

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ – ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ
ΠΑΙΔΙΑΤΡΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ

Διευθυντής: Καθηγητής Γεώργιος Α. Συρογιαννόπουλος

ΣΥΧΝΟΤΗΤΑ ΑΝΤΙΓΟΝΩΝ ΤΟΥ ΜΕΙΖΟΝΟΣ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ
ΙΣΤΟΣΥΜΒΑΤΟΤΗΤΟΣ ΣΕ ΕΙΔΙΚΟΥΣ ΠΛΗΘΥΣΜΟΥΣ ΤΟΥ ΔΙΑΜΕΡΙΣΜΑΤΟΣ ΤΗΣ
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΣΟΦΙΑ ΑΘ. ΑΛΕΥΡΑ – ΚΟΚΚΑΛΗ
ΠΑΙΔΙΑΤΡΟΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΛΑΡΙΣΑ 2006

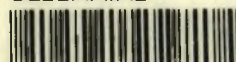
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ

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

Αριθ. Εισ.: 7602/1
Ημερ. Εισ.: 10-10-2009
Δωρεά: Π.Θ.
Ταξιθετικός Κωδικός: Δ
571.964
ΑΛΕ

✓

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



004000083733

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

	<i>Σελίδα</i>
ΠΡΟΛΟΓΟΣ	1
ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ	5
ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	6
ΜΕΡΟΣ Α΄: ΤΟ ΣΥΣΤΗΜΑ HLA	6
1. Ορισμοί	6
2. Ιστορία	7
3. Γενετικός χάρτης του HLA συστήματος	9
4. Δομή των HLA γονιδίων και μορίων	12
4.1. Δομή των HLA τάξης I μορίων	12
4.2. Δομή των HLA τάξης I γονιδίων	15
4.3. Δομή των HLA τάξης II μορίων	16
4.4. Δομή των HLA τάξης II γονιδίων	18
5. HLA απλότυπος – Διαταραχή ισορροπίας σύνδεσης	20
6. Ονοματολογία των HLA μορίων	22
7. Κυτταρική κατανομή και έκφραση των HLA μορίων .	29
8. Βιολογικός ρόλος των HLA μορίων	31
8.1. Σύνδεση των HLA τάξης I και II μορίων με αντιγονικά	33
8.2. Άμεση και έμμεση οδός παρουσίασης των HLA μορίων στη μεταμόσχευση	34
8.3. Τα HLA μόρια ως βάση της αλλοδραστικότητας	35
8.4. Ο ρόλος των HLA μορίων στην επιλογή των T κυτταρικών κλώνων (T Cell Repertoire)	36
8.5. Η σημασία του HLA πολυμορφισμού στη θεωρία της εξέλιξης	37
ΜΕΡΟΣ Β΄: ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΩΝ HLA ΜΟΡΙΩΝ	38
1. Εισαγωγή	38
2. Γενικές γνώσεις	39
2.1. Δομή DNA	39

2.2. Μετουσίωση – Υγριδισμός	41
2.3. Πολυμορφισμοί DNA – ενδονουκλεάσες περιορισμού	42
2.4. DNA ανιχνευτές	44
3. Βασικές τεχνικές μοριακής βιολογίας	46
3.1. Απομόνωση γονιδιωματικού (genomic) DNA ...	47
3.2. Τεχνική του υβριδισμού	47
3.3. Υβριδισμός κατά Southern	48
3.4. Υβριδισμός Northern	51
3.5. Αποτύπωση κηλίδας (Dot blot υβριδισμός)	51
3.6. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης	52
4. Έλεγχος Ιστοσυμβατότητας με μοριακές τεχνικές ...	54
4.1. Τυποποίηση των HLA τάξης II αλληλίων με την RFLP μέθοδο	56
4.2. Τυποποίηση των HLA τάξης II αλληλίων με τη χρήση της PCR	59
4.3. Τυποποίηση των HLA τάξης I αλληλίων με μοριακές τεχνικές	61
ΜΕΡΟΣ Γ΄: ΚΛΙΝΙΚΗ ΣΗΜΑΣΙΑ ΤΗΣ HLA ΤΥΠΟΠΟΙΗΣΗΣ	63
1. Μεταμόσχευση	63
1.1. Μεταμόσχευση νεφρού	63
1.2. Μεταμόσχευση παγκρέατος	67
1.3. Μεταμόσχευση καρδιάς	68
1.4. Μεταμόσχευση ήπατος	68
1.5. Μεταμόσχευση μυελού των οστών	69
2. Μεταγγίσεις αίματος	69
3. Συσχέτιση των HLA αντιγόνων με ασθενείς	70
4. Άλλες εφαρμογές της HLA τυποποίησης	72
4.1. Φυλογενετική ανάλυση πληθυσμών	72
4.2. HLA και έλεγχος πατρότητας	73
ΜΕΡΟΣ Δ΄: ΦΥΛΟΓΕΝΕΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΠΛΗΘΥΣΜΩΝ	75
Μέθοδοι ανάλυσης γενετικών δεικτών σε πληθυσμιακές μελέτες.	75
1. Εισαγωγή	75

2. Η σημασία της κατανομής των γονιδίων του MHC σε πληθυσμιακές μελέτες	77
3. Γεωγραφική κατανομή των HLA αλληλίων	79
4. Δυναμική πληθυσμών	84
4.1. Συχνότητα απλοτύπων και διαταραχή ισορροπίας συνδέσεως των γονιδίων	84
4.2. Η διαταραχή ισορροπίας συνδέσεως των γονιδίων – Δείκτης του χρόνου	85
4.3. Η διαταραχή της ισορροπίας συνδέσεως των αλληλίων καθρέφτης της γονιδιακής κατάστασης.	86
4.4. Διαταραχή της ισορροπίας συνδέσεως των γονιδίων και επιλογή	87
4.5. Το Δ και η μετανάστευση του ανθρώπου	89
5. Προσπάθεια ανάπτυξης της γενετικής ιστορίας της Ευρώπης	90
6. Προέλευση και διατήρηση του Πολυμορφισμού του συστήματος HLA	92
6.1. Προέλευση του πολυμορφισμού	92
6.2. Διατήρηση του πολυμορφισμού	93
7. Ο νόμος των Hardy Weinberg	95
7.1. Πληθυσμιακή γενετική	95
8. Οι κλειστοί πληθυσμοί της Θεσσαλίας	96
8.1. Βλάχοι	98
8.2. Σαρακατσάνοι	101
8.3. Καραγκούνηδες	102

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	104
1. ΒΙΟΛΟΓΙΚΟ ΥΛΙΚΟ	105
2. ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ ΜΕΛΕΤΗΣ ΤΩΝ ΑΝΤΙΓΟΝΩΝ HLA ΑΠΟ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΤΟΥ ΠΕΡΙΦΕΡΕΙΑΚΟΥ ΑΙΜΑΤΟΣ ΤΟΥ ΠΛΗΘΥΣΜΟΥ ΤΗΣ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ	106
2.1. Απομόνωση του γονιδιωματικού DNA από λευκά αιμοσφαίρια περιφερικού αίματος	106
2.2. Γονιδιακή τυποποίηση των HLA τάξης I (-A, -B, -C) και HLA τάξης II (DRB ₁)	108
Αρχή της μεθόδου	108
Επακριβής καθορισμός των HLA (-A, -B, -C) και HLA (-DRB ₁) αλληλομόρφων	109
2.3. Γενετική και στατιστική ανάλυση	109-111
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	111-138
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	139
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	143
ABSTRACT	146
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	148

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Στον άνθρωπο και σε πολλά ανώτερα ζωικά είδη, έχει διαπιστωθεί η ύπαρξη μιας στενά συνδεδεμένης ομάδας γονιδίων, των οποίων τα προϊόντα έκφρασης διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην ανοσολογική απάντηση του οργανισμού. Η ομάδα αυτή των γονιδίων, που παρουσιάζει μεγάλο πολυμορφισμό, καλείται Μείζον Σύμπλεγμα Ιστοσυμβατότητας (Major Histocompatibility Complex, MHC). Το σύστημα αυτό εδράζεται στο χρωμόσωμα 6 στον άνθρωπο, ονομάζεται σύστημα HLA (Human Leucocyte Antigens), αντιπροσωπεύει δε ένα από τα πλέον μελετημένα βιολογικά συστήματα των ανωτέρων στην βιολογική κλίμακα ειδών.

Στον ποντικό ανάλογη χρωμοσωμική περιοχή αποτελεί το σύστημα H-2 ισοδύναμο του HLA του ανθρώπου. Οι εκτεταμένες γνώσεις, από την έρευνα της γενετικής του συστήματος H-2 συνέβαλαν ιδιαίτερος στην προώθηση της μελέτης του συστήματος HLA, που τα τελευταία χρόνια έλαβε διαστάσεις, λόγω του υψηλού ενδιαφέροντος που παρουσιάζει.

Τα γονίδια που κωδικοποιούν για την παραγωγή των HLA-αντιγόνων του ανθρώπου διακρίνονται σε τρεις κατηγορίες : τάξης I, τάξης II, και τάξης III. Από αυτά τα HLA τάξης I, -A, -B, -C, και HLA τάξης II, -DR, -DQ, -DP, ονομάζονται «κλασσικά». Εκτός από αυτά υπάρχουν και άλλα μη «κλασσικά» γονίδια (π.χ. HLA-E, -F, -G, MIC, TAP, TNF α , και TNF β).

Τα αντιγόνα τάξης I (HLA-A, B, C) βρίσκονται σε όλα τα εμπύρνηνα κύτταρα του οργανισμού και κυρίως στα λεμφοκύτταρα του περιφερικού αίματος, αλλά και στα αιμοπετάλια.

Τα αντιγόνα τάξης II (HLA-DR, DQ, DP) προσδιορίζονται κυρίως στα B λεμφοκύτταρα, μακροφάγα, μονοκύτταρα, επιθηλιακά, ενδοθηλιακά κύτταρα, σπερματοζωάρια και ενεργοποιημένα T λεμφοκύτταρα.

Το MHC θεωρείται ως το πλέον πολυμορφικό ανοσογενετικό σύστημα στον άνθρωπο, γεγονός που σημαίνει ότι για κάθε μια γονιδιακή θέση υπάρχουν πολλές γονιδιακές μορφές ή αλληλόμορφα.

Τα τελευταία χρόνια, ραγδαίες εξελίξεις στην τεχνολογία του DNA καθιστούν δυνατή την πλήρη ανάλυση του συστήματος, σε επίπεδο

αλληλομόρφων.

Οι κλινικές εφαρμογές των γνώσεων που προέκυψαν από την εκτεταμένη μελέτη του MHC, έδειξαν ότι το σύστημα:

1. ευθύνεται για την απόρριψη μοσχευμάτων
2. παίζει σημαντικό ρόλο στην ανοσιακή απάντηση του οργανισμού.
3. συμβάλλει στον αποκλεισμό πατρότητας.
4. σχετίζεται προς ορισμένα νοσήματα.
5. χρησιμεύει για ανθρωπολογικές μελέτες.

Το MHC, όπως ήδη έχει αναφερθεί, αποτελεί ένα από τα σπουδαιότερα συστήματα βιολογικών μελετών. Η μελέτη κατανομής των αλληλομόρφων των γονιδίων του MHC στους διάφορους πληθυσμούς είναι ιδιαίτερα χρήσιμη. Η αξία του ως φυλογενετικός δείκτης οφείλεται:

- στον υψηλού βαθμού πολυμορφισμό του
- στις διαφορές αντιγονικών συνδυασμών μεταξύ των διαφόρων πληθυσμιακών ομάδων και
- στην ύπαρξη διαταραχής ισορροπίας σύνδεσης μεταξύ των γονιδίων.

Ο πολυμορφισμός του συστήματος είχε μελετηθεί σε βάθος, με μοριακές πλέον τεχνικές σε πολλές ομάδες πληθυσμών, στους περισσότερους Ευρωπαϊκούς και στον Ελληνικό πληθυσμό. Καλύτεροι ως φυλογενετικοί δείκτες θεωρούνται κλειστές πληθυσμιακές ομάδες με ελάχιστο ποσοστό επιμειξιών με επιβεβαιωμένη την εθνολογική και γενεαλογική «καθαρότητα» της κάθε φυλής – που κατοικούν στην ίδια περιοχή.

Τέτοιος πληθυσμός είναι ο Θεσσαλικός πληθυσμός, και αυτό γιατί η Θεσσαλία είναι μία απομονωμένη γεωγραφικά περιοχή, έως και τον 20^ο αιώνα, εξαιτίας και του φυσικού περιβάλλοντός της, που είναι ως προς τη μεταφορά των πληθυσμών οριακά περιορισμένο.

Γι' αυτό πιστεύεται ότι οι πληθυσμοί, που ζουν στην περιοχή παραμένουν γενετικά «καθαροί».

Σύμφωνα με το πρωτόκολλο, σκοπός της παρούσης διδακτορικής διατριβής αποτελεί η μελέτη των γενετικών τόπων HLA-A, -B, -C και DRB₁

στον επίμικτο και σε τρεις κλειστούς (Βλάχοι, Σαρακατσάνοι, Καραγκούνηδες) Θεσσαλικούς πληθυσμούς, καθώς και η σύγκριση μεταξύ αυτών και του επίμικτου Θεσσαλικού πληθυσμού.

Τα αποτελέσματα της μελέτης θα συμβάλλουν σημαντικά στη διαλεύκανση της φυλογενετικής ταυτότητας και της ιστορικής προέλευσης του πληθυσμού της Θεσσαλίας, και αφετέρου να αποτελέσουν δεδομένα αναφοράς για τη μελλοντική αναζήτηση HLA- συσχετίσεων με νοσήματα, ιδιαίτερα εκείνα με υψηλό επιπολασμό στην περιοχή.

Η εργασία αυτή αποτελείται από:

1) Το Γενικό μέρος που περιλαμβάνει:

α) το σύστημα HLA (ορισμοί, ιστορία, γενετική δομή, ονοματολογία, βιολογικός ρόλος των HLA μορίων).

β) τις τεχνικές μοριακής βιολογίας και την ανάλυση των HLA μορίων (γενικές γνώσεις, βασικές τεχνικές μοριακής βιολογίας).

2) Από το ειδικό μέρος που περιλαμβάνει α) το βιολογικό υλικό και τις μεθόδους που εφαρμόσαμε.

3) α) Τα αποτελέσματα και τη στατιστική τους ανάλυση.

β) τη συζήτηση των ευρημάτων, καθώς και σύγκριση με τα βιβλιογραφικά δεδομένα,

γ) περίληψη και αναφορά των συμπερασμάτων που προέκυψαν και

δ) βιβλιογραφία.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα τον καθηγητή της Παιδιατρικής Κλινικής του Ιατρικού Τμήματος του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας κ. Σταύρο Χαϊδά, που μου ανέθεσε το θέμα της διατριβής μου και για τις πολύτιμες συμβουλές του.

Στον επιβλέποντα της διδακτορικής μου διατριβής Επίκουρο Καθηγητή Παιδιατρικής του Ιατρικού Τμήματος του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας κ. Νικόλαο Σκεντέρη εκφράζω τη βαθύτατη ευγνωμοσύνη μου για τη συνεχή επίβλεψη και καθοδήγησή του σ' όλα τα στάδια της μελέτης.

Τις θερμές ευχαριστίες μου εκφράζω, επίσης, στα άλλα δύο μέλη της Τριμελούς Επιτροπής, τον καθηγητή Μαιευτικής και Γυναικολογίας κ. Ιωάννη Μεσσήνη και την Επίκουρη Καθηγήτρια Βιοχημείας κ. Ελένη

Γεωργάτσου.

Επίσης θέλω να ευχαριστήσω τον Αναπληρωτή Καθηγητή Ανοσολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας και Διευθυντή του Εργαστηρίου Ανοσολογίας και Ιστοσυμβατότητας κ. Αναστάσιο Γερμενή για τις πολύτιμες συμβουλές και παρεμβάσεις του κατά τη διάρκεια της εκπόνησης της παρούσης διατριβής.

Θεωρώ, επίσης, υποχρέωσή μου να εκφράσω τις θερμές ευχαριστίες μου στην Διευθύντρια του Εργαστηρίου Ανοσολογίας του Εθνικού Κέντρου Ιστοσυμβατότητας του Γενικού Κρατικού Νοσοκομείου Αθηνών κ. Αικατερίνη Σταυροπούλου καθώς και στην κ. Μ. Σπυροπούλου ιατρό του ίδιου εργαστηρίου για τη βοήθειά τους στην επεξεργασία των αποτελεσμάτων. Ευχαριστίες επίσης οφείλω στον Πρόεδρο του Ιατρικού Τμήματος του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας καθηγητή κ. Νικόλαο Σταθάκη για την πολύτιμη συμπαράστασή του, όπως και στον καθηγητή Παιδιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας κ. Γεώργιο Συρογιαννόπουλο.

Τέλος, ευχαριστώ την Διευθύντρια της Παιδιατρικής Κλινικής του Γενικού Νοσοκομείου Λάρισας κ. Ιωάννα Αγορογιάννη για τις ενθαρρυντικές και εποικοδομητικές υποδείξεις της.

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

- ARC:** Αντιγονοπαρουσιαστικό κύτταρο (antigen presenting cell)
- BF:** Παράγοντας Β του συμπληρώματος (B factor)
- DNA:** Δεσοξυριβονουκλεϊνικό οξύ (deoxyribonucleic acid)
- dNTPs:** Δεοξυνουκλεοτίδια (deoxynucleotides triphosphate)
- HLA:** Λευκοκυτταρικά αντιγόνα (human leucocyte antigens)
- HSP:** Πρωτεΐνες του θερμικού shock (heat-shock proteins)
- IL:** Ιντερλευκίνη (interleukin)
- INF-γ:** Ιντερφερόνη-γ (interferon γ)
- MB:** Μοριακό βάρος
- MHC:** Μείζον σύμπλεγμα ιστοσυμβατότητας (major histocompatibility complex)
- PCR:** Αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (polymerase chain reaction)
- SSO:** Ειδικά ολιγονουκλεοτίδια της αλληλουχίας (sequence specific oligonucleotides)
- SSP:** Ειδικές ολιγονουκλεοτιδικές αφετηρίες (sequence specific primers)
- TAP:** Πρωτεΐνη μεταφοράς αντιγόνου (transporter in antigen processing)
- TcR:** Υποδοχέας του Τ-κυττάρου (T cell receptor)
- TNF-α:** Παράγοντας νέκρωσης των όγκων α (tumor necrosis factor)
- UV:** Υπεριώδες φως (ultra-violet)

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΤΟ ΣΥΣΤΗΜΑ HLA

1. Ορισμοί

Ο όρος Μείζον Σύμπλεγμα Ιστοσυμβατότητας (Major Histocompatibility Complex, MHC) προέρχεται από πειραματικές μελέτες σε πειραματόζωα, που είχαν σκοπό να ερευνήσουν την τύχη μεταμοσχευμένων ιστών. Τα αποτελέσματα αυτών των πειραματικών μελετών οδήγησαν στην αναγνώριση ενός σημαντικού συνόλου γονιδίων υπεύθυνου για τον έλεγχο αποδοχής ή απόρριψης μοσχευμάτων μεταξύ όμοιων ή ανόμοιων γενετικά ατόμων, το οποίο ονομάστηκε Μείζον Σύμπλεγμα Ιστοσυμβατότητας (MHC). Ο όρος "HLA" αναφέρεται στην αρχική ονοματολογία "Human Leucocyte antigen series A" και περιγράφει την πρώτη γονιδιακή θέση που ανακαλύφθηκε στο ανθρώπινο MHC. Από τη διαμάχη για την προέλευση του όρου προέκυψε τελικά ο γενικότερος όρος "Human Leucocyte Antigens" (Dausset 1974),

Το HLA σύστημα κωδικοποιεί τρία είδη γλυκοπρωτεϊνών, **τα τάξης I, τάξης II και τάξης III μόρια**. Τα τάξης I και II μόρια αναφέρονται και ως **HLA αντιγόνα ή αλλοαντιγόνα** γιατί μπορεί να αναγνωριστούν από το ανοσιακό σύστημα κατά την απόρριψη μοσχευμάτων μεταξύ HLA ανόμοιων ατόμων. Ένα από τα σημαντικά χαρακτηριστικά των HLA μορίων είναι ο **πολυμορφισμός** τους. Αυτό σημαίνει ότι κάθε τάξη μορίων, ακόμη και κάθε γονιδιακή θέση περιλαμβάνει ένα μεγάλο αριθμό παραλλαγών αντιγονικών μορίων και γονιδίων αντίστοιχα. Η **γονιδιακή θέση ή τόπος (locus)** αναφέρεται σε ένα μοναδικό γονίδιο που ξεχωρίζει από τα υπόλοιπα γειτονικά γονίδια και κωδικοποιεί ένα μοναδικό προϊόν, συμβολίζεται δε με ένα κεφαλαίο γράμμα. Οι παραλλαγές των μορίων που ανευρίσκονται μέσα σ' ένα πληθυσμό αναφέρονται **ως γονιδιακές μορφές ή αλλήλια (alleles)**. Με άλλα λόγια διαφορετικά άτομα - μέλη ενός πληθυσμού μπορεί να έχουν ποικίλα αλλήλια για μία γονιδιακή θέση (Pløegh και συν. 1981).

2. Ιστορία

Οι αρχικές μελέτες πάνω στο ανθρώπινο Μείζον Σύμπλεγμα Ιστοσυμβατότητας, όπως άλλωστε συμβαίνει στον τομέα της γενετικής, αναπτύχθηκαν με πρωτοπόρες εργασίες πάνω σε ζώα. Κατά τις δεκαετίες του '30 και '40 οι Peter Gorer και George Snell δούλεψαν πάνω στη γενετική και ανοσολογία των όγκων σε μεταμοσχευμένα ποντίκια. Αμέσως μετά ο Peter Medawar ασχολήθηκε με τους κυτταρικούς μηχανισμούς τους υπεύθυνους για την απόρριψη μεταμοσχευμένου δέρματος και οργάνων στα ποντίκια. Η ιστορία του ανθρώπινου MHC έρχεται αρκετά μεταγενέστερα, όταν το 1958 οι Dausset και Payne έδειξαν, ανεξάρτητα ο ένας από τον άλλον, ότι πολυμεταγγισμένοι ασθενείς και έγκυες γυναίκες συχνά είχαν στον ορό τους κυκλοφορούντα αντισώματα κατά αλλοαντιγόνων που τώρα πλέον είναι γνωστό ότι είναι προϊόντα των γονιδίων του Μείζονος Συμπλέγματος Ιστοσυμβατότητας.

Η εντυπωσιακή γνώση του HLA συστήματος και των αντιγονικών προϊόντων του συγκεντρώθηκε μέσα σε 30 χρόνια, αντανακλώντας την αξιοσημείωτη διεθνή συνεργασία μεταξύ των πολυάριθμων ερευνητών στον τομέα αυτόν. Μια σειρά από Διεθνή Συνέδρια Ιστοσυμβατότητας (International Histocompatibility Workshop, IHW) έδωσαν την ευκαιρία σε επιστήμονες απ' όλον τον κόσμο να συζητήσουν τα αποτελέσματα των μελετών τους αφού προηγουμένως αντάλλαξαν γνώσεις και την πείρα τους πάνω σε αντιδραστήρια και τεχνικές. Μετά από κάθε τέτοιο συνέδριο μια επιτροπή ονοματολογίας από τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (World Health Organization, WHO) εκσυγχρονίζει το παγκόσμιο αποδεκτό "λεξικό" των HLA και ενημερώνει όλους τους επιστήμονες με δημοσιεύσεις σε σχετικά επιστημονικά περιοδικά (Tissue Antigens, Immunogenetics κ.ά.).

Η ανάγκη κατανόησης του HLA συστήματος προωθήθηκε από τη μεγάλη έκταση των μεταμοσχεύσεων οργάνων και ιστών. Ο θεμελιώδης ρόλος της άμεσης δοκιμασίας διασταύρωσης (crossmatch) στην πρόληψη της υπεροξείας απόρριψης του νεφρικού μοσχεύματος εδραιώθηκε από τον Kissmeyer-Nielsen ο οποίος έδειξε ότι μεταμόσχευση νεφρού μετά από

θετική δοκιμασία διασταύρωσης μεταξύ του ορού του λήπτη και των λεμφοκυττάρων του δότη οδηγεί σε άμεση μη αναστρέψιμη απόρριψη (Kissmeyer-Nielsen 1966). Πολλοί επιστήμονες συνεισέφεραν στη σημερινή γνώση της ιστοσυμβατότητας μεταξύ των οποίων οι Benacerraf, Dausset και Snell που τιμήθηκαν και με το βραβείο Nobel το 1980 για την ανακάλυψη του ανθρώπινου MHC (HLA) και του MHC του ποντικού. (Histocompatibility system 2, H-2) και για την έρευνα τους πάνω στο ρόλο του MHC στην ανοσιακή απάντηση.

Για την ανίχνευση των HLA αντιγόνων χρησιμοποιήθηκαν αρχικά τεχνικές συγκόλλησης λευκών αιμοσφαιρίων, στη συνέχεια η τεχνική της λεμφοκυτταροτοξικότητας, ο θάνατος δηλ, των κυττάρων στόχων από ειδικά αντι-HLA αντισώματα, που επικράτησε, όταν το 1964 οι Terasaki και McClelland ανέπτυξαν την τεχνική της μικρολεμφοκυτταροτοξικότητας (microlymphocytotoxicity test) (Terasaki και McClelland 1964). Η τεχνική αυτή είναι σήμερα μέθοδος ρουτίνας για την ορολογική τυποποίηση και την άμεση διασταύρωση δότη-λήπτη. Τροποποιήσεις της τεχνικής αυτής έγιναν αρκετές, κυρίως αλλάζοντας τις χρωστικές που χρησιμοποιούνται για την εκτίμηση των νεκρών κυττάρων ή αλλάζοντας τους χρόνους και τις θερμοκρασίες επώασης. Παρ' όλα αυτά, η αρχή της μεθόδου παραμένει η ίδια. Η ανάπτυξη της τεχνολογίας των μονοκλωνικών αντισωμάτων (monoclonal antibodies, MoAb) υποσχέθηκε καλύτερη ποιότητα μονοειδικών αντιορών, όχι όμως για όλα τα HLA αντιγόνα (Dyer και Middleton 1993).

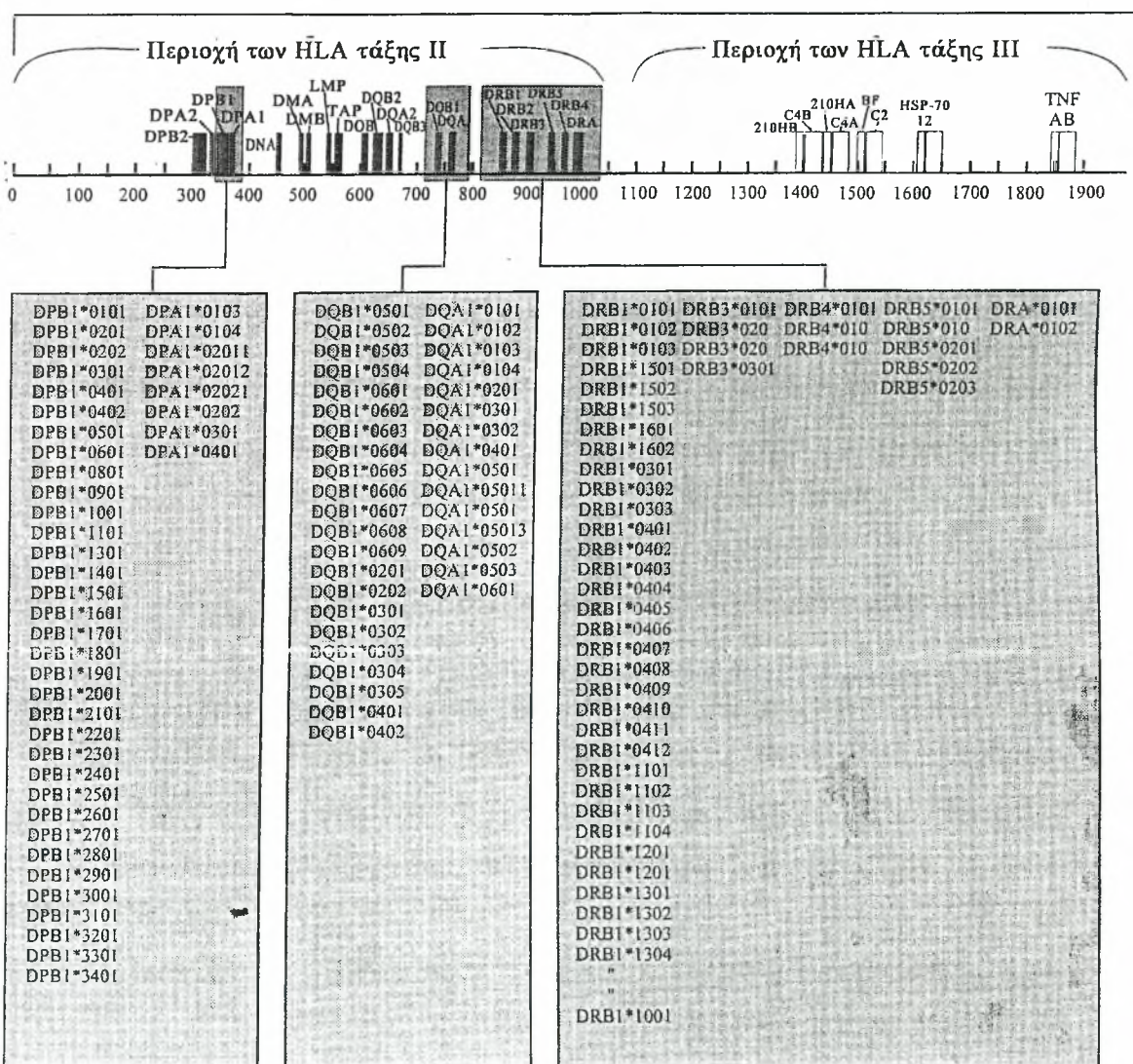
Η εξέλιξη των τεχνικών για την αναγνώριση των ποικιλιών των γονιδιακών αλληλουχιών οδήγησε σε μια θεμελιώδη αλλαγή στη μεθοδολογία της τυποποίησης των HLA αντιγόνων. Στα μέσα της δεκαετίας του '80 εφαρμόστηκε η μέθοδος της ανάλυσης των πολυμορφισμών μήκους θραύσματος από περιοριστικό ένζυμο (Restriction Fragment Length Polymorphisms, RFLPs), με την οποία αναγνωρίζονται όλες οι γνωστές ορολογικές ειδικότητες των HLA-DR και -DQ αντιγόνων. Με την εμφάνιση, το 1987, της μεθόδου μεγέθυνσης του DNA με την τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR) και με τη

γνώση των αλληλουχιών των HLA αντιγόνων για τη σύνθεση ειδικών ολιγονουκλεοτιδίων-αφετηριών (Sequence Specific Primers, SSP) έγινε πλέον εφικτός ένας ακριβέστερος καθορισμός των γονιδιακών πολυμορφισμών των HLA αντιγόνων, χρησιμοποιώντας μικροποσότητες DNA από οποιοδήποτε σχεδόν είδος ιστού.

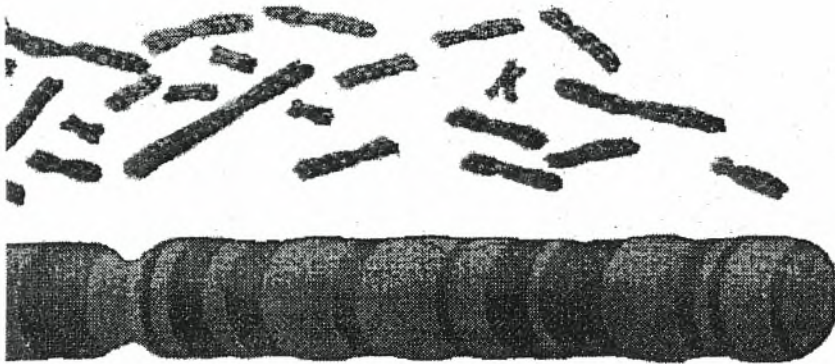
3. Γενετικός χάρτης του HLA συστήματος

Η εφαρμογή των τεχνικών μοριακής βιολογίας επέτρεψε στους επιστήμονες να ανακαλύψουν τη γονιδιακή οργάνωση του HLA συστήματος. Ο καθιερωμένος γενετικός χάρτης για το HLA σύστημα περιλαμβάνει ένα χρωμοσωμικό τμήμα, μήκους περίπου 3500 χιλιοβάσεων (kilobases, kb) στην p21.3 ταινία πάνω στο βραχύ σκέλος του χρωμοσώματος 6 (Σχήμα 1). Ουδόντα δύο γονίδια και ψευδογονίδια αναγνωρίστηκαν πάνω στο τμήμα αυτό, ομαδοποιημένα σε τρεις τάξεις ανάλογα με την τοπογραφική θέση τους ως προς το κεντρομέρος του χρωμοσώματος, αλλά και ως προς την ομοιότητα στη δομή και τη λειτουργία των προϊόντων που κωδικοποιούν. Σύμφωνα λοιπόν με το χάρτη αυτόν υπάρχουν 17 γονίδια τάξης I στο τελομερικό άκρο του συστήματος εκ των οποίων μόνο τρία εκφράζονται, τα A, B και C γονίδια, 29 τάξης II στο κεντρομερικό άκρο μεταξύ των οποίων κυρίως τα HLA-DR, -DQ και -DP γονίδια (HLA-D γονίδια) και 36 τάξης III που εντοπίζονται μεταξύ των γονιδίων HLA-DR και HLA-B. Η περιοχή αυτή των τάξης III γονιδίων περιλαμβάνει γονίδια για τους παράγοντες του συμπληρώματος (C4A, C4B, Bf και C2), τα γονίδια 21B και 21A του στεροειδούς ενζύμου 21-υδροξυλάση, τα γονίδια A και B του παράγοντα νέκρωσης των όγκων (Tumor Necrosis Factor, TNF) και τα γονίδια HSP70-1 και HSP70-2 της πρωτεΐνης οξείας φάσεως HSP70 (Hansen και συν. 1993).

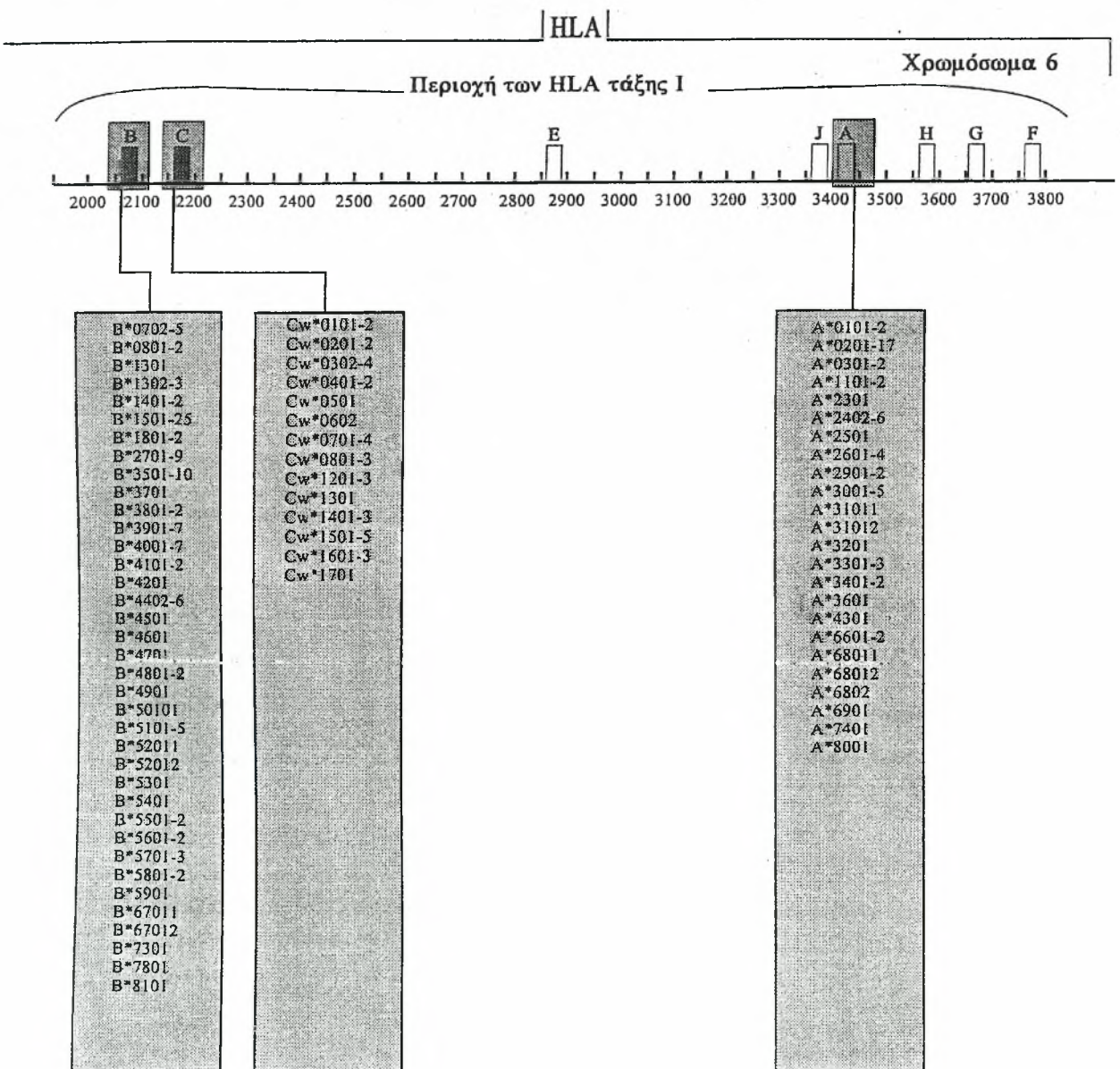
Αναπόφευκτα, πολλά από αυτά τα γονίδια δεν έχουν ανοσολογική λειτουργία και βρέθηκαν κατά τύχη στο χρωμοσωμικό αυτό τμήμα, ή ίσως κωδικοποιούν πρωτεΐνες των οποίων οι λειτουργίες δεν έχουν πλήρως κατανοηθεί αλλά πιθανόν να αποδειχθούν σημαντικά αληθινά γονίδια.



Σχήμα 1: Σχηματική αναπαράσταση της HLA περιοχής στο χρωμόσωμα 6 με τους γονιδιακούς τόπους και την ποικιλία των αλληλίων που κωδικοποιούνται από αυτούς.



Σύνολο
χρωμοσωμάτων

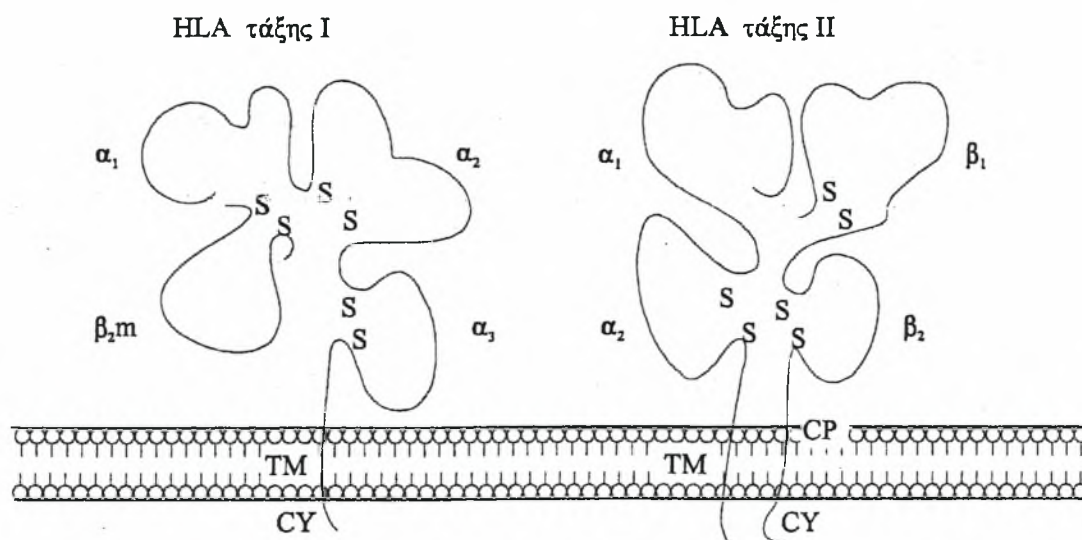


4. Δομή των HLA γονιδίων και μορίων

4.1 Δομή των HLA τάξης I μορίων

Οι βασικές δομικές μονάδες των HLA τάξης I μορίων αποτελούνται από μια βαριά πολυπεπτιδική αλυσίδα (α αλυσίδα) των 340 αμινοξέων (45kd) και από μια ελαφριά αλυσίδα (12kd), την β2-μικροσφαιρίνη (p2-microglobulin, β2-m) που κωδικοποιείται από το χρωμόσωμα 15 (Σχήμα 2). Η βαριά αλυσίδα είναι το μόνο μέλος του ετεροδιμερούς μορίου που διασχίζει τη διπλοστιβάδα της κυτταρικής μεμβράνης με το αμινοτελικό τμήμα της προς το εξωτερικό του κυττάρου. Η β2-μικροσφαιρίνη συνδέεται με το εξωκυττάριο κομμάτι της βαριάς αλυσίδας και χωρίς τη σύνδεση αυτή το λειτουργικό τάξης I μόριο δεν εκφράζεται στην κυτταρική επιφάνεια (Ploegh και συν. 1981).

Η βαριά αλυσίδα έχει τρεις καλά διαφοροποιημένες δομικές περιοχές: ένα εξωκυττάριο τμήμα από 274 αμινοξέα, ένα υδρόφοβο διαμεμβρανικό τμήμα των 25 περίπου αμινοξέων, υπεύθυνο για το "αγκυροβόλημα" του μορίου στη μεμβράνη και ένα υδρόφιλο ενδοκυττάριο άκρο των 30 αμινοξέων. Το εξωκυττάριο τμήμα διαιρείται με τη σειρά του σε τρεις περιοχές των 90, 92 και 92 αμινοξέων αντίστοιχα που χαρακτηρίζονται ως α1, α2 και α3 περιοχές (Σχήμα 2). Κάθε μια από τις α2, α3 και β2m περιέχει έναν εσωτερικό δισουλφιδικό δεσμό μεταξύ των θέσεων των αμινοξέων 101 -164, 203-259 και 25-81, αντίστοιχα. Η α1 περιοχή δεν έχει δισουλφιδικούς δεσμούς, αλλά ένα μοναδικό κομμάτι υδατάνθρακα στη θέση 86. Η μεγαλύτερη ποικιλία στον δομικό πολυμορφισμό των HLA τάξης I μορίων εντοπίζεται στις α1 και α2 περιοχές, σε σημεία που λέγονται υπερμεταβλητές περιοχές (hypervariable regions, HVR) (Lopez de Castro 1993).

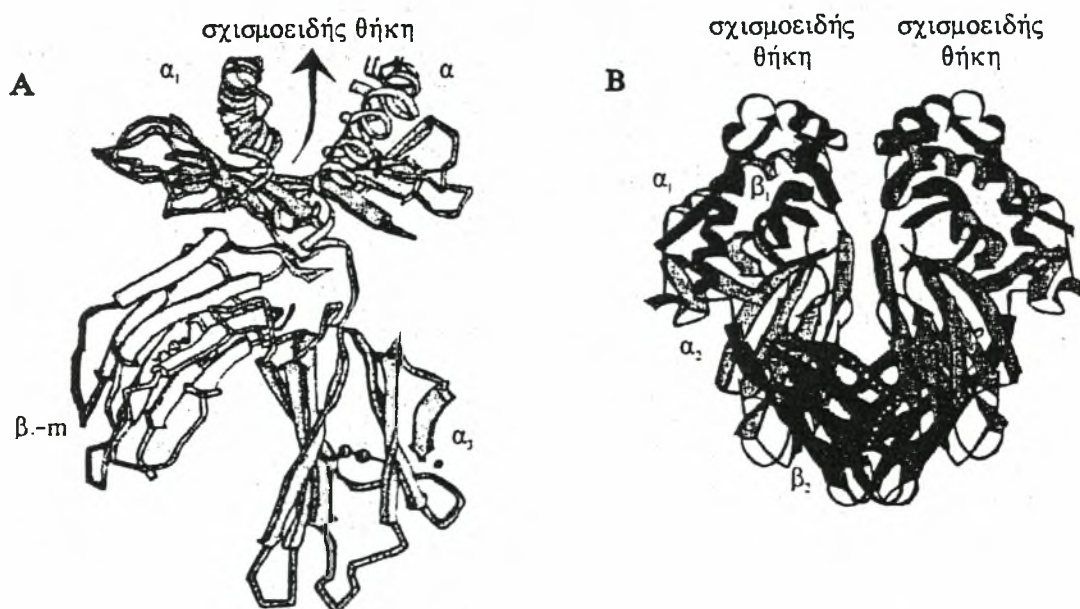


Σχήμα 2: Σχηματική αναπαράσταση της δομής των HLA τάξης I και II μορίων. TM: Διαμεμβρανική περιοχή, CY: Κυτοπλασματικό τμήμα των μορίων, S-S: Δισουλφιδικοί δεσμοί, α_1 , α_2 , α_3 , β_1 , β_2 : περιοχές των HLA τάξης I και II μορίων, β_{2m} : β_2 -μικροσφαιρίνη.

Οι N-τελικές α_1 και α_2 περιοχές παρουσιάζουν κάποια ομολογία στις αλληλουχίες τους, όχι όμως και με την α_3 . Ωστόσο, η α_3 εμφανίζει μεγάλη ομολογία με τη β_2 μικροσφαιρίνη και μαζί και οι δύο μεγάλη ομοιότητα στις αλληλουχίες των σταθερών περιοχών των ανοσοσφαιρινών. Ως εκ τούτου τα τάξης I μόρια μοιράζονται την κοινή εξελικτικά καταγωγή τους με τις ανοσοσφαιρίνες και θεωρούνται μέλη της μεγάλης οικογένειας των ανοσοσφαιρινών (immunoglobulin superfamily), η οποία περιλαμβάνει ακόμη τον T- κυτταρικό υποδοχέα, (TcR), και τα CD4 και CD8 μόρια προσκόλλησης (Bjorkman και Parham 1990).

Πρόσφατα με την κρυσταλλογράφηση των HLA τάξης I μορίων μελετήθηκε η τρισδιάστατη δομή τους (Σχήμα 3A). Οι α_1 και α_2 περιοχές της βαριάς αλυσίδας συνδυάζονται για να σχηματίσουν ένα στερεό οικοδόμημα όπου συνδέεται το αντιγονικό πεπτίδιο που προέρχεται από την επεξεργασία ενός μεγαλύτερου αντιγόνου. Σ' αυτήν τη διαμόρφωση δύο α -έλικες σχηματίζουν τα πλευρικά τοιχώματα μιας μακριάς και βαθιάς σχισμής ο πυθμένας της οποίας αποτελείται από μια β -πτυχωτή επιφάνεια. Το αποτέλεσμα είναι η δημιουργία μιας σχισμοειδούς θήκης (groove ή cleft), όπου συνδέεται το αντιγονικό πεπτίδιο (peptide-binding site) για να

παρουσιαστεί στο CD8+ T λεμφοκύτταρο (Bjorkman και συν. 1987) (Σχήμα 3A). Τα εσωτερικά τοιχώματα της κοιλότητας της σχισμοειδούς θήκης δεν είναι ομαλά, αλλά μία σειρά από κοιλώματα (rockets ή depressions) έχουν περιγραφεί μέσα σ' αυτήν (Saper και συν. 1991). Το αντιγονικό πεπτιδίδιο που εισέρχεται μέσα στη θήκη, προσαρμόζει μία ή περισσότερες από τις πλευρικές του αλυσίδες μέσα σ' αυτά τα κοιλώματα, διαμορφώνοντας έτσι ένα μοριακό σύμπλεγμα προς ανίχνευση από τον T κυτταρικό υποδοχέα. Έξι κοιλώματα που σημειώνονται με τα γράμματα A, B, C, D, E και F έχουν αναγνωριστεί και εντοπίζονται στη συμβολή της β-πτυχωτής επιφάνειας με την α-έλικα (κοιλώματα B, C, D, E) ή μεταξύ δύο α-ελίκων (κοιλώματα A και F).



Σχήμα 3: Το μοντέλο των HLA τάξης I και II από δεδομένα κρυσταλλογραφίας με ακτίνες X. A.: Το μοντέλο του HLA-A2 μορίου B: Μοντέλο δύο HLA-DR1 μορίων. Οι α αλυσίδες παρουσιάζονται με ανοιχτό χρώμα και οι β με πιο έντονο. Τα βέλη ορίζουν τις σχισμοειδείς θήκες των δύο μορίων.

Οι περισσότερες από τις πολυμορφικές θέσεις των τάξης I μορίων εντοπίζονται στα τοιχώματα και τον πυθμένα της σχισμοειδούς αυτής θήκης, με αποτέλεσμα να αλλάζει το περίγραμμα της από μόριο σε μόριο. Έτσι κάθε HLA τάξης I μόριο έχει τη δικιά του ειδικότητα για σύνδεση με αντιγονικά πεπτιδίδια, ειδικότητα που καθορίζεται από την αλληλουχία των

αμινοξέων στα τοιχώματα και τον πυθμένα της θήκης. Πρέπει να τονιστεί ότι αν και η σύνδεση των πεπτιδίων από τα τάξης I μόρια είναι κατά κάποιον τρόπο επιλεκτική, δεν είναι τόσο ειδική όσο αυτή των αντιγόνων από τα αντισώματα, με αποτέλεσμα κάθε HLA τάξης I μόριο να μπορεί να συνδεθεί μ' ένα αρκετά μεγάλο φάσμα πεπτιδίων. Αυτό έχει ως συνέπεια ακόμη κι ο περιορισμένος αριθμός των διάφορων HLA τάξης I μορίων (όχι πάνω από 6) που εκφράζονται από κάθε άτομο να το καθιστά ικανό να απαντήσει στα περισσότερα αντιγόνα που του παρουσιάζονται από τα μόρια αυτά (Hansen 1993).

4.2 Δομή των HLA τάξης I γονιδίων

Η HLA τάξης I χρωμοσωμική περιοχή περιλαμβάνει ένα τμήμα DNA περίπου 1600kb τελομερικά του βραχέος σκέλους του χρωμοσώματος 6 (Σχήμα 1). Υπάρχουν τρία γενικώς αναγνωρισμένα HLA τάξης I γονίδια στην παραπάνω περιοχή, τα HLA-A, -B και -C που κωδικοποιούν τα ορολογικώς ανιχνευόμενα HLA τάξης I αντιγόνα, γνωστά και ως αντιγόνα μεταμόσχευσης και επιπλέον τρία ακόμη τάξης I γονίδια, τα HLA-E, -F και -G που επίσης κωδικοποιούν λειτουργικά μόρια, γνωστά ως μη κλασσικά τάξης I μόρια (nonclassical class I ή class I-like molecules). Στην ίδια περιοχή αναγνωρίστηκαν επίσης 11 ψευδογονίδια από τα οποία τα καλύτερα χαρακτηρισμένα είναι τα HLA-H και HLA-J, δομικά όμοια, με τα HLA-A, αλλά ανενεργά (Trowsdale και Hanson 1993).

Η δομή των τάξης I γονιδίων ανακλά την τμηματική οργάνωση της βαριάς αλυσίδας σε δομικά διαφοροποιημένες περιοχές. Έτσι το γονίδιο τάξης I περιλαμβάνει 8 εξόνια (εξόνιο - τμήμα γονιδίου που κωδικοποιεί πρωτεΐνη) μήκους περίπου 3.5 kb που διακόπτονται από 7 ιντρόνια (ιντρόνιο - παρεμβαλλόμενη αλληλουχία βάσεων που δεν κωδικοποιεί πρωτεΐνη) ποικίλου μήκους. Το εξόνιο 1 κωδικοποιεί ένα 5'-αμετάφραστο κομμάτι 18 νουκλεοτιδίων, ακολουθούμενο από 24 κωδικόνια που αντιστοιχούν στην N-τελική οδηγό αλληλουχία. Τα εξόνια 2 (270 νουκλεοτίδια), 3 και 4 (276 νουκλεοτίδια το καθένα) αντιστοιχούν ακριβώς

στις α1, α2 και α3 περιοχές της βαριάς πολυπεπτιδικής αλυσίδας του HLA τάξης I μορίου. Το εξόνιο 5 (117 νουκλεοτίδια) κωδικοποιεί το διαμεμβρανικό κομμάτι και τις γειτονικές του περιοχές. Τα εξόνια 6 (33 νουκλεοτίδια) και 7 (48 νουκλεοτίδια) κωδικοποιούν το ενδοκυτταροπλασματικό τμήμα. Τέλος το εξόνιο 8 (περίπου 400 νουκλεοτίδια) κωδικοποιεί τις COOH- τελικές θέσεις του ενδοκυτταροπλασματικού άκρου της πρωτεΐνης και την 3'-αμετάφραστη περιοχή (Hansen 1993).

4.3 Δομή των HLA τάξης II μορίων

Η δομή των HLA τάξης II μορίων διαφέρει από αυτήν των τάξης I, καθώς τα τάξης II είναι μη ομοιοπολικά συνδεδεμένα ετεροδιμερή που αποτελούνται από δύο α και β πολυπεπτιδικές αλυσίδες των 230 περίπου αμινοξέων (Σχήμα 2). Στην περίπτωση των HLA τάξης II μορίων και οι δύο αλυσίδες διασχίζουν την κυτταρική μεμβράνη και τόσο η α όσο και η β αλυσίδα κωδικοποιούνται από γονίδια που βρίσκονται στην HLA περιοχή. Ωστόσο, η οργάνωση των περιοχών των μορίων τάξης I και II είναι παρόμοια καθώς και αυτή των αντίστοιχων γονιδίων. Κάθε αλυσίδα των τάξης II μορίων έχει δύο εξωτερικές περιοχές των 90-100 αμινοξέων: α1 και α2, β1 και β2 για την α και β αλυσίδα αντίστοιχα. Η α1 περιοχή δεν περιέχει δισουλφιδικό δεσμό, ενώ η β1 που είναι και κατά μερικά αμινοξέα μακρύτερη περιέχει ένα δισουλφιδικό δεσμό μεταξύ των θέσεων 15 και 79 των αμινοξέων. Οι περιοχές (α2 και β2) που βρίσκονται πιο κοντά στην κυτταρική μεμβράνη περιέχουν επίσης δισουλφιδικούς δεσμούς και παρουσιάζουν έντονη ομολογία των αλληλουχιών τους με τις σταθερές περιοχές των ανοσοσφαιρινών. Για τον ίδιο λόγο λοιπόν τα HLA τάξης II μόρια συμπεριλαμβάνονται επίσης στην μεγάλη οικογένεια των ανοσοσφαιρινών. Το εξωκυττάριο κομμάτι των α και β αλυσίδων ακολουθεί ένα υδρόφιλο συνδετικό πεπτίδιο 10-12 αμινοξέων, ένα διαμεμβρανικό κομμάτι των 23 και 19 αμινοξέων για την α και β αλυσίδα αντίστοιχα και ένα υδρόφιλο ενδοκυττάριο τμήμα 8-15 αμινοξέων (Kappes και Strominger

1988).

Στα HLA τάξης II μόρια ο πολυμορφισμός συγκεντρώνεται στις περιοχές μακριά από την κυτταρική μεμβράνη, στην α1 για τα DQ και DP εκτός των DR και στην β1 για τα DR, DQ και DP. Από τη σύγκριση των DR αλληλίων φαίνεται ότι οι πολυμορφικές θέσεις είναι διασκορπισμένες κατά μήκος της β1 περιοχής, ωστόσο οι πολυμορφισμοί εντοπίζονται κυρίως στις θέσεις 9-13, 27-33 και 67-74 των αμινοξέων. Οι τρεις παραπάνω περιοχές αποτελούν και τους στόχους των διαφόρων μεθόδων τυποποίησης που εφαρμόζονται για την ανίχνευση του πολυμορφισμού των HLA τάξης II αλληλίων με τις νεώτερες μοριακές τεχνικές. Τα HLA-DQ και -DP μόρια εμφανίζουν πολυμορφισμό και στις δύο α και β αλυσίδες τους. Ο καθορισμός του HLA-DQ πολυμορφισμού με την ορολογική μέθοδο περιορίζεται μόνον στην ανίχνευση των HLA-DQβ αλυσίδων, ενώ οι μοριακές τεχνικές αναγνωρίζουν με επιτυχία τον πολυμορφισμό τόσο των HLA-DQβ και -DPβ όσο και των HLA-DQα και -DPα αλυσίδων (Austyn και Wood 1994).

Με βάση τη σύγκριση σταθερών και μεταβλητών περιοχών των HLA τάξης I και II μορίων αλλά και τη γνωστή πλέον τρισδιάστατη δομή των HLA τάξης I μετά την κρυσταλλογράφηση των HLA-A2 και Aw68, προτάθηκε μια ανάλογη διαμόρφωση και για τα HLA τάξης II μόρια, όπου οι α1 και β1 περιοχές των τάξης II, όμοια με τις α1 και α2 των τάξης I, σχηματίζουν μια σχισμή όπου συνδέεται το αντιγονικό πεπτίδιο (Brown και συν. 1988). Πρόσφατα η υποθετική αυτή διαμόρφωση αποδείχτηκε ορθή μετά την κρυσταλλογράφηση του HLA-DR1 αντιγόνου (Brown και συν. 1993) (Σχήμα 3B). Επίσης αποδείχτηκε ότι οι πολυμορφικές θέσεις της β αλυσίδας των HLA-DR που αναφέρθηκαν παραπάνω, στην τριτοταγή δομή του μορίου εντοπίζονται στα τοιχώματα και τον πυθμένα της σχισμής. Ο πολυμορφισμός παίζει σημαντικό ρόλο στη διαμόρφωση της θέσης σύνδεσης στο αντιγονικό πεπτίδιο, άρα καθορίζει την ειδικότητα της σύνδεσης. Κάποιες πολυμορφικές θέσεις φαίνεται ότι δεν είναι προσιτές στον T- κυτταρικό υποδοχέα ή τα αντισώματα, ενώ κάποιες άλλες όπως αυτές στα τοιχώματα και τα προεξέχοντα τμήματα τους μπορεί να

συνδεθούν με τα αντισώματα. Οι τελευταίες αυτές θέσεις, μπορεί να πει κανείς, ότι είναι υπεύθυνες για τον πολυμορφισμό που ανιχνεύεται με την ορολογική μέθοδο (Lopez de Castro 1993).

4.4 Δομή των HLA τάξης II γονιδίων

Η κοντινότερη προς το κεντρομέρος του βραχέος σκέλους του χρωμοσώματος 6 HLA τάξης II περιοχή (HLA-D περιοχή) εκτείνεται σε 900kb και περιέχει τρεις υποπεριοχές: HLA-DP, HLA-DQ και HLA-DR (Σχήμα 1). Ξεκινώντας από το κεντρομέρος, η HLA-DP υποπεριοχή περιλαμβάνει δύο A (DPA1, DPA2) και δύο B (DPB1, DPB2) γονίδια. Τα DPA1 και DPB1 κωδικοποιούν τις α και β αλυσίδες αντίστοιχα των HLA-DP μορίων που φέρουν τις DP1 ως DP6 αντιγονικές ειδικότητες, ενώ τα DPA2 και DPB2 είναι ψευδογονίδια. Τελομερικά των HLA-DP εντοπίζονται τα DNA, DOB, DMA και DMB γονίδια. Για τα δύο πρώτα δεν είναι γνωστό αν εκφράζουν πρωτεϊνικά προϊόντα. Τα DMA και DMB αναγνωρίστηκαν πρόσφατα και κωδικοποιούν πρωτεΐνες παρόμοιες με τις α και β αλυσίδες. Η HLA-DQ περιοχή περιλαμβάνει δύο A (DQA1, DQA2) και τρία B γονίδια (DQB1, DQB2, DQB3). Τα DQA1 και DQB1 γονίδια κωδικοποιούν τα HLA-DQ ετεροδιμερή που φέρουν τις DQ1 ως DQ9 ορολογικές ειδικότητες, ενώ τα υπόλοιπα γονίδια της υποπεριοχής είναι ψευδογονίδια. Η HLA-DR υποπεριοχή περιέχει ένα μόνο A (HLA-DRA) γονίδιο για την κωδικοποίηση της α αλυσίδας των HLA-DR μορίων, πέντε B (HLA-DRB1-5) για την β αλυσίδα και τέσσερα ψευδογονίδια (HLA-DRB6-9). Ανάλογα με τον απλότυπο, ένα DRA και ένα ή το πολύ δύο DRB γονίδια εκφράζονται. Συγκεκριμένα όλα τα αλληλία, με εξαίρεση το HLA-DR1, -DR8 και -DR10 εκφράζουν δύο DRB γονίδια. Το DRB1 γονίδιο κωδικοποιεί την πολυμορφική β αλυσίδα που υπάρχει σε όλες τις ορολογικές ειδικότητες (HLA-DR1 ως DR18). Ένα δεύτερο DRB γονίδιο (DRB3, DRB4 ή DRB5) κωδικοποιεί μία λιγότερο πολυμορφική β αλυσίδα που απαντά στις DR52, DR53 και DR51 ειδικότητες αντίστοιχα (Trowsdale και Hanson 1993).

Μέχρι πρόσφατα υπήρχε η άποψη ότι η HLA τάξης II περιοχή

περιείχε μόνον τάξης II γονίδια. Νεώτερες χαρτογραφικές μελέτες όμως έφεραν στο φως νέα γονίδια στην περιοχή αυτή, μερικά από τα οποία ενέχονται για την παρουσίαση του αντιγόνου. Δύο σειρές γονιδίων υπεύθυνα για αντιγονικά πεπτίδια των τάξης I μορίων χαρτογραφήθηκαν στην HLA τάξης II περιοχή. Η πρώτη σειρά περιλαμβάνει γονίδια που κωδικοποιούν προϊόντα που παίζουν ρόλο στη μεταφορά αντιγονικών πεπτιδίων στο ενδοπλασματικό δίκτυο για να συναντήσουν τα HLA μόρια (Transport Associated with Antigen-Processing, TAP1 και TAP2). Η δεύτερη σειρά γονιδίων κωδικοποιεί προϊόντα που παίρνουν μέρος στην επεξεργασία του αντιγόνου (Large Multifunctional Proteasome genes, LMP2 και LMP7) (Hansen 1993).

Όπως και με τα HLA τάξης I μόρια, οι διάφορες δομικές περιοχές των α και β αλυσίδων των HLA τάξης II κωδικοποιούνται από ξεχωριστά εξόνια πάνω στα αντίστοιχα A και B γονίδια. Η οργάνωση των A και B γονιδίων είναι όμοια εκτός από τις διαφορές στη δομή των εξονίων που κωδικοποιούν το συνδετικό, διαμεμβρανικό και ενδοκυτταροπλασματικό κομμάτι. Έτσι, το εξόνιο 1 των A και B γονιδίων κωδικοποιεί την 5'-αμετάφραστη περιοχή, το πεπτίδιο σήμα (signal peptide) και δύο με τέσσερα αμινοξέα της πρώτης περιοχής ($\alpha 1$ ή $\beta 1$). Τα εξόνια 2 και 3 κωδικοποιούν το υπόλοιπο της $\alpha 1$ ή $\beta 1$ περιοχής και τη δεύτερη εξωκυτάρια περιοχή κάθε αλυσίδας ($\alpha 2$ ή $\beta 2$). Για την α αλυσίδα, το συνδετικό πεπτίδιο, η διαμεμβρανική και η ενδοκυτοπλασματική περιοχή και ένα κομμάτι της 3'-αμετάφραστης περιοχής κωδικοποιούνται από το εξόνιο 4 του A γονιδίου. Το εξόνιο 5 του ίδιου γονιδίου κωδικοποιεί το υπόλοιπο της 3'-αμετάφραστης περιοχής. Για τη β αλυσίδα, το συνδετικό πεπτίδιο, η διαμεμβρανική περιοχή και ένα μέρος της ενδοκυτοπλασματικής κωδικοποιούνται από το εξόνιο 4 του B γονιδίου. Το εξόνιο 5 κωδικοποιεί άλλο ένα κομμάτι της ενδοκυτοπλασματικής περιοχής και τέλος ότι απέμεινε από την περιοχή αυτή μαζί με ολόκληρη την 3'-αμετάφραστη περιοχή κωδικοποιείται από το εξόνιο 6 (Trowsdale και Hanson 1993).

Συνοψίζοντας, τα HLA τάξης I και II μόρια είναι ανάλογες πρωτεΐνες και συνίστανται από δομικά διαφοροποιημένα εξωκυτάρια, διαμεμβρανικά

και ενδοκυττάρια τμήματα. Το εξωκυττάριο τους τμήμα είναι οργανωμένο σε τέσσερις περιοχές που με τη σειρά τους συνίστανται από δύο υποομάδες, μία κοντά στην κυτταρική μεμβράνη με δύο περιοχές που μοιάζουν με τη σταθερή περιοχή των ανοσοσφαιρινών και μια υποομάδα μακριά από τη κυτταρική μεμβράνη. Η τελευταία αυτή αποτελείται από δύο περιοχές που παρουσιάζουν όλον τον πολυμορφισμό που διακρίνει τα HLA τάξης I και II μόρια.

5. HLA απλότυπος-Διαταραχή ισορροπίας σύνδεσης

Λόγω της στενής μεταξύ τους σύνδεσης, τα HLA αλληλία κάθε γονιδιακής θέσης ενός χρωμοσώματος κληρονομούνται σε συνδυασμό σαν μια μονάδα. Ο συνδυασμός αυτός των HLA μορίων που κωδικοποιούνται από τα γονίδια του ενός χρωμοσώματος αναφέρεται ως απλότυπος. Επειδή κάθε άτομο κληρονομεί ένα χρωμόσωμα από κάθε γονέα, φέρει δύο HLA απλότυπους. Η απλή γραφή των αντιγόνων με τη σειρά των γονιδιακών θέσεων ορίζει τον φαινότυπο, π.χ. A1A2B8B44Cw1Cw3DR 3DR5DQ1DQ2DP3DP4, ενώ η γραφή κατά χρωμόσωμα (οι δύο απλότυποι μαζί), τον γονότυπο, π.χ. A1B8Cw3DR3DQ1DP4/ A2B44Cw1DR5DQ2DP3. Επιπλέον, τα HLA γονίδια είναι συγκυρίαρχα γονίδια με αποτέλεσμα και τα δύο αλληλία μιας γονιδιακής θέσης εκφράζονται και ανιχνεύονται πάνω στα κύτταρα. Σύμφωνα με τους νόμους του Mendel, υπάρχει 25% πιθανότητα δύο αδέρφια να έχουν κοινούς και τους δύο HLA απλότυπους, οπότε χαρακτηρίζονται ταυτόσημα, 50% πιθανότητα να μοιράζονται τον έναν από τους δύο απλοτυπους, αναφέρονται ως απλοταυτόσημα και τέλος 25% πιθανότητα να μην έχουν κανένα κοινό απλότυπο οπότε και θεωρούνται HLA ασύμβατα αδέρφια (Leivestad 1993).

Εξαιτίας των τυχαίων διασταυρώσεων μεταξύ των ατόμων σ' έναν πληθυσμό, η συχνότητα ανεύρεσης ενός δεδομένου αλληλίου μιας HLA γονιδιακής θέσης συνδεμένο (linked) μ' ένα άλλο αλληλίο μιας δεύτερης γονιδιακής θέσης είναι συνάρτηση των συχνοτήτων καθενός αλληλίου στον πληθυσμό. Ωστόσο κάποιοι συνδυασμοί αλληλίων ανευρίσκονται με

συχνότητα μεγαλύτερη από την αναμενόμενη. Το φαινόμενο αυτό ονομάζεται "διαταραχή ισορροπίας σύνδεσης" (linkage disequilibrium) και ορίζεται ποσοτικά ως η διαφορά (Δ) μεταξύ παρατηρούμενων και αναμενόμενων συχνοτήτων. Όταν η παρατηρούμενη συχνότητα είναι μεγαλύτερη από την αναμενόμενη, η διαταραχή ισορροπίας σύνδεσης χαρακτηρίζεται θετική (" $\Delta+$ "), αντίθετα, όταν είναι μικρότερη από την αναμενόμενη, αρνητική (" $\Delta-$ "). Για παράδειγμα, οι συχνότητες των HLA-A1 και HLA-B8 στους λευκούς είναι 27,5%, και 15,7% αντίστοιχα. Η προβλεπόμενη συχνότητα των δύο αλληλιών μαζί στον ίδιο απλότυπο θα ήταν 4,3% ($0,275 \times 0,157 \times 100$). Στην πραγματικότητα η συχνότητα του απλότυπου A1B8 αποτελεί το 9,8% του πληθυσμού. Έτσι λοιπόν τα A1 και B8 λέγεται ότι βρίσκονται σε θετική διαταραχή ισορροπίας σύνδεσης στους λευκούς. Στην HLA τάξης II περιοχή οι HLA-DR και HLA-DQ υποπεριοχές είναι στενά συνδεδεμένες μεταξύ τους αφού δεν τις χωρίζουν παρά μόνον 80 με 300kb με αποτέλεσμα η διαταραχή ισορροπίας να είναι πολύ πιο έντονη. Αντίθετα μεταξύ DR και DP αλληλιών η διαταραχή ισορροπίας είναι ασθενής γεγονός που σημαίνει ότι η περιοχή αποτελεί πρόσφορο έδαφος για γενετικό ανασυνδυασμό με διασκελισμό (crossing over) (So 1994).

Υπάρχουν διάφορες πιθανές εξηγήσεις για την ύπαρξη της διαταραχής ισορροπίας σύνδεσης σ' έναν πληθυσμό. Πρώτον, είναι δυνατόν μερικά αλληλία να παραμένουν μαζί γιατί προσφέρουν ένα επιλεκτικό πλεονέκτημα στους φορείς τους, οπότε οι απλότυποι που φέρουν αυτόν το συνδυασμό διαφυλάχτηκαν. Μια δεύτερη πιθανή εξήγηση είναι ότι δεν πέρασε ικανοποιητικός χρόνος ώστε να εδραιωθεί η ισορροπία στον πληθυσμό του οποίου οι αρχέγονοι απλότυποι αναμίχτηκαν σχετικά πρόσφατα. Η τρίτη εξήγηση υποθέτει ότι οι περιοχές ανασυνδυασμού δεν κατανέμονται τυχαία αλλά μάλλον άνισα στους απλότυπους. Η πρώτη εξήγηση φαίνεται η πιο πιθανή, καθώς έχει υπολογιστεί πως ο χρόνος που χρειάζεται για να επιτευχθεί ισορροπία σύνδεσης μέσα στην HLA περιοχή είναι σύντομος, ενώ η τρίτη εξήγηση μάλλον συμβάλλει στην διατήρηση της διαταραχής της ισορροπίας (Dawkins και συν. 1989).

6. Ονοματολογία των HLA μορίων

Με βάση τις ορολογικές μεθόδους αναγνωρίστηκαν μέχρι σήμερα από τα HLA τάξης I μόρια 24 αλλήλια για την A γονιδιακή θέση, 51 για την B και 8 για την C, ενώ από τα HLA τάξης II 22 για την DR, 7 για την DQ και 6 για την DP γονιδιακή θέση (Πίνακας 1) (Bodmer και συν. 1995). Από το 1975 και μετά (6ο συνέδριο Ιστοσυμβατότητας) καθιερώθηκε η εξής ονοματολογία: α) για τεκμηριωμένης ταυτότητας αλλήλια τα αρχικά HLA ακολουθούμενα από το γράμμα της γονιδιακής θέσης κι έναν αριθμό και β) για αντιγόνα που δεν έχουν επίσημα αναγνωρισθεί μεταξύ της γονιδιακής θέσης και του αριθμού μεσολαβεί το γράμμα "w" (από την αγγλική λέξη "workshop"). Αντιγόνα άγνωστα συμβολίζονται με "x" στη θέση του αριθμού. Καθώς περισσότερα HLA γονίδια έχουν κλωνοποιηθεί και χαρακτηριστεί ως προς τις αλληλουχίες τους οι παραπάνω αριθμοί έχουν αυξηθεί δραματικά. Έτσι 59 αλλήλια χαρακτηρίστηκαν για την A γονιδιακή θέση, 118 για την B, 36 για την C, 124 για την DRB1, 4 DRB3, 5 DRB4, 5 DRB5, 3 DRB6, 2DRB7, 2 DRA αλλήλια, 25 DQB1 αλλήλια, 16 DQA1 αλλήλια, 62 DPB1 και 8 DP AI αλλήλια (Πίνακας Α). Η ανάγκη νέου τρόπου ονοματολογίας που να περιλαμβάνει τα νέα δεδομένα έγινε φανερή.

Σύμφωνα με την επιτροπή της Παγκόσμιας Οργάνωσης Υγείας για την HLA ονοματολογία, τα αλλήλια κάθε γονιδιακής θέσης καθορίζονται από το γράμμα της γονιδιακής θέσης ακολουθούμενο από μια σειρά τεσσάρων αριθμών αφού προηγηθεί αστερίσκος.

Πίνακας Α: Ονοματολογία των HLA μορίων

HLA αλλήλια	HLA ορολογικές ειδικότητες	HLA αλλήλια	HLA ορολογικές ειδικότητες
A*0101	A1	A*3004	A30(19)
A*0102	A1	A*3005	A30(19)
A*0201	A2	A*31011	A31(19)
A*0202	A2	A*31012	A3 1(19)
A*0203	A203	A*3201	A32(19)
A* 0204	A2	A*3301	A33(19)

HLA αλληλία	HLA ορολογικές ειδικότητες	HLA αλληλία	HLA ορολογικές ειδικότητες
A*0205	A2	A*3302	A33(19)
A*0206	A2	A*3303	A33(19)
A*0207	A2	A*3401	A34(10)
A*0208	A2	A*3402	A34(10)
A*0209	A2	A*3601	A3 6
A*0210	A210	A*4301	A43
A*0211	A2	A*6601	A66(10)
A*0212	A2	A*6602	A66(10)
A*0213	A2	A*68011	A68(28)
A*0214	A2	A*68012	A68(28)
A*0215N		A*6802	A68(28)
A*0216	A2	A*6901	A69(28)
A*0217	A2	A*7401	A74(19)
A*0301	A3	A*8001	
A*0302	A3		
A*1101	A11	B*0702	B7
A*1102	A11	B*0703	B703
A*2301	A23(9)	B*0704	B7
A*2402	A24(9)	B*0705	B7
A*2403	A2403	B*0801	B8
A*2404	A24(9)	B* 0802	B8
A*2405	A24(9)	B*1301	B13
A*2406	A24(9)	B*1302	B13
A*2501	A25(10)	B*1303	
A*2601	A26(10)	B*1401	B64(14)
A*2602	A26(10)	B*1402	B65(14)
A*2603	A26(10)	B*1501	B62(15)
A*2604	A26(10)	B*1502	B75(15)
A*2901	A29(19)	B*1503	B72(70)
A*2902	A29(19)	B*1504	B62(15)
A*3001	A30(19)	B*1505	B62(15)
A*3002	A30(19)	B*1506	B62(15)
A*3003	A3 0(1 9)	B*1507	B62(15)
B*1508	B62(15)	B*3801	B38(16)
B*1509	B70	B*3802	B28(16)
B*1510	B71(70)	B*39011	B3901
B*1511	B15	B*39013	B3901
B*1512	B76(15)	B*39021	B3902
B*1513	B77(15)	B*39022	B3902

HLA αλληλία	HLA ορολογικές ειδικότητες	HLA αλληλία	HLA ορολογικές ειδικότητες
6*1514	B76(15)	B*3903	B39(16)
6*1515	B62(15)	B*3904	B39(16)
B*1516	B63(15)	B*3905	
B*1517	B63(15)	B*39061	639(16)
B*1518	B71(70)	B*39062	B39(16)
6*1519	B76(15)	B*3907	
B*1520	B62(15)	B*40011	B60(40)
B*1521	B15	B*40012	B60(40)
6*1522		B*4002	B61(40)
6*1523		B*4003	640
B*1524	B62(15)	B*4004	640
6*1525	B15	6*4005	B4005
B*1801	B18	B*4006	B61(40)
B*1802	B18	B*4007	
6*2701	B27	6*4101	B41
B*2702	B27	6*4102	641
6*2703	B27	6*4201	B42
B*2704	B27	6*4402	B44(12)
6*27052	B27	6*4403	B44(12)
6*27053	B27	6*4404	644(12)
6*2706	B27	6*4405	644(12)
6*2707	B27	B*4406	B44(12)
B*2708		B*4501	B45(12)
6*2709	B27	6*4601	B46
6*3501	B35	6*4701	647
B*3502	B35	B*4801	648
B*3503	B35	6*4802	648
B*3504	B35	B*4901	B49(21)
B*3505	B35	B*5001	B50(21)
B*3506	B35	6*5101	B51(5)
B*3507	B35	B*5102	65102
B*3508	B35	B*5103	65103
B*3509	B35	6*5104	651(5)
B*3510		6*5105	651(5)
B*3701	B37	6*52011	B52(5)
B*52012	B52(5)	Cw*1203	
B*5301	B53	Cw*1301	
B*5401	B54(22)	Cw*1401	

HLA αλληλία	HLA ορολογικές ειδικότητες	HLA αλληλία	HLA ορολογικές ειδικότητες
B*5501	B55(22)	Cw*1402	
B*5502	B55(22)	Cw*1403	
B*5601	B56(22)	Cw*1501	
B*5602	B56(22)	Cw*1502	
B*5701	B57(17)	Cw*1503	
B*5702	B57(17)	Cw*1504	
B*5703	B57(17)	Cw*1505	
B*5801	B58(17)	Cw*1601	
B*5802		Cw*1602	
B*5901	B59	Cw*1603	
B*67011	B67	Cw*1701	
B*67012	B67		
B*7301	B73	DRA*0101	
B*7801	B7801	DRA*0102	
B*8101			
Cw*0101	Cw1	DRB1*0101	DR1
Cw*0102	Cw1	DRB1*0102	DR1
Cw*0201	Cw2	DRB1*0103	DR103
Cw*02021	Cw2	DRB1*0104	DR1
Cw*02022	Cw2	DRB1*1501	DR15(2)
Cw*0302	Cw3	DRB1*15021	DR15(2)
Cw*0303	Cw3	DRB1*15022	DR15(2)
Cw*0304	Cw3	DRB1*1503	DR15(2)
Cw*0401	Cw4	DRB1*1504	DR15(2)
Cw*0402	Cw4	DRB1*1601	DR16(2)
Cw*0501	Cw5	DRB1*1602	DR16(2)
Cw*0602	Cw6	DRB1*1603	
Cw*0701	Cw7	DRB1*1604	DR16(2)
Cw*0702	Cw7	DRB1*1605	
Cw*0703	Cw7	DRB1*1606	DR2
Cw*0704	Cw7	DRB1*03011	DR17(3)
Cw*0801	Cw8	DRB1*03012	DR17(3)
Cw*0802	Cw8	OKB1*0302	DR18(3)
Cw*0803	Cw8	DRB1*0303	DR18(3)
Cw*1201		DRB1*0304	DR3
Cw*12021		DRB1*0305	DR3
Cw*12022		DRB1*0401	DR4
DRB1*0403	DR4	DRB1*0402	DR4
		DRB1*1119	

HLA αλληλία	HLA ορολογικές ειδικότητες	HLA αλληλία	HLA ορολογικές ειδικότητες
DRB1*0404	DR4	DRB1*1201	DR12(5)
DRB1*0405	DR4	DRB1*12021	DR12(5)
DRB1*0406	DR4	DRB1*12022	DR12(5)
DRB1*0407	DR4	DRB1*12031	DR12(5)
DRB1*0408	DR4	DRB1*12032	DR12(5)
DRB1*0409	DR4	DRB1*1301	DR13(6)
DRB1*0410	DR4	DRB1*1302	DR13(6)
DRB1*0411	DR4	DRB1*1303	DR13(6)
DRB1*0412	DR4	DRB1*1304	DR13(6)
DRB1*0413	DR4	DRB1*1305	DR13(6)
DRB1*0414	DR4	DRB1*1306	DR13(6)
DRB1*0415	DR4	DRB1*1307	
DRB1*0416	DR4	DRB1*1308	DR13(6)
DRB1*0417	DR4	DRB1*1309	
DRB1*0418	DR4	DRB1*1310	DR13(6)
DRB1*0419	DR4	DRB1*1311	DR13(6)
DRB1*0420	DR4	DRB1*1312	
DRB1*0421	DR4	DRB1*1314	DR13(6)
DRB1*0422	DR4	DRB1*1315	
DRB1*11011	DR11(5)	DRB1*1316	
DRB1*11012	DR11(5)	DRB1*1317	
DRB1*1102	DR11(5)	DRB1*1318	
DRB1*1103	DR11(5)	DRB1*1319	
DRB1*11041	DR11(5)	DRB1*1401	DR14(6)
DRB1*11042	DR11(5)	DRB1*1402	DR14(6)
DRB1*1105	DR11(5)	DRB1*1403	DR14(6)
DRB1*1106	DR11(5)	DRB1*1404	DR14(6)
DRB1*1107		DRB1*1405	DR14(6)
DRB1*11081	DR11(5)	DRB1*1406	DR14(6)
DRB1*11082	DR11(5)	DRB1*1407	DR14(6)
DRB1*1109	DR11(5)	DRB1*1408	DR14(6)
DRB1*1110		DRB1*1409	DR14(6)
DRB1*1111		DRB1*1410	
DRB1*1112		DRB1*1411	
DRB1*1113	DR11(5)	DRB1*1412	
DRB1*1114		DRB1*1413	
DRB1*1115	DR11(5)	DRB1*1414	
DRB1*1116		DRB1*1415	
DRB1*1117		DRB1*1416	

HLA αλληλία	HLA ορολογικές ειδικότητες	HLA αλληλία	HLA ορολογικές ειδικότητες
DRB1*1118		DRB1*1417	
DRB1*1418		DRB7*01012	
DRB1*0701	DR7		
DRB1*0801	DR8	DQA1*0101	
DRB1*08021	DR8	DQA1*01021	
DRB1*08022	DR8	DQA1*01022	
DRB1*08031	DR8	DQA1*0103	
DRB1*08032	DR8	DQA1*0104	
DRB1*08041	DR8	DQA1*0201	
DRB1*08042	DR8	DQA1*03011	
DRB1*0805	DR8	DQA1*0302	
DRB1*0806	DR8	DQA1*0401	
DRB1*0807	DR8	DQA1*0501	
DRB1*0808	DR8	DQA1*05011	
DRB1*0809	DR8	DQA1*05012	
DRB1*0810	DR8	DQA1*05013	
DRB1*0811	DR8	DQA1*0502	
DRB1*09011	DR9	DQA1*0503	
DRB1*09012	DR9	DQA1*0601	
DRB1*1001	DR10		
DRB3*0101	DR52	DQB1*0501	DQ5(1)
DRB3*0201	DR52	DQB1*0502	DQ5(1)
DRB3*0202	DR52	DQB1*05031	DQ5(1)
DRB3*0301	DR52	DQB1*05032	DQ5(1)
		DQB1*0504	
DRB4*01	DR53	DQB1*06011	DQ6(1)
DRB4*0101101	DR53	DQB1*06012	DQ6(1)
DRB4*0101102N		DQB1*0602	DQ6(1)
DRB4*0102	DR53	DQB1*0603	DQ6(1)
DRB4*0103	DR53	DQB1*0604	DQ6(1)
		DQB1*06051	DQ6(1)
DRB5*0101	DR51	DQB1*06052	DQ6(1)
DRB5*0102	DR51	DQB1*0606	
DRB5*0201	DR51	DQB1*0607	
DRB5*0202	DR51	DQB1*0608	
DRB5*0203	DR51	DQB1*0609	
		DQB1*0201	DQ2
DRB6*0101		DQB1*0202	DQ2
DRB6*0201		DQB1*0301	DQ7(3)

HLA αλληλία	HLA ορολογικές ειδικότητες	HLA αλληλία	HLA ορολογικές ειδικότητες
DRB6*0202		DQB1*0302	DQ8(3)
		DQB1*03032	DQ9(3)
DRB7*01011		DQB1*0304	DQ7(3)
DQB1*0305		DPB1*2401	
DQB1*0401	DQ4	DPB1*2501	
DQB1*0402	DQ4	DPB1*26011	
		DPB1*26012	
DPA1*0103		DPB1*2701	
DPA1*0104		DPB1*2801	
DPA1*02011		DPB1*2901	
DPA1*02012		DPB1*3001	
DPA1*02021		DPB1*3101	
DPA1*02022		DPB1*3201	
DPA1*0301		DPB1*3301	
DPA1*0401		DPB1*3401	
		DPB1*3501	
DPB1*01011	DPw1	DPB1*3601	
DPB1*01012	DPw1	DPB1*3701	
DPB1*0201	DPw2	DPB1*3801	
DPB1*02011	DPw2	DPB1*3901	
DPB1*02012	DPw2	DPB1*4001	
DPB1*0202	DPw2	DPB1*4101	
DPB1*0301	DPw3	DPB1*4401	
DPB1*0401	DPw4	DPB1*4501	
DPB1*0402	DPw4	DPB1*4601	
DPB1*0501	DPw5	DPB1*4701	
DPB1*0601	DPw6	DPB1*4801	
DPB1*0801		DPB1*4901	
DPB1*0901		DPB1*5001	
DPB1*1001		DPB1*5101	
DPB1*11011		DPB1*5201	
DPB1*11012		DPB1*5301	
DPB1*1301		DPB1*5401	
DPB1*0401		DPB1*5501	
DPB1*0501		DPB1*5601	
DPB1*0601		DPB1*5701	
DPB1*0701		DPB1*5801	
DPB1*0801			
DPB1*0901			

HLA αλληλία	HLA ορολογικές ειδικότητες	HLA αλληλία	HLA ορολογικές ειδικότητες
DPB1*20011			
DPB1*20012			
DPB1*2101			
DPB1*2201			
DPB1*2301			

Οι δυο πρώτοι αριθμοί υποδηλώνουν το αλληλίο όπως το αναγνωρίζει η ορολογική τυποποίηση και οι δύο τελευταίοι καθορίζουν το αλληλίο από την αλληλουχία των αμινοξέων του, π.χ. B*2701, B*2702 κ.λπ., χρησιμοποιούνται δε διαδοχικοί αριθμοί όταν υπάρχουν περισσότερες αλληλουχίες για το ίδιο ορολογικά ανιχνευόμενο αλληλίο. Για τα HLA τάξης II αλληλία η ονοματολογία είναι παρόμοια, μόνο που στην περίπτωση αυτή λαμβάνεται υπόψη ότι στις DR, DQ και DP υποπεριοχές περιέχονται περισσότερα από ένα B γονίδια ενώ στις DQ και DP υποπεριοχές υπάρχουν 2 A γονίδια (DQA1, DQA2 και DPA1, DPA2) από τα οποία όμως μόνον τα DQA1 και DPA1 είναι λειτουργικά. Σύμφωνα με τα προηγούμενα στην αναγραφή του HLA τάξης II αλληλίου πριν τον αστερίσκο προηγείται ο αριθμός του γονιδίου, π.χ. DRB1*0301, DRB3*0101, DQA1*0104 κλπ. (BodmerKai συν. 1995).

7. Κυτταρική κατανομή και έκφραση των HLA μορίων

Τα τάξης I μόρια εκφράζονται ουσιαστικά πάνω σε όλα τα εμπύρνηνα σωματικά κύτταρα. Το επίπεδο έκφρασης (ο αριθμός δηλ. των μορίων στην κυτταρική επιφάνεια) ποικίλει πάρα πολύ μεταξύ των διαφόρων τύπων των κυττάρων. Για παράδειγμα τα μυϊκά κύτταρα και οι νευρώνες έχουν πολύ χαμηλή έκφραση, ενώ τα λεμφοκύτταρα εκφράζουν υψηλά επίπεδα HLA τάξης I μορίων. Επιπλέον η έκφραση αυξάνει κατά τη διάρκεια μιας ανοσιακής απάντησης. Γενικά, η έκφραση των HLA τάξης I μορίων επηρεάζεται θετικά ή αρνητικά από πολλούς παράγοντες. Μεσολαβητές της κυτταρικής και χημικής ανοσίας αλλά και της φλεγμονής όπως οι κυτοκίνες (λεμφοκίνες, ιντερλευκίνες, ιντερφερόνες) αυξάνουν την έκφραση των τάξης

I μορίων ενώ η μεταμόρφωση των επιθηλιακών κυττάρων από ιούς όπως ο Αδενοϊός 12 οδηγεί σε ελαττωμένα επίπεδα έκφρασης τους. Δεδομένου του ρόλου των HLA τάξης I μορίων στην παρουσίαση των ενδογενών αντιγόνων, η ελάττωση της έκφρασης των τάξης I μορίων που προκαλείται από τον ιό παρέχει ένα μηχανισμό στον ιό να ξεφύγει από το ανοσιακό σύστημα του ξενιστού. Αντίθετα, αυξημένα επίπεδα έκφρασης των τάξης I μορίων διευκολύνουν την εξόντωση του ιού. Είναι γνωστό ότι αυξημένη έκφραση μιας πρωτεΐνης στην κυτταρική επιφάνεια μπορεί να οφείλεται σε πολλαπλούς μηχανισμούς όπως αυξημένη μεταγραφή του mRNA, αυξημένη σταθερότητα του mRNA μέσα στο κύτταρο και αλλαγές στο ρυθμό επεξεργασίας του mRNA μετά την μεταγραφή. Στην περίπτωση των τάξης I μορίων η αυξημένη έκφραση συνοδεύεται συνήθως από αύξηση της ποσότητας του mRNA. Τελικά, αυξημένη έκφραση των HLA μορίων αυξάνει πιθανώς την τύχη των αντιγονικών πεπτιδίων να αναγνωριστούν και να "θανατωθούν" από τα κυτταροτοξικά T λεμφοκύτταρα (So 1994).

Συγκρίνοντας με τα HLA τάξης I μόρια, η έκταση της ιστικής έκφρασης των HLA τάξης II μορίων είναι κατά πολύ περιορισμένη. Τα τάξης II μόρια εμφανίζονται στις κυτταρικές επιφάνειες των B λεμφοκυττάρων, των μονοκυττάρων, μακροφάγων και δενδριτικών κυττάρων. Όλα αυτά τα κύτταρα έχουν την κοινή ιδιότητα, της "διαχείρισης" του αντιγόνου που προέρχεται από το εξωτερικό του κυττάρου και την έναρξη της ανοσιακής απάντησης, παρουσιάζοντας το στα T λεμφοκύτταρα. Για τον παραπάνω λόγο τα κύτταρα αυτά ορίζονται ως αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα (Antigen-Presenting Cells, APCs). Τα HLA τάξης II μόρια ανευρίσκονται επίσης στο αγγειακό ενδοθήλιο, στο επιθήλιο του γαστρεντερικού σωλήνα και τα νεφρικά σπειράματα. Έχουν ακόμη παρατηρηθεί ποσοτικές διαφορές ως προς την κυτταρική έκφραση μεταξύ των διαφόρων HLA τάξης II μορίων (DR, DQ και DP). Τα DR μόρια είναι παρόντα σε μεγαλύτερες ποσότητες απ' ότι τα DQ και DP, ωστόσο κυτταρικές σειρές προερχόμενες από λεμφώματα και λευχαιμικά άτομα έδειξαν έκφραση των DP και DQ με σύγχρονη απουσία των DR μορίων (Lopez de Castro 1993).

Η έκφραση των HLA τάξης II μορίων μπορεί να αυξηθεί ή και να

προκληθεί από τις κυτοκίνες στους ιστούς που δεν τα εκφράζουν. Καλύτερα μελετημένη είναι η γ-ιντερφερόνη (γ-IFN) που προκαλεί την έκφραση των τάξης II μορίων στους ινοβλάστες, τις B-κυτταρικές σειρές, τα T-κύτταρα, το αγγειακό ενδοθήλιο, το θυμικό επιθήλιο και άλλους ιστούς. Ο TNFα επίσης αυξάνει την έκφραση των τάξης II μορίων στα μονοκύτταρα και τα μακροφάγα και δρα συνεργητικά με την γ-IFN. Η πρόκληση της έκφρασης των τάξης II γονιδίων από τις κυτοκίνες έχει κάποια σχέση με την παθογένεια των αυτοάνοσων νοσημάτων και την ανάπτυξη της απόρριψης μοσχεύματος σύμφωνα με ιστοπαθολογικές μελέτες όπου παρατηρήθηκε εκτροπή της έκφρασης των τάξης II μορίων (Lechler 1994). Η φυσιολογία, τελικά, της αυξημένης έκφρασης των τάξης II μορίων δεν είναι πλήρως κατανοητή. Ωστόσο, φαίνεται πιθανό η αυξημένη έκφραση να κινητοποιεί τα κύτταρα που παρουσιάζουν ένα αντιγονικό πεπτίδιο στα T βοηθητικά κύτταρα με αποτέλεσμα την αύξηση του επιπέδου της ανοσιακής απάντησης προς το ξένο αντιγόνο γενικότερα αλλά και της απάντησης του ενεχόμενου κυττάρου (Austyn και Wood 1994).

8. Βιολογικός ρόλος των HLA μορίων

Το γενικό πλαίσιο μέσα στο οποίο μελετήθηκαν τα προϊόντα του MHC αποδίδεται από την αρχική ονομασία τους που ήταν αντιγόνα μεταμόσχευσης. Η κατανόηση του βιολογικού ρόλου των MHC μορίων βασίστηκε σε πειράματα πάνω στο γενετικό έλεγχο της ειδικής ανοσιακής απάντησης έναντι θυμοεξαρτημένων αντιγόνων. Οι μελέτες που έγιναν αποκάλυψαν ότι γονίδια μέσα στην HLA περιοχή, που ορίζονται ως γονίδια ανοσιακής απάντησης (Immune response genes, Ir) καθορίζουν την ικανότητα των T λεμφοκυττάρων να απαντούν σε θυμοεξαρτώμενα αντιγόνα. Κάθε άτομο διαφέρει στην ικανότητα του να απαντά σε αντιγόνα κάτω από τον έλεγχο τέτοιων Ir γονιδίων (Benacerraf 1993).

Η φύση των αντιγονικών καθαριστών ή επιτόπων που αναγνωρίζονται από τα αντισώματα αποτέλεσε ένα από τα θεμελιώδη ενδιαφέροντα των ανοσολόγων. Μετά από μελέτες καθιερώθηκε η άποψη

ότι οι ανοσοσφαιρίνες συνδέονται με τους αντιγονικούς καθαριστές που συντελούν στη φυσική διαμόρφωση του πρωτεϊνικού αντιγόνου. Επειδή για μεγάλο χρονικό διάστημα τα αντισώματα ήταν τα μοναδικά μόρια του ανοσιακού συστήματος ικανά να συνδεθούν με αντιγόνα, εκτιμήθηκε ότι και η κυτταρική ειδική ανοσιακή απάντηση (αυτή που επιτυγχάνεται με τη μεσολάβηση των Τ λεμφοκυττάρων) κατευθύνεται επίσης προς τους αντιγονικούς επιτόπους. Το 1959 όμως, όταν συγκρίθηκαν οι επίτοποι ενός πρωτεϊνικού αντιγόνου ειδικού για αντισώματα με επίτοπους ικανούς να προκαλέσουν κυτταρική ανοσιακή απάντηση, βρέθηκε ότι η τελευταία κατευθύνεται κατά εκτυλιγμένων πρωτεϊνικών μορίων με τους αντιγονικούς καθαριστές σε γραμμική δομή και μάλιστα χρειάζονταν εκτεταμένη αποδιάταξη για να αποκαλυφθούν. Το γενικότερο συμπέρασμα που προέκυψε τελικά από ανάλογες παρατηρήσεις και μελέτες είναι ότι τα ξένα αντιγόνα πρέπει να προσληφθούν με ενδοκύττωση (πινοκύττωση) από τα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα, να καταβολιστούν στα ενδοσωμάτια και λυσοσωμάτια ώστε να σχηματιστούν ξεδιπλωμένα κομμάτια που περιέχουν τους μέχρι τώρα κρυμμένους επιτόπους που αναγνωρίζουν τα ειδικά Τ λεμφοκύτταρα (Ziegler και Unanue 1981).

Αφού έγινε γνωστή η διαδικασία της επεξεργασίας του αντιγόνου ώστε αυτό να αναγνωριστεί μ' έναν ξεχωριστό τρόπο από το Τ λεμφοκύτταρο, τα πειράματα με το ίδιο θέμα συνεχίστηκαν. Τα αποτελέσματα των πειραμάτων αποκάλυψαν ότι τα βοηθητικά Τ λεμφοκύτταρα (CD4⁺ Τ κύτταρα) αναγνωρίζουν τα ξένα αντιγόνα μόνον όταν τους παρουσιάζονται σε συνδυασμό με τα αυτόλογα MHC τάξης II μόρια (Doyle και Strominger 1987). Άλλοι ερευνητές έφτασαν σε ταυτόσημα αποτελέσματα για τα MHC τάξης I μόρια και τα κυτταροτοξικά Τ λεμφοκύτταρα (CD8⁺ Τ κύτταρα) (Sailer και συν 1990), οπότε γενικεύτηκε η βασική απαίτηση της συνεργασίας των αυτόλογων MHC μορίων με τον Τ κυτταρικό υποδοχέα (T cell Receptor, TcR) για την παρουσίαση του αντιγόνου προς όλα τα Τ λεμφοκύτταρα. Το φαινόμενο αυτό έγινε γνωστό ως MHC ή HLA περιορισμός (Lechler 1994).

Ιστορικά, ο βιολογικός ρόλος των MHC μορίων διευκρινίστηκε για τα

τάξης II μόρια τα οποία έχουν περιορισμένη έκφραση πάνω σε κύτταρα επιφορτισμένα με την παρουσίαση των ξένων πρωτεϊνικών αντιγόνων. Λίγο αργότερα έγινε γνωστό ότι οι ίδιες αρχές εφαρμόζονται και στην αναγνώριση από τα τάξης I ιικά αντιγόνα, με τη διαφορά ότι η παρουσίαση του αντιγόνου με ένα τάξης I μόριο απαιτεί το αντιγόνο να έχει συντεθεί μέσα στο κύτταρο. Από αυτές και άλλες παρατηρήσεις βγήκε το συμπέρασμα ότι υπάρχουν δύο ξεχωριστοί δρόμοι επεξεργασίας και παρουσίασης του αντιγόνου, ο δρόμος των MHC τάξης II μορίων που ευνοείται από την παραλαβή διαλυτών αντιγόνων από το εξωκυττάριο περιβάλλον (εξωγενή αντιγόνα, μικροβιακά), και ο δρόμος των MHC τάξης I μορίων με την επεξεργασία αντιγόνων που συντίθενται μέσα στο κύτταρο (ενδογενή αντιγόνα, ιικά, νεοπλασματικά) (Goodman 1994).

8.1 Σύνδεση των HLA τάξης I και II μορίων με αντιγονικά πεπτίδια

Λίγα είναι γνωστά προς το παρόν για τους μηχανισμούς που κατευθύνουν κατά προτίμηση τη σύνδεση των εξωγενών αντιγονικών πεπτιδίων στα τάξης II μόρια και των ενδογενών στα τάξης I μόρια, όπως επίσης δεν είναι ακόμη ξεκαθαρισμένος ο τρόπος μέσα στο κύτταρο όπου το αντίστοιχο HLA μόριο αντιδρά με τα αντιγονικά πεπτίδια.

Οι δύο τάξεις των HLA μορίων έχουν ιδιαίτερες αλλά ανάλογες λειτουργίες. Και τα δύο συνδέονται με επεξεργασμένα αντιγονικά πεπτίδια για την παρουσίαση τους στα T λεμφοκύτταρα. Ωστόσο τα τάξης II μόρια που εκφράζονται επιλεκτικά πάνω σε κύτταρα με την ιδιότητα να επεξεργάζονται και να παρουσιάζουν αντιγόνα στα T λεμφοκύτταρα για να ξεκινήσει η ανοσιακή απάντηση, είναι ικανά να αποχωρίζονται και να επανασυνδέονται με πεπτίδια, ανάλογα με τις συγκεντρώσεις των πεπτιδίων στα οποία εκτίθενται, ώστε να γίνει πιο αποτελεσματική η χρήση του περιορισμένου αριθμού των διαθέσιμων για παρουσίαση HLA μορίων. Αυτό αποδείχτηκε από το μεγάλο συναγωνισμό μεταξύ διαφόρων πεπτιδίων να συνδεθούν με το ίδιο τάξης II μόριο (Benacerraf 1993).

Αντίθετα, τα τάξης I μόρια που εκφράζονται πάνω σε όλα τα κύτταρα,

με τα αυτόλογα και ενδογενώς συντεθειμένα πεπτίδια, αποτελούν με μια έννοια "το δελτίο ταυτότητας" του κυττάρου που θα ελεγχθεί από το σύστημα των Τ λεμφοκυττάρων. Έτσι ένα κύτταρο που φέρει ένα "εαυτό πεπτίδιο" (self-peptide) θα παραμείνει άθικτο, ενώ ένα μολυσμένο από ιό κύτταρο θα εκθέσει τα πεπτίδια του ιού που συνέθεσε κάτω από τις οδηγίες των ιικών νουκλεϊκών οξέων με αποτέλεσμα να επιστρατεύσει τα κυτταροτοξικά Τ λεμφοκύτταρα εναντίον του (Salter και συν. 1990).

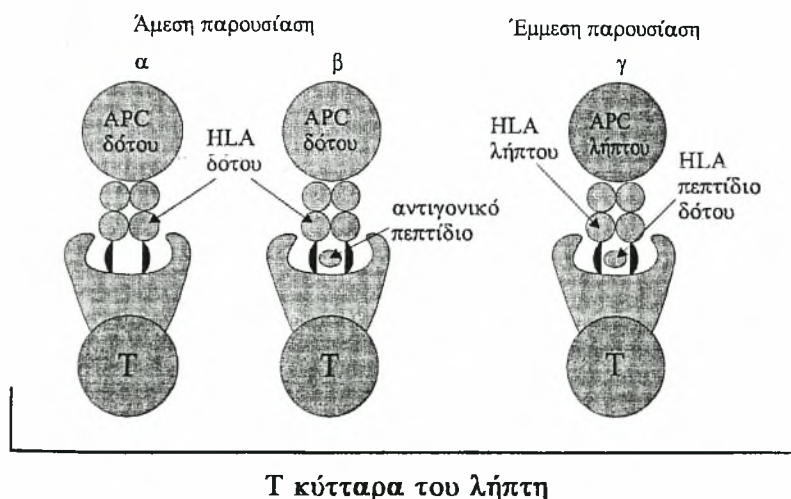
8.2 Άμεση και έμμεση οδός παρουσίασης των HLA μορίων στη μεταμόσχευση

Τα Τ κύτταρα αναγνωρίζουν τα ξένα HLA αντιγόνα (τα HLA αντιγόνα του δότη) με δύο ξεχωριστές οδούς, είτε άμεσα ως άθικτα μόρια ή έμμεσα ως πεπτίδια που προκύπτουν από την αντιγονική επεξεργασία (Shoskes και Wood 1994). Σύμφωνα με την άμεση οδό παρουσίασης, τα αντιγονοπαρουσιαστικά (APC) κύτταρα του δότη παρουσιάζουν τα HLA αντιγόνα του δότη κατευθείαν στον Τ κυτταρικό υποδοχέα ενός Τ κυττάρου του λήπτη (Σχήμα.4). Τα HLA αντιγόνα του δότη μπορεί τη στιγμή της παρουσίασης τους στον Τ- κυτταρικό υποδοχέα (TcR) του λήπτη να έχουν κενή τη σχισμοειδή τους θήκη (Σχήμα 4α) ή να επεξεργάζονται ένα πεπτίδιο (Σχήμα 4β). Από πειράματα σε επίμυες, η άμεση οδός παρουσίασης ενοχοποιείται για την επιταχυνόμενη απόρριψη των νεφρικών μοσχευμάτων σε πρόσφατα μεταμοσχευμένους επίμυες, όχι όμως και για την απόρριψη των νεφρών που "επιβίωσαν" πάνω από 50 μέρες (Braun και συν. 1993). Για την αναγνώριση με την έμμεση οδό, τα αλλογενή HLA μόρια (του δότη) αφού επεξεργαστούν, μετατραπούν δηλαδή σε μικρότερα πεπτίδια από τα APC του λήπτη, παρουσιάζονται από τα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα του λήπτη και αναγνωρίζονται κατά τον ίδιο τρόπο με τον οποίο τα Τ κύτταρα αναγνωρίζουν οποιοδήποτε αντιγόνο (Σχήμα 4γ). Τα αλλοαντιγόνα που αποπίπτουν από το μόσχευμα εκλαμβάνονται από τα APC του λήπτη ως εξωγενή αντιγόνα, ως εκ τούτου CD4+ Τ λεμφοκύτταρα που, όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, αναγνωρίζουν πεπτίδια συνδεδεμένα με HLA

τάξης II μόρια, κυριαρχούν στην απάντηση κατά των αλλοαντιγόνων που παρουσιάζονται με την έμμεση οδό (Shoskes και Wood 1994).

8.3 Τα HLA μόρια ως βάση της αλλοδραστικότητας (αλλοαπάντησης)

Είναι πλέον γνωστό ότι ενώ φυσιολογικά άτομα δεν αντιδρούν κατά των δικών τους (αυτόλογων) ιστών, μία σφοδρή απάντηση μπορεί να δημιουργηθεί έναντι ξένων (αλλογενών) ιστών που να οδηγήσει στην απόρριψη του μοσχεύματος. Η απάντηση αυτή αποτελεί τις *in vivo* εκδηλώσεις της αλλοδραστικότητας (alloreactivity) ή αλλοαπάντησης (Kaminski και συν. 1993). Τρεις διαφορετικές εξηγήσεις έχουν προταθεί για την ερμηνεία της σφοδρότητας της αλλοδραστικότητας: α) μια γενετική τάση που ευνοεί γονίδια T κυτταρικών υποδοχέων με ειδικότητα για τα HLA αντιγόνα, β) μεγαλύτερη πυκνότητα των αλλογενών HLA καθαριστών πάνω στην επιφάνεια των αλλογενών αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων (APCs) και γ) μεγαλύτερη συχνότητα των διάφορων αλλογενών HLA καθαριστών πάνω σ' αυτά τα APCs (Auchincloss και Sachs 1993). Είναι σημαντικό να κατανοήσουμε ότι οι παραπάνω θεωρίες ισχύουν μόνον όταν τα HLA αντιγόνα του δότη παρουσιάζονται κατευθείαν στους T κυτταρικούς υποδοχείς του ξενιστή-λήπτη από τα APCs του δότη (άμεσος δρόμος παρουσίασης).



Σχήμα 4. Άμεση και έμμεση οδός παρουσίασης των HLA μορίων στη μεταμόσχευση.

Αν τα αλλογενή HLA (του δότη) παρουσιάζονται ως αντιγονικά πεπτιδία (επεξεργασμένα δηλ. αντιγόνα από τα APCs του λήπτη) σε συνεργασία με τα εαυτά HLA (του λήπτη), τότε η αναγνώριση τους από τους T κυτταρικούς υποδοχείς του ξενιστή-λήπτη ακολουθεί όμοιο δρόμο με αυτόν οποιουδήποτε αντιγόνου (έμμεσος δρόμος παρουσίασης).

Συνοψίζοντας, η αδυναμία αποδοχής ενός μοσχεύματος οφείλεται στους περίπλοκους μηχανισμούς που έχει αναπτύξει ο ανθρώπινος οργανισμός για τη διάκριση του ίδιου από το μη ίδιο, και στους οποίους τα HLA μόρια κατέχουν τον πρωταγωνιστικό ρόλο.

8.4 Ο ρόλος των HLA μορίων στην επιλογή των T κυτταρικών κλώνων (T Cell Repertoire)

Τα HLA μόρια δεν έχουν την ικανότητα να διακρίνουν μεταξύ πεπτιδίων προερχομένων από την αποικοδόμηση ιδίων πρωτεϊνών και αυτών που προέρχονται από ξένες πρωτεΐνες. Τα περισσότερα πεπτιδία που μπορούν να απορροφηθούν από τα HLA μόρια των φυσιολογικών κυττάρων προέρχονται από την αποικοδόμηση αυτόλογων πρωτεϊνών που έχουν επεξεργαστεί από τα ίδια τα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα ή αποκτηθεί από το άμεσο κυτταρικό περιβάλλον. Η "ανικανότητα" αυτή του συστήματος παρουσίασης να ανταπεξέλθει στη διάκριση μεταξύ εαυτού και ξένου, προϋποθέτει ότι το T κυτταρικό σύστημα διαθέτει τους δικούς του μηχανισμούς εκπαίδευσης, πώς δηλαδή να διακρίνει μεταξύ συμπλεγμάτων από αυτόλογα και ξένα πεπτιδία συνδεδεμένα με HLA μόρια ώστε να αποφεύγονται καταστροφικές αυτοάνοσες αντιδράσεις (Germain 1993).

Το μεγαλύτερο μέρος αυτής της εκμάθησης προς διάκριση λαμβάνει χώρα μέσα στο θύμο κατά τη διάρκεια της διαφοροποίησης των T κυττάρων με δύο σημαντικές διεργασίες: α) την επιλογή T κυττάρων με υποδοχείς για τα αυτόλογα HLA μόρια (positive selection) και β) την απομάκρυνση T κυτταρικών κλώνων που μπορεί να ενεργοποιηθούν από αυτόλογα πεπτιδία όταν παρουσιάζονται σε συνεργασία με τα αυτόλογα HLA μόρια (negative selection) (Roitt 1994). Σαν αποτέλεσμα, τα T κύτταρα θα

δείχνουν ανοχή (tolerance) στα συνδεδεμένα με τα αυτόλογα HLA (self-HLA) αυτόλογα πεπτίδια (self-peptides), ενώ θα απαντούν, κυρίως, στα συνδεδεμένα με τα αυτόλογα HLA ξένα πεπτίδια (nonself-peptides). Οι διεργασίες της θετικής και αρνητικής επιλογής των υπό ωρίμανση θυμοκυττάρων οδηγεί στην εξαγωγή T λεμφοκυττάρων με ενδιάμεση συγγένεια προς τα HLA μόρια του ξενιστού. Με την καθοριστική αυτή επίδραση των HLA μορίων ο θύμος καταστρέφει τα επικίνδυνα αυτοαντιδρώντα κύτταρα, αγνοεί τα άχρηστα κύτταρα με τη χαμηλότερη συγγένεια ως προς τα HLA μόρια και επιλέγει τα χρήσιμα κύτταρα με την ενδιάμεση συγγένεια προς τα αυτόλογα HLA μόρια (Von Boehmer και συν. 1989).

8.5 Η σημασία του HLA πολυμορφισμού στη θεωρία της εξέλιξης.

Το πιο σημαντικό χαρακτηριστικό των HLA μορίων, επιπλέον της βιολογικής τους λειτουργίας ως πεπτιδικών παρουσιαστών στο ανοσιακό σύστημα και του ρόλου τους στη δημιουργία ενός φάσματος T κυτταρικών κλώνων, αποτελεί ο τεράστιος πολυμορφισμός τους. Άμεση συνέπεια αυτού είναι το γεγονός ότι τα άτομα διαφέρουν μεταξύ τους ως προς την ικανότητα σύνδεσης των επεξεργασμένων πεπτιδίων που προέρχονται από ένα δεδομένο αντιγόνο. Επιλεγμένα άτομα με τον κατάλληλο απλότυπο αναμένεται να δείχνουν μεγάλη ικανότητα απάντησης, ενώ άλλα με λιγότερο "τυχερούς" απλότυπους να συμπεριφέρονται ως μη απαντητές. Η εξελικτική συνέπεια τέτοιων ατομικών διαφορών στην ενδεχόμενη ικανότητα απάντησης μέσα σε ένα είδος είναι ότι κάποια άτομα θα έχουν πάντα μεγαλύτερο πλεονέκτημα στην επιλογή και άρα την επιβίωση τους (Klein και συν. 1993). Το κόστος αυτού του πλεονεκτήματος για το είδος είναι ότι άλλα άτομα θα διατρέχουν τον κίνδυνο να μην αναπτύξουν την επιθυμητή ανοσιακή απάντηση και επιπλέον κάποιοι απλότυποι να συσχετιστούν με αυτοάνοσες διαταραχές (Benacerraf 1993).

ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΩΝ HLA ΜΟΡΙΩΝ

1. Εισαγωγή

Η γενετική πληροφορία στον άνθρωπο όπως σε όλους τους οργανισμούς φυλάγεται στη γραμμική αλληλουχία 4 αζωτούχων βάσεων, δύο της πουρίνης και δύο της πυριμιδίνης κατά μήκος των δύο κλώνων ενός DNA (Deoxyribonucleic Acid, Δεοξυριβονουκλεϊκό οξύ) μορίου. Οι κύριες βάσεις της πουρίνης είναι η αδενίνη (Adenine) και η θυμίνη (Thymine), ενώ οι κύριες βάσεις της πυριμιδίνης είναι η κυτοσίνη (Cytosine) και η γουανίνη (Guanine), συμβολίζονται δε με το πρώτο γράμμα της λατινικής τους γραφής ως A, T, C και G αντίστοιχα. Στα μόρια των RNA υπάρχουν οι ίδιες βάσεις μόνο που αντί θυμίνης υπάρχει η ουρακίλη (Uracil). Η αλληλουχία του ανθρώπινου γονιδιώματος έχει μήκος πάνω από 3 δισεκατομμύρια DNA βάσεις, κατανεμημένο μεταξύ 23 χρωμοσωμάτων και παρουσιάζεται δύο φορές σε κάθε διπλοειδή κυτταρικό πυρήνα. Το ανθρώπινο γονιδίωμα περιέχει 100.000 περίπου γονίδια που το καθένα συνίσταται κατά μέσον όρο από μερικές χιλιάδες βάσεις που κωδικοποιούν μια ειδική πρωτεΐνη ή ένα δομικό RNA (RiboNucleic Acid, Ριβονουκλεϊκό οξύ). Η κωδική πληροφορία ενός τυπικού ανθρώπινου γονιδίου περιλαμβάνει τμήματα DNA που μεταφράζονται σε πρωτεΐνες και λέγονται εξόνια (exons) τα οποία διακόπτονται από περιοχές που δεν κωδικοποιούν πρωτεΐνη και λέγονται ιντρόνια (introns). Οι αλληλουχίες που κωδικοποιούν ένα λειτουργικό προϊόν αποτελούν στο σύνολο τους μόνον το 5-10% του ανθρώπινου γενώματος, ενώ η λειτουργία των υπόλοιπων αλληλουχιών παραμένει άγνωστη στο μεγαλύτερο τμήμα τους. Η αλληλουχία των βάσεων πολλών ανθρώπινων γονιδίων έχει πλήρως καθοριστεί, ωστόσο, αποτελεί ακόμη ένα μικρό κομμάτι του ανθρώπινου γενώματος (Watson 1976).

Κατά τη διάρκεια των 2 τελευταίων δεκαετιών η ανάπτυξη της τεχνολογίας του ανασυνδυσμένου DNA έκανε δυνατή την ανάλυση

μεμονωμένων γονιδίων γρήγορα και με μεγάλη ακρίβεια. Οι μοριακές τεχνικές, όπως αποκαλούνται, είναι πλέον κοινότυπες στα εργαστήρια έρευνας και βαθμιαία προσαρμόζονται για χρήση και στα κλινικά εργαστήρια. Το DNA προσφέρει πολλά πλεονεκτήματα ως υπόστρωμα για κλινική ανάλυση: είναι ένα σταθερό βιομόριο, εύκολο στο χειρισμό του που απομονώνεται είτε από πρόσφατους ή παγωμένους ιστούς, είτε από δείγμα αίματος και μπορεί να κατεργαστεί και να κατατεμαχιστεί με τρόπους συχνά αδύνατους για μια πρωτεΐνη. Ακόμη σημαντικότερο είναι ότι η πρόσβαση στις πληροφορίες που περιέχονται στο DNA διευκόλυνε τη διερεύνηση πολλών νοσημάτων σε μοριακό επίπεδο.

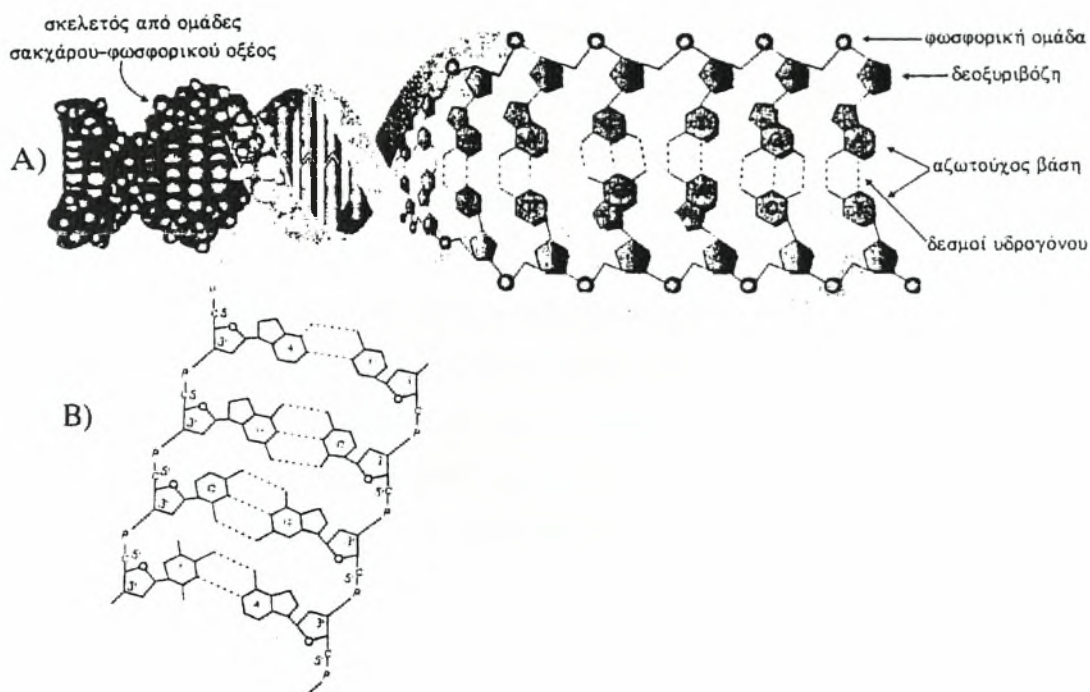
2. Γενικές γνώσεις

2.1 Δομή DNA

Το DNA είναι ένα μακρύ, γραμμικό μεγαλομόριο που αποτελείται από μεγάλο αριθμό δεοξυριβονουκλεοτιδίων, που κάθε ένα συνίσταται από μια αζωτούχο βάση (A, T, C, G), ένα σάκχαρο που είναι δεοξυριβόζη και μια φωσφορική ομάδα (Σχήμα 5A). Ο σκελετός της αλληλουχίας αυτής των νουκλεοτιδίων σχηματίζεται από εναλλασσόμενες ομάδες σακχάρου και φωσφορικού οξέος, ενώ οι βάσεις συνδέονται ως πλευρικές αλυσίδες και η αλληλουχία τους φέρει τη γενετική πληροφορία. Η ένωση ενός σακχάρου με το επόμενο του γίνεται με έναν φωσφοδιεστερικό δεσμό, ειδικότερα το 3' άτομο άνθρακα του σακχάρου ενός δεοξυριβονουκλεοτιδίου ενώνεται με το 5' άτομο άνθρακα του επόμενου σακχάρου (Σχήμα 5B).

Το 1953 οι Watson και Crick πρότειναν ένα πρότυπο διπλής έλικας για το DNA, το οποίο βασίστηκε σε όλες τις χημικές και φυσικές ιδιότητες που είχαν παρατηρηθεί ως τότε. Τα χαρακτηριστικά του προτύπου αυτού είναι τα εξής:

1) Κάθε μόριο DNA αποτελείται από δύο δεξιόστροφες πολυνουκλεοτιδικές αλυσίδες (έλικες), που περιελίσσονται γύρο από έναν άξονα και σχηματίζουν μια διπλή έλικα.



Σχήμα 5: Δομή DNA

2) Οι βάσεις των αλυσίδων τοποθετούνται στο εσωτερικό της διπλής έλικας. Τα επίπεδα των βάσεων είναι παράλληλα μεταξύ τους και κάθετα προς τον επιμήκη άξονα της διπλής έλικας.

3) Οι δύο κλώνοι συγκρατούνται μεταξύ τους με δεσμούς υδρογόνου μεταξύ απέναντι βάσεων (Σχήμα 5A). Όμως, μόνον ορισμένα ζεύγη βάσεων επιτρέπονται, δηλ. η αδενίνη του ενός κλώνου ζευγαρώνει πάντοτε με τη θυμίνη του άλλου (A/T) και ανάλογα η γουανίνη με την κυτοσίνη (G/C). Το χαρακτηριστικό αυτό της δομής του DNA περιγράφεται ως **συμπληρωματικότητα** των βάσεων του. Δύο δεσμοί υδρογόνου συνδέουν το ζεύγος A/T και τρεις το G/C.

4) Οι βάσεις τοποθετούνται η μία επάνω από την άλλη με απόσταση των επιπέδων τους 3,4 Ε. Οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των επιπέδων αρωματικών επιφανειών των γειτονικών βάσεων (υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις) σταθεροποιούν την ελικωτή δομή του DNA και συμβάλλουν στη διατήρηση της μαζί με τους δεσμούς υδρογόνου μεταξύ των βάσεων.

5) Οι δύο πολυνουκλεοτιδικές αλυσίδες είναι αντιπαράλληλες,

δηλαδή οι 3'-5' φωσφοδιεστερικοί δεσμοί διατρέχουν προς αντίθετες διευθύνσεις.

6) Η διπλή έλικα έχει μία μεγάλη αύλακα και μία μικρή αύλακα.

Γενικά οι υδρόφιλες υδατανθρακικές ομάδες και οι φορτισμένες φωσφορικές ρίζες βρίσκονται στο εξωτερικό του μορίου του DNA, ενώ οι υδρόφοβες βάσεις τοποθετούνται μέσα στη διπλή έλικα όπου προστατεύονται από το νερό. Το DNA φέρει τις γενετικές πληροφορίες με τη μορφή της αλληλουχίας των βάσεων και οι πληροφορίες αυτές μεταφράζονται με βάση τον γενετικό κώδικα σε αλληλουχίες αμινοξέων. Επομένως οι γενετικές πληροφορίες για την ακριβή αλληλουχία των αμινοξέων στις πρωτεΐνες φυλάγονται στο DNA με τη μορφή της αλληλουχίας των βάσεων (Τρακατέλλης 1984).

2.2 Μετουσίωση-Υβριδισμός

Ενώ οι ομοιοπολικοί δεσμοί μέσα στον ίδιο κλώνο είναι πολύ ισχυροί, η σταθερότητα των δεσμών υδρογόνου των ζευγών βάσεων μεταξύ των δύο κλώνων είναι αναλογικά μικρότερη, έτσι ώστε οι δύο κλώνοι μπορούν εύκολα να αποχωριστούν σε αλκαλικό pH (>13), σε υψηλή θερμοκρασία (>95°) και με αποδιατακτικές ουσίες (φορμαμίδιο). Η μεταβολή αυτή στη δομή του DNA ονομάζεται μετουσίωση ή αποδιάταξη (denaturation) (Τρακατέλλης 1984). Κατά τη μετουσίωση δεν προκαλείται διάσπαση ομοιοπολικών δεσμών, αλλά διακοπή των δυνάμεων που είναι υπεύθυνες για τη διατήρηση της δομής της διπλής έλικας του DNA, δηλαδή των δεσμών υδρογόνου μεταξύ των βάσεων και των υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων. Τότε η διπλή έλικα του DNA χωρίζεται σε μονές αλυσίδες (single strands) DNA. Το ξετύλιγμα της διπλής έλικας ονομάζεται "τήξη" (melting) γιατί εμφανίζεται ξαφνικά σε μια συγκεκριμένη θερμοκρασία γνωστή ως θερμοκρασία τήξης (T_m) του DNA, κατά την οποία χάνεται η μισή ελικοειδής δομή. Η T_m ενός μορίου DNA εξαρτάται κυρίως από την περιεκτικότητα του σε ζεύγη G/C (τρεις δεσμοί υδρογόνου) κατά γραμμικό τρόπο και μπορεί να υπολογιστεί από την επί τις % σύσταση εάν

γνωρίζουμε τη σύνθεση του μορίου σε βάσεις.

Η μετουσίωση του DNA είναι αντιστρεπτή ακόμη και όταν οι δύο αλυσίδες έχουν ολοκληρωτικά χωρίσει. Επανουσίωση ή επαναδιάταξη (renaturation) δηλαδή σχηματισμός κανονικού δίκλωνου DNA μπορεί να γίνει σε θερμοκρασία χαμηλότερη από την T_m του μορίου και εξαρτάται από πολλούς παράγοντες, όπως το είδος, το μέγεθος, τη συγκέντρωση του DNA και την ιοντική ισχύ του διαλύματος.

Ο **υβριδισμός** (hybridization) βασίζεται στο γεγονός ότι μονές αλυσίδες DNA έχουν την τάση να σχηματίζουν μεταξύ τους περιοχές διπλοελικωμένου DNA στα τμήματα στα οποία οι αλληλουχίες των βάσεων είναι συμπληρωματικές. Ο υβριδισμός μπορεί να γίνει μεταξύ μορίων DNA/DNA, DNA/RNA και RNA/RNA ακόμη κι αν προέρχονται από διαφορετικούς οργανισμούς με αποτέλεσμα τον σχηματισμό μορίων υβριδίων. Η τεχνική της υβριδοποίησης χρησιμοποιείται σήμερα ευρέως για την ανίχνευση συμπληρωματικών αλληλουχιών DNA (Stryer 1988).

2.3 Πολυμορφισμοί DNA-ενδονουκλεάσες περιορισμού

Γενετικός πολυμορφισμός είναι μία παραλλαγή στην αλληλουχία των βάσεων του DNA, η οποία κληρονομείται σύμφωνα με τους νόμους του Mendel και απαντά σε ποσοστό πάνω από 1% του υπό μελέτη πληθυσμού. Η χρησιμότητα των γενετικών πολυμορφισμών έγκειται στο ότι είναι δυνατόν να διακριθούν τα δύο ή περισσότερα αλληλόμορφα γονίδια (αλλήλια) μιας γονιδιακής θέσης πάνω σε κάθε χρωμόσωμα. Η ύπαρξη τους μπορεί να οφείλεται σε γενετική παρέκκλιση ή επιλογή λόγω πλεονεκτημάτων ετεροζυγωτών ή επανεμφανιζόμενες μεταλλάξεις σε ειδικές θέσεις στην αλληλουχία βάσεων του DNA (Vogel και Motylsky 1986). Οι πολυμορφισμοί του DNA είναι ουδέτερες μικρές παραλλαγές στην αλληλουχία των νουκλεοτιδίων που αφορούν αλλαγή μιας βάσεως, προσθήκη ή απάλειψη και ανιχνεύονται μετά από ανάλυση του DNA με ένζυμα περιορισμού, επειδή δημιουργούν ή εξαφανίζουν μια θέση τομής για το ένζυμο (Βαβάτση-Χριστάκη 1991). Λόγω του τεράστιου μεγέθους και της

πολυπλοκότητας του ανθρώπινου γενώματος μετά την κατάτμηση του DNA με ένα περιοριστικό ένζυμο προκύπτουν πολλές χιλιάδες θραύσματα διαφορετικού μεγέθους. Οι διαφορές στο μέγεθος συγκεκριμένων θραυσμάτων DNA μετά από κατάτμηση της αντίστοιχης γονιδιακής περιοχής ομόλογων χρωμοσωμάτων έχουν ορισθεί ως **πολυμορφισμοί μήκους θραύσματος από περιοριστικό ένζυμο** (Restriction Fragment Length Polymorphisms, RFLPs) (Bosten 1980). Τα RFLPs αποτελούν γενετικούς δείκτες για τη συγκεκριμένη περιοχή του DNA και αποκαλύπτονται με μοριακές τεχνικές όπως Southern blotting ή μετά από PCR (Alberts και συν. 1994).

Τα ένζυμα τα οποία διασπών φωσφοδιεστερικούς δεσμούς πολυνουκλεοτιδικών αλυσίδων ονομάζονται νουκλεάσες (nucleases) και όσες από αυτές διασπών εσωτερικούς φωσφοδιεστερικούς δεσμούς, δηλαδή μέσα στην πολυνουκλεοτιδική αλυσίδα, ονομάζονται ενδονουκλεάσες (endonucleases). Η έρευνα τα τελευταία χρόνια αποκάλυψε μία κατηγορία ενδονουκλεασών, των οποίων η δράση δείχνει μία απόλυτη ειδίκευση και περιορίζεται σε φωσφοδιεστερικούς δεσμούς που περιβάλλονται από ορισμένες αλληλουχίες βάσεων. Τα ειδικά αυτά ένζυμα ονομάζονται ενδονουκλεάσες περιορισμού (restriction endonucleases) τα οποία τέμνουν το δίκλωνο DNA σε ορισμένη περιοχή την οποία αναγνωρίζουν (Σχήμα 6). Έτσι φυσιολογικές παραλλαγές βάσεων στο γονιδιωματικό DNA οδηγούν στην εμφάνιση ή εξαφάνιση θέσεων τομής αλλάζοντας μ' αυτόν τον τρόπο το μήκος των θραυσμάτων που προκύπτουν από μία ορισμένη γονιδιακή περιοχή. Τα ένζυμα αυτά απομονώθηκαν από βακτηρίδια στα οποία υπάρχουν για να διασπών ξένο DNA (π.χ. βακτηριοφάγων) και παίρνουν το όνομα τους από τα αρχικά γράμματα που αναφέρονται στο μικροοργανισμό από τον οποίο προέρχονται, π.χ. Eco από *Escherichia coli*, είναι δυνατόν να ακολουθούνται από τέταρτο γράμμα που υποδηλώνει το στέλεχος του μικροοργανισμού π.χ. Eco R και σε περίπτωση που υπάρχουν περισσότερα ένζυμα σε ένα στέλεχος μικροοργανισμού τα διακρίνουμε με λατινικούς αριθμούς π.χ. Taq I (από *Thermus aquaticus*) κλπ. Κάθε ένζυμο

αναγνωρίζει μια ειδική αλληλουχία βάσεων που αποτελείται από 4-8 νουκλεοτίδια και έχει το χαρακτηριστικό ότι είναι παλίνδρομη δηλ. διαβάζεται το ίδιο και από αριστερά προς δεξιά και από δεξιά προς αριστερά (Σχήμα 6). Η χρησιμοποίηση των ενζύμων περιορισμού στην ανάλυση του DNA αποτελεί σημαντικό εργαλείο (Τρακατέλλης 1984).

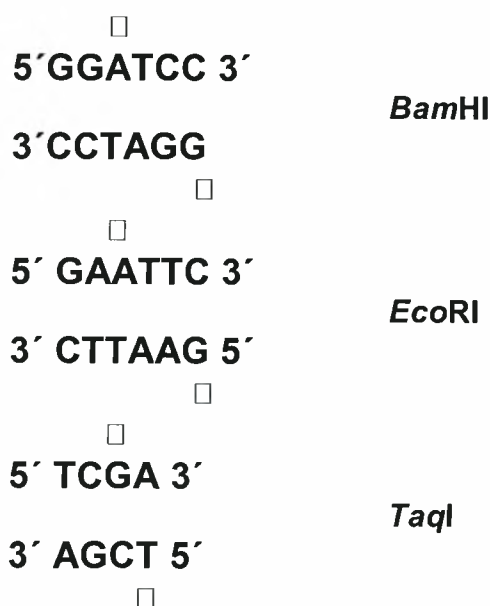
2.4 DNA ανιχνευτές

Οι DNA ανιχνευτές (DNA probes) είναι τμήματα DNA που περιέχουν κάποιο γονίδιο ή γονιδιακή περιοχή (genomic probes-γονιδιακοί ανιχνευτές), ή είναι συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια με δομή συμπληρωματική προς την δομή της γονιδιακής περιοχής που ενδιαφέρει. Για την παρασκευή των γονιδιακών ανιχνευτών χρησιμοποιείται είτε τμήμα γονιδιωματικού DNA που περιέχει το υπό μελέτη γονίδιο και έχει παραχθεί μετά από κατάτμηση με ένζυμο περιορισμού, είτε το mRNA κάποιου γονιδίου ευκαρυωτικού κυττάρου από το οποίο συντίθεται το συμπληρωματικό DNA (complementary DNA, cDNA) με τη δράση του ενζύμου αντίστροφη τρανσκριπτάση (reverse transcriptase) (Βαβάτση-Χριστάκη 1989). Τα τμήματα του γονιδιωματικού DNA ή cDNA που παρασκευάζονται, ενσωματώνονται σε ένα DNA-φορέα (vector), π.χ. πλασμίδιο ή βακτηριοφάγο σχηματίζοντας ένα ανασυνδυασμένο μόριο DNA. Ως φορείς επιλέγονται πλασμίδια ή βακτηριοφάγοι γιατί μπορούν να αντιγραφούν αυτόνομα, όταν βρεθούν μέσα σε ένα κατάλληλο κύτταρο-ξενιστή. Το ανασυνδυασμένο μόριο DNA επωάζεται στη συνέχεια με τα κατάλληλα κύτταρα ξενιστές, π.χ. *E. coli* και προσλαμβάνεται από αυτά σε πολύ μικρό ποσοστό. Ακολουθεί η επιλογή των κυττάρων που περιέχουν το ανασυνδυασμένο μόριο DNA από τα υπόλοιπα κύτταρα-ξενιστές βάσει συνήθως της ανθεκτικότητας σε κάποιο αντιβιοτικό του πλασμιδίου φορέα που χρησιμοποιήθηκε. Αν π.χ. φορέας ήταν ένα πλασμίδιο που προσδίδει ανθεκτικότητα στην τετρακυκλίνη και κύτταρο-ξενιστής βακτηρίδιο ευαίσθητο στο αντιβιοτικό αυτό, τότε προσθήκη αντιβιοτικού στο καλλιεργητικό υλικό θα θανατώσει όλα τα βακτηρίδια που δεν περιέχουν

τον φορέα. Τελικά, τα κύτταρα ξενιστές που επιλέχθηκαν καλλιεργούνται ώστε να αυξηθεί το ποσό του ανασυνδυασμένου DNA (κλωνοποίηση, cloning), το οποίο αφού απομονωθεί από τα κύτταρα-ξενιστές χρησιμοποιείται ως DNA ανιχνευτής (Τρακατέλλης 1984). Εκτός από την κλωνοποίηση in vivo για την εξασφάλιση μεγάλου ποσού του ανιχνευτού χρησιμοποιείται η κλωνοποίηση in vitro με την τεχνική PCR και αλληλουχίες του βακτηριοφάγου M13 (Tarleton και Schwartz 1991).

Σήμερα, στις περισσότερες εφαρμογές γίνεται χρήση συνθετικών ολιγονουκλεοτιδίων ως ανιχνευτών. Το μήκος τους μπορεί να κυμαίνεται από 10 μέχρι 100 περίπου βάσεις, συνήθως όμως αυτά που χρησιμοποιούνται αποτελούνται από 18-20 νουκλεοτίδια και παρασκευάζονται με χημική μέθοδο σε ειδικά αυτόματα μηχανήματα.

Για την ανίχνευση του DNA στόχου με τη μέθοδο του υβριδισμού ο ανιχνευτής πρέπει να σημανθεί. Οι πιο κοινές μέθοδοι σήμανσης του ανιχνευτή είναι οι ραδιοϊσοτοπικές με τη χρήση ^{35}S , ^3H , ^{14}C και συχνότερα ^{32}P . Οι ραδιοϊσοτοπικές μέθοδοι παρέχουν τα εξής δύο πλεονεκτήματα: πρώτον, το σημασμένο DNA ανιχνεύεται με πολύ μεγάλη ευαισθησία και δεύτερον η χημική φύση και ως εκ τούτου και η συμπεριφορά του DNA δεν μεταβάλλεται.



Σχήμα 6. Αλληλουχίες βάσεων που αναγνωρίζουν ορισμένες ενδονουκλεάσες περιορισμού. Με βέλη φαίνονται οι περιοχές διάσπασης και δίπλα αναγράφονται τα ονόματα των ενζύμων.

Η ανίχνευση του υβριδίου του DNA στόχου με τον ανιχνευτή γίνεται με μέτρηση της ραδιενέργειας ή αυτοραδιογραφία (autoradiography) στην τεχνική αποτύπωσης. Πρόσφατα ωστόσο, μεγάλη προσοχή δόθηκε στην ανάπτυξη και εφαρμογή μη ραδιοϊσοτοπικών μεθόδων για την αποφυγή των περιορισμών που επιβάλλονται από τη χρήση ραδιοϊσοτόπου όπως άδεια και ειδικός εξοπλισμός καθώς και ο μικρός χρόνος ημίσειας ζωής του ισοτόπου και η διάθεση των ραδιοσημασμένων αποβλήτων (Van Bragt 1993). Οι περισσότερες από τις μη ισοτοπικές μεθόδους χρησιμοποιούν ενζυμική, χημική, ή φωτοχημική ενσωμάτωση ενός δείκτη (marker). Η ανίχνευση του DNA στόχου γίνεται με ενζυμική χρωματομετρική μέθοδο ή χημειοφωταύγεια.

Ένας ιδανικός ανιχνευτής είναι ένα μονόκλωνο μόριο το οποίο υβριδίζεται ειδικά με την ομόλογη νουκλεϊκή αλληλουχία-στόχο. Οι παράγοντες που μπορούν να επηρεάσουν την διαδικασία του υβριδισμού είναι το μήκος, η φύση (DNA ή RNA ανιχνευτές), η ειδικότητα του ανιχνευτή, το είδος της σήμανσης και το σημείο τήξης (T_m) του υβριδίου, το οποίο όπως αναφέρθηκε εξαρτάται από την περιεκτικότητα του ανιχνευτή σε ζεύγη GC και μάλιστα όσο μεγαλύτερη είναι η περιεκτικότητα σε GC τόσο υψηλότερο είναι το σημείο T_m (Van Bragt 1993). Η θερμοκρασία στην οποία γίνεται ο υβριδισμός είναι συνήθως 5°C κάτω από το T_m του υβριδίου.

3. Βασικές τεχνικές μοριακής βιολογίας

Οι μέθοδοι της Μοριακής Βιολογίας στο διαγνωστικό εργαστήριο περιλαμβάνουν κυρίως την τεχνική του υβριδισμού σε συνδυασμό με τεχνικές αποτύπωσης όπως αποτύπωση DNA κατά Southern (Southern blot), Northern υβριδισμός, αποτύπωση κηλίδας (Dot Blot υβριδισμός) και την τεχνική της Αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR).

3.1 Απομόνωση γονιδιωματικού (genomic) DNA

Το σύνολο του χρωμοσωμικού DNA, απαλλαγμένο από τις χρωμοσωμικές πρωτεΐνες (ιστόνες) καλείται γονιδιωματικό DNA. Πριν από την εφαρμογή τεχνικών ανάλυσης του DNA, απαιτείται απομόνωση (isolation) ή εκχύλιση (extraction) του DNA από εμπύρηνια κύτταρα του οργανισμού μας τα οποία συνήθως είναι τα λευκά αιμοσφαίρια σε περιφερικό αίμα. DNA μπορεί επίσης να απομονωθεί από δείγματα ιστών, αμνιακά κύτταρα και χοριακές λάχνες.

Οι μέθοδοι απομόνωσης DNA περιλαμβάνουν τη χρήση απορρυπαντικών για τη λύση των κυτταρικών και πυρηνικών μεμβρανών και πρωτεολυτικών ενζύμων (πρωτεϊνάση K) για τη διάσπαση των βασικών πρωτεϊνών (ιστόνες) οι οποίες συμμετέχουν στο "πακετάρισμα" του DNA στο χρωμόσωμα. Ακολουθεί απομάκρυνση τους με οργανικούς διαλύτες (φαινόλη και χλωροφόρμιο) ή πυκνό διάλυμα άλατος (6M NaCl) (Miller SA και συν, 1988) και κατακρήμνιση του DNA σε διάλυμα αλκοόλης παρουσία άλατος. Στο τελικό δείγμα γίνεται ποσοτικός προσδιορισμός του μακρομοριακού DNA φασματοφωτομετρικά (Sambrook J και συν. 1989).

3.2 Τεχνική του υβριδισμού

Η ανίχνευση ή ταυτοποίηση αλληλουχιών DNA με τη μέθοδο του υβριδισμού χρησιμοποιείται πολύ συχνά στην Μοριακή Βιολογία. Με τη μέθοδο αυτή γίνεται αναγνώριση αλληλουχιών του DNA δείγματος που εξετάζεται με τη χρησιμοποίηση ενός σημασμένου ανιχνευτή με συμπληρωματική προς αυτές αλληλουχία. Συνήθως πραγματοποιείται επάνω σε στερεό υπόστρωμα που τις περισσότερες φορές είναι μία μεμβράνη νάυλον ή νιτροκυτταρίνης. Όταν το νουκλεϊκό οξύ ανιχνεύεται μέσα στο κύτταρο ή τον ιστό στον οποίο συνήθως ανευρίσκεται, τότε η τεχνική αποκαλείται υβριδισμός "in situ". Ο υβριδισμός επιτελείται μεταξύ του DNA ή RNA στόχου και του σημασμένου ανιχνευτή ο οποίος πριν χρησιμοποιηθεί μετουσιώνεται σε μονόκλωνο DNA όπως άλλωστε και το

DNA στόχος. Στη συνέχεια ακολουθεί υβριδισμός σε κατάλληλες συνθήκες θερμοκρασίας και pH. Καθώς τα DNA μόρια επανατυλίγονται, κάποιοι από τους κλώνους - στόχους θα υβριδοποιηθούν με τον ανιχνευτή παρά με τον συμπληρωματικό τους κλώνο, σχηματίζοντας ράδιο- ή μη σημασμένα υβρίδια. Για να αυξηθεί η πιθανότητα ο DNA κλώνος - στόχος να υβριδοποιηθεί με τον ανιχνευτή και όχι με τον αρχικό του συμπληρωματικό κλώνο, η αντίδραση του υβριδισμού γίνεται σε περίσσεια του ανιχνευτού. Η σταθερότητα του συμπλέγματος ανιχνευτή - DNA στόχου επηρεάζεται από πολλούς παράγοντες, από τους οποίους οι σημαντικότεροι είναι η θερμοκρασία, η συγκέντρωση του άλατος στο διάλυμα υβριδισμού και το μήκος και η σύνθεση σε βάσεις του ανιχνευτή.

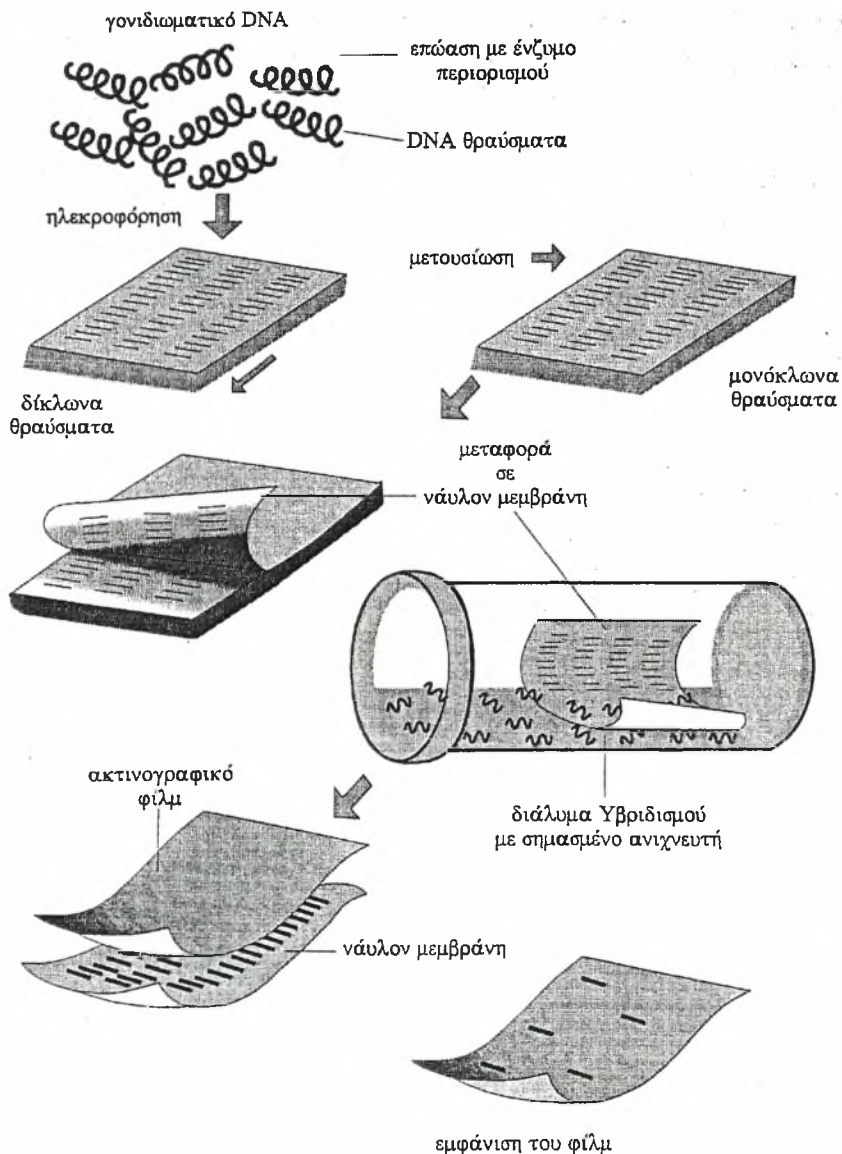
3.3 Υβριδισμός κατά Southern

Η τεχνική αυτή περιλαμβάνει διάσπαση του DNA με ενδονουκλεάσες περιορισμού, ανάλυση του προϊόντος διάσπασης με ηλεκτροφόρηση, μεταφορά του σε μεμβράνη όπου το DNA μονιμοποιείται και στη συνέχεια υβριδίζεται με DNA ή RNA ανιχνευτή (Σχήμα 7Α). Με την τεχνική του Southern (1975:) είναι δυνατόν να βρεθεί αν υπάρχει αλλοίωση σε κάποιο τμήμα γονιδιωματικού DNA. Με αυτοραδιογραφία ή νεώτερες πολύ ευαίσθητες τεχνικές ανιχνεύεται ποσό DNA μικρότερο από 1 pg. Η μέθοδος περιλαμβάνει:

- α. Κατάτμηση του DNA με ενδονουκλεάσες περιορισμού, οπότε ελαττώνεται η πολυπλοκότητα των θραυσμάτων DNA που θα μελετηθούν. Το προϊόν της κατάτμησης είναι ένα σύνολο θραυσμάτων DNA με διαφορετικό μέγεθος.
- β. Ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων σε πηκτή αгарόζης. Το κάθε θραύσμα DNA θα κινηθεί στην ηλεκτροφόρηση ανάλογα με το μοριακό του μέγεθος (τμήματα μικρότερου μοριακού βάρους κινούνται γρηγορότερα).
- γ. Αποδιάταξη (εκτύλιξη) του DNA πάνω στην πηκτή και διάσπαση των μεγάλου μεγέθους θραυσμάτων DNA σε μικρότερα ώστε να είναι

δυνατή η μεταφορά τους στη μεμβράνη.

δ. Μεταφορά του DNA από την πηκτή σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης ή νάυλον και μονιμοποίηση ώστε να δεσμευτεί το DNA στη μεμβράνη. Η μεταφορά στη μεμβράνη γίνεται με τριχοειδικά φαινόμενα, όπως περιγράφηκε αρχικά από τον Southern (1975). Για να γίνει η μεταφορά (Σχήμα 7B) η πηκτή τοποθετείται σε τράπεζα καλυμμένη με διηθητικό χαρτί που διαβρέχεται από ένα διάλυμα υψηλής συγκέντρωσης άλατος. Πάνω στην πηκτή εφαρμόζεται η μεμβράνη και επιστοιβάζονται στρώματα διηθητικού χαρτιού.

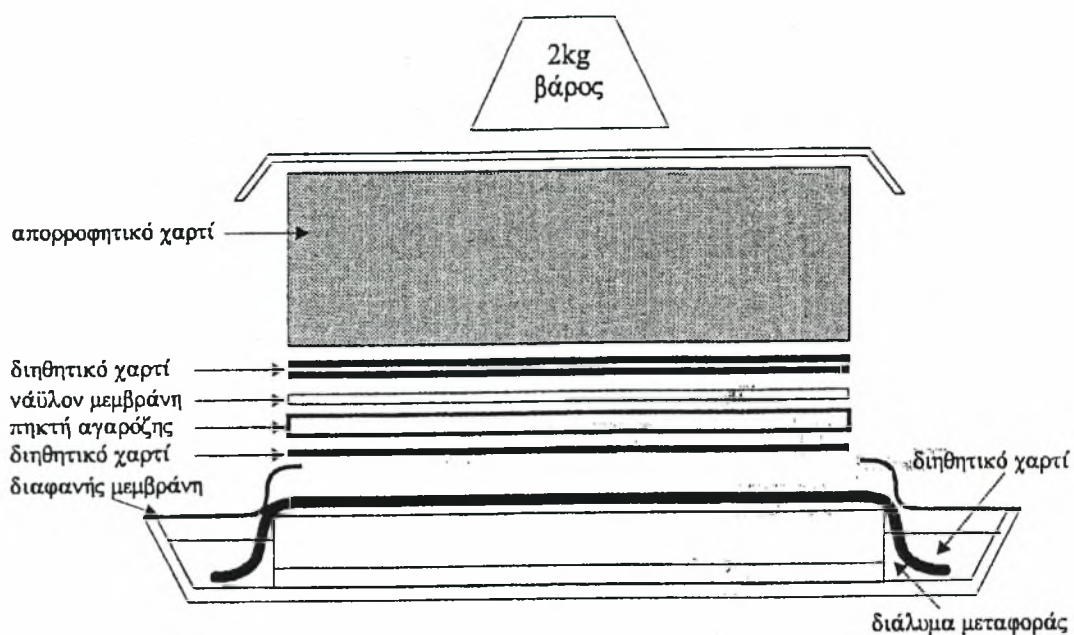


Σχήμα 7A: Τεχνική αποτύπωσης κατά Southern και υβριδισμός

Έτσι το διάλυμα μεταφέρεται από την πηκτή προς τη μεμβράνη συμπαρασύροντας το DNA που δεσμεύεται σ' αυτήν. Υπάρχουν επίσης συσκευές μεταφοράς που βασίζονται στην εφαρμογή πίεσης ώστε το ρυθμιστικό διάλυμα που υπάρχει στους πόρους της πηκτής να μεταφερθεί στη θέση της μεμβράνης χωρίς να διαταραχθεί η ηλεκτροφορητική εικόνα (Κουϊδου Σ. 1993). Με τον έναν ή τον άλλον τρόπο δημιουργείται τελικά το αποτύπωμα του ηλεκτροφορήματος πάνω στη μεμβράνη και ακολουθεί ακινητοποίηση του DNA πάνω σ' αυτήν.

- ε. Υβριδισμός της μεμβράνης με σημασμένο DNA ή RNA ανιχνευτή. Αποκάλυψη της θέσης του ανιχνευτή γίνεται με αυτοραδιογραφία (έκθεση της ραδιενεργού μεμβράνης σε ακτινογραφικό φιλμ) ή με άλλη μέθοδο ανάλογα με τη σήμανση του DNA ανιχνευτή. Το μέγεθος του υβριδισμένου θραύσματος - στόχου υπολογίζεται σε σύγκριση με θραύσματα DNA γνωστού μεγέθους που ηλεκτροφορούνται παράλληλα με τα δείγματα.

Η τεχνική κατά Southern και υβριδισμό όχι μόνο αποκαλύπτει την παρουσία μιας ιδιαίτερης αλληλουχίας βάσεων αλλά και το μέγεθος του θραύσματος DNA πάνω στο οποίο η αλληλουχία αυτή απλώνεται. Δύο ομόλογα τμήματα DNA, με την ίδια δηλ. αλληλουχία βάσεων όταν κατεργαστούν με το ίδιο ένζυμο περιορισμού θα δώσουν θραύσματα με το ίδιο μέγεθος. Αν όμως τα θραύσματα που προκύπτουν έχουν διαφορετικό μέγεθος η ύπαρξη μετάλλαξης στο ένα από τα δύο τμήματα DNA είναι σίγουρη και η διάκριση παθολογικού από φυσιολογικό γονίδιο οριστική.



Σχήμα 7B: Μεταφορά του DNA από την πηκτή σε νάυλον μεμβράνη.

3.4 Υβριδισμός Northern

Η μέθοδος του υβριδισμού Northern είναι παρόμοια με τη μέθοδο υβριδισμού κατά Southern και περιλαμβάνει τη μεταφορά RNA, συνήθως αγγελιοφόρου (mRNA) ή ριβοσωμικού (rRNA) σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης. Στη συνέχεια γίνεται υβριδισμός με κάποιον σημασμένο ανιχνευτή, συνήθως τμήμα γονιδιωματικού DNA. Με τη μέθοδο επιτυγχάνεται η ανίχνευση παραλλαγών στο RNA που μελετάται καθώς και η ποσοτική του αναλογία στο συνολικό RNA (Sambrook J και συν 1989).

3.5 Αποτύπωση κηλίδας (Dot blot υβριδισμός)

Στην αρχική της μορφή η μέθοδος περιλάμβανε απευθείας τοποθέτηση μικρής ποσότητας δείγματος (συνήθως RNA) σε φίλτρο νιτροκυτταρίνης, ξήρανση και υβριδισμό με τον κατάλληλο σημασμένο ανιχνευτή (συνήθως τμήμα γονιδιωματικού DNA). Η τεχνική βελτιώθηκε κυρίως με τη χρήση κατάλληλων μικροσυσκευών που επιτρέπουν την καλύτερη τοποθέτηση της κηλίδας με τη χρησιμοποίηση κενού ώστε να

διευκολύνεται ο ποσοτικός προσδιορισμός του νουκλεϊκού οξέος από την ένταση του σήματος του υβριδισμού. Για την ανίχνευση συχνά χρησιμοποιούνται συνθετικά ολίγονουκλεοτίδια που επιτρέπουν μεγαλύτερη ευαισθησία. Σήμερα η τεχνική χρησιμοποιείται πολύ συχνά για τον έλεγχο των αποτελεσμάτων της PCR (Sambrook J και συν 1989).

3.6 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης

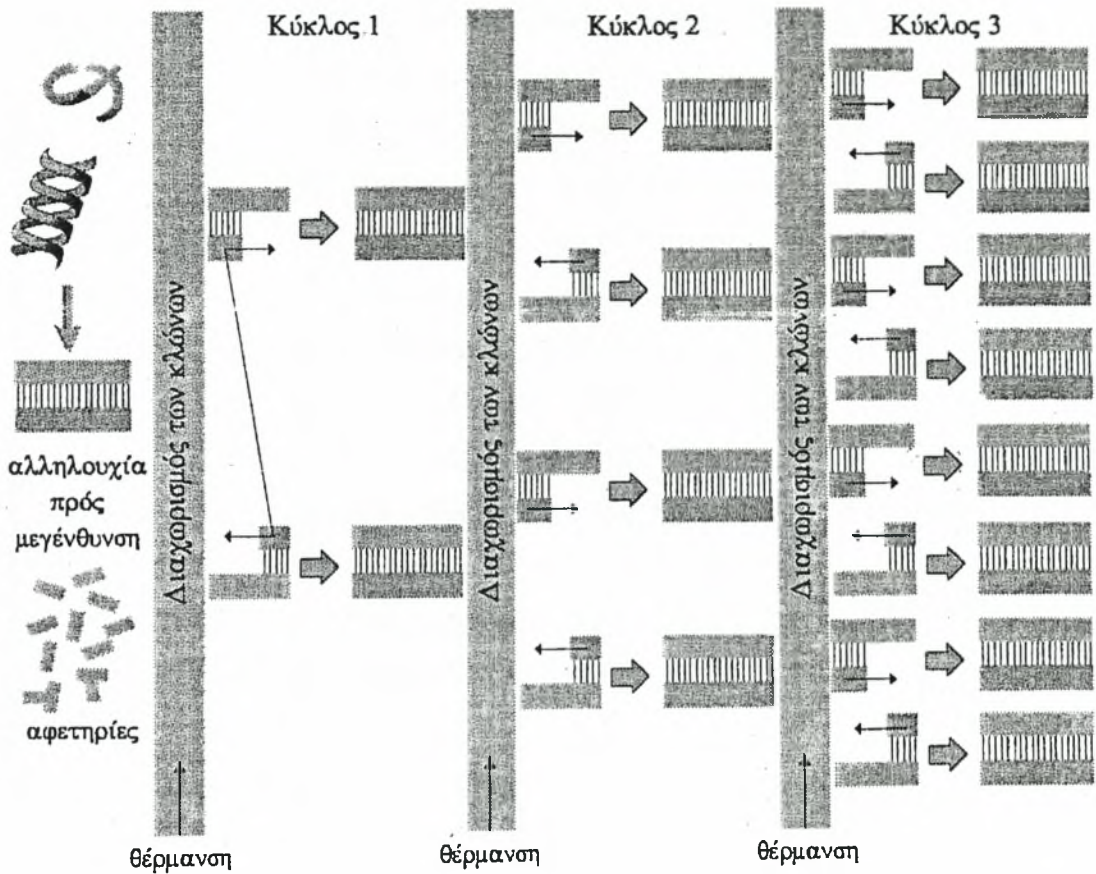
Στο παρελθόν, ένα μεγάλο μειονέκτημα των μεθόδων υβριδισμού ήταν η απαίτηση τους για μεγάλες ποσότητες DNA δείγματος ώστε να αντισταθμίσουν την χαμηλή τους ευαισθησία. Το πρόβλημα αυτό ξεπεράστηκε πρόσφατα με την ανάπτυξη ενζυμικής τεχνικής που μεγεθύνει εκθετικά ορισμένες DNA αλληλουχίες *in vitro*. Η νέα τεχνική εκμεταλλεύεται τις χημικές ιδιότητες των νουκλεϊκών οξέων και εξειδικευμένων ενζύμων που μπορούν να επιδιορθώνουν και να αντιγράφουν το DNA *in vitro*.

Κυτταρικά ένζυμα, γνωστά ως **DNA πολυμεράσες** (DNA polymerases) επιμηκύνουν τον ένα κλώνο του δίκλωνου DNA προσθέτοντας αλληλοδιαδόχως νέες νουκλεοτιδικές βάσεις στο 3' άκρο του που χρησιμεύει ως **αφετηρία** (primer) χρησιμοποιώντας τον άλλο κλώνο ως **πρότυπο** (template). Το ένζυμο προσθέτει νουκλεοτίδια με αλληλουχία βάσεων συμπληρωματική ως προς αυτήν του προτύπου, σχηματίζοντας μ' αυτόν τον τρόπο διπλή έλικα.

Τις ιδιότητες αυτές της DNA πολυμεράσης αξιοποιεί η τεχνική της αλυσιδωτής **αντίδρασης πολυμεράσης** (Polymerase Chain Reaction, PCR), η οποία εφαρμόζεται για την αντιγραφή *in vitro* μιας γονιδιακής περιοχής που αποτελεί το DNA στόχο (Σχήμα 8) (Saiki και συν. 1985, Mullis και Faloona 1987). Το δείγμα DNA είναι δυνατόν να προέρχεται από πολύ μικρό αριθμό κυττάρων και με την PCR σχηματίζονται πολλαπλά αντίγραφα ενός συγκεκριμένου γονιδίου που βρίσκεται στον πυρήνα των κυττάρων αυτών. Η PCR επιτυγχάνεται όταν οι πλευρικές (flanking) προς το υπό μελέτη (μεγέθυνση) τμήμα αλληλουχίες βάσεων είναι οπωσδήποτε εκ των προτέρων γνωστές και αποδίδει περισσότερο όταν έχει να μεγεθύνει

τμήματα μικρότερα των 2000bp περίπου (Innis και Gelfand 1990).

Στην PCR τεχνική εκτός από το DNA στόχο χρησιμοποιούνται ως άλυσιοι αφετηρίες ή εκκινητές (primers) 2 συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια που έχουν δομή συμπληρωματική προς τις πλευρικές αλληλουχίες του DNA στόχου, το καθένα αντίστοιχα προς τον ένα κλώνο του στόχου και με αντίθετη κατεύθυνση, ισομοριακές συγκεντρώσεις τριφωσφορικών δεοξυριβονουκλεοτιδίων (deoxyribonucleotide triphosphates, dNTP's) που είναι η δομική μονάδα του DNA, ιόντα Mg και τέλος το ένζυμο DNA πολυμεράση. Η πολυμεράση που χρησιμοποιείται είναι μια μορφή θερμοάντοχης DNA πολυμεράσης η οποία έχει απομονωθεί από το βακτηρίδιο *Thermus aquaticus* (Taq) (Bell 1989). Η αντίδραση PCR περιλαμβάνει 3 στάδια: αρχικά, γίνεται μετουσίωση του DNA δείγματος σε υψηλή θερμοκρασία, κατά την οποία το δίκλωνο DNA μετατρέπεται σε μονόκλωνο. Κατόπιν συνδέονται "υβριδίζονται" οι αφετηρίες ολιγονουκλεοτίδια στις δύο πλευρές του DNA στόχου, στους αντίστοιχους κλώνους σε χαμηλότερη θερμοκρασία που εξαρτάται από τη σύνθεση των αφετηριών. Με τη δράση της DNA πολυμεράσης προστίθενται συμπληρωματικές βάσεις δεοξυριβονουκλεοτιδίων στο 3' άκρο κάθε αφετηρίας και αυτή επεκτείνεται με αποτέλεσμα τη σύνθεση καινούριων κλώνων DNA συμπληρωματικών προς αυτούς του πρότυπου DNA, οπότε και διπλασιάζεται η υπό μελέτη γονιδιακή περιοχή. Η σειρά των 3 σταδίων, μετουσίωσης (denaturation), σύνδεσης ή υβριδισμού των αφετηριών (annealing) και επέκτασης των αφετηριών με τη σύνθεση νέου κλώνου DNA (extension), αποτελούν 1 κύκλο της PCR (Βαβάτση-Χριστάκη 1993). Η τεχνική είναι μια διαδικασία επαναλαμβανόμενων κύκλων με τους οποίους αυξάνει εκθετικά ο αριθμός των αντιγράφων του DNA στόχου, διότι οι κλώνοι που σχηματίζονται χρησιμοποιούνται ως πρότυπο στον επόμενο κύκλο (Σχήμα 8) (Rapley και συν. 1992).



Σχήμα 8. Μεγέθυνση του DNA με την τεχνική της PCR

Κάθε κύκλος PCR περιλαμβάνει 3 διαφορετικές θερμοκρασίες για τα 3 στάδια που τον αποτελούν. Η μετουσίωση του DNA επιτυγχάνεται σε υψηλή θερμοκρασία 90°-95° C για ελάχιστο χρονικό διάστημα 30-180 sec. Σε θερμοκρασία των 40°-60° C επιτυγχάνεται η σύνδεση των αφετηριών για λίγο χρόνο και στους 70°-75° C η Taq πολυμεράση καταλύει την ενζυμική αντίδραση για τη σύνθεση νέου DNA. Οι εναλλαγές αυτές της θερμοκρασίας επιτελούνται μέσα σε ειδικά αυτοματοποιημένες συσκευές που κυκλοφορούν στο εμπόριο και ονομάζονται θερμοκυκλοποιητές (Thermocyclers).

4. Έλεγχος Ιστοσυμβατότητας με μοριακές τεχνικές

Ο τρόπος σύνδεσης των αντισωμάτων και οι αντιδράσεις των λεμφοκυττάρων όταν αυτά ενεργοποιούνται από ανόμοια HLA αντιγόνα

αποτελέσαν για πολύ καιρό τις μοναδικές αποδείξεις του μεγάλου πολυμορφισμού που χαρακτηρίζει το HLA σύστημα (Colombe 1994). Με την πρόοδο της γονιδιακής κλωνοποίησης και της ανεύρεσης των αλληλουχιών των βάσεων του DNA διαπιστώθηκε ότι ο πολυμορφισμός του HLA συστήματος προέρχεται τελικά από τις διαφορές στις αλληλουχίες αυτές που εντοπίζονται στις μεταβλητές περιοχές των HLA μορίων. Στα HLA τάξης II γονίδια οι μεταβλητές περιοχές εντοπίζονται στο εξόνιο 2, ωστόσο πολυμορφικές περιοχές επίσης ανευρίσκονται στα ιντρόνια και τις γειτονικές περιοχές των γονιδίων (Marsh και Bodmer 1994). Τα τάξης II αντιγόνα μπορούν να χαρακτηριστούν ως μία "συρραφή" των συνδυασμών αυτών των πολυμορφικών αλληλουχιών. Κατά συνέπεια, πολλά αντιγόνα μοιράζονται κάποιες από τις κοινές αλληλουχίες, γεγονός στο οποίο αποδίδεται το φαινόμενο των διασταυρούμενων αντιδράσεων των αντιορών που χρησιμοποιούνται στην ορολογική τυποποίηση, και πιο πρόσφατα οι διασταυρούμενοι υβριδισμοί των τάξης II ανιχνευτών που χρησιμοποιούνται στις διάφορες μοριακές τεχνικές. Ασφαλώς, η πιο διαφωτιστική μέθοδος μοριακής τυποποίησης των HLA αντιγόνων θα ήταν η αναγνώριση της πλήρους αλληλουχίας των βάσεων των HLA γονιδίων για κάθε άτομο (Sequence-based Typing, SBT) (Santamaria και συν. 1992). Μέχρι η μέθοδος αυτή επιλογής να αυτοματοποιηθεί και παραδοθεί στο διαγνωστικό εργαστήριο, υπάρχουν εναλλακτικές προσεγγίσεις που εκμεταλλεύονται τόσο τις μοναδικές όσο και τις κοινές αλληλουχίες των HLA αντιγόνων.

Οι μέθοδοι τυποποίησης των HLA χαρακτηρίζονται από το είδος του DNA και τον τύπο του πολυμορφισμού που ανιχνεύουν. Το είδος του DNA είναι είτε γονιδιωματικό (genomic), DNA δηλ. απομονωμένο από τον κυτταρικό πυρήνα, είτε το μεγεθυμένο προϊόν της PCR αντίδρασης. Οι πολυμορφισμοί που ανιχνεύονται είναι είτε ειδικοί για αλληλουχίες μοναδικές ενός δεδομένου HLA αλληλίου (allele-specific), είτε ειδικοί για αλληλουχίες μικρομεταβλητών (microvariable) περιοχών των HLA γονιδίων (sequence-specific). Οι μοριακές τεχνικές αναγνωρίζουν κατ' αρχήν τα HLA αντιγόνα της ορολογικής τυποποίησης καθώς και τους υποτύπους των αλληλίων όπως αυτοί καθορίστηκαν με την απ' ευθείας ανάγνωση των

νουκλεοτιδικών αλληλουχιών των γονιδίων (Colombe 1994).

Οι μοριακές τεχνικές στο ξεκίνημα τους εφαρμόστηκαν κυρίως για την τυποποίηση των HLA τάξης II αλληλίων, αφ' ενός λόγω του μεγαλύτερου πολυμορφισμού που τα διακρίνει σε σχέση με τα HLA τάξης I, αφ' ετέρου λόγω της δυσκολίας αναγνώρισης τους με τις κλασσικές ορολογικές και κυτταρικές δοκιμασίες. Ο τύπος, η βιωσιμότητα των κυττάρων και η έκφραση τους στην κυτταρική επιφάνεια δεν έχουν καμία βαρύτητα για τις μοριακές τεχνικές. Η ομοζυγωτία, όταν υπάρχει, αποκαλύπτεται με πλήρη βεβαιότητα, τα DNA δείγματα εύκολα συντηρούνται και μεταφέρονται και η ανάγνωση των αποτελεσμάτων επιτυγχάνεται με σχετικά μικρή εμπειρία και με αντικειμενικότητα (Savage και συν. 1993).

4.1 Τυποποίηση των HLA τάξης II αλληλίων με την RFLP μέθοδο

Η πρώτη μοριακή μέθοδος που εφαρμόστηκε είναι η ανίχνευση των πολυμορφισμών μήκους θραύσματος από περιοριστικό ένζυμο (Restriction Fragment Length Polymorphism, RFLP). Η ανάλυση των πολυμορφισμών μήκους θραύσματος από περιοριστικό ένζυμο εφαρμόστηκε για πρώτη φορά στη διερεύνηση του πολυμορφισμού των HLA τάξης II αντιγόνων από τον Wake και τους συνεργάτες του το 1982. Η βελτίωση και επέκταση της RFLP ανάλυσης ώστε να συμπεριλάβει την HLA-DR, DQ και DP τυποποίηση και η βαθμιαία κλινική αξιολόγηση της μεθόδου κυριάρχησε στο 10ο Διεθνές Συνέδριο Ιστοσυμβατότητας και οδήγησε στην ευρεία αποδοχή της από το 1988 (Marcadet και συν. 1989).

Για την HLA RFLP τυποποίηση εφαρμόστηκε η τεχνική Southern blotting μετά από κατάτμηση του γονιδιωματικού DNA των υπό μελέτη ατόμων με ένα ή περισσότερα περιοριστικά ένζυμα και στη συνέχεια υβριδισμός με ραδιοσημασμένους ανιχνευτές (Bidwell 1988). Αν και αρχικά χρησιμοποιήθηκε ως συμπληρωματική της ορολογικής τυποποίησης τεχνική, μεταγενέστερες μελέτες απέδειξαν ότι η RFLP ανάλυση επιτρέπει την ακριβέστατη γονοτυπική τυποποίηση των περισσότερων HLA-DR και -

DQ ειδικοτήτων (Kohonen-Corish και Serjeants on 1986, Keller και συν. 1987, Carlsson και συν. 1987, Bell 1987, Simons και συν. 1989). Οι μελέτες αυτές έδειξαν ότι η αντιστοιχία μεταξύ RFLP και φαινοτυπικά προσδιοριζόμενων DR, DQ ειδικοτήτων ποικίλει ανάλογα με το περιοριστικό ένζυμο που χρησιμοποιείται.

Το περιοριστικό ένζυμο Tag I προτιμάται από πολλούς ερευνητές διότι επιτρέπει το διαχωρισμό της πλειοψηφίας των DRB-DQB-DQA απλοτύπων (Bidwell 1988, Bignon και συν. 1989). Ένας σημαντικός λόγος για την επιλογή του ενζύμου αυτού είναι η αλληλουχία που αναγνωρίζει η Tag I (5 '-TCGA- 3') πάνω στο DNA, η οποία περιέχει το δινουκλεοτίδιο CpG (νουκλεοτίδιο κυτοσίνης ακολουθούμενο από νουκλεοτίδιο γουανίνης). Οι θέσεις που περιέχουν τα CpG διμερή παρουσιάζουν υψηλότερη συχνότητα πολυμορφισμού στο ανθρώπινο DNA απ' ότι άλλες θέσεις, ως αποτέλεσμα μεταλλάξεων που συμβαίνουν περισσότερο στις περιοχές αυτές, οπότε με την Tag I RFLP τυποποίηση ανιχνεύονται περισσότεροι πολυμορφισμοί (Bidwell και συν. 1993). Ως ανιχνευτές προτιμούνται μικρά τμήματα cDNA που προέρχονται από mRNA μεταγραφώματα της γονιδιακής υποπεριοχής της αντίστοιχης DRB, DQB και DQA ειδικότητας ή των εξονίων τους και όχι ολόκληρης της HLA τάξης II περιοχής, ώστε να αποφεύγονται οι διασταυρούμενοι διαγονιδιακοί υβριδισμοί των ανιχνευτών και να διευκολύνεται η ανάγνωση των υβριδισμένων τμημάτων στην αυτοραδιογραφία (So και συν. 1984, Bidwell και συν. 1987, Bidwell και συν. 1988).

Οι κύριες εφαρμογές της RFLP ανάλυσης περιλαμβάνουν την επιλογή των DR/DQ συμβατών δοτών για αλλογενή μεταμόσχευση μυελού των οστών (Caisson και συν. 1985, Howell και συν. 1989), την τυποποίηση υποψήφιων ληπτών νεφρικού μοσχεύματος και των ζώντων συγγενών δοτών τους καθώς και την αναδρομική τυποποίηση των πτωματικών δοτών (Mytilineos και συν. 1990, Olerup και συν. 1990, Wood N και συν. 1990). Οι μελέτες αυτές, αλλά και πολλές άλλες συγκρίνοντας την DNA τυποποίηση με την ορολογική τυποποίηση αποκάλυψαν σοβαρά ποσοστά σφάλματος στην τελευταία (Mytilineos και συν. 1990, Opelz και συν. 1991, Adam K και

συν. 1994). Επιπλέον, η RFLP ανάλυση εφαρμόζεται ακόμη σε ανθρωπολογικές μελέτες και σε μελέτες συσχέτισης των HLA τάξης II αντιγόνων με διάφορα νοσήματα δίνοντας εντυπωσιακά αποτελέσματα (Kohonen-Corish και Serjeantson 1986, Eastaλ και συν. 1989, Horn και συν. 1989, Badenhoop 1990, Olerup και συν. 1991, Morling και συν. 1991, Donald και συν. 1992, Konrad και συν. 1994).

Η τυποποίηση με την DNA-RFLP μέθοδο αποκαλύπτει πολυμορφισμούς τόσο στις μεταγραφόμενες όσο και στις μη μεταγραφόμενες περιοχές, ωστόσο οι περισσότεροι πολυμορφισμοί αποδίδονται σε διαφορές στις μη μεταγραφόμενες περιοχές. Λόγω όμως της ισχυρής διαταραχής ισορροπίας σύνδεσης (linkage disequilibrium) μεταξύ των πολυμορφικών θέσεων και των μεταγραφόμενων αλληλουχιών, οι πολυμορφισμοί που προκύπτουν μπορεί να χρησιμοποιηθούν για την αναγνώριση των HLA τάξης II αλληλίων. Το μεγαλύτερο μειονέκτημα της RFLP τεχνικής σε σχέση με την ορολογική τυποποίηση είναι ότι δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί στην τυποποίηση του πτωματικού δότη νεφρικού μοσχεύματος διότι απαιτείται πολύς χρόνος μέχρι να δοθεί το αποτέλεσμα. Επίσης είναι μειονέκτημα της μεθόδου ότι οι DR-DQ συσχετίσεις χρησιμοποιούνται αναγκαστικά για τον διαχωρισμό μεταξύ δύο ομάδων DR αλληλίων (μεταξύ των DR3 και DR6 αλληλίων και των DR7 και DR9), οι οποίες παρουσιάζουν παρόμοιες ή ταυτόσημες μεταξύ τους ταινίες αμαύρωσης. Για το λόγο αυτό θα πρέπει να δίνεται μεγάλη προσοχή όταν μελετούνται όχι λευκοί πληθυσμοί, όπου μπορεί να υπάρχουν διαφορετικές συσχετίσεις μεταξύ DR και DQ αλληλίων (Kam-Tao και συν. 1993). Η RFLP ανάλυση μπορεί να αποκαλύψει νέα DR αντιγόνα εμφανίζοντας ασυνήθη υβριδισμένα τμήματα και αντίστροφα, μπορεί να μην υπάρχουν ένζυμα ικανά να παράγουν θραύσματα DNA που να χαρακτηρίζουν γνωστούς υπότυπους των HLA αλληλίων. Έτσι κάποιοι υπότυποι των DR αλληλίων (όπως των DR4, DR11, DR13 και DR14) δεν μπορούν να διαχωριστούν ακόμη και μετά την DR/DQ συσχέτιση. Ως συνέπεια των παραπάνω περιορισμών αναπτύχθηκαν γρήγορα εναλλακτικές τεχνικές που βασίζονται στην αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Bidwell 1993).

4.2 Τυποποίηση των HLA τάξης II αλληλίων με τη χρήση της PCR

Η τυποποίηση των HLA αντιγόνων με την PCR αναπτύχθηκε παράλληλα με κάθε άλλη βιολογική εφαρμογή της μεθόδου. Παρόλα αυτά, ο εξαιρετικά μεγάλος πολυμορφισμός των HLA γονιδίων αποτέλεσε πρόκληση για τους μοριακούς βιολόγους. Έτσι, τα HLA γονίδια διεκδίκησαν την πρωτοπορία σε κάθε νέα, βασισμένη στην PCR μέθοδο. Η PCR προσφέρει πολλά πλεονεκτήματα στη μοριακή τυποποίηση των HLA αντιγόνων γιατί παράγει σημαντική ποσότητα του επιλεγμένου HLA γονιδίου ενώ συγχρόνως απαιτεί ελάχιστη ποσότητα δείγματος. Το προϊόν της PCR αντίδρασης μπορεί μετά να χρησιμοποιηθεί με διάφορες μεθόδους ώστε να ανιχνευτούν οι εσωτερικοί πολυμορφισμοί των γονιδίων και άρα και των HLA αλληλίων (Vaughan 199], Erlich 1991, Giphart 1991).

Η τυποποίηση των HLA τάξης II αντιγόνων με την τεχνική του υβριδισμού με συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια μετά από μεγέθυνση του DNA με την PCR (PCR-Sequence Specific Oligonucleotides, **PCR-SSO**) ήταν η πρώτη με βάση την PCR μέθοδο που έδωσε σημαντική βελτίωση στην RFLP ανάλυση (Bidwell 1994). Η μέθοδος περιλαμβάνει έναν κατάλογο συνθετικών ολιγονουκλεοτιδίων ώστε να επιτευχθεί η μεγέθυνση των HLA αλληλουχιών-στόχων. Τα ολιγονουκλεοτίδια είναι μικρά συνθετικά κομμάτια μονόκλωνου DNA, μήκους 18-24 συνήθως νουκλεοτιδίων συμπληρωματικά των γνωστών πολυμορφικών αλληλουχιών των HLA αλληλίων. Οι αλληλουχίες-στόχοι που μεγεθύνονται προέρχονται από τα πολυμορφικά εξόνια των HLA γονιδίων που είναι το εξόνιο 2 για τα HLA τάξης II και τα εξόνια 2 και 3 με ή χωρίς το ιντρόνιο 2 των HLA τάξης I γονιδίων. Μετά από 30 κύκλους των 3 σταδίων που περιλαμβάνουν: τη μετουσίωση του DNA στόχου, τη σύνδεση των ολιγονουκλεοτιδικών αφετηριών (primers) στις δύο πλευρές του στόχου και τη σύνθεση νέου DNA, το προϊόν της PCR αντίδρασης μεταφέρεται πάνω σε μεμβράνη, όπου ακινητοποιείται και υβριδίζεται με ειδικά συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια για την κάθε HLA ειδικότητα, σημασμένα ισοτοπικά ή χημικά. Η ανάγνωση των

αποτελεσμάτων επιτυγχάνεται εύκολα με αυτοραδιογραφία ή ενζυμική χρωματομετρική μέθοδο (Tiercy και συν. 1993, Neviny-Stickel και Albert 1993). Συνήθως απαιτείται μεγάλος αριθμός ολιγονουκλεοτιδίων (20-60) λόγω των κοινών πολυμορφικών αλληλουχιών. Για τον λόγο αυτόν έχουν προταθεί διάφορα σχήματα συνδυασμού των ολιγονουκλεοτιδίων ανάλογα με το είδος της πληροφορίας που απαιτείται, π.χ. στη συσχέτιση των HLA με νοσήματα, στις ανθρωπολογικές μελέτες ή στη συμβατότητα δότη-λήπτη (Tiercy 1993). Σήμερα, υπάρχουν πολλοί συνδυασμοί ετεροζυγωτικών φαινοτύπων που μοιράζονται τις ίδιες πολυμορφικές αλληλουχίες και ως εκ τούτου δεν μπορούν να τυποποιηθούν χωρίς αμφιβολία με τα προτεινόμενα πρωτόκολλα συνθετικών ολιγονουκλεοτιδίων. Έτσι πολύ συχνά η μέθοδος αποτυγχάνει να ανιχνεύσει μια νέα πολυμορφική αλληλουχία αφού κανένα ολιγονουκλεοτίδιο δεν έχει συντεθεί γι' αυτήν (Colombe 1994).

Η PCR-SSO τυποποίηση του πολυμορφισμού των HLA-DRB/DQB/DPB αλληλίων έχει πολυάριθμες εφαρμογές στις μελέτες του ρόλου του HLA τάξης II πολυμορφισμού στην επιδεκτικότητα στα αυτοάνοσα νοσήματα, τις μεταμοσχεύσεις οργάνων και ιστών και στις ανθρωπολογικές μελέτες (Wordsworth 1991, Tiercy και συν. 1991, Perdriger και συν. 1992, Djoulah και συν. 1994).

Μια απλούστερη μέθοδος ολιγονουκλεοτιδικής τυποποίησης περιλαμβάνει την ακινητοποίηση όλων των συνθετικών ολιγονουκλεοτιδίων πάνω σε στερεό υπόστρωμα (νάυλον μεμβράνη). Η μέθοδος αυτή είναι γνωστή ως ανάστροφος υβριδισμός ("reverse" dot blot hybridization) (Saiki και συν. 1989). Το προϊόν της PCR σημαίνεται μη ισοτοπικά κατά τη διάρκεια της αντίδρασης και στη συνέχεια μοιράζεται πάνω στην μεμβράνη για να υβριδιστεί. Η παρουσία του συνδεδεμένου PCR προϊόντος που υβριδίστηκε με το αντίστοιχο ολιγονουκλεοτίδιο ανιχνεύεται με ενζυμική χρωματογραφία ή χημειοφωταύγεια. Η μέθοδος προϋποθέτει βέβαια οι συνθήκες υβριδισμού να είναι ίδιες για όλα τα συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια, πράγμα που δεν είναι πάντα εφικτό για όλες τις γονιδιακές θέσεις (Erich και συν. 1991).

Η παρατήρηση της παρουσίας μοναδικών αλληλουχιών για κάθε DR

και DQ αλληλίο έδωσε στο εργαστήριο την αποτελεσματικότερη και ταχύτερη γονοτυπική μέθοδο. Έτσι, σχεδιάστηκαν ολιγονουκλεοτιδικές αφετηρίες (primers) με βάση αυτές τις αλληλουχίες, ώστε κάτω από τις κατάλληλες συνθήκες υβριδισμού να παράγεται μεγεθυσμένο προϊόν μόνον όταν έχει επιτευχθεί απόλυτο ταίριασμα με το υπό εξέταση δείγμα DNA. Όταν δεν παράγεται μεγεθυσμένο προϊόν, το DNA δείγμα δεν φέρει την υπό αναζήτηση γονιδιακή αλληλουχία. Ως εκ τούτου η ειδικότητα της τυποποίησης είναι μέρος της PCR αντίδρασης και δεν απαιτούνται νέοι υβριδισμοί με ειδικά ολιγονουκλεοτίδια για την αναγνώριση του αλληλίου, όπως αυτό συμβαίνει στην PCR-SSO τεχνική. Μετά την μεγέθυνση, το δείγμα ηλεκτροφορεύεται και εξετάζεται μετά από χρώση με βρωμιούχο αιθίδιο για την παρουσία ή απουσία του PCR προϊόντος. Η μέθοδος αυτή που αναφέρεται ως HLA τυποποίηση με την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης και ειδικές ολιγονουκλεοτιδικές αφετηρίες (PCR-Sequence Specific Primers, PCR-SSP), μπορεί να αναγνωρίσει τα ορολογικά ανιχνευόμενα αλληλία καθώς και τους πολυάριθμους υποτύπους αυτών (Olerup και Zetterquist 1992).

Το μεγαλύτερο πλεονέκτημα της PCR-SSP τυποποίησης είναι ότι με τον κατάλληλο εξοπλισμό, η HLA-DR τυποποίηση ολοκληρώνεται μέσα σε 3 ώρες χρησιμοποιώντας βραχύτατη τεχνική απομόνωσης του DNA από το υπό μελέτη άτομο και με λογικό κόστος. Για τους παραπάνω λόγους η PCR-SSP τεχνική αποτελεί τη μοναδική εφαρμόσιμη μοριακή DR τυποποίηση για τις πτωματικές νεφρικές μεταμοσχεύσεις, όπου η ακρίβεια στην τυποποίηση και η οικονομία χρόνου είναι απαραίτητες προϋποθέσεις για την καλή έκβαση της μεταμόσχευσης.

4.3 Τυποποίηση των HLA τάξης I αλληλιων με μοριακές τεχνικές

Μόλις πρόσφατα οι πρόοδοι της PCR για την τυποποίηση των HLA τάξης II αλληλιων εφαρμόστηκαν και για τα τάξης I. Η φαινοτυπική τυποποίηση των τάξης II ήταν πραγματικά περισσότερο προβληματική από αυτήν των τάξης I, με αποτέλεσμα περισσότερες προσπάθειες να

καταναλώθηκαν στην εφαρμογή της τεχνολογίας του DNA για την ομάδα των HLA τάξης II. Αντίθετα, η HLA τάξης I DNA τυποποίηση διαφαίνεται προβληματική για τρεις λόγους: α) η ύπαρξη πολυμορφισμών στα εξόνια 2 και 3 των τάξης I γονιδίων, συχνά (για παράδειγμα στην PCR-SSP μέθοδο) απαιτεί μεγέθυνση των αλληλουχιών του εξονίου 2, του ιντρονίου 2 και του εξονίου 3, β) οι πολυμορφικές αλληλουχίες των τάξης I γονιδίων είναι διάσπαρτες και όχι εντοπισμένες, όπως συμβαίνει με τις τρεις υπερμεταβλητές περιοχές των τάξης II γονιδίων και γ) η αφθονία των τάξης I ψευδογονιδίων μπορεί να συγκαλύψει την ανάλυση των HLA-A, B και C PCR προϊόντων (Bidwell 1994). Παρόλα αυτά, μέσα στον τελευταίο χρόνο αρκετές προκαταρκτικές εφαρμογές της PCR τεχνικής περιγράφηκαν (Olerup 1994, Bugawan και συν. 1994, Cereb και συν. 1995).

Οι μοριακές τεχνικές της τυποποίησης των HLA αντιγόνων προσφέρουν την ακριβέστερη στρατηγική αναγνώρισης του εκτεταμένου πολυμορφισμού που χαρακτηρίζει τα μόρια αυτά. Η πρόκληση για τις μοριακές μεθόδους είναι να εξασφαλίσουν ένα αποτέλεσμα σε σύντομο χρόνο και με το ελάχιστο κόστος, έτσι ώστε τα οφέλη της ακριβούς μοριακής τυποποίησης να εφαρμοστούν στις κρίσιμες χρονικά και τεχνικά απαιτήσεις του προμεταμοσχευτικού ελέγχου.

ΚΛΙΝΙΚΗ ΣΗΜΑΣΙΑ ΤΗΣ HLA ΤΥΠΟΠΟΙΗΣΗΣ

1. Μεταμόσχευση

Η μεταμόσχευση οργάνων και ιστών παρέιχε και παρέχει την κινητήρια δύναμη για την εκτεταμένη έρευνα του HLA συστήματος. Έτσι, τα εργαστήρια Ιστοσυμβατότητας συνεχίζουν περισσότερο από 30 χρόνια να τροφοδοτούν με γνώσεις και στατιστικές ανοσογενετικές μελέτες με θέμα τα HLA αντιγόνα.

Όπως είναι ήδη γνωστό, το HLA σύμπλεγμα, πάνω σε κάθε χρωμόσωμα 6, κωδικοποιεί τα HLA μόρια, τα οποία αποτελούν τον HLA απλότυπο και κληρονομούνται συνήθως ως σύνολο. Αδέλφια που κληρονόμησαν τους ίδιους δύο απλότυπους από τους γονείς τους, καλούνται HLA ταυτόσημα. Όταν λήπτης και δότης μοιράζονται έναν HLA απλότυπο, αποκαλούνται απλοταυτόσημοι και τέτοια είναι συνήθως η περίπτωση του πατρικού μοσχεύματος. Ωστόσο, τα αδέλφια μπορούν να διαφέρουν και ως προς τους δύο απλότυπους, οπότε καλούνται ασύμβατα αδέλφια. Γενετικός ανασυνδυασμός μέσα στο HLA ή κοινά HLA αντιγόνα μεταξύ των γονέων μπορεί να αλλάξουν τον πραγματικό αριθμό των HLA αντιγόνων που μοιράζονται δύο αδέλφια (Auchincloss και Sachs 1993).

Λόγω του μεγάλου πολυμορφισμού των HLA μορίων, τα περισσότερα μη συγγενή άτομα διαφέρουν και ως προς τους δύο απλότυπους. Ωστόσο, τα άτομα αυτά μπορεί να μοιράζονται ή να διαφέρουν σε ένα ή περισσότερα HLA γονίδια που φέρουν οι απλότυποι τους και επομένως σε ένα ή περισσότερα αντίστοιχα HLA μόρια (Leivestad και συν. 1993).

1.1 Μεταμόσχευση νεφρού

Η μεταμόσχευση νεφρού αποτελεί θεραπεία υποκατάστασης της νεφρικής λειτουργίας στους ασθενείς με χρόνια νεφρική ανεπάρκεια τελικού σταδίου. Η προέλευση του δότη νεφρικού μοσχεύματος μπορεί να είναι: α)

από ζώντες συγγενείς (γονείς ή αδέρφια), β) από πτωματικούς δότες και γ) από ζώντες μη συγγενείς δότες (σύζυγοι). Στις περισσότερες Ευρωπαϊκές χώρες και τις Η.Π.Α. το 80% των νεφρικών μοσχευμάτων προέρχεται από πτωματικούς δότες, στην Ελλάδα όμως η κυριότερη πηγή εξακολουθεί να είναι η από ζώντες συγγενείς δότες (Αλεξόπουλος 1995).

Ο ρόλος των HLA αντιγόνων στην επιβίωση του νεφρικού μοσχεύματος αποδεικνύεται από τα αποτελέσματα νεφρικής μεταμόσχευσης από HLA ταυτόσημα αδέρφια (Cecka and Terasaki 1991). Ενώ είναι γενικά αποδεκτή η σημασία της ιστοσυμβατότητας στις μεταμοσχεύσεις από ταυτόσημο αδελφό, εξακολουθεί να αμφισβητείται η σημασία της για τις πτωματικές μεταμοσχεύσεις. Αυτό μπορεί να οφείλεται στο μικρό αριθμό πτωματικών μεταμοσχεύσεων που αναλύθηκαν, τον χαμηλό αριθμό πλήρως συμβατών με το λήπτη μοσχευμάτων που μεταμοσχεύτηκαν και τη βελτίωση άλλων σημαντικών παραμέτρων που ίσως ελαττώνουν τη σημασία της ιστοσυμβατότητας (Sanfilippo και συν. 1988). Η θετική επίδραση των κοινών HLA-A και -B στις πτωματικές νεφρικές μεταμοσχεύσεις αναφέρθηκε για πρώτη φορά τη δεκαετία του '60 (Terasaki και συν. 1966) ενώ μόλις το 1978 που έγινε εφικτή η ανίχνευση τους με την ορολογική μέθοδο, αναλύθηκε και η συμμετοχή των HLA-DR αντιγόνων στην επιβίωση των νεφρικών μοσχευμάτων (Ting και Morris 1979). Σε μερικές, μάλιστα μελέτες η επίδραση της HLA-DR συμβατότητας αποδείχτηκε ισχυρότερη από αυτήν για τα HLA-A και -B αντιγόνα (Albrechtsen και συν. 1979, Moen και συν. 1980).

Πριν από την εισαγωγή της κυκλοσπορίνης (CyA) στη βασική ανοσοκατασταλτική θεραπεία, οι περισσότερες κλινικές μελέτες είχαν δείξει σημαντική βελτίωση της επιβίωσης πλήρως συμβατών για τα HLA αντιγόνα μοσχευμάτων σε σύγκριση με ασύμβατα μοσχεύματα. Μετά την εισαγωγή της CyA, ωστόσο, η επίδραση της HLA συμβατότητας δεν ήταν τόσο εκσημασμένη, παρά το γεγονός ότι υπήρχε ελάττωση των επεισοδίων οξείας απόρριψης σε συμβατά μοσχεύματα (Lundgren και συν. 1986). Σε μεγαλύτερες όμως, πολυκεντρικές μελέτες η ευεργετική επίδραση της HLA συμβατότητας στην επιβίωση του μοσχεύματος εδραιώθηκε, ανεξάρτητα

από το είδος της ανοσοκαταστολής που χρησιμοποιήθηκε. Σύμφωνα με πρόσφατα στοιχεία από το UCLA και την UNOS (United Network for Organ Sharing) η ετήσια επιβίωση μοσχευμάτων με πλήρη ταυτότητα (δύο HLA απλότυποι κοινοί) ήταν 94%. Όταν, ο δότης γονέας ή αδελφός ήταν συμβατός για τον έναν HLA απλότυπο, η ετήσια επιβίωση ανέρχονταν σε 89% και 90% αντίστοιχα (Cecka και Terasaki 1991). Παρόμοια ήταν και τα ευρήματα Ευρωπαϊκής πολυκεντρικής μελέτης (Collaborative Transplant Study, CTS) (Opelz 1992).

Το πλεονέκτημα της καλής συμβατότητας γίνεται περισσότερο εμφανές στη μακροχρόνια επιβίωση των μοσχευμάτων. Έτσι η προβλεπόμενη ημιπερίοδος ζωής (ο χρόνος δηλ. που χρειάζεται για την απόρριψη του 50% των μοσχευμάτων που λειτούργησαν τον πρώτο χρόνο μετά τη μεταμόσχευση) είναι 26,9 χρόνια για μοσχεύματα πλήρους ταυτότητας στο σύστημα HLA και 12,2 και 10,8 χρόνια για μοσχεύματα από απλοταυτόσημο αδελφό ή γονέα αντίστοιχα (Cecka και Terasaki 1991). Παρόμοια ευνοϊκή επίδραση στη μακροχρόνια επιβίωση των μοσχευμάτων αποκάλυψε και η CTS (Opelz 1992). Τα ευνοϊκά αυτά αποτελέσματα από την ανάλυση των μεταμοσχεύσεων από ζώντες δότες οδήγησαν στην αλλαγή του τρόπου κατανομής των πτωματικών μοσχευμάτων, από τοπική σε εθνική κλίμακα με βάση την καλύτερη δυνατή ιστοσυμβατότητα μεταξύ δότη-λήπτη. Έτσι, ενώ η ετήσια επιβίωση μοσχευμάτων με πλήρη ή μερική ταυτότητα είναι 88% και 79% αντίστοιχα, η προβλεπόμενη ημιπερίοδος ζωής είναι 17,3 χρόνια για τα πλήρως συμβατά πτωματικά μοσχεύματα και 7,8 χρόνια για μοσχεύματα με λιγότερα κοινά HLA αντιγόνα (Takemoto και συν. 1992). Επιπλέον, από την προαναφερθείσα μελέτη εξετάστηκε και το πιθανό πρόβλημα της κατανομής του πτωματικού μοσχεύματος σε εθνικό επίπεδο που είναι η επιμήκυνση του χρόνου ψυχρής ισχαιμίας λόγω του απαιτούμενου χρόνου για τη μεταφορά του μοσχεύματος. Τα αποτελέσματα επιβεβαιώνουν τα δεδομένα από την CTS συμφωνά με τα οποία η επιβίωση νεφρικών μοσχευμάτων με καμία διαφορά στα HLA αντιγόνα και με χρόνο ψυχρής ισχαιμίας μέχρι 48 ώρες είναι μεγαλύτερη από αυτήν μοσχευμάτων με τέσσερις αντιγονικές διαφορές και χρόνο ψυχρής ισχαιμίας

κάτω από 24 ώρες (Opelz 1992).

Η βελτίωση της επιβίωσης του μοσχεύματος ήταν περισσότερο εμφανής όταν η ανάλυση των αποτελεσμάτων έγινε με βάση τα λεγόμενα σχιστά αντιγόνα (split HLA antigens) για τα HLA-A και -B και στα κυρίως αντιγόνα (broad antigens) για τα HLA-DR (Opelz και συν. 1993). Αυτό σημαίνει ότι αν ο δότης είχε HLA-A24 ενώ ο λήπτης είχε HLA-A23 (και τα δύο αντιγόνα είναι σχιστά του κυρίως αντιγόνου A9) αυτό θεωρήθηκε ως μη συμβατότητα. Μελέτες από τη Μ. Βρετανία έδειξαν ότι όταν πτωματικοί νεφροί μεταμοσχεύονται με διαφορά το πολύ σε ένα HLA-A ή -B αντιγόνο και καμία διαφορά στα HLA-DR (beneficially matched) έχουν μεγαλύτερη επιβίωση όταν συγκριθούν με μοσχεύματα με περισσότερες από δύο διαφορές (Gilks και συν. 1987, Cicciarelli και Cho 1991). Από ελληνικές μελέτες φάνηκε ότι όταν συγγενής δότης και λήπτης μοιράζονται τους απλότυπους A1B8, A2B12, A3B7, A11B5, A11B35 και A9B12 (απλότυποι με θετική διαταραχή ισορροπίας σύνδεσης μεταξύ των Ευρωπαϊκών λευκών) η μακροχρόνια επιβίωση των μοσχευμάτων είναι πολύ μεγαλύτερη (Δανιηλίδης 1988, Polymenidis και συν. 1992). Επίσης η επιβίωση του μοσχεύματος από πτωματικό δότη με 1 -3 μη κοινά HLA-A, B αντιγόνα και 1 μη κοινό DR ήταν μεγαλύτερη από αυτήν με 4 μη κοινά HLA-A, B και 2 μη κοινά DR αντιγόνα (Adam και συν. 1992).

Η συμβολή της HLA συμβατότητας στην επιτυχή έκβαση της μεταμόσχευσης είναι ιδιαίτερα θεαματική σε περιστατικά προϋπάρχουσας ευαισθητοποίησης του υποψήφιου λήπτη. Έτσι, άτομα που δέχονται δεύτερη και τρίτη μεταμόσχευση, επωφελούνται σαφώς από τη λήψη ενός ιδιαίτερα συμβατού μοσχεύματος. Επίσης λήπτες με τίτλο αντιλεμφοκυτταρικών αντισωμάτων δείχνουν μία σαφή συσχέτιση μεταξύ ιστοσυμβατότητας και επιβίωσης του μοσχεύματος. Όσο μεγαλύτερος ο βαθμός ευαισθητοποίησης, τόσο μεγαλύτερη είναι η επίδραση της ιστοσυμβατότητας στην επιβίωση του μοσχεύματος (Opelz και συν. 1993). Επιπλέον, η ευνοϊκή επίδραση της ιστοσυμβατότητας είναι περισσότερο εμφανής στους λευκούς απ' ότι μαύρους λήπτες πτωματικού νεφρού (Cicciarelli και Cho 1991).

Τα τελευταία χρόνια μια πληθώρα νέων τεχνικών που βασίζονται αποκλειστικά στην ανάλυση του DNA προσφέρουν τη δυνατότητα λεπτομερέστερης ανάλυσης του HLA συστήματος, με άμεση συνέπεια την ακριβέστερη συσχέτιση του με την έκβαση των μεταμοσχεύσεων. Σε συγκριτικές μελέτες από την CTS πρόκυψε ότι η επιβίωση μοσχεύματος ήταν 87% όταν λήπτης και δότης είναι ταυτόσημοι για τα HLA-DR με ορολογική και μοριακή τυποποίηση, ενώ 69% όταν είναι HLA-DR ταυτόσημοι με ορολογικές μεθόδους μόνον και όχι με μοριακή τυποποίηση (Opelz και συν. 1991, Mytilineos και συν. 1993).

Από τα υπάρχοντα δεδομένα δεν διαφαίνεται επίδραση της HLA-C γονιδιακής θέσης στην επιβίωση του μοσχεύματος, ενώ η συμβατότητα στα HLA-DQ αντιγόνα φαίνεται να είναι ευνοϊκή (Terasaki και συν. 1993). Επίσης καμία διαφορά δε βρέθηκε όταν δότης (πρωματικός ή συγγενής) και λήπτης διαφέρουν ως προς τα HLA-DP αντιγόνα (Middleton και συν. 1992).

Η προοπτική μιας μοναδικής εθνικής λίστας ληπτών με σκοπό τη βελτίωση του επιπέδου της συμβατότητας σε σχέση με τη γρήγορη τοπική διάθεση του πρωματικού μοσχεύματος σε βάρος της άριστης συμβατότητας, είναι ακόμη υπό συζήτηση. Σήμερα, η κατανομή των νεφρικών μοσχευμάτων με συμβατότητα μικρότερη από την ιδανική, βασίζεται σε ένα σύστημα επιλογής που περιλαμβάνει την ομάδα αίματος, το επίπεδο των προσχηματισμένων αντι-HLA αντισωμάτων (αρνητική άμεση και έμμεση δοκιμασία διασταύρωσης, cross-match και panel test αντίστοιχα), την ποιότητα της HLA συμβατότητας, τον χρόνο αναμονής στη λίστα και την ηλικία του υποψήφιου λήπτη,

1.2 Μεταμόσχευση παγκρέατος

Πολυπαραγοντική ανάλυση των προγνωστικών παραγόντων σε 764 ασθενείς που αναφέρθηκαν στη διεθνή υπηρεσία για μεταμόσχευση παγκρέατος, παρουσιάζει μία θετική επίδραση των ορολογικά τυποποιημένων κοινών HLA-DR στην επιβίωση του μοσχεύματος (Viste και συν. 1990), Η σημασία της HLA-A και -B συμβατότητας δεν έχει ακόμη

αποδειχτεί.

1.3 Μεταμόσχευση καρδιάς

Η ιστοσυμβατότητα στη μεταμόσχευση καρδιάς δε λαμβάνεται καθόλου υπόψη διότι ο ανώτατος χρόνος ψυχρής ισχαιμίας δεν επιτρέπει την εκτενή τυποποίηση. Παρόλα αυτά, σύμφωνα με τα στοιχεία της CHTS (Collaborative Heart Transplant Study) είναι σαφής η σημασία της ιστοσυμβατότητας στη μεταμόσχευση του οργάνου αυτού. Μοσχεύματα με 0-2 διαφορές στα HLA-A, -B και -DR αντιγόνα δείχνουν υψηλότερα ποσοστά επιβίωσης και ελάττωση των επεισοδίων απόρριψης σε σύγκριση με περιστατικά με 3-6 διαφορές (Opelz 19.94). Επίσης σε πρόσφατη δημοσίευση αναφέρεται ότι η HLA συμβατότητα ελαττώνει τη συχνότητα και σοβαρότητα της οξείας απόρριψης του καρδιακού μοσχεύματος και βελτιώνει την επιβίωση του μοσχεύματος για πάνω από 10 χρόνια μετά τη μεταμόσχευση (Smith και συν. 1995).

1.4 Μεταμόσχευση ήπατος

Όπως και με τη μεταμόσχευση καρδιάς, έτσι και στη μεταμόσχευση ήπατος ο περιορισμένος χρόνος ψυχρής ισχαιμίας δεν αφήνει περιθώρια για HLA τυποποίηση και μεταφορά του οργάνου στον καταλληλότερο λήπτη. Αποτελέσματα HLA τυποποιήσεων που έγιναν μετά τη μεταμόσχευση δεν δείχνουν να παίζει κανένα ρόλο η HLA συμβατότητα και μάλιστα από τις ίδιες αναφορές παρατηρήθηκε ελάττωση στην επιβίωση του μοσχεύματος μεταξύ HLA-A, -B και -DR αντιγόνων (Markus και συν. 1988). Πρόσφατα στοιχεία όμως από την CLTS (Collaborative Liver Transplant Study) εξηγούν την ύπαρξη ή απουσία ευνοϊκής επίδρασης της HLA συμβατότητας για τα DR αντιγόνα ανάλογα με την πρωτοπαθή νόσο που οδήγησε στη μεταμόσχευση ήπατος (προσωπική επικοινωνία). Σύμφωνα με αυτά, σε περιπτώσεις μεταμοσχεύσεων από χολική κίρρωση η DR συμβατότητα δεν φαίνεται να παίζει σημαντικό ρόλο, ενώ

μεταμόσχευση λόγω ηπατίτιδας Β ή C η DR συμβατότητα οδηγεί σε καλύτερη επιβίωση του μοσχεύματος.

1.5 Μεταμόσχευση μυελού των οστών

Η μεταμόσχευση μυελού των οστών καθιερώθηκε εδώ και πολλά χρόνια ως θεραπεία της απλαστικής αναιμίας, της οξείας και χρόνιας λευχαιμίας, των λεμφωμάτων και πιο πρόσφατα των αιμοσφαιρινοπαθειών (μεσογειακή αναιμία), του πολλαπλού μυελώματος και των βαριών αυτοανόσων παθήσεων (Φάσσας 1995). Ο ιδιόμορφος περιορισμός της μεταμόσχευσης μυελού των οστών είναι η ανάγκη προφύλαξης από την ανοσολογική αντίδραση του μοσχεύματος κατά του ξενιστή καθώς επίσης και ο έλεγχος της αντίστασης του ξενιστή στο μόσχευμα (Storb και Thomas 1983). Οι περιορισμοί αυτοί είναι τόσο σοβαροί ώστε να απαιτείται πλήρης συμβατότητα ως προς το HLA σύστημα για επιτυχημένη έκβαση σε όλες τις περιπτώσεις (Auchincloss και Sachs 1993). Μέχρι πρόσφατα, οι HLA-συμβατοί δότες έπρεπε να αναζητηθούν μεταξύ των αδελφών και συγγενών των ασθενών, η εξέλιξη όμως των ανοσολογικών τεχνικών που διευκόλυνε την διερεύνηση του πολυμορφισμού του HLA συστήματος, επέτρεψε τη διεύρυνση της δεξαμενής των δοτών και έξω από τους ταυτόσημους συγγενείς (Beatty 1993). Ωστόσο, ο πολυμορφισμός των HLA είναι τόσο μεγάλος, ώστε να απαιτείται μια τράπεζα από 100.000 πιθανούς δότες για να βρεθεί ένας ταυτόσημος δότης για το 43% μόνον των ασθενών (Hows και Bradley 1990).

2. Μεταγγίσεις αίματος

Μεταξύ των δυνατοτήτων εκλογής για την τροποποίηση της ανοσιακής απάντησης του λήπτη ώστε να αποτραπεί η απόρριψη είναι και οι μεταγγίσεις. Η ευνοϊκή επίδραση των μεταγγίσεων στην επιβίωση των αλλομοσχευμάτων από μη συγγενή δότη αναγνωρίστηκε από τον Opelz το 1973 και τεκμηριώθηκε και από άλλους ερευνητές. Το ίδιο ευεργετικό

αποτέλεσμα αποδείχτηκε για πρώτη φορά στην Ελλάδα και στις μεταμοσχεύσεις από ζώντα συγγενή δότη από τους Παπαδημητρίου και συν. το 1981. Ωστόσο, ο κίνδυνος μετάδοσης της ηπατίτιδας C κυρίως αλλά και ανεπιθύμητες αντιδράσεις που οφείλονταν σε αντισώματα κατά αντιγόνων των λευκοκυττάρων επέφεραν μια προοδευτική υποβάθμιση στο θέμα. Από την άλλη πλευρά, τα τελευταία 5 χρόνια ίσως και λόγω της εφαρμογής της CyA στην κλινική μεταμόσχευση δε βρέθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά στην επιβίωση νεφρικών μοσχευμάτων μεταξύ ληπτών που έλαβαν μετάγγιση αίματος και άλλων που δεν έλαβαν (Opelz 1994).

Από παλαιότερες μελέτες είχε βρεθεί ότι τα HLA αντιγόνα των κυττάρων του αίματος που μεταγγίζεται μπορούν να ευαισθητοποιήσουν το λήπτη και να προκαλέσουν εμφάνιση αντι-HLA αντισωμάτων (Kissmeyer-Nielsen και συν. 1966). Μετά από αυτές τις παρατηρήσεις αναζητήθηκαν κάποιες ιδιαίτερες συμβατότητες ή ασυμβατότητες μεταξύ μεταγγιζόμενου λήπτη και αιμοδότη. Πράγματι, η ευαισθητοποίηση του λήπτη μπορεί να ελαττωθεί όταν μεταγγιζόμενος και αιμοδότης έχουν ένα κοινό HLA-DR (Lagaaij 1990). Ωστόσο, το όφελος από μετάγγιση συμβατού για τα HLA-DR αντιγόνα αίμα παραμένει ανεπιβεβαίωτη (Dyer και Middleton 1993).

3. Συσχέτιση των HLA αντιγόνων με ασθένειες

Μετά την αποκάλυψη του εκτεταμένου πολυμορφισμού των HLA αλληλίων, πολυάριθμες παθήσεις συσχετίστηκαν με αυτά με δύο τρόπους προσέγγισης: α) οικογενειακές μελέτες για την ανεύρεση γενετικής σύνδεσης μεταξύ μιας HLA γονιδιακής θέσης κι ενός γονιδίου που ελέγχει τη νόσο και β) πληθυσμιακές μελέτες για την αποκάλυψη συσχέτισης μεταξύ των HLA αντιγόνων και της νόσου, συγκρίνοντας τη συχνότητα τους σε ασθενείς με την αντίστοιχη συχνότητα σε υγιείς μάρτυρες (Dyer και Middleton 1993).

Η HLA τυποποίηση εφαρμόστηκε σ' ένα μεγάλο αριθμό παθήσεων. Αρχικά, εξετάστηκαν τα HLA-A και HLA-B αντιγόνα, με την πρόοδο όμως της HLA-DR τυποποίησης φάνηκε ότι στην πλειοψηφία των παθήσεων η

συσχέτιση ήταν εντονότερη με τα HLA-DR απ' ό τι με τα HLA-A ή -B αντιγόνα (Tiwari και Terasaki 1985). Σε αρκετές μάλιστα παθήσεις είναι δύσκολο να βεβαιώσει κανείς την HLA γονιδιακή θέση που ενέχεται για τη συσχέτιση, λόγω της διαταραχής ισορροπίας σύνδεσης (linkage disequilibrium) μεταξύ των γονιδιακών θέσεων. Εκτός από τη συσχέτιση της αγκυλοποιητικής σπονδυλαρθρίτιδας με το HLA-B27, οι υπόλοιπες αφορούν τα HLA τάξης II. Η ισχυρότερη συσχέτιση βρέθηκε σε ασθενείς με ναρκοληψία και αφορά το HLA-DR2, ακολουθεί ο ινσουλινοεξαρτώμενος σακχαρώδης διαβήτης τύπου I με τα HLA-DR3 και -DR4 και η ρευματοειδής αρθρίτιδα με το HLA-DR4 και λιγότερο συχνά με τα DR1 και DR10 (Lechler 1994).

Η έρευνα για τη συσχέτιση των HLA αντιγόνων με τις διάφορες παθήσεις έδειξε ότι οι περισσότερες από αυτές είναι αυτοάνοσης αιτιολογίας. Ωστόσο, οι μηχανισμοί που ενέχονται δεν έχουν γίνει μέχρι σήμερα φανεροί. Οι διάφορες υποθέσεις που έχουν γίνει συστηματοποιούν τους προτεινόμενους μηχανισμούς σε τέσσερις ομάδες. Πρώτον, τα HLA μόρια δρουν ως υποδοχείς των αιτιολογικών παραγόντων των συσχετιζόμενων παθήσεων. Δεύτερον, η σχισμοειδής θήκη ενός και μόνον HLA μορίου μπορεί να δεχτεί το επεξεργασμένο κομμάτι του αντιγονικού πεπτιδίου που τελικά είναι υπεύθυνο για την πρόκληση της πάθησης. Τρίτον, τα γονίδια που ενέχονται για την προδιάθεση στη νόσο, δεν είναι τα HLA γονίδια, αλλά πιθανότερο τα γονίδια που κωδικοποιούν τις α και β αλυσίδες του T- κυτταρικού υποδοχέα. Δεδομένου ότι ο T-κυτταρικός υποδοχέας αναγνωρίζει ένα σύμπλεγμα, αυτό του ειδικού αντιγονικού πεπτιδίου (υπεύθυνου για την προδιάθεση στη νόσο) με ένα HLA μόριο, η HLA συσχέτιση θεωρείται μάλλον έμμεση. Τέλος η τέταρτη υπόθεση που ορίζεται και ως "μοριακός μιμητισμός", προτείνει ότι το HLA αντιγόνο που συσχετίζεται με τη νόσο είναι ανοσολογικά όμοιο με τον αιτιολογικό παράγοντα της νόσου. Εξαιτίας της ομοιότητας αυτής είτε καμία ανοσιακή απάντηση δεν ξεκινά, οπότε ο αιτιολογικός παράγοντας δρα ανενόχλητος, είτε μια ισχυρή ανοσιακή απάντηση έναντι του αιτιολογικού παράγοντα αρχίζει, οπότε λόγω της προαναφερθείσας ομοιότητας η ανοσιακή

απάντηση στρέφεται και κατά του HLA αντιγόνου. Η αυτοάνοση απάντηση καταλήγει στην εμφάνιση της νόσου (Schwartz 1992).

Η συνήθης μέτρηση της έντασης μιας συσχέτισης είναι ο σχετικός κίνδυνος (Relative Risk, RR) που ορίζεται ως η πιθανότητα να εμφανίσει τη νόσο κάποιο άτομο που φέρει το συσχετιζόμενο με τη νόσο HLA αντιγόνο σε σχέση με εκείνο που δεν το φέρει. Ο σχετικός κίνδυνος (Σ.Κ) υπολογίζεται από τον τύπο $\Sigma.Κ = (A+ \times M-) / (A- \times M+)$ όπου A+ ο αριθμός των ασθενών που φέρουν το αντιγόνο, M- ο αριθμός των υγιών μαρτύρων που δεν το φέρουν, A- ο αριθμός των ασθενών που δεν το φέρουν και M+ ο αριθμός των υγιών μαρτύρων που φέρουν το αντιγόνο (Woolf 1955). Σχετικός κίνδυνος κοντά στη μονάδα (1,0) υποδηλώνει ότι τα άτομα που φέρουν το αντιγόνο δεν έχουν αυξημένο κίνδυνο να εμφανίσουν τη νόσο (αρνητική συσχέτιση), ενώ σχετικός κίνδυνος μεγαλύτερος από τη μονάδα συνεπάγεται αυξημένο κίνδυνο γι' αυτούς που φέρουν το αντιγόνο να εμφανίσουν τη νόσο (θετική συσχέτιση).

Οι τεχνικές της μοριακής βιολογίας έδωσαν νέα ώθηση στις μελέτες των HLA αντιγόνων και τις συσχετιζόμενες παθήσεις. Οι τεχνικές αυτές εξάλειψαν τα μειονεκτήματα της ορολογικής τυποποίησης, επιτρέποντας μεγαλύτερη ασφάλεια στις πιθανολογούμενες συσχετίσεις. Επίσης παρέχουν τη δυνατότητα ανίχνευσης και άλλων HLA γονιδιακών θέσεων όπως των HLA-DQ και -DP, εξασφαλίζοντας με αυτόν τον τρόπο τη συμμετοχή ολόκληρου του HLA απλότυπου στη συσχέτιση με τα διάφορα νοσήματα.

4. Άλλες εφαρμογές της HLA τυποποίησης

4.1 Φυλογενετική ανάλυση πληθυσμών

Ο όρος φυλογενετική ανάλυση πληθυσμών σημαίνει τον προσδιορισμό των φυλετικών τύπων και τον καθορισμό των προσμίξεων μιας ομάδας ανθρώπων και επομένως την ανάλυση της εξελικτικής του ιστορίας (Πολυμενίδης 1987). Οι μέθοδοι που χρησιμοποιούνται για τη

φυλογενετική ανάλυση είναι: 1) η ιστορική, 2) η γλωσσολογική και 3) οι ανθρωποβιολογικές (Πολυμενίδης 1978). Ο προσδιορισμός των HLA αντιγόνων αποτελεί την κυριότερη βιολογική μέθοδο της φυλογενετικής ανάλυσης και μόνος του υπερκαλύπτει όλες τις άλλες εξετάσεις λόγω του εξαιρετικά μεγάλου πολυμορφισμού του συστήματος.

Η HLA περιοχή έχει το προνόμιο να παράγει νέες ποικιλίες αντιγόνων με δύο κυρίως μηχανισμούς: 1) τη μετατροπή γονιδίου (gene conversion) και τη μετάλλαξη σημείου (point mutation). Σύμφωνα με τον πρώτο, μέρος της αλληλουχίας των βάσεων από ένα γονίδιο μπορεί να μεταφερθεί σε ένα άλλο, ενώ με τον δεύτερο μηχανισμό ένα ζεύγος βάσεων ενός γονιδίου αντικαθίσταται από ένα άλλο. Αποτέλεσμα των μηχανισμών αυτών είναι η συνεχής γένεση νέων HLA αλληλίων και η επέκταση του πολυμορφισμού του συστήματος. Επιπλέον, δεδομένης της θετικής διαταραχής ισορροπίας σύνδεσης μεταξύ των HLA DR και DQ γονιδιακών θέσεων φαινόμενα ανασυνδυασμού είναι αναμενόμενα μεταξύ DQB1 και DQA1, DQA1 και DRB1, DRB1 και DRB3, DRB1 και DRB5 γονιδίων, με αποτέλεσμα τη γένεση ενός "δευτέρου βαθμού" πολυμορφισμού σε επίπεδο απλοτύπων (So 1994). Επίσης, λαμβάνοντας υπόψη τον σημαντικό ρόλο των HLA γονιδίων στην αντίδραση των ατόμων σε μερικούς μικροοργανισμούς, στην απόρριψη του μοσχεύματος και στην ευαισθησία σε διάφορα νοσήματα, η γνώση του γενετικού πολυμορφισμού των HLA γονιδίων παρουσιάζει μεγάλο επιστημονικό ενδιαφέρον. Η εμφάνιση της DNA τυποποίησης παρείχε τεχνικές μεγάλης ευαισθησίας και ακρίβειας, πλεονεκτήματα απαραίτητα για την αποκάλυψη του HLA πολυμορφισμού.

4.2 HLA και έλεγχος πατρότητας

Τα HLA αντιγόνα κληρονομούνται με γνωστό και σταθερό τρόπο, εμφανίζονται από τη γέννηση, παραμένουν σταθερά σε όλη τη ζωή και ελέγχονται με σταθερές και επαναλήψιμες μεθόδους. Ως εκ τούτου η προσθήκη του HLA συστήματος στα ήδη χρησιμοποιούμενα συστήματα ελέγχου πατρότητας (αντιγόνα και ένζυμα ερυθροκυττάρων, πρωτεΐνες

ορού) διαφωτίζει τις περιπτώσεις αμφισβητούμενης πατρότητας σε ποσοστό 99%. Από τις γονιδιακές θέσεις, του HLA απλοτύπου χρησιμοποιούνται κυρίως οι A και B και με βάση αυτές έχουν γίνει οι μέχρι σήμερα συγκρίσεις με τα άλλα συστήματα. Με την εφαρμογή των μοριακών τεχνικών ανίχνευσης των HLA αντιγόνων έγινε δυνατή η αναγνώριση με μεγάλη ακρίβεια και άλλων γονιδιακών θέσεων (DRB, DQA, DQB, DPB), με αποτέλεσμα οι πιθανότητες αποκλεισμού πατρότητας από τη χρήση του συστήματος HLA και μόνον, να είναι ίσες ή και περισσότερες από τις πιθανότητες συνδυασμού όλων των υπόλοιπων συστημάτων ελέγχου της πατρότητας.

Συνοψίζοντας, η λεπτομερής γνώση του HLA συστήματος που προκύπτει από τις μοναδικές ιδιότητες των προϊόντων του, όπως ο εκτεταμένος πολυμορφισμός τους, ο πλούσιος βιολογικός τους ρόλος και οι πολυάριθμες μέθοδοι ανίχνευσης τους, μπορεί αναμφίβολα να θεωρηθεί ως μία προφανής "γέφυρα" μεταξύ των βασικών επιστημών και της κλινικής πράξης.

ΦΥΛΟΓΕΝΕΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΠΛΗΘΥΣΜΩΝ

ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΓΕΝΕΤΙΚΩΝ ΔΕΙΚΤΩΝ ΣΕ ΠΛΗΘΥΣΜΙΑΚΕΣ ΜΕΛΕΤΕΣ

1. Εισαγωγή

Οι μεταναστεύσεις των διαφόρων πληθυσμιακών ομάδων μέχρι την τελική οριοθέτηση των συνόρων τους και οι ιδιαιτερότητες που χαρακτηρίζουν τις μετακινήσεις αυτές στο χώρο και το χρόνο, επηρεάζουν σημαντικά τη γενετική δομή των πληθυσμών αυτών. Φυλογενετική, λοιπόν, ανάλυση ενός πληθυσμού είναι η προσπάθεια επανασύνθεσης της εξελικτικής του πορείας, ενώ τα γενετικά δεδομένα που προκύπτουν, αποτελούν απαραίτητη προϋπόθεση για μια πιο ολοκληρωμένη γνώση της ιστορίας των διαφόρων πληθυσμών (Cavali-Sforza L. *Phylogenetic analysis: Histocompatibility testing*. Munksgaard, Copenhagen, 17, 1972).

Οι μέθοδοι που χρησιμοποιούνται στη μελέτη των ανθρώπινων φυλών, είναι κυρίως η ιστορική, η γλωσσολογική και η ανθρωποβιολογική. Οι δύο τελευταίες αφορούν ανθρωπολογικές προσεγγίσεις (ανθρωποσκοπικές, ανθρωπομετρικές) και ιδιαίτερα βιολογικές, που ασχολούνται με τη μελέτη γενετικών συστημάτων, όπως π.χ. των αντιγονικών συστημάτων των ερυθρών αιμοσφαιρίων, ενζύμων, πρωτεϊνών του ορού καθώς και των αντιγόνων του Μείζονος Συμπλέγματος Ιστοσυμβατότητας (MHC), ενός από τα πιο πολύμορφα γενετικά συστήματα του ανθρώπου.

Οι συχνότητες των γονιδίων (*gene frequencies*), καθώς και οι συχνότητες των αλληλίων των παραπάνω γενετικών συστημάτων, παρουσιάζουν ποσοτικές διακυμάνσεις μεταξύ των διαφόρων πληθυσμών και συσχετίζονται άμεσα με το είδος των μεταναστεύσεων (ατομικές ή μαζικές) και με την τυχόν εμφάνιση «δημογραφικής έκρηξης» (*demic expansion*), φαινομένου που χαρακτηρίζει τις μαζικές μετακινήσεις και κατά το οποίο παρατηρείται αχαλίνωτη αύξηση του πληθυσμού και φυσικά και των γονιδίων.

Εκτός από τις μεγάλες μεταναστεύσεις των φυλών, στο χώρο και στο χρόνο, οι μεταλλάξεις, η φυσική επιλογή και η τυχαία γενετική μεταστροφή (random genetic drift) είναι οι μεγάλες δυνάμεις της εξέλιξης. Όλα τα υπαρκτά αλληλία είναι αποτέλεσμα μεταλλάξεων και η συχνότητα, με την οποία αυτά εμφανίζονται, είναι 1 ανά 10.000 γαμέτες ανά γενεά και ανά γενετικό τόπο (locus). Όταν πολλαπλές μεταλλάξεις αφορούν τον ίδιο γενετικό τόπο, συσχετίζονται με μαζικές μετακινήσεις λαών και η γεωγραφική τους κατανομή ενδεχομένως καθορίζει την περιοχή, από την οποία άρχισε η μετανάστευση καθώς και τη φορά της. (Piazza A. Blood genetic markers. Their use for studying migrations. In: Ohayon E., Cambon – Thomsen A (eds) Human population genetics. Colloque INSERM 142:75, 1987).

Η φυσική επιλογή διαφέρει από τις άλλες δυνάμεις της εξέλιξης στο ότι αυτή αποτελεί το μοναδικό επίκτητο αλλά συγχρόνως και ταχύτερο μηχανισμό δράσης στην εξελικτική πορεία των ειδών. Σε αντίθεση με τη μετανάστευση που επιδρά σε όλα τα γονίδια, η φυσική επιλογή επιδρά σε μικρό αριθμό γονιδίων. Σε ένα τέτοιο πρότυπο, ένας «επιθυμητός» γονότυπος είναι 10% συχνότερος από τον «αναμενόμενο», ενώ ο χρόνος που απαιτείται για την αύξηση του από 10% έως 90%, είναι περίπου 30 γενεές. Από τις διάφορες παρατηρήσεις που έχουν γίνει στον τομέα αυτό, προκύπτει ότι η φυσική επιλογή επηρεάζει κάθε γονίδιο με διαφορετικό τρόπο, ανάλογα με το φυσικό περιβάλλον, ενώ η μετανάστευση έχει την ίδια επίδραση σε όλα τα γονίδια. Όπως είναι επόμενο, οι παρατηρήσεις αυτές βοήθησαν τελικά στην ανάπτυξη μεθόδων που διαχωρίζουν τη γενετική διαφοροποίηση από τη μετακίνηση των πληθυσμών και από τη φυσική επιλογή.

Σε ορισμένες, όμως, περιόδους της Ιστορίας, σε ορισμένες γεωγραφικές περιοχές και σε πληθυσμούς «κλειστούς» παρατηρούνται τυχαίες διακυμάνσεις της συχνότητας των γονιδίων σχεδόν σε κάθε γενεά και αυτό αποτελεί τον κανόνα και όχι την εξαίρεση. Αυτή η γενετική μεταστροφή αφορά στον ίδιο βαθμό όλα τα γονίδια και εξαρτάται από το εύρος του πληθυσμού. Ένας εμπειρικός τρόπος διαχωρισμού της γενετικής

μεταστροφής από τη μετακίνηση ενός πληθυσμού, είναι η διαπίστωση του βαθμού του ετεροζυγωτισμού (που καθορίζει και το βαθμό του πολυμορφισμού) στον πληθυσμό αυτό. Ο ετεροζυγωτισμός αυξάνεται στις μετακινήσεις των πληθυσμών και μειώνεται σημαντικά στους κλειστούς πληθυσμούς, στους οποίους υπερισχύει η γενετική μεταστροφή. Ενδεχομένως η ισορροπία μεταξύ των δύο αυτών δυνάμεων της εξέλιξης να εξηγεί τη σταθερότητα της γενετικής διαφοροποίησης στο χρόνο. Τέλος, η ανασύνθεση της ιστορίας της εξέλιξης, με βάση τα γενετικά δεδομένα, στηρίζεται και στο αξίωμα ότι η «διάσταση» μεταξύ δύο πληθυσμών αυξάνεται με το διαχωρισμό τους στο χρόνο. Είναι, λοιπόν, απαραίτητο να συνυπολογισθεί με τις άλλες γενετικές παραμέτρους και η γενετική απόσταση (genetic distance), η οποία είναι ανάλογη με το χρόνο του διαχωρισμού των υπό έλεγχο πληθυσμιακών ομάδων. (Ammerman AJ, Cavalli-Sforza L. Measuring the rate of spread of early farming in Europe. *Man* 6:674, 1971).

2. Η σημασία της κατανομής των γονιδίων του MHC σε πληθυσμιακές μελέτες

Το MHC έχει μεγάλο ενδιαφέρον για τους ανθρωπολόγους και τους γενετιστές για δύο βασικές του ιδιότητες: για το μεγάλο του πολυμορφισμό και για την ύπαρξη μεγάλου αριθμού γονιδίων στενά συνδεδεμένων μεταξύ τους, τα οποία στον άνθρωπο εδράζονται στο χρωμόσωμα 6. Ο πολυμορφισμός του MHC, που βασικά προσδιορίζεται με ορολογικές μεθόδους, είναι πολύ μεγάλος. Για παράδειγμα, στους γενετικούς τόπους HLA-A, B και C, με τη νέα ονοματολογία καθορίζονται 20, 30 και 11 αλληλία, αντίστοιχα. Αυτός ο ορολογικά καθοριζόμενος πολυμορφισμός πολλαπλασιάζεται, όταν συνυπολογισθούν τα «κοινά» (public) αντιγόνα, που ελέγχονται με μονοδυνάμους ορούς ή με μονοκλωνικά αντισώματα. Ο πολυμορφισμός γίνεται μεγαλύτερος, όταν η μελέτη αφορά τη δομή των μορίων. Έτσι, με τη μέθοδο της ισοηλεκτρικής εστίασης έχουν προσδιορισθεί για τα τάξης I αντιγόνα, δηλαδή για τα HLA-A, B και C 34, 59

και 11 υποομάδες. Ορισμένες από τις υποομάδες αυτές ενδέχεται να αντιστοιχούν σε υποτύπους που έχουν διαφορετική δράση, όπως είναι οι 6 υπότυποι του B27 και οι οποίοι αναγνωρίζονται με βιοχημικές μεθόδους και T κυτταροτοξικούς κυτταρικούς κλώνους. Με την ίδια μεθοδολογία, αποκαλύπτεται ένας μεγάλος πολυμορφισμός και για τα τάξης II γονίδια. Ο πολυμορφισμός των γονιδίων τάξης II, είναι ποσοτικός όσον αφορά την έκφραση μιας ή περισσοτέρων αλυσίδων των υποτύπων HLA-DR, αλλά και ποιοτικός, που αποτελεί μια ιδιαιτερότητα των γονιδίων αυτών και αφορά τις αλυσίδες DRβ, DQα και β και DPα. Ακόμη περισσότερες πληροφορίες στο επίπεδο του πολυμορφισμού των γονιδίων του MHC συγκεντρώνονται με τη μελέτη του πολυμορφισμού περιορισμένου μήκους τμημάτων του DNA (restriction fragment length polymorphism - RFLP). Τέλος, με τη γνώση της αλληλουχίας των νουκλεοτιδίων των κωδικοποιημένων και μη περιοχών του συστήματος, συγκεντρώνονται πια όλες οι πληροφορίες για τον πολυμορφισμό του. (Angelini G. De Preval C., Gorski J, Mach B. High – resolution analysis of the human HLA-DR polymorphism by hybridization with sequence-specific oligonucleotide probes. Proc Natl Acad Sci USA 83:4489, 1986). Για τους ανθρωπολόγους, έχει μεγάλη σημασία ο βαθμός του πολυμορφισμού και όλες οι παρατηρούμενες διαφοροποιήσεις του, γιατί, σε συνδυασμό με ορισμένους άλλους δείκτες, αποτελεί σημαντική πηγή πληροφοριών για τους υπό μελέτη πληθυσμούς.

Το δεύτερο ενδιαφέρον στοιχείο είναι οι δεσμοί συνοχής των διαφόρων γονιδίων του συστήματος ιστοσυμβατότητας HLA. Στην περιοχή HLA εδράζεται ένας μεγάλος αριθμός πολυμόρφων γονιδίων. Τα HLA-A, B, C καθώς και τα γονίδια των παραγόντων C2, C4A, C4B, BF του συμπληρώματος, γονίδια του TNF (Tumor Necrosis Factor), της 21-υδροξυλάσης (21-OH) και ένας αξιοσημείωτος αριθμός τάξης II γονιδίων. Τελευταία, πλησίον του γενετικού τόπου HLA-A, έχουν ανακαλυφθεί νέα γονίδια με δομή παρόμοια με εκείνη των τάξης I γονιδίων και με μεγάλο πολυμορφισμό.

Αν και ορισμένα γονίδια έχουν μικρότερο βαθμό πολυμορφισμού (21-OH, C2, DRA), ο αριθμός των συνδυασμών των διαφόρων αλληλίων

του συστήματος είναι τεράστιος, με απλοτυπικούς συνδυασμούς που ανέρχονται σε 363.216 και γονοτυπικούς που φθάνουν τους $6,48 \times 10^{10}$. (Degos L. La repartition anthropologique des genes HLA et la dynamique des populations: HLA Complexe majeur d'histocompatibilité de l'homme. Flammarion médecine-sciences 101, 1986). Εντούτοις, σε μερικούς πληθυσμούς παρατηρούνται ορισμένοι συνδυασμοί αλληλίων συχνότερα από ό,τι αναμένεται, ως ένα είδος συνδυασμών «προτίμησης». Το φαινόμενο αυτό ονομάζεται διαταραχή της ισορροπίας συνδέσεως των γονιδίων (linkage disequilibrium) και αποτελεί ένα νέο πεδίο έρευνας για τους γενετιστές, στην προσπάθεια τους να εξηγήσουν τα κληρονομικά γενετικά δεδομένα αρχέγονων πληθυσμών. Αυτό συμβαίνει κυρίως, όταν ο χρόνος δεν επαρκεί για τους απαραίτητους ανασυνδυασμούς των γονιδίων που αποκαθιστούν μια γενετική ισορροπία, σε σχέση με παράγοντες που καταργούν την ισορροπία αυτή, όπως είναι η φυσική επιλογή, η μετανάστευση και η «απομόνωση» των πληθυσμών. Αυτή, λοιπόν, η περιοχή του χρωμοσώματος 6 του ανθρώπου επιτρέπει να διερευνηθεί σε βάθος η γενετική ιστορία της ανθρωπότητας. (Piazza A. Haplotype and linkage disequilibria from the three-locus phenotypes. Histocompatibility Testing. Munksgaard, Copenhagen, 932, 1975).

3. Γεωγραφική κατανομή των HLA αλληλίων

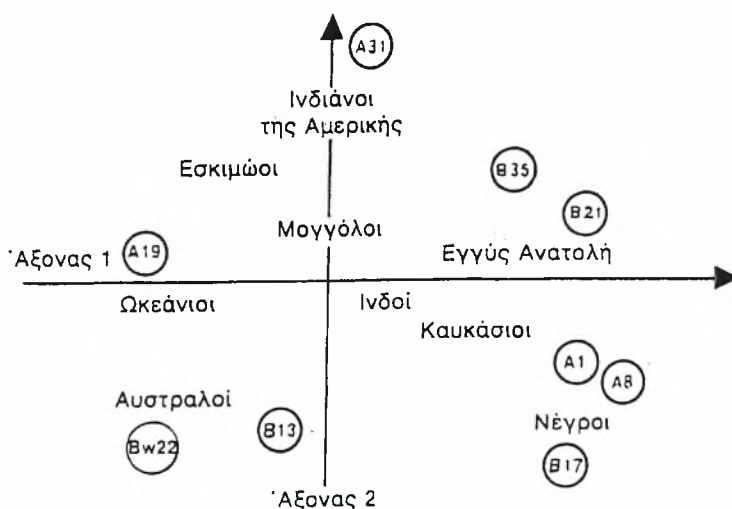
Οι ποιοτικές και ποσοτικές διαφορές στη γεωγραφική κατανομή των αλληλίων του συστήματος HLA αναλύθηκαν συστηματικά στο 5ο Διεθνές Workshop Ιστοσυμβατότητας του 1972, το οποίο ασχολήθηκε αποκλειστικά με ανθρωπολογικές μελέτες με βάση τα αντιγόνα ιστοσυμβατότητας 54 διαφορετικών πληθυσμών και τα εργαστήρια που έλαβαν μέρος σ' αυτό, χρησιμοποίησαν κοινά βιολογικά υλικά. (Dauset J., Colombani J. Report of an International Workshop and Conference. Evian, France 1972. In: Histocompatibility testing. Munksgaard, Copenhagen 1972). Τα ευρήματα του Workshop αλλά και πρόσφατα δεδομένα απέδειξαν ότι συγκεκριμένα αλληλία ανευρίσκονται συχνότερα σε ορισμένους πληθυσμούς, όπως στους

Νέγρους τα HLA-AW36, HLA-AW43, HLA- BW42 και HLA-DRW18 και στους Μογγόλους τα HLA-46, HLA-BW76, HLA-BW77, HLA-B54, HLA-BW59 και HLA-CW11. Στους Καυκάσιους παρατηρείται το HLA-A1 και σε ολόκληρη την περιοχή της Μεσογείου το HLA-B21.

Οι ποσοτικές διαφορές βασίζονται σε υπολογισμούς που αφορούν τη συχνότητα των γονιδίων (gene frequency) και τη γενετική απόσταση (genetic distance) μεταξύ των πληθυσμών. Έχουν προταθεί, κατά καιρούς, διάφοροι τρόποι υπολογισμού αυτών των παραμέτρων, εκτός των κλασικών μεθόδων των Cavalli -Sfortza και Edwards (1967) και των Balakrishnan και Sanghvi (1968). Οι μέθοδοι αυτές καθορίζουν τη συχνότητα των διαφόρων αλληλίων του HLA και τα ανακατανέμουν. Αυτές οι ανακατανομές είναι επακόλουθο των μεταναστεύσεων των πληθυσμιακών ομάδων και εξαρτώνται από τις γενετικές και γεωγραφικές των αποστάσεις. (Greenacre MJ, Degos L. Corespondance analysis of HLA gene frequency data from 124 population samples. *Am J Hum Genet* 29:60, 1977), (Piazza A. The genetic data from the French provinces. A tentative summary. In: Ohayon E., Cambon – Thomsen A (eds) *Human population genetics. Colloque INSERM 142*, 1987). Ορισμένοι ερευνητές κατόρθωσαν με βάση τις γενετικές αποστάσεις να συνθέσουν τα φυλογενετικά δένδρα, λαβαίνοντας υπόψη τις τυχόν ομοιότητες μεταξύ των λαών. (Piazza A., Viganotti C. Evolutionary trees and HLA-A polymorphism. *Histocompatibility testing*. Munksgaard, Copenhagen, 731, 1972). Αυτά τα φυλογενετικά δένδρα ερμηνεύονται με ορισμένες επιφυλάξεις, επειδή και άλλες παράμετροι, που ενδεχομένως ποικίλλουν τις συχνότητες των γονιδίων, θα έπρεπε να ληφθούν υπόψη, όπως είναι η επιλογή, η αύξηση ενός πληθυσμού και η μετανάστευση. Με βάση τα γονίδια των γενετικών τόπων HLA-A και B, ο κόσμος χωρίζεται σε δύο υποθετικούς άξονες: αφενός υπάρχουν οι Καυκάσιοι με τους Νέγρους και αφετέρου οι Μογγολοειδείς (Ινδιάνοι της Αμερικής, Ανατολίτες) με τους Αυστραλούς. Η ταξινόμηση αυτή, που αφορά τους δύο άξονες, βασίστηκε σε πολυπαραγοντική ανάλυση (εικ. 1). Για έναν τρίτο άξονα, οι συσχετισμοί είναι διαφορετικοί, με παράλληλους συσχετισμούς των Ινδιάνων της Αμερικής με τους

Καυκάσιους και των Νέγρων με πληθυσμούς της Ανατολής. Οι συσχετισμοί που αφορούν τους δύο κεντρικούς άξονες, έχουν επιτευχθεί με τη βοήθεια και άλλων δεικτών και αφορούν διαφορές στη γενετική δομή των φυλών που έχουν ως αποτέλεσμα ένα διαχωρισμό Ανατολής-Δύσης. Ένας άλλος συσχετισμός που πηγάζει από τα αποτελέσματα του τρίτου άξονα και που βασίζεται κυρίως σε ανθρωπομετρικές μεθόδους, αναφέρεται στη φυσική επιλογή (ύψος, μεταβολές κρανίου κ.λπ.) και σε κλιματολογικές διαφορές, με αποτέλεσμα το διαχωρισμό Βορρά - Νότου. Ο γενετικός τόπος HLA- DR ακολουθεί τον τελευταίο διαχωρισμό και γι' αυτό αποτελεί ένα μοντέλο φυσικής επιλογής πολύ καλύτερο απ' ό,τι οι γενετικοί τόποι HLA-A και B.

Από πολυπαραγοντικές αναλύσεις, με τις οποίες γίνεται αντιληπτός ο τρόπος κατανομής των γονιδίων HLA-A και B σε ολόκληρο τον κόσμο, και λαβαίνοντας υπόψη ότι οι διαφορές που ακολουθούν το γεωγραφικό μήκος

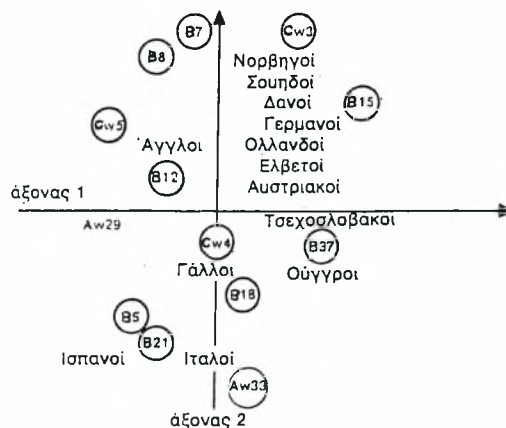


Εικόνα 1. Πολυπαραγοντική ανάλυση των συχνοτήτων των γονιδίων των HLA-A και B στους πληθυσμούς της γης

οφείλονται σε μεταναστεύσεις πληθυσμών, ενώ οι διαφορές που ακολουθούν το γεωγραφικό πλάτος οφείλονται και σε μεταναστεύσεις αλλά και στη φυσική επιλογή, θεωρείται ότι οι μεταναστεύσεις αποτελούν το 88% της διαφοροποίησης, ενώ μόνο μικρό ποσοστό (12%) των ποικιλιών ανάγονται στη φυσική επιλογή. Αυτοί βέβαια οι αφορισμοί είναι αρκετά πρώιμοι, επειδή δεν είναι γνωστά όλα τα γονίδια των Νέγρων, Μογγολοειδών

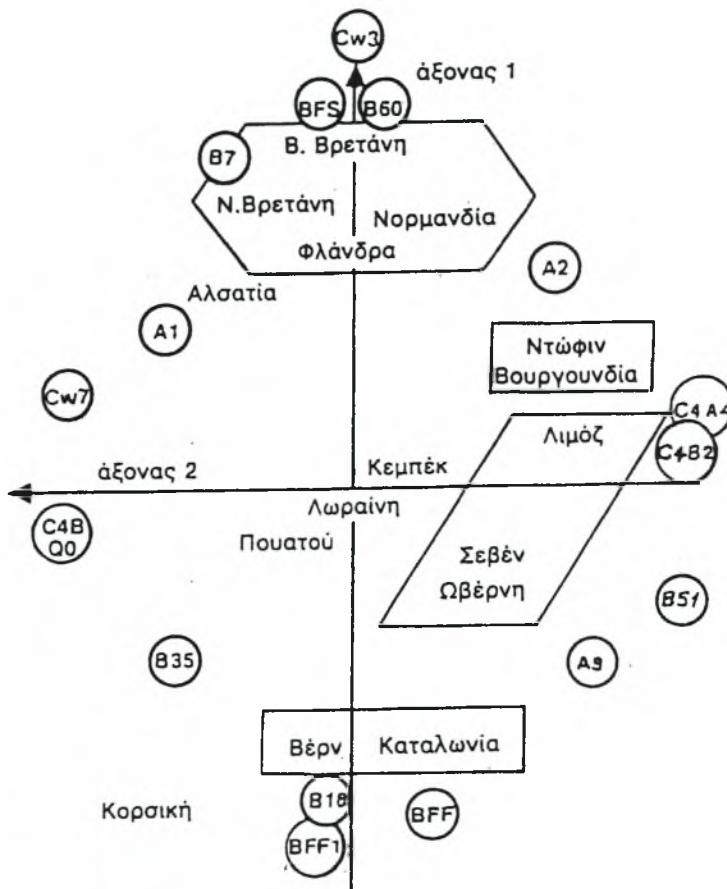
και Αυστραλών και ούτε όλα τα γονίδια της περιοχής HLA-D.

Στην Ευρώπη, με δεδομένα που βασίζονται στο σύστημα ιστοσυμβατότητας HLA αλλά και σε άλλα γενετικά συστήματα (Rhesus, ABO, ένζυμα κ.λπ.), καθορίστηκαν, οι γενετικές διαφορές στις διάφορες περιοχές, με τη βοήθεια πολυπαραγοντικής ανάλυσης. Έτσι, στη Δυτική Ευρώπη, οι αποστάσεις μεταξύ των πληθυσμών υπολογίζονται με βάση τις συχνότητες των γονιδίων του HLA και είναι πρακτικά ταυτόσημες των γεωγραφικών αποστάσεων (εικ. 2). (Greenacre MJ, Degos L. Correspondance analysis of HLA gene frequency data from 124 population samples. *Am J Hum Genet* 29:60, 1977). Μια περισσότερο εμπειριστατωμένη μελέτη σε όλη την Ευρώπη, που περιλάμβανε 21 αλληλία HLA και 17 μη HLA γονίδια, επέτρεψε την ανασύνθεση των γενετικών διαφορών των πληθυσμών αυτών. (Piazza A., Viganotti C. *Evolutionary trees and HLA-A polymorphism. Histocompatibility testing*. Munksgaard, Copenhagen, 731, 1972). Η παραπάνω μελέτη αποδεικνύει ότι το σύστημα ιστοσυμβατότητας HLA έχει από μόνο του επάρκεια για τον καθορισμό αυτών των διαφορών. Επίσης, εξηγεί το συσχετισμό των γενετικών διαφορών σε σχέση με την προώθηση της γεωργίας στην Ευρώπη, ξεκινώντας από την εγγύς Ανατολή 9.000 χρόνια π.Χ. και φθάνοντας μέχρι τη Δυτική Ευρώπη 5.000 π.Χ., με μια πρόοδο στη μετακίνηση 1 km το χρόνο και με κυκλική φορά. Από τη μελέτη του τρόπου μεταβίβασης των γεωργικών, γνώσεων και των γενετικών διαφορών των λαών στο χώρο που



Εικόνα 2. Πολυπαραγοντική ανάλυση των συχνοτήτων των γονιδίων των HLA-A, B και C στους ευρωπαϊκούς πληθυσμούς

έγινε αυτή η μεγάλη τροφοπαραγωγική μετακίνηση, συμπεραίνεται ότι η επέκταση της καλλιέργειας έγινε περίπου ταυτόχρονα με τη μετανάστευση του ανθρώπου και όχι με τη μετάδοση των μέσων της καλλιέργειας. Τέλος, οι Menozzi et al (1978) ήταν οι πρώτοι που διατύπωσαν τη θεωρία ότι εκτός από τους τρεις κύριους άξονες είναι πολύ πιθανή η ύπαρξη και ενός άξονα Βορρά-Νότου, ο οποίος όμως θα αντιπροσωπεύει μια φυσική επιλογή που θα οφείλεται σε κλιματολογικά κυρίως αίτια προωθώντας τις ποικιλίες των συχνοτήτων ορισμένων μόνον αντιγόνων. Τελευταία, έγινε μια πολύ εμπειριστατωμένη μελέτη της γαλλικής επαρχίας, με έλεγχο 1382 οικογενειών (5500 απλότυποι HLA) διασκορπισμένων σε 15 γαλλικές περιοχές, και στο Κεμπέκ του Καναδά, με έλεγχο 300 γενετικών δεικτών, δημιουργώντας με τον τρόπο αυτό μια τράπεζα πληροφοριών μοναδική στον κόσμο (εικ. 3).



Εικόνα 3. Πολυπαραγοντική ανάλυση των συχνοτήτων των γονιδίων των HLA-A, B, C, DR, BF, C4A στη Γαλλία

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι υπάρχουν αντιγονικές διαφορές, ιδιαίτερα σε ορισμένες περιοχές, όπως π.χ. μεγάλη αύξηση του DR4 στη Βρετάνη ή μεγάλη αύξηση του DR5 στα νοτιοανατολικά και στην Κορσική, μεγάλες διαφορές μεταξύ Αλσατίας και Λωραίνης και μεγάλες ομοιότητες μεταξύ Βρετάνης, Νορμανδίας και Φλάνδρας. Μέσα από μια πολυπαραγοντική ανάλυση, ο πρώτος άξονας διαχωρίζει το Βορρά από το Νότο (Βρετάνη, Νορμανδία, Φλάνδρα, Μπερν και Καταλονία αντίστοιχα) ο δεύτερος άξονας αφορά ορισμένες κεντρικές περιοχές, όπως Βέρνη, Βουργουνδία κ.λπ. Τέλος, το Κεμπέκ πλησιάζει γενετικά προς το Πουατού, στο κέντρο περίπου, όπου διασταυρώνονται οι δύο άξονες (Cambon-Thomsen A, Ohayon E. Province francaises. In: Ohayon E, Cambon – Thompsen A (eds) Human population genetics, Colloque INSERM 142, 1987).

4. Δυναμική πληθυσμών

4.1. Συχνότητα απλοτύπων και διαταραχή ισορροπίας συνδέσεως των γονιδίων

Ο συνδυασμός ενός αλληλίου κάποιου γενετικού τόπου (Aa) με ένα αλληλίο ενός άλλου γενετικού τόπου (Bb) ονομάζεται απλότυπος. Οι δυνατοί συνδυασμοί των αλληλίων αυτών είναι οι AB, Ab, aB και ab, με αντίστοιχες συχνότητες χ_1 , χ_2 , χ_3 και χ_4 . Οι συνδυασμοί αυτοί των αλληλίων καμιά φορά είναι πολύ δυνατοί και περισσότερο συχνοί απ' ό,τι αναμένεται. Αυτή είναι η έννοια της διαταραχής της ισορροπίας συνδέσεως των αλληλίων (linkage disequilibrium) ή Δ , το οποίο πολύ συχνά καθορίζει έναν πληθυσμό. Το Δ δεν περιορίζεται μόνο σε δύο γενετικούς τόπους αλλά τους αφορά όλους, δηλαδή από το HLA-A έως το HLA-DP και την GLO, έτσι ώστε ολόκληρη η περιοχή του χρωμοσώματος 6 να είναι σε Δ .

Η διαταραχή της ισορροπίας συνδέσεως ή Δ ορίζεται από τον τύπο:

$$\Delta = \chi_1 \cdot \chi_4 - \chi_2 \cdot \chi_3$$

Όταν δύο γενετικοί τόποι είναι στενά συνδεδεμένοι μεταξύ τους πάνω στο ίδιο χρωμόσωμα, η πιθανότητα PAB ενός αλληλίου A του πρώτου

γενετικού τόπου και ενός αλληλίου B του δεύτερου γενετικού τόπου ισούται με τις συχνότητες των γονιδίων των A και B τόπου, δηλαδή:

$$PAB = PA \times PB$$

Ο προσδιορισμός των απλοτυπικών συχνοτήτων είναι απαραίτητος για τον έλεγχο της ύπαρξης ισορροπίας σύνδεσης των αλληλίων. Όταν, όμως, δεν υπάρχει η αναμενόμενη ισορροπία, παρατηρείται εμφάνιση του Δ μεταξύ των δύο αλληλίων, που ισούται με: (Degos L. 1986).

$$\Delta = PAB - (PA \times PB)$$

Η εμφάνιση μιας έντονης διαταραχής της ισορροπίας σύνδεσης των γονιδίων προϋποθέτει είτε τον αποκλεισμό μιας πανμειξίας, που ενδεχομένως είχε συμβεί στην αρχαιότητα από μεγάλες μετακινήσεις πληθυσμών είτε την επιλογή ενός και μόνο πληθυσμού είτε, τέλος, μια δυνατή φυσική επιλογή βασισμένη σε συνδυασμούς αλληλίων.

4.2. Η διαταραχή ισορροπίας συνδέσεως των γονιδίων - Δείκτης του χρόνου

Οι αρχέγονοι πληθυσμοί του πλανήτη έζησαν και αναπτύχθηκαν, αρχικά, απομονωμένοι μεταξύ τους. Η απομόνωση αυτή είχε ως αποτέλεσμα μια μεγάλη ομοιογένεια του πληθυσμού, με αρκετή μείωση του αριθμού των απλοτυπικών συνδυασμών δύο στενά συνδεδεμένων αλληλίων στο χρωμόσωμα. Όσο πλησιέστερα βρίσκονται τα γονίδια (απόσταση μικρότερη του 1 centimorgan) τόσο βραδύτερη είναι η εξαφάνιση τους στο χρόνο. Όσο ένας πληθυσμός παραμένει απομονωμένος τόσο εντονότερο είναι το Δ . Σε περίπτωση πανμειξίας, το Δ μειώνεται σε κάθε γενεά, ανάλογα με τον ολικό αριθμό των ανασυνδυασμών (recombinations, r) μεταξύ των αλληλίων δύο γενετικών τόπων και του αριθμού των γενεών (n) και αυτό εκφράζεται ως:

$$\Delta = \Delta_0 (1-r)^n$$

Το Δ_0 αντιστοιχεί στο Δ της μηδενικής γενεάς, η ελάττωση του Δ μέσα στο χρόνο εξαρτάται από την απόσταση μεταξύ δύο γενετικών τόπων και από τη συχνότητα των ανασυνδυασμών των αλληλίων τους. Οι

εκάστοτε, όμως, ανασυνδυασμοί των αλληλίων δεν είναι ίδιοι για όλους τους απλοτύπους. Η μοριακή βιολογία επέτρεψε την κατανόηση ορισμένων επίμαχων σημείων που αφορούσαν τους ανασυνδυασμούς, στους οποίους υπήρχε έκδηλη ασυμφωνία μεταξύ της φυσικής απόστασης και του αριθμού των ανασυνδυασμών. Αυτό κυρίως αφορά τους γενετικούς τόπους DR και DP και εκείνους, στους οποίους ορισμένοι απλότυποι είναι σε διαταραχή ισορροπίας σύνδεσης.

4.3. Η διαταραχή της ισορροπίας συνδέσεως των αλληλίων καθρέφτης της γονιδιακής κατάστασης

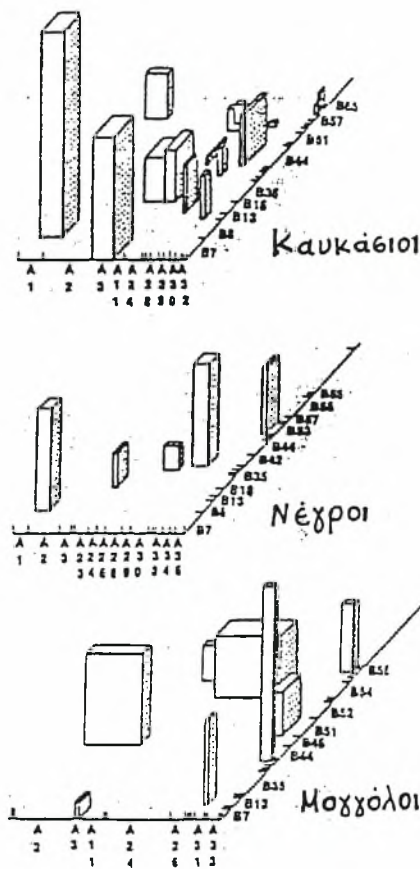
Ο προσδιορισμός του Δ σε ένα πληθυσμό έχει πολύ μεγαλύτερη σημασία ακόμη και από τον καθορισμό της συχνότητας των γονιδίων του. Στις εικόνες 4 και 5 αναφέρονται τα Δ των γενετικών τόπων HLA-A, B και DR στις τρεις σπουδαιότερες φυλές της ανθρωπότητας. Το Δ και η σημασία του μεταξύ των αλληλίων των παραπάνω γενετικών τόπων, εκφράζεται με τον όγκο και το ύψος των στηλών, ενώ οι αποστάσεις των HLA-A, B και DR αλληλίων αναγράφονται κατά μήκος των δύο αξόνων, με βάση τη συχνότητα των γονιδίων τους στους πληθυσμούς αυτούς. (Edwards A WF. Distances between population on the basis of gene frequencies: Biometrics 27: 873, 1971). Παρόλο που οι διαφορές μεταξύ των φυλών είναι μεγάλες, εντούτοις για γενετικούς τόπους που βρίσκονται κοντά πάνω στο χρωμόσωμα, όπως δηλαδή οι HLA-B και C, ορισμένα Δ (HLA-B35, CW4) είναι ίδια σε όλο το κόσμο. Αυτό σημαίνει ότι το ποσοστό των ανασυνδυασμών είναι τόσο χαμηλό, ώστε ο χρόνος να μην είναι εύκολο να απαλείψει ή να κάνει περισσότερο έντονες τις διαφορές μεταξύ των εθνών.

Στην Ευρώπη υπάρχουν περιοχές με χαρακτηριστικά Δ, όπως το AW33-B14 στη Νότιο Ευρώπη και στη Βόρειο Αφρική, το AW30 – B18 στη Σαρδηνία και στη χώρα των Βάσκων και το AW30-B13 στην Εγγύς Ανατολή. Στον ελλαδικό χώρο, τα σπουδαιότερα Δ είναι τα A2 –B5 και A9 – B18. (Renier N, Stavropoulos C, Lepage V. The distribution of HLA antigens and genes in the Greek population: Tissue Antigens 13: 154,

1979).

4.4. Διαταραχή της ισορροπίας συνδέσεως των γονιδίων και επιλογή

Αποτελεί μεγάλη πρόκληση για τους ερευνητές, η προσπάθεια κατανόησης του ρόλου της φυσικής επιλογής στη διαταραχή συνδέσεως των γονιδίων των αλληλίων του συστήματος HLA. Με τις γνώσεις των τελευταίων ετών, που αφορούν τον τρόπο παρουσίασης των πεπτιδίων των HLA μορίων, είναι βέβαιο ότι τα μόρια αυτά υφίστανται μια φυσική επιλογή από το περιβάλλον.

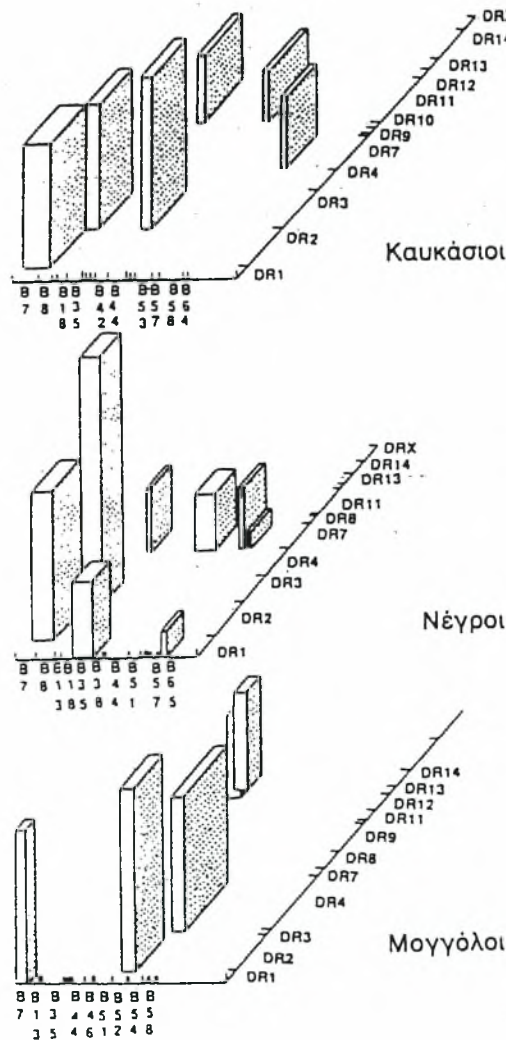


Εικόνα 4. Το Δ μεταξύ των HLA-A και HLA-B στις τρεις κύριες φυλές

Το ότι η φυσική επιλογή επεμβαίνει στα γενετικά μοντέλα των διαφόρων πληθυσμών, αποδεικνύεται ενδεχομένως από το ότι:

- Η φυσική επιλογή δρα άμεσα στα αλληλία διαφορετικών γενετικών τύπων προκαλώντας διαταραχή συνδέσεως τους με αύξηση της

συχνότητας συγκεκριμένου απλοτύπου ή απλοτύπων. (Bodmer WF, Cann H, Piazza A. Differential genetic variability among polymorphisms as an indication of natural selection: Histocompatibility testing. Munksgaard, Copenhagen, 753, 1972). Η υπόθεση αυτή δύσκολα γίνεται κατανοητή, κυρίως όταν αναφέρεται σε αριθμό γονιδίων ορισμένης χρωμοσωμιακής περιοχής, που βρίσκονται σε διαταραχή συνδέσεως και που συσχετίζονται με την ευσθησία τους σε ορισμένα νοσήματα, όπως π.χ. τα αυτοάνοσα νοσήματα, ο διαβήτης κ.λπ. (HLA-A1, CW7, B8, DW3, BFS), ή γονίδια που συσχετίζονται με τη σκλήρυνση κατά πλάκας, όπως τα HLA-A3, CW7, B7 και DW2. Στην τελευταία περίπτωση υπάρχει άμεση συσχέτιση των A3, CW7, B7 και DW2 με την εμφάνιση της νόσου.



Εικόνα 5. Το Δ μεταξύ των HLA-A και HLA-DR στις τρεις κύριες φυλές

- Η επιλογή δρα σε ένα μόνο γονίδιο που εδράζεται σε γενετικό τόπο που βρίσκεται ήδη σε διαταραχή ισορροπίας ή Δ, την οποία και αναπτύσσει περισσότερο. Η δράση αυτή της επιλογής είναι τόσο δυνατή, ώστε να μην επιτρέπει τους ανασυνδυασμούς των γονιδίων, οι οποίοι ενδεχομένως εξαφάνιζαν αυτό το Δ μέσα στο χρόνο.

- Η επιλογή ευνοεί τον ετεροζυγωτισμό σε ένα μεταλλαγμένο γονίδιο. Αυτού του είδους η επιλογή αφορά κυρίως γειτονικά γονίδια, ενώ η διαταραχή της ισορροπίας σύνδεσης είναι εφήμερη, λόγω του μεγάλου αριθμού των ανασυνδυασμών.

Καμιά φορά, όμως, η επιλογή δρα αρνητικά με το να απαλείφει ορισμένους ανεπιθύμητους συνδυασμούς γονιδίων, όπως συμβαίνει σε μερικούς πληθυσμούς, όταν οι συνδυασμοί αυτοί δεν είναι πια αναγκαίοι.

Τέλος, και άλλοι παράγοντες παίζουν ενδεχομένως σπουδαίο ρόλο στην εμφάνιση του Δ, δημιουργώντας συνθήκες περίπλοκες, μέσα από τις οποίες δύσκολα αναγνωρίζεται ο ρόλος της φυσικής επιλογής. Δεν θα πρέπει να αγνοηθεί η παρατήρηση των Piazza et al (1980), κατά την οποία ο καθοριστικός ρόλος στις μεταναστεύσεις είναι η μεγάλη ποικιλία του πολυμορφισμού του HLA, στον οποίο μικρό ρόλο παίζει η φυσική επιλογή.

4.5. Το Δ και η μετανάστευση τον ανθρώπου

Είναι γνωστό ότι μια μετανάστευση με συγχώνευση δύο πληθυσμών προκαλεί τη δημιουργία μιας διαταραχής σύνδεσης των γονιδίων στους πληθυσμούς αυτούς, που οφείλεται στις διαφορές των συχνοτήτων των γονιδίων των αλληλίων A και B. (Degos L, Colombani J, Chaventre A, Bengtson B, Jacquard A. Selective pressure on HLA polymorphism. *Nature* 249: 62, 1974). Για να είναι σημαντική η διαφορά αυτή, πρέπει ο ένας τουλάχιστον από τους δύο πληθυσμούς να είναι σχετικά ομοιογενής ως προς τη συχνότητα των γονιδίων A και B. Αυτό προϋποθέτει ότι ο πληθυσμός αυτός θα παραμένει σχετικά «κλειστός», κυρίως μέσα από συγγενικούς γάμους. Αυτό πραγματοποιείται όταν τα γεωγραφικά σύνορα ή τα φτωχά μέσα μεταφοράς εμποδίζουν τις συχνές μεταναστεύσεις, όπως οι

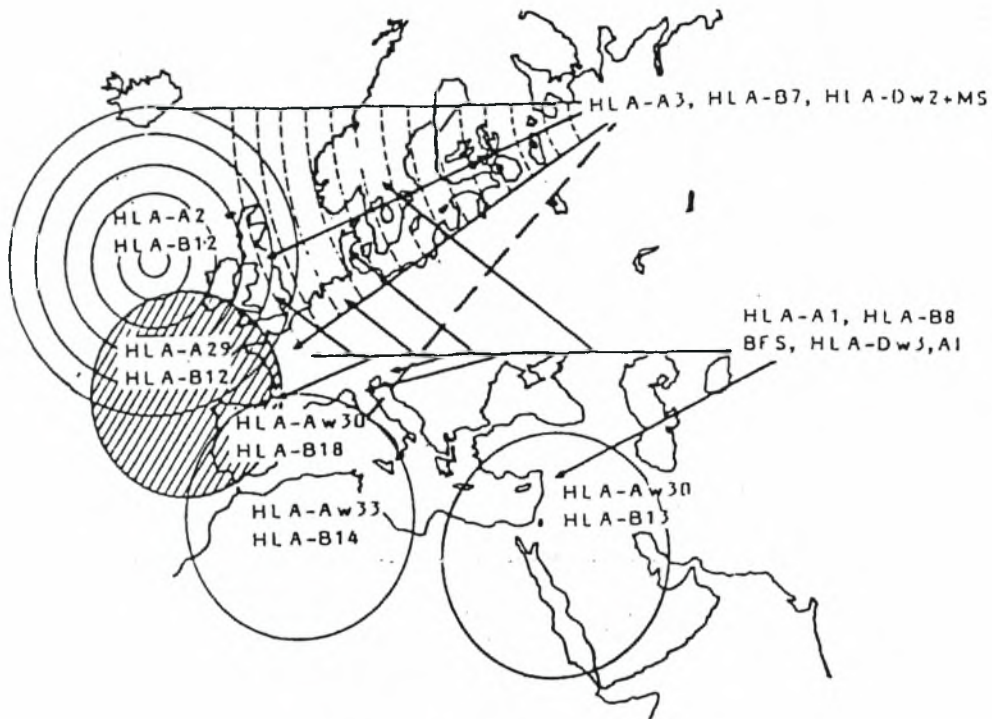
μεγάλες μεταναστεύσεις Ινδοευρωπαϊών από την Ανατολή στη Δύση και οι μεταναστεύσεις των Νορμανδών προς τη Δυτική Ευρώπη.

Ένας παράγοντας που έχει σημασία για τη διαφορά του Δ , είναι η αναλογία των ατόμων που μεταναστεύουν, σε σχέση με το μέγεθος των πληθυσμών που τα δέχεται. Τελικά, οι κατακτητές είναι περισσότεροι αριθμητικά από τους κατακτημένους και δρουν καταλυτικά στον «κλειστό» πληθυσμό διαφοροποιώντας το μεγάλο αριθμό ομοζυγωτισμού. Αν, σε άλλη περίπτωση, οι μετανάστες είναι η μειοψηφία, τα γονίδια τους διαχέονται μέσα στις γενεές και το Δ περιορίζεται λόγω του μεγάλου αριθμού των ανασυνδυασμών των γονιδίων.

5. Προσπάθεια ανάπλασης της γενετικής ιστορίας της Ευρώπης

Ήδη από το 1978, οι Menozzi et al, με βάση τις συχνότητες των γονιδίων και του Δ , απέδειξαν τον τρόπο επέκτασης των πληθυσμών από νοτιοανατολικά στα βορειοδυτικά και από ανατολάς προς δυσμάς, συσχετίζοντας τις μετακινήσεις αυτές με την πρόοδο στη γεωργία.

Αναμφισβήτητα, ο καθορισμός του Δ αποτελεί το σημαντικότερο δείκτη μελέτης της γενετικής ιστορίας των λαών, επειδή με το Δ ερευνάται αφενός η «αφετηρία» ενός λαού και αφετέρου οι μεγάλες μετακινήσεις των φυλών. Ο καθορισμός, λοιπόν, του αρχέγονου Δ και των διαφόρων ποικιλιών του, ανάλογα με τη φορά της μετανάστευσης, εξηγούν ενδεχομένως τα μέχρι σήμερα ευρήματα. Η φυσική επιλογή, που ενδεχομένως παίζει και αυτή το ρόλο της, δεν έχει περιληφθεί στο μοντέλο των Menozzi et al. Με βάση τη θεωρία αυτή, είναι δυνατή η ανασύνθεση τηςφοράς των μεταναστεύσεων των πληθυσμών και αυτό παρουσιάζεται στην εικόνα 6. Είναι πολύ πιθανό, μεταξύ των πληθυσμών που εκτείνονται στη δυτική Μεσόγειο και πριν από την εποίκηση της από τα ινδοευρωπαϊκά φύλα, να υπήρχε ο απλότυπος A1, B8, DW3, ένας απλότυπος παρόμοιος με εκείνον που προσδιορίσθηκε στους Βάσκους και στους Σαρδηνίους.



Εικόνα 6. Το Δ στην Ευρώπη

Στις περιοχές αυτές, επίσης, υπάρχει ένα κοινό Δ το HLA-A30,B18. Γνωρίζοντας ότι το HLA-A30 αλλήλιο είναι αφρικανικής προέλευσης, γεννάται το ερώτημα ύπαρξης στη Νότιο Ευρώπη ενός πληθυσμού προερχομένου από την Αφρική. Στους Σαρδηνίους εντούτοις, που δεν έχουν εποικισθεί από ινδοευρωπαίους, παρατηρείται ένα Δ, το HLA-A3,B7, που αποτελεί κύριο Δ των πληθυσμών των παράλιων περιοχών της Δυτικής Μεσογείου και της Βόρειας Ευρώπης. Είναι πολύ πιθανόν το Δ αυτό να είναι το αποτέλεσμα ανάμειξης πληθυσμών κατ' εξοχήν βόρειας προέλευσης, που ήταν ναυτικοί. Σε ορισμένες περιοχές, είναι δυνατόν να συνυπάρχουν περισσότερα του ενός Δ ταυτόχρονα. Στη Δανία, π.χ., συνυπάρχουν το HLA-A1,B8 που αντιπροσωπεύει ινδοευρωπαϊκή μετανάστευση, το HLA-A2,B12 που χαρακτηρίζει πληθυσμούς που ζούσαν στο παρελθόν στον τόπο αυτό και το HLA-A3, B7, που προέρχεται από μετανάστευση βορείων φυλών. Είναι πολύ δύσκολος, επίσης, ο προσδιορισμός του Δ ενός πληθυσμού, όταν αυτός έχει ήδη μεταναστεύσει σε περιοχή που περιλαμβάνει πληθυσμό μικτό, που προήλθε, δηλαδή, από μετανάστευση και συγχώνευση με τον ιθαγενή πληθυσμό. Έτσι, σε μελέτες

του Δ στους μαύρους της Αμερικής, στους μαύρους της Αφρικής και στους λευκούς Καυκάσιους, η μείωση του Δ, HLA-A1,B8, οφείλεται στο ότι το 20% των γονιδίων των Καυκάσιων αναμείχθηκαν με εκείνα των μαύρων της Αμερικής, ενώ ένα άλλο Δ, όπως π.χ. το HLA-A2-B40, προέρχεται από αυτή τη συγχώνευση. Τέλος, όλοι οι παράγοντες που προαναφέρθηκαν, παίζουν σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη της γενετικής ιστορίας των λαών, όπως είναι η δημιουργία του αρχέγονου Δ σε μεμονωμένους πληθυσμούς, η δυσκολία εμφάνισης του Δ σε γονίδια γειτονικά στο χρωμόσωμα, η ελάττωση ή η συνύπαρξη Δ σε πληθυσμούς που υφίστανται δύο ή περισσότερες μεταναστεύσεις άλλων πληθυσμιακών ομάδων καθώς και η δημιουργία των Δ από φυσική επιλογή.

6. Προέλευση και διατήρηση του πολυμορφισμού του συστήματος HLA

6.1. Προέλευση του πολυμορφισμού

Ο πολυμορφισμός του συστήματος HLA οφείλεται κυρίως σε τρία φαινόμενα:

α. Μεταλλάξεις. Οι μεταλλάξεις έρχονται πρώτες σε σπουδαιότητα από τα φαινόμενα που προκαλούν τον πολυμορφισμό. Αυτές κυρίως είναι υπεύθυνες για ειδικότητες μεγάλου εύρους, όπως είναι, π.χ., τα κοινά (public) αντιγόνα, ή για ομάδες διασταυρούμενων αντιδράσεων που οφείλονται σε ποικιλίες ενός τμήματος του γονιδίου.

β. Γενετικοί ανασυνδυασμοί. Σε μερικές περιπτώσεις μια ειδικότητα ενός HLA αλληλίου διαφοροποιείται λόγω γενετικών ανασυνδυασμών. Είναι δυνατόν το αλληλίο AW69, π.χ., να έχει ένα πεδίο (domain) α_1 ταυτόσημο με εκείνο του A28 και ένα πεδίο ταυτόσημο με εκείνο του A2. Ένα άλλο παράδειγμα είναι το αλληλίο BW42, του οποίου το πεδίο α_1 είναι ταυτόσημο με του B7 και το πεδίο α_2 με εκείνο του B8.

γ. Μετατροπή του γονιδίου (gene conversion). Επειδή οι στιγμιαίες μεταλλάξεις είναι σπάνιες, η πλειοψηφία των ποικιλιών των αλληλίων διαμορφώνεται καθ' ομάδες πάνω σε μια περιοχή νουκλεοτιδίων η δε κατανομή τους δεν είναι τυχαία. Το φαινόμενο αυτό ονομάζεται μετατροπή του γονιδίου και σημαίνει τη μετάθεση ενός τμήματος DNA ενός χρωμοσώματος σε ένα άλλο ή μιας γενετικής περιοχής σε μια άλλη στο ίδιο χρωμόσωμα. Ένα, λοιπόν, γονίδιο δόρα ως δότης και παραμένει το ίδιο, ενώ το άλλο είναι ο λήπτης και αποκτά ένα τμήμα νέο με περισσότερα νουκλεοτίδια. Αναφορές στο φαινόμενο αυτό έχουν γίνει στις μελέτες της μεταβολής H-2 Kbml στον ποντικό, όπου 7 νουκλεοτίδια αντικαταστάθηκαν αυτόματα παρουσία του γονιδίου Kb. Το γονίδιο δότης φαίνεται να είναι ένα γονίδιο, όχι πολύμορφο, της περιοχής QA(Q10) του H-2 συστήματος. Στον άνθρωπο, το φαινόμενο της γενετικής μεταστροφής, π.χ. μεταξύ των γονιδίων DRB1 και DRB3, μπορεί να εξηγήσει γιατί το HLA-DR3 προέρχεται από το HLA-DR6 και το HLA-DR5 από το HLA-DR4,DW10. Είναι δεδομένο, επίσης, ότι το HLA-B46 σχηματίζεται δια μεταφοράς ενός μέρους του πεδίου α_1 του CW11 μέσα στο πεδίο α_1 του B58. Ο πολυμορφισμός είναι ενδεχομένως και φαινόμενο ποσοτικό, κατά το οποίο δεν εκφράζονται ορισμένες αλυσίδες DRB ενός απλότυπου, όπως η αλυσίδα β_4 (που αντιστοιχεί στην ειδικότητα DR53a,b,c) και που ενδεχομένως εκφράζεται ή όχι. Το ίδιο ισχύει και με την αλυσίδα β_3 που αντιστοιχεί στην ειδικότητα DR52a,b,c. Έτσι, ορισμένα άτομα έχουν μια αλυσίδα DR β που εκφράζεται, άλλα έχουν δύο, ενώ ορισμένα άτομα (DRW16) έχουν τρεις αλυσίδες DRB. Ο πολυμορφισμός αυξάνεται, επίσης, με τους συνδυασμούς μιας α και μιας β αλυσίδας της ίδιας σειράς ή συνδυασμών μεταξύ δύο διαφορετικών σειρών, όπως DR και DQ. (Degos L. 1989).

6.2. Διατήρηση του πολυμορφισμού

Έχει αποδειχθεί από τη μελέτη της γενετικής των πληθυσμιακών ομάδων ότι ο πολυμορφισμός διατηρείται, όταν γίνεται φυσική επιλογή σε

αλληλίο με ομοζυγωτισμό. Η θεωρία της μεγάλης σημασίας του ετεροζυγωτισμού στη διατήρηση του πολυμορφισμού, ιδιαίτερα στο σύστημα ιστοσυμβατότητας, κερδίζει έδαφος τα τελευταία χρόνια. Στον ποντικό, μια επιλογή έναντι ομοζυγωτισμού εξηγείται, ενδεχομένως, από ένα πολυγονιδιακό σύστημα t , που επιδρά στα υπόλοιπα κατά την εμβρυϊκή διαφοροποίηση. Αυτό εδράζεται στο χρωμόσωμα 17 και ορισμένα αλληλία αυτού του συστήματος είναι ανενεργά, όταν εκφράζονται με ομοζυγωτία. Στον άνθρωπο, δεν υπάρχει παρόμοιο σύστημα με το t του ποντικού αλλά είναι δυνατό να υπάρχουν πολύμορφα γονίδια με ανενεργά αλληλία.

Η επιλογή έναντι του ομόζυγου απλότυπου έχει μελετηθεί σε μεμονωμένους πληθυσμούς, όπως π.χ. στη φυλή των Touareg Kei Kurmege, στην οποία οι γάμοι είναι καθαρά αιμομικτικοί (η σύζυγος είναι η κόρη του αδελφού της μητέρας)" και στους Ινδιάνους της Αμερικής του Νότου. (Black FL, Salzano FM. Evidence for heterosis in the HLA system. *Am J Hum Genet* 33: 894, 1981). Αντίθετα, σε άλλους μεμονωμένους πληθυσμούς ή σε μεγάλες πληθυσμιακές ομάδες, στις οποίες υπάρχουν γάμοι μεταξύ εξαδέλφων, δεν έχει παρατηρηθεί επιλογή έναντι του ομόζυγου απλότυπου. Αυτό, ενδεχομένως, σημαίνει ότι τέτοια επιλογή δεν γίνεται έναντι του ομοζυγωτισμού αυτού του ιδίου του συστήματος ιστοσυμβατότητας αλλά έναντι ομοζυγωτισμού γονιδίων που εδράζονται πλησίον του συστήματος HLA και υπόκεινται σε αυτή την επιλογή. Έτσι, η μεταβίβαση του απλότυπου HLA-B8, DR3, BFS, C2C, C4A20, C4B1 εξαρτάται από το αν συσχετίζεται με το GLO1 ή το GLO2. Στη δεύτερη περίπτωση, όταν ο απλότυπος είναι πατρικής προέλευσης, μεταβιβάζεται σε ποσοστό 83% στα παιδιά, ενώ, όταν συσχετίζεται με το GLO1 και είναι μητρικής προέλευσης, το ποσοστό μεταβίβασης ανέρχεται μόνο σε 50%. Άλλες μελέτες που έχουν γίνει από την ομάδα του Radvany (1987), που αφορούν τις διαταραχές στον τρόπο μεταβίβασης του διαχωρισμού των αλληλουχιών των αλληλίων ή απλοτύπων και στις οποίες παρατηρείται μια υπεροχή των αρρένων στα πρωτότοκα παιδιά, που έχουν ταυτότητα ως προς το HLA-DR με τη μητέρα, δεν έχουν επαληθευθεί και από άλλους ερευνητές. Επίσης, διαταραχές των αλληλουχιών που παρατηρούνται σε

οικογένειες με διαβήτη, ιδιαίτερα στους απλότυπους που φέρουν τα DR3 και DR4, οι οποίες έχουν αναφερθεί από τους Vadheim et al (1986), αναμένεται να επαληθευθούν. Το σύστημα ιστοσυμβατότητας HLA, όμως, αποτελεί ένα πολύ χρήσιμο «εργαλείο» για ανθρωπολογικές μελέτες, όχι μόνο για την έρευνα της γενετικής ιστορίας των λαών αλλά και για την κατανόηση του πολυμορφισμού αυτού του πιο πολύμορφου συστήματος του ανθρώπου.

7. Ο νόμος των Hardy-Weinberg

7.1. Πληθυσμιακή Γενετική

Για τον ασχολούμενο με την ιατρική γενετική η πιο σπουδαία έννοια στη πληθυσμιακή γενετική είναι η ισορροπία Hardy-Weinberg. Περιγράφηκε ανεξάρτητα το 1908 από τον Άγγλο μαθηματικό G.H. Hardy και το Γερμανό ιατρό W. Weinberg για να εξηγήσει γιατί τα επικρατή χαρακτηριστικά δεν αντικαθιστούν αυτόματα τα υπολειπόμενα χαρακτηριστικά στον πληθυσμό. Η χρησιμότητα της στην ιατρική γενετική είναι ότι εξηγεί γιατί σε ένα μεγάλο πληθυσμό με τυχαίες συζεύξεις οι συχνότητες των αλληλομόρφων δεν αλλάζουν από γενεά σε γενεά, καθώς και το πώς καθορίζονται οι συχνότητες των γονότυπων για οποιονδήποτε γενετικό τόπο, από τις σχετικές συχνότητες των αλληλομόρφων σ' αυτό το γενετικό τόπο.

Πίνακας 1. Συχνότητες γονότυπων στους απογόνους

		<u>Πατρικοί γαμέτες</u>	
		A (p)	a (q)
Μητρικοί γαμέτες	A (p)	AA (p^2)	Aa (pq)
	a (q)	Aa (pq)	Aa (q^2)

Ας θεωρήσουμε ένα μοναδικό αυτοσωματικό γενετικό τόπο με δύο αλληλόμορφα (A και a), των οποίων οι πληθυσμιακές συχνότητες στα σπερματοζώαρια και στα ωάρια είναι $p = \eta$ συχνότητα του αλληλομόρφου A

και $q = \eta$ συχνότητα του αλληλόμορφου a . Επειδή υπάρχουν μόνο δύο αλληλόμορφα, $p+q = 1$. Όπως φαίνεται στον Πίνακα 1, η τυχαία διασταύρωση (σύζευξη ανεξάρτητη από τον γονότυπο) είναι μαθηματικά ισοδύναμη με την τυχαία μίξη και ένωση σπερματοζωαρίων και ωαρίων. Η συχνότητα κάθε γονότυπου εμφανίζεται στις παρενθέσεις. Οι συχνότητες των γονότυπων στους απογόνους είναι:

γονότυπος:	AA	Aa	aa
συχνότητα:	p^2	$2pq$	q^2

Στην επόμενη γενεά, κάθε ένας από τους τρεις πατρικούς γονότυπους μπορεί να διασταυρωθεί με κάθε ένα μητρικό γονότυπο, όπως εμφανίζεται στον Πίνακα 2. Η συχνότητα κάθε τύπου σύζευξης είναι στις παρενθέσεις. Έτσι, η συχνότητα κάθε γονότυπου (AA, Aa και aa) είναι σταθερή για συνεχόμενες γενεές και ο πληθυσμός θεωρείται ότι βρίσκεται σε ισορροπία Hardy-Weinberg.

Πίνακας 2. Συχνότητα συζευκτικών τύπων

	<u>Πατρικοί γονότυποι</u>			
		A (p)		a (q)
Μητρικοί γονότυποι	AA (p^2)	AA x AA (p^4)	AA x Aa ($2p^3q$)	AA x aa (p^2q^2)
	Aa ($2pq$)	Aa x AA ($2p^3q$)	Aa x Aa ($4p^2q^2$)	Aa x aa ($2pq^3$)
	aa (q^2)	aa x AA (p^2q^2)	aa x Aa ($2pq^3$)	aa x aa (q^4)

8. Οι κλειστοί πληθυσμοί της Θεσσαλίας

Τραγουδισμένη από τους αρχαίους, ζηλεμένη από όλους τους κατακτητές της βαλκανικής χερσονήσου, η Θεσσαλία, χώρα του μύθου και του μόχθου βρίσκεται στις παρειές της Ελλάδας, καλύπτοντας μian επιφάνεια 13.984 τ. χλμ.

Στην αυγή του πλανήτη, αποτελούσε μια εσωτερική θάλασσα, τριγυρισμένη από ένα στεφάνι ψηλών βουνών.

Ένας γεωλογικός κατακλυσμός επέτρεψε στα νερά να ξεχυθούν στο Αιγαίο από ένα γιγάντιο ρήγμα έτσι, φανερώθηκε ο βυθός και μαζί του οι Θεοί, οι άνθρωποι, τα ζώα.

Πάνω στα ψηλώματα ζουν αυτόχθονες ορεινοί, οι Βλάχοι και νομάδες Σαρακατσάνοι. Στα καμποχώρια, στη δυτική λεκάνη της πεδιάδας, κατοικούν οι Καραγκούνηδες κ.ά.

Καθεμιά από αυτές τις ομάδες προσδίνουν στη Θεσσαλία το χαρακτηριστικό χρώμα και την ιδιαιτερότητα του ύφους τους.

Και αυτό γιατί η Θεσσαλία είναι μία απομονωμένη γεωγραφικά περιοχή, έως και τον 20^ο αιώνα, εξαιτίας και του φυσικού περιβάλλοντός της, που είναι ως προς τη μεταφορά των πληθυσμών οριακά περιορισμένο.

Γι' αυτό πιστεύεται ότι οι πληθυσμοί, που ζουν στην περιοχή παραμένουν γενετικά «καθαροί».

Η καταγωγή και προέλευση των Βλάχων, Σαρακατσάνων και Καραγκούνηδων είναι ένα θέμα, που περιλαμβάνει υλικό πρόσφορο για συζήτηση.



Εικόνα 7

Στην παραπάνω εικόνα φαίνεται η περιοχή της Θεσσαλίας και οι περιοχές που κατοικούνται από τις πληθυσμιακές ομάδες των Βλάχων με κόκκινο χρώμα, ο πληθυσμός των Σαρακατσάνων παρέμενε στις περιοχές με μπλε χρώμα, ενώ των Καραγκούνηδων στις περιοχές που απεικονίζονται με πράσινο χρώμα.

Οι περιοχές αυτές έχουν χαρτογραφηθεί στις αρχές του προηγούμενου αιώνα από τους Rubin 1913, και Walter 1956. Σήμερα βέβαια δεν υπάρχουν τέτοιοι τοπολογικοί διαχωρισμοί, αφού όπως είναι γνωστό η τάση των ανθρώπων μέσω των κοινωνικών, πολιτιστικών και άλλων συνθηκών της ζωής, δημιουργείται άμεση αλληλεξάρτηση και μίξη όλων των ομάδων, ακόμη και των εθνών.

8.1. Βλάχοι

Οι Βλάχοι στην Ελλάδα κατοικούν κυρίως στην περιοχή της Δυτικής Μακεδονίας, Βόρειας Θεσσαλίας, Ανατολικής Ηπείρου, Θράκης και αλλού.

Ο Κανελλίδης (1887) υποθέτει μάλιστα ότι Βλάχοι κατοίκησαν και στην Πελοπόννησο τον 18^ο αιώνα.

Στην Δ. Μακεδονία ζουν οι Βλάχοι στον νομό Κοζάνης, στα χωριά Σαμαρίνα, Αβδέλλα, Περιβόλι κ.ά.

Ακριβή στοιχεία για τον αριθμό των Βλάχων στην Ελλάδα δεν υπάρχουν. Κατά τον Πουλιανό, μόνο στη Θεσσαλία, πρέπει να είναι 77.000 Βλάχοι περίπου. Κατοικούν στον νομό Τρικάλων, στα χωριά Λειβάδι, Αλμυρό κ.ά. Πιθανόν να κατέβηκαν από την Δ. Μακεδονία και μετοίκησαν στις πλαγιές της οροσειράς της Πίνδου. Η πλειονότητα των Βλάχων ασχολείται με την κτηνοτροφία και είναι ημινομάδες.

Οι Βλάχοι, μέσω της διασποράς τους σε όλη τη Βαλκανική από διάφορους συγγραφείς αναφέρεται ότι δίνουν την αίσθηση μιας ιδιαίτερης εθνογλωσσικής ή εθνοπολιτισμικής ομάδας η οποία διαχέεται ανάμεσα στους Ντόπιους, όπου κατά καιρούς αναπτύσσονται.

Αν εξαιρέσουμε τη μεγάλη μητροπολιτική συγκέντρωσή τους κατά μήκος της Πίνδου, όλοι οι υπόλοιποι οικισμοί και οι εγκαταστάσεις τους

μοιάζουν να έχουν εκτοξευτεί σαν τους σπινθήρες ενός πυροτεχνήματος που ρίχτηκε πάνω από τα Βαλκάνια. Η διασπορά τους φαντάζει αφύσικη και δίνει την εικόνα μιας αναγκαστικής και μάλλον βίαιης μετακίνησης και μετεγκατάστασης.

Αυτόματα λοιπόν δημιουργείται η απορία για το κέντρο εκτόξευσης της διασποράς και γεννάται η λογική της αναζήτησής τους. Από πού ξεκίνησαν και τι μετέφεραν μαζί τους όλοι αυτοί οι άνθρωποι. Οι γνώμες των ερευνητών σε αυτά τα ερωτήματα συγχέονται, χωρίς να μπορούν να δώσουν κάποια συγκεκριμένη απάντηση.

Τα ίχνη των Βλάχων μπορούμε να τα παρακολουθήσουμε μέχρι την εποχή της Ρωμαϊκής Αυτοκρατορίας, τις μετακινήσεις των λαών και τον σχηματισμό της Βυζαντινής Αυτοκρατορίας. Πολλοί συγγραφείς αναζητούν την καταγωγή των Βλάχων στους Δάκες· ο Αραβαντινός ανήκει σ' αυτήν την κατηγορία. Στα τελευταία του έργα είναι της γνώμης ότι εκλατινισθείσες ομάδες της Δακίας, εκτοπίστηκαν κατά τον 5^ο αιώνα, από την περιοχή του Μολδάβα ποταμού (σημερινή Ρουμανία), μεταφέρθηκαν προς τα νότια στη Θράκη και στην οροσειρά του Αίμου. Αφού χωρίστηκαν, κατοίκησαν σε διάφορα μέρη των βουνών της Μακεδονίας, της Θεσσαλίας και της Ηπείρου. Εκεί έμειναν οι διάφορες ομάδες απομονωμένες, κατά τον Αραβαντινό, ως την εποχή του αυτοκράτορα του Βασιλείου Β' της Μακεδονικής δυναστείας, δηλαδή περίπου ως τα μέσα του 10^{ου} αιώνα. Εξαιτίας των Βουλγαρικών πολέμων και των ταραχών που δημιουργήθηκαν από αυτά τα γεγονότα, σχηματίστηκαν μικρές ομάδες, οι οποίες έζησαν σχετικά απομονωμένες, και από τις οποίες κατάγονται οι Βλάχοι.

Όμοια με τον Αραβαντινό βλέπει και ο Βέης την προέλευση των Βλάχων της Ελλάδας, από τους Δάκες της τοποθεσίας του Σάρου και του Δούναβη. Από κει, και κάτω από την πίεση των Ρωμαίων, κατέβηκαν χωρισμένοι σε πολλές ομάδες προς τα Νότια, στην Ήπειρο και στην Μακεδονία. Αυτό νομίζει ο Βέης, βασιζόμενος σε μια μνεία στο «Στρατηγικόν» του Κεκαυμένου. Στην ίδια ομάδα ανήκουν και οι Τσιντσάνοι, οι οποίοι είναι Βλάχοι της Γιουγκοσλαβίας, ονομαζόμενοι έτσι, προφανώς από την συνήθη στην διάλεκτό τους επανάληψη του ήχου *te, ti*

(tre, tsch). Ο Κούμας θεωρεί τους Βλάχους των ποταμών Μολδάβα και Δούναβη κυρίως εκλατινισμένες Θρακικές φυλές (Δάκες και Γαίτες). Αναφέρει τους Βλάχους σαν εκλατινισμένους αυτόχθονες πληθυσμούς, όπως επίσης της Μακεδονίας, Θεσσαλίας κ.λπ., και ότι έγινε εκεί η ίδια διαδικασία στην γλώσσα όπως στους Ισπανούς, Πορτογάλους και Γάλλους.

Ο Schafarik βλέπει διαφορές μεταξύ του πληθυσμού της Δακίας και των εκλατινισμένων ομάδων της Μακεδονίας, της Θεσσαλίας και της Αλβανίας. Το ίδιο και ο Άμαντος, ο οποίος πιστεύει ότι οι αυτόχθονες Έλληνες που υπηρέτησαν στις ρωμαϊκές λεγεώνες, πήραν και την λατινική γλώσσα.

Ο Κεραμόπουλος προσπάθησε να αποδείξει ότι μια εκλατινοποίηση στην γλώσσα του αυτόχθονα πληθυσμού δημιουργήθηκε όταν αυτός έλαβε ενεργό μέρος στον ρωμαϊκό στρατό.

Έτσι οι Βλάχοι κατάγονται από τους αυτόχθονες πληθυσμούς, οι οποίοι υπηρετούσαν στον ρωμαϊκό στρατό σαν λεγεωνάριοι (auxilarii). Αποκτούσαν ίσα πολιτικά δικαιώματα με τους Ρωμαίους, και επειδή τα στρατιωτικά καθήκοντα στις ρωμαϊκές λεγεώνες ήταν κληρονομικά, ήταν εύκολο να καθιερωθεί και να διατηρηθεί η λατινική γλώσσα στον πληθυσμό. Έτσι δημιουργήθηκε ο πυρήνας για τους Βλάχους και για την Βλάχικη γλώσσα στα δυτικά τμήματα της χερσονήσου του Αίμου, και με την πάροδο του χρόνου εξαπλώθηκε και στην Δακία. Ο Κεραμόπουλος δεν παραδέχεται σαν ιστορικά αποδεδειγμένη μια μετακίνηση των Βλάχων σε διάφορες κατευθύνσεις παρά μόνο των Πετσενέγων ή Πατσινάκων, στους οποίους ο Κεραμόπουλος βλέπει τους Μογλενίτες Βλάχους. Ελάχιστα πειστική βρίσκει επίσης την θεωρία ότι οι Βλάχοι προέρχονται από Ρωμαίους λεγεωνάριους. Κατά την γνώμη του δεν υπήρχε κανένα κίνητρο για Ρωμαίους πολίτες να κατοικήσουν σε άγονες και απομονωμένες περιοχές της Ελλάδας.

Ο Thummann ανάγει την καταγωγή των Βλάχων (Κουτσοβλάχων) στην Ελλάδα και συγκεκριμένα στον παλιό αυτόχθονα πληθυσμό της Β. Ελλάδας. Σ' αυτό συμφωνεί και ο Jorga ο οποίος δεν παραδέχεται ότι οι Κουτσοβλάχοι προέρχονται από την Δακία. Τους θεωρεί κυρίως εκλατινισμένα Ιλλυρικά φύλα. Βασίζεται στο γεγονός ότι η Ρουμανική

γλώσσα και η γλώσσα των Κουτσοβλάχων είναι εντελώς διαφορετική. Αναφέρεται χαρακτηριστικά ότι ένας Ρουμάνος και ένας Κουτσοβλάχος της περιοχής του Μοναστηρίου δεν μπορούν να συνεννοηθούν. Η ομοιότητα στις δύο εκλατινισμένες γλώσσες και κυρίως η χαρακτηριστική θέση του άρθρου, δεν είναι για τον Jorga αποδεικτικό στοιχείο, γιατί το ίδιο φαινόμενο υπάρχει στα Βουλγαρικά και στα Αλβανικά. Κατά την γνώμη του ίδιου συγγραφέα είναι ένα υπόλειμμα των παλιών κατοίκων της χερσονήσου του Αίμου, των Θρακών.

8.2. Σαρακατσάνοι

Οι Σαρακατσάνοι, με όλα τα ανθρωπολογικά και παλαιοανθρωπολογικά δεδομένα, αναδεικνύονται ο αρχαιότερος λαός της Ευρώπης. (Άρη Ν. Πουλιανού, 1993). Αποτελούν μια αδιάλειπτη βιολογική συνέχεια του *Homo sapiens*, όπως εμφανίζεται στην Παλαιολιθική Εποχή, ιδίως στη Μέση Παλαιολιθική (~50.000 χρόνια). Εμφανίζουν αρκετά υπολείμματα γνωρισμάτων που οδηγούν στα ίχνη των Αρχανθρώπων της Κατώτερης Παλαιολιθικής, όταν το Ανθρώπινο Γένος αρχίζει να παίρνει τη σημερινή του μορφή και να εμφανίζει έντονα χαρακτηριστικά Σύγχρονου, Σοφού, Λογικού και Κοινωνικού όντος με έναρθρη λαλιά, δηλαδή πριν από ~700.000 χρόνια.

Το ολιγότερο που μπορεί να συμπεράνει κανείς με την ανθρωπολογική μελέτη τους, είναι ότι αποτελούν μία «επανεμφάνιση» στο χρόνο των αρχαιοτάτων κατοίκων της Ηπείρου μας, του είδους του Ανθρώπου του λογικού, ο οποίος απλώνεται στην Ευρώπη κατά τη Μουστιαία εποχή (~50.000 χρόνια).

Η γλώσσα των Σαρακατσαναίων, σύμφωνα με τα γλωσσολογικά δεδομένα, ήταν και είναι μόνο η ελληνική. Προφανώς η ελληνική πρωτοπαρουσιάζεται στα βουνά της Πίνδου (Άγραφα και Τζουμέρκα) πριν μερικές δεκάδες χιλιάδες χρόνια, επιβιώνει κοινωνικά μέσα από την κλειστή οικογενειακή παράδοση των πρώτων προμηθευτών τροφής της ανθρωπότητας, που γίνονται πια οργανωμένοι ποιμένες, και η εξέλιξη του

είδους με τη φυσική επιλογή φτάνει στη σημερινή του μορφή. Έτσι μπορεί να πει κανείς, ότι η ελληνική, έμμεσα, με τα ανθρωπολογικά στοιχεία, αποτελεί τη ρίζα των γλωσσών των λεγομένων «ινδοευρωπαϊκών» λαών. (Καβαδίας Γ. 1996, Καλοδήμος Θ. 2003, Πουλιανός 1993).

Με την ανθρωπολογική έννοια οι Σαρακατσάνοι ανήκουν στην ηπειρωτική ποικιλία των ευρωπαϊοειδών, και όχι στην Αιγαιακή, που είναι κατοπινή εξέλιξη. Οι Ευρωπαϊοειδείς απλώνονται από τα Πυρηναία ως τον Καύκασο δια μέσου της Ευρώπης. Από κει και πέρα έχουμε όλες τις δυνατές υποποικιλίες που αναπτύσσονται σ' αυτό το χώρο και επιδρούν ακόμη μέχρι τους Αίνου της Ιαπωνίας. Γενικότερο συμπέρασμα: οι Πρωτοευρωπαίοι καταλαμβάνουν αρχικά όλο το χώρο της Ευρώπης και της βόρειας Ασίας. Ο ανθρωπολογικός τύπος της Πίνδου (continental) είναι ο αρχικός πυρήνας των Ευρωπαίων, γνωστός σήμερα και σαν Διναρικός. Οι Σαρακατσάνοι όμως της Πίνδου απετέλεσαν το κλειδί για την ανίχνευση της προΐστορίας των Ευρωπαίων.

8.3. Καραγκούνηδες

Με τη λέξη «Καραγκούνηδες» ή «Γκαραγκούνηδες» ονομάζονται γενικά στη Θεσσαλία οι κάτοικοι της πεδινής Θεσσαλίας στη συντριπτική τους πλειοψηφία.

Οι Καραγκούνηδες κατοικούν και στους τέσσερις νομούς της Θεσσαλίας. Συγκεκριμένα, στο νομό Καρδίτσας είναι εγκατεστημένοι, σχεδόν αποκλειστικά, σε όλη την πεδινή έκταση. Στο νομό Τρικάλων κατέχουν τον μεγαλύτερο πεδινό χώρο, εκτός από τα χωριά που βρίσκονται στις υπώρειες των Χασίων, των οποίων οι κάτοικοι ονομάζονται «Χασιώτες». Την πλειονότητα του πεδινού χώρου κατέχουν, επίσης, οι Καραγκούνηδες και στους άλλους δύο νομούς (Λάρισας και Μαγνησίας). Ένα μέρος των Καραγκούνηδων του Νομού Λάρισας είναι γνωστοί με το όνομα «Κατσανάδες» ή «Γκατζανάδες» ή «Ρεβενήσιοι». Επίσης οι Καραγκούνηδες γύρω από την κωμόπολη Ζάρκο Τρικάλων ονομάζονται «Κοξαράδες» ή «Γκοξαράδες».

Οι Καραγκούνηδες, λοιπόν, της Καρδίτσας και των Τρικάλων, μαζί με τους Κατσανάδες και τους Κοξαράδες και τους άλλους Καραγκούνηδες των νομών Λάρισας και Μαγνησίας συνθέτουν την έννοια των Καραγκούνηδων της Θεσσαλίας στην ευρεία σημασία του όρου. (Ηρακλής Χρ. Παπαδήμα 1980).

Ποια είναι η καταγωγή των Καραγκούνηδων και γιατί ονομάστηκαν έτσι; Πυκνή ομίχλη καλύπτει τα ερωτήματα αυτά. Όσο είναι αλήθεια ότι οι Καραγκούνηδες είναι Έλληνες μ' ένα ιδιαίτερο λαϊκό πολιτισμό, ομοιογενή και εξωτερικά διακριτό, τόσο είναι βέβαιο πως κανείς δεν ξέρει μ' επιστημονική ακρίβεια, πότε, πώς και γιατί διαφοροποιήθηκαν από τους άλλους Έλληνες και κάτω από ποιες συνθήκες ανέπτυξαν τον πολιτισμό τους. Το ίδιο συμβαίνει με τ' όνομά τους. Μερικοί υποστηρίζουν ότι η ονομασία τους προέρχεται από το γεγονός ότι φορούσαν επενδύτες από μαύρο δέρμα προβάτου, δηλαδή μαύρη γούνα και σε παραφθαρμένα τούρκικα καρά-γκούνα, πράγμα που τους έμεινε σαν παρωνύμιο. Σύμφωνα με τη γνώμη άλλων, οφείλουν τ' όνομά τους στη συνήθειά τους να κινούν το κεφάλι τους μιλώντας. Ο την «κάρα κινών» ονομάστηκε Καραγκούνης. (Γ. Β. Καββαδία, 1980).

Η λαογραφία, μας χορηγεί πλούσια στοιχεία, τα οποία τόσο ζηλότυπα μας στερούν οι ιστορικές πηγές. Οι Καραγκούνηδες και, γενικότερα, οι Θεσσαλοί, δεν έχουν καμιά σχέση με αλβανικά ή αρβανιτοβλάχικα στοιχεία. Οι Θεσσαλοί Καραγκούνηδες, λοιπόν, αποτελούν όχι απλώς ελληνικό φύλο, αλλά ένα από τα αρχαιότερα ελληνικά φύλα, που επιζούν ως τις μέρες μας.

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. ΒΙΟΛΟΓΙΚΟ ΥΛΙΚΟ

Λήψη αίματος 15 ml από κάθε άτομο που παίρνει μέρος στη μελέτη μας.

Οι κατηγορίες πληθυσμών από το διαμέρισμα της Θεσσαλίας, που συμπεριλάβαμε στη μελέτη μας είναι:

1. Επίμικτοι Θεσσαλοί: 170 άτομα.
2. Βλάχοι: 127 άτομα.
3. Σαρακατσάνοι: 111 άτομα.
4. Καραγκούνηδες: 109 άτομα.

Σύμφωνα με το πρωτόκολλο συνεργασίας μεταξύ Παιδιατρικής Πανεπιστημίου Θεσσαλίας και Εθνικού Κέντρου Ιστοσυμβατότητας (Ε.Κ.Ι.) για τον προσδιορισμό των αντιγόνων HLA στο θεσσαλικό πληθυσμό.

Χαρακτηριστικά - προϋποθέσεις μελέτης ατόμων

- α) Υγιή άτομα.
- β) Ηλικίας 18 – 65 ετών.
- γ) Στον επίμικτο θεσσαλικό πληθυσμό, να μην είναι συγγενείς μεταξύ τους και να είναι γεννημένοι στη Θεσσαλία οι ίδιοι και οι γονείς τους.
- δ) Στις υποομάδες (Βλάχοι, Σαρακατσάνοι, Καραγκούνηδες) να είναι τρεις γενεές καθαροί μεταξύ τους.

Η καθαρότητα τους ελέγχθηκε και εθνολογικά (βλάχικη γλώσσα, επάγγελμα, γνώση και ενασχόληση με τα σχετικά έθιμα, συμμετοχή σε συλλόγους κ.λπ.) με στόχο την επιβεβαίωση της κατάταξης των ατόμων στον ανάλογο πληθυσμό.

Υλικό: 15 ml ολικού αίματος, μετά από φλεβοκέντηση σε σωληνάριο με αντιπηκτικό Na₂ EDTA.

Μέθοδος ατομική αιμοληψία ή ομαδική από συνεργεία αιμοληψίας κατόπιν συνεννοήσεως. Το ληφθέν δείγμα αίματος διατηρείται στους -20°C, αποστέλλεται στο Ε.Κ.Ι. σε χρόνο 30 ημερών σε ψυγείο αιμοδοσίας.

Στοιχεία δειγμάτων

- Ηλικία
 - Φύλο
 - Τόπος γέννησης
 - Καταγωγή
 - Διαμονή
 - Ατομικό Ιστορικό
 - Κληρονομικό ιστορικό.
 - Τυχόν γενετικά ή άλλα νοσήματα ή χρόνιες καταστάσεις που ενδιαφέρουν.
- } ενδιαφέροντα στοιχεία μόνο

ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ ΜΕΛΕΤΗΣ ΤΩΝ ΑΝΤΙΓΟΝΩΝ ΗΛΑ ΑΠΟ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΤΟΥ ΠΕΡΙΦΕΡΙΚΟΥ ΑΙΜΑΤΟΣ ΤΟΥ ΠΛΗΘΥΣΜΟΥ ΤΗΣ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

2.1. Απομόνωση του γονιδιωματικού DNA από λευκά αιμοσφαίρια περιφερικού αίματος.

Η μέθοδος χρησιμοποιεί ως πηγή DNA τα εμπύρνηνα κύτταρα του αίματος.

Η εκχύλιση του DNA περιλαμβάνει τα ακόλουθα στάδια:

- ❖ οσμωτική λύση των ερυθροκυττάρων και συλλογή των εμπύρνηνων λευκών,
- ❖ διάσπαση των κυτταρικών μεμβρανών των λευκοκυττάρων και συλλογή των πυρήνων με φυγοκέντρωση,
- ❖ λύση των πυρηνικών μεμβρανών,
- ❖ επώαση του πυρηνικού υλικού με πρωτεϊνάση για την άμεση καταστροφή των νουκλεασών,
- ❖ απομάκρυνση των πρωτεϊνών και της πρωτεϊνάσης παρουσία κεκορεσμένου διαλύματος NaCl,
- ❖ κατακρήμνιση του ευρισκόμενου στο υψηλής συγκέντρωσης σε άλας

διάλυμα, DNA με την προσθήκη αλκοόλης.

Η μεθοδολογία που ακολουθήσαμε αναλυτικά στην απομόνωση του DNA, είναι η εξής:

Σε αρχικό όγκο αίματος 10 ml προστίθενται 15 ml διαλύματος, 155mM NH₄Cl, 10mM KHCO₃, 1mM EDTA pH: 7,5 ακολουθεί επώαση στους 4°C για 50 min και φυγοκέντρηση στις 4000rpm στους 4°C για 15min. Μετά την απομάκρυνση του υπερκείμενου διαλύματος προστίθενται 7.5 ml διαλύματος λύσης I και ακολουθεί ήπια ανακίνηση και φυγοκέντρηση στις 4000rpm στους 4°C, για 15min. Η παραπάνω διαδικασία επαναλαμβάνεται δύο φορές. Στη συνέχεια προστίθενται 2.5 ml διαλύματος 10mM Tris, 400mM NaCl, 2mM EDTA, pH: 7,5 και το μείγμα ανακινείται έως ότου διαλυθεί το ίζημα. Ακολουθεί παραμονή σε θερμοκρασία δωματίου για 15min και προστίθενται 200μl διαλύματος 10% SDS και 200μl πρωτεϊνάσης K παρέχεται σε σκόνη, (χρησιμοποιείται σε διάλυμα 100 mM Tris, 50 mM EDTA pH:7,5).

Το μείγμα επωάζεται στους 55°C για 1h ενώ ακολουθεί προσθήκη 1ml 6M NaCl, ισχυρή ανακίνηση και φυγοκέντρηση στις 4000rpm στους 4°C για 15min. Το υπερκείμενο διάλυμα μεταγγίζεται σε νέους σωλήνες και φυγοκεντρείται στις 6000 rpm, στους 4°C, για 15min.

Το υπερκείμενο μεταγγίζεται εκ νέου και προστίθεται διπλάσια ποσότητα απόλυτης αιθανόλης.

Ακολουθεί κατακρήμνιση του DNA, έκπλυση με 70% αιθανόλη και επαναδιάλυση σε κατάλληλο όγκο ddH₂O. Ακολουθεί μέτρηση της οπτικής πυκνότητας για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης και του βαθμού καθαρότητας του δείγματος χρησιμοποιώντας το λόγο της απορρόφησης στα 260nm προς την απορρόφηση στα 280nm. (Sanchez et al 1996, Xiao L et al 2003)

Αυτή η διαδικασία είναι γρήγορη και παράγει υψηλής καθαρότητας DNA το οποίο στη συνέχεια μπορεί να ενισχυθεί με την χρήση ειδικής αλληλουχίας εκκινητών (PCR – Sequence Specific Primers, PCR – SSP), για τον προσδιορισμό των τάξης I και II HLA – γονιδίων.

2.2. Γονιδιακή τυποποίηση των HLA τάξης I (-A, -B, -C) και HLA τάξης II (DRB₁).

Η τυποποίηση των HLA- τάξης I και II αλληλομόρφων γονιδίων πραγματοποιείται με τη διαδικασία της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης όπου χρησιμοποιούνται εκκινητές ειδικοί για την αλληλουχία στόχο (PCR-SSP, Sequence specific primers). Η διαδικασία βασίζεται στο πρωτόκολλο που περιγράφουν οι Olerup et al 1993. Αρχικά απομονώνεται γονιδιωματικό DNA από λευκά αιμοσφαίρια το οποίο χρησιμοποιείται ως μήτρα στην αντίδραση (~100 ng). Στη συνέχεια σχεδιάζονται εκκινητές ειδικοί για κάθε αλληλουχία - στόχο.

Η μέθοδος βασίζεται στην αρχή ότι ένας εκκινητής που υβριδίζει απόλυτα με την αλληλουχία - στόχο θα ενισχύσει πιο αποτελεσματικά το συγκεκριμένο τμήμα που ορίζει σε σχέση με ένα εκκινητή που παρουσιάζει μη συμπληρωματικές βάσεις με την αλληλουχία-στόχο. Η τυποποίηση βασίζεται στην ενίσχυση ή μη των τμημάτων που αντιστοιχούν σε κάθε αλληλόμορφο. Σε σωλήνα τύπου Eppendorf μεταφέρονται το DNA, 5 μl διάλυμα πολυμεράσης, 1 πολυμεράση, 0.5 mM από κάθε dNTP (1 mM από διάλυμα 10 mM), 10 pmole από κάθε εκκινητή και ddH₂O μέχρι τελικού όγκου 50 μl.

Αρχή της μεθόδου

Η μέθοδος PCR-SSP βασίζεται στην ταυτόχρονη χρήση ενός φάσματος (panel) αντιδράσεων κάθε ένα από τους οποίους έχει μια συγκεκριμένη ειδικότητα. Βασική αρχή της μεθόδου αποτελεί το γεγονός ότι, οι εκκινητές οι οποίοι είναι πλήρως συμπληρωματικοί προς τον στόχο του DNA που μας ενδιαφέρει, θα είναι πιο αποτελεσματικοί στην PCR από έναν εκκινητή με μία ή περισσότερες ασυμβατότητες στο 3' άκρο. Οι εκκινητές δρουν κατά τέτοιο τρόπο, εμποδίζοντας έτσι τον μη ειδικό πολλαπλασιασμό. Για τον προσδιορισμό των HLA-A, HLA-B, και HLA-C τάξης I και HLA – DRB₁ τάξης II γονιδίων χρησιμοποιήθηκε το εμπορικό σκεύασμα της Pel-Freez. Χρησιμοποιήθηκαν συνδυασμοί εκκινητών (24 για

το HLA-A.48 για τα HLA-B και 23 για το HLA-C).

Μετά την ολοκλήρωση της PCR, η παρουσία ή όχι προϊόντος αντίδρασης μπορεί να ελεγχθεί μετά από ηλεκτροφόρηση σε 2% πήκτωμα αγαρόζης και εξέταση του πηκτώματος κάτω από υπεριώδες φως. Τα αποτελέσματα ερμηνεύονται με την βοήθεια κατάλληλου πίνακα.

Επακριβής καθορισμός των HLA (-A, -B, -C) και HLA (-DRB₁) αλληλομόρφων

Ο προσδιορισμός των HLA τάξης I και II αλληλομόρφων με εφαρμογή της PCR-SSP με την βοήθεια των εμπορικών σκευασμάτων της Dynal (Dynal SSP typing kit) και της Olerup (Olerup SSP kit).

2.3. Γενετική και στατιστική ανάλυση

Για τη στατιστική επεξεργασία των δεδομένων χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό STATA 9.0, ενώ για την σύγκριση των ποσοτικών και ποιοτικών χαρακτηριστικών κατά την ανάλυση εφαρμόστηκαν τα παραμετρικά τέστ ANOVA και Pearson χ^2 . Η γενετική διερεύνηση των δεδομένων πραγματοποιήθηκε με το λογισμικό Helix Tree, ενώ τα μαθηματικά μοντέλα που χρησιμοποιούνται από το παραπάνω λογισμικό αναλύονται στην συνέχεια.

Ισορροπία Hardy-Weinberg

Το μοντέλο Hardy-Weinberg model μας δίνει την δυνατότητα να συγκρίνουμε την πραγματική δομή ενός πληθυσμού στο χρόνο με την γενετική δομή που θα αναμέναμε αν ο πληθυσμός ήταν σε ισορροπία Hardy-Weinberg. Αν οι συχνότητες των γονότυπων διαφέρουν από αυτές που θα αναμέναμε υπό ισορροπία, μπορούμε να υποθέσουμε ότι κάποια από τις προϋποθέσεις του μοντέλου παραβιάζεται και να επιχειρήσουμε να καθορίσουμε ποιά.

Με το στατιστικό τεστ του χ^2 που παρουσιάζεται στον Πίνακα 16 εξετάζεται αν οι παρατηρούμενες συχνότητες είναι σημαντικά διαφορετικές από τις αναμενόμενες, καθορίζοντας ως μηδενική υπόθεση την H_0 : δεν

υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των αναμενόμενων και των παρατηρηθέντων συχνοτήτων ή αλλιώς ο πληθυσμός είναι σε ισορροπία Hardy-Weinberg.

Αναμενόμενη συχνότητα απλότυπων

Τα γενετικά δεδομένα για το Helix Tree θεωρούνται ότι για κάθε άτομο και θέση χρωμοσώματος τα δύο αλληλία είναι γνωστά, αλλά ποιο ανήκει σε ποιο χρωμόσωμα είναι άγνωστο. Ωστόσο αυτό που παρουσιάζει το μεγαλύτερο ενδιαφέρον, είναι η μορφή των αλληλιών σε διαφορετικές τοποθεσίες στο ίδιο χρωμόσωμα, δηλαδή στους απλότυπους, οι οποίοι εξετάζονται και στην συγκεκριμένη μελέτη. Η εκτίμηση των συχνοτήτων των απλότυπων για τις επιλεγμένες τοποθεσίες, πραγματοποιείται με την χρήση του αλγορίθμου «αναμονής και μεγιστοποίησης» (Expectation/Maximization (EM) algorithm). Ξεκινώντας με είτε τυχαίου, είτε σύνθετου απλότυπου μέθοδο εκτιμώμενων πιθανοτήτων, κάθε επανάληψη του EM αλγόριθμου, υπολογίζει πιθανότητες για τους γονότυπους, βασισμένη στις πιθανότητες των αντίστοιχων απλοτύπων όπως εκτιμήθηκαν πριν, ή αρχικοποιήθηκαν προϋποθέτοντας τυχαίο ζευγάρι («Maximization» step).

Υπολογισμός του συντελεστή LD

Έστω K ένας γενετικός τόπος με αλληλία 1...k και συχνότητες p_1, \dots, p_k και M ένας γενετικός τόπος με αλληλία 1...m και συχνότητες q_1, \dots, q_m . Η συνεισφορά στην ισορροπία σύνδεσης για το αλληλίο i του γενετικού τόπου K και του j του M μπορεί να εκφραστεί ως:

$$D_{ij} = p_{ij} - p_i q_j$$

όπου p_{ij} είναι η απο κοινού συχνότητα για τα αλληλία i και j του ίδιου γαμέτη.

Με την χρήση του EM αλγορίθμου για την εκτίμηση απλότυπων, υπολογίζουμε τα p_{ij} , στη συνέχεια τα D_{ij} και έτσι μπορούμε να γράψουμε την X^2 κατανομή με $(k-1)(m-1)$ βαθμούς ελευθερίας

$$X^2 = n \sum_{i=1}^k \sum_{j=1}^m \frac{D_{ij}^2}{2p_i q_j}$$

και να υπολογίσουμε την p-τιμή

$$p = \text{chisq}(X^2, (k-1)(m-1))$$

καθώς και τον συντελεστή συσχέτισης R απο την αντίστροφη κατανομή για 1 βαθμό ελευθερίας ως:

$$R = \sqrt{\frac{F_{(p)}^{-1}}{n}}$$

Υπολογισμός LD για το D-prime

Έστω K και M δύο γενετικοί τόποι με αλληλία 1...k και 1...m με συχνότητες $p_1 \dots p_k$ και $q_1 \dots q_m$ αντίστοιχα. Σκοπός μας είναι να προσεγγίσουμε τον κανονικοποιημένο συντελεστή D' ο οποίος είναι ο LD διαιρεμένος με την μέγιστη δυνατή τιμή του. Χρησιμοποιώντας τον EM αλγόριθμο ορίζουμε τις συνεισφορές D' ως:

$$D'_{ij} = \begin{cases} D_{ij} / \min(p_i q_j, (1-p_i)(1-q_j)), & \text{if } D_{ij} < 0 \\ D_{ij} / \min((1-p_i)q_j, p_i(1-q_j)), & \text{αλλιώς} \end{cases}$$

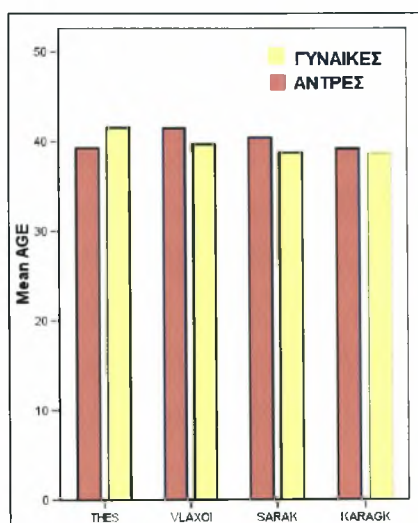
και

$$D' = \sum_{i=1}^k \sum_{j=1}^m p_i q_j |D'_{ij}|.$$

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Το δείγμα αποτέλεσαν 517 άτομα των οποίων αναλυτικά τα περιγραφικά στοιχεία παρουσιάζονται παρακάτω (Πίνακας 3).

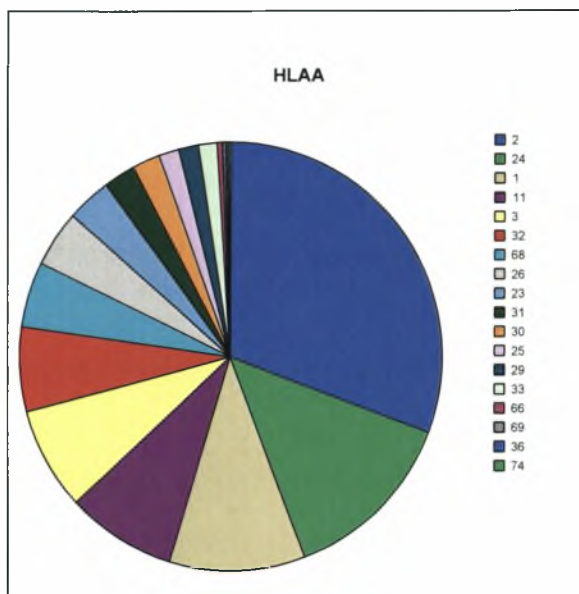
Πίνακας 3. Κατανομή στους 4 υπο μελέτη πληθυσμούς, φύλο και μέση ηλικία					
	ΑΡΙΘΜΟΣ	ΠΟΣΟΣΤΟ%	ΑΡΙΘΜΟΣ	ΠΟΣΟΣΤΟ%	(M.T±SD)
Επίμ. Θεσσαλοί	170	32,9	ΑΝΔΡΕΣ: 97 ΓΥΝΑΙΚΕΣ: 73	ΑΝΔΡΕΣ: 57,1 ΓΥΝΑΙΚΕΣ: 42,9	40,3±10,5
Βλάχοι	127	24,6	ΑΝΔΡΕΣ: 60 ΓΥΝΑΙΚΕΣ: 67	ΑΝΔΡΕΣ: 47,2 ΓΥΝΑΙΚΕΣ: 52,8	40,6±10,2
Σαρακατσάνοι	111	21,5	ΑΝΔΡΕΣ: 60 ΓΥΝΑΙΚΕΣ: 51	ΑΝΔΡΕΣ: 54,1 ΓΥΝΑΙΚΕΣ: 45,9	39,7±10,8
Καραγκούνηδες	109	21,1	ΑΝΔΡΕΣ: 57 ΓΥΝΑΙΚΕΣ: 52	ΑΝΔΡΕΣ: 52,3 ΓΥΝΑΙΚΕΣ: 47,7	39,0±10,0
Σύνολο	517	100			



Σχήμα 9. Μέση ηλικία ανα φύλο των 4 πληθυσμών.

Απο το Σχήμα 9 φαίνεται ότι δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στους πληθυσμούς όσον αφορά την ηλικία (ANOVA, P=0,66) γεγονός το οποίο δημιουργεί τις προϋποθέσεις για σύγκριση μεταξύ τους χωρίς περαιτέρω προσαρμογές (adjustments).

Σε μία γραφική αποτύπωση της συχνότητας με την οποία εμφανίζονται τα HLA-A παρατηρούμε ότι ο γονότυπος A*02 εμφανίζεται συχνότερα, ακολουθεί ο A*24 ενώ οι A*36 και A*74 παρουσιάζουν την μικρότερη συχνότητα (Σχήμα 10).



Σχήμα 10. Συχνότητα των γονότυπων των HLA-A.

Τα εν λόγω στοιχεία των γονότυπων των 4 HLA-τόπων στους υπο μελέτη πληθυσμούς σε ποσοστιαία μορφή, παρουσιάζονται στους παρακατω πίνακες. Αναλυτικά:

Πίνακας 4. Ποσοστιαία κατανομή των HLA-A αλληλίων επι των πληθυσμών				
	ΕΠΙΜ. ΘΕΣΣΑΛΟΙ	ΒΛΑΧΟΙ	ΣΑΡΑΚΑΤΣΑΝΟΙ	ΚΑΡΑΓΚΟΥΝΗΔΕΣ
A*01	10,0	9,4	12,2	11,0
A*02	32,1	31,5	27,9	30,7
A*03	7,1	7,5	10,8	6,0
A*11	7,6	9,4	9,9	6,9
A*23	4,7	4,3	0,9	2,8
A*24	13,8	12,6	12,6	14,7
A*25	0,6	0,8	0,5	5,0
A*26	3,8	5,9	4,5	2,8
A*29	0,9	0,8	3,2	1,8
A*30	2,4	3,1	0,9	1,8
A*31	3,5	2,8	1,8	0,9
A*32	6,8	5,1	5,9	7,8
A*33	0,6	1,2	3,2	1,4
A*36	0,3	0,0	0,5	0,0
A*66	0,6	0,4	0,0	0,5
A*68	4,7	4,7	5,0	5,5
A*69	0,3	0,4	0,0	0,5
A*74	0,3	0,0	0,5	0,0

Τα HLA-A αλλήλια παρουσιάζονται διαφορετικά σε στατιστικά σημαντικό βαθμό ($\chi^2(0,05)$, $p<0,05$) ανάμεσα σε ομαδοποιημένους πληθυσμούς. Συγκεκριμένα, η κατανομή τους φαίνεται να είναι διαφορετική ανάμεσα στους συνεννομένους πληθυσμούς:

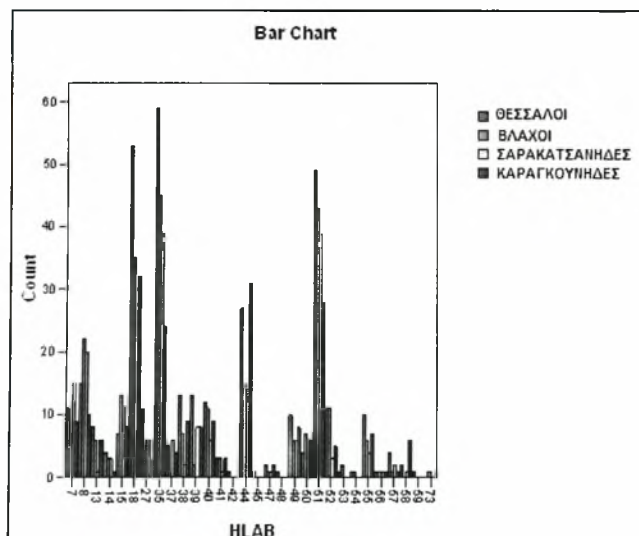
- Θεσσαλούς και Βλάχους με Σαρακατσάνους και Καραγκούνηδες ($\chi^2(0,05)$, $p<0,05$).
- Σαρακατσάνοι με Θεσσαλούς και Βλάχους και Καραγκούνηδες ($\chi^2(0,05)$, $p<0,05$).
- Καραγκούνηδες με Θεσσαλούς και Βλάχους και Σαρακατσάνους ($\chi^2(0,05)$, $p<0,05$).

Για τα HLA-B αλλήλια τώρα, φαίνεται να υπάρχει μια διαφοροποίηση στη συχνότητα με την οποία εμφανίζονται οι γονότυποι ανάμεσα στους πληθυσμούς χωρίς όμως η διαφορά να είναι στατιστικά σημαντική σε επίπεδο σημαντικότητας 5% ($\chi^2(0,05)$, $p=0,08$). Παρατηρούνται όμως και εδώ σημαντικές διαφορές στην συχνότητα με την οποία εμφανίζονται οι γονότυποι ανάμεσα στους πληθυσμούς:

- Θεσσαλούς και Σαρακατσάνους με Βλάχους και Καραγκούνηδες ($\chi^2(0,05)$, $p<0,05$).
- Σαρακατσάνους και Βλάχους με Θεσσαλούς και Καραγκούνηδες ($\chi^2(0,05)$, $p<0,05$).
- Καραγκούνηδες με Θεσσαλούς και Βλάχους και Σαρακατσάνους ($\chi^2(0,05)$, $p<0,05$).

Πίνακας 5. Ποσοστιαία κατανομή των HLA-B αλληλίων επι των πληθυσμών.

	ΕΠΙΜ. ΘΕΣΣΑΛΟΙ	ΒΛΑΧΟΙ	ΣΑΡΑΚΑΤΣΑΝΟΙ	ΚΑΡΑΓΚΟΥΝΗΔΕΣ
B*07	3,2	2,8	6,8	4,1
B*08	4,4	8,7	9,0	4,6
B*13	2,4	2,4	0,5	2,8
B*14	1,2	1,2	1,4	0,5
B*15	2,1	5,1	5,0	3,7
B*18	15,6	13,8	13,5	14,7
B*27	3,2	2,0	2,7	0,0
B*35	17,4	17,7	17,6	11,0
B*37	1,5	0,4	2,7	1,8
B*38	3,8	2,8	0,9	4,1
B*39	3,8	0,8	3,6	3,7
B*40	3,5	4,3	2,7	4,1
B*41	0,9	1,2	0,5	1,4
B*42	0,3	0,0	0,0	0,0
B*44	7,9	5,5	6,8	14,2
B*45	0,3	0,0	0,0	0,0
B*47	0,6	0,4	0,5	0,9
B*48	0,3	0,0	0,0	0,0
B*49	2,9	2,4	2,7	3,7
B*50	1,2	2,8	0,9	2,8
B*51	14,4	16,9	17,6	12,8
B*52	3,2	4,3	1,4	2,3
B*53	0,3	0,8	0,0	0,0
B*54	0,3	0,4	0,0	0,0
B*55	2,9	2,4	1,8	3,2
B*56	0,3	0,4	0,5	0,5
B*57	1,2	0,4	0,9	0,5
B*58	0,6	0,0	0,5	2,8
B*59	0,3	0,0	0,0	0,0
B*73	0,0	0,4	0,0	0,0



Σχήμα 11. Συχνότητα των γονότυπων των HLA-B ανάμεσα στους πληθυσμούς

Παρακάτω, παρατίθενται οι ποσοστιαίες κατανομές των HLA-CW και HLA-DRB₁ αλληλίων στους επιμέρους υπο μελέτη πληθυσμούς:

Πίνακας 6. Ποσοστιαία κατανομή των HLA-CW αλληλίων επι των πληθυσμών				
	ΕΠΙΜΙΚΤΟΙ ΘΕΣΣΑΛΟΙ	ΒΛΑΧΟΙ	ΣΑΡΑΚΑΤΣΑΝΟΙ	ΚΑΡΑΓΚΟΥΝΗΔΕΣ
CW*01	2,6	5,5	5,0	4,6
CW*02	6,2	4,3	5,0	9,2
CW*03	6,5	5,5	7,7	8,3
CW*04	17,9	17,7	21,2	12,4
CW*05	2,6	4,7	1,8	2,8
CW*06	6,8	4,7	2,7	9,2
CW*07	23,8	23,6	23,9	21,6
CW*08	2,1	2,4	2,3	0,9
CW*12	18,2	16,1	15,8	17,4
CW*14	1,8	2,0	3,6	1,4
CW*15	7,4	11,0	5,9	6,4
CW*16	3,2	1,6	3,6	5,0
CW*17	0,6	0,8	1,4	0,9
CW*18	0,3	0,0	0,5	0,0

Πίνακας 7. Ποσοστιαία κατανομή των HLA-DRB αλληλίων επι των πληθυσμών				
	ΕΠΙΜ. ΘΕΣΣΑΛΟΙ	ΒΛΑΧΟΙ	ΣΑΡΑΚΑΤΣΑΝΟΙ	ΚΑΡΑΓΚΟΥΝΗΔΕΣ
DRB*01	6,8	8,7	5,0	4,1
DRB*03	7,4	9,4	9,5	9,2
DRB*04	7,1	7,5	6,8	7,8
DRB*07	6,8	5,1	1,8	6,0
DRB*08	1,2	1,6	1,8	1,8
DRB*09	0,3	0,0	0,0	0,0
DRB*10	2,1	2,0	0,9	1,4
DRB*11	28,2	25,6	32,9	28,9
DRB*12	2,1	4,7	0,5	1,4
DRB*13	10,3	7,5	11,3	6,9
DRB*14	7,1	5,5	4,1	9,2
DRB*15	8,5	7,5	9,9	6,0
DRB*16	12,4	15,0	15,8	17,4

Στους πίνακες 8-11 παρουσιάζονται οι γονότυποι των HLA-A, HLA-B, HLA-CW και HLA-DRB₁, όπως προσδιορίστηκαν στον πληθυσμό των Θεσσαλών, των Βλάχων, των Σαρακατσάνων και των Καραγκούνηδων.

Πίνακας 8. Οι γονότυποι των 4 HLA-τόπων στον πληθυσμό των Επίμ. Θεσσαλών

A*01_A*01	0,6	B*07_B*07	0,6	CW*01_CW*01	0,6	DRB*01_DRB*01	0,6
A*01_A*02	6,5	B*07_B*15	0,6	CW*01_CW*02	0,6	DRB*01_DRB*03	2,4
A*01_A*03	1,2	B*07_B*35	1,2	CW*01_CW*05	1,8	DRB*01_DRB*04	0,6
A*01_A*11	1,2	B*07_B*39	0,6	CW*01_CW*06	0,6	DRB*01_DRB*07	0,6
A*01_A*23	1,2	B*07_B*40	0,6	CW*01_CW*15	1,2	DRB*01_DRB*11	3,5
A*01_A*24	3,5	B*07_B*51	1,8	CW*02_CW*02	0,6	DRB*01_DRB*14	1,8
A*01_A*26	0,6	B*07_B*55	0,6	CW*02_CW*03	0,6	DRB*01_DRB*15	1,8
A*01_A*3	0,6	B*08_B*08	0,6	CW*02_CW*04	2,4	DRB*01_DRB*16	1,8
A*01_A*30	0,6	B*08_B*13	0,6	CW*02_CW*06	1,8	DRB*03_DRB*03	1,2
A*01_A*31	0,6	B*08_B*18	0,6	CW*02_CW*07	1,8	DRB*03_DRB*04	0,6
A*01_A*32	2,4	B*08_B*35	2,4	CW*02_CW*12	1,8	DRB*03_DRB*11	5,9
A*01_A*36	0,6	B*08_B*39	0,6	CW*02_CW*14	0,6	DRB*03_DRB*12	0,6
A*02_A*02	11,2	B*08_B*40	0,6	CW*02_CW*15	1,2	DRB*03_DRB*13	1,8
A*02_A*03	3,5	B*08_B*44	2,4	CW*02_CW*16	0,6	DRB*03_DRB*14	0,6
A*02_A*11	5,3	B*08_B*55	0,6	CW*03_CW*03	1,2	DRB*03_DRB*16	0,6
A*02_A*23	2,4	B*13_B*13	0,6	CW*03_CW*04	0,6	DRB*04_DRB*04	1,2
A*02_A*24	10,0	B*13_B*15	1,2	CW*03_CW*06	0,6	DRB*04_DRB*08	0,6
A*02_A*25	0,6	B*13_B*18	1,2	CW*03_CW*07	4,7	DRB*04_DRB*10	1,8
A*02_A*26	1,2	B*13_B*35	0,6	CW*03_CW*12	2,4	DRB*04_DRB*11	4,7
A*02_A*29	1,8	B*14_B*14	0,6	CW*03_CW*15	1,2	DRB*04_DRB*13	0,6
A*02_A*30	0,6	B*14_B*18	0,6	CW*03_CW*16	0,6	DRB*04_DRB*14	1,2
A*02_A*31	1,2	B*14_B*51	0,6	CW*04_CW*04	7,1	DRB*04_DRB*15	1,2
A*02_A*32	4,7	B*15_B*18	0,6	CW*04_CW*06	1,2	DRB*04_DRB*16	0,6
A*02_A*33	0,6	B*15_B*49	0,6	CW*04_CW*07	8,2	DRB*07_DRB*07	0,6
A*02_A*68	2,9	B*15_B*50	0,6	CW*04_CW*12	5,9	DRB*07_DRB*10	1,2
A*03_A*11	1,8	B*15_B*51	0,6	CW*04_CW*14	0,6	DRB*07_DRB*11	4,7
A*03_A*23	1,2	B*18_B*18	4,1	CW*04_CW*15	1,8	DRB*07_DRB*12	0,6
A*03_A*24	2,9	B*18_B*35	4,1	CW*04_CW*16	0,6	DRB*07_DRB*13	2,4
A*03_A*26	1,2	B*18_B*38	1,8	CW*04_CW*17	0,6	DRB*07_DRB*15	1,2
A*03_A*31	0,6	B*18_B*39	1,2	CW*05_CW*07	1,2	DRB*07_DRB*16	1,8
A*03_A*32	0,6	B*18_B*40	1,2	CW*05_CW*12	0,6	DRB*08_DRB*11	1,8
A*03_A*68	0,6	B*18_B*41	1,2	CW*05_CW*15	0,6	DRB*09_DRB*11	0,6
A*11_A*11	0,6	B*18_B*44	1,2	CW*05_CW*16	1,2	DRB*10_DRB*15	0,6
A*11_A*23	1,8	B*18_B*47	1,2	CW*06_CW*06	0,6	DRB*10_DRB*16	0,6
A*11_A*24	1,2	B*18_B*49	0,6	CW*06_CW*07	4,1	DRB*11_DRB*11	7,1
A*11_A*26	1,2	B*18_B*51	4,7	CW*06_CW*12	2,9	DRB*11_DRB*12	1,2
A*11_A*30	0,6	B*18_B*52	0,6	CW*06_CW*14	1,2	DRB*11_DRB*13	5,3
A*11_A*32	0,6	B*18_B*55	1,8	CW*07_CW*07	5,9	DRB*11_DRB*14	5,9
A*11_A*66	0,6	B*18_B*57	0,6	CW*07_CW*08	0,6	DRB*11_DRB*15	4,7
A*23_A*24	0,6	B*27_B*27	0,6	CW*07_CW*12	7,6	DRB*11_DRB*16	4,1
A*23_A*31	0,6	B*27_B*35	1,2	CW*07_CW*14	0,6	DRB*12_DRB*13	1,2
A*23_A*68	1,8	B*27_B*37	1,2	CW*07_CW*15	4,1	DRB*12_DRB*16	0,6
A*24_A*24	1,2	B*27_B*38	0,6	CW*07_CW*16	1,8	DRB*13_DRB*14	1,8
A*24_A*26	2,4	B*27_B*44	1,8	CW*07_CW*17	0,6	DRB*13_DRB*15	2,4
A*24_A*30	0,6	B*27_B*58	0,6	CW*07_CW*18	0,6	DRB*13_DRB*16	5,3
A*24_A*31	1,8	B*35_B*35	5,3	CW*08_CW*08	1,2	DRB*14_DRB*15	1,2

A*24_A*32	1,2	B*35_B*37	0,6	CW*08_CW*12	0,6	DRB*14_DRB*16	1,8
A*24_A*68	1,2	B*35_B*38	1,2	CW*08_CW*16	0,6	DRB*15_DRB*15	0,6
A*25_A*68	0,6	B*35_B*39	0,6	CW*12_CW*12	5,9	DRB*15_DRB*16	2,9
A*26_A*02	0,6	B*35_B*40	1,2	CW*12_CW*14	0,6	DRB*16_DRB*16	2,4
A*26_A*68	0,6	B*35_B*41	0,6	CW*12_CW*15	1,8		
A*30_A*31	1,2	B*35_B*42	0,6	CW*12_CW*16	0,6		
A*30_A*32	0,6	B*35_B*44	1,8	CW*15_CW*15	1,2		
A*30_A*68	0,6	B*35_B*49	1,2	CW*15_CW*16	0,6		
A*31_A*32	0,6	B*35_B*51	5,3				
A*31_A*69	0,6	B*35_B*52	0,6				
A*32_A*32	0,6	B*35_B*54	0,6				
A*32_A*66	0,6	B*35_B*55	0,6				
A*32_A*68	1,2	B*37_B*39	0,6				
A*33_A*74	0,6	B*37_B*51	0,6				
		B*38_B*39	0,6				
		B*38_B*40	0,6				
		B*38_B*44	1,2				
		B*38_B*50	0,6				
		B*38_B*51	0,6				
		B*38_B*52	0,6				
		B*39_B*51	1,2				
		B*39_B*52	0,6				
		B*39_B*53	0,6				
		B*39_B*57	0,6				
		B*39_B*59	0,6				
		B*40_B*50	0,6				
		B*40_B*51	1,2				
		B*40_B*55	0,6				
		B*40_B*58	0,6				
		B*44_B*44	1,2				
		B*44_B*45	0,6				
		B*44_B*49	1,2				
		B*44_B*51	1,2				
		B*44_B*52	1,2				
		B*44_B*55	1,2				
		B*48_B*52	0,6				
		B*49_B*50	0,6				
		B*49_B*51	1,2				
		B*49_B*52	0,6				
		B*51_B*51	3,5				
		B*51_B*52	1,2				
		B*51_B*55	0,6				
		B*51_B*56	0,6				
		B*51_B*57	0,6				
		B*52_B*57	0,6				

A*01_A*02	6,3	B*07_B*13	0,8	CW*01_CW*03	1,6	DRB*01_DRB*01	0,8
A*01_A*03	0,8	B*07_B*18	1,6	CW*01_CW*04	0,8	DRB*01_DRB*03	1,6
A*01_A*11	0,8	B*07_B*35	1,6	CW*01_CW*06	1,6	DRB*01_DRB*04	2,4
A*01_A*23	1,6	B*07_B*44	0,8	CW*01_CW*07	2,4	DRB*01_DRB*07	0,8
A*01_A*24	2,4	B*07_B*51	0,8	CW*01_CW*12	1,6	DRB*01_DRB*10	0,8
A*01_A*25	0,8	B*08_B*08	1,6	CW*01_CW*15	3,1	DRB*01_DRB*11	2,4
A*01_A*26	1,6	B*08_B*15	1,6	CW*02_CW*04	2,4	DRB*01_DRB*13	0,8
A*01_A*31	2,4	B*08_B*18	1,6	CW*02_CW*07	2,4	DRB*01_DRB*14	0,8
A*01_A*32	0,8	B*08_B*27	0,8	CW*02_CW*08	0,8	DRB*01_DRB*15	1,6
A*01_A*68	1,6	B*08_B*35	2,4	CW*02_CW*12	3,1	DRB*01_DRB*16	4,7
A*02_A*02	11	B*08_B*40	0,8	CW*03_CW*04	2,4	DRB*03_DRB*03	1,6
A*02_A*03	3,9	B*08_B*49	0,8	CW*03_CW*07	3,1	DRB*03_DRB*10	0,8
A*02_A*11	5,5	B*08_B*50	0,8	CW*03_CW*12	1,6	DRB*03_DRB*11	7,1
A*02_A*23	3,9	B*08_B*51	3,1	CW*03_CW*14	0,8	DRB*03_DRB*12	0,8
A*02_A*24	7,9	B*08_B*52	1,6	CW*03_CW*15	0,8	DRB*03_DRB*14	0,8
A*02_A*26	2,4	B*08_B*55	0,8	CW*03_CW*16	0,8	DRB*03_DRB*15	3,1
A*02_A*29	0,8	B*13_B*35	1,6	CW*04_CW*04	3,9	DRB*03_DRB*16	1,6
A*02_A*30	1,6	B*13_B*38	0,8	CW*04_CW*05	2,4	DRB*04_DRB*04	0,8
A*02_A*31	0,8	B*13_B*52	0,8	CW*04_CW*06	0,8	DRB*04_DRB*07	0,8
A*02_A*32	3,1	B*13_B*73	0,8	CW*04_CW*07	9,4	DRB*04_DRB*11	1,6
A*02_A*33	0,8	B*14_B*35	0,8	CW*04_CW*08	0,8	DRB*04_DRB*13	0,8
A*02_A*68	3,1	B*14_B*40	0,8	CW*04_CW*12	6,3	DRB*04_DRB*14	3,1
A*03_A*11	4,7	B*14_B*51	0,8	CW*04_CW*15	2,4	DRB*04_DRB*15	1,6
A*03_A*24	0,8	B*15_B*15	1,6	CW*05_CW*05	1,6	DRB*04_DRB*16	2,4
A*03_A*25	0,8	B*15_B*18	0,8	CW*05_CW*07	0,8	DRB*07_DRB*08	0,8
A*03_A*30	0,8	B*15_B*27	0,8	CW*05_CW*12	0,8	DRB*07_DRB*11	2,4
A*03_A*31	0,8	B*15_B*51	1,6	CW*05_CW*14	2,4	DRB*07_DRB*12	0,8
A*03_A*68	2,4	B*15_B*52	0,8	CW*06_CW*06	0,8	DRB*07_DRB*13	0,8
A*11_A*11	0,8	B*18_B*18	2,4	CW*06_CW*07	0,8	DRB*07_DRB*14	0,8
A*11_A*23	0,8	B*18_B*35	3,9	CW*06_CW*12	3,1	DRB*07_DRB*16	3,1
A*11_A*24	0,8	B*18_B*37	0,8	CW*06_CW*15	1,6	DRB*08_DRB*11	0,8
A*11_A*30	0,8	B*18_B*38	0,8	CW*07_CW*07	7,1	DRB*08_DRB*13	0,8
A*11_A*31	0,8	B*18_B*40	2,4	CW*07_CW*08	0,8	DRB*08_DRB*15	0,8
A*11_A*32	1,6	B*18_B*44	1,6	CW*07_CW*12	7,1	DRB*10_DRB*11	0,8
A*11_A*68	0,8	B*18_B*51	3,9	CW*07_CW*14	0,8	DRB*10_DRB*16	1,6
A*23_A*23	0,8	B*18_B*52	1,6	CW*07_CW*15	5,5	DRB*11_DRB*11	5,5
A*23_A*24	0,8	B*18_B*55	0,8	CW*08_CW*08	0,8	DRB*11_DRB*12	2,4
A*24_A*02	0,8	B*18_B*56	0,8	CW*08_CW*15	0,8	DRB*11_DRB*13	3,9
A*24_A*11	0,8	B*18_B*57	0,8	CW*12_CW*12	0,8	DRB*11_DRB*14	3,9
A*24_A*24	1,6	B*27_B*35	0,8	CW*12_CW*15	3,9	DRB*11_DRB*15	3,1
A*24_A*26	2,4	B*27_B*41	0,8	CW*12_CW*16	2,4	DRB*11_DRB*16	9,4
A*24_A*30	0,8	B*27_B*44	0,8	CW*12_CW*17	0,8	DRB*12_DRB*12	0,8
A*24_A*32	3,1	B*35_B*15	1,6	CW*15_CW*15	1,6	DRB*12_DRB*13	0,8
A*24_A*68	0,8	B*35_B*35	3,1	CW*15_CW*17	0,8	DRB*12_DRB*14	1,6
A*26_A*26	1,6	B*35_B*38	1,6			DRB*12_DRB*15	1,6
A*26_A*30	1,6	B*35_B*40	0,8			DRB*13_DRB*04	0,8
A*26_A*68	0,8	B*35_B*41	0,8			DRB*13_DRB*13	0,8

A*29_A*33	0,8	B*35_B*44	0,8		DRB*13_DRB*15	2,4
A*30_A*24	0,8	B*35_B*47	0,8		DRB*13_DRB*16	1,6
A*31_A*69	0,8	B*35_B*49	2,4		DRB*16_DRB*11	2,4
A*32_A*33	0,8	B*35_B*50	1,6		DRB*16_DRB*13	0,8
A*32_A*66	0,8	B*35_B*51	5,5		DRB*16_DRB*15	0,8
		B*35_B*52	1,6		DRB*16_DRB*16	0,8
		B*35_B*53	0,8			
		B*38_B*40	0,8			
		B*38_B*51	0,8			
		B*38_B*55	0,8			
		B*39_B*40	0,8			
		B*39_B*49	0,8			
		B*40_B*51	1,6			
		B*40_B*52	0,8			
		B*41_B*51	0,8			
		B*44_B*44	1,6			
		B*44_B*49	0,8			
		B*44_B*51	2,4			
		B*44_B*55	0,8			
		B*50_B*50	0,8			
		B*50_B*51	0,8			
		B*51_B*18	1,6			
		B*51_B*51	3,1			
		B*51_B*52	1,6			
		B*51_B*54	0,8			
		B*51_B*55	1,6			
		B*53_B*50	0,8			

Πίνακας 10. Οι γονότυποι των 4 HLA-τόπων στον πληθυσμό των Σαρακατσάνων

A*01_A*01	4,5	B*07_B*08	0,9	CW*01_CW*03	0,9	DRB*01_DRB*03	0,9
A*01_A*02	3,6	B*07_B*15	0,9	CW*01_CW*04	0,9	DRB*01_DRB*04	0,9
A*01_A*03	2,7	B*07_B*18	3,6	CW*01_CW*07	5,4	DRB*01_DRB*10	0,9
A*01_A*11	1,8	B*07_B*35	0,9	CW*01_CW*15	1,8	DRB*01_DRB*11	3,6
A*01_A*24	2,7	B*07_B*39	0,9	CW*01_CW*16	0,9	DRB*01_DRB*12	0,9
A*01_A*26	0,9	B*07_B*44	0,9	CW*02_CW*03	1,8	DRB*01_DRB*13	0,9
A*01_A*29	0,9	B*07_B*49	0,9	CW*02_CW*04	2,7	DRB*01_DRB*16	1,8
A*01_A*32	0,9	B*07_B*51	3,6	CW*02_CW*07	1,8	DRB*03_DRB*04	0,9
A*01_A*36	0,9	B*07_B*57	0,9	CW*02_CW*08	0,9	DRB*03_DRB*08	0,9
A*01_A*68	0,9	B*08_B*08	3,6	CW*02_CW*12	2,7	DRB*03_DRB*11	6,3
A*02_A*02	8,1	B*08_B*18	0,9	CW*03_CW*03	0,9	DRB*03_DRB*13	2,7
A*02_A*03	4,5	B*08_B*27	0,9	CW*03_CW*04	0,9	DRB*03_DRB*14	3,6
A*02_A*11	4,5	B*08_B*35	2,7	CW*03_CW*06	0,9	DRB*03_DRB*15	1,8
A*02_A*2	0,9	B*08_B*38	0,9	CW*03_CW*07	2,7	DRB*03_DRB*16	1,8
A*02_A*23	1,8	B*08_B*44	0,9	CW*03_CW*12	0,9	DRB*04_DRB*04	0,9
A*02_A*24	9,0	B*08_B*49	0,9	CW*03_CW*14	1,8	DRB*04_DRB*11	6,3
A*02_A*25	0,9	B*08_B*51	1,8	CW*03_CW*15	0,9	DRB*04_DRB*15	2,7
A*02_A*26	0,9	B*08_B*55	0,9	CW*03_CW*16	1,8	DRB*04_DRB*16	0,9
A*02_A*29	3,6	B*13_B*51	0,9	CW*04_CW*04	5,4	DRB*07_DRB*11	1,8

A*02_A*30	0,9	B*14_B*18	0,9	CW*04_CW*05	0,9	DRB*07_DRB*15	0,9
A*02_A*32	3,6	B*14_B*35	0,9	CW*04_CW*07	12,6	DRB*07_DRB*16	0,9
A*02_A*33	0,9	B*14_B*38	0,9	CW*04_CW*08	1,8	DRB*08_DRB*11	2,7
A*02_A*68	3,6	B*15_B*15	1,8	CW*04_CW*12	4,5	DRB*10_DRB*11	0,9
A*03_A*03	4,5	B*15_B*18	0,9	CW*04_CW*15	3,6	DRB*11_DRB*11	10,8
A*03_A*11	1,8	B*15_B*27	1,8	CW*04_CW*16	0,9	DRB*11_DRB*13	6,3
A*03_A*24	0,9	B*15_B*47	0,9	CW*04_CW*17	1,8	DRB*11_DRB*14	0,9
A*03_A*26	0,9	B*15_B*51	1,8	CW*05_CW*07	1,8	DRB*11_DRB*15	6,3
A*03_A*68	0,9	B*18_B*18	1,8	CW*05_CW*14	0,9	DRB*11_DRB*16	9,0
A*03_A*74	0,9	B*18_B*35	6,3	CW*06_CW*12	2,7	DRB*13_DRB*13	1,8
A*11_A*24	1,8	B*18_B*40	0,9	CW*06_CW*14	0,9	DRB*13_DRB*14	0,9
A*11_A*29	0,9	B*18_B*44	1,8	CW*06_CW*15	0,9	DRB*13_DRB*15	2,7
A*11_A*31	0,9	B*18_B*50	0,9	CW*07_CW*03	0,9	DRB*13_DRB*16	5,4
A*11_A*32	1,8	B*18_B*51	7,2	CW*07_CW*07	4,5	DRB*14_DRB*15	1,8
A*11_A*33	3,6	B*27_B*35	1,8	CW*07_CW*12	9,0	DRB*14_DRB*16	0,9
A*11_A*68	1,8	B*27_B*44	0,9	CW*07_CW*14	2,7	DRB*15_DRB*16	3,6
A*24_A*24	3,6	B*35_B*35	3,6	CW*07_CW*15	0,9	DRB*16_DRB*16	3,6
A*24_A*31	0,9	B*35_B*37	1,8	CW*07_CW*18	0,9		
A*24_A*32	0,9	B*35_B*39	0,9	CW*08_CW*08	0,9		
A*24_A*33	0,9	B*35_B*40	0,9	CW*12_CW*04	0,9		
A*24_A*68	0,9	B*35_B*41	0,9	CW*12_CW*12	3,6		
A*26_A*11	0,9	B*35_B*44	2,7	CW*12_CW*14	0,9		
A*26_A*26	1,8	B*35_B*51	4,5	CW*12_CW*15	0,9		
A*26_A*31	0,9	B*35_B*52	0,9	CW*12_CW*16	0,9		
A*26_A*32	0,9	B*35_B*55	0,9	CW*12_CW*17	0,9		
A*29_A*32	0,9	B*35_B*56	0,9	CW*15_CW*16	2,7		
A*30_A*31	0,9	B*35_B*57	0,9				
A*32_A*32	0,9	B*37_B*39	1,8				
A*32_A*68	0,9	B*37_B*51	1,8				
A*33_A*68	0,9	B*39_B*51	2,7				
		B*39_B*52	0,9				
		B*40_B*40	0,9				
		B*40_B*51	1,8				
		B*44_B*44	0,9				
		B*44_B*51	4,5				
		B*49_B*49	0,9				
		B*49_B*51	0,9				
		B*49_B*55	0,9				
		B*50_B*51	0,9				
		B*51_B*51	0,9				
		B*51_B*52	0,9				
		B*55_B*58	0,9				

Πίνακας 11. Οι γονότυποι των 4 HLA-τόπων στον πληθυσμό των Καρακούνηδων

A*01_A*01	2,8	B*07_B*15	0,9	CW*01_CW*01	0,9	DRB*01_DRB*11	3,7
A*01_A*02	7,3	B*07_B*18	1,8	CW*01_CW*03	1,8	DRB*01_DRB*13	1,8
A*01_A*03	1,8	B*07_B*35	1,8	CW*01_CW*04	1,8	DRB*01_DRB*14	2,8
A*01_A*11	0,9	B*07_B*39	0,9	CW*01_CW*05	0,9	DRB*03_DRB*04	0,9
A*01_A*24	3,7	B*07_B*44	1,8	CW*01_CW*07	2,8	DRB*03_DRB*07	1,8
A*01_A*32	2,8	B*07_B*55	0,9	CW*02_CW*02	0,9	DRB*03_DRB*08	1,8
A*02_A*02	9,2	B*08_B*13	1,8	CW*02_CW*05	0,9	DRB*03_DRB*11	6,4
A*02_A*03	3,7	B*08_B*18	1,8	CW*02_CW*06	3,7	DRB*03_DRB*12	1,8
A*02_A*11	2,8	B*08_B*35	0,9	CW*02_CW*07	3,7	DRB*03_DRB*13	0,9
A*02_A*23	0,9	B*08_B*38	0,9	CW*02_CW*12	6,4	DRB*03_DRB*14	2,8
A*02_A*24	9,2	B*08_B*39	0,9	CW*02_CW*15	0,9	DRB*03_DRB*16	0,9
A*02_A*25	2,8	B*08_B*40	0,9	CW*02_CW*16	0,9	DRB*04_DRB*04	1,8
A*02_A*26	0,9	B*08_B*44	0,9	CW*03_CW*03	0,9	DRB*04_DRB*07	1,8
A*02_A*29	3,7	B*08_B*51	0,9	CW*03_CW*04	0,9	DRB*04_DRB*11	3,7
A*02_A*31	1,8	B*13_B*13	0,9	CW*03_CW*06	0,9	DRB*04_DRB*13	0,9
A*02_A*32	4,6	B*13_B*18	0,9	CW*03_CW*07	2,8	DRB*04_DRB*14	0,9
A*02_A*33	0,9	B*13_B*51	0,9	CW*03_CW*12	3,7	DRB*04_DRB*15	0,9
A*02_A*68	3,7	B*14_B*52	0,9	CW*03_CW*15	0,9	DRB*04_DRB*16	1,8
A*02_A*69	0,9	B*15_B*35	0,9	CW*03_CW*16	1,8	DRB*07_DRB*07	0,9
A*03_A*03	0,9	B*15_B*37	0,9	CW*04_CW*04	2,8	DRB*07_DRB*11	1,8
A*03_A*24	0,9	B*15_B*38	0,9	CW*04_CW*06	0,9	DRB*07_DRB*14	0,9
A*03_A*26	0,9	B*15_B*44	1,8	CW*04_CW*07	5,5	DRB*07_DRB*15	1,8
A*03_A*30	0,9	B*15_B*49	0,9	CW*04_CW*12	6,4	DRB*07_DRB*16	1,8
A*03_A*32	0,9	B*15_B*51	0,9	CW*04_CW*15	2,8	DRB*08_DRB*11	0,9
A*03_A*68	0,9	B*18_B*18	2,8	CW*04_CW*17	0,9	DRB*08_DRB*16	0,9
A*11_A*11	1,8	B*18_B*35	1,8	CW*05_CW*05	0,9	DRB*10_DRB*11	0,9
A*11_A*23	0,9	B*18_B*39	0,9	CW*05_CW*15	0,9	DRB*10_DRB*14	0,9
A*11_A*24	0,9	B*18_B*40	2,8	CW*05_CW*6	0,9	DRB*10_DRB*16	0,9
A*11_A*25	1,8	B*18_B*41	0,9	CW*06_CW*03	1,8	DRB*11_DRB*03	0,9
A*11_A*26	0,9	B*18_B*44	4,6	CW*06_CW*07	4,6	DRB*11_DRB*11	11
A*11_A*30	0,9	B*18_B*47	0,9	CW*06_CW*08	0,9	DRB*11_DRB*12	0,9
A*11_A*33	0,9	B*18_B*49	0,9	CW*06_CW*12	1,8	DRB*11_DRB*13	1,8
A*23_A*24	1,8	B*18_B*50	0,9	CW*06_CW*14	0,9	DRB*11_DRB*14	4,6
A*23_A*26	0,9	B*18_B*51	3,7	CW*06_CW*15	0,9	DRB*11_DRB*15	0,9
A*23_A*32	0,9	B*18_B*55	0,9	CW*06_CW*16	0,9	DRB*11_DRB*16	4,6
A*24_A*24	0,9	B*18_B*58	0,9	CW*07_CW*07	3,7	DRB*13_DRB*11	0,9
A*24_A*25	2,8	B*35_B*35	1,8	CW*07_CW*12	9,2	DRB*13_DRB*13	0,9
A*24_A*26	0,9	B*35_B*38	1,8	CW*07_CW*14	0,9	DRB*13_DRB*15	0,9
A*24_A*32	0,9	B*35_B*40	0,9	CW*07_CW*15	1,8	DRB*13_DRB*16	4,6
A*24_A*33	0,9	B*35_B*41	0,9	CW*07_CW*16	4,6	DRB*14_DRB*14	0,9
A*24_A*68	5,5	B*35_B*44	1,8	CW*08_CW*12	0,9	DRB*14_DRB*15	0,9
A*25_A*30	0,9	B*35_B*49	0,9	CW*12_CW*12	1,8	DRB*14_DRB*16	2,8
A*25_A*32	0,9	B*35_B*50	0,9	CW*12_CW*15	1,8	DRB*15_DRB*04	0,9
A*25_A*66	0,9	B*35_B*51	2,8	CW*12_CW*17	0,9	DRB*15_DRB*16	4,6
A*26_A*32	0,9	B*35_B*52	0,9	CW*15_CW*14	0,9	DRB*16_DRB*11	3,7

A*30_A*68	0,9	B*35_B*55	0,9	CW*15_CW*15	0,9	DRB*16_DRB*15	0,9
A*32_A*32	1,8	B*35_B*58	0,9	CW*16_CW*16	0,9	DRB*16_DRB*16	3,7
		B*37_B*39	0,9				
		B*37_B*40	0,9				
		B*37_B*44	0,9				
		B*38_B*41	0,9				
		B*38_B*44	1,8				
		B*38_B*49	0,9				
		B*38_B*58	0,9				
		B*39_B*44	0,9				
		B*39_B*49	0,9				
		B*39_B*51	0,9				
		B*39_B*58	0,9				
		B*40_B*50	0,9				
		B*40_B*51	0,9				
		B*40_B*55	0,9				
		B*44_B*44	3,7				
		B*44_B*47	0,9				
		B*44_B*49	0,9				
		B*44_B*50	0,9				
		B*44_B*51	3,7				
		B*49_B*51	1,8				
		B*50_B*55	0,9				
		B*50_B*58	0,9				
		B*51_B*51	2,8				
		B*51_B*52	1,8				
		B*51_B*57	0,9				
		B*51_B*58	0,9				
		B*52_B*55	0,9				
		B*55_B*56	0,9				

Ακολουθως, παρουσιάζονται οι αναμενόμενοι HLA- απλότυποι και οι πιθανότητες εμφάνισής τους στους υπο μελέτη πληθυσμούς.

Πίνακας 12. Οι αναμενόμενοι απλότυποι κατα φθίνουσα σειρά πιθανότητας, στον πληθυσμο των Επίμικτων Θεσσαλών.

A*02_B*18_CW*07_DRB*11	0,05159827	A*26_B*38_CW*05_DRB*13	0,00294118
A*02_B*51_CW*15_DRB*11	0,03529411	A*26_B*51_CW*07_DRB*04	0,00294118
A*02_B*35_CW*04_DRB*11	0,0264706	A*26_B*55_CW*03_DRB*16	0,00294118
A*01_B*08_CW*07_DRB*03	0,02352941	A*30_B*53_CW*04_DRB*13	0,00294118
A*23_B*44_CW*04_DRB*07	0,01764706	A*02_B*51_CW*15_DRB*14	0,00294118
A*02_B*27_CW*02_DRB*16	0,01176471	A*03_B*35_CW*03_DRB*13	0,00294118
A*24_B*18_CW*12_DRB*11	0,01090782	A*03_B*55_CW*07_DRB*15	0,00294118

A*02_B*18_CW*12_DRB*16	0,00927758	A*11_B*44_CW*04_DRB*11	0,00294118
A*11_B*35_CW*04_DRB*11	0,00882353	A*24_B*49_CW*12_DRB*07	0,00294118
A*02_B*44_CW*16_DRB*13	0,00882353	A*24_B*51_CW*01_DRB*01	0,00294118
A*01_B*35_CW*04_DRB*11	0,00882353	A*25_B*18_CW*12_DRB*04	0,00294118
A*24_B*39_CW*12_DRB*11	0,00882353	A*26_B*35_CW*04_DRB*13	0,00294118
A*68_B*51_CW*15_DRB*16	0,00882353	A*29_B*08_CW*07_DRB*03	0,00294118
A*24_B*35_CW*04_DRB*03	0,00882353	A*32_B*38_CW*12_DRB*15	0,00294118
A*02_B*51_CW*01_DRB*11	0,00882353	A*33_B*27_CW*02_DRB*13	0,00294118
A*32_B*50_CW*06_DRB*16	0,00882347	A*66_B*55_CW*03_DRB*07	0,00294118
A*24_B*18_CW*07_DRB*11	0,00882345	A*74_B*37_CW*06_DRB*11	0,00294118
A*02_B*35_CW*04_DRB*01	0,00882339	A*01_B*13_CW*06_DRB*07	0,00294118
A*02_B*15_CW*07_DRB*11	0,00882237	A*01_B*18_CW*07_DRB*11	0,00294118
A*01_B*52_CW*12_DRB*15	0,00812872	A*01_B*38_CW*12_DRB*04	0,00294118
A*02_B*13_CW*06_DRB*11	0,00677237	A*01_B*41_CW*17_DRB*03	0,00294118
A*02_B*18_CW*07_DRB*15	0,00677122	A*01_B*51_CW*06_DRB*14	0,00294118
A*24_B*35_CW*04_DRB*11	0,00673924	A*01_B*51_CW*15_DRB*14	0,00294118
A*02_B*35_CW*04_DRB*14	0,00588249	A*02_B*18_CW*12_DRB*15	0,00294118
A*11_B*18_CW*07_DRB*11	0,00588244	A*02_B*35_CW*01_DRB*16	0,00294118
A*02_B*40_CW*02_DRB*16	0,00588241	A*02_B*40_CW*03_DRB*13	0,00294118
A*23_B*49_CW*07_DRB*13	0,00588235	A*02_B*40_CW*03_DRB*14	0,00294118
A*02_B*51_CW*15_DRB*16	0,00588235	A*02_B*41_CW*16_DRB*03	0,00294118
A*02_B*39_CW*12_DRB*12	0,00588235	A*03_B*07_CW*03_DRB*04	0,00294118
A*03_B*08_CW*07_DRB*03	0,00588235	A*03_B*27_CW*02_DRB*08	0,00294118
A*11_B*35_CW*12_DRB*14	0,00588235	A*03_B*35_CW*04_DRB*09	0,00294118
A*24_B*35_CW*12_DRB*01	0,00588235	A*03_B*51_CW*03_DRB*12	0,00294118
A*26_B*39_CW*12_DRB*04	0,00588235	A*11_B*18_CW*12_DRB*15	0,00294118
A*01_B*15_CW*07_DRB*13	0,00588235	A*11_B*27_CW*02_DRB*16	0,00294118
A*01_B*44_CW*05_DRB*11	0,00588235	A*11_B*35_CW*04_DRB*16	0,00294118
A*02_B*49_CW*07_DRB*14	0,00588235	A*11_B*52_CW*12_DRB*11	0,00294118
A*03_B*57_CW*12_DRB*01	0,00588235	A*11_B*55_CW*04_DRB*16	0,00294118
A*11_B*18_CW*07_DRB*14	0,00588235	A*23_B*07_CW*12_DRB*15	0,00294118
A*11_B*18_CW*12_DRB*13	0,00588235	A*23_B*49_CW*07_DRB*03	0,00294118
A*24_B*27_CW*02_DRB*04	0,00588235	A*23_B*51_CW*01_DRB*03	0,00294118
A*24_B*44_CW*12_DRB*14	0,00588235	A*23_B*51_CW*14_DRB*14	0,00294118
A*30_B*13_CW*06_DRB*07	0,00588235	A*24_B*13_CW*06_DRB*14	0,00294118
A*32_B*07_CW*15_DRB*07	0,00588235	A*24_B*18_CW*02_DRB*16	0,00294118
A*68_B*52_CW*12_DRB*15	0,00588235	A*24_B*39_CW*12_DRB*16	0,00294118
A*31_B*35_CW*04_DRB*11	0,00588235	A*24_B*40_CW*02_DRB*03	0,00294118
A*32_B*18_CW*07_DRB*11	0,00588235	A*24_B*49_CW*02_DRB*16	0,00294118
A*02_B*55_CW*03_DRB*15	0,00588235	A*24_B*51_CW*16_DRB*15	0,00294118
A*01_B*51_CW*14_DRB*11	0,00588235	A*24_B*59_CW*07_DRB*08	0,00294118
A*02_B*18_CW*07_DRB*04	0,00588235	A*26_B*51_CW*12_DRB*11	0,00294118
A*23_B*38_CW*12_DRB*16	0,00588235	A*29_B*07_CW*15_DRB*16	0,00294118
A*02_B*44_CW*05_DRB*11	0,00588235	A*29_B*44_CW*05_DRB*07	0,00294118
A*02_B*35_CW*04_DRB*10	0,00588235	A*30_B*49_CW*07_DRB*04	0,00294118
A*03_B*39_CW*12_DRB*13	0,00588228	A*31_B*18_CW*05_DRB*03	0,00294118
A*32_B*35_CW*04_DRB*13	0,0058822	A*31_B*38_CW*07_DRB*14	0,00294118
A*11_B*35_CW*04_DRB*01	0,00518755	A*32_B*08_CW*07_DRB*11	0,00294118
A*03_B*35_CW*04_DRB*16	0,00502547	A*32_B*27_CW*02_DRB*08	0,00294118
A*11_B*52_CW*12_DRB*15	0,00363598	A*32_B*39_CW*07_DRB*14	0,00294118

A*01_B*35_CW*04_DRB*01	0,0036017	A*32_B*47_CW*06_DRB*04	0,00294118
A*03_B*18_CW*07_DRB*11	0,00339522	A*32_B*51_CW*16_DRB*13	0,00294118
A*03_B*18_CW*12_DRB*16	0,00334402	A*68_B*18_CW*02_DRB*16	0,00294118
A*01_B*35_CW*04_DRB*16	0,00297546	A*68_B*38_CW*12_DRB*08	0,00294118
A*02_B*44_CW*04_DRB*13	0,00294134	A*68_B*55_CW*03_DRB*16	0,00294118
A*31_B*39_CW*12_DRB*12	0,00294125	A*68_B*57_CW*06_DRB*11	0,00294118
A*02_B*35_CW*04_DRB*15	0,00294119	A*02_B*38_CW*12_DRB*13	0,00294118
A*24_B*44_CW*05_DRB*11	0,00294118	A*02_B*40_CW*03_DRB*15	0,00294118
A*02_B*44_CW*01_DRB*11	0,00294118	A*02_B*44_CW*05_DRB*04	0,00294118
A*68_B*38_CW*12_DRB*13	0,00294118	A*02_B*51_CW*16_DRB*01	0,00294118
A*02_B*38_CW*07_DRB*10	0,00294118	A*03_B*07_CW*07_DRB*16	0,00294118
A*11_B*44_CW*01_DRB*01	0,00294118	A*03_B*35_CW*18_DRB*04	0,00294118
A*02_B*51_CW*02_DRB*01	0,00294118	A*03_B*41_CW*04_DRB*13	0,00294118
A*01_B*37_CW*06_DRB*11	0,00294118	A*11_B*51_CW*16_DRB*13	0,00294118
A*02_B*55_CW*03_DRB*16	0,00294118	A*24_B*15_CW*03_DRB*11	0,00294118
A*32_B*14_CW*08_DRB*11	0,00294118	A*24_B*51_CW*06_DRB*15	0,00294118
A*24_B*35_CW*04_DRB*01	0,00294118	A*26_B*47_CW*06_DRB*07	0,00294118
A*24_B*35_CW*12_DRB*14	0,00294118	A*30_B*55_CW*03_DRB*11	0,00294118
A*23_B*52_CW*07_DRB*15	0,00294118	A*31_B*35_CW*04_DRB*10	0,00294118
A*02_B*44_CW*16_DRB*15	0,00294118	A*32_B*51_CW*04_DRB*07	0,00294118
A*32_B*52_CW*12_DRB*15	0,00294118	A*33_B*58_CW*03_DRB*13	0,00294118
A*03_B*38_CW*12_DRB*16	0,00294118	A*36_B*50_CW*06_DRB*03	0,00294118
A*68_B*51_CW*07_DRB*14	0,00294118	A*68_B*51_CW*15_DRB*11	0,00294118
A*01_B*51_CW*16_DRB*04	0,00294118	A*30_B*18_CW*07_DRB*14	0,00294118
A*02_B*18_CW*07_DRB*13	0,00294118	A*01_B*08_CW*07_DRB*15	0,00294118
A*02_B*57_CW*06_DRB*07	0,00294118	A*24_B*55_CW*03_DRB*07	0,00294118
A*03_B*14_CW*08_DRB*01	0,00294118	A*23_B*49_CW*07_DRB*16	0,00294118
A*03_B*35_CW*12_DRB*13	0,00294118	A*3_B*35_CW*04_DRB*13	0,00294118
A*24_B*14_CW*08_DRB*01	0,00294118	A*02_B*35_CW*12_DRB*14	0,00294118
A*24_B*40_CW*12_DRB*12	0,00294118	A*30_B*42_CW*17_DRB*01	0,00294118
A*24_B*44_CW*07_DRB*11	0,00294118	A*32_B*15_CW*03_DRB*07	0,00294118
A*24_B*51_CW*07_DRB*04	0,00294118	A*01_B*37_CW*06_DRB*16	0,00294118
A*26_B*35_CW*03_DRB*13	0,00294118	A*66_B*14_CW*08_DRB*01	0,00294118
A*02_B*49_CW*07_DRB*13	0,00294118	A*25_B*18_CW*12_DRB*01	0,00036765
A*11_B*07_CW*07_DRB*16	0,00294118	A*25_B*18_CW*12_DRB*03	0,00036765
A*32_B*37_CW*06_DRB*11	0,00294118	A*25_B*18_CW*14_DRB*01	0,00036765
A*32_B*51_CW*14_DRB*01	0,00294118	A*25_B*18_CW*14_DRB*03	0,00036765
A*02_B*38_CW*12_DRB*10	0,00294118	A*25_B*51_CW*12_DRB*01	0,00036765
A*68_B*44_CW*02_DRB*13	0,00294118	A*25_B*51_CW*12_DRB*03	0,00036765
A*11_B*27_CW*01_DRB*01	0,00294118	A*25_B*51_CW*14_DRB*01	0,00036765
A*24_B*45_CW*16_DRB*07	0,00294117	A*25_B*51_CW*14_DRB*03	0,00036765
A*26_B*07_CW*04_DRB*15	0,00294117	A*26_B*38_CW*03_DRB*04	0,00036765
A*01_B*35_CW*04_DRB*13	0,00294117	A*26_B*38_CW*03_DRB*10	0,00036765
A*02_B*40_CW*02_DRB*12	0,00294112	A*26_B*38_CW*12_DRB*04	0,00036765
A*31_B*37_CW*12_DRB*12	0,0029411	A*26_B*38_CW*12_DRB*10	0,00036765
A*11_B*18_CW*07_DRB*15	0,00294109	A*26_B*40_CW*03_DRB*04	0,00036765
A*68_B*54_CW*04_DRB*14	0,00294104	A*26_B*40_CW*03_DRB*10	0,00036765
A*02_B*44_CW*07_DRB*07	0,00294102	A*26_B*40_CW*12_DRB*04	0,00036765
A*02_B*13_CW*06_DRB*07	0,00294002	A*26_B*40_CW*12_DRB*10	0,00036765
A*32_B*40_CW*02_DRB*16	0,00290689	A*26_B*51_CW*06_DRB*04	0,00036765

A*02_B*13_CW*06_DRB*15	0,00205231	A*26_B*51_CW*06_DRB*15	0,00036765
A*02_B*40_CW*03_DRB*03	0,00147059	A*26_B*51_CW*14_DRB*04	0,00036765
A*02_B*58_CW*03_DRB*03	0,00147059	A*26_B*51_CW*14_DRB*15	0,00036765
A*24_B*07_CW*07_DRB*11	0,00147059	A*26_B*52_CW*06_DRB*04	0,00036765
A*24_B*07_CW*07_DRB*15	0,00147059	A*26_B*52_CW*06_DRB*15	0,00036765
A*26_B*40_CW*03_DRB*03	0,00147059	A*26_B*52_CW*14_DRB*04	0,00036765
A*26_B*58_CW*03_DRB*03	0,00147059	A*26_B*52_CW*14_DRB*15	0,00036765
A*31_B*07_CW*07_DRB*11	0,00147059	A*30_B*08_CW*07_DRB*04	0,00036765
A*31_B*07_CW*07_DRB*15	0,00147059	A*30_B*08_CW*07_DRB*14	0,00036765
A*01_B*08_CW*08_DRB*03	0,00073529	A*30_B*08_CW*12_DRB*04	0,00036765
A*01_B*08_CW*08_DRB*13	0,00073529	A*30_B*08_CW*12_DRB*14	0,00036765
A*01_B*44_CW*08_DRB*03	0,00073529	A*30_B*39_CW*07_DRB*04	0,00036765
A*01_B*44_CW*08_DRB*13	0,00073529	A*30_B*39_CW*07_DRB*14	0,00036765
A*24_B*08_CW*08_DRB*03	0,00073529	A*30_B*39_CW*12_DRB*04	0,00036765
A*24_B*08_CW*08_DRB*13	0,00073529	A*30_B*39_CW*12_DRB*14	0,00036765
A*24_B*35_CW*04_DRB*04	0,00073529	A*31_B*07_CW*07_DRB*13	0,00036765
A*24_B*35_CW*07_DRB*04	0,00073529	A*31_B*07_CW*07_DRB*16	0,00036765
A*24_B*40_CW*04_DRB*04	0,00073529	A*31_B*07_CW*15_DRB*13	0,00036765
A*24_B*40_CW*07_DRB*04	0,00073529	A*31_B*07_CW*15_DRB*16	0,00036765
A*24_B*44_CW*08_DRB*03	0,00073529	A*31_B*08_CW*07_DRB*04	0,00036765
A*24_B*44_CW*08_DRB*13	0,00073529	A*31_B*08_CW*07_DRB*14	0,00036765
A*24_B*48_CW*08_DRB*04	0,00073529	A*31_B*08_CW*12_DRB*04	0,00036765
A*24_B*48_CW*08_DRB*11	0,00073529	A*31_B*08_CW*12_DRB*14	0,00036765
A*24_B*48_CW*12_DRB*04	0,00073529	A*31_B*35_CW*02_DRB*07	0,00036765
A*24_B*48_CW*12_DRB*11	0,00073529	A*31_B*35_CW*02_DRB*15	0,00036765
A*24_B*52_CW*08_DRB*04	0,00073529	A*31_B*35_CW*12_DRB*07	0,00036765
A*24_B*52_CW*08_DRB*11	0,00073529	A*31_B*35_CW*12_DRB*15	0,00036765
A*24_B*52_CW*12_DRB*04	0,00073529	A*31_B*39_CW*07_DRB*04	0,00036765
A*24_B*52_CW*12_DRB*11	0,00073529	A*31_B*39_CW*07_DRB*14	0,00036765
A*68_B*35_CW*04_DRB*04	0,00073529	A*31_B*39_CW*12_DRB*04	0,00036765
A*68_B*35_CW*07_DRB*04	0,00073529	A*31_B*39_CW*12_DRB*14	0,00036765
A*68_B*40_CW*04_DRB*04	0,00073529	A*31_B*51_CW*02_DRB*07	0,00036765
A*68_B*40_CW*07_DRB*04	0,00073529	A*31_B*51_CW*02_DRB*15	0,00036765
A*02_B*51_CW*03_DRB*01	0,00036765	A*31_B*51_CW*03_DRB*01	0,00036765
A*02_B*51_CW*03_DRB*04	0,00036765	A*31_B*51_CW*03_DRB*04	0,00036765
A*02_B*51_CW*06_DRB*04	0,00036765	A*31_B*51_CW*07_DRB*01	0,00036765
A*02_B*51_CW*06_DRB*15	0,00036765	A*31_B*51_CW*07_DRB*04	0,00036765
A*02_B*51_CW*07_DRB*01	0,00036765	A*31_B*51_CW*07_DRB*13	0,00036765
A*02_B*51_CW*07_DRB*04	0,00036765	A*31_B*51_CW*07_DRB*16	0,00036765
A*02_B*51_CW*14_DRB*04	0,00036765	A*31_B*51_CW*12_DRB*07	0,00036765
A*02_B*51_CW*14_DRB*15	0,00036765	A*31_B*51_CW*12_DRB*15	0,00036765
A*02_B*52_CW*06_DRB*04	0,00036765	A*31_B*51_CW*15_DRB*13	0,00036765
A*02_B*52_CW*06_DRB*15	0,00036765	A*31_B*51_CW*15_DRB*16	0,00036765
A*02_B*52_CW*14_DRB*04	0,00036765	A*31_B*56_CW*03_DRB*01	0,00036765
A*02_B*52_CW*14_DRB*15	0,00036765	A*31_B*56_CW*03_DRB*04	0,00036765
A*02_B*56_CW*03_DRB*01	0,00036765	A*31_B*56_CW*07_DRB*01	0,00036765
A*02_B*56_CW*03_DRB*04	0,00036765	A*31_B*56_CW*07_DRB*04	0,00036765
A*02_B*56_CW*07_DRB*01	0,00036765	A*32_B*35_CW*04_DRB*04	0,00036765
A*02_B*56_CW*07_DRB*04	0,00036765	A*32_B*35_CW*04_DRB*10	0,00036765
A*03_B*35_CW*04_DRB*04	0,00036765	A*32_B*35_CW*15_DRB*04	0,00036765

A*03_B*35_CW*04_DRB*10	0,00036765	A*32_B*35_CW*15_DRB*10	0,00036765
A*03_B*35_CW*15_DRB*04	0,00036765	A*32_B*51_CW*04_DRB*04	0,00036765
A*03_B*35_CW*15_DRB*10	0,00036765	A*32_B*51_CW*04_DRB*10	0,00036765
A*03_B*51_CW*04_DRB*04	0,00036765	A*32_B*51_CW*15_DRB*04	0,00036765
A*03_B*51_CW*04_DRB*10	0,00036765	A*32_B*51_CW*15_DRB*10	0,00036765
A*03_B*51_CW*15_DRB*04	0,00036765	A*68_B*18_CW*12_DRB*01	0,00036765
A*03_B*51_CW*15_DRB*10	0,00036765	A*68_B*18_CW*12_DRB*03	0,00036765
A*11_B*38_CW*03_DRB*04	0,00036765	A*68_B*18_CW*14_DRB*01	0,00036765
A*11_B*38_CW*03_DRB*10	0,00036765	A*68_B*18_CW*14_DRB*03	0,00036765
A*11_B*38_CW*12_DRB*04	0,00036765	A*68_B*51_CW*12_DRB*01	0,00036765
A*11_B*38_CW*12_DRB*10	0,00036765	A*68_B*51_CW*12_DRB*03	0,00036765
A*11_B*40_CW*03_DRB*04	0,00036765	A*68_B*51_CW*14_DRB*01	0,00036765
A*11_B*40_CW*03_DRB*10	0,00036765	A*68_B*51_CW*14_DRB*03	0,00036765
A*11_B*40_CW*12_DRB*04	0,00036765	A*69_B*35_CW*02_DRB*07	0,00036765
A*11_B*40_CW*12_DRB*10	0,00036765	A*69_B*35_CW*02_DRB*15	0,00036765
A*24_B*07_CW*07_DRB*13	0,00036765	A*69_B*35_CW*12_DRB*07	0,00036765
A*24_B*07_CW*07_DRB*16	0,00036765	A*69_B*35_CW*12_DRB*15	0,00036765
A*24_B*07_CW*15_DRB*13	0,00036765	A*69_B*51_CW*02_DRB*07	0,00036765
A*24_B*07_CW*15_DRB*16	0,00036765	A*69_B*51_CW*02_DRB*15	0,00036765
A*24_B*51_CW*07_DRB*13	0,00036765	A*69_B*51_CW*12_DRB*07	0,00036765
A*24_B*51_CW*07_DRB*16	0,00036765	A*69_B*51_CW*12_DRB*15	0,00036765
A*24_B*51_CW*15_DRB*13	0,00036765	A*32_B*40_CW*02_DRB*01	3,4284E-05
A*24_B*51_CW*15_DRB*16	0,00036765	A*02_B*15_CW*07_DRB*07	1,1552E-06

Πίνακας 13. Οι αναμενόμενοι απλότυποι κατά φθίνουσα σειρά πιθανότητας, στον πληθυσμο των Βλάχων.

A*01_B*08_CW*07_DRB*03	0,051181	A*32_B*08_CW*07_DRB*01	0,003937
A*24_B*35_CW*04_DRB*11	0,027538	A*32_B*13_CW*06_DRB*10	0,003937
A*02_B*18_CW*12_DRB*11	0,023584	A*32_B*40_CW*02_DRB*12	0,003937
A*02_B*18_CW*07_DRB*11	0,019724	A*32_B*49_CW*15_DRB*14	0,003937
A*02_B*35_CW*04_DRB*11	0,019705	A*32_B*51_CW*01_DRB*10	0,003937
A*03_B*18_CW*07_DRB*01	0,019685	A*68_B*15_CW*03_DRB*04	0,003937
A*11_B*35_CW*04_DRB*11	0,015749	A*68_B*18_CW*12_DRB*11	0,003937
A*24_B*51_CW*15_DRB*11	0,015748	A*68_B*40_CW*02_DRB*12	0,003937
A*24_B*55_CW*03_DRB*16	0,015748	A*68_B*51_CW*01_DRB*04	0,003937
A*02_B*51_CW*15_DRB*13	0,015748	A*68_B*51_CW*07_DRB*01	0,003937
A*11_B*52_CW*12_DRB*01	0,015748	A*02_B*51_CW*14_DRB*01	0,003937
A*02_B*51_CW*15_DRB*16	0,015747	A*02_B*53_CW*12_DRB*11	0,003937
A*02_B*18_CW*07_DRB*04	0,011811	A*11_B*37_CW*08_DRB*07	0,003937
A*02_B*44_CW*05_DRB*16	0,011811	A*11_B*52_CW*07_DRB*04	0,003937
A*02_B*27_CW*02_DRB*16	0,011811	A*23_B*49_CW*15_DRB*11	0,003937
A*02_B*38_CW*12_DRB*13	0,011811	A*24_B*44_CW*05_DRB*11	0,003937
A*02_B*08_CW*07_DRB*03	0,011811	A*25_B*08_CW*07_DRB*11	0,003937
A*02_B*51_CW*01_DRB*16	0,007874	A*26_B*07_CW*07_DRB*16	0,003937
A*11_B*35_CW*04_DRB*01	0,007874	A*31_B*40_CW*03_DRB*12	0,003937
A*02_B*50_CW*04_DRB*16	0,007874	A*32_B*40_CW*15_DRB*12	0,003937
A*02_B*51_CW*14_DRB*11	0,007874	A*32_B*44_CW*05_DRB*10	0,003937

A*02_B*35_CW*04_DRB*12	0,007874	A*68_B*40_CW*07_DRB*16	0,003937
A*02_B*35_CW*06_DRB*11	0,007874	A*68_B*40_CW*15_DRB*16	0,003937
A*02_B*35_CW*07_DRB*14	0,007874	A*68_B*52_CW*12_DRB*15	0,003937
A*02_B*35_CW*12_DRB*13	0,007874	A*02_B*51_CW*15_DRB*03	0,003937
A*03_B*35_CW*02_DRB*01	0,007874	A*68_B*07_CW*07_DRB*13	0,003937
A*23_B*44_CW*07_DRB*07	0,007874	A*23_B*49_CW*07_DRB*15	0,003937
A*24_B*35_CW*04_DRB*16	0,007874	A*03_B*44_CW*04_DRB*14	0,003937
A*24_B*51_CW*12_DRB*15	0,007874	A*24_B*50_CW*15_DRB*10	0,003937
A*26_B*51_CW*04_DRB*13	0,007874	A*03_B*50_CW*02_DRB*16	0,003937
A*30_B*08_CW*07_DRB*11	0,007874	A*02_B*15_CW*12_DRB*16	0,003937
A*30_B*13_CW*06_DRB*03	0,007874	A*03_B*51_CW*15_DRB*14	0,003937
A*24_B*35_CW*04_DRB*01	0,007874	A*02_B*35_CW*04_DRB*04	0,003937
A*26_B*18_CW*12_DRB*15	0,007874	A*68_B*54_CW*01_DRB*11	0,003937
A*26_B*51_CW*01_DRB*11	0,007874	A*32_B*52_CW*01_DRB*12	0,003937
A*02_B*51_CW*01_DRB*11	0,007874	A*31_B*51_CW*14_DRB*04	0,003937
A*11_B*35_CW*04_DRB*04	0,007874	A*11_B*38_CW*12_DRB*16	0,003936
A*24_B*51_CW*16_DRB*11	0,007874	A*02_B*53_CW*07_DRB*11	0,003916
A*02_B*15_CW*06_DRB*11	0,007874	A*23_B*38_CW*07_DRB*14	0,003898
A*02_B*50_CW*06_DRB*16	0,007874	A*68_B*18_CW*07_DRB*15	0,001969
A*01_B*40_CW*03_DRB*15	0,007874	A*68_B*18_CW*12_DRB*15	0,001969
A*24_B*18_CW*12_DRB*11	0,007873	A*02_B*44_CW*05_DRB*07	0,001969
A*32_B*40_CW*03_DRB*12	0,003937	A*02_B*44_CW*05_DRB*13	0,001969
A*32_B*52_CW*03_DRB*15	0,003937	A*11_B*18_CW*07_DRB*03	0,001969
A*03_B*35_CW*04_DRB*14	0,003937	A*11_B*18_CW*12_DRB*03	0,001969
A*02_B*15_CW*12_DRB*11	0,003937	A*23_B*44_CW*05_DRB*07	0,001969
A*32_B*51_CW*16_DRB*11	0,003937	A*23_B*44_CW*05_DRB*13	0,001969
A*24_B*08_CW*07_DRB*03	0,003937	A*01_B*15_CW*03_DRB*11	0,000984
A*02_B*18_CW*07_DRB*14	0,003937	A*01_B*15_CW*03_DRB*13	0,000984
A*23_B*49_CW*04_DRB*11	0,003937	A*01_B*15_CW*07_DRB*11	0,000984
A*68_B*51_CW*15_DRB*16	0,003937	A*01_B*15_CW*07_DRB*13	0,000984
A*11_B*18_CW*07_DRB*04	0,003937	A*02_B*07_CW*08_DRB*08	0,000984
A*30_B*15_CW*12_DRB*14	0,003937	A*02_B*07_CW*08_DRB*11	0,000984
A*01_B*08_CW*07_DRB*11	0,003937	A*02_B*07_CW*15_DRB*10	0,000984
A*01_B*35_CW*07_DRB*16	0,003937	A*02_B*07_CW*15_DRB*16	0,000984
A*01_B*40_CW*07_DRB*12	0,003937	A*02_B*13_CW*15_DRB*10	0,000984
A*01_B*52_CW*15_DRB*04	0,003937	A*02_B*13_CW*15_DRB*16	0,000984
A*01_B*57_CW*06_DRB*07	0,003937	A*02_B*44_CW*08_DRB*08	0,000984
A*02_B*14_CW*08_DRB*04	0,003937	A*02_B*44_CW*08_DRB*11	0,000984
A*02_B*15_CW*12_DRB*08	0,003937	A*23_B*15_CW*03_DRB*11	0,000984
A*02_B*18_CW*12_DRB*01	0,003937	A*23_B*15_CW*03_DRB*13	0,000984
A*02_B*44_CW*04_DRB*01	0,003937	A*23_B*15_CW*07_DRB*11	0,000984
A*02_B*49_CW*12_DRB*11	0,003937	A*23_B*15_CW*07_DRB*13	0,000984
A*02_B*50_CW*01_DRB*07	0,003937	A*26_B*35_CW*12_DRB*04	0,000984
A*02_B*51_CW*02_DRB*15	0,003937	A*26_B*35_CW*12_DRB*14	0,000984
A*02_B*51_CW*04_DRB*13	0,003937	A*26_B*35_CW*17_DRB*04	0,000984
A*03_B*07_CW*07_DRB*15	0,003937	A*26_B*35_CW*17_DRB*14	0,000984
A*03_B*15_CW*05_DRB*13	0,003937	A*26_B*41_CW*12_DRB*04	0,000984
A*03_B*35_CW*03_DRB*11	0,003937	A*26_B*41_CW*12_DRB*14	0,000984
A*03_B*35_CW*04_DRB*07	0,003937	A*26_B*41_CW*17_DRB*04	0,000984
A*03_B*39_CW*15_DRB*12	0,003937	A*26_B*41_CW*17_DRB*14	0,000984

A*03_B*47_CW*15_DRB*07	0,003937	A*29_B*07_CW*15_DRB*10	0,000984
A*11_B*07_CW*07_DRB*08	0,003937	A*29_B*07_CW*15_DRB*16	0,000984
A*11_B*07_CW*07_DRB*15	0,003937	A*29_B*13_CW*15_DRB*10	0,000984
A*11_B*35_CW*12_DRB*03	0,003937	A*29_B*13_CW*15_DRB*16	0,000984
A*11_B*51_CW*15_DRB*15	0,003937	A*33_B*07_CW*08_DRB*08	0,000984
A*11_B*52_CW*12_DRB*15	0,003937	A*33_B*07_CW*08_DRB*11	0,000984
A*23_B*14_CW*08_DRB*07	0,003937	A*33_B*44_CW*08_DRB*08	0,000984
A*23_B*15_CW*04_DRB*13	0,003937	A*33_B*44_CW*08_DRB*11	0,000984
A*24_B*35_CW*04_DRB*07	0,003937	A*01_B*13_CW*06_DRB*04	0,000492
A*24_B*35_CW*04_DRB*14	0,003937	A*01_B*13_CW*06_DRB*15	0,000492
A*24_B*51_CW*04_DRB*04	0,003937	A*01_B*13_CW*15_DRB*04	0,000492
A*25_B*27_CW*04_DRB*16	0,003937	A*01_B*13_CW*15_DRB*15	0,000492
A*26_B*15_CW*01_DRB*03	0,003937	A*01_B*15_CW*03_DRB*07	0,000492
A*26_B*18_CW*05_DRB*01	0,003937	A*01_B*15_CW*03_DRB*16	0,000492
A*26_B*51_CW*01_DRB*13	0,003937	A*01_B*15_CW*07_DRB*07	0,000492
A*26_B*52_CW*12_DRB*12	0,003937	A*01_B*15_CW*07_DRB*16	0,000492
A*26_B*55_CW*07_DRB*16	0,003937	A*01_B*18_CW*03_DRB*07	0,000492
A*30_B*35_CW*04_DRB*11	0,003937	A*01_B*18_CW*03_DRB*16	0,000492
A*31_B*18_CW*07_DRB*15	0,003937	A*01_B*18_CW*07_DRB*07	0,000492
A*31_B*51_CW*07_DRB*04	0,003937	A*01_B*18_CW*07_DRB*16	0,000492
A*01_B*41_CW*15_DRB*07	0,000492	A*29_B*44_CW*16_DRB*16	0,000492
A*01_B*41_CW*15_DRB*14	0,000492	A*30_B*13_CW*06_DRB*04	0,000492
A*01_B*41_CW*17_DRB*07	0,000492	A*30_B*13_CW*06_DRB*07	0,000492
A*01_B*41_CW*17_DRB*14	0,000492	A*30_B*13_CW*12_DRB*04	0,000492
A*01_B*51_CW*15_DRB*07	0,000492	A*30_B*13_CW*12_DRB*07	0,000492
A*01_B*51_CW*15_DRB*14	0,000492	A*30_B*18_CW*04_DRB*03	0,000492
A*01_B*51_CW*17_DRB*07	0,000492	A*30_B*18_CW*04_DRB*15	0,000492
A*01_B*51_CW*17_DRB*14	0,000492	A*30_B*18_CW*05_DRB*03	0,000492
A*01_B*73_CW*06_DRB*04	0,000492	A*30_B*18_CW*05_DRB*15	0,000492
A*01_B*73_CW*06_DRB*15	0,000492	A*30_B*35_CW*04_DRB*03	0,000492
A*01_B*73_CW*15_DRB*04	0,000492	A*30_B*35_CW*04_DRB*15	0,000492
A*01_B*73_CW*15_DRB*15	0,000492	A*30_B*35_CW*05_DRB*03	0,000492
A*02_B*13_CW*06_DRB*04	0,000492	A*30_B*35_CW*05_DRB*15	0,000492
A*02_B*13_CW*06_DRB*15	0,000492	A*30_B*38_CW*06_DRB*04	0,000492
A*02_B*13_CW*15_DRB*04	0,000492	A*30_B*38_CW*06_DRB*07	0,000492
A*02_B*13_CW*15_DRB*15	0,000492	A*30_B*38_CW*12_DRB*04	0,000492
A*02_B*41_CW*15_DRB*07	0,000492	A*30_B*38_CW*12_DRB*07	0,000492
A*02_B*41_CW*15_DRB*14	0,000492	A*31_B*15_CW*03_DRB*07	0,000492
A*02_B*41_CW*17_DRB*07	0,000492	A*31_B*15_CW*03_DRB*16	0,000492
A*02_B*41_CW*17_DRB*14	0,000492	A*31_B*15_CW*07_DRB*07	0,000492
A*02_B*51_CW*15_DRB*07	0,000492	A*31_B*15_CW*07_DRB*16	0,000492
A*02_B*51_CW*15_DRB*14	0,000492	A*31_B*18_CW*01_DRB*04	0,000492
A*02_B*51_CW*17_DRB*07	0,000492	A*31_B*18_CW*01_DRB*16	0,000492
A*02_B*51_CW*17_DRB*14	0,000492	A*31_B*18_CW*03_DRB*07	0,000492
A*02_B*73_CW*06_DRB*04	0,000492	A*31_B*18_CW*03_DRB*16	0,000492
A*02_B*73_CW*06_DRB*15	0,000492	A*31_B*18_CW*07_DRB*07	0,000492
A*02_B*73_CW*15_DRB*04	0,000492	A*31_B*18_CW*07_DRB*16	0,000492
A*02_B*73_CW*15_DRB*15	0,000492	A*31_B*18_CW*12_DRB*04	0,000492
A*03_B*18_CW*04_DRB*03	0,000492	A*31_B*18_CW*12_DRB*16	0,000492
A*03_B*18_CW*04_DRB*15	0,000492	A*31_B*38_CW*03_DRB*11	0,000492

A*03_B*18_CW*05_DRB*03	0,000492	A*31_B*38_CW*03_DRB*14	0,000492
A*03_B*18_CW*05_DRB*15	0,000492	A*31_B*38_CW*12_DRB*11	0,000492
A*03_B*35_CW*04_DRB*03	0,000492	A*31_B*38_CW*12_DRB*14	0,000492
A*03_B*35_CW*04_DRB*15	0,000492	A*31_B*55_CW*03_DRB*11	0,000492
A*03_B*35_CW*05_DRB*03	0,000492	A*31_B*55_CW*03_DRB*14	0,000492
A*03_B*35_CW*05_DRB*15	0,000492	A*31_B*55_CW*12_DRB*11	0,000492
A*03_B*44_CW*05_DRB*15	0,000492	A*31_B*55_CW*12_DRB*14	0,000492
A*03_B*44_CW*05_DRB*16	0,000492	A*31_B*56_CW*01_DRB*04	0,000492
A*03_B*44_CW*14_DRB*15	0,000492	A*31_B*56_CW*01_DRB*16	0,000492
A*03_B*44_CW*14_DRB*16	0,000492	A*31_B*56_CW*12_DRB*04	0,000492
A*03_B*51_CW*05_DRB*15	0,000492	A*31_B*56_CW*12_DRB*16	0,000492
A*03_B*51_CW*05_DRB*16	0,000492	A*32_B*14_CW*02_DRB*01	0,000492
A*03_B*51_CW*14_DRB*15	0,000492	A*32_B*14_CW*02_DRB*16	0,000492
A*03_B*51_CW*14_DRB*16	0,000492	A*32_B*14_CW*08_DRB*01	0,000492
A*11_B*18_CW*01_DRB*04	0,000492	A*32_B*14_CW*08_DRB*16	0,000492
A*11_B*18_CW*01_DRB*16	0,000492	A*32_B*27_CW*02_DRB*08	0,000492
A*11_B*18_CW*12_DRB*04	0,000492	A*32_B*27_CW*02_DRB*13	0,000492
A*11_B*18_CW*12_DRB*16	0,000492	A*32_B*27_CW*04_DRB*08	0,000492
A*11_B*44_CW*05_DRB*15	0,000492	A*32_B*27_CW*04_DRB*13	0,000492
A*11_B*44_CW*05_DRB*16	0,000492	A*32_B*40_CW*02_DRB*01	0,000492
A*11_B*44_CW*14_DRB*15	0,000492	A*32_B*40_CW*02_DRB*16	0,000492
A*11_B*44_CW*14_DRB*16	0,000492	A*32_B*40_CW*08_DRB*01	0,000492
A*11_B*51_CW*05_DRB*15	0,000492	A*32_B*40_CW*08_DRB*16	0,000492
A*11_B*51_CW*05_DRB*16	0,000492	A*32_B*41_CW*02_DRB*08	0,000492
A*11_B*51_CW*14_DRB*15	0,000492	A*32_B*41_CW*02_DRB*13	0,000492
A*11_B*51_CW*14_DRB*16	0,000492	A*32_B*41_CW*04_DRB*08	0,000492
A*11_B*56_CW*01_DRB*04	0,000492	A*32_B*41_CW*04_DRB*13	0,000492
A*11_B*56_CW*01_DRB*16	0,000492	A*33_B*14_CW*02_DRB*01	0,000492
A*11_B*56_CW*12_DRB*04	0,000492	A*33_B*14_CW*02_DRB*16	0,000492
A*11_B*56_CW*12_DRB*16	0,000492	A*33_B*14_CW*08_DRB*01	0,000492
A*23_B*39_CW*05_DRB*12	0,000492	A*33_B*14_CW*08_DRB*16	0,000492
A*23_B*39_CW*05_DRB*14	0,000492	A*33_B*18_CW*12_DRB*11	0,000492
A*23_B*39_CW*12_DRB*12	0,000492	A*33_B*18_CW*12_DRB*16	0,000492
A*23_B*39_CW*12_DRB*14	0,000492	A*33_B*18_CW*16_DRB*11	0,000492
A*23_B*49_CW*05_DRB*12	0,000492	A*33_B*18_CW*16_DRB*16	0,000492
A*23_B*49_CW*05_DRB*14	0,000492	A*33_B*40_CW*02_DRB*01	0,000492
A*23_B*49_CW*12_DRB*12	0,000492	A*33_B*40_CW*02_DRB*16	0,000492
A*23_B*49_CW*12_DRB*14	0,000492	A*33_B*40_CW*08_DRB*01	0,000492
A*24_B*39_CW*05_DRB*12	0,000492	A*33_B*40_CW*08_DRB*16	0,000492
A*24_B*39_CW*05_DRB*14	0,000492	A*33_B*44_CW*12_DRB*11	0,000492
A*24_B*39_CW*12_DRB*12	0,000492	A*33_B*44_CW*12_DRB*16	0,000492
A*24_B*39_CW*12_DRB*14	0,000492	A*33_B*44_CW*16_DRB*11	0,000492
A*24_B*49_CW*05_DRB*12	0,000492	A*33_B*44_CW*16_DRB*16	0,000492
A*24_B*49_CW*05_DRB*14	0,000492	A*66_B*27_CW*02_DRB*08	0,000492
A*24_B*49_CW*12_DRB*12	0,000492	A*66_B*27_CW*02_DRB*13	0,000492
A*24_B*49_CW*12_DRB*14	0,000492	A*66_B*27_CW*04_DRB*08	0,000492
A*26_B*13_CW*06_DRB*04	0,000492	A*66_B*27_CW*04_DRB*13	0,000492
A*26_B*13_CW*06_DRB*07	0,000492	A*66_B*41_CW*02_DRB*08	0,000492
A*26_B*13_CW*12_DRB*04	0,000492	A*66_B*41_CW*02_DRB*13	0,000492
A*26_B*13_CW*12_DRB*07	0,000492	A*66_B*41_CW*04_DRB*08	0,000492

A*26_B*38_CW*06_DRB*04	0,000492	A*66_B*41_CW*04_DRB*13	0,000492
A*26_B*38_CW*06_DRB*07	0,000492	A*69_B*38_CW*03_DRB*11	0,000492
A*26_B*38_CW*12_DRB*04	0,000492	A*69_B*38_CW*03_DRB*14	0,000492
A*26_B*38_CW*12_DRB*07	0,000492	A*69_B*38_CW*12_DRB*11	0,000492
A*29_B*18_CW*12_DRB*11	0,000492	A*69_B*38_CW*12_DRB*14	0,000492
A*29_B*18_CW*12_DRB*16	0,000492	A*69_B*55_CW*03_DRB*11	0,000492
A*29_B*18_CW*16_DRB*11	0,000492	A*69_B*55_CW*03_DRB*14	0,000492
A*29_B*18_CW*16_DRB*16	0,000492	A*69_B*55_CW*12_DRB*11	0,000492
A*29_B*44_CW*12_DRB*11	0,000492	A*69_B*55_CW*12_DRB*14	0,000492
A*29_B*44_CW*12_DRB*16	0,000492	A*23_B*38_CW*12_DRB*14	3,91E-05
A*29_B*44_CW*16_DRB*11	0,000492	A*24_B*53_CW*07_DRB*11	2,12E-05

Πίνακας 14. Οι αναμενόμενοι απλότυποι κατα φθίνουσα σειρά πιθανότητας, στον πληθυσμο των Σαρακατσάνων.

A*01_B*08_CW*07_DRB*03	0,03603604	A*03_B*39_CW*12_DRB*16	0,00450451
A*11_B*35_CW*04_DRB*11	0,03153153	A*03_B*51_CW*01_DRB*01	0,00450451
A*02_B*35_CW*04_DRB*11	0,03054404	A*03_B*57_CW*03_DRB*14	0,00450451
A*02_B*18_CW*07_DRB*11	0,02787107	A*11_B*08_CW*04_DRB*13	0,00450451
A*02_B*18_CW*12_DRB*11	0,01801803	A*11_B*15_CW*01_DRB*03	0,00450451
A*24_B*18_CW*07_DRB*11	0,01801802	A*11_B*18_CW*04_DRB*16	0,00450451
A*02_B*35_CW*04_DRB*16	0,01801802	A*11_B*35_CW*03_DRB*11	0,00450451
A*03_B*35_CW*04_DRB*11	0,01801802	A*11_B*35_CW*04_DRB*12	0,00450451
A*32_B*40_CW*03_DRB*16	0,01801802	A*11_B*35_CW*12_DRB*16	0,00450451
A*24_B*15_CW*03_DRB*11	0,01801796	A*11_B*35_CW*14_DRB*03	0,00450451
A*01_B*37_CW*06_DRB*11	0,01351351	A*11_B*39_CW*12_DRB*15	0,00450451
A*02_B*51_CW*14_DRB*16	0,01351351	A*11_B*44_CW*05_DRB*15	0,00450451
A*02_B*51_CW*12_DRB*04	0,0135135	A*11_B*51_CW*04_DRB*11	0,00450451
A*02_B*08_CW*07_DRB*03	0,0135135	A*11_B*51_CW*16_DRB*15	0,00450451
A*03_B*07_CW*07_DRB*15	0,01266952	A*11_B*52_CW*12_DRB*01	0,00450451
A*29_B*08_CW*07_DRB*03	0,00900902	A*23_B*39_CW*12_DRB*01	0,00450451
A*02_B*51_CW*03_DRB*11	0,00900901	A*24_B*35_CW*04_DRB*13	0,00450451
A*01_B*07_CW*07_DRB*15	0,00900901	A*24_B*44_CW*04_DRB*04	0,00450451
A*24_B*27_CW*02_DRB*01	0,00900901	A*24_B*44_CW*15_DRB*07	0,00450451
A*02_B*44_CW*07_DRB*11	0,00900901	A*24_B*44_CW*16_DRB*14	0,00450451
A*02_B*51_CW*01_DRB*04	0,00900901	A*24_B*51_CW*03_DRB*11	0,00450451
A*31_B*51_CW*16_DRB*15	0,00900901	A*24_B*51_CW*05_DRB*01	0,00450451
A*32_B*07_CW*07_DRB*15	0,00900901	A*25_B*40_CW*02_DRB*16	0,00450451
A*33_B*14_CW*08_DRB*01	0,00900901	A*26_B*15_CW*03_DRB*04	0,00450451
A*68_B*51_CW*14_DRB*11	0,00900901	A*26_B*18_CW*04_DRB*11	0,00450451
A*03_B*35_CW*04_DRB*14	0,00900901	A*26_B*55_CW*01_DRB*14	0,00450451
A*03_B*18_CW*07_DRB*03	0,00900901	A*29_B*08_CW*07_DRB*11	0,00450451
A*02_B*44_CW*02_DRB*16	0,00900901	A*29_B*44_CW*15_DRB*07	0,00450451
A*68_B*18_CW*07_DRB*16	0,00900901	A*30_B*44_CW*05_DRB*15	0,00450451
A*11_B*51_CW*04_DRB*13	0,00900901	A*31_B*51_CW*04_DRB*13	0,00450451
A*02_B*51_CW*01_DRB*11	0,00900901	A*32_B*07_CW*07_DRB*16	0,00450451
A*02_B*18_CW*07_DRB*13	0,00900895	A*32_B*41_CW*17_DRB*13	0,00450451
A*02_B*18_CW*02_DRB*11	0,00816501	A*32_B*51_CW*16_DRB*16	0,00450451

A*02_B*51_CW*15_DRB*11	0,005492	A*32_B*52_CW*12_DRB*15	0,00450451
A*03_B*35_CW*04_DRB*01	0,005492	A*33_B*07_CW*07_DRB*15	0,00450451
A*02_B*51_CW*01_DRB*16	0,00450451	A*33_B*35_CW*12_DRB*15	0,00450451
A*24_B*18_CW*07_DRB*16	0,00450451	A*33_B*56_CW*04_DRB*13	0,00450451
A*26_B*44_CW*12_DRB*04	0,00450451	A*36_B*08_CW*12_DRB*14	0,00450451
A*24_B*15_CW*15_DRB*11	0,00450451	A*68_B*18_CW*02_DRB*11	0,00450451
A*26_B*07_CW*12_DRB*16	0,00450451	A*68_B*18_CW*12_DRB*16	0,00450451
A*01_B*08_CW*15_DRB*11	0,00450451	A*68_B*35_CW*12_DRB*04	0,00450451
A*01_B*35_CW*04_DRB*08	0,00450451	A*68_B*35_CW*12_DRB*16	0,00450451
A*01_B*37_CW*05_DRB*10	0,00450451	A*68_B*40_CW*12_DRB*04	0,00450451
A*01_B*37_CW*17_DRB*04	0,00450451	A*01_B*35_CW*04_DRB*07	0,00450451
A*01_B*39_CW*12_DRB*13	0,00450451	A*01_B*35_CW*04_DRB*11	0,00450451
A*01_B*44_CW*04_DRB*07	0,00450451	A*01_B*51_CW*12_DRB*08	0,00450451
A*01_B*49_CW*01_DRB*13	0,00450451	A*02_B*08_CW*03_DRB*14	0,00450451
A*01_B*51_CW*12_DRB*11	0,00450451	A*02_B*39_CW*15_DRB*16	0,00450451
A*01_B*57_CW*16_DRB*14	0,00450451	A*02_B*44_CW*07_DRB*16	0,00450451
A*02_B*37_CW*06_DRB*08	0,00450451	A*02_B*51_CW*16_DRB*13	0,00450451
A*02_B*39_CW*04_DRB*16	0,00450451	A*03_B*07_CW*03_DRB*13	0,00450451
A*02_B*50_CW*12_DRB*13	0,00450451	A*03_B*35_CW*04_DRB*13	0,00450451
A*02_B*51_CW*07_DRB*15	0,00450451	A*24_B*27_CW*15_DRB*01	0,00450451
A*02_B*51_CW*12_DRB*11	0,00450451	A*24_B*51_CW*15_DRB*13	0,00450451
A*02_B*51_CW*12_DRB*13	0,00450451	A*29_B*55_CW*04_DRB*13	0,00450451
A*02_B*52_CW*02_DRB*11	0,00450451	A*32_B*35_CW*04_DRB*11	0,00450451
A*03_B*07_CW*15_DRB*08	0,00450451	A*32_B*50_CW*06_DRB*11	0,00450451
A*03_B*08_CW*07_DRB*03	0,00450451	A*68_B*39_CW*12_DRB*13	0,00450451
A*03_B*18_CW*07_DRB*04	0,00450451	A*68_B*51_CW*12_DRB*13	0,00450451
A*03_B*35_CW*01_DRB*11	0,00450451	A*74_B*18_CW*07_DRB*10	0,00450451
A*26_B*27_CW*12_DRB*04	0,00450451	A*02_B*55_CW*07_DRB*15	0,00056306
A*24_B*07_CW*04_DRB*13	0,00450451	A*02_B*55_CW*14_DRB*13	0,00056306
A*02_B*51_CW*14_DRB*04	0,00450451	A*02_B*55_CW*14_DRB*15	0,00056306
A*24_B*49_CW*15_DRB*16	0,00450451	A*24_B*55_CW*01_DRB*03	0,00056306
A*23_B*44_CW*12_DRB*16	0,00450451	A*24_B*55_CW*01_DRB*14	0,00056306
A*24_B*18_CW*04_DRB*15	0,00450451	A*24_B*55_CW*16_DRB*03	0,00056306
A*24_B*44_CW*12_DRB*11	0,0045045	A*24_B*55_CW*16_DRB*14	0,00056306
A*2_B*51_CW*17_DRB*04	0,0045045	A*24_B*58_CW*01_DRB*03	0,00056306
A*29_B*27_CW*04_DRB*15	0,00450449	A*24_B*58_CW*01_DRB*14	0,00056306
A*03_B*51_CW*15_DRB*01	0,00351701	A*24_B*58_CW*16_DRB*03	0,00056306
A*01_B*49_CW*07_DRB*11	0,00225225	A*24_B*58_CW*16_DRB*14	0,00056306
A*01_B*49_CW*07_DRB*16	0,00225225	A*26_B*08_CW*07_DRB*11	0,00056306
A*01_B*49_CW*12_DRB*11	0,00225225	A*26_B*08_CW*07_DRB*16	0,00056306
A*01_B*49_CW*12_DRB*16	0,00225225	A*26_B*08_CW*12_DRB*11	0,00056306
A*02_B*15_CW*07_DRB*11	0,00225225	A*26_B*08_CW*12_DRB*16	0,00056306
A*02_B*15_CW*18_DRB*11	0,00225225	A*26_B*38_CW*07_DRB*11	0,00056306
A*24_B*07_CW*07_DRB*03	0,00225225	A*26_B*38_CW*07_DRB*16	0,00056306
A*24_B*07_CW*07_DRB*11	0,00225225	A*26_B*38_CW*12_DRB*11	0,00056306
A*24_B*15_CW*07_DRB*11	0,00225225	A*26_B*38_CW*12_DRB*16	0,00056306
A*24_B*15_CW*18_DRB*11	0,00225225	A*29_B*49_CW*07_DRB*13	0,00056306
A*24_B*49_CW*07_DRB*03	0,00225225	A*29_B*49_CW*07_DRB*15	0,00056306
A*24_B*49_CW*07_DRB*11	0,00225225	A*29_B*49_CW*14_DRB*13	0,00056306
A*02_B*14_CW*02_DRB*13	0,00112613	A*29_B*49_CW*14_DRB*15	0,00056306
A*02_B*14_CW*08_DRB*13	0,00112613	A*29_B*55_CW*07_DRB*13	0,00056306

A*02_B*38_CW*02_DRB*13	0,00112613	A*29_B*55_CW*07_DRB*15	0,00056306
A*02_B*38_CW*08_DRB*13	0,00112613	A*29_B*55_CW*14_DRB*13	0,00056306
A*03_B*15_CW*02_DRB*11	0,00112613	A*29_B*55_CW*14_DRB*15	0,00056306
A*03_B*15_CW*02_DRB*16	0,00112613	A*30_B*13_CW*06_DRB*03	0,00056306
A*03_B*15_CW*03_DRB*11	0,00112613	A*30_B*13_CW*06_DRB*11	0,00056306
A*03_B*15_CW*03_DRB*16	0,00112613	A*30_B*13_CW*15_DRB*03	0,00056306
A*03_B*27_CW*02_DRB*11	0,00112613	A*30_B*13_CW*15_DRB*11	0,00056306
A*03_B*27_CW*02_DRB*16	0,00112613	A*30_B*51_CW*06_DRB*03	0,00056306
A*03_B*27_CW*03_DRB*11	0,00112613	A*30_B*51_CW*06_DRB*11	0,00056306
A*03_B*27_CW*03_DRB*16	0,00112613	A*30_B*51_CW*15_DRB*03	0,00056306
A*11_B*07_CW*08_DRB*15	0,00112613	A*30_B*51_CW*15_DRB*11	0,00056306
A*11_B*07_CW*08_DRB*16	0,00112613	A*31_B*13_CW*06_DRB*03	0,00056306
A*11_B*39_CW*08_DRB*15	0,00112613	A*31_B*13_CW*06_DRB*11	0,00056306
A*11_B*39_CW*08_DRB*16	0,00112613	A*31_B*13_CW*15_DRB*03	0,00056306
A*26_B*07_CW*08_DRB*15	0,00112613	A*31_B*13_CW*15_DRB*11	0,00056306
A*26_B*07_CW*08_DRB*16	0,00112613	A*31_B*51_CW*06_DRB*03	0,00056306
A*26_B*15_CW*12_DRB*13	0,00112613	A*31_B*51_CW*06_DRB*11	0,00056306
A*26_B*15_CW*12_DRB*15	0,00112613	A*31_B*51_CW*15_DRB*03	0,00056306
A*26_B*15_CW*15_DRB*13	0,00112613	A*31_B*51_CW*15_DRB*11	0,00056306
A*26_B*15_CW*15_DRB*15	0,00112613	A*32_B*08_CW*07_DRB*11	0,00056306
A*26_B*39_CW*08_DRB*15	0,00112613	A*32_B*08_CW*07_DRB*16	0,00056306
A*26_B*39_CW*08_DRB*16	0,00112613	A*32_B*08_CW*12_DRB*11	0,00056306
A*26_B*47_CW*12_DRB*13	0,00112613	A*32_B*08_CW*12_DRB*16	0,00056306
A*26_B*47_CW*12_DRB*15	0,00112613	A*32_B*38_CW*07_DRB*11	0,00056306
A*26_B*47_CW*15_DRB*13	0,00112613	A*32_B*38_CW*07_DRB*16	0,00056306
A*26_B*47_CW*15_DRB*15	0,00112613	A*32_B*38_CW*12_DRB*11	0,00056306
A*33_B*14_CW*02_DRB*13	0,00112613	A*32_B*38_CW*12_DRB*16	0,00056306
A*33_B*14_CW*08_DRB*13	0,00112613	A*33_B*55_CW*01_DRB*03	0,00056306
A*33_B*38_CW*02_DRB*13	0,00112613	A*33_B*55_CW*01_DRB*14	0,00056306
A*33_B*38_CW*08_DRB*13	0,00112613	A*33_B*55_CW*16_DRB*03	0,00056306
A*03_B*07_CW*02_DRB*15	0,00084399	A*33_B*55_CW*16_DRB*14	0,00056306
A*02_B*49_CW*07_DRB*13	0,00056306	A*33_B*58_CW*01_DRB*03	0,00056306
A*02_B*49_CW*07_DRB*15	0,00056306	A*33_B*58_CW*01_DRB*14	0,00056306
A*02_B*49_CW*14_DRB*13	0,00056306	A*33_B*58_CW*16_DRB*03	0,00056306
A*02_B*49_CW*14_DRB*15	0,00056306	A*33_B*58_CW*16_DRB*14	0,00056306
A*02_B*55_CW*07_DRB*13	0,00056306		

Πίνακας 15. Οι αναμενόμενοι απλότυποι κατα φθίνουσα σειρά πιθανότητας, στον πληθυσμο των Καραγούνηδων.

A*02_B*18_CW*07_DRB*11	0,0343693	A*11_B*37_CW*06_DRB*16	0,00458716
A*01_B*08_CW*07_DRB*03	0,02293578	A*11_B*38_CW*12_DRB*13	0,00458716
A*24_B*35_CW*04_DRB*11	0,02293578	A*23_B*44_CW*04_DRB*03	0,00458716
A*02_B*35_CW*04_DRB*14	0,02293573	A*23_B*51_CW*01_DRB*11	0,00458716
A*02_B*44_CW*07_DRB*16	0,02062909	A*24_B*18_CW*04_DRB*11	0,00458716
A*25_B*18_CW*12_DRB*15	0,01834862	A*24_B*35_CW*07_DRB*11	0,00458716
A*02_B*51_CW*07_DRB*16	0,01376147	A*24_B*38_CW*12_DRB*07	0,00458716
A*11_B*55_CW*03_DRB*11	0,01375655	A*24_B*39_CW*12_DRB*03	0,00458716
A*24_B*18_CW*02_DRB*11	0,01374714	A*24_B*44_CW*07_DRB*16	0,00458716

A*02_B*51_CW*15_DRB*11	0,01150226	A*24_B*49_CW*15_DRB*13	0,00458716
A*25_B*18_CW*12_DRB*11	0,00918849	A*24_B*51_CW*01_DRB*11	0,00458716
A*11_B*55_CW*03_DRB*14	0,00917923	A*24_B*52_CW*14_DRB*11	0,00458716
A*23_B*49_CW*07_DRB*11	0,00917446	A*25_B*15_CW*03_DRB*13	0,00458716
A*02_B*35_CW*04_DRB*11	0,00917435	A*25_B*35_CW*03_DRB*01	0,00458716
A*02_B*51_CW*01_DRB*14	0,00917432	A*25_B*44_CW*16_DRB*01	0,00458716
A*24_B*08_CW*07_DRB*03	0,00917431	A*26_B*38_CW*12_DRB*10	0,00458716
A*01_B*44_CW*07_DRB*11	0,00917431	A*26_B*39_CW*12_DRB*07	0,00458716
A*01_B*44_CW*12_DRB*14	0,00917431	A*26_B*56_CW*01_DRB*01	0,00458716
A*01_B*49_CW*07_DRB*11	0,00917431	A*29_B*35_CW*16_DRB*16	0,00458716
A*02_B*15_CW*03_DRB*04	0,00917431	A*30_B*52_CW*12_DRB*16	0,00458716
A*02_B*15_CW*03_DRB*11	0,00917431	A*31_B*07_CW*15_DRB*04	0,00458716
A*02_B*39_CW*12_DRB*04	0,00917431	A*32_B*08_CW*07_DRB*03	0,00458716
A*02_B*44_CW*16_DRB*16	0,00917431	A*32_B*38_CW*12_DRB*08	0,00458716
A*26_B*44_CW*04_DRB*07	0,00917431	A*32_B*38_CW*12_DRB*15	0,00458716
A*32_B*40_CW*02_DRB*16	0,00917431	A*32_B*38_CW*12_DRB*16	0,00458716
A*68_B*47_CW*06_DRB*13	0,00917431	A*32_B*40_CW*02_DRB*12	0,00458716
A*01_B*51_CW*02_DRB*11	0,00917431	A*32_B*44_CW*16_DRB*13	0,00458716
A*02_B*51_CW*07_DRB*11	0,00917431	A*32_B*57_CW*06_DRB*11	0,00458716
A*11_B*18_CW*12_DRB*13	0,00917431	A*33_B*58_CW*03_DRB*03	0,00458716
A*03_B*35_CW*04_DRB*11	0,00917431	A*66_B*41_CW*17_DRB*13	0,00458716
A*24_B*44_CW*02_DRB*16	0,00917431	A*68_B*15_CW*12_DRB*15	0,00458716
A*29_B*07_CW*15_DRB*16	0,00917431	A*68_B*40_CW*03_DRB*04	0,00458716
A*24_B*44_CW*02_DRB*01	0,00917431	A*68_B*51_CW*04_DRB*11	0,00458716
A*02_B*18_CW*07_DRB*03	0,0069151	A*68_B*58_CW*03_DRB*03	0,00458716
A*02_B*44_CW*02_DRB*16	0,00689385	A*11_B*18_CW*04_DRB*16	0,00458716
A*01_B*07_CW*07_DRB*15	0,00689385	A*11_B*38_CW*12_DRB*11	0,00458716
A*02_B*07_CW*07_DRB*16	0,00458716	A*24_B*51_CW*04_DRB*11	0,00458716
A*02_B*15_CW*12_DRB*16	0,00458716	A*32_B*35_CW*04_DRB*01	0,00458716
A*24_B*44_CW*02_DRB*04	0,00458716	A*68_B*07_CW*15_DRB*11	0,00458716
A*03_B*35_CW*04_DRB*14	0,00458716	A*24_B*51_CW*01_DRB*01	0,00458716
A*11_B*18_CW*07_DRB*16	0,00458716	A*11_B*44_CW*05_DRB*04	0,00458716
A*02_B*50_CW*06_DRB*04	0,00458716	A*02_B*49_CW*14_DRB*14	0,00458716
A*02_B*18_CW*07_DRB*13	0,00458716	A*24_B*39_CW*12_DRB*12	0,00458716
A*02_B*39_CW*12_DRB*11	0,00458716	A*02_B*51_CW*16_DRB*16	0,00458716
A*02_B*50_CW*06_DRB*03	0,00458716	A*32_B*50_CW*06_DRB*03	0,00458716
A*02_B*35_CW*06_DRB*03	0,00458716	A*32_B*39_CW*12_DRB*14	0,00458716
A*02_B*51_CW*14_DRB*16	0,00458716	A*02_B*50_CW*06_DRB*07	0,00458716
A*02_B*18_CW*02_DRB*16	0,00458716	A*24_B*44_CW*16_DRB*03	0,00458716
A*02_B*51_CW*01_DRB*16	0,00458716	A*02_B*39_CW*07_DRB*16	0,00458716
A*02_B*52_CW*02_DRB*07	0,00458716	A*03_B*49_CW*07_DRB*14	0,00458716
A*24_B*44_CW*12_DRB*04	0,00458716	A*68_B*51_CW*15_DRB*04	0,00458716
A*01_B*08_CW*07_DRB*11	0,00458716	A*02_B*15_CW*12_DRB*11	0,00458716
A*01_B*08_CW*16_DRB*15	0,00458716	A*02_B*35_CW*04_DRB*12	0,00458716
A*01_B*13_CW*06_DRB*11	0,00458716	A*32_B*40_CW*02_DRB*11	0,00458716
A*01_B*18_CW*16_DRB*11	0,00458716	A*29_B*07_CW*16_DRB*16	0,00458716
A*01_B*37_CW*06_DRB*04	0,00458716	A*02_B*51_CW*15_DRB*04	0,00458716
A*01_B*37_CW*06_DRB*13	0,00458716	A*24_B*51_CW*01_DRB*03	0,00458715
A*01_B*52_CW*12_DRB*15	0,00458716	A*69_B*58_CW*03_DRB*11	0,00458711
A*02_B*18_CW*12_DRB*11	0,00458716	A*23_B*49_CW*07_DRB*03	0,00458701

A*02_B*35_CW*12_DRB*14	0,00458716	A*11_B*40_CW*15_DRB*14	0,00458223
A*02_B*37_CW*06_DRB*16	0,00458716	A*25_B*40_CW*12_DRB*16	0,00457298
A*02_B*50_CW*06_DRB*10	0,00458716	A*01_B*44_CW*05_DRB*04	0,00229358
A*02_B*51_CW*02_DRB*08	0,00458716	A*02_B*44_CW*05_DRB*11	0,00229358
A*02_B*58_CW*06_DRB*07	0,00458716	A*03_B*44_CW*16_DRB*07	0,00229358
A*03_B*13_CW*06_DRB*07	0,00458716	A*31_B*40_CW*03_DRB*07	0,00229358
A*03_B*18_CW*07_DRB*04	0,00458716	A*03_B*51_CW*15_DRB*07	0,00229358
A*03_B*18_CW*07_DRB*14	0,00458716	A*03_B*51_CW*15_DRB*15	0,00229358
A*03_B*55_CW*01_DRB*11	0,00458716	A*24_B*13_CW*06_DRB*07	0,00229358
A*03_B*58_CW*07_DRB*08	0,00458716	A*24_B*13_CW*07_DRB*07	0,00229358
A*25_B*13_CW*06_DRB*11	0,00229358	A*11_B*52_CW*12_DRB*15	0,00057339
A*25_B*13_CW*08_DRB*11	0,00229358	A*23_B*35_CW*04_DRB*13	0,00057339
A*30_B*13_CW*06_DRB*11	0,00229358	A*23_B*35_CW*04_DRB*16	0,00057339
A*30_B*13_CW*08_DRB*11	0,00229358	A*23_B*35_CW*17_DRB*13	0,00057339
A*30_B*51_CW*15_DRB*07	0,00229358	A*23_B*35_CW*17_DRB*16	0,00057339
A*30_B*51_CW*15_DRB*15	0,00229358	A*23_B*41_CW*04_DRB*13	0,00057339
A*68_B*18_CW*06_DRB*15	0,00229358	A*23_B*41_CW*04_DRB*16	0,00057339
A*68_B*18_CW*07_DRB*15	0,00229358	A*23_B*41_CW*17_DRB*13	0,00057339
A*03_B*44_CW*16_DRB*04	0,00229358	A*23_B*41_CW*17_DRB*16	0,00057339
A*31_B*40_CW*03_DRB*04	0,00229358	A*24_B*38_CW*03_DRB*01	0,00057339
A*01_B*44_CW*05_DRB*11	0,00229358	A*24_B*38_CW*03_DRB*13	0,00057339
A*02_B*44_CW*05_DRB*04	0,00229358	A*24_B*38_CW*12_DRB*01	0,00057339
A*01_B*07_CW*02_DRB*15	0,00228046	A*24_B*38_CW*12_DRB*13	0,00057339
A*02_B*51_CW*15_DRB*03	0,00225921	A*24_B*58_CW*03_DRB*01	0,00057339
A*01_B*18_CW*04_DRB*10	0,00114679	A*24_B*58_CW*03_DRB*13	0,00057339
A*01_B*18_CW*04_DRB*16	0,00114679	A*24_B*58_CW*12_DRB*01	0,00057339
A*01_B*18_CW*12_DRB*10	0,00114679	A*24_B*58_CW*12_DRB*13	0,00057339
A*01_B*18_CW*12_DRB*16	0,00114679	A*26_B*44_CW*01_DRB*01	0,00057339
A*02_B*13_CW*05_DRB*07	0,00114679	A*26_B*44_CW*01_DRB*14	0,00057339
A*02_B*13_CW*05_DRB*14	0,00114679	A*26_B*44_CW*05_DRB*01	0,00057339
A*02_B*13_CW*6_DRB*07	0,00114679	A*26_B*44_CW*05_DRB*14	0,00057339
A*02_B*13_CW*6_DRB*14	0,00114679	A*26_B*51_CW*01_DRB*01	0,00057339
A*02_B*51_CW*05_DRB*07	0,00114679	A*26_B*51_CW*01_DRB*14	0,00057339
A*02_B*51_CW*05_DRB*14	0,00114679	A*26_B*51_CW*05_DRB*01	0,00057339
A*02_B*51_CW*6_DRB*07	0,00114679	A*26_B*51_CW*05_DRB*14	0,00057339
A*02_B*51_CW*6_DRB*14	0,00114679	A*32_B*35_CW*04_DRB*13	0,00057339
A*03_B*18_CW*04_DRB*10	0,00114679	A*32_B*35_CW*04_DRB*16	0,00057339
A*03_B*18_CW*04_DRB*16	0,00114679	A*32_B*35_CW*17_DRB*13	0,00057339
A*03_B*18_CW*12_DRB*10	0,00114679	A*32_B*35_CW*17_DRB*16	0,00057339
A*03_B*18_CW*12_DRB*16	0,00114679	A*32_B*41_CW*04_DRB*13	0,00057339
A*24_B*50_CW*03_DRB*13	0,00114679	A*32_B*41_CW*04_DRB*16	0,00057339
A*24_B*50_CW*06_DRB*13	0,00114679	A*32_B*41_CW*17_DRB*13	0,00057339
A*24_B*55_CW*03_DRB*13	0,00114679	A*32_B*41_CW*17_DRB*16	0,00057339
A*24_B*55_CW*06_DRB*13	0,00114679	A*32_B*44_CW*01_DRB*01	0,00057339
A*30_B*35_CW*02_DRB*16	0,00114679	A*32_B*44_CW*01_DRB*14	0,00057339
A*30_B*35_CW*12_DRB*16	0,00114679	A*32_B*44_CW*05_DRB*01	0,00057339
A*30_B*40_CW*02_DRB*16	0,00114679	A*32_B*44_CW*05_DRB*14	0,00057339
A*30_B*40_CW*12_DRB*16	0,00114679	A*32_B*51_CW*01_DRB*01	0,00057339
A*32_B*07_CW*05_DRB*07	0,00114679	A*32_B*51_CW*01_DRB*14	0,00057339
A*32_B*07_CW*05_DRB*11	0,00114679	A*32_B*51_CW*05_DRB*01	0,00057339

A*32_B*07_CW*15_DRB*07	0,00114679	A*32_B*51_CW*05_DRB*14	0,00057339
A*32_B*07_CW*15_DRB*11	0,00114679	A*33_B*14_CW*08_DRB*04	0,00057339
A*32_B*44_CW*05_DRB*07	0,00114679	A*33_B*14_CW*08_DRB*15	0,00057339
A*32_B*44_CW*05_DRB*11	0,00114679	A*33_B*14_CW*12_DRB*04	0,00057339
A*32_B*44_CW*15_DRB*07	0,00114679	A*33_B*14_CW*12_DRB*15	0,00057339
A*32_B*44_CW*15_DRB*11	0,00114679	A*33_B*38_CW*03_DRB*01	0,00057339
A*68_B*35_CW*02_DRB*16	0,00114679	A*33_B*38_CW*03_DRB*13	0,00057339
A*68_B*35_CW*12_DRB*16	0,00114679	A*33_B*38_CW*12_DRB*01	0,00057339
A*68_B*40_CW*02_DRB*16	0,00114679	A*33_B*38_CW*12_DRB*13	0,00057339
A*68_B*40_CW*12_DRB*16	0,00114679	A*33_B*52_CW*08_DRB*04	0,00057339
A*68_B*50_CW*03_DRB*13	0,00114679	A*33_B*52_CW*08_DRB*15	0,00057339
A*68_B*50_CW*06_DRB*13	0,00114679	A*33_B*52_CW*12_DRB*04	0,00057339
A*68_B*55_CW*03_DRB*13	0,00114679	A*33_B*52_CW*12_DRB*15	0,00057339
A*68_B*55_CW*06_DRB*13	0,00114679	A*33_B*58_CW*03_DRB*01	0,00057339
A*03_B*38_CW*04_DRB*08	0,00057339	A*33_B*58_CW*03_DRB*13	0,00057339
A*03_B*38_CW*04_DRB*11	0,00057339	A*33_B*58_CW*12_DRB*01	0,00057339
A*03_B*38_CW*12_DRB*08	0,00057339	A*33_B*58_CW*12_DRB*13	0,00057339
A*03_B*38_CW*12_DRB*11	0,00057339	A*68_B*38_CW*04_DRB*08	0,00057339
A*03_B*41_CW*04_DRB*08	0,00057339	A*68_B*38_CW*04_DRB*11	0,00057339
A*03_B*41_CW*04_DRB*11	0,00057339	A*68_B*38_CW*12_DRB*08	0,00057339
A*03_B*41_CW*12_DRB*08	0,00057339	A*68_B*38_CW*12_DRB*11	0,00057339
A*03_B*41_CW*12_DRB*11	0,00057339	A*68_B*41_CW*04_DRB*08	0,00057339
A*11_B*14_CW*08_DRB*04	0,00057339	A*68_B*41_CW*04_DRB*11	0,00057339
A*11_B*14_CW*08_DRB*15	0,00057339	A*68_B*41_CW*12_DRB*08	0,00057339
A*11_B*14_CW*12_DRB*04	0,00057339	A*68_B*41_CW*12_DRB*11	0,00057339
A*11_B*14_CW*12_DRB*15	0,00057339	A*24_B*40_CW*02_DRB*16	1,4176E-05
A*11_B*52_CW*08_DRB*04	0,00057339	A*11_B*40_CW*15_DRB*11	4,9224E-06
A*11_B*52_CW*08_DRB*15	0,00057339		
A*11_B*52_CW*12_DRB*04	0,00057339		

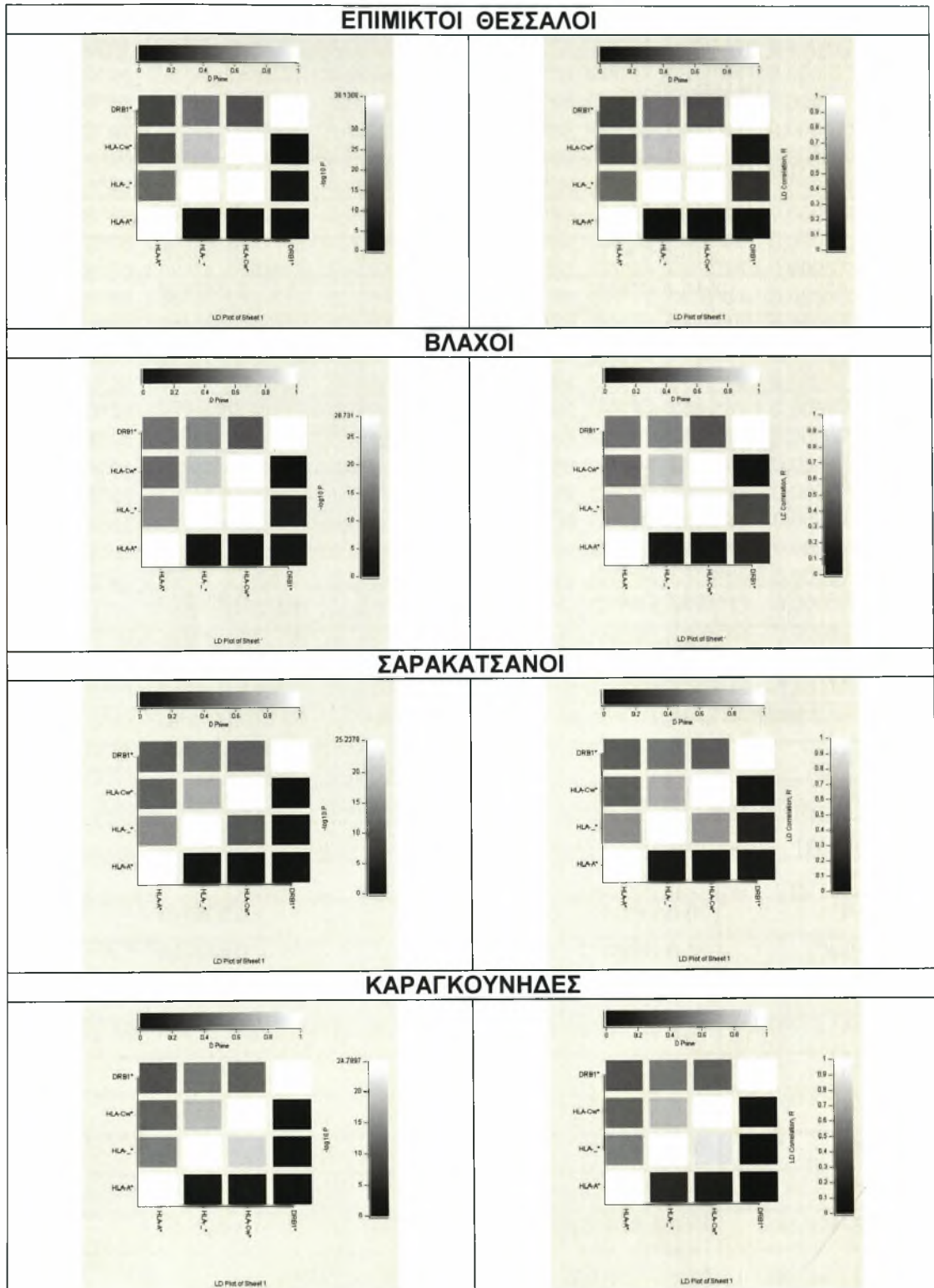
Στους παρακάτω πίνακες φαίνεται η ισορροπία σύνδεσης (Hardy-Weinberg) των HLA-τόπων στους 4 πληθυσμούς (πίνακας 16) και οι συντελεστές συσχέτισεων των τεσσάρων αλληλόμορφων LD D-prime (πίνακας 17):

Πίνακας 16. Ισορροπία σύνδεσης κατά Hardy-Weinberg στους 4 υπο μελέτη πληθυσμούς								
	ΒΛΑΧΟΙ		ΚΑΡΑΓΚΟΥΝΗΛΕΣ		ΣΑΡΑΚΑΤΣΑΝ ΟΙ		ΘΕΣΣΑΛΟΙ	
	X ²	p-value	X ²	p-value	X ²	p-value	X ²	p-value
HLA-A*	176,07	0,0007	102,73	0,8708	135,47	0,4966	294,95	1,21E-08
HLA-B*	234,09	0,9980	209,93	0,8365	270,77	0,2113	387,23	0,7405
HLA-Cw*	118,19	0,0023	112,87	0,0600	102,23	0,1979	164,25	4,02E-06
HLA-DRB1*	66,65	0,4544	70,23	0,3380	65,14	0,5067	76,19	0,5369

Πίνακας 17. Συντελεστές συσχέτισης των 4 αλληλομόρφων στους 4 υπο μελέτη πληθυσμούς

ΕΠΙΜ. ΘΕΣΣΑΛΟΙ		LD Correlation R	D Prime
HLA-A*	HLA-B*	0.0238323	0.489121
HLA-A*	HLA-Cw*	0.00152771	0.40399
HLA-A*	HLA-DRB1*	7,48E+00	0.367436
HLA-B*	HLA-Cw*	1	0.785881
HLA-B*	HLA-DRB1*	0.266682	0.547095
HLA-Cw*	HLA-DRB1*	0.120899	0.407572
ΒΛΑΧΟΙ		LD Correlation R	D Prime
HLA-A*	HLA-B*	0.0390588	0.595065
HLA-A*	HLA-Cw*	0.0628966	0.480629
HLA-A*	HLA-DRB1*	0.201664	0.505003
HLA-B*	HLA-Cw*	1	0.777931
HLA-B*	HLA-DRB1*	0.362932	0.587239
HLA-Cw*	HLA-DRB1*	0.0317058	0.416415
ΣΑΡΑΚΑΤΣΑΝΟΙ		LD Correlation R	D Prime
HLA-A*	HLA-B*	0.10069	0.601017
HLA-A*	HLA-Cw*	0.0654273	0.461924
HLA-A*	HLA-DRB1*	0.0986985	0.436336
HLA-B*	HLA-Cw*	0.640402	0.701395
HLA-B*	HLA-DRB1*	0.155262	0.530285
HLA-Cw*	HLA-DRB1*	0.0632328	0.448834
ΚΑΡΑΓΚΟΥΝΗΔΕΣ		LD Correlation R	D Prime
HLA-A*	HLA-B*	0.20188	0.550084
HLA-A*	HLA-Cw*	0.15138	0.463537
HLA-A*	HLA-DRB1*	0.0102097	0.389533
HLA-B*	HLA-Cw*	0.903764	0.74682
HLA-B*	HLA-DRB1*	0.0230652	0.52105
HLA-Cw*	HLA-DRB1*	0.0672694	0.462253

Σχηματικά, οι παραπάνω σχέσεις αποδίδονται ως εξής:



Σχήμα 12. Διάγραμμα στο οποίο διαφαινονται οι σχέσεις των υπό μελέτη γενετικών τόπων. Οι συντελεστές τείνουν στην μονάδα υποδηλώνοντας μεγαλύτερη συσχέτιση όσο το χρώμα είναι πιο ανοικτό.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η μελέτη αυτή επιχειρεί να εντοπίσει γενετικές διαφοροποιήσεις όσον αφορά αλληλόμορφα των τόπων A, B, CW, DRB1 του επίμικτου Θεσσαλικού πληθυσμού καθώς και των τριών πληθυσμών των Βλάχων, των Καραγκούνηδων και των Σαρακατσάνων που κατοικούν στην περιοχή οι οποίοι θεωρείται ακόμα ότι παραμένουν κλειστοί.

Η μελέτη της συχνότητας των γονιδιακών φαινοτύπων και απλοτύπων έχει τόσο θεωρητική όσο και πρακτική σημασία. Ειδικότερα αποκαλύπτει την ύπαρξη διαφορών, που αποτελούν σημαντικά στοιχεία για την προέλευση των πληθυσμών, τη γενετική απόσταση μεταξύ τους και τις μετακινήσεις τους, στοιχεία που μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε ποικίλους τομείς (Phillips 1996, Blaschitz et al 2001, Leffell 2004).

Επιπλέον, οι αναλογίες των απλοτύπων στους πληθυσμούς οδηγούν σε συμπεράσματα σχετικά με την ανοχή των ατόμων που τους αποτελούν στο «ίδιο», την αποτελεσματικότητα αντιμετώπισης παθογόνων, την αποφυγή αυτοάνοσων αντιδράσεων και τέλος, την πίεση φυσικής επιλογής που αυτοί υφίστανται.

Η τελευταία ένδειξη μπορεί να αποτελέσει στοιχείο πρόβλεψης της φυλογενετικής πορείας των πληθυσμών και να προβλέψει τα εξελικτικά μονοπάτια που πρόκειται να ακολουθήσουν (Perosa et. Al. 2002, Kanga et. al. 2004).

Συνεπώς, οι φυλογενετικές αναλύσεις μπορούν να παρέχουν σπουδαίες πληροφορίες για την ευπάθεια ή την αντίσταση ενός πληθυσμού και να εξηγήσουν αυτά τα ευρήματα με τη βοήθεια της φυσικής επιλογής ή της γενετικής ροής.

Το ρεπερτόριο των HLA υποδοχέων σε διαφορετικά άτομα επηρεάζεται από την πολυμορφική και πολυγονιδιακή φύση της γονιδιακής οικογένειας. Η ποικιλότητα στο γονιδιακό σύμπλεγμα είναι αποτέλεσμα του πολυμορφισμού σε διαφορετικά γονίδια όσο και ποικιλίας στον αριθμό και το είδος των γονιδίων που είναι παρόντα σε ένα δεδομένο απλότυπο (Urhberg et al 2002, Shilling et al 2002, Selvakumar et al 1997).

Γενικώς, μελέτες των MHC – τόπων έχουν από παλιά επιχειρηθεί στον

Ελληνικό χώρο, όλες αυτές οι μελέτες αναφέρονταν σε επίμικτο Ελληνικό Πληθυσμό (Stavroulous – Giokas C. Hum Immunol 2000, '01).

Οι περισσότερες από αυτές είτε έχουν πολύ μικρό πληθυσμιακό δείγμα είτε έχουν πραγματοποιηθεί με τις παλιότερες ορολογικές τεχνικές.

Παρόμοιες μελέτες έχουν γίνει και στην Ιταλία όπου διαφορετικές περιοχές και περίχωρα της Ιταλίας παρουσιάζουν σημαντικές διαφορές στα αλληλόμορφα των HLA, δίνοντας μια επιπλέον ένδειξη της γενετικής ετερογένειας του Ιταλικού πληθυσμού (Piazza 1989, 2000, 2001).

Στην παρούσα μελέτη πρωτοποριακή είναι η μεθοδολογία των μοριακών τεχνικών που χρησιμοποιείται, το μεγάλο σχετικά πληθυσμιακό δείγμα που έχει συλλεχθεί καθώς και οι παράγοντες που έχουν απομονωθεί σε σχέση με παλαιότερες μελέτες. Η καθαρότητα του πληθυσμού του δείγματος, εξασφαλίστηκε με την εξερεύνηση κάθε ατόμου που συμπεριλήφθηκε, μέχρι βάθους τριών γενεών.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της στατιστικής ανάλυσης, προκύπτουν τα ακόλουθα συμπεράσματα:

Παρατηρούμε ότι το συχνότερο αλληλόμορφο που ανιχνεύεται σε όλους τους πληθυσμούς της μελέτης αλλά και στον επίμικτο Ελληνικό και Ευρωπαϊκό πληθυσμό είναι το A*02 ώστε μπορεί να υποστηριχθεί η κοινή γενετική τους προέλευση. Όσον αφορά το αλληλόμορφο HLA-B, τα αποτελέσματα της μελέτης αναδεικνύουν ως συχνότερο το B*35 και στους τέσσερεις υπο μελέτη πληθυσμούς, το οποίο συμπίπτει με την συχνότητα του στον επίμικτο ελληνικό πληθυσμό, διαφοροποιείται όμως στον Ευρωπαϊκό στον οποίο επικρατέστερο είναι το αλληλόμορφο B*44. Μικρή φαίνεται να είναι και η συχνότητα του B*27 το οποίο συνδέεται με την αγκυλοποιητική σπονδυλίτιδα, και που παρά την σπανιότητα ανεύρεσης οδηγεί σε αύξηση του κινδύνου για εμφάνιση της νόσου 90 φορές. Επίσης μικρές αλλά όχι σημαντικές διαφοροποιήσεις ανάμεσα στις παρατηρηθήσες συχνότητες των 4 πληθυσμών και του Ευρωπαϊκού και επίμικτου Ελληνικού πληθυσμού παρατηρούνται στο αλληλόμορφο DRB1 υποδεικνύοντας ότι ο ελληνικός πληθυσμός έχει μικρή γενετική απόσταση από τον Ευρωπαϊκό. Τα εν λόγω πληθυσμιακά ποσοστά παρουσιάζονται στον πίνακα 18.

Πίνακας 18. Οι συχνότητες των επικρατέστερων MCH αλληλόμορφων στον Ευρωπαϊκό, στον Επίμικτο Ελληνικό και στους τέσσερεις υπο μελέτη πληθυσμούς

	<i>Ευρωπαίοι</i>	Επ. Ελληνικός	Επιμ. Θεσσαλοί	Βλάχοι	Σαρακ.	Καραγκ.
HLA-A*01	16,4	17,5	10	9,4	12,2	11
HLA-A*02	28,9	44,3	32	31,5	27,9	30,7
HLA-A*03	14,4	16,7	7	7,5	10,8	6
HLA-A*24	8,4	27,2	13,8	12,6	12,6	14,7
HLA-B*07	14,1	4,9	3,2	2,8	6,8	4,1
HLA-B*08	12	8,1	4,4	8,7	9	4,6
HLA-B*35	8,7	26,4	17,4	17,7	17,6	11
HLA-B*44	15,6	13	7,9	5,5	6,8	14,2
HLA-DRB*03	14,5	12,6	7,4	9,4	9,5	9,2
HLA-DRB*04	17,7	18,3	7,1	7,5	6,8	7,8
HLA-DRB*07	14,8	13,4	6,8	5,1	1,8	6
HLA-DRB*15	17,2	16,7	8,5	7,5	9,9	6

Η γενετική σύσταση των τεσσάρων υπο μελέτη πληθυσμών διαφοροποιείται μεταξύ τους κατα την ανάλυση Hardy-Weinberg. Ιδιαίτερα, η ισορροπία διατηρείται στους τόπους MHC-B και MHC-DRB1 για τους Βλάχους και τους Θεσσαλούς ενώ για τους Καραγκούνηδες και τους Σαρακατσάνους σε όλους τους εξετασθέντες τόπους MHC-A, MHC-B, MHC-CW, MHC-DRB1. Σημαντικές όμως διαφορές προκύπτουν όσον αφορά τους γενετικούς τόπους MHC-A και MHC-CW στους Βλάχους και τους Θεσσαλούς οι οποίες πιθανόν να οφείλονται σε δυνάμεις επιλογής (π.χ στρωμάτωση, γάμοι κ.α).

Σύμφωνα τώρα με τα αποτελέσματα των συντελεστών LD και D-prime την μεγαλύτερη συσχέτιση την παρουσιάζουν τα αλληλόμορφα HLA-B HLA-CW και στους τέσσερεις πληθυσμούς, ενώ ακολουθεί με μικρότερο συντελεστή συσχέτισης το HLA-B με το HLA-A και το HLA-B με το HLA-DRB1. Η δυναμική των σχέσεων αυτή παρουσιάζονται και στα διαγράμματα του σχήματος 12.

Ενδιαφέρον παρουσιάζουν οι ομοιότητες ανα δύο στις πιθανότητες ανεύρεσης των αναμενόμενων απλότυπων. Συγκεκριμένα ο επικρατέστερος

αναμενόμενος απλότυπος και στους Βλάχους και στους Σαρακατσάνους είναι ο A*01-B*08-CW*07-DRB1*03 ο οποίος έρχεται δεύτερος σε πιθανότητα στους Καραγκούνηδες και τέταρτος στους Θεσσαλούς. Ο A*02-B*18-CW*07-DRB1*11 πιθανολογείται συχνότερος στους Θεσσαλούς αλλά και στους Καραγκούνηδες ενώ στους Βλάχους και στους Σαρακατσάνους εμφανίζεται τέταρτος. Το γεγονός αυτό υποδηλώνει την πρακτική σημασία της μελέτης μας, οργάνωση τραπεζών μη συγγενών εθελοντών δοτών μυελού των οστών ή στελεχιαίων κυττάρων ομφαλοπλακουντιακού αίματος.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Σκοπός της παρούσης διδακτορικής διατριβής αποτελεί η μελέτη των γενετικών τόπων HLA-A, -B, -C και DRB₁ στον επίμικτο και σε τρεις κλειστούς (Βλάχοι, Σαρακατσάνοι, Καραγκούνηδες) Θεσσαλικούς πληθυσμούς, και η σύγκριση μεταξύ αυτών του Επίμικτου Ελληνικού και Ευρωπαϊκού πληθυσμού, που έχουν μελετηθεί με τον ίδιο τρόπο και τα αποτελέσματα έχουν δημοσιευθεί στη διεθνή βιβλιογραφία.

ΥΛΙΚΟ

Το υλικό της μελέτης αποτέλεσαν 517 άτομα (274 άνδρες –243 γυναίκες).

Αναλυτικά:

1. Επίμικτοι Θεσσαλοί: 170 άτομα
2. Βλάχοι: 127 άτομα
3. Σαρακατσάνοι: 11 άτομα
4. Καραγκούνηδες: 109 άτομα

Τα άτομα της μελέτης ήταν υγιή, ηλικίας 18 – 65 ετών, στον επίμικτο Θεσσαλικό πληθυσμό, να μην είναι συγγενείς μεταξύ τους και να είναι γεννημένοι στη Θεσσαλία οι ίδιοι και οι γονείς τους.

Στις υποομάδες (Βλάχοι, Σαρακατσάνοι, Καραγκούνηδες) να είναι τρεις γενεές καθαροί μεταξύ τους.

Η καθαρότητά τους ελέγχθηκε και εθνολογικά (Βλάχικη γλώσσα, επάγγελμα, γνώση και ενασχόληση με τα σχετικά έθιμα, συμμετοχή σε συλλόγους κ.λπ.) με στόχο την επιβεβαίωση της κατάταξης των ατόμων στον ανάλογο πληθυσμό.

ΜΕΘΟΔΟΣ

Η τυποποίηση των HLA – αλληλομόρφων έγινε με απομόνωση του γονιδιωματικού DNA από λευκά αιμοσφαίρια περιφερικού αίματος, με τη χρήση μοριακών τεχνικών. Συγκεκριμένα με ενίσχυση του DNA με PCR και

χρήση ειδικών ολιγονουκλεοτιδικών αφητηριών (PCR – Sequence Specific Primers, PCR – SSP) με την βοήθεια των εμπορικών σκευασμάτων της Dynal (Dynal SSP typing kit) και της Olerup (Olerup SSP Kit).

Για τη γενετική και τη στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό STATA 9,0, ενώ για την σύγκριση των ποσοτικών και ποιοτικών χαρακτηριστικών κατά την ανάλυση εφαρμόστηκαν τα παραμετρικά τεστ ANOVA και Pearson χ^2 .

Η γενετική διερεύνηση των δεδομένων πραγματοποιήθηκε με το λογισμικό Helix Tree.

Προσδιορίστηκαν η συχνότητα των HLA – A, B, C, και DRB₁, ο βαθμός ισορροπίας με το νόμο Hardy Weinberg, ο βαθμός ανισορροπίας σύνδεσης και η αναμενόμενη συχνότητα των HLA – απλοτύπων των πληθυσμών.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Τα αποτελέσματα της μελέτης έδειξαν ότι:

1) Οι Βλάχοι, οι Σαρακατσάνοι και οι Καραγκούνηδες αποτελούν γενετικά διακριτούς πληθυσμούς.

2) Σημαντικές διαφορές όμως προκύπτουν ανάμεσα στους Βλάχους και τον επίμικτο Θεσσαλικό πληθυσμό κυρίως όσον αφορά τους γενετικούς τόπους MHC-A και MHC-CW* κατά την ανάλυση Hardy – Weinberg.

3) Ο επίμικτος Θεσσαλικός πληθυσμός διακρίνεται γενετικά από τους τρεις αυτούς πληθυσμούς, έχει όμως υποστεί σημαντική επίδραση από αυτούς.

4) Η γενετική σύσταση όλων των πληθυσμών που μελετήθηκαν, παρουσιάζει μικρές σχετικά αποκλίσεις από τη γενετική σύσταση του Επίμικτου Ελληνικού Πληθυσμού.

5) Ο επίμικτος Ελληνικός πληθυσμός έχει μικρή γενετική απόσταση από τον Ευρωπαϊκό.

6) Ενδιαφέρον παρουσιάζουν οι ομοιότητες ανά δύο στις πιθανότητες ανεύρεσης των αναμενόμενων απλοτύπων.

Συγκεκριμένα ο επικρατέστερος αναμενόμενος απλότυπος είναι:

A*01 – B*08 – Cw*07 – DRB*₁03 Βλάχοι – Σαρακατσάνοι και A*02 –

B*18 – CW*07 – DRB*₁11 επίμικτοι Θεσσαλοί – Καραγκούνηδες.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ: Οι Βλάχοι είναι ο γενετικά περισσότερο συμπαγής Θεσσαλικός πληθυσμός, ενώ ο επίμικτος Θεσσαλικός πληθυσμός, οι Καραγκούνηδες και οι Σαρακατσάνοι, έχουν υποστεί σημαντικές γενετικές επιδράσεις.

SUMMARY

INTRODUCTION: The purpose of the present doctoral thesis is the study of the genetic regions HLA –A, -B, -C and DRB₁ in the semi-mixed but also in the three closed Thessalian populations (“Vlahi”, “Sarakatsani”, “Karagounides”) and the comparison between those of semi-mixed greek and european population which have been studied in the same way and whose results have been published in the international bibliography.

MATERIAL: 517 people constituted the material of the study (274 men – 243 women).

Analytically:

1. Semi-mixed Thessalians: 170 people
2. “Vlahi”: 127 people
3. “Sarakatsani”: 111 people
4. “Karagounides”: 109 people

The people in the semi-mixed Thessalian population study, were healthy, aged between 18-65 years old, not related to one another and born in Thessalia, of at least 2 generations.

In the subgroups (“Vlahi”, “Sarakatsani”, “Karagounides”) they needed to be three generations’ cleanblooded. Their purity (cleanbloodness) was checked both ethnologically (“Vlahiki” language, profession, knowledge and occupation with the relative customs, participation in differing organisations e.t.c.) aiming at the confirmation of the classification of the people in the suitable (analogous) population.

METHOD: The standardization of HLA-typing was performed by isolating the genomic DNA from the leukocytes of peripheral blood, via the use of molecular techniques. More precisely, via enhancing the DNA with PCR and the use of special oligonucleidic primers (PCR – sequence specific primers, PCR – SSP), with the help of Dynalindustrial merchandise (Dynal

SSP typing kit) and olerup (olerup SSP kit).

The logistical program (software) STATA 9,0 was used for the genetical and statistical analysis of the results, while during the analysis the parametrical tests ANOVA and Perason X^2 were used for comparing the quantitative and qualitative characteristics.

The data was analysed via Helix Tree software (logistica program). The frequency of HLA –A, B, C and DRB1 the balance degree according to the law of Hardy Weinberg , the degree of imbalance connection and the frequency of HLA – haplotype of the population were identified.

RESULTS: The results of the study showed that:

1) “Vlahi”, “Sarakatsani” and “Karagounides” from genetically distinct populations.

2) Striking differences arise between “Vlahous” and the semi-mixed Thessalian population, especially as far as the genetic regions MHC-A and MHC-CW* are concerned, during the Hardy – Weinberg analysis.

3) The semi-mixed Thessalian population is separated genetically from these three populations, however, it has gone through great influence by them.

4) The genetic composition of all populations studied, presents slight variations compared to the genetic composition of the semi-mixed greek population.

5) The semi-mixed Greek populations has a slight genetical difference from the European one.

6) The similarities seen between populations at the odds of finding the expected haplotypes show great interest.

More particularly, the most dominant expected haplotypes are:

A*01 – B*08 – Cw*07 – DRB*₁03 “Vlahi” – “Sarakatsani” – A*02 – B*18 – CW*07 – DRB*₁11 “Semi-mixed Thessalian” – “Karagounides”

CONCLUSIONS: “Vlahi”, are genetically the densest Thessalian population, while the semi-mixed Thessalian population, “Karagounides” and “Sarakatsani” have shown to have gone through severe genetic effects.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. ABBAS AK, LICHTMAN AH. *Cellular and Molecular Immunology*. 5th ed, Saunders, Philadelphia 2003.
2. Adam K, Polymenidis Z, Papakyriazi L et al. HLA-A, B, DR antigens and renal transplantation from cadaveric donors and living-related donors in greek patients. *Transplant Proc* 1992; 24: 6:2449-2450.
3. Adam K, Vavatsi N, Mytilmeos J et al. NLA class U DNA-RFLP typing in 102 individuals from Northern Greece. *Transpl In(* 1994: 7 JSuppl U: 522-526.
4. Albrechtsen D, Arnesen E, Thorsby E. Cell-mediated cytotoxicity directed at HLA-D gene products. *Transplantation* 1979; 27:338-34].
5. *Ammerman AJ, Cavalli-Sforza L*. Measuring the rate of spread of early farming in Europe. *Man* 6:674, 1971.
6. ANDO A, KAWAI J, MAEDA M, TSUJI K, TROWSDALE J, INOKO H. Mapping and nucleotide sequence of a new HLA class II light chain, DQB3. *Immunogenetics* 1989, 30:243-249.
7. *Angelini G, De Preval C, Gorski J, Mach B*. High-resolution analysis of the human HLA-DR polymorphism by hybridization with sequence-specific oligonucleotide probes. *Proc Nail Acad Sci USA* 83:4489, 1986.
8. Auchincloss H, Sachs DH. Transplantation and Graft Rejection. In: Paul WE, ed. *Fundamental Immunology*, Raven Press Ltd, New York 1993: J099 J14J.
9. ARNAIZ-VILLENA A, CARIN M, BENDIKUZE N, GOMEZ-CASADO E, MOSCOSO J, ZAMORA J, SILVERA C, OGUZ FS, SARPER-DILER A, DE PACHO A, ALLENDE L, GUILLEN J, MARTINEZ-LASO J. HLA alleles in Turks. *Tissue Antigens* 2001, 57:308-317.
10. Austyn JM and Wood K.f. The major histocompatibility complex. In Austyu JM and Wood KJ eds *Principles of cellular and molecular immunology*. Oxford Univ. Press N-Y. 1994: 65-113.

11. Badenhop K, Schwarz G, Bingley P et al. Restriction fragment length polymorphism analysis of NLA haplotypes in families with Type 1 diabetes mellitus. *Tissue Antigens* 1990; 35: 32-39.
12. Balakrishnan V, Sanghvi LD. Distance between populations on the basis of attribute data. *Biometrics* 24:859, 1968.
13. Beatty PG 1993. Marrow Transplantation from Unrelated Donors. In: Solheim BG, Ferrone S and Moller E, eds. *The HLA System in Clinical Transplantation*, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg 1993: 366-372.
14. Bell J, Denney D, MacMurray A, Foster L, Waiting D and McDevitt HO. Molecular mapping of class II polymorphisms in the human Major Histocompatibility Complex. *J Immunol* 1987; 139: 562-573.
15. Bell J. The polymerase chain reaction. *Immunol Today* 1989; 10: 351-355.
16. Benacerraf B. Biological Function of HLA Molecules. In Solheim BG, Ferrone S and Moller E, eds. *The HLA System in Clinical Transplantation*, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg 1993: 109-118.
17. Bjorkman PJ, Saper MA, Samraoui B et al. Structure of the human class II histocompatibility antigen, HLA-A2. *Nature* 1987; 329: 506-512.
18. Bidwell JL, Bidwell EA, Laundry G, Kloyda P and Bradley BA. Allelotypes defined by short DQ α and DQ β cDNA probes correlate with and define splits of HLA-DQ serological specificities. *Mol Immunol* 1987; 24: 5: 513-522.
19. Bidwell JL. DNA-RFLP analysis and genotyping of HLA-DR and DQ antigens. *Immunol Today* 1988; 9: 18-23.
20. Bidwell JL, Bidwell EA, Wood NAP et al. HLA-DR and -DQ Typing by DNA-RFLP Analysis. In: Hui KM and Bidwell JL eds *Handbook of HLA-typing techniques*, CRC Press, Florida 1993: 71-98.
21. Bignon JD, Semana G, Tiercy JM, Simons M, Lalouel JM and Cohen D. DNA-RFLP analysis: HLA-DR Beta Workshop Report. In: B. Dupont ed *Immunobiology of HLA Vol I, Transplantation Testing* 1987,

- Springer-Verlag, New York 1989:851-860.
22. *Black FL, Salzano FM.* Evidence for heterosis in the HLA system. *Am J Hum Genet* 33: 894, 1981.
 23. *Bodmer GJ, Marsh SGH, Albert ED et al.* Nomenclature for factors of the HLA system, 1995. *Tissue Antigens* 1995; 46: 1-18.
 24. *Bodmer WF, Cann H, Piazza A.* Differential genetic variability among polymorphisms as an indication of natural selection: Histocompatibility testing. Munksgaard, Copenhagen, 753, 1972.
 25. *Bostan D, White RL, Skolnick M, Davis RW.* Construction of a genetic linkage map using restriction fragment length polymorphisms. *Am J Hum Genet* 1980; 32: 314-331.
 26. *Bugawan TL, Apple R and Erlich HA.* A method for typing polymorphism at the HLA-A locus using PCR amplification and immobilized oligonucleotide probes. *Tissue Antigens* 1994; 44: 137-147.
 27. ΓΕΡΜΕΝΗΣ ΑΕ. Ιατρική Ανοσολογία. Εκδόσεις Παπαζήση, Αθήνα 2000.
 28. *Carlsson B, Bohme J, Lundgren et al.* HLA class II Genes Studied With Genomic Hybridization in Kidney and Bone Marrow Transplantation Donor-Recipient Pairs. *Transplant Proc* 1985; XVII: I: 952-954.
 29. *Carlsson B, Wallin J, Bohme J and Moller E.* HLA-DR-DQ Haplotypes Defined by Restriction Fragment Analysis: Correlation to Serology. *Hum Immunol* 1987; 20:95-113.
 30. *Cavalli-Sforza L* Phylogenetic analysis: Histocompatibility testing. Munksgaard, Copenhagen, 17, 1972.
 31. *Cavalli-Sforza LL, Edwards AWF.* Phylogenetic analysis models and estimation procedures. *Am J Hum Genet* 19:233, 1967.
 32. *Cambon-Thomsen A, Ohayon E.* Province française. In: Ohayon E, Cambon-Thomsen A (eds) Human population genetics, Colloque INSERM 142, 1987.
 33. *Cereb N, Maye P, Lee S, Kong Y and Yang Y.* Locus-specific

- amplification of HLA class I genes from genomic DNA: locus-specific sequences in the first and third introns of HLA-A, -B and -C alleles. *Tissue Antigens* 1995; 45: 1-11
34. Cicciarcilli J and Cho Y. HLA matching: univariate and multivariate analyses of UNOS Registry data. In: Terasaki PI, ed. *Clinical transplants* 1991. UCLA Tissue
 35. Typing Laboratory, Los Angeles 1991: 325-333.
 36. Colombe BW. Histocompatibility Testing. In: Stites PD, Terr IA, Parslow GT eds *Basic & Clinical Immunology*, a Lange medical book, San Francisco 1994:237-255
 37. DAAR AS, FUGGLE SV, FABRE JW, TING A, MORRIS PJ. The detailed distribution of MHC class II antigens in normal human organs. *Transplantation* 1984, 38:293-298.
 38. Dausset J. Iso-leuco-anticorps. *Acta Haematol*, 1958: 20: 156-160.
Dausset J. The major histocompatibility complex in man. Last, present and future concepts. *Science*, 1974: 1469-1474.
 39. *Dausset J, Colombani J*. Report of an International Workshop and Conference. Evian, France 1972. In: *Histocompatibility testing*. Munksgaard, Copenhagen 1972.
 40. *Dausset J, Legrand L, Lepage V, Contu L, Marcelli-Barge A, Wildloecher J et al*. A haplotype study of HLA complex with special reference to the HLA-DR series and to Bf, C2 and Glyoxalase 1 polymorphisms. *Tissue Antigens* 12: 297, 1978.
 41. DAVID-WATINE B, ISRAEL A, KOURLISKY P. The regulation and expression of MHC class I genes. *Immunol Today* 1990, 11:286-292.
 42. Dawkins RL, Kay PH, Martin E and Christiansen FT. The genomic structure of ancestral haplotypes revealed by pulsed field gel electrophoresis (PFGE). In: B. Dupon ed *Immunobiology of HLA Vol I, Histoconpatibility Testing* 1987. Springer-Verlag, New York 1989: 893-895.
 43. *Degos L, Colombani J, Chaventre A, Bengison B, Jacquard A*. Selective pressure on HLA polymorphism. *Nature* 249: 62, 1974.

44. *Degos L.* La repartition anthropologique des genes HLA et la dynamique des populations: HLA Complexe majeur d'histocompatibilite de Γ homme. Flammarion medecine-sciences 101, 1986.
45. *Degos L.* Repartition anthropologique des genes HLA et dynamique des population. Dausset J, Pla M (eds) HLA, Complexe Majeur d'Histocompatibilite de Γ Homme. Flammarion, 215, 1989.
46. Donald JA, Rudman K, Cooper DW et al. Progression of HIV- related disease is associated with HLA DQ and DR alleles defined by restriction fragment length polymorphisms- Tissue Antigens 1992; 39: 241-245.
47. Djoulah S, Sanchez-Mazas A, Khalij 1 et al. HLA-DRB1, DQA1 and DQB1 DNA polymorphisms in healthy Algerian and genetic relationships with other populations. Tissue Antigens 1994; 43: 102-109.
48. Dyer P, Johnson R, Martin S, et al. Evidence that matching for HLA antigens significantly increases transplant survival in 1001 renal transplants performed in the northwest region of England. Transplantation 1989; 48: 131-135.
49. Dyer P and Middleton D. Introduction in Dyer V and Middleton D eds Histo-compatibility Testing, A Practical Approach, IRL Press, Oxford 1993: 1-51.
50. Easleal S, Voorhoeve A, Zimmet P and Serjeantson S. RFLP-Delmed HLA-DP Polymorphism in Four Ethnic Groups. Hum Immunol 1989; 25: 169-179.
51. *Edwards AWF.* Distances between population on the basis of gene frequencies: Biometrics 27: 873, 1971.
52. Erlich H, Bugawan T, Begovich AB. HLA-DR, DQ and DP typing using PCR amplification and immobilized probes. Eur J Immunogen 1991; 18: 33-55.
53. GERAGHTY DE, KOLLER BH, HANSEN JA, ORR HT. The HLA class I gene family includes at least six genes and twelve pseudogenes and

- gene fragments. *J Immunol* 1992, 149:1934-1946.
54. Greenacre MJ, Degos L. Correspondance analysis of HLA gene frequency data from 124 population samples. *Am J Hum Genet* 29:60, 1977.
 55. GILLESPIE JH. *Population Genetics: A Concise Guide*. Johns Hopkins University Press, New York 2004.
 56. Hansen HT, Beatriz MC and Sachs HD. The Major Histocompatibility Complex. In WE Paul ed *Fundamental Immunology*, Raven Press, New York 1993: 577-628.
 57. Horn GT, Bugawan TL, Long CM and Erlich HA. Allclic Sequence Variation in the HLA-DQ Region: Implications for Localization of Serological Specificities and for Susceptibility to Autoimmune Disease. In; B. Dupon ed *Immunobiology of HLA Vol T, Histoconpatibility Testing* 1987, Springer-Vcrlag. New York 1989: 399-401.
 58. HORTON R, WILMING L, RAND V, LOVERING RC, BRUFORD EA, KHODIYAR VK ET AL. Gene map of the extended human MHC. *Nature Reviews Genetics* 2004, 5:889-899.
 59. HowcII WVI, Evans PR, Spellerberg MB, Wilson PJ and Smith JL. A comparison of serological, cellular and DNA-RFLP melhod.s for HLA matching in the selection of related bone marrow donors. *Bone Marrow Transplant* 1989; 4: 63-68.
 60. Hows JM and Bradley BA. The use of unrelated marrow donors for transplantation. *British J Haematol* 1990; 76: 1-6.
 61. Germain NR. Antigen Processing arid Presentation. In WE Paul cd, *Fundamental Immunology*, Raven Press, New York 1993: 629-675.
 62. Gilks WR, Bradley BA, Gore SM, Klonda PT. Substantial benefits of tissue matching in renal transplantation. *Transplantation* 1987; 43: 669-674.
 63. Gipharl MJ and Verduijn W. The Eurotranplant HLA-DRB oligonuclcotide typing set. *Eur J Immunogcn* 1991; 18; 57-68.
 64. Goodman .IW. Antigen Presentation and the Major Ilistocompatibility Complex. In Stitcs PD. Terr IA, Parslow GT eds. *Basic & Clinical*

- Immunology, a Lange medical book, San Francisco 1994: 58-65.
65. Καβαδίας Γ. Καρακγούνηδες Εκδόσεις Λούση, 1996.
 66. Καλοδήμος Θ. Σαρακατσάνικος Λόγος Εταιρία Σαρακατσάνικων Μελετών. 2003).
 67. Kaminski E, Martin A and Bradley BA. HLA Molecules in Allorecognition. T cell recognition and typing methods. In Solheim BG, Ferrone S and Mollcr E, eds. The HLA System in Clinical Transplantation, Spriner-Verlag, Berlin Heidelberg 1993: 202-213.
 68. Kam Tao Li P, Poon A, Hawkins B, Yeung V, Hong Bo Y and Lai K. Restriction fragment length polymorphism of HLA-DQ and -DR allogentypes in normal Southern Chinese. Tissue Antigens 1993; 42: 502-508.
 69. Kappes D and Strommger L. 1.1 human class II major histocompatibility complex genes and proteins. Ann Rev Biochem 1988: 57: 991-1028.
 70. Keller E, Andreas-Zitz A, McNicholas A, Grooms A, Scholz S and Albert ED. Characterization of DR. blank alleles by restriction fragment length polymorphism (RFLP). Tissue Antigens 1987; 29: 154-159.
 71. Kissmeyer-Nielsen F. Olsen S, Petersen V, Fjeldborg O. Hyperacute rejection of kidney allografts, associated with pre-existing humoral antibodies against donor cells. Lancet 1966: ii: 662-669.
 72. Kohonen-Corish MR.I and Serjeantson SW. HLA-DRfi Gene DNA Polymorphisms Revealed by *T;iq I* Correlate with HLA-DR Specificities. Human Immunol 1986; 15:263-271.
 73. Konrad M, Mytilineos J, Bouissou F et al. HLA class II associations with idiopathic nephrotic syndrome in children. Tissue Antigens 1994; 43: 275- 280.
 74. Kondopoulou H, Anastasia Kouvatsi, Costas Triantaphyllidis
Department of Genetics, Development and Molecular Biology, School of Biology, Aristotle University of Thessaloniki, 54006 Thessaloniki Macedonia Greece. Forensic evaluation of 10 STRs and two minisatellite loci in the Greek population. Forensic Science

- International 124 (2001) 228- 230.
75. Κουκούδης Α. Οι μητροπόλεις και η δισχιπτορά των Βλάχων. Εκδόσεις Ζήτρος 2000
 76. Lagaaij EL. Immunization and immune suppression by blood transfusion. Thesis, Leiden 1990.
 77. Lechler R. Mechanisms of NLA and disease associations. In Lechler R ed, HLA and disease, Academic Press, Cambridge 1994: 83-91.
 78. Leivestad T, Varldal F and Thorsby E. NLA Matching in Clinical Organ Transplantation. In: Solheim BG. Ferrone S and Moller E, eds, The HLA System in Clinical Transplantation, Spriner-Veriag, Berlin Heidelberg 1993:261-269.
 79. Lopez de Castro JA. Class I and Class IIIILA Proteins and Genes: An Overview of Structure, Polymorphism and Expression. In Solheim BG, Ferrone S, Moller E eds The HLA System in Clinical Tranplantation, Sp ringer-Verlag. Berlin Heidelberg 1993:49-62.
 80. Lundgren G. Groth CG, Albrechtsen D et al. HLA-matching and pretransplant blood transfusions in cadaveric renal transplantation - a changing picture with cyclosporin. Lancet 1986; 2: 66-69.
 81. Marcadet A, O¹ Connel P and Cohen D, Standardized Southern Blot Workshop Technique. In: B. Dupon ed Immunobiology of HLA Vol 1, Histoconpatibility Testing 1987, Springer-Verlag, New York 1989: 553-560.
 82. Marsh SGE and Bodmer JG. HLA class II Region Nuclcolide Sequences 1994. F_uropeau Journal of Immunogenetics 1994; 21; 6: 519-551.
 83. Middlelon D, Mytilneos J, Savage D ct al. Matching for DPBJ alleles m zero mismatched MLA-A, -B, -DR renal transplants (abstract). 10th GTS Anniversary and 100.000 CTS transplants. Heidelberg 1992: 92.\
 84. Markus BH, Duquesnoy RJ, Gordon RD et al. Histoeompatibility and liver transplant outcome: does HLA exert a dualislic effect? Transplantation 1988; 46; 372-377.
 85. *Menozi P, Piazza A, Cavalli-Sfortza L.* Synthetic maps of human

- genea frequencies in EuiupcaiiS; Science 201: 786, 1978.
86. Moen T, Albrchlsen D, Flatmark A ct al. Importance of HLA-DR matching in cadaveric renal transplantation: a prospective one-center study of 170 transplants. N Engl J Med 1980: 303:850-854.
 87. Morling N, Friis J, Fuggcr L et al. DMA polymorphism of HLA class II genes in pau-ciarticuiar juvenile rheumatoid arthritis. Tissue Antigens 1991; 38: 16-23.
 88. Mullis KB and Faloona FA. Specific synthesis of DMA in vitro via a polymcrase catalyzed chain reaction. Methods Enzymol 1987; 152:335-350.
 89. Mytilineos J, Scherer S, Ilanscn B, Gaweco A and Opelz G. RFLP-DR Beta and Serological HLA-DR Typing of 200 Kidney Recipients and 1000 Controls. Transplant Proc 1990, 22; 4: 191 1-1912.
 90. Mytilineos J, Scherer S and Opelz G. Comparison of RFLP-DR Beta and serological HLA-DR typing in 1500 individuals. Transplantation 1990, 50; 5: 870-873.
 91. Mytilineos J, Scherer S, Duncklcy II et al. DNA HLA-DR typing results of 4000 kidney transplants. Transplantation 1993, 55: 778-781.
 92. Mytilineos J, Scherer S, Dunckley H et al. DNA Typing of 3500 Cadaver Kidney Tranplants Does Not Confirm the "DR6 Effect". Transplant Proc 1993, 25; I: 207-209.
 93. Nevinny-Stickel C and Albert ED. HLA class II typing in a microtitrc plate formate using digoxigenin-labelled amplified DNA and biotin-labellsxl oligonucleotide probes. Eur J Immunogen 1993, 20; 419-427.
 94. Olerup O, Zetterquist H, Ohlson L, Carlsson B, Wallin J and Moller E. Genomic HLA-DR and DQ typing by *Taq* I RFLP Analysis: An Alternative to Serologic Tissue Typing. Transplant Pros 1990,22; 1: 144.
 95. Olerup O, Troye-Blomberg M, Schreuder GMT and Riley E. HLA-DR and DQ gene polymorphism in West Africans is twice as extensive as in North European Caucasians: Evolutionary implications. Proc Natl Acad Sci USA, 1991.88:S480-S484.

96. Olerup O and Zetterquist H. HLA-DR typing by PCR amplification with sequence-specific primers (PCR-SS1¹) in 2 hours: an alternative to serological DR typing in clinical practice including donor-recipient matching in cadaveric transplantation. *Tissue Antigens* 1992, 39: 225-235.
97. Olerup O. HLA-B27 typing by group-specific PCR amplification. *Tissue Antigens* 1994,43: 253-256.
98. *Piazza A.* Blood genetic markers. Their use for studying migrations. In: Ohayon E, Cambon-Thomsen A (eds) *Human population genetics. Colloque INSERM 142:75*, 1987.
99. *Piazza A.* Haplotype and linkage disequilibria from the three-locus phenotypes. *Histocompatibility Testing. Munksgaard, Copenhagen, 932*, 1975.
100. *Piazza A.* The genetic data from the French provinces. A tentative summary. In: Ohayon E, Cambon-Thomsen A (eds) *Human population genetics. Colloque INSERM 142*, 1987.
101. *Piazza A, Viganotti C.* Evolutionary trees and HLA-A polymorphism. *Histocompatibility testing. Munksgaard, Copenhagen, 731*, 1972.
102. *Piazza A.* Haplotype and linkage disequilibria from 'the three locus phenotypes. *Histocompatibility Testing. Munksgaard, Copenhagen, 932*, 1975.
103. *Piazza A, Menozi P, Cavalli-Sforza LL.* The HLA-A,B genes frequencies in the world: migration or selection? *Hum Immunol* 1: 297, 1980.
104. Perdriger A, Semana G, Quillivic F et al. DPBI polymorphism in rheumatoid arthritis: Evidence of an association with allele DPBI 0401. *Tissue Antigens* 1992; 39; 14-18.
105. Ploegh HL, Orr HT and Strominger JL Major histocompatibility antigens: the human (IIA-A,B,C) and murine (I-EK, I-TD) class I molecules. *Cell* 1981;24:287-299.
106. Polimenidis Z, Adam K, Parapanissiou E et al. Importance of certain HLA-A, B haplotypes for the survival of renal grafts from living-

- related donors. *Transplant Proc* 1992; 24:6: 2458-2460
107. *Radvany RM, Vaisrub N, Ober C, Patel KM, Hecht F. The human sex ratio: increase in first born males to parents with shared HLA-DR antigens: Tissue¹ Antigens* 29: 34, 1987.
108. Rapley R, Bimal DMT, Bevan IS and Walker MR. Fundamentals of the polymerase chain reaction: A future in clinical diagnosis? *Med Lab Sci* 1992; 49: 119-128.
109. *Renieri N, Stavropoulos C, Lepage V. The distribution of HLA antigens and genes in the Greek population: Tissue Antigens* 13: 154, 1979.
110. ΣΩΤΗΡΙΟΥ Σ. Οι Βλαχόφωνοι του Ευρωπαϊκού και Βαλκανικού χώρου. Πελασγός, Αθήνα 1998.
111. Saiki RK, Walsh PS, Levenson Clland Eriich HA. Genetic analysis of amplified DNA with immobilized sequence-specific oligonucleotide probes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86: 6230-6234.
112. Salter RD, Benjamin RJ, Wesley PK et al. A binding site for the T-cell co-receptor CDS on the α3 domain of HLA-A2. *Nature* 1990; 345: 41-46.
113. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T eds. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, New York 1989: 7.37-7.57.
114. Sanfilippo F, Vaughn WK, Alexander JW et al. Organ sharing for good NLA-A. B and DR matching improves cadaveric renal graft survival in SEOPF: retrospective and prospective studies considering delayed graft function, race, center effects, cyclosporine and other factors. In: Terasaki PI, ed. *Clinical transplants*, 1988. UCLA Tissue Typing Laboratory, Los Angeles 1988: 211-223.
115. Santamana P, Boyce-Jacino MT, Lindstrom AL et al. HLA class II "typing": Direct sequencing of DRB, DQB and DQA genes. *Hum Immunol* 1992; 33: 69-81.
116. Saper MA, Bjorkman P.T, Wiley DC. Refined structure of the human histocompatibility antigen HLA-A2 at a 2.6 Å resolution. *J Mol Biol* 1991; 219: 277-281.

117. Savage D, Baxter-Lowe LA, Gorski .1 and Middleton D. Molecular Methods. In: Dyer P and Middleton D eds Histocompatibility Testing, A Practical Approach, Oxford University Press,. New York 1993:107-142.
118. SCHREUDER GM, HURLEY CK, MARSH SG, LAU M, FERNANDEZ-VINA M, NOREEN HJ, setterholm M, maiers M; world marrow donor associations quality assurance and IT working groups; WHO nomenclature committee for factors of the HLA system; 13TH international histocompatibility workshop serology component; international cell exchange, UCLA; US national marrow donor program. The HLA Dictionary 2004: a summary of HLA-A, -B, -C, -DRB1/3/4/5 and -DQB1 alleles and their association with serologically defined HLA-A, -B, -C, -DR and -DQ antigens. *Tissue Antigens* 2005, 65:1 –55.
119. Schwartz BD. The Major Histocompatibility Complex and Disease Susceptibility. In Wangaarden JB, Smith LH, Bennett SC eds Cecils. Textbook of Medicine, Saunders Company, Philadelphia 1992, Vol I: 1470-1479.
120. Shokes DA and Wood K.I. Indirect presentation of MHC antigens in transplantation. *Immunol Today* 1994; 15,1: 32-38.
121. Simons MS, Wheeler R, Cohen D, Lalouel T-M and Dupont B. Restriction Fragment Length Polymorphism of HLA genes; summary of the Tenth Intenational Workshop Southern blot analysis. In: B. Dupon cd Immunobiology of HLA Vol I, Histoconpatibil'rty Testing 1987, Springcr-Veriag, New York 1989: 959-1023.
122. Smith .ID, Rose ML, Pomerance A.. Burke M, Yacoub Mil. Reduction of cellular rejection and increase in longer-term survival after heart transplantation after HLA-DR matching. *Lancet* 1995: 346: 1318-1322.
123. So A, Trowsdale J, Bodmcr J and Bodmer W. DMA polymorphism of HLA-DRp" and HLA-DPp genes- In: Albert ED et al eds Hislocompatibility Testing 1984, Springer-Vcrlag, Berlin 1984: 565-578.
124. So A. Genetics, polymorphism and regulation of expression of HLA

- region genes. In Lechler R ed, HLA and disease, Academic Press, Cambridge 1994: 1-34.
125. STROMINGER JL, MANN D, PARHAM P, ROBB R, SPRINGER T, TERHORST C. Structured HLA-A and -B antigens isolated from cultured human lymphocytes. *Cold Spring Harbor Symp Quant Biol* 1977, 41:323-329.
 126. Sutherland FR, Leckie SH, Ostbye T, Howson WT, Sengar DP, Lazarovits AI. The importance of class I and class II HLA in cadaveric renal transplantation. *Clin Invest Med* 1991; 14:120.
 127. Storb R and Thomas ED. Allogeneic bone-marrow transplantation. *Immunol Rev* 1983: 71: 77-102.
 128. Tarleton J and Schwartz C. Using the polymerase chain reaction to maintain DNA probe inventories in clinical and diagnostic laboratories. *Clinical Genetics* 1991:39:121-124.
 129. Terasaki PI and McClelland JD. Microdroplet assay of human serum cytotoxins. *Nature* 1964: 204: 998-1000.
 130. Terasaki PI, Vredevoc DL, Mickey MR, et al. Serotyping for homotransplantation. Selection of kidney donors for thirty-two recipients. *Ann NY Acad Sci* 1966: 129:500-520.
 131. Tiercy J-M, Grundschober C, Jeanne! M and Mach B. A Comprehensive HLA-DRB, -DQB and DPB Oligotyping Procedure by Hybridization with Sequence-Specific Oligonucleotide Probes. In: Hui KM and Bidwell JL eds *Handbook of HLA-typing techniques*, CRC Press, Florida 1993: 117-147.
 132. Trowsdale J and Hanson I. MHC Genes. In Solhchim BG, Ferrone S, Moller E eds *The HLA System in Clinical Transplantation*. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg 1993:41-48.
 133. Watson JD. *Molecular Biology of the Gene*. In W. A. Benjamin inc. ed, California 1976.
 134. Wood N, Joysey V, Bidwell J and Kluuda P. HLA-DR Typing of Renal Allograft Patients and Donors by DNA-RFLP: Correlation With Pretransplant Serotyping. *Transplant Proc* 1990; 22: 5: 2287.
 135. Wordsworth P. PCR-SSO typing in HLA-disease associations studies.

- Eur J Immunogenet 1991; 18: 139-146.
136. Van Bvag Peter. Hybridization of Nucleic Acids Πρακτικά μετεκπαιδευτικού Σεμιναρίου με θέμα: Τεχνικές ανάλυσης DNA, PCR. Εφαρμογές στη διαγνωστική, Θεσσαλονίκη 1993: 57-79.
137. *Vadheim CM, Rotter J, Maclareri 'N, Riley W, Anderson C.* 'Preferential Transmission of diabetic alleles within the HLA gene complex. N Engl J Med. 315: 1314, 1986.
138. Vaughan RW. PCR-SSO typing for HLA-DRB alleles. Eur J. Immunogenet 1991; 18: 69-80.
139. Viste A, Moudry-Munns K, Southerland DRR. Prognostic risk factors for graft failure following pancreas transplantation: results of multivariate analysis of data from the International Pancreas Transplant Registry. Transplant Int 1990; 3: 98-102.
140. Vogel F, Motylsky AG. Human genetics 2nd ed. Springer Berlin Heidelberg New York 1986.
141. Von Boehmer H, The IIS and Kisielow P. The thymus selects the useful, neglects the useless and destroys the harmful. Immunol today 1989;10:57-61.
142. Ziegler K and Unanue ER. Identification of a macrophage antigen-processing event required for I-region restricted antigen presentation to T lymphocytes. J Immunol 1981; 127: 1869-1875.