



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

Διπλωματική εργασία  
ΠΥΡΟΒΕΤΣΗ ΑΛΕΞΑΝΔΡΑ

“ Μοριακή ανάλυση του γονιδίου DRB του μείζονος  
συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας (MHC) στα είδη λαγών  
*Lepus europaeus* και *Lepus timidus* ”



ΛΑΡΙΣΣΑ

Ακαδημαϊκό έτος 2006-2007



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

Αριθ. Εισ.: 5199/1

Ημερ. Εισ.: 08-03-2007

Δωρεά: Π.Θ.

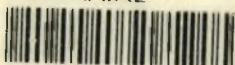
Ταξιδετικός Κωδικός: ΠΤ - ΒΒ

2007

ΠΥΡ



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ  
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



004000087654

## *Ευχαριστίες*

Πρώτα από κάθε άλλον, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κο Μαμούρη Ζήση για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε να μου αναθέσει αυτήν τη διπλωματική εργασία όπως και για τη βοήθεια και την διαρκή καθοδήγησή του κατά τη συγγραφή της. Επίσης ευχαριστώ τα υπόλοιπα μέλη της τριμελούς επιτροπής που δέχτηκαν να συμμετέχουν σε αυτήν και για το χρόνο που αφιέρωσαν για να διορθώσουν την εργασία.

Οφείλω ένα μεγάλο ευχαριστώ στον υποψήφιο Διδάκτορα κο Σταμάτη Κώστα για την υπομονή που έδειξε και την προθυμία να βοηθήσει σε κάθε πρόβλημα που αντιμετώπισα κατά τη διάρκεια του πειραματικού μέρους. Χωρίς την συμπαράσταση και τις πολύτιμες παρεμβάσεις του, η εκπόνηση της εργασίας δεν θα ήταν εφικτή.

Θερμές ευχαριστίες θα ήθελα επίσης να δώσω σε όλα τα μέλη που απάρτιζαν το προσωπικό του εργαστηρίου τη χρονική περίοδο που απασχολήθηκα κι εγώ, για την πολύ καλή συνεργασία και την υποστήριξή τους, αλλά και για την ευχάριστες στιγμές που πέρασα μαζί τους.

# Περιεχόμενα

ΠΕΡΙΛΗΨΗ .....	4
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	
1.1 Τα είδη <i>Lepus europaeus</i> και <i>Lepus timidus</i> .....	5
1.1.1 <i>Lepus europaeus</i> (ευρωπαϊκός λαγός).....	5
1.1.2 <i>Lepus timidus</i> (ορεινός λαγός).....	8
1.2 Ο γονιδιακός τόπος του MHC .....	11
1.2.1 Δομή - λειτουργία μορίων MHC.....	14
1.2.1.1 MHC τάξης I.....	14
1.2.1.2 MHC τάξης II.....	15
1.2.2 Ποικιλομορφία του MHC.....	17
1.2.2.1 Προέλευση της ποικιλομορφίας των αλληλομόρφων MHC.....	17
1.2.2.2 Μηχανισμοί που διατηρούν αυτόν τον πολυμορφισμό στο MHC.....	18
1.2.3 Προέλευση του MHC.....	19
1.2.4 Το γονίδιο DRB.....	23
1.3 Η μέθοδος SSCP στην ανάλυση της ποικιλομορφίας.....	25
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	
2.1 Απομόνωση ολικού DNA από ιστό λαγού.....	28
2.2 Υπολογισμός συνολικής ποσότητας DNA με φωτομέτρηση.....	31
2.3 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR).....	32
2.4 Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης.....	36
2.5 Αποδιάταξη του DNA.....	38
2.6 Ανάλυση SSCP.....	39
2.6.1 Προετοιμασία πηκτής.....	39
2.6.2 Χρώση με νιτρικό άργυρο (Silver Staining).....	41
2.7 Καθαρισμός DNA από διάλυμα.....	43
2.8 Προσδιορισμός της αλληλουχίας DNA (Sequencing).....	44

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	47
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	54
5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	59

**Μοριακή ανάλυση του γονιδίου DRB του μείζονος  
συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας (MHC) στα είδη λαγών  
*Lepus europaeus* και *Lepus timidus***

***Περίληψη***

Το μείζον σύμπλεγμα ιστοσυμβατότητας (MHC) αποτελείται από μια ομάδα γονιδίων τα οποία παίζουν πολύ σημαντικό ρόλο στο ανοσοποιητικό σύστημα των σπονδυλωτών. Ο γενετικός τόπος του MHC είναι ο πλέον πολυμορφικός του γονιδιώματος. Στην παρούσα μελέτη εξετάζεται ο πολυμορφισμός στο εξόνιο 2 του γονιδίου DRB του MHC σε πληθυσμούς *Lepus europaeus* και *Lepus timidus* από την Ελβετία, όπου τα δύο είδη συνυπάρχουν και συχνά υβριδίζονται. Για τον προσδιορισμό της ποικιλομορφίας χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος ανάλυσης "πολυμορφισμού διαμόρφωσης του μονού κλώνου" (SSCP). Τα αποτελέσματα έδειξαν την ύπαρξη 9 διαφορετικών αλληλομόρφων σε 112 άτομα *Lepus europaeus* (8% ποικιλομορφία) και 7 διαφορετικών αλληλομόρφων σε 90 άτομα *Lepus timidus* (7,7% ποικιλομορφία). Εξετάζονται λοιπόν τα πιθανά αίτια της μειωμένης ποικιλομορφίας καθώς και τα αποτελέσματα της αλληλεπίδρασης των δύο ειδών μεταξύ τους.

## Τα είδη *Lepus europaeus* και *Lepus timidus*

### ❖ *Lepus europaeus* (ευρωπαϊκός λαγός)



Εικόνα 1: Ο *Lepus europaeus*

#### Συστηματική κατάταξη

Βασίλειο: Ζώων

Φύλο: Χορδωτά

Υποφύλο: Σπονδυλωτά

Κλάση: Θηλαστικά

Τάξη: Λαγόμορφα

Οικογένεια: *Leporidae*

Γένος: *Lepus*

Είδος: *europaeus*

#### Γεωγραφικό εύρος

Η φυσική κατανομή των ευρωπαϊκών λαγών συμπεριλαμβάνει τη Μεγάλη Βρετανία και τη Δυτική Ευρώπη και ανατολικά από τη Μέση Ανατολή μέχρι την Κεντρική Ασία (Lincoln, 1974; Broekhuizen & Maaskamp, 1980; Caillol & Meunier, 1989; Poli *et al.*, 1991). Έχουν εισαχθεί από τον άνθρωπο σε αρκετές άλλες ηπείρους και βρίσκονται πλέον και στον Καναδά, στις Η.Π.Α., σε διάφορες περιοχές της Νότιας και Κεντρικής Αμερικής και στην Αυστραλία (Bonino & Montenegro, 1997; Broekhuizen & Maaskamp, 1980; Caillol *et al.*, 1988; Hall & Kelson, 1959; Lincoln, 1974; Poli *et al.*, 1991).



Εικόνα 2: Η κατανομή του *L. europaeus* στη γη.

### Κατοικία

Οι ευρωπαϊκοί λαγοί προτιμούν ανοιχτούς αγρούς και βοσκότοπους οριοθετημένους από δασικές εκτάσεις. Ζουν σε ρηχές φωλιές, συστάδες χόρτου ή θάμνους (Peterson, 1966; Bansfield, 1974; William & Whitaker, 1943).

### Φυσική περιγραφή

Έχουν μάζα από 3 έως 5 kg και συνολικό μήκος 600-750 mm. Τα αυτιά τους είναι μακριά, 94-102 mm, με μαύρες άκρες ενώ είναι γκρι στο εσωτερικό. Η ουρά με μήκος 72-110 mm είναι μαύρη στο πάνω μέρος και άσπρη στο κάτω. Το τρίχωμα έχει διάφορες αποχρώσεις του καφέ εκτός από την κοιλιά που είναι γκρι-άσπρη. Το κεφάλι είναι καφέ με χρωματιστούς κύκλους γύρω από τα μάτια. Το χειμώνα ο *L. europaeus* δεν αλλάζει το τρίχωμά του σε άσπρο, απλώς γίνεται ελαφρώς πιο γκριζο (Peterson, 1966; Bansfields, 1974; Dragg, 1974). Δεν έχει παρατηρηθεί σεξουαλικός διμορφισμός.



Εικόνα 3: Τυπικό δείγμα *L. europaeus*

### Αναπαραγωγή

Η αναπαραγωγική περίοδος για τον *L. europaeus* είναι μεταξύ μέσων χειμώνα (Ιανουάριος/Φεβρουάριος) και μέσων καλοκαιριού. Η περίοδος κυοφορίας κυμαίνεται μεταξύ 30 και 42 ημερών (Bansfield, 1974; Peterson, 1966). Οι νέοι λαγοί φτάνουν σε σεξουαλική ωριμότητα σε ηλικία 8 μηνών έως 1 χρόνου. Για να προστατέψει τα νεογνά από κάποια επίθεση θηρευτή που θα τα αφάνιζε όλα, η μητέρα τα σκορπίζει σε μια ευρεία περιοχή και κάνει κύκλους για να τα φροντίσει (Bansfield, 1974).



### *Συμπεριφορά*

Οι ευρωπαϊκοί λαγοί είναι κυρίως μοναχικά ζώα με εξαίρεση την περίοδο ζευγαρώματος. Είναι νυκτόβια και αναζητούν τροφή κυρίως τη νύχτα. Διαθέτουν ιδιαίτερα ανεπτυγμένη την αίσθηση της όρασης, όσφρησης και ακοής. Μόλις αντιληφθούν θηρευτή τρέχουν με πολύ μεγάλη ταχύτητα (60km/h στην ευθεία) με τη δυνατότητα γρήγορων ελιγμών. Εάν χρειαστεί βουτούν και στο νερό καθώς είναι αρκετά καλοί κολυμβητές (William & Whitaker; Bansfield, 1974). Στους θηρευτές τους συμπεριλαμβάνονται οι αλεπούδες, τα κογιότ, τα γεράκια και οι κουκουβάγιες.

### *Διατροφικές συνήθειες*

Είναι φυτοφάγα ζώα καθώς τρώνε χόρτα, βότανα και διάφορες σοδιές από χωράφια κατά τη διάρκεια του καλοκαιριού. Το χειμώνα τρέφονται με κλαδάκια, μπουμπούκια και φλούδες μικρών σπυροφόρων δέντρων. Χαρακτηριστικό τους είναι και η κοπροφαγία (Banfield, 1974; William & Whitaker, 1943; Peterson, 1966).

### *Οικονομική σημασία για τον άνθρωπο*

Σε περιοχές όπως η Αργεντινή, η Αυστραλία και η Νότια Αμερική ο *L. euroraeus* αποτελεί παράσιτο εξαιτίας της γρήγορης αναπαραγωγής του και των καταστροφών που προκαλεί στη γεωργία (Bonino & Montenegro, 1997; Bansfield, 1974; William & Whitaker, 1943). Ειδικά στη Βόρεια Αμερική αποτελεί ένα σημαντικό θήραμα λόγω του άσπρου και εξαιρετικά νόστιμου κρέατος του (William & Whitaker, 1943; Bansfield, 1974).

## ◊ *Lepus timidus* (ορεινός λαγός)



Εικόνα 4: Ο *Lepus timidus*

### Συστηματική κατάταξη

Βασίλειο: Ζώων

Φύλο: Χορδωτά

Υποφύλο: Σπονδυλωτά

Κλάση: Θηλαστικά

Τάξη: Λαγόμορφα

Οικογένεια: *Leporidae*

Γένος: *Lepus*

Είδος: *timidus*

### Γεωγραφικό εύρος

Ο *L. timidus* έχει μια γενική ζώνη διαβίωσης που καλύπτει μεγάλο μέρος της Παλαιαρκτικής περιοχής (Angerbojorn & Flux, 1995; Corbet & Harris, 1991).



Εικόνα 5: Η κατανομή του *L. timidus* στη γη.

### Κατοικία

Ευδοκιμούν σε τρεις κύριους τύπους κατοικίας: στην τούνδρα, στα δάση και στους βάλτους της Σκωτίας και της Ιρλανδίας. Μεγάλοι πληθυσμοί λαγών βρίσκονται στις μεταβατικές ζώνες όλων αυτών των ανοιχτών ενδιαιτημάτων. Κατά τη διάρκεια του χειμώνα μετακινούνται σε πιο προφυλαγμένες περιοχές (Ognev, 1966).

### Φυσική περιγραφή

Η εμφάνισή των ορεινών λαγών ποικίλλει γεωγραφικά ανάλογα με τον τύπο ενδιαιτήματος και το υψόμετρο. Η μάζα τους κυμαίνεται από 1 έως 4 kg και το μήκος του σώματος και κεφαλιού μεταξύ 430 και 610 mm. Η ουρά μπορεί να είναι κοντή (40mm) έως μακριά (70mm) και το μήκος των αυτιών μεταξύ 76-106 mm. Ο χρωματισμός αλλάζει με τη φωτοπερίοδο και συμπεριλαμβάνει 3 περιόδους. Στην πρώτη, από Ιούνιο μέχρι Σεπτέμβριο, το τρίχωμα αλλάζει από καφέ σε καφέ με άσπρες κηλίδες. Κατά τη διάρκεια της δεύτερης περιόδου, από Οκτώβριο μέχρι Ιανουάριο, μετατρέπεται σε γκρι/άσπρο. Στην τρίτη, από Φεβρουάριο μέχρι Μάη, από άσπρο ξαναγίνεται καφέ. Οι αλλαγές αυτές συμβαίνουν γρηγορότερα σε μία πρώιμη, ζεστή άνοιξη καθώς η θερμοκρασία και το χιόνι που καλύπτει το έδαφος επηρεάζουν αυτόν το ρυθμό. Οι αρσενικοί ορεινοί λαγοί είναι μικρότεροι από τους θηλυκούς με εποχιακή διακύμανση στο βάρος. Οι βόρειοι λαγοί είναι επίσης βαρύτεροι από τους νότιους (Ognev, 1966; Corbet & Harris, 1991).



Εικόνα 6: Οι χρωματικές αλλαγές που συμβαίνουν στο τρίχωμα του *L. timidus* εποχιακά.

### Αναπαραγωγή

Αφού επέλθει η ωριμότητα, μετά τον πρώτο χρόνο ζωής, τα θηλυκά γεννούν 1-2 φορές το χρόνο 1-4 μικρά. Σε περίπτωση που έλθει νωρίς η άνοιξη μπορεί να γεννήσουν μέχρι και 3 φορές. Το μέγεθος της γέννας συσχετίζεται με το μέγεθος της μητέρας και μεγαλύτερες μητέρες κάνουν περισσότερα μικρά. Αυτό όμως ποικίλλει με την περιοχή και το ενδιαίτημα. Η

περίοδος αναπαραγωγής είναι από τον Ιανουάριο μέχρι το Σεπτέμβριο και ελέγχεται επίσης από τη φωτοπερίοδο. Η κυοφορία διαρκεί 47-54 μέρες (Ognev, 1966).

### *Συμπεριφορά*

Η κοινωνική οργάνωση των ορεινών λαγών είναι ένα σπάνιο παράδειγμα συστήματος κυριαρχούμενο από θηλυκά. Ο *L. timidus* είναι ζώο νυκτόβιο και περνάει το μεγαλύτερο μέρος της μέρας του μέσα σε φωλιές είτε στο χιόνι είτε στο έδαφος που μειώνει σημαντικά τα ρεύματα αέρα. Συνήθως οι φωλιές δε χρησιμοποιούνται επανειλημμένα αλλά εγκαταλείπονται (Angerbojorn & Flux, 1995).

### *Διατροφικές συνήθειες*

Η διαίτα του *L. timidus* ποικίλλει όχι μόνο σύμφωνα με το ενδιαίτημα, αλλά και με την εποχή. Το καλοκαίρι, οι δασικοί πληθυσμοί καταναλώνουν κυρίως φύλλα και κλαδάκια, ενώ αυτοί που κατοικούν στην τούνδρα τρώνε αλπικά φυτά. Το χειμώνα, όταν το μεγαλύτερο μέρος της τροφής είναι θαμμένο κάτω από το χιόνι, τα ρείκια είναι η κυρίαρχη πηγή τροφής. Εφόσον σπάνια έχουν παρατηρηθεί να πίνουν νερό, πιστεύεται ότι μπορεί να τρώνε χιόνι (Angerbojorn & Flux, 1995; Corbet & Harris, 1991).

### *Οικονομική σημασία για τον άνθρωπο*

Μερικές φορές το χειμώνα, όταν δεν είναι διαθέσιμη πολλή τροφή, καταστρέφουν διάφορες καλλιέργειες (δημητριακά, οπωροφόρα δέντρα). Αν και δε θεωρείται ιδιαίτερα εδώδιμος, τρώγεται ως κυνήγι σε μερικές περιοχές της Ιρλανδίας (Corbet & Harris, 1991).

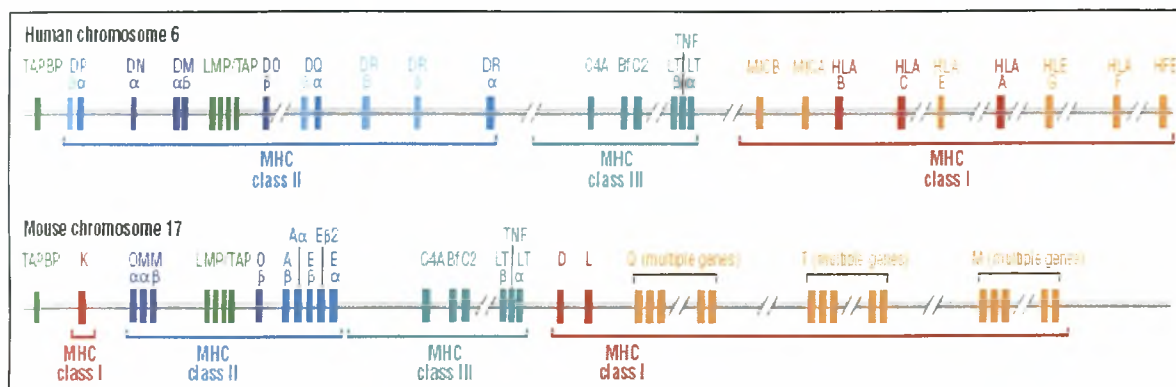
## *Ο γονιδιακός τύπος του ΜΗC*

Τα μόρια του μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας (Major Histocompatibility Complex, ΜΗC) είναι πρωτεΐνες της μεμβράνης των αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων (Antigen Presenting Cells, APCs) που παρουσιάζουν πεπτίδια από πρωτεϊνικά αντιγόνα ώστε να αναγνωριστούν από τα Τ λεμφοκύτταρα. Ενώ σήμερα γνωρίζουμε ότι αυτή είναι η φυσιολογική λειτουργία των μορίων ΜΗC, το ΜΗC πρωτοανακαλύφθηκε ως ο γενετικός τύπος που καθόριζε κατά κύριο λόγο την αποδοχή ή την απόρριψη μοσχευμάτων από ένα άτομο σε άλλο. Με άλλα λόγια, τα άτομα που είναι πανομοιότυπα στον τύπο ΜΗC (ομόμικτα ζώα και μονοζυγωτικοί δίδυμοι) θα αποδεχτούν μοσχεύματα το ένα του άλλου, ενώ άτομα που διαφέρουν στον τύπο του ΜΗC θα απορρίψουν τα μοσχεύματα αυτά. Εφόσον όμως η απόρριψη μοσχεύματος δεν αποτελεί φυσικό βιολογικό φαινόμενο, δεν είναι δυνατόν τα γονίδια του ΜΗC να εξελίχθηκαν μόνο για αυτόν το σκοπό, όπως και διαπιστώθηκε (Abbas & Lichtman: **Basic Immunology**).

Το ΜΗC είναι ένα σύνολο γονιδίων με ανοσολογικές και μη λειτουργίες και βρίσκεται σε όλα τα μέχρι τώρα μελετημένα σπονδυλωτά (Trowsdale, 1995; Gruen & Weissman, 1997). Η δράση του μπορεί να περιγραφεί ως πλειοτροπική, δηλαδή πολλαπλές μη-συσχετιζόμενες λειτουργίες (Bodmer, 1972; Meruelo & Edidin, 1980; Jonker & Balner, 1980; Dausset, 1981). Ανάμεσα στις μη-ανοσολογικές λειτουργίες, οι πιο αξιοσημείωτες είναι οι αλληλεπιδράσεις με άλλους υποδοχείς της κυτταρικής επιφάνειας (Svejgaard & Ryder, 1976; Edidin, 1988), συγκεκριμένα με τον υποδοχέα της τρανσφερίνης (TfR), τον επιδερμικό αυξητικό παράγοντα (Schreiber et al., 1984) και διάφορους υποδοχείς ορμονών (Phillips et al., 1986; Solano et al., 1988; Verland et al., 1989) όπως και στη μεταγωγή σήματος (Schafer et al., 1995). Το ΜΗC επίσης εμποδίζει την ομομιξία μέσω της επιρροής του

στην επιλογή συντρόφου στα ποντίκια (Williams & Lenington, 1993; Potts, 1991) και στους ανθρώπους (Ober et al., 1997; Wedekind et al., 1995) και στις αναπαραγωγικές διαδικασίες σε αρουραίους (Palm, 1974), ποντίκια (Hamilton & Hellstrom, 1978; Wedekind et al., 1996) και ανθρώπους (Ober et al., 1992; Jin et al., 1995). Οι αναπαραγωγικοί μηχανισμοί ποικίλλουν από επιλεκτική γονιμοποίηση μέχρι επιλεκτική αποβολή. Ένα κύριο κοινό σημείο των συστημάτων συμβατότητας είναι ότι ευνοούν τη γενετική ανομοιότητα μεταξύ των ζευγαριών και των γαμετών (επιλογή συντρόφου, επιλεκτική γονιμοποίηση), αλλά την ομοιότητα όσον αφορά σε περιπτώσεις όπως η αναγνώριση συγγενικών ειδών και η συμβατότητα μοσχεύματος (Brown, 1983; Jones & Partridge, 1983). Όλες αυτές οι λειτουργίες βασίζονται στην πρόβλεψη ενός φαινοτύπου που αντιπροσωπεύει την γενετική ταυτότητα του ατόμου από το MHC: είτε μόρια επιφάνειας είτε χημειοισθητήρια σήματα.

Τα μόρια του μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας στους ανθρώπους ονομάζονται ανθρώπινα λευκοκυτταρικά αντιγόνα (Human Leukocyte Antigens, HLA), επειδή πρώτα ανακαλύφθηκαν σαν αντιγόνα λευκοκυττάρων τα οποία ταυτοποιήθηκαν με ειδικά αντισώματα. Ο γενετικός τόπος HLA εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 6p21.31 και καλύπτει μία περιοχή περίπου 3,6Mbp, ανάλογα με τον απλότυπο (Trowsdale, 1995). Τα πιο καλά μελετημένα γονίδια HLA είναι τα εννιά επονομαζόμενα "κλασικά" γονίδια MHC: HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DPA1, HLA-DPB1, HLA-DQA1, HLA-DQB1, HLA-DRA, και HLA-DRB1.



- █ classical MHC class I molecules
- █ classical MHC class II molecules
- █ components of antigen processing and loading machinery
- █ non-classical MHC class I molecules
- █ non-classical MHC class II molecules
- █ complement components and cytokine

Εικόνα 7: Ένα απλοποιημένο διάγραμμα του ανθρώπινου MHC στο χρωμόσωμα 6 και του MHC του ποντικιού στο χρωμόσωμα 17 ακριβώς από κάτω. Η οργάνωση του MHC στα δύο είδη έχει πολλές ομοιότητες.

Σε όλα τα είδη ο γενετικός τόπος MHC περιέχει δύο ομάδες εξαιρετικά πολυμορφικών γονιδίων, τα γονίδια του MHC τάξης I και II. Τα γονίδια αυτά κωδικοποιούν αντίστοιχα τα μόρια MHC τάξης I και II τα οποία παρουσιάζουν πεπτιδία στα T κύτταρα. Επιπλέον από τα πολυμορφικά γονίδια, ο τόπος MHC περιέχει πολλά μη-πολυμορφικά γονίδια. Ορισμένα από αυτά κωδικοποιούν πρωτεΐνες που εμπλέκονται στην παρουσίαση αντιγόνων και άλλα κωδικοποιούν πρωτεΐνες με άγνωστη λειτουργία.

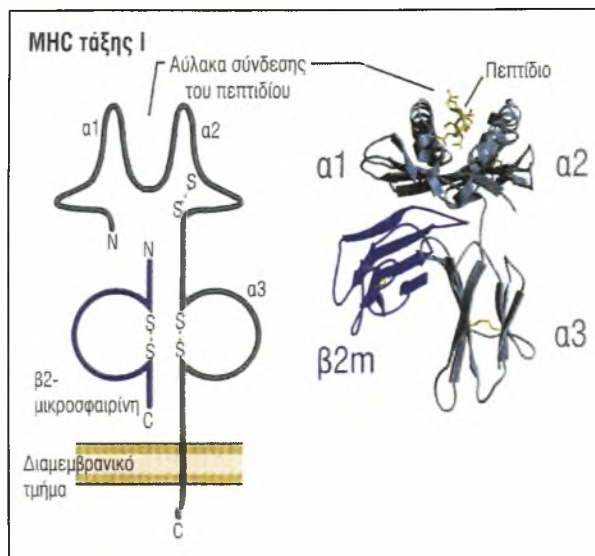
Τα μόρια MHC τάξης I και II είναι μεμβρανικές πρωτεΐνες η καθεμία από τις οποίες περιέχει μια αύλακα σύνδεσης του πεπτιδίου στο αμινοτελικό τους άκρο. Αν και η σύνθεση των υπομονάδων των μορίων τάξης I και II είναι διαφορετική, η συνολική τους δομή μοιάζει πολύ (Abbas & Lichtman: **Basic Immunology**).

## Δομή - Λειτουργία μορίων ΜHC

### ΜHC τάξης I

Τα μόρια της τάξης I βρίσκονται στη μεμβράνη όλων των εμπύρηνων κυττάρων και παρουσιάζουν αντιγόνα στα κυτταροτοξικά Τ λεμφοκύτταρα - CD8<sup>+</sup> (τα CD8<sup>+</sup> Τ κύτταρα μπορούν να απαντήσουν μόνο σε πεπτιδία που παρουσιάζονται από μόρια ΜHC τάξης I). Στον άνθρωπο υπάρχουν τρία

πολυμορφικά γονίδια τάξης I: HLA-A, HLA-B και HLA-C. Όλα τα γονίδια τάξης I έχουν μέγεθος μεταξύ 3 και 6 kb (Browning, 1996), ενώ κάθε μόριο τάξης I αποτελείται από μια α αλυσίδα, μη ομοιοπολικά συνδεδεμένη σε μία πρωτεΐνη, τη β2-μικροσφαιρίνη, η οποία κωδικοποιείται εκτός του ΜHC.



Εικόνα 8: Σχηματική απεικόνιση και μοντέλο κρυσταλλικής δομής του μορίου ΜHC τάξης I.

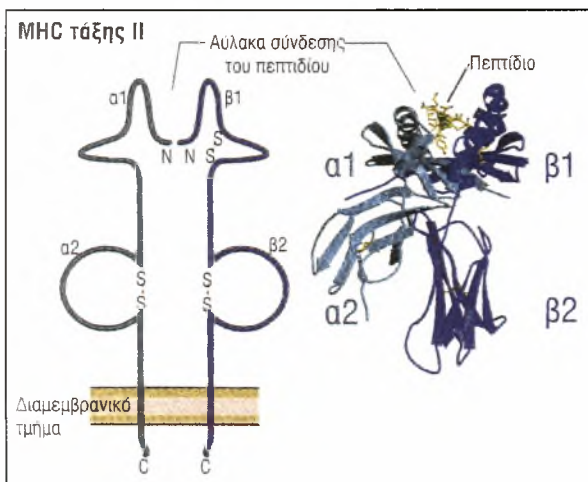
Τα αμινοτελικά τμήματα των περιοχών α1 και α2 του μορίου ΜHC τάξης I σχηματίζουν μια αύλακα σύνδεσης του πεπτιδίου, η οποία είναι αρκετά μεγάλη ώστε να εφαρμόζει πεπτιδία 8 έως 11 αμινοξέων. Τα πεπτιδία που θα παρουσιαστούν στα Τ λεμφοκύτταρα συνδέονται στην βάση της αύλακας σύνδεσης του πεπτιδίου, ενώ ο υποδοχέας των Τ κυττάρων έρχεται σε επαφή με τις πλευρές της αύλακας (ο υποδοχέας βέβαια, έρχεται σε επαφή και με τμήματα του πεπτιδίου που παρουσιάζεται). Τα πολυμορφικά αμινοξέα των μορίων τάξης I, δηλαδή τα αμινοξέα που διαφέρουν μεταξύ των μορίων ΜHC διαφορετικών ατόμων, εντοπίζονται στις περιοχές α1 και α2 της α αλυσίδας. Ορισμένα από αυτά τα πολυμορφικά αμινοξέα συνεισφέρουν στη δημιουργία μορφολογικών παραλλαγών στη βάση της αύλακας σύνδεσης του



πεπτιδίου και επομένως στην ικανότητα διαφορετικών μορίων ΜHC να παρουσιάζουν πεπτίδια. Άλλα πολυμορφικά αμινοξέα συνεισφέρουν σε διαφοροποιήσεις στα πλάγια των αυλάκων και επομένως επηρεάζουν την αναγνώριση από Τ κύτταρα. Η περιοχή α3 είναι σταθερή και περιέχει τη θέση σύνδεσης για το συνυποδοχέα CD8 των Τ κυττάρων (Abbas & Lichtman: **Basic Immunology**).

### ΜHC τάξης II

Τα μόρια της τάξης II βρίσκονται μόνο στην επιφάνεια επαγγελματικών αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων (Β λεμφοκύτταρα, μακροφάγα, δενδριτικά κύτταρα). Όσον αφορά στον άνθρωπο, υπάρχουν τρεις ομάδες πολυμορφικών γονιδίων τάξης II: HLA-DR, HLA-DQ και HLA-DP,



Εικόνα 9: Σχηματική απεικόνιση και μοντέλο κρυσταλλικής δομής του μορίου ΜHC τάξης II.

ενώ κάθε γονίδιο έχει μήκος 4-11 kb (Browning, 1996). Κάθε μόριο ΜHC τάξης II αποτελείται από δύο αλυσίδες, τις α και β. Τα αμινοτελικά τμήματα και των δύο αλυσίδων, οι περιοχές α1 και β1, περιέχουν πολυμορφικά αμινοξέα και σχηματίζουν μια αύλακα αρκετά μεγάλη ώστε να

εφαρμόζουν πεπτίδια μήκους 10 έως 30 αμινοξέων. Η μη-πολυμορφική περιοχή β2 περιέχει τη θέση σύνδεσης του συνυποδοχέα CD4 των Τ λεμφοκυττάρων. Επειδή το CD4 συνδέεται με τα μόρια της τάξης II, τα CD4<sup>+</sup> Τ κύτταρα απαντούν μόνο σε πεπτίδια που παρουσιάζονται από μόρια ΜHC τάξης II (Abbas & Lichtman: **Basic Immunology**).

Ένα σημαντικό χαρακτηριστικό των γονιδίων MHC είναι ότι η έκφρασή τους είναι συγκυρίαρχη, δηλαδή τα αλληλόμορφα που κληρονομούνται από κάθε γονέα εκφράζονται εξίσου. Επειδή υπάρχουν τρία πολυμορφικά γονίδια τάξης I στον άνθρωπο (HLA -A, HLA-B και HLA-C) και κάθε άτομο κληρονομεί μία τριάδα από τα γονίδια αυτά από κάθε γονέα, κάθε κύτταρο μπορεί να εκφράσει μέχρι και έξι διαφορετικά μόρια MHC. Στην περίπτωση δε των τριών ομάδων πολυμορφικών γονιδίων τάξης II (HLA-DR, HLA-DQ και HLA-DP) και η α και η β αλυσίδα είναι πολυμορφικές. Καθώς η α αλυσίδα από το ένα αλληλόμορφο μπορεί να συνδυαστεί με τη β αλυσίδα από το άλλο αλληλόμορφο, οι συνδυασμοί τους δημιουργούν ορισμένα υβριδικά μόρια τάξης II, έτσι ώστε μπορούν να εκφραστούν 10 έως 20 διαφορετικά μόρια MHC (Abbas & Lichtman: **Basic Immunology**).

Ένα άλλο χαρακτηριστικό των γονιδίων του MHC αποτελεί το ότι είναι εξαιρετικά πολυμορφικά, δηλαδή υπάρχουν πολλά διαφορετικά αλληλόμορφα σε διαφορετικά άτομα ενός πληθυσμού. Ο πολυμορφισμός είναι τόσο μεγάλος ώστε σε συνήθεις ανοιχτούς πληθυσμούς δεν υπάρχουν δύο άτομα με τα ίδια ακριβώς γονίδια και μόρια MHC. Επειδή τα πολυμορφικά αμινοξέα καθορίζουν ποια πεπτίδια θα παρουσιαστούν από κάθε μόριο MHC, η ύπαρξη πολλαπλών αλληλομόρφων εξασφαλίζει ότι τουλάχιστον κάποιο μέλος του πληθυσμού θα μπορεί να παρουσιάσει πρακτικά οποιοδήποτε αντιγόνο μικροοργανισμού. Έχει διατυπωθεί η υπόθεση ότι ο πολυμορφισμός δημιουργήθηκε εξελικτικά για να εξασφαλιστεί ότι ο πληθυσμός δε θα υποκύψει σε ένα νέο μικροοργανισμό ή σε έναν παλιό μικροοργανισμό που έχει μεταλλάξει κάποια πρωτεΐνη του, γιατί τουλάχιστον κάποια άτομα θα είναι ικανά να εγείρουν αποτελεσματικές ανοσοαπαντήσεις κατά οποιουδήποτε πεπτιδίου. Τα μόρια MHC κωδικοποιούνται από κληρονομούμενες αλληλουχίες DNA και οι παραλλαγές στις οποίες οφείλονται οι πολυμορφισμοί δεν προκαλούνται από ανασυνδυασμό γονιδίων (Abbas & Lichtman: **Basic Immunology**).

## *Ποικιλομορφία του ΜΗC*

### *Προέλευση της ποικιλομορφίας των αλληλομόρφων ΜΗC*

Οι γενετικοί τόποι του μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας (ΜΗC) είναι πολύ πολυμορφικοί σε ανθρώπους, ποντίκια και ορισμένα άλλα θηλαστικά, με ετεροζυγωτία που φτάνει το ποσοστό 80-90%. Τέσσερις διαφορετικές υποθέσεις έχουν διατυπωθεί για να εξηγηθεί αυτός ο υψηλός βαθμός πολυμορφισμού: (1) υψηλός ρυθμός μεταλλάξεων, (2) γονιδιακή μετατροπή ή ανασυνδυασμός μεταξύ γενετικών τόπων, (3) ισοζυγούσα επιλογή και (4) συχνοεξαρτώμενη επιλογή.

Η κατανομή του προτύπου πολυμορφισμού της γενετικής ακολουθίας στα γονίδια της τάξης I στον άνθρωπο και στο ποντίκι παρέχει ενδείξεις για τέσσερις συντονισμένους παράγοντες που συμβάλλουν στη δημιουργία και διατήρηση αλληλομορφικής ποικιλομορφίας η οποία χαρακτηρίζει το ΜΗC. Αυτοί συμπεριλαμβάνουν: α) μία σταδιακή συσσώρευση τυχαίων μεταλλάξεων κατά τη διάρκεια του εξελικτικού χρόνου, αλλά όχι έναν ασυνήθιστα υψηλό ρυθμό μεταλλαξιγένεσης, β) αρνητική επιλογή σε μεταλλάξεις των περιοχών του μορίου τάξης I που εμπλέκεται στην αλληλεπίδραση με τον υποδοχέα των T κυττάρων, καθώς και των περιοχών που αλληλεπιδρούν με κοινά χαρακτηριστικά των αντιγόνων, γ) θετική επιλεκτική πίεση προς διατήρηση του πολυμορφισμού και της ετεροζυγωτίας στην περιοχή αναγνώρισης αντιγόνου και δ) περιοδικός ενδογονιδιακός (μεταξύ των αλληλομόρφων) και σπανιότερα διαγονιδιακός ανασυνδυασμός στα γονίδια τάξης I.

Θα πρέπει να δοθεί έμφαση στο γεγονός ότι η εξελικτική αλληλεπίδραση μεταξύ μετάλλαξης και ανασυνδυασμού ποικίλλει μεταξύ των γονιδίων του ΜΗC, ακόμη και μεταξύ περιοχών του ίδιου γονιδίου (Parham & Ohta, 1996; Hughes & Nei, 1988; Hughes & Nei, 1989). Η κύρια πηγή ποικιλομορφίας των αλληλουχιών των γονιδίων HLA είναι οι σημειακές

μεταλλάξεις, αλλά ο ρυθμός μεταλλαξιγένεσης δεν είναι σε καμία περίπτωση υψηλότερος στο ΜΗC από το υπόλοιπο γονιδίωμα (Lawlor et al., 1988; Parham et al., 1995). Εξαιτίας του πολυμορφισμού μεταξύ των ειδών (transspecies polymorphism), η συσσώρευση σημειακών μεταλλάξεων κατά την πάροδο εκατομμυρίων χρόνων είχε ως αποτέλεσμα εκτεταμένο πολυμορφισμό. Σε αντίθεση, οι γονιδιακές μετατροπές έχουν παράγει τουλάχιστον 80 νέα αλληλόμορφα τάξης I από το διαχωρισμό του Homo και ο ρυθμός μετατροπής είναι πολύ υψηλότερος από αυτόν των σημειακών μεταλλάξεων (Zangenberg et al., 1995).

#### *Μηχανισμοί που διατηρούν αυτόν τον πολυμορφισμό στο ΜΗC*

Η επιλογή που καθοδηγείται από παθογόνους παράγοντες ευνοεί τη γενετική ποικιλομορφία του ΜΗC μέσω και του πλεονεκτήματος του ετεροζυγώτη (υπερκυριαρχία) και της συχνοεξαρτώμενης επιλογής (Potts & Wakeland, 1993). Η επιλογή θεωρείται ότι ευνοεί σπάνιους γονότυπους, εφόσον είναι πιθανότερο οι παθογόνοι μικροοργανισμοί να έχουν αναπτύξει μηχανισμούς έτσι ώστε να αποφεύγουν την ΜΗC-εξαρτώμενη ανοσία που κωδικοποιείται από συνηθισμένους γονότυπους (Potts & Slev, 1995).

Όσον αφορά τους μηχανισμούς που είναι ανεξάρτητοι από παθογόνους παράγοντες, το ΜΗC χρησιμοποιείται για να διακρίνει τη γενετική ομοιότητα σε άκρως πολυμορφικούς γενετικούς τόπους προς αποφυγή ομομιξίας. Η βάση αυτού του μηχανισμού είναι ότι υπάρχουν είδη σπονδυλωτών που ανιχνεύουν το γονότυπο του ΜΗC από τη μυρωδιά (Boyse et al., 1983; Brown et al., 1987; Singh et al., 1987). Εφόσον λοιπόν οι κοινοί υψηλά πολυμορφικοί γενετικοί μάρτυρες πιθανόν να σημαίνουν συγγένεια, η αποφυγή ζευγαρώματος με ζώα που έχουν παρόμοιο γονότυπο ΜΗC μειώνει την πιθανότητα ομομιξίας. Έτσι λοιπόν το γενετικό πλεονέκτημα των μορίων

MHC να εμφανίζουν υψηλό βαθμό πολυμορφισμού οδηγεί σε παραγωγή εύρωστων ετερόζυγων απογόνων και συνεπώς με αυξημένη ανθεκτικότητα έναντι σε παθογόνα.

### *Προέλευση του MHC*

Δεν υπάρχει συγκεκριμένο υποψήφιο μόριο για το προγονικό γονίδιο MHC. Σύμφωνα με μία υπόθεση το μόριο MHC που εμφανίστηκε πρώτο στην ιστορία της εξέλιξης ανήκει στην τάξη II (Hughes et al., 1993), ενώ σύμφωνα με άλλη θεωρία υποστηρίζεται ότι πρώτα δημιουργήθηκαν τα μόρια τάξης I ως αποτέλεσμα ανασυνδυασμού ανάμεσα σε μια καρβοξυτελική περιοχή μιας ανοσοσφαιρίνης και τη πεπτιδοδεσμεύουσα περιοχή μιας HSP-70 πρωτεΐνης θερμικού σοκ (Flaznik et al., 1991). Φυλογενετική ανάλυση που πραγματοποίησαν οι Hughes & Nei (1993), έδειξε ότι υπάρχει σχέση μεταξύ της α αλυσίδας των μορίων MHC τάξης II και της β2-μικροσφαιρίνης, καθώς και ανάμεσα στη β αλυσίδα των μορίων MHC τάξης II και της α αλυσίδας των μορίων MHC τάξης I. Τα περισσότερα στοιχεία υποστηρίζουν ότι το προγονικό MHC μόριο παρουσίαζε δομική ομοιότητα με τα μόρια MHC II τα οποία στη συνέχεια έδωσαν γένεση στα μόρια του MHC I (Hughes & Nei, 1993; Lawlor et al., 1990; Klein & O'Uigin, 1993). Ωστόσο οι υποθέσεις αυτές δεν μπορούν να εξηγήσουν τη φύση του πρώτου γονιδίου MHC. Ο Ohno (1987) προτείνει ότι οι πρωτεΐνες προσκόλλησης που εντοπίζονται στη πλασματική μεμβράνη των κυττάρων (N-CAM) και εμπλέκονται στις διαδικασίες οργανογένεσης, είναι οι τελευταίοι πρόγονοι του επίκτητου ανοσοποιητικού συστήματος. Οι N-CAM του κοτόπουλου για τη νευρωνική οργανογένεση κατέχουν 4 περιοχές όμοιες με τη β2-μικροσφαιρίνη και είναι αυτή η περιοχή από την οποία προήλθε το επίκτητο ανοσοποιητικό σύστημα (Ohno, 1987). Οι Hughes και Nei υπολόγισαν το χρόνο απόκλισης για τα

γονίδια τάξης I και II ο οποίος βρέθηκε να είναι 446-521 εκατομμύρια χρόνια ανάλογα με τη μέθοδο (1990). Τα δεδομένα αυτά συνηγορούν υπέρ της παρατήρησης ότι οργανισμοί όπως τα αμφίβια τα οποία διαχωρίστηκαν πριν από 370 χρόνια διαθέτουν και τα δύο γονίδια A και B του MHC II (Kaufman et al., 1990). Έτσι, η παρουσία όλων των γονιδίων της τάξης I, II και III του MHC στο αμφίβιο *Xenopus* προτείνει ότι η περιοχή του γονιδιώματος που κωδικοποιεί για τα μόρια του MHC είναι τόσο παλιά, που υπολογίζεται σε 370 εκατομμύρια χρόνια ή και περισσότερο (Nonaka et al., 1997). Οι γενετικοί τόποι του MHC δεν υπάρχουν πάντα σε ένα στενά συνδεδεμένο σύμπλεγμα όπως στα θηλαστικά, αλλά μπορεί να βρεθούν σε δύο (π.χ. κοτόπουλο, Miller et al., 1994) ή πολλαπλά συμπλέγματα (π.χ. zebrafish, Bingulac-Popovic et al., 1997).

Το ενδογενές ανοσοποιητικό σύστημα είναι το μοναδικό αμυντικό σύστημα στα ασπόνδυλα. Υπάρχει και στα σπονδυλωτά, αλλά η κύρια ανοσολογική άμυνα σε αυτά είναι το επίκτητο ανοσοποιητικό σύστημα με τα συστατικά του MHC, TCR και Ig γονίδια καθώς και ένζυμα με δράση ρεκομπινάσης όπως η RAG 1. Αυτά τα κύρια συστατικά του επίκτητου ανοσοποιητικού συστήματος δεν απουσιάζουν μόνο στα ασπόνδυλα αλλά και στα πρωτόγονα άγναθα σπονδυλωτά (Klein & Sato, 1998; Matsunaga & Rahman, 1998). Το επίκτητο ανοσοποιητικό σύστημα φαίνεται να έχει εξελιχθεί από τα πρωτόγονα γναθοστόματα σπονδυλωτά δηλ. τους χονδριχθύες (καρχαρίες, σελάχια) και μετά. Δεν υπάρχει κανένα μοριακό στοιχείο που να καθορίζει αν τα ανοσοποιητικά συστήματα των σπονδυλωτών (και συγκεκριμένα το MHC) είναι εξελικτικά συσχετισμένα με το συστήματα αλλοαναγνώρισης των ασπόνδυλων. Το MHC καθεαυτό δεν υπάρχει στα άγναθα ψάρια (Klein & O'Uigin, 1993; Matsunaga & Rahman, 1998), αλλά μόρια MHC τάξης I και II υπάρχουν στους χονδριχθύες (καρχαρίες) (Kasahara et al., 1992; Okamura et al., 1997). Τα συνολικά δεδομένα

προτείνουν ότι το ΜΗC εξελίχθηκε μετά το διπλασιασμό βασικών γονιδίων (housekeeping genes) κάποια στιγμή μετά την εξελικτική απόκλιση των άγναθων σπονδυλωτών (Kasahara et al., 1996; Kasahara et al., 1997). Πιστεύεται ότι ο αναδιπλασιασμός επέτρεψε στο ένα αντίγραφο να διατηρήσει τις βασικές του λειτουργίες και στο άλλο να διαφοροποιηθεί.

Όσον αφορά τα μόρια ΜΗC σε αμφίβια και πτηνά αυτά παρουσιάζουν ομοιότητες με τα μόρια ΜΗC των θηλαστικών ενώ σαφείς ενδείξεις για ύπαρξη πολυμορφισμού των μορίων ΜΗC τάξης I και II υπάρχουν και για τα ερπετά. Ωστόσο, σε πολλές λεπτομέρειες διαφέρουν από τα θηλαστικά και δεν είναι ξεκάθαρο αν αυτές αντικατοπτρίζουν κάποιο ιστορικό εξελικτικό γεγονός ή κάποιου είδους επιλογή που ασκήθηκε λόγω διαφορετικού τρόπου ζωής ή περιβάλλοντος. Για παράδειγμα, ο ενήλικος βάτραχος *Xenopus* έχει ένα σθεναρό ανοσοποιητικό σύστημα με πολλές ομοιότητες με αυτό των θηλαστικών, πανταχού παρόντα μόρια τάξης I, αλλά πολύ μεγαλύτερη κατανομή μορίων τάξης II στους ιστούς συγκριτικά με τον άνθρωπο, το ποντίκι και το κοτόπουλο. Ο γυρίνος του *Xenopus* έχει μία πολύ πιο περιορισμένη ανοσολογική απάντηση, καθόλου μόρια τάξης I στις κυτταρικές επιφάνειες και κατανομή μορίων τάξης II όμοια με αυτήν των θηλαστικών. Η αμφίβια σαλαμάνδρα *Ambystoma mexicanum* έχει πολύ αδύναμη ανοσολογική απάντηση (σαν να μην υπάρχουν καθόλου Τ βοηθητικά κύτταρα), μία ευρεία κατανομή μορίων τάξης II και καθόλου μόρια τάξης I στις κυτταρικές επιφάνειες. Αυτά τα ζώα διαφέρουν επίσης σημαντικά στο επίπεδο του πολυμορφισμού του ΜΗC. Μια ακόμη διαφορά σε σχέση με τα θηλαστικά είναι η παρουσία μορίων με άγνωστη λειτουργία. Στον *Xenopus* και στα ερπετά υπάρχουν δύο πληθυσμοί της α αλυσίδας τάξης I στην επιφάνεια των ερυθροκυττάρων: εκείνες που συνδέονται με τη β2-μικροσφαιρίνη και εκείνες που σχηματίζουν ομοδιμερή μέσω δισουλφιδικών δεσμών (Kaufman et al., 1990).

Τα γονίδια ΜΗC τάξης I δε φαίνεται να έχουν ορθόλογες (δηλ. ομόλογες λόγω προέλευσης από έναν κοινό προγονικό γενετικό τόπο) σχέσεις μεταξύ των θηλαστικών διαφορετικών τάξεων. Παρόλο που ορθόλογες σχέσεις έχουν βρεθεί ανάμεσα με γενετικούς τύπους τάξης II θηλαστικών (Hughes & Nei, 1990). Ο γενετικός τύπος HLA-C έχει βρεθεί μόνο στον άνθρωπο, στο γορίλα και στο χιμπατζή αλλά όχι στον πίθηκο (Boyson et al., 1996). Οι γονιδιακές περιοχές τάξης II φαίνεται να προέκυψαν πριν το διαχωρισμό των τάξεων των πλακουντοφόρων θηλαστικών. Ο αρχαιότερος πολυμορφικός γενετικός τύπος τάξης II φαίνεται να είναι ο HLA-DQA1 (Gyllensten & Erlich, 1989). Υπάρχουν στοιχεία ότι τα γονίδια του ΜΗC υπόκεινται σε μία διαδικασία γένεσης-και-θανάτου (Nei et al., 1997). Νέα γονίδια δημιουργούνται από επαναλαμβανόμενο γονιδιακό αναδιπλασιασμό και κάποια διπλά γονίδια διατηρούνται στο γονιδίωμα για μεγάλα χρονικά διαστήματα, ενώ άλλα διαγράφονται ή μετατρέπονται σε μη-λειτουργικά λόγω επιβλαβών μεταλλάξεων. Αυτή η άποψη διαφωνεί με την προηγούμενη ιδέα ότι η ποικιλομορφία και η εξέλιξη του ΜΗC κυβερνώνται από την κοινή εξέλιξη των πολυγονιδιακών οικογενειών του μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας (ΜΗC) και της ανοσοσφαιρίνης (Ig). Τα αλληλόμορφα φαίνεται να έχουν γρήγορο ρυθμό ανακύκλωσης. Η έλλειψη αντιστοιχίας μεταξύ των αλληλομόρφων του ανθρώπου και του χιμπατζή προτείνει ότι 5 εκατομμύρια χρόνια διαχωρισμού αρκούν για την επαναδιαμόρφωση των αλληλομόρφων του ΜΗC. Αυτό σημαίνει ότι τα αλληλόμορφα υφίστανται διαρκείς μετατροπές κατά τη διάρκεια της εξέλιξης των ειδών (Parham & Ohta, 1996).



## *Το γονίδιο DRB*

Το HLA-DRB1 ανήκει στα "παράλογα" (paralogues: ομόλογα γονίδια που έχουν προκύψει από διπλασιασμό) της β αλυσίδας των μορίων HLA τάξης II. Το μόριο τάξης II είναι ένα ετεροδιμερές που αποτελείται από μία α (DRA) και μία β (DRB) αλυσίδα και οι δύο προσδεδεμένες στη μεμβράνη. Παίζει κεντρικό ρόλο στο ανοσοποιητικό σύστημα καθώς παρουσιάζει πεπτιδία που προέρχονται από εξωκυτταρικές πρωτεΐνες. Τα μόρια της τάξης II εκφράζονται στα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα (APCs: Β λεμφοκύτταρα, δένδριτικά κύτταρα, μακροφάγα). Η β αλυσίδα έχει μήκος περίπου 26-28 kDa. Κωδικοποιείται από 6 εξόνια: το εξόνιο 1 κωδικοποιεί το αρχικό πεπτιδίο, τα εξόνια 2 και 3 κωδικοποιούν τις δύο εξωκυτταρικές περιοχές, το εξόνιο 4 κωδικοποιεί τη διαμεμβρανική περιοχή και το εξόνιο 5 κωδικοποιεί την κυτταροπλασματική ουρά. Μέσα στο μόριο DR η β αλυσίδα περιέχει όλους τους πολυμορφισμούς που καθορίζουν την ικανότητα δέσμευσης πεπτιδίου. Εκατοντάδες DRB1 αλληλόμορφα έχουν χαρακτηριστεί και γίνεται διαρκής καταγραφή αυτών των πολυμορφισμών για μεταμοσχεύσεις νεφρών και μυελού των οστών. Το DRB1 εκφράζεται σε πέντε φορές μεγαλύτερα επίπεδα από τα παράλογά του DRB3, DRB4 και DRB5. Το DRB1 είναι παρόν σε όλα τα άτομα. Διαφορετικά αλληλόμορφα DRB1 είναι συνδεδεμένα είτε με κανένα είτε με ένα από τα γονίδια DRB3, DRB4 και DRB5. Υπάρχουν πέντε σχετικά ψευδογονίδια: DRB2, DRB6, DRB7, DRB8 και DRB9.

Είναι αξιοσημείωτο ότι μέσα στα DRB γονίδια του MHC ο πολυμορφισμός δεν αφορά το σύνολο της αλληλουχίας, αλλά είναι συγκεντρωμένος σε υπερμεταβλητές περιοχές του εξονίου 2 (Lundberg & McDevitt, 1992; Marsh & Bodmer, 1992; Fan et al.,1989; Gyllensten et al.,1991), που κωδικοποιεί την αύλακα σύνδεσης του αντιγόνου των μορίων

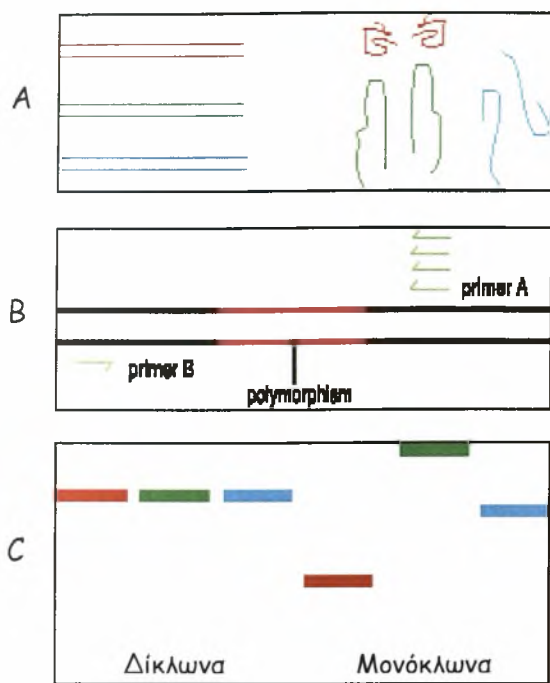
MHC τάξης II. Σε μελέτη των Lakshmi & Gerald σε πρωτεύοντα, μηχανισμοί που προτάθηκαν για να ερμηνεύσουν την αυστηρή συντήρηση στο περιεχόμενο γονιδίων ζωτικής σημασίας υποστηρίζουν ότι ο διαγονιδιακός ανασυνδυασμός δημιουργεί επαναλαμβανόμενα μοτίβα πολυμορφισμών στο DRB (Gyllenstein et al., 1991; Lundberg & McDevitt, 1992). Έγινε ανάλυση πάνω από 50 αλληλουχιών DRB πρωτευόντων και αναγνωρίστηκαν ανάμεσα σε αλληλουχίες όμοιες με το DRB6 μακάκων και μπαμπούνων διάφορες απαλοιφές νουκλεοτιδίων σε συγκεκριμένες υπερμεταβλητές περιοχές του εξονίου 2. Αυτές κωδικοποιούν ένα τμήμα α-έλικας της περιοχής δέσμησης του αντιγόνου. Αυτές οι πολύ συγκεκριμένες απαλοιφές υποδεικνύουν την ανταλλαγή περιοχών μέσα σε τμήματα του γονιδίου DRB, ως ένας από τους εξελικτικούς μηχανισμούς που δημιουργούν και διατηρούν την ποικιλομορφία του MHC.

## *Η μέθοδος SSCP στην ανάλυση της ποικιλομορφίας*

Ο "πολυμορφισμός διαμόρφωσης του μονού κλώνου" (Single-Strand Conformation Polymerism) είναι ο ηλεκτροφορητικός διαχωρισμός μονόκλωνων νουκλεϊκών οξέων με βάση μικρές διαφορές στην αλληλουχία (συχνά ακόμη και ένα ζευγάρι βάσεων) οι οποίες δίνουν διαφορετική δευτεροταγή δομή και μία μετρήσιμη διαφορά στην κινητικότητα διαμέσου μιας πηκτής πολυακρυλαμίδης.

Η κινητικότητα του δίκλωνου DNA στην ηλεκτροφόρηση σε πηκτή εξαρτάται από το μέγεθος του μορίου και το μήκος, αλλά είναι σχετικά ανεξάρτητη της αλληλουχίας. Ωστόσο η κινητικότητα των μονών κλώνων επηρεάζεται σημαντικά από πολύ μικρές αλλαγές στην αλληλουχία, πιθανόν και από ένα μόνο νουκλεοτίδιο ανάμεσα σε εκατοντάδες. Αυτές οι μικρές αλλαγές είναι παρατηρήσιμες λόγω της σχετικά ασταθούς φύσης του μονόκλωνου DNA. Απουσία του συμπληρωματικού του κλώνου, ένας μονός κλώνος αναδιπλώνεται λόγω δεσμών υδρογόνου που δημιουργούνται μεταξύ διαφόρων βάσεων της αλληλουχίας του. Αυτή η τριτοταγής δομή είναι μοναδική και ανεξάρτητη από το μήκος του κλώνου. Έτσι, μία και μόνο αλλαγή στην αλληλουχία μπορεί να αλλάξει δραματικά την κινητικότητα του κλώνου μέσα στην πηκτή αλλάζοντας το ζευγάρωμα των βάσεων μέσα στο μόριο και την αντίστοιχη τρισδιάστατη διαμόρφωσή του (Melcher, 2000).

Η ανάλυση SSCP βασίζεται σε αυτήν την ιδιότητα του μονόκλωνου DNA. Ανακαλύφθηκε το 1989 και αποτελεί μία οικονομική, εύκολη και ευαίσθητη μέθοδο για την ανίχνευση γενετικού πολυμορφισμού (Sunpuks et al., 2000).



Εικόνα 10: Η διαδικασία της ανάλυσης SSCP: (Α) Τα τρία τμήματα δίκλωννου DNA με τις αντίστοιχες μονόκλωννες τρισδιάστατες δομές (το κόκκινο τμήμα αναδιπλώνεται στο μικρότερο μόριο και το πράσινο στο μεγαλύτερο). (Β) Ο επιθυμητός πολυμορφισμός επιλέγεται με τους κατάλληλους εκκινητές (ο εκκινητής Α είναι σε περίσσεια για να ενισχυθεί μόνο ο ένας κλώνος). (C) Και τα δίκλωννα και τα μονόκλωννα τμήματα ηλεκτροφορούνται σε πηκτή. Αν δεν υπήρχαν τα χρώματα δε θα μπορούσαν να διαχωριστούν τα δίκλωννα μόρια. Τα μονόκλωννα μόρια ωστόσο παρουσιάζουν σημαντική διαφορά στην κινητικότητα: το μικρό κόκκινο μόριο κινείται πιο γρήγορα στην πηκτή και από το μπλε και από το μεγάλο πράσινο μόριο. Σύμφωνα με αυτά τα αποτελέσματα SSCP είναι εμφανές ότι οι διαφορετικές ζώνες (κόκκινη, μπλε, πράσινη) περιέχουν κλώνους με διαφορετικές αλληλουχίες. Όσο πιο μακριά είναι οι ζώνες μεταξύ τους, τόσο περισσότερο διαφέρουν οι νουκλεοτιδικές αλληλουχίες.

Όπως και οι RFLPs (Restriction Fragment Length Polymorphisms), οι SSCP είναι πολυμορφικά αλληλόμορφα κληρονομούμενων γενετικών τόπων που μπορούν να χρησιμοποιηθούν σαν γενετικοί μάρτυρες. Η ανάλυση SSCP μπορεί να ανιχνεύσει πολυμορφισμούς DNA και μεταλλάξεις σε πολλαπλές θέσεις τμημάτων DNA (Orita et al., 1989). Παρόλο που κατά βάση είναι μία τεχνική ανίχνευσης μεταλλάξεων, η μέθοδος SSCP χρησιμοποιείται συχνότερα για ανάλυση πολυμορφισμών σε έναν μόνο γενετικό τόπο, ιδιαίτερα όταν χρησιμοποιείται για ιατρικές διαγνώσεις (Sunpucks et al., 2000).

Η αρχή λειτουργίας της μεθόδου σε γενικές γραμμές περιλαμβάνει:

- διάσπαση του γενωμικού DNA
- μετουσίωση των μορίων DNA σε αλκαλικό διάλυμα
- ηλεκτροφόρηση σε ουδέτερη πηκτή πολυακρυλαμίδης
- είτε μεταφορά σε νάιλον μεμβράνη και υβριδισμό με DNA ή RNA ανιχνευτές (Orita et al., 1989) είτε χρώση με κατάλληλες χρωστικές π.χ. νιτρικό άργυρο ( $AgNO_3$ ).

Η κινητικότητα των μονόκλωνων αλυσίδων εξαρτάται από τη θερμοκρασία. Για καλύτερα αποτελέσματα, η ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων πρέπει να συμβαίνει σε σταθερή θερμοκρασία μέχρι το τέλος.

Η ευαισθησία της τεχνικής επηρεάζεται από το pH. Τα τμήματα δίκλωνου DNA συνήθως αποδιατάσσονται μετά από έκθεσή τους σε βασικό περιβάλλον δηλαδή σε υψηλό pH. Οι Kukita et al. απέδειξαν ότι η προσθήκη γλυκερόλης στην πηκτή πολυακρυλαμίδης ελαττώνει την τιμή του pH του ρυθμιστικού διαλύματος ηλεκτροφόρησης (Tris Borate buffer) με αποτέλεσμα να αυξάνεται η ευαισθησία της SSCP ανάλυσης και να λαμβάνονται πιο ευδιάκριτα αποτελέσματα (1997).

Το μήκος του τμήματος επίσης επηρεάζει την ανάλυση SSCP. Για βέλτιστα αποτελέσματα το μέγεθος των τμημάτων DNA θα πρέπει να κυμαίνεται μεταξύ 150-300bp, παρόλο που η SSCP ανάλυση του RNA επιτρέπει μεγαλύτερο μέγεθος τμημάτων (Wagner, 2002). Η παρουσία γλυκερόλης στην πηκτή μπορεί επίσης να επιτρέψει την ανάλυση μεγαλύτερων τμημάτων DNA με επαρκή ευαισθησία (Kukita et al., 1997).

## Υλικά και μέθοδοι

### Απομόνωση ολικού DNA από ιστό λαγού

Βασικό βήμα για τη μελέτη του πολυμορφισμού σε επίπεδο γονιδίου αποτελεί η επιτυχής -τόσο ποσοτικά, όσο και ποιοτικά- απομόνωση γενετικού υλικού DNA. Η διαδικασία που ακολουθήθηκε για την εξαγωγή και απομόνωση ολικού DNA πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με το πρωτόκολλο Bernatchez et al. (1988) με κάποιες μικρές τροποποιήσεις. Χρησιμοποιήθηκαν τα ακόλουθα διαλύματα.

#### **Extraction buffer** (100ml), αποθήκευση στους 4°C

- *2ml Tris-HCL 2M, pH=8,5*, το οποίο ρυθμίζει το pH.
- *2ml EDTA 0,5M*, το οποίο χρησιμοποιείται ως χηλικός παράγοντας δεσμεύοντας κατιόντα  $Ca^{2+}$  και  $Mg^{2+}$  τα οποία είναι απαραίτητα για τη δράση νουκλεασών. Έτσι προστατεύεται το DNA από διάσπαση.
- *4ml NaCl 5M*, το οποίο ρυθμίζοντας την οσμωτική πίεση συμβάλλει στην διάσπαση των κυτταρικών μεμβρανών και την ομογενοποίηση του ιστού.
- *92ml ddH<sub>2</sub>O*.

#### **Lysis buffer** (20ml), αποθήκευση στους 4°C

- *18ml extraction buffer*
- *2ml SDS 10%*. Το SDS είναι ιονικό απορρυπαντικό το οποίο συμβάλλει στην διάσπαση των κυτταρικών μεμβρανών και ιδιαίτερα της πυρηνικής μεμβράνης ενώ ταυτόχρονα συντελεί στην αποδιάταξη πρωτεϊνών γεγονός που προστατεύει το DNA από τη δράση νουκλεασών.
- *100μl διαλύματος proteinase K (100mg/ml)*. Η πρωτεϊνάση K διασπά τις πρωτεΐνες.

## Διαδικασία

1. Αρχικά τοποθετούνται 100mg ιστού αρκετά τεμαχισμένου σε σωλήνα erpendorf του 1,5ml και προσθέτουμε 1ml extraction buffer.
2. Έντονη ανάδευση του σωλήνα (vortex) και φυγοκέντρηση σε θερμοκρασία δωματίου (φυγόκεντρος erpendorf) στις 10.000στροφές για 2min.
3. Προσεκτική απομάκρυνση του υπερκείμενου και προσθήκη ξανά 1ml extraction buffer, ακολουθώντας το προηγούμενο στάδιο.
4. Προσεκτική απομάκρυνση του υπερκείμενου και προσθήκη 400μl digestion buffer το οποίο προηγουμένως έχει ανακινηθεί καλά.
5. Έντονη ανάδευση (vortex) ώστε να αναμιχθεί ο ιστός (ίζημα) με το διάλυμα.
6. Τοποθέτηση των δειγμάτων σε υδατόλουτρο (Medingen), με τη βοήθεια μικρού φελιζόλ ώστε το υγρό τμήμα των δειγμάτων να είναι βυθισμένο, στους 50°C για όλη τη νύχτα.
7. Ανακίνηση των δειγμάτων κάθε μισή ώρα ώστε να επαναιωρείται το ίζημα.
8. Προσθήκη 150μl οξικού νατρίου ( $\text{CH}_3\text{COONa}$  3M, pH=5.2)
9. Έντονη ανάδευση των δειγμάτων και τοποθέτησή τους στους -20°C για 15min.
10. Φυγοκέντρηση στις 13.000 στροφές για 10min στους 4°C.
11. Μεταφορά του υπερκείμενου σε σωλήνα erpendorf.
12. Προσθήκη 1ml εξισορροπημένης φαινόλης προκειμένου να διαλυθούν οι πρωτεΐνες. [Η φαινόλη είναι ισχυρός αποδιατακτικός παράγοντας των πρωτεϊνών. Έτσι μετά την προσθήκη φαινόλης πραγματοποιείται διαχωρισμός λιπιδίων, πρωτεϊνών και νουκλεϊκών οξέων με αποτέλεσμα να επιτυγχάνεται εκχύλιση του DNA. Ειδικότερα το διάλυμα της

- φαινόλης θα πρέπει να έχει τουλάχιστον  $pH=7$  ώστε το DNA μετά την εκχύλιση να κατανέμεται στην επάνω υδατική φάση.]
13. Ακολουθεί έντονη ανάδευση σε vortex.
  14. Φυγοκέντρηση στις 13.000στροφές για 20min στους  $4^{\circ}C$ .
  15. Προσεκτική μεταφορά της επάνω υδατικής φάσης σε νέο σωλήνα erpendorf.
  16. Προσθήκη 0,5ml φαινόλης και 0,5ml χλωροφορμίου - ισοαμυλικής αλκοόλης (24V:1V). Μικρή ανάδευση στο vortex. [Το χλωροφόρμιο διευκολύνει το διαχωρισμό των φάσεων λόγω μεγάλης πυκνότητας απομακρύνει τη διαλυμένη φαινόλη από την υδατική φάση και συντελεί στην μετουσίωση των πρωτεϊνών, ενώ πόλος της ισοαμυλικής αλκοόλης είναι η σταθεροποίηση του χλωροφορμίου.]
  17. Φυγοκέντρηση στις 13.000 στροφές για 5min στους  $4^{\circ}C$ .
  18. Προσεκτική μεταφορά της επάνω υδατικής φάσης σε νέο σωλήνα erpendorf.
  19. Προσθήκη 1ml χλωροφορμίου - ισοαμυλικής αλκοόλης (24V:1V). Μικρή ανάδευση στο vortex.
  20. Φυγοκέντρηση στις 13.000 στροφές για 5min στους  $4^{\circ}C$ .
  21. Προσεκτική μεταφορά της επάνω υδατικής φάσης σε νέο σωλήνα erpendorf.
  22. Προσθήκη 1ml ισοπροπανόλης (2-προπανόλης).
  23. Μικρή ανάδευση στο vortex και παραμονή των δειγμάτων για 20min σε θερμοκρασία δωματίου
  24. Φυγοκέντρηση στις 13.000 στροφές για 20min στους  $4^{\circ}C$ .
  25. Προσεκτική απομάκρυνση του υπερκείμενου, παρατηρώντας ταυτόχρονα το ίζημα στο κάτω μέρος του erpendorf ώστε να μη μετακινηθεί.
  26. Προσθήκη 1ml παγωμένης αλκοόλης (αιθανόλης 70%).



27. Ανακίνηση των δειγμάτων με το χέρι.
28. Φυγοκέντρωση στις 13.000 στροφές για 5min στους 4°C.
29. Πολύ προσεκτική απομάκρυνση του υπερκείμενου, παρατηρώντας ταυτόχρονα το ίζημα.
30. Τα δείγματα τοποθετούνται στον κλίβανο στους 37°C για περίπου 1 ώρα, παρατηρώντας ώστε να μην υπάρχουν μικροσταγονίδια στα τοιχώματα του erpendorf.
31. Διάλυση του ιζήματος του DNA σε 100μl ddH<sub>2</sub>O
32. Τα δείγματα συντηρούνται στο ψυγείο στους 4°C όταν πρόκειται να χρησιμοποιηθούν άμεσα ή στους -20°C για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα αποθήκευσης.

### ***Υπολογισμός συνολικής ποσότητας DNA με φωτομέτρηση***

Μετά την επαναιώρηση των δειγμάτων γίνεται μέτρηση του κάθε δείγματος στο φωτόμετρο προκειμένου να πιστοποιηθεί καταρχήν αν τα δείγματα που απομονώθηκαν με την παραπάνω διαδικασία περιέχουν αρκετή ποσότητα DNA.

Για τη φωτομέτρηση χρειάζονται 50μl δείγματος. Συνήθως χρησιμοποιείται η εξής αραιώση: 1μl διαλύματος από το κάθε δείγμα (DNA από την απομόνωση, διαλυμένο σε 100μl H<sub>2</sub>O) και προστίθενται 49μl ddH<sub>2</sub>O. Αν το φωτόμετρο εμφανίσει την ένδειξη +++, σημαίνει ότι θα πρέπει να κάνουμε μεγαλύτερη αραιώση. Ενδείξεις που κυμαίνονται πάνω από 250ng/μl σημαίνουν ότι οι ποσότητες DNA που απομονώθηκαν από την παραπάνω διαδικασία είναι ικανοποιητικές, αν και μεγάλη σημασία έχει και η καθαρότητα του DNA.

## ***Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)***

Στόχος του πειράματος ήταν η ενίσχυση του εξονίου 2 του γονιδίου DRB της κλάσης II του MHC με τη βοήθεια της αντίδρασης PCR. Το τμήμα του DNA-στόχος που θέλουμε να ενισχυθεί έχει μέγεθος που κυμαίνεται μεταξύ 220-250 ζευγών βάσεων.

Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε συσκευή erpendorf. Για μια αντίδραση PCR των 30μl χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω αντιδραστήρια:

DNA	500ng
Buffer (10x → 1x)	3μl
MgCl <sub>2</sub> (50mM → 1,5mM)	0,9
dNTPs (10mM → each)	0,6
Primer F (50pmoles/μl)	0,6
Primer R (50pmoles/μl)	0,6
Taq polymerase 5units/μl	0,15
ddH <sub>2</sub> O	21,8

- ✓ Το DNA δρα ως εκμαγείο που περιέχει το τμήμα προς ενίσχυση.
- ✓ Το ρυθμιστικό διάλυμα (buffer) περιέχει 500mM KCl, 100mM Tris-HCl pH 9.0 και παρέχει το κατάλληλο χημικό περιβάλλον για τη δράση της DNA πολυμεράσης.
- ✓ Τα ιόντα Mg<sup>2+</sup> είναι απαραίτητα για τη δράση της πολυμεράσης και η αυξομείωση της συγκέντρωσής τους ρυθμίζει την πιστότητα της αντιγραφής. Σημειώνεται ότι η Taq πολυμεράση δεν διαθέτει δράση 3'-5' εξωνουκλεάσης και άρα δεν έχει τη δυνατότητα να επιδιορθώνει τα λάθη της.
- ✓ Τα τριφωσφορικά δεοξυριβονουκλεοτίδια (dNTPs) είναι η πρώτη ύλη για την επιμήκυνση των νέων αλυσίδων από την πολυμεράση.

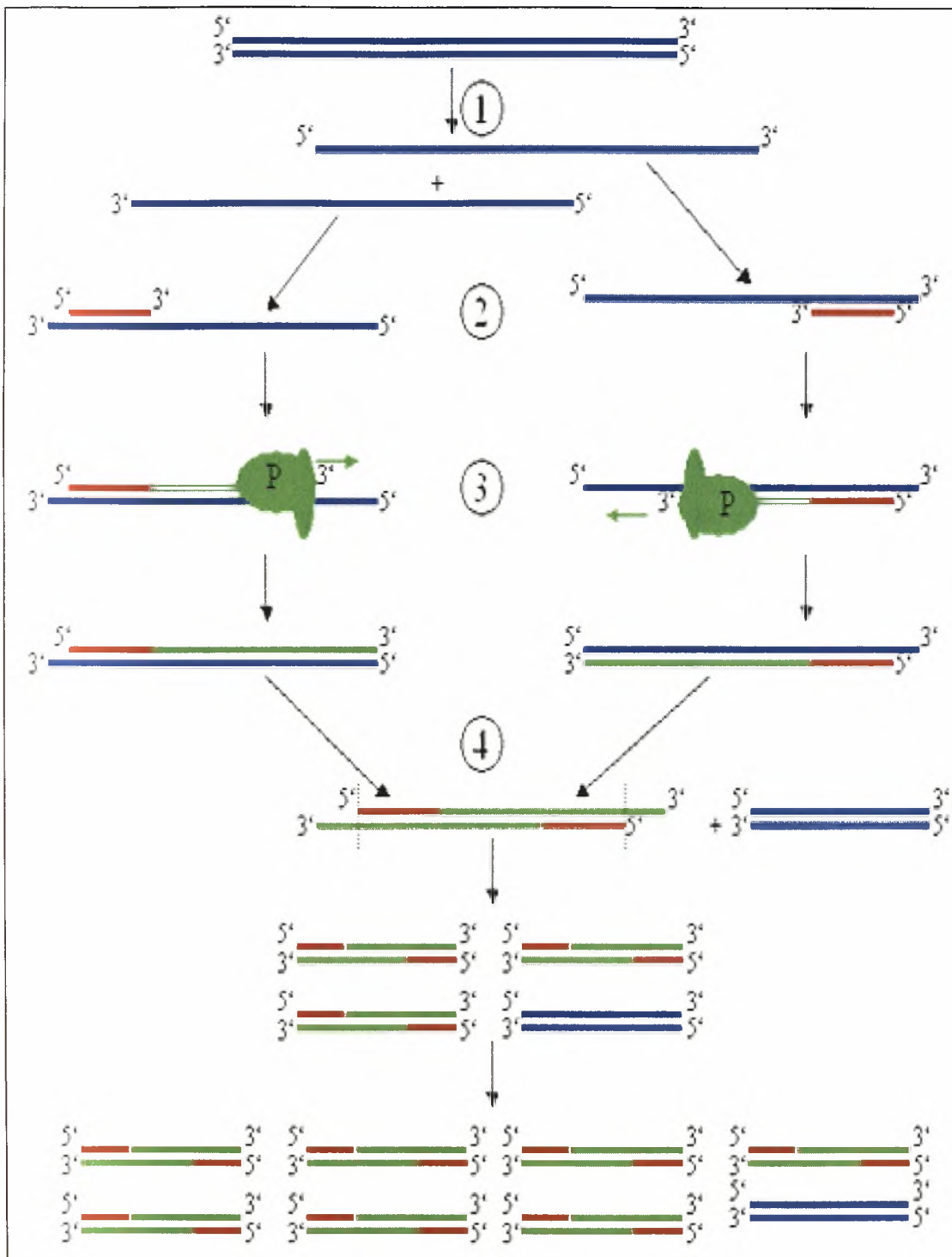
- ✓ Η Ταq πολυμεράση, η οποία έχει απομονωθεί από το βακτήριο *Thermus aquaticus*, είναι θερμοσταθερή σε θερμοκρασίες 94-95°C.
- ✓ Οι εκκινητές (primers) που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση του γονιδίου DRB αγοράστηκαν από την Macrogen και είναι οι ακόλουθοι:  
DRB2F: 5' GAGTGTCAATTTCTACAACGGGA 3'  
DRB2R: 5' CTCCTCAACCCCGTAGTTGTGTCTGCA 3'

Η επιλογή του μήκους και της  $T_m$  των εκκινητών εξαρτάται από πολλούς παράγοντες. Η  $T_m$  ενός εκκινητή ορίζεται ως η θερμοκρασία στην οποία οι μισές περιοχές πρόσδεσης των εκκινητών είναι κατειλημμένες. Η  $T_m$  αυξάνεται ανάλογα με το μήκος του εκκινητή. Πολύ υψηλές τιμές  $T_m$  (πάνω από 80°C) μπορεί να δημιουργήσουν πρόβλημα αφού η DNA πολυμεράση είναι λιγότερο ενεργή σε αυτές τις θερμοκρασίες. Το ιδανικό μήκος ενός εκκινητή είναι γενικά από 15 έως 40 νουκλεοτίδια, με  $T_m$  μεταξύ 55°C και 65°C, παραπλήσια για το κάθε ζεύγος εκκινητών. Επίσης η περιεκτικότητα σε βάσεις G-C θα πρέπει να είναι μεταξύ 40-60%. Τέλος δεν πρέπει να υπάρχουν συμπληρωματικές αλληλουχίες, ούτε μέσα στο ίδιο μόριο εκκινητή, ούτε ανάμεσα στους δύο, διότι κάτι τέτοιο οδηγεί σε σχηματισμό φουρκέτας ή διμερών μορφών, αντίστοιχα.

Οι συνθήκες ενίσχυσης του γονιδίου DRB στην PCR είναι οι ακόλουθες:

- |   |                |             |
|---|----------------|-------------|
| 1. Αρχική αποδιάταξη                    | 95°C για 5min  | } 35 κύκλοι |
| 2. Αποδιάταξη                           | 95°C για 45sec |             |
| 3. Συγκόλληση των εκκινητών (Annealing) | 60°C για 50sec |             |
| 4. Επιμήκυνση                           | 72°C για 30sec |             |
| 5. Τελική επιμήκυνση                    | 72°C για 7min  |             |

1. **Αρχική αποδιάταξη:** Το μείγμα θερμαίνεται στους  $95^{\circ}\text{C}$  για 5min για είναι σίγουρο ότι τα τμήματα DNA όπως επίσης και οι εκκινητές έχουν αποδιαταχθεί.
2. **Αποδιάταξη:** Με τη θέρμανση στους  $95^{\circ}\text{C}$  για 45sec επιτυγχάνεται το σπάσιμο των διπλών ( $A=T$ ) και τριπλών δεσμών ( $G\equiv C$ ) μεταξύ των δίκλωνων αλυσίδων του DNA και η μετατροπή τους σε μονόκλωνη μορφή. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι η θερμοκρασία της αρχικής αποδιάταξης όσο και της αποδιάταξης είναι υψηλή και θα πρέπει να μη διαρκεί περισσότερο χρόνο γιατί ελαττώνεται η ενεργότητα της πολυμεράσης.
3. **Επαναδιάταξη (συγκόλληση των εκκινητών):** Στο στάδιο αυτό οι εκκινητές έχουν μεγάλη κινητικότητα μέσα στο δείγμα. Ιονικοί δεσμοί διαρκώς δημιουργούνται και διασπώνται μεταξύ των μονόκλωνων εκκινητών και των μονόκλωνων εκμαγείων DNA. Οι πιο σταθεροί δεσμοί (εκκινητές που είναι απόλυτα συμπληρωματικοί) διαρκούν λίγο περισσότερο και σε αυτό το τμήμα δίκλωνου DNA (εκκινητής+εκμαγείο) η πολυμεράση μπορεί να προσδεθεί και να ξεκινήσει την αντιγραφή. Μόλις προστεθούν λίγες βάσεις, οι δεσμοί υδρογόνου μεταξύ του εκκινητή και του εκμαγείου είναι τόσο ισχυροί που δεν πλέον μπορούν να διασπαστούν.
4. **Επιμήκυνση:** Η μικρή άνοδος στους  $72^{\circ}\text{C}$  για 30sec αποτελεί την ιδανική θερμοκρασία δράσης για την πολυμεράση. Οι εκκινητές που δεν είναι τελείως συμπληρωματικοί με την αλληλουχία που κόλλησαν αποδιατάσσονται από αυτήν (εξαιτίας την υψηλής θερμοκρασίας) κι έτσι δεν επιμηκύνεται.
5. **Τελική επιμήκυνση:** Αυτό το βήμα συχνά χρησιμοποιείται μετά τον τελευταίο κύκλο για να διασφαλίσει ότι κάθε μονόκλωνο τμήμα DNA έχει ολοκληρώσει την αντιγραφή του.



Εικόνα 11: Σχηματική απεικόνιση της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR). (1) Αποδιάταξη στους 95°C, (2) Επαναδιάταξη στους 60°C, (3) Επιμήκυνση στους 72°C (P=Polymerase) και (4) Ο πρώτος κύκλος ολοκληρώθηκε. Σε κάθε κύκλο και οι δύο κλώνοι DNA αποτελούν εκμαγείο για τον επόμενο κύκλο, με αποτέλεσμα να διπλασιάζεται το ποσό του αντιγραφόμενου DNA για κάθε νέο κύκλο (επάνω φαίνεται το συνολικό αποτέλεσμα 3 κύκλων).

## *Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης*

Η ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης είναι μία μέθοδος που χρησιμοποιείται στη βιοχημεία και τη μοριακή βιολογία για το διαχωρισμό τμημάτων DNA σύμφωνα με το μέγεθος και για την εκτίμηση του μεγέθους των τμημάτων αυτών συγκρίνοντάς τα με τμήματα γνωστού μεγέθους (DNA ladder = μάρτυρας). Αυτό επιτυγχάνεται περνώντας αρνητικά φορτισμένα μόρια DNA μέσω μιας πηκτής αгарόζης με ηλεκτρικό πεδίο. Τα πιο κοντά δίκλινα μόρια κινούνται γρηγορότερα από τα μακρύτερα μέσα από τους πόρους της πηκτής.

Ο πιο σημαντικός παράγοντας μπορεί να είναι το μήκος του μορίου DNA αλλά και η διαμόρφωση παίζει επίσης πολύ σημαντικό ρόλο στην ταχύτητα κίνησης (κυκλικό < γραμμικό < υπερελικωμένο). Η παρουσία βρωμιούχου αιθιδίου (EtBr) στην πηκτή έχει ως αποτέλεσμα το DNA να τρέχει πιο αργά, καθώς το EtBr παρεμβάλλεται και αποελικώνει το DNA. Όσο υψηλότερη είναι η τάση, τόσο γρηγορότερα κινείται το DNA, αν και αυτό περιορίζεται από το γεγονός ότι μεγάλη τάση συνεπάγεται υψηλές θερμοκρασίες και άρα λιώσιμο της πηκτής. Επίσης η υψηλή τάση μειώνει τη διακριτική ικανότητα της πηκτής.

Η βασική χρώση όσον αφορά στις πηκτές αгарόζης είναι το EtBr, που αν και είναι εξαιρετικά καρκινογόνο, διαθέτει τη μοναδική ιδιότητα να φθορίζει στο υπεριώδες φως όταν εμπλέκεται με DNA. Τρέχοντας DNA σε πηκτή που περιέχει EtBr και εκθέτοντάς την σε υπεριώδες φως, γίνονται ορατές διακριτές ζώνες DNA.

Τα ρυθμιστικά διαλύματα φόρτωσης (loading buffers) προστίθενται μαζί με το DNA έτσι ώστε να το καταστήσουν ορατό και να το κάνουν να καταβυθίζεται μέσα στο πηγάδι της πηκτής. Ως χρωστικές για αυτόν το

σκοπό συνήθως χρησιμοποιούνται τα Xylene cyanol και Bromophenol blue ενώ η γλυκερόλη και η φικόλη συμβάλλουν στην καταβύθιση.

Υπάρχει ένας μεγάλος αριθμός ρυθμιστικών διαλυμάτων (buffers) που χρησιμοποιούνται για την ηλεκτροφόρηση σε αгарόζη. Τα πιο κοινά είναι το TAE (Tris Acetate EDTA) και το TBE (Tris Borate EDTA). Το TAE έχει τη μικρότερη ρυθμιστική ικανότητα, αλλά παρέχει την καλύτερη ανάλυση για μεγαλύτερα τμήματα DNA. Αυτό σημαίνει μικρότερη τάση και περισσότερος χρόνος, αλλά καλύτερο προϊόν.

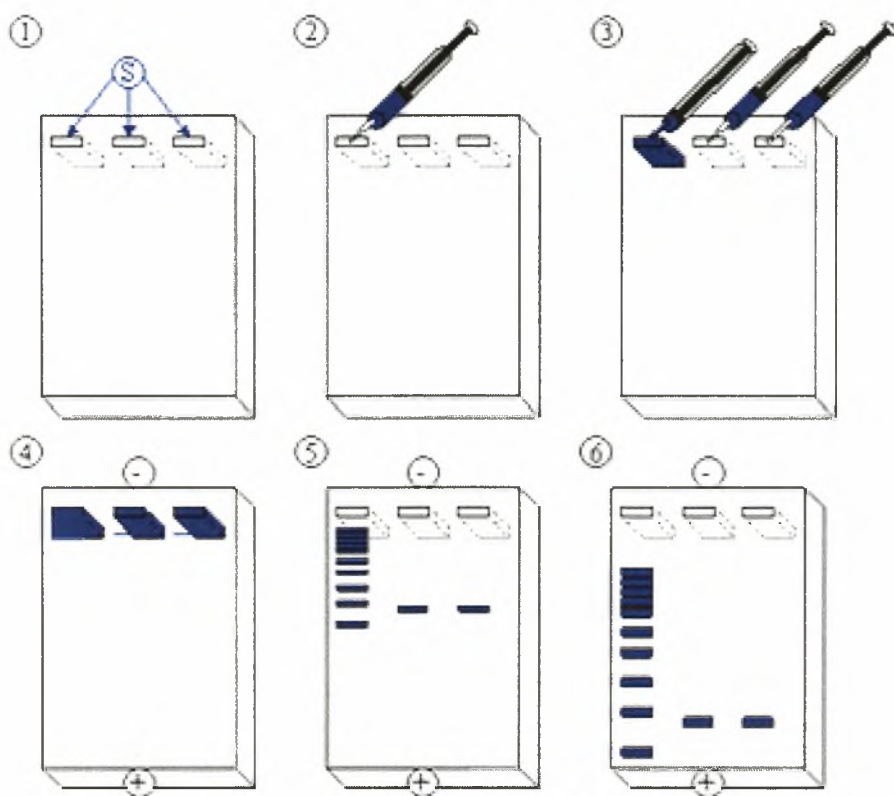
Για την παρασκευή πηκτής αгарόζης 2% χρησιμοποιούμε τα εξής:

- 30ml TAE 1x
- 0,6gr αгарόζη
- 2,5μl βρωμιούχο αιθίδιο (10mg/ml)

### **Διαδικασία**

Ζυγίζουμε και τοποθετούμε 0,6gr αгарόζης σε κωνική φιάλη των 100ml αφού έχουμε προσθέσει προηγουμένως 30ml TAE. Το μείγμα αгарόζης-TAE θερμαίνεται κατάλληλα για τη διάλυση της αгарόζης και ακολούθως αφού αφεθεί σε θερμοκρασία δωματίου ακολουθεί προσθήκη 2,5 μl βρωμιούχου αιθίδιου (EtBr) κάτω από τον απαγωγό, επειδή το βρωμιούχο αιθίδιο λόγω της πτητικότητάς του μέσω των ατμών του μείγματος καθίσταται εξαιρετικά επιβλαβές. Στη συνέχεια γίνεται έκχυση του διαλύματος σε μήτρα για ηλεκτροφόρηση στην οποία προσαρμόζονται ειδικές χτενάκια για τη δημιουργία πηγαδιών. Το διάλυμα αφήνεται να πήξει μέσα στη μήτρα για λίγα λεπτά και όταν σταθεροποιηθεί αφαιρείται το χτενάκι. Τέλος η πηκτή που προκύπτει μαζί με τη μήτρα τοποθετούνται σε μια συσκευή ηλεκτροφόρησης που περιέχει TAE 1x.

Για τη φόρτωση της πηκτής αναμειγνύονται 3μl loading buffer με 5μl προϊόντος PCR και προσεκτικά εισάγονται στα πηγαδάκια της πηκτής. Η τάση ρυθμίζεται στα 100V και μετά από περίπου 30min είναι δυνατή η παρατήρηση των ζωνών DNA.



Εικόνα 12: Ενδεικτικό παράδειγμα φόρτωσης πηκτής αгарόζης. Στο (6) φαίνονται καθαρά πια οι ζώνες του DNA και μπορεί να γίνει σύγκρισή τους με τις ζώνες του μάρτυρα (ladder) γνωστού μήκους που έτρεξαν στο πρώτο πηγάδι. Έτσι υπολογίζεται το μέγεθος του τμήματος DNA που ενισχύθηκε νωρίτερα με την PCR, όπως επίσης υπολογίζεται προσεγγιστικά και η σχετική ποσότητα του DNA ανάλογα με την ένταση φωτεινότητας της ζώνης.

## Αποδιάταξη του DNA

Από κάθε θετικό δείγμα (με επαρκή ποσότητα DNA) που προέκυψε μετά την ηλεκτροφόρηση στην πηκτή αгарόζης, αφαιρέθηκαν 6μl και προστέθηκαν σε 10μl αποδιατακτικού διαλύματος (denaturation buffer).



**Denaturation buffer** (10ml), αποθήκευση στους 4°C.

- 95% formamide
- 10% γλυκερόλη
- 0,05% Bromophenol blue
- 0,05% xylene cyanol
- 10mM NaOH

Στη συνέχεια με εφαρμογή ενός προγράμματος σε κυκλοποιητή erpendorf για 5 λεπτά στους 95°C πραγματοποιείται πλήρης αποδιάταξη των δίκλωνων μορίων DNA. Λίγο πριν το τέλος του προγράμματος, τα δείγματα βγαίνουν από τον κυκλοποιητή και τοποθετούνται αμέσως σε πάγο προκειμένου να παραμείνουν σε μονόκλωνη κατάσταση. Ακολούθως, τα δείγματα φορτώνονται σε πηκτή πολυακρυλαμίδης 10% για SSCP.

## ***Ανάλυση SSCP***

### *Προετοιμασία πηκτής*

Ανάλογα με το μέγεθος των τμημάτων DNA που θα ηλεκτροφορηθούν και την ποιότητα των αποτελεσμάτων που απαιτείται, χρησιμοποιούνται πηκτές πολυακρυλαμίδης με διαφορετικές συγκεντρώσεις κατά περίπτωση. Στο εν λόγω πείραμα χρησιμοποιήθηκε πηκτή πολυακρυλαμίδης 10%.

Οι πηκτές πολυακρυλαμίδης σχηματίζονται με πολυμερισμό ακρυλαμίδης και του διακλαδωτή N,N'-methylene bisacrylamide. Ο πολύ αργός αυτός πολυμερισμός επιταχύνεται εξαιρετικά από ελεύθερες ρίζες που απελευθερώνονται από το APS (ammonium persulfate) υπό την παρουσία του TEMED (tetramethylethylenediamine). Η πυκνότητα της πηκτής εξαρτάται από την ποσότητα της ακρυλαμίδης και του διακλαδωτή στο μείγμα. Όσο πιο μεγάλοι είναι οι πόροι της πηκτής, τόσο πιο γρήγορα κινούνται τα μόρια DNA.

Πριν την έναρξη της όλης διαδικασίας θα πρέπει να υπάρχει έτοιμο **μητρικό διάλυμα ακρυλαμίδης 38,5%**. 100ml μητρικού διαλύματος φτιάχνονται διαλύοντας 37,5gr ακρυλαμίδης και 1gr N,N'-methylene bisacrylamide σε 60ml ddH<sub>2</sub>O, το διάλυμα διηθείται και προστίθεται νερό μέχρι τον όγκο των 100ml. Φυλάσσεται στους 4°C μέχρι περίπου 15 μέρες.

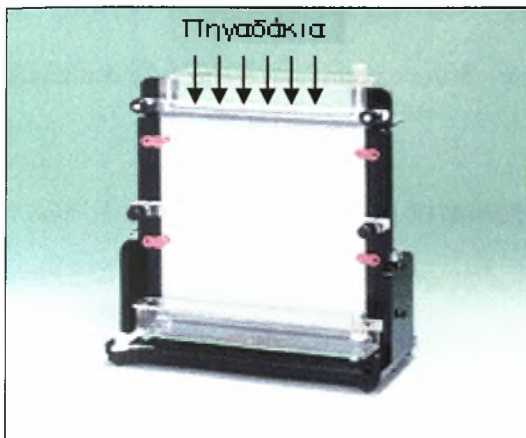
Για την παρασκευή μιας πηκτής πολυκρυλαμίδης 10% (50ml) χρειάζονται:

- 13ml μητρικού διαλύματος 38,5%
- 2,5ml TBE 10x
- 5ml γλυκερόλη
- H<sub>2</sub>O μέχρι τον όγκο των 50ml

...και στη συνέχεια προστίθενται:

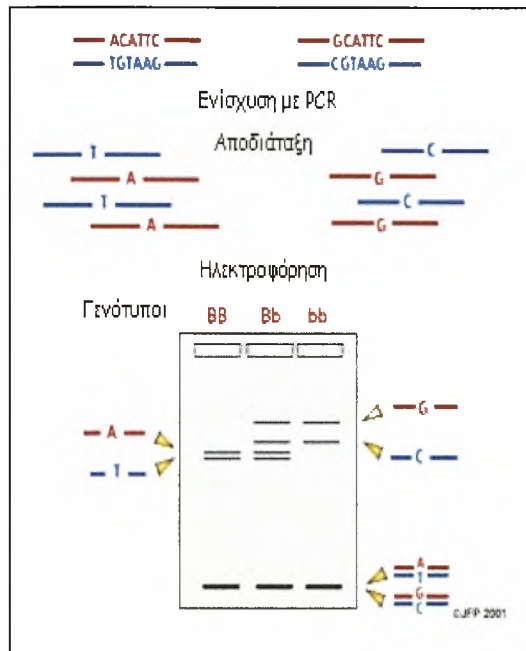
- 50μl TEMED και
- 250μl APS 20%

Αφού σταθεροποιηθεί η πηκτή, τοποθετείται σε κατάλληλη συσκευή ηλεκτροφόρησης με ρυθμιστικό διάλυμα TBE 0,5x. Στη συνέχεια τα δείγματα φορτώνονται στα πηγαδάκια της πηκτής. Στη συσκευή εφαρμόζεται τάση ~180V και τα δείγματα αφήνονται να τρέξουν για 16-18 ώρες (over night) σε θερμοκρασία 4°C. Για την εμφάνιση των αποτελεσμάτων ακολουθεί χρώση της πηκτής με νιτρικό άργυρο (AgNO<sub>3</sub>) (Ainsworth et al., 1991).



Εικόνα 13 (επάνω): Συσκευή ηλεκτροφόρησης για SSCP.

Εικόνα 14 (δεξιά): Εμφάνιση 3 διαφορετικών γενοτύπων (BB, Bb, bb) από συνδυασμούς 2 αλληλομόρφων που έχουν διαφορά σε ένα μόνο ζεύγος βάσεων.



### Χρώση με νιτρικό άργυρο ( $AgNO_3$ ) - Silver Staining

Η διαδικασία ξεκινάει τοποθετώντας την ηλεκτροφορημένη πηκτή σε ένα δοχείο. Στη συνέχεια ακολουθούνται τα εξής στάδια:

1) Παρασκευή **Διαλύματος I** το οποίο περιέχει:

8ml ethanol + 0,5ml οξικό οξύ, σε τελικό όγκο  $V_{\text{τελ}}=400\text{ml}$ .

Ακολουθούν 2 πλύσεις με το Διάλυμα I, για 3 min η κάθε μια και στη συνέχεια μία πλύση με  $ddH_2O$ .

2) Παρασκευή **Διαλύματος II** το οποίο περιέχει:

$AgNO_3$  1gr/ltr, σε τελικό όγκο  $V_{\text{τελ}}= 200\text{ml}$ .

Η πλύση διαρκεί 15min και ακολουθούν 2 πλύσεις με  $ddH_2O$ .

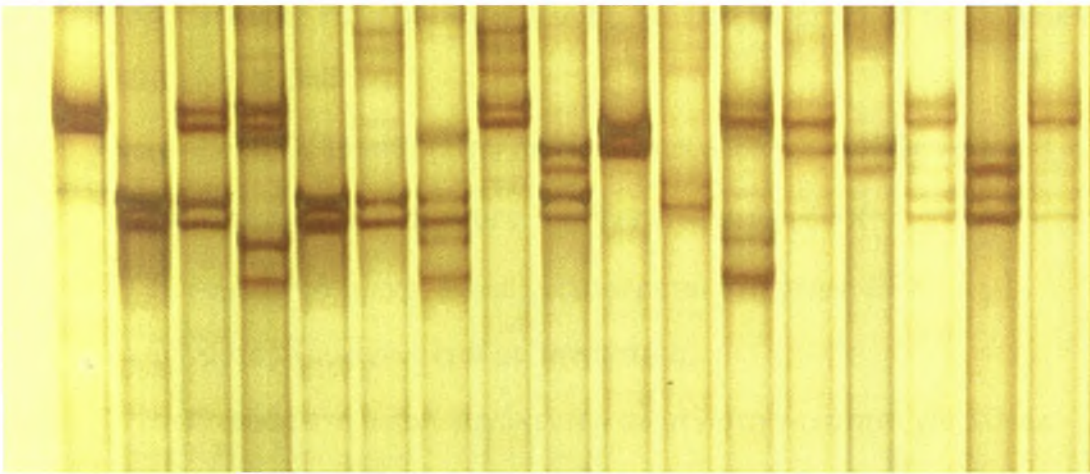
3) Παρασκευή **Διαλύματος III** το οποίο περιέχει:

3gr NaOH + 0,01gr  $NaBH_4$  + 1ml HCHO σε τελικό όγκο  $V_{\text{τελ}}= 200\text{ml}$

Η πηκτή παραμένει μέσα στο Διάλυμα III για 15-20min (μέχρι να εμφανιστούν καλά οι ζώνες των δειγμάτων) και ακολουθεί πλύση με ddH<sub>2</sub>O.

Στην τεχνική αυτή ο νιτρικός άργυρος σχηματίζει αδιάλυτα σύμπλοκα φωσφορικού αργύρου με τις φωσφορικές ομάδες του DNA. Όταν υπόκειται σε κάποιον αναγωγικό παράγοντα όπως π.χ. την φορμαλδεΐδη (HCHO), μαυρίζει. Στο τέλος της χρώσης, η πηκτή τοποθετείται μέσα σε νάιλον περίβλημα για να μην αφυδατωθεί κι έτσι διατηρείται για 6 περίπου μήνες.

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17



Εικόνα 15: Ενδεικτικά αποτελέσματα ανάλυσης SSCP σε 17 άτομα.

Στην παραπάνω εικόνα διακρίνονται κάποια πρότυπα ομοζυγωτικών ατόμων, όπως τα άτομα στις θέσεις 2, 5, 6 που έχουν και ίδιο πρότυπο ηλεκτροφόρησης μεταξύ τους (δύο ζώνες). Το άτομο στη θέση 3 εμφανίζει πρότυπο (τέσσερις ζώνες) το οποίο προκύπτει από συνδυασμό των ζωνών των ατόμων στις θέσεις 1 και 2. Ομοίως το άτομο στη θέση 9 φαίνεται να έχει προκύψει από συνδυασμό των ατόμων 2 και 14. Αυτό υποδεικνύει ότι τα άτομα στις θέσεις 3 και 9 είναι ετεροζυγωτικά. Ετεροζυγωτικά (με τέσσερις ζώνες) φαίνεται να είναι επίσης τα άτομα στις θέσεις 4, 7 και 12, αν και τα ομοζυγωτικά άτομα από των οποίων το συνδυασμό προέκυψαν δεν βρίσκονται

στη συγκεκριμένη πηκτή. Αντίστοιχα εξετάστηκαν και τα υπόλοιπα δείγματα συγκρινόμενα μεταξύ τους και τα άτομα εκείνα που εμφάνισαν καθαρά διαφορετικά πρότυπα ηλεκτροφόρησης, μετά από κατάλληλο καθαρισμό, στάλθηκαν για ανάλυση της αλληλουχίας τους.

### **Καθαρισμός DNA από διάλυμα**

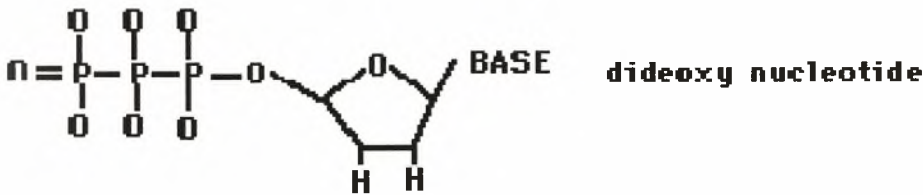
Ο καθαρισμός του DNA έγινε με βάση το "GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit" της Amersham Biosciences. Ο μέγιστος όγκος διαλύματος προϊόντος PCR/DNA που μπορεί να επεξεργαστεί με το ακόλουθο πρωτόκολλο είναι 100μl:

1. Μία στήλη GFX τοποθετείται σε σωλήνα συλλογής για κάθε καθαρισμό.
2. Προστίθενται 500μl **capture buffer** στη στήλη GFX.
3. Το διάλυμα DNA (μέχρι 100μl) μεταφέρεται στη στήλη GFX.
4. Τα δείγματα αναμειγνύονται με την πιπέτα.
5. Φυγοκέντρηση στη μικρή φυγόκεντρο σε μέγιστη ταχύτητα για 30sec.
6. Απόρριψη του υπερκειμένου αδειάζοντας το σωλήνα συλλογής.  
Τοποθέτηση της στήλης GFX ξανά μέσα στο σωλήνα συλλογής.
7. Προσθήκη 500μl **wash buffer** στη στήλη. Φυγοκέντρηση στη μέγιστη ταχύτητα για 30sec.
8. Απόρριψη του σωλήνα συλλογής και μεταφορά της στήλης GFX σε καινούργιο σωλήνα erpendorf 1,5ml.
9. Προσθήκη 50μl **elution buffer** (10ml Tris-HCl, pH 8.0) ή ddH<sub>2</sub>O στη κορυφή της στήλης GFX.
10. Επώαση των δειγμάτων σε θερμοκρασία δωματίου για 1min.
11. Φυγοκέντρηση σε μέγιστη ταχύτητα για 1min για ανάκτηση του καθαρισμένου DNA.

## Προσδιορισμός της αλληλουχίας DNA (Sequencing)

Μετά τον καθαρισμό τα δείγματα αποστάλθηκαν στην εταιρία Macrogen για προσδιορισμό της αλληλουχίας τους με τη Μέθοδο Τερματισμού Νουκλεοτιδικής Αλυσίδας με Διδεοξυνουκλεοτίδια (Dideoxynucleotide Chain Termination / Sanger).

Η αρχή της μεθόδου στηρίζεται στη χρήση 2',3'-διδεοξυτριφωσφορικών νουκλεοτιδίων (ddNTPs), τα οποία διαφέρουν από τα δεοξυνουκλεοτίδια διότι φέρουν ένα επιπλέον άτομο υδρογόνου ενωμένο στο 3' άτομο C αντί για μία ομάδα OH. Τα μόρια αυτά τερματίζουν την επιμήκυνση της αλυσίδας του DNA διότι δεν σχηματίζουν φωσφοδιεστερικό δεσμό με το επόμενο δεοξυνουκλεοτίδιο.

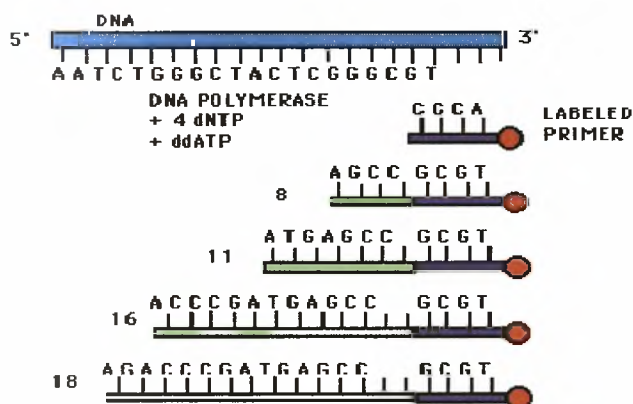


Εικόνα 16: Η δομή ενός διδεοξυνουκλεοτιδίου (ddNTP).

Προκειμένου να πραγματοποιηθεί αλληλούχηση, το πρώτο βήμα που ακολουθείται είναι η μετατροπή της διπλής έλικας του μορίου DNA σε μονόκλωνη αλυσίδα. Η αντίδραση αυτή πραγματοποιείται παρουσία NaOH το οποίο αποδιατάσσει το δίκλωνο μόριο DNA. Η αντίδραση Sanger περιλαμβάνει τα ακόλουθα:

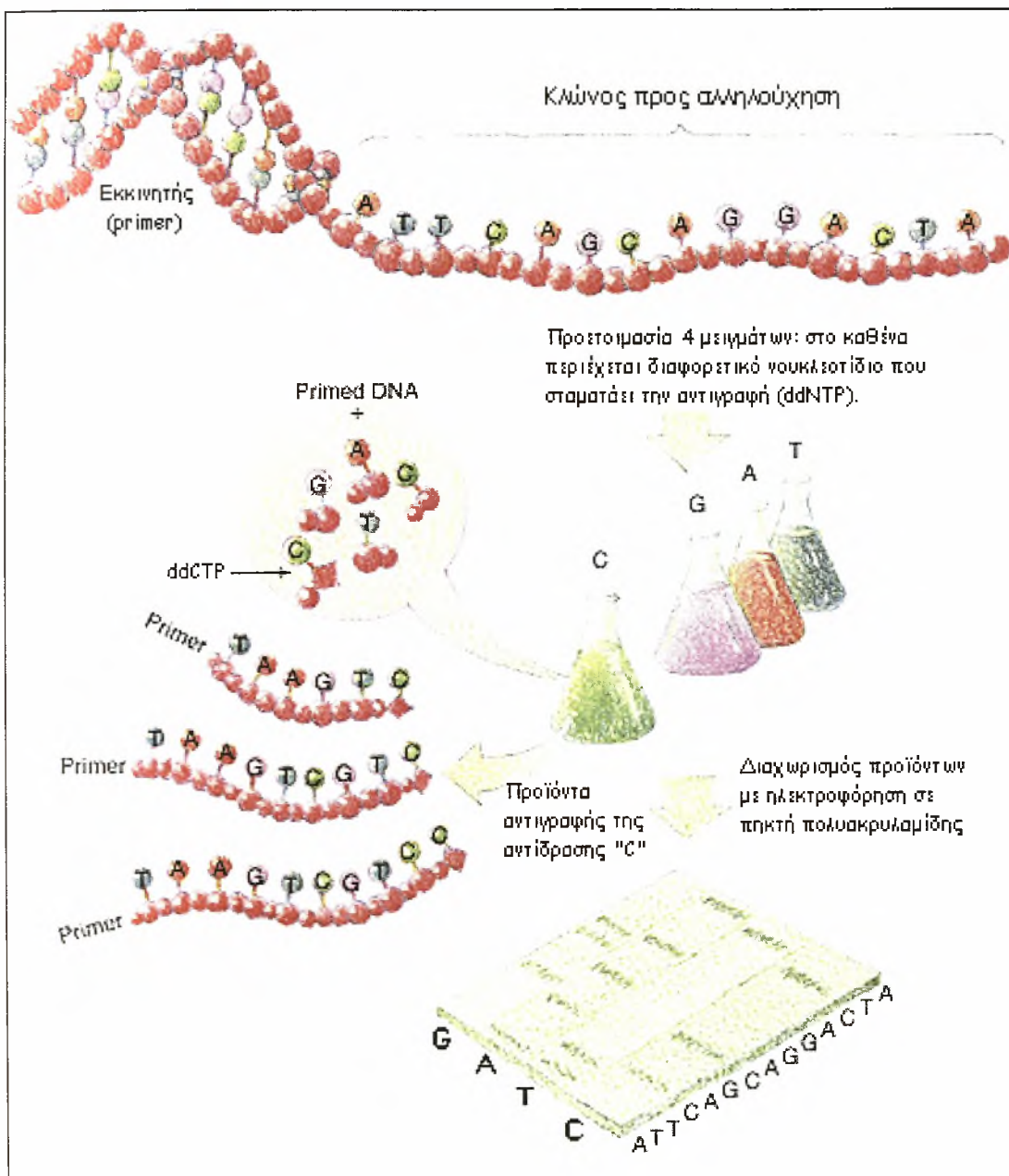
- ✓ Την αλυσίδα που υφίσταται αλληλούχηση (η οποία προκύπτει μετά από αποδιάταξη παρουσία NaOH).
- ✓ Εκκινητές (primers, συμπληρωματικά τμήματα DNA με την αλυσίδα που υφίσταται αλληλούχηση και ραδιενεργώς σημασμένα στο 5' άκρο).

✓ Μείγμα από ένα συγκεκριμένο ddNTP (όπως για παράδειγμα το ddATP) μαζί με το φυσιολογικό του dNTP (dATP σε αυτήν την περίπτωση) και τα υπόλοιπα τρία dNTPs (dCTP, dGTP, dTTP). Η συγκέντρωση του ddATP δε θα πρέπει να ξεπερνά το 1% της συγκέντρωσης του dATP. Η λογική πίσω από αυτό το ποσοστό είναι ότι μετά την προσθήκη της DNA πολυμεράσης, ο πολυμερισμός που λαμβάνει χώρα θα τερματιστεί όταν ένα ddATP ενσωματωθεί στον επιμηκυνόμενο κλώνο. Αν τα ddATP αποτελούν μόνο το 1% της συνολικής ποσότητας των dATP τότε θα προκύψει μια σειρά από σημασμένες αλληλουχίες, καθεμία από τις οποίες θα έχει διαφορετικό μήκος ανάλογα με τη θέση που προστίθεται η βάση σχετικά με το 5' άκρο.



Εικόνα 17: Στην εικόνα φαίνονται τα συστατικά μέρη μιας αντίδρασης Sanger καθώς και οι αλληλουχίες διαφορετικών μηκών που έχουν προκύψει.

Όταν όλες οι αντιδράσεις ολοκληρωθούν, τότε τα προϊόντα ηλεκτροφορούνται σε πηκτή πολυακρυλαμίδης (PAGE). Στην πηκτή υπάρχουν τέσσερις γραμμές κάθε μία από τις οποίες αντιστοιχεί σε μία από τις αντιδράσεις. Στη συνέχεια η πηκτή μεταφέρεται σε φίλτρο νιτροκυτταρίνης και υπόκειται σε αυτοραδιογραφία έτσι ώστε μόνο οι ζώνες με τα ραδιοσημασμένα 5' άκρα να είναι ορατές. Στην PAGE τα μικρότερα τμήματα DNA μετακινούνται γρηγορότερα. Συνεπώς η πρώτη ζώνη στη βάση του πηκτώματος υποδεικνύει το πρώτο διδεοξυνουκλεοτίδιο που προστέθηκε στο σημασμένο εκκινητή.



Εικόνα 18: Απεικόνιση της μεθόδου τερματισμού νουκλεοτιδικής αλυσίδας με διδεοξυνουκλεοτίδια (Sanger)



## Αποτελέσματα

Όσον αφορά το είδος *L. europaeus*, εξετάστηκαν 112 άτομα σε δείγματα των οποίων εφαρμόστηκε η μέθοδος PCR-SSCP για το γονίδιο DRB.

<i>L. europaeus</i>	ΠΡΟΤΥΠΟ
SWISS 1	1+2
SWISS 2	2
SWISS 3	5+6
SWISS 4	1
SWISS 5	2
SWISS 6	1
SWISS 7	3
SWISS 8	5
SWISS 9	5
SWISS 10	6
SWISS 12	2
SWISS 13	1
SWISS 14	5
SWISS 15	1
SWISS 17	7
SWISS 18	1+2
SWISS 20	1
SWISS 21	1+2
SWISS 22	1+7
SWISS 23	1
SWISS 25	2
SWISS 28	3
SWISS 29	1+2
SWISS 31	8
SWISS 33	1+8
SWISS 34	1
SWISS 37	3
SWISS 38	1
SWISS 39	1
SWISS 40	2+4
SWISS 41	2
SWISS 42	8
SWISS 44	2+3
SWISS 45	5
SWISS 46	1
SWISS 47	9
SWISS 50	1
SWISS 51	1

<i>L. europaeus</i>	ΠΡΟΤΥΠΟ
SWISS 52	9
SWISS 53	3+6
SWISS 54	1+2
SWISS 56	1
SWISS 59	1+2
SWISS 62	1+2
SWISS 63	1
SWISS 65	2
SWISS 68	1
SWISS 70	1
SWISS 71	1
SWISS 72	6
SWISS 74	1
SWISS 75	1
SWISS 76	1
SWISS 77	1
SWISS 80	2+8
SWISS 82	4
SWISS 83	1
SWISS 84	5
SWISS 85	7
SWISS 87	9
SWISS 88	1+2
SWISS 89	1
SWISS 90	1+2
SWISS 92	2
SWISS 94	8
SWISS 95	1
SWISS 97	2
SWISS 100	4
SWISS 101	1+2
SWISS 102	1
SWISS 104	1
SWISS 105	1
SWISS 106	2+9
SWISS 107	6
SWISS 108	1
SWISS 109	1+2

<i>L. europaeus</i>	ΠΡΟΤΥΠΟ
SWISS 110	1+2
SWISS 113	1
SWISS 115	4
SWISS 117	6
SWISS 119	1
SWISS 120	1+2
SWISS 121	1
SWISS 122	1
SWISS 123	1+2
SWISS 126	5
SWISS 127	1+2
SWISS 129	5
SWISS 131	2+5
SWISS 132	2
SWISS 133	5
SWISS 134	5
SWISS 136	1+2
SWISS 137	2
SWISS 138	1
SWISS 139	4
SWISS 140	3
SWISS 142	7
SWISS 143	1
SWISS 146	1+7
SWISS 147	1
SWISS 148	5
SWISS 149	2
SWISS 150	3+4
SWISS 152	1+3
SWISS 155	1
SWISS 157	1+8
SWISS 158	1+2
SWISS 161	2
SWISS 162	1+2
SWISS 163	1
SWISS 164	3+9

Όπως φαίνεται από τους πίνακες, αποκαλύφθηκαν 22 διαφορετικά πρότυπα σε 112 άτομα. Τα 9 από τα πρότυπα ανήκουν σε ομοζυγωτικά άτομα (80 άτομα του προς εξέταση πληθυσμού - 71,4% ομοζυγωτία). Τα υπόλοιπα 13 πρότυπα ανήκουν σε ετεροζυγωτικά άτομα (32 άτομα του προς εξέταση πληθυσμού - 28,6% ετεροζυγωτία) και αποτελούν συνδυασμούς των 9 προτύπων που αντιστοιχούν στα ομοζυγωτικά άτομα. Αυτό υποδεικνύει την ύπαρξη 9 αλληλομόρφων (8% ποικιλομορφία) του γονιδίου DRB στον *L. europaeus*, τα οποία δόθηκαν για αλληλούχηση ώστε να μπορούν να συγκριθούν μεταξύ τους.

Η επεξεργασία των δεδομένων αυτών έγινε με τη βοήθεια των προγραμμάτων:

- BioEdit 7.0
- CLUSTAL
- TREEVIEW

Στην παρακάτω πολλαπλή ομοπαράθεση που έγινε με το πρόγραμμα BioEdit 7.0, φαίνονται στοιχημένες οι αλληλουχίες των 9 ομοζυγωτικών προτύπων του DRB που βρέθηκαν για τον *L. europaeus*. Αναλυτικά απεικονίζεται μόνο η αλληλουχία του προτύπου 1, ενώ στις αλληλουχίες των προτύπων που ακολουθούν, όταν στην ίδια θέση αντιστοιχεί ίδια βάση, αυτό συμβολίζεται με κουκίδα. Κάθε άλλη διαφορά διευκρινίζεται με το γράμμα της βάσης που αλλάζει.

```

          10          20          30          40          50          60
Pattern1_Le TGAGTGTCAATTTCTACAACGGGACGCAGCGGGTGCCGGTTCCTGGATAGGCATTTCTACAA
Pattern2_Le .....G..A.T.....
Pattern3_Le .....
Pattern4_Le .....G...C.....
Pattern5_Le .....G...T.....
Pattern6_Le .....G.....
Pattern7_Le .....G..A.T.....
Pattern8_Le .....AT.C...C....
Pattern9_Le .....G.AAA.....

```

```

          70          80          90          100          110          120
Pattern1_Le CCGGGAGGAGTTCCTGCGCTTCGACAGCGACGTGGGGGAGTACCAGGCGGTGACCGAGCT
Pattern2_Le .....A.....G.....
Pattern3_Le .....A.G.....G.....
Pattern4_Le .....G...T.....G.....
Pattern5_Le .....A.....G.....
Pattern6_Le .....A.....G.....
Pattern7_Le .....A.....G.....
Pattern8_Le .....A..G.....G.....
Pattern9_Le .....A.....G.....

```

```

          130          140          150          160          170          180
Pattern1_Le GGGCCGGCCGGACGCCAAGTACTGGAACAGCCAGCCGGACTTCCTGGAGGACAGGCGGGC
Pattern2_Le .....G.....
Pattern3_Le .....TA.....G.....G.....
Pattern4_Le .....T.CA.....T.....ACA.....T...C.A....
Pattern5_Le .....G.....A.....T...C.....
Pattern6_Le .....TC.....A.....T.....AGA.....T..GC....
Pattern7_Le .....A.....G.....A.A.....T.TGC....
Pattern8_Le .....TA.....A.....
Pattern9_Le .....C.....G.....A.....T...C.....

```

```

          190          200          210          220
Pattern1_Le CCCGGTGGACACTTACTGCAAACACAACCTACGGGGTTCGGGAGA
Pattern2_Le .....
Pattern3_Le .T.....
Pattern4_Le .....G.....
Pattern5_Le .T.C.....G.T.....
Pattern6_Le .G.....G.T.....
Pattern7_Le .G.....G.T.....
Pattern8_Le .....
Pattern9_Le .T.....T.....

```

Η μέθοδος PCR-SSCP εφαρμόστηκε για το γονίδιο DRB και σε δείγματα του είδους *L. timidus*, όπου εξετάστηκαν 90 άτομα.

<i>L. timidus</i>	ΠΡΟΤΥΠΟ
SWISS 1	4
SWISS 2	2
SWISS 3	3
SWISS 4	2+4
SWISS 5	3
SWISS 8	4+5
SWISS 9	1+2
SWISS 11	3+4
SWISS 12	4
SWISS 13	1+2
SWISS 14	4+5
SWISS 15	3+4
SWISS 16	2+4
SWISS 17	1+2
SWISS 18	1
SWISS 19	2
SWISS 20	4
SWISS 21	2+3
SWISS 22	2
SWISS 23	6
SWISS 26	4
SWISS 27	2+4
SWISS 29	2+4
SWISS 30	2+3
SWISS 31	1
SWISS 32	2
SWISS 33	2+4
SWISS 35	1
SWISS 36	2+4
SWISS 37	2+4

<i>L. timidus</i>	ΠΡΟΤΥΠΟ
SWISS 38	7
SWISS 39	1
SWISS 40	4
SWISS 41	4
SWISS 42	2
SWISS 43	2+4
SWISS 51	1+2
SWISS 52	2+4
SWISS 53	1+3
SWISS 54	2+4
SWISS 55	4
SWISS 56	4+6
SWISS 57	2+4
SWISS 58	2
SWISS 59	3
SWISS 60	2+4
SWISS 61	4
SWISS 62	4
SWISS 63	4
SWISS 64	2
SWISS 71	4
SWISS 72	4
SWISS 73	2+6
SWISS 74	2+4
SWISS 75	4
SWISS 76	3
SWISS 77	6
SWISS 79	6+7
SWISS 80	4+6
SWISS 81	3+4

<i>L. timidus</i>	ΠΡΟΤΥΠΟ
SWISS 87	4+6
SWISS 89	5+6
SWISS 90	3
SWISS 91	3+6
SWISS 92	3+4
SWISS 93	4+5
SWISS 94	1+4
SWISS 95	4+7
SWISS 103	2+4
SWISS 104	2
SWISS 105	2+7
SWISS 106	2+7
SWISS 107	2+3
SWISS 109	5+6
SWISS 110	1+3
SWISS 111	1
SWISS 112	2+3
SWISS 115	2+4
SWISS 116	2+4
SWISS 117	6
SWISS 119	3
SWISS 120	3
GLARUS 1	3+4
GLARUS 2	4
GLARUS 3	2+4
GLARUS 5	4+7
GLARUS 6	2+6
GLARUS 7	1+4
GLARUS 13	3
GLARUS 14	6+7

Για τον *L. timidus* αποκαλύφθηκαν 21 διαφορετικά πρότυπα. Τα 7 από τα πρότυπα ανήκουν σε ομοζυγωτικά άτομα (39 άτομα του προς εξέταση πληθυσμού - 43,3% ομοζυγωτία). Τα υπόλοιπα 14 πρότυπα ανήκουν σε ετεροζυγωτικά άτομα (51 άτομα του προς εξέταση πληθυσμού- 56,7% ετεροζυγωτία). Τα 7 αλληλόμορφα του γονιδίου DRB στον *L. timidus* (7,7% ποικιλομορφία), δόθηκαν για αλληλούχιση και συγκρίθηκαν μεταξύ τους με τη βοήθεια του BioEdit 7.0.

```

          10      20      30      40      50      60
Pattern1_Lt  TGAGTGTCAATTTCTACAACGGGACGCAGCGGGTGCGGGTCCTGGAGAGGCACCTTCTACAA
Pattern2_Lt  .....T.....T..ATT.....
Pattern3_Lt  .....T.....
Pattern4_Lt  .....T.....
Pattern5_Lt  .....T.....T.....
Pattern6_Lt  .....T.....T..TT.....
Pattern7_Lt  .....T.....T..AT.....

```

```

          70      80      90      100     110     120
Pattern1_Lt  CCGGGAGGAGACTCTGCGCTTCGACAGCGACTGGGGGACTACAGGGCGGGTGACCCGAGCT
Pattern2_Lt  .....TTCG.....C.....
Pattern3_Lt  .....TTCG.....C.....
Pattern4_Lt  .....ACG.....A.....C.....
Pattern5_Lt  .....TTCA.....C.....
Pattern6_Lt  .....TTCG.....C.....
Pattern7_Lt  .....TTCG.....C.....

```

```

          130     140     150     160     170     180
Pattern1_Lt  GGGCCGGCCGGAGGCCAAGGACTGGAACAGCCAGCCGGACTTCCTGGAGGACAGGGCGGGC
Pattern2_Lt  .....C.....T.....G.....A.....A.....
Pattern3_Lt  .....C..G..T.....T.....AAG
Pattern4_Lt  .....TC.....T.....T.....AGA.....T..GC.....
Pattern5_Lt  .....T.C.....AT.....T.....AGA.....T..GC.....
Pattern6_Lt  .....C.....T.....A.....A.....
Pattern7_Lt  .....C.....T.....G.....A.....

```

```

          190     200     210     220
Pattern1_Lt  ATCCGTGGACACGTACTGCAAACACAACACTACGGGGTTCGGGAGA
Pattern2_Lt  CC.G.....T.T.....
Pattern3_Lt  CCAG.....TGT.....
Pattern4_Lt  CG.G.....
Pattern5_Lt  CG.G.....T.....
Pattern6_Lt  CC.G.....T.T.....
Pattern7_Lt  CC.G.....T.T.....

```

Επίσης, ενώ δε βρέθηκε κανένα κοινό αλληλόμορφο ανάμεσα στα δύο είδη, θα πρέπει να παρατηρηθεί η μεγάλη ομοιότητα που υπάρχει μεταξύ των αλληλόμορφων στο είδος *L. euroraeus* και των αντίστοιχων αλληλόμορφων στο *L. timidus*, όπως απεικονίζεται στην επόμενη πολλαπλή ομοπαράθεση.

```

      10      20      30      40      50      60      70      80
Pattern1_Lt TGAGTGTCATTTCTACAACGGGACGCAGCGGGTGCGGCTTCCTGGAGAGGCACTTCTACAACGGGAGGAGACTTCGGCGCT
Pattern2_Lt .....T.....T..ATT.....TTCG.....
Pattern3_Lt .....T.....TTCG.....
Pattern4_Lt .....T.....ACG.....
Pattern5_Lt .....T.....T.....TTCA.....
Pattern6_Lt .....T..T..TT.....TTCG.....
Pattern7_Lt .....T..T..AT.....TTCG.....
Pattern1_Le .....T.....T..T.....TTC.....
Pattern2_Le .....T.....A..TT.....TTCA.....
Pattern3_Le .....T.....T..T.....TACG.....
Pattern4_Le .....T.....TTCG.....TTCA.....
Pattern5_Le .....T.....TT.....TTCA.....
Pattern6_Le .....T.....T.....TTCA.....
Pattern7_Le .....T.....A..TT.....TTCA.....
Pattern8_Le .....T.....T..AT..C.....ATTCG.....
Pattern9_Le .....T.....AAA..T.....TTCA.....

      90      100      110      120      130      140      150      160
Pattern1_Lt TCGACAGCGACGTGGGGGAGTACAGGGCGGTGACCGAGCTGGGCCGGCCGGAGGCCAAGGACTGGACAGCCAGCCGGAC
Pattern2_Lt .....C.....C.....C.....T.....G.....
Pattern3_Lt .....C.....C.....G..T.....T.....
Pattern4_Lt .....A.....C.....TC.....T.....T.....
Pattern5_Lt .....C.....T..C.....AT.....T.....
Pattern6_Lt .....C.....C.....T.....G.....
Pattern7_Lt .....C.....C.....T.....G.....
Pattern1_Le .....CA.....C.....T.....
Pattern2_Le .....C.....C.....T.....
Pattern3_Le .....C.....TA..C.....T.....
Pattern4_Le ..T.....C.....T..CA.....T.....T.....
Pattern5_Le .....C.....C.....T.....
Pattern6_Le .....C.....TCC.....AT.....T.....
Pattern7_Le .....C.....C.....AT.....G.....
Pattern8_Le .....C.....TA..C.....T.....
Pattern9_Le .....C.....C.....T.....G.....

      170      180      190      200      210      220
Pattern1_Lt TTCCTGGAGGACAGGCGGGCATCCGTGGACACGTACTGCAAACACAACTACGGGGTTCGGGAGA
Pattern2_Lt A.....A..CC..G.....T..T.....
Pattern3_Lt .....AAGCCAG.....TGT.....
Pattern4_Lt AGA.....T..GC.....CG..G.....
Pattern5_Lt AGA.....T..GC.....CG..G.....T.....
Pattern6_Lt A.....A..CC..G.....T..T.....
Pattern7_Lt .....A..CC..G.....T..T.....
Pattern1_Le .....CC..G.....T.....
Pattern2_Le ..G.....CC..G.....T.....
Pattern3_Le ..G.....C..G.....T.....
Pattern4_Le ACA.....T..C..A.....CC..G.....
Pattern5_Le ..A.....T..C.....C.....T.....
Pattern6_Le AGA.....T..GC.....CG..G.....T.....
Pattern7_Le A..A.....T..TGC.....CG..G.....T.....
Pattern8_Le .....A.....CC..G.....T.....
Pattern9_Le ..A.....T..C.....C..G.....T..T.....

```



Εικόνα 19: Φυλογενετικό δέντρο όπου απεικονίζονται οι γενετικές αποστάσεις μεταξύ των 16 συνολικά αλληλομόρφων του εξονίου 2 του DRB στα είδη *L. euroraeus* (9 αλληλόμορφα) και *L. timidus* (7 αλληλόμορφα).

Στην παραπάνω εικόνα παρατηρούνται κάποιες συστοιχίες αμιγείς για το κάθε είδος, όπως τα Πρότυπα 1, 3 και 8 για τον *L. euroraeus* και τα Πρότυπα 3, 7, 2 και 6 για τον *L. timidus*. Παρόλα αυτά αξιοσημείωτη είναι η ομοιότητα του Προτύπου 6 *L.e* με το Πρότυπο 5 *L.t*, καθώς έχουν διαφορά μόλις σε μία βάση (στη θέση 132 ο *L.e* έχει C, ενώ ο *L.t* έχει A). Γενικότερα, αυτό που παρατηρείται είναι ότι αλληλουχίες του ενός είδους συγγενεύουν περισσότερο με αλληλουχίες του άλλου είδους, παρά με αντίστοιχες του ίδιου είδους. Αυτό μπορεί να ερμηνευτεί με δύο τρόπους: είτε σημαίνει ότι τα δύο είδη διαχωρίστηκαν πρόσφατα και είναι ακόμη φυλογενετικά κοντά οι γενετικοί τους τόποι DRB, είτε αποδεικνύεται ότι λόγω υβριδισμού μεταξύ τους έγινε ανασυνδυασμός σε κάποια γονίδια με αποτέλεσμα το πέρασμα μέρους των γονιδίων του ενός είδους στο άλλο.

## Συζήτηση

Η διατήρηση της γενετικής σύστασης ενός ζωικού είδους αποτελεί ένα από τα σημαντικότερα θέματα που απασχολούν τη σύγχρονη βιολογία ήδη από τη δεκαετία του 1950 (Simon, 1984). Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε ο πολυμορφισμός του γονιδίου DRB του MHC στα είδη *Lepus europaeus* και *Lepus timidus*. Η μελέτη του πολυμορφισμού είχε ως αποτέλεσμα την εύρεση 22 προτύπων για το είδος *Lepus europaeus*, αποτελούμενα από συνδυασμούς 9 διαφορετικών αλληλομόρφων του DRB, ενώ για το είδος *Lepus timidus* βρέθηκαν 21 πρότυπα, τα οποία αντιστοιχούν σε 7 διαφορετικά αλληλόμορφα. Με αυτόν τον τρόπο μπορεί να γίνει μια εκτίμηση του πολυμορφισμού του DRB στο κάθε είδος αλλά και μία σύγκριση μεταξύ των δύο ειδών όσον αφορά το συγκεκριμένο γονίδιο.

Έχει διατυπωθεί η υπόθεση ότι ο πολυμορφισμός δημιουργήθηκε εξελικτικά για να εξασφαλιστεί ότι ο πληθυσμός δε θα υποκύψει σε ένα νέο μικροοργανισμό ή σε έναν παλιό μικροοργανισμό που έχει μεταλλάξει κάποια πρωτεΐνη του, γιατί τουλάχιστον κάποια άτομα θα είναι ικανά να εγείρουν αποτελεσματικές ανοσοαπαντήσεις κατά οποιουδήποτε πεπτιδίου και συνεπώς το είδος δε θα οδηγηθεί σε εξαφάνιση. Έτσι ο πολυμορφισμός αποτελεί κριτήριο για τη γενετική ευρωστία ενός πληθυσμού.

Ένα άλλο σημαντικό χαρακτηριστικό των γονιδίων MHC είναι ότι η έκφρασή τους είναι συγκυρίαρχη, δηλαδή στους ετεροζυγώτες τα αλληλόμορφα που κληρονομούνται από κάθε γονέα εκφράζονται εξίσου. Η φυσική επιλογή, λοιπόν, ευνοεί ευθέως τα MHC ετεροζυγωτικά άτομα ως αποτέλεσμα της αυξημένης αποτελεσματικότητάς τους στην αντιμετώπιση ενός ευρέος φάσματος παθογόνων (Nei & Hughes, 1991).

Τα δείγματα *Lepus europaeus* και *Lepus timidus* που αναλύθηκαν προήλθαν από την Ελβετία, όπου συνυπάρχουν και -όπως εδώ και πολύ καιρό



έχει θωρηθεί- υβριδίζονται (Lonnberg, 1905; Fraguiglione, 1959; Gustavsson, 1971). Το ποσοστό ποικιλομορφίας στο γονίδιο DRB υπολογίστηκε για τον *Lepus europaeus* 8% (με 28,6% ετεροζυγωτία), ενώ για τον *Lepus timidus* 7,7% (με 56,7% ετεροζυγωτία).

Μελέτες για την ποικιλομορφία του γονιδίου DRB έχουν γίνει και σε άλλα θηλαστικά, όπως στο ελάφι *Odocoileus virginianus* με τη μέθοδο SSCP. Βρέθηκαν 15 αλληλόμορφα του εξονίου 2 του DRB σε δείγματα 150 ελαφιών ενός πληθυσμού της νοτιοανατολικής Οκλαχόμα (10% ποικιλομορφία). Ακόμη έγινε φυλογενετική ανάλυση σε σύγκριση με αλληλόμορφα άλλων ειδών της ίδιας οικογένειας όπως το ελάφι *Cervus elaphus*, το ζαρκάδι *Capreolus capreolus* και το ελάφι *Alces americana* (Van Den Bussche et al., 1999). Προέκυψε λοιπόν ότι η κατανομή πολυμορφικών αμινοξέων στα αλληλόμορφα *Odvi*-DRB ήταν παρόμοια με αυτήν των αλληλομόρφων *Ceel*-DRB (Swarbrick et al., 1995) παρόλο που το κάθε είδος είχε και τα δικά του, μοναδικά για το είδος του, κατάλοιπα.

Άλλο ένα είδος το οποίο μελετήθηκε ως προς την ποικιλομορφία που παρουσιάζει στο MHC είναι και το κοινό χάμστερ *Cricetus cricetus*. Σε αντίθεση με την Τσεχία, όπου υπάρχει ένας πολύ μεγάλος και πολυμορφικός πληθυσμός με 86,6% ποικιλομορφία (13 διαφορετικά αλληλόμορφα σε 15 άτομα - 91% ετεροζυγωτία), στη Δανία και τη Γαλλία όλα τα ζώα είναι πανομοιότυπα και ομοζυγωτικά (ένα μοναδικό αλληλόμορφο). Αυτή η πλήρης έλλειψη διαφοροποίησης είναι πιθανώς το αποτέλεσμα ενός φαινομένου στενωπού που προκλήθηκε από τις αλλαγές που έγιναν τις τελευταίες δεκαετίες στις γεωργικές μεθόδους στη Δυτική Ευρώπη (Smulders et al., 2003).

Αντίστοιχα με το χάμστερ, φαινόμενο στενωπού έχουν υποστεί και οι θαλάσσιοι ελέφαντες του είδους *Mirounga angustirostris*, που κυνηγήθηκαν σχεδόν μέχρι εξαφάνισης τον 19ο αιώνα αλλά παρόλα αυτά ο πληθυσμός τους

ανέκαμψε και τώρα το είδος αριθμεί περίπου 175.000 άτομα (Cooper & Stewart, 1983; Stewart et al., 1994). Αυτό όμως είχε ως συνέπεια να μειωθεί η ποικιλομορφία του είδους και συγκεκριμένα μετά από ανάλυση SSCP αποκαλύφθηκε η ύπαρξη μόνο 3 αλληλομόρφων για το γονίδιο DRB σε 110 άτομα (2,7% ποικιλομορφία) (Weber et al., 2004).

Σε μελέτη που έγινε στο εξόνιο 2 του DRB στο είδος *Rupicapra rupicapra* βρέθηκαν 19 διαφορετικά αλληλόμορφα σε δείγματα 59 ατόμων. Αυτό σημαίνει ότι ο πληθυσμός έχει 32,2% ποικιλομορφία. Επίσης ένας σημαντικά υψηλότερος ρυθμός μη-συνώνυμων μεταλλάξεων σε σύγκριση με το ρυθμό των συνώνυμων μεταλλάξεων, υποδεικνύει την ύπαρξη θετικής επιλογής για την ποικιλομορφία στο DRB (Schaschl et al., 2005).

Αποτελέσματα από αδημοσίευτες μελέτες σε πληθυσμούς *Lepus europaeus* της Ελλάδας και της Βουλγαρίας δείχνουν την ύπαρξη 20 διαφορετικών αλληλομόρφων σε 524 άτομα που αναλύθηκαν συνολικά. Αυτό ερμηνεύεται ως 3,8% ποικιλομορφία στους εν λόγω πληθυσμούς.

Από τα αποτελέσματα των διάφορων μελετών που παρατέθηκαν παραπάνω, παρατηρούμε ότι το ποσοστό ποικιλομορφίας σε πληθυσμούς θηλαστικών κυμαίνεται από μηδέν, όπως στην περίπτωση του χάμστερ *Cricetus cricetus* στη Γαλλία και στη Δανία, μέχρι και 86,6%. Συνεπώς, τα ποσοστά ποικιλομορφίας που βρέθηκαν σε αυτήν τη μελέτη για τα είδη *Lepus europaeus* και *Lepus timidus* της Ελβετίας μπορούν να χαρακτηριστούν σχετικά μικρά (8% για τον *Lepus europaeus* και 7,7% για τον *Lepus timidus*).

Μέχρι τώρα έχουν προταθεί οι ακόλουθες υποθέσεις για να ερμηνεύσουν τον χαμηλό πολυμορφισμό στο MHC: (1) μειωμένη εξελικτική πίεση λόγω χαμηλού ρυθμού ανάπτυξης και μετάδοσης παθογόνων σε θαλάσσια περιβάλλοντα [θαλάσσιος ελέφαντας *Mirounga leonine* (Slade et al., 1992)], (2) μη-προσαρμοστική απώλεια λόγω μειωμένου γεωγραφικού εύρους και πληθυσμού μικρού με μειούμενο μέγεθος (φαινόμενο στενωπού)

[κάστορας *Castor fiber* (Babik et al., 2005)], (3) μοναχικός τρόπος ζωής που προκαλεί μειωμένη μεταφορά παθογόνων ανάμεσα στα άτομα του πληθυσμού και συνεπώς μειωμένη εξελικτική πίεση [σουηδικό ελάφι *Alces alces* (Ellegren et al., 1996)] και (4) μειωμένος πολυμορφισμός ως συνέπεια του συστήματος αναπαραγωγής σε συνδυασμό με περιορισμένη γενετική ροή (Sommer & Tichy, 1999).

Όσον αφορά τον ορεινό λαγό *Lepus timidus*, αποίκησε τη Σκανδιναβία στο τέλος της πιο πρόσφατης πλειστόκαινου (Liljegren & Lageras, 1993). Στην αρχή του τελευταίου αιώνα αποίκησε όλη τη Σουηδία, αλλά μετά εξαφανίστηκε σταδιακά από το νότο. Ο Lonhberg (1908) περιγράφει μείωση της κατανομής μέσα σε 5 χρόνια, από το 1901 έως το 1906. Μια πιθανή αιτία για τη μόνιμη εξαφάνιση του ορεινού λαγού από την Ευρώπη φαίνεται να είναι ο διαειδικός ανταγωνισμός και ο υβριδισμός με τον ευρωπαϊκό λαγό, ή πιθανώς ακόμη και η προσβολή από επιδημικές ασθένειες φερόμενες από τον *Lepus europaeus* (Thulin, 2003). Μία σύγκριση των κατανομών του ορεινού λαγού και του ευρωπαϊκού λαγού στην Ευρώπη δείχνει ότι όπου υπάρχει ο *Lepus europaeus*, ο *Lepus timidus* φαίνεται να περιορίζεται σε μεγάλα υψόμετρα και πυκνά δάση. Ο διαχωρισμός του κάθε είδους σε διαφορετικό περιβάλλον φαίνεται να είναι γενικό χαρακτηριστικό των λαγών (Flux, 1981).

Έχει παρατηρηθεί ότι τα δύο είδη λαγών υβριδίζονται μεταξύ τους και προς τις δύο κατευθύνσεις, το οποίο επιβεβαιώνεται με ανάλυση δεικτών μιτοχονδριακού DNA (mtDNA) μητρικής προέλευσης. Ο ευρωπαϊκός λαγός *Lepus europaeus* εισήχθη στη Σουηδία από τη Βόρεια Ευρώπη ως κυνήγι κατά τη διάρκεια του 19<sup>ου</sup> αιώνα (Lonhberg, 1905). Από τις πρώτες εισαγωγές ευρωπαϊκού λαγού στη Σουηδία, αναφέρθηκε η εμφάνιση στη φύση μορφολογικών ενδιάμεσων μεταξύ του ευρωπαϊκού και του ορεινού λαγού (Lonhberg, 1905). Αυτά τα άτομα, που παρουσιάζουν ενδιάμεσα χαρακτηριστικά, θεωρήθηκαν υβρίδια των ειδών (Lonhberg, 1905). Σε

αιχμαλωσία, Θηλυκά ορεινού λαγού ζευγαρώνουν αυθόρμητα με αρσενικά ευρωπαϊκού λαγού και παράγουν βιώσιμους απογόνους, αλλά αντίθετη διασταύρωση επιτεύχθηκε μόνο με τεχνητή γονιμοποίηση (Gustavsson & Sundt, 1965). Αργότερα όμως οι Thulin et al. (2006) βρήκαν στη Ρωσία τρία δείγματα με mtDNA *Lepus europaeus* και πυρηνικό DNA *Lepus timidus*. Αυτό το mtDNA διαπερνά το φραγμό μεταξύ των ειδών μέσω υβριδισμού μεταξύ τους, όποτε αυτά υπάρχουν σε συμπατρία (Thulin & Tegelstrom, 2002).

Κάθε φορά που ένας θηλυκός ορεινός λαγός ζευγαρώνει με έναν αρσενικό ευρωπαϊκό λαγό, ο τοπικός πληθυσμός *Lepus timidus* χάνει έναν αμιγή απόγονο του είδους. Αυτό το φαινόμενο, "εξόντωση μέσω υβριδισμού", έχει παλαιότερα περιγραφεί από τους Rhymer & Simberloff (1996) και είναι μία πιθανή κατάληξη όταν υβριδίζεται ένα γηγενές με ένα εισαγόμενο είδος (Ebenhard, 1988; Simberloff, 1996). Συμπερασματικά, οι ορεινοί λαγοί διώκονται από τους ευρωπαϊκούς λαγούς τόσο οικολογικά όσο και γενετικά (Thulin, 2003) αφού, όπως φαίνεται, ο *Lepus europaeus* διευκολύνει την εξάπλωσή του στο βορρά προσαρμοζόμενος μέσω υβριδισμού και διείσδυσης (Anderson & Stebbins, 1954).

## **Βιβλιογραφία**

- Abul K.Abbas, Andrew H. Lichtman: Basic Immunology. W.B.SAUNDERS COMPANY
- Ainsworth P., Surth L., Coulter-Mackie M. (1991). Diagnostic single strand conformation polymorphism, (SSCP): a simplified non- radioisotopic method as applied to Tay-Sachs B1 variant. *Nucleic Acids Res.* 19, p.405-406
- Anderson, E. & Stebbins, G.L. Jr (1954) Hybridization as an evolutionary stimulus. *Evolution*, 8, 378-388.
- Angerbojorn, A., J. Flux. June 23, 1995. *Lepus timidus*. *Mammalian Species*, 495: 1-11.
- Babik W, Durka W, Radwan J. Sequence diversity of the MHC DRB gene in the Eurasian beaver (*Castor fiber*). *Molecular Ecology* (2005) 14, 4249-4257
- Bansfield, A. 1974. *Mammals of Canada*. Toronto: University of Toronto Press.
- Bingulac-Popovic J, Figueroa F, Sato A, Talbot WS, Johnson SL, Gates M, Postlethwait JH, Klein J: Mapping of mhc class I and class II regions to different linkage groups in the zebrafish, *Danio rerio*. *Immunogenetics* 46:129, 1997
- Bodmer WF. Evolutionary significance of the HLA system [Review]. *Nature* 1972; 237: 139-145.
- Bonino, N., A. Montenegro. 1997. Reproduction of the European hare in Pantagonia, Argentina. *Acta Theriologica*, 42(1): 47-54.
- Boyse EA, Beauchamp GK, Yamazaki K: Critical review: the sensory perception of genotypic polymorphism of the major histocompatibility

- complex and other genes: some physiological and phylogenetic implications. *Human Immunology* 6:177, 1983
- Boyson JE, Shufflebotham C, Cadavid LF, Urvater JA, Knapp LA, Hughes AL, Watkins DI: The MHC class I genes of the rhesus monkey. Different evolutionary histories of MHC class I and II genes in primates. *Journal of Immunology* 156:4656, 1996
- Broekhuizen, S., F. Maaskamp. 1980. Behaviour of does and leverets of the European hare (*Lepus europaeus*) whilst nursing. *J. Zool. Lond.*, 191: 487-501.
- Brown JL. Some paradoxical goals of cells and organisms: the role of the MHC. In: Pfaff DW, ed. *Ethical Questions in Brain and Behavior: Problems and Opportunities*, New York: Springer-Verlag, 1983: 111-124.
- Brown RE, Singh PB, Roser B: The major histocompatibility complex and the chemosensory recognition of individuality in rats. *Physiology & Behavior* 40:65, 1987
- Caillol, M., M. Meunier, M. Mondain-Monval, P. Simon. 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.
- Cooper CF, Stewart BS (1983) Demography of northern elephant seals, 1911-82. *Science*, 219, 969-971.
- Corbet, G., S. Harris. 1991. *The Handbook of British Mammals*. Oxford: Blackwell Scientific Publications.
- Dausset J. The major histocompatibility complex in man. *Science* 1981; 213: 1469-1474.
- Dragg, A. 1974. *Mammals of Ontario*. Waterloo, Ontario: Otter Press.
- Ebenhard, T. 1988. *Introduced birds and mammals and their ecological*

- effects. *J. Swed. Wildlife Res. (Viltrevy)* 4: 5-107.
- Eidlin M. Function by association? MHC antigens and membrane receptor complexes. *Immunology Today* 1988; 9: 218-219.
- Ellegren H, Mikko S, Wallin K, Andersson L (1996) Limited polymorphism at major histocompatibility complex (MHC) loci in the Swedish moose *A. alces*. *Mol Ecol* 5:3-9
- Fan, W., Kasahara, M., Gutknecht, J., Klein, D., Mayer, W. E., Jonker, M. & Klein, J. (1989) *Human Immunol.* 26, 107-121.
- Flajnik MF, Canel C, Kramer J, Kasahara M: Which came first, MHC class I or class II? *Immunogenetics* 33:295, 1991
- Flux, J.E.C. (1981) Field observations of behaviour in the genus *Lepus*. In: *Proceedings of the World Lagomorph Conference* (Ed. by K. Myers & C.D. MacInnes), pp. 377-394. University of Guelph, Guelph, Australia.
- Fraguglione, D. (1959) Les anomalies du pelage chez les lièvres commun et variable. *Diana*, 4, 57-59.
- Gaur L. K. & Nepom G. T. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 5380-5383.
- Gruen JR, Weissman SM. Evolving views of the major histocompatibility complex. *Blood* 1997; 90: 4252-4265.
- Gustavsson, I. and Sundt, C. O. 1965. Anwendung von künstlicher Befruchtung bei der Hybridisierung von zwei Hasenarten. *J. Z. Jagdwiss.* 11: 155-158. (in German)
- Gustavsson I (1971) Mitotic and meiotic chromosomes of the variable hare (*Lepus timidus* L.), the common hare (*Lepus europaeus* Pall.) and their hybrids. *Hereditas*, 67, 27-34.
- Gyllensten UB, Erlich HA: Ancient roots for polymorphism at the HLA-DQ alpha locus in primates. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 86:9986, 1989

- Gyllensten, U. B., Sundvall, M. & Erlich, H. A. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88, 3686-3690.
- Hall, E., K. Kelson. 1959. Mammals of North America. New York: The Ronald Press Co..
- Hamilton, W., J. Whitaker. 1943. Mammals of the Eastern United States. 2nd ed. Ithica, NY: Cornell University Press.
- Hughes AL, Nei M: Pattern of nucleotide substitution at major histocompatibility complex class I loci reveals overdominant selection. Nature 335:167, 1988
- Hughes AL, Nei M: Nucleotide substitution at major histocompatibility complex class II loci: evidence for overdominant selection. Proceedings of the National Academy of Sciences USA 86:958, 1989
- Hughes AL, Nei M: Evolutionary relationships of class II major-histocompatibility- complex genes in mammals. Molecular Biology & Evolution 7:491, 1990
- Hughes AL, Nei M: Evolutionary relationships of the classes of major histocompatibility complex genes. Immunogenetics 37:337, 1993
- Jones JS, Partridge L. Tissue rejection: the price for sexual acceptance . Nature 1983; 304: 484-485.
- Jonker M, Balner H . The major histocompatibility complex: a key to a better understanding of evolution. Transplantation Proceedings 1980; 12: 575-581.
- Kasahara M, Vazquez M, Sato K, McKinney EC, Flajnik MF: Evolution of the major histocompatibility complex: isolation of class II A cDNA clones from the cartilaginous fish. Proceedings of the National Academy of Sciences USA 89:6688, 1992
- Kasahara M, Hayashi M, Tanaka K, Inoko H, Sugaya K, Ikemura T, Ishibashi T: Chromosomal localization of the proteasome Z subunit



- gene reveals an ancient chromosomal duplication involving the major histocompatibility complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 93:9096, 1996
- Kasahara M, Nakaya J, Satta Y, Takahata N: Chromosomal duplication and the emergence of the adaptive immune system. *Trends in Genetics* 13:90, 1997
- Kaufman J, Skjoedt K, Salomonsen J: The MHC molecules of nonmammalian vertebrates. *Immunological Reviews* 113:83, 1990
- Klein J, O'hUigin C: Composite origin of major histocompatibility complex genes [Review]. *Current Opinion in Genetics & Development* 3:923, 1993
- Klein J, Sato A: Birth of the major histocompatibility complex. *Scandinavian Journal of Immunology* 47:199, 1998
- Kukita, Y., et al. SSCP Analysis of Long DNA Fragments in Low pH Gel. *Human Mutation*; 1997, (10): 400-7.
- Lawlor DA, Ward FE, Ennis PD, Jackson AP, Parham P: HLA-A and B polymorphisms predate the divergence of humans and chimpanzees. *Nature* 335:268, 1988
- Lawlor DA, Zemmour J, Ennis PD, Parham P: Evolution of class-I MHC genes and proteins: from natural selection to thymic selection. *Annual Review of Immunology* 8:23, 1990
- Liljegren R, Lageras P (1993) *Fran Mammutstapp Till Kohage: Djurens Histiria I Sverige*. Wallin & Dalhom Boktryckery AB, Lund.
- Lincoln, G. 1974. Reproduction and March madness in the Brown hare, *Lepus europaeus*. *J. Zool. Lond.*, 174: 1-14.
- Lönnerberg E (1905) On hybrids between *Lepus timidus* L. and *Lepus europaeus* Pall. From southern Sweden. *Proceedings of Zoological Society of London*, 1, 278-287.

- Lönnerberg E. (1908) Några villebrådsarters nutida utbredning i Skåne. Svenska Jägareförbundets Tidskrift, 46, 7-16.
- Lundberg, A. S. & McDevitt, H. O. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 6545-6549.
- Marsh, S. G. E. & Bodmer, J. G. (1992) Tissue Antigens 40, 229-243.
- Matsunaga T, Rahman A: What brought the adaptive immune system to vertebrates? Immunological Reviews 166:177, 1998
- Melcher, Ulrich. SSCPs.  
<<http://opbs.okstate.edu/~melcher/MG/MGW1/MG11129.html>>.
- Meruelo D, Edidin M . The biological function of the major histocompatibility complex: hypotheses [Review]. Contemporary Topics in Immunobiology 1980; 9: 231-253.
- Miller MM, Goto R, Bernot A, Zoorob R, Auffray C, Bumstead N, Briles WE: Two Mhc class I and two Mhc class II genes map to the chicken Rfp-Y system outside the B complex. Proceedings of the National Academy of Sciences USA 91:4397, 1994
- Nei M, Gu X, Sitnikova T: Evolution by the birth-and-death process in multigene families of the vertebrate immune system. Proceedings of the National Academy of Sciences USA 94:7799, 1997
- Nei M, Hughes AL (1991) 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, pp 222-247
- Nonaka M, Namikawa C, Kato Y, Sasaki M, Salter-Cid L, Flajnik MF: Major histocompatibility complex gene mapping in the amphibian *Xenopus* implies a primordial organization. Proceedings of the National Academy of Sciences USA 94:5789, 1997
- Ober C, Weitkamp LR, Cox N, Dytch H, Kostyu DD, Elias S. HLA and mate choice in humans. American Journal of Human Genetics 1997; 61: 497-

504.

- Ognev, S. 1966. *Mammals of the U.S.S.R. and Adjacent Countries*. Jerusalem: Israel Program for Scientific Translations.
- Ohno S: The ancestor of the adaptive immune system was the CAM system for organogenesis. *Experimental & Clinical Immunogenetics* 4:181, 1987
- Okamura K, Ototake M, Nakanishi T, Kurosawa Y, Hashimoto K: The most primitive vertebrates with jaws possess highly polymorphic MHC class I genes comparable to those of humans. *Immunity* 7:777, 1997
- Orita, M., et al. Detection of Polymorphisms of Human DNA by Gel Electrophoresis as SSCP. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*; 1989, (86): 2766-70.
- Palm J. Maternal-Fetal histoincompatibility in rats: an escape from adversity. *Cancer Research* 1974; 34: 2061-2065.
- Parham P, Adams EJ, Arnett KL: The origins of HLA-A,B,C polymorphism. [Review]. *Immunological Reviews* 143:141, 1995
- Parham P, Ohta T: Population biology of antigen presentation by MHC class I molecules. *Science* 272:67, 1996
- Peterson, R. 1966. *The Mammals of Eastern Canada*. Oxford University Press.
- Phillips ML, Moule ML, Delovitch TL, Yip CC. Class I histocompatibility antigens and insulin receptors: evidence for interactions. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 1986; 83: 3474-3478.
- Poli, A., M. Nigro, D. Gallazi, G. Sironi, A. Lavazza. 1991. Acute hepatitis in the european brown hare (*Lepus europaeus*) in Italy. *Journal of Wildlife Diseases*, 27(4): 621-629.

- Potts WK, Manning CJ, Wakeland EK. Mating patterns in seminatural populations of mice influenced by MHC genotype. *Nature* 1991; 352: 619-621.
- Potts WK, Wakeland EK: Evolution of MHC genetic diversity: a tale of incest, pestilence and sexual preference. *Trends in Genetics* 9:408, 1993.
- Potts WK, Slev PR: Pathogen-based models favoring MHC genetic diversity [Review]. *Immunological Reviews* 143:181, 1995
- Rhymer, J. M. and Simberloff, D. 1996. Extinction by hybridisation and introgression. *\_/ Annu. Rev. Ecol. Syst.* 27: 83\_/109.
- Schafer PH, Pierce SK, Jardetzky TS. The structure of MHC class II: a role for dimer of dimers. *Seminars in Immunology* 1995; 7: 389-398.
- Schaschl H, Goodman SJ, Suchentrunk F. Sequence analysis of the MHC class II DRB alleles in Alpine chamois (*Rupicapra r. rupicapra*). *Developmental and Comparative Immunology* 28 (2004) 265-277
- Schreiber AB, Schlessinger J, Edidin M. Interaction between major histocompatibility complex antigens and epidermal growth factor receptors on human cells. *Journal of Cell Biology* 1984; 98: 725-731.
- Simberloff, D. (1996) Hybridization between native and introduced wildlife species: importance for conservation. *Wildlife Biology*, 2, 143-150.
- Simon D. (1984). Conservation of animal genetic resources. A review. *Livest.Prod. Sci.* 11, p.23-26.
- Singh PB, Brown RE, Roser B: MHC antigens in urine as olfactory recognition cues. *Nature* 327:161, 1987.
- Slade R (1992) Limited MHC polymorphism in the southern elephant seal: implications for MHC evolution and marine mammal population biology. *Proc R Soc Lond B* 249:163-171

- Smulders M.J.M, Snoek L.B., Booy G., Vosman B. Complete loss of MHC genetic diversity in the Common Hamster (*Cricetus cricetus*) population in The Netherlands. Consequences for conservation strategies. *Conservation Genetics* 4:441-451, 2003
- Solano AR, Cremaschi G, Sbnchez ML, Borda E, Sterin-Borda L, Podestb EJ. Molecular and biological interaction between major histocompatibility complex class I antigens and luteinizing hormone receptors or beta-adrenergic receptors triggers cellular response in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 1988; 85: 5087-5091.
- Sommer S, Tichy, H (1999) MHC-class II polymorphism and paternity in the monogamous *Hypogeomys antimena*, the endangered, largest endemic Malagasy rodent. *Mol Ecol* 8:1259-1272
- Stewart BS, Yochem PK, Huber HR et al. (1994) History and present status of the northern elephant seal population. In: *Elephant Seals: Population Ecology, Behavior, and Physiology* (eds Le Boeuf BJ, Laws RM), pp. 29-48. University of California Press, Berkeley.
- Sunnucks, P., et al. SSCP Is Not So Difficult: The Application and Utility of Single-Stranded Conformation Polymorphism in Evolutionary Biology and Molecular Ecology. *Molecular Ecology*; 2000, (9): 1699-710.
- Svejgaard A, Ryder LP. Interaction of HLA molecules with non-immunological ligands as an explanation of HLA and disease association. *Lancet* 1976; ii: 547-549.
- Swarbrick PA, Schwaiger F-W, Epplen JT, Buchan GS, Griffin JFT, Crawford AM (1995) Cloning and sequencing of expressed DRB genes of the red deer (*Cervus elaphus*) Mhc. *Immunogenetics* 42:1-9

- Thulin CG. The distribution of mountain hares *Lepus timidus* in Europe: a challenge from brown hares *L. europaeus*? *Mammal Rev.* 2003, Volume 33, No. 1, 29-42.
- Thulin CG, Fang M, Averianov AO. Introgression from *Lepus europaeus* to *L. timidus* in Russia revealed by mitochondrial single nucleotide polymorphisms and nuclear microsatellites. *Hereditas* 00: 00/00 (2006)
- Thulin CG. and Tegelstrom, H. 2002. Biased geographical distribution of mitochondrial DNA that passed the species barrier from mountain hares to brown hares (genus *Lepus*), an effect of genetic incompatibility and mating behaviour? *J. Zool.* 258: 299\_/306.
- Trowsdale J. "Both man & bird & beast": comparative organization of MHC genes [Review]. *Immunogenetics* 1995; 41: 1-17.
- Van Den Bussche RA, Hooper SR, Lochmiller RL. Characterization of Mhc-DRB allelic diversity in white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*) provides insight into Mhc-BRB allelic evolution within Cervidae. *Immunogenetics* 1999; 49:429-437
- Verland S, Simonsen M, Gammeltoft S, Allen H, Flavell RA, Olsson L. Specific molecular interaction between the insulin receptor and a D product of MHC class I. *Journal of Immunology* 1989; 143: 945-951.
- Wagner, John. Screening Methods for Detection of Unknown Point Mutations.<[http://www.users.med.cornell.edu/~jawagne/screening\\_for\\_mutations.html#Single-Strand.Conformational.Polymorphism](http://www.users.med.cornell.edu/~jawagne/screening_for_mutations.html#Single-Strand.Conformational.Polymorphism)>
- Weber DS, Stewart SB, Schienman J and Lehman N. Major histocompatibility complex variation at three class II loci in the northern elephant seal. *Molecular Ecology* (2004) 13, 711-718

Wedekind C, Seebeck T, Bettens F, Paepke AJ. MHC-dependent mate preferences in humans. *Proceedings of the Royal Society of London - Series B: Biological Sciences* 1995; 260: 245-249.

Williams JR, Lenington S. Factors modulating preferences of female house mice for males differing in t-complex genotype: role of t-complex genotype, genetic background, and estrous condition of females. *Behavior Genetics* 1993; 23: 51-58.

Zangenberg G, Huang MM, Arnheim N, Erlich H: New HLA-DPB1 alleles generated by interallelic gene conversion detected by analysis of sperm.