

Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας

ΜΕΛΕΤΗ ΕΥΡΕΣΗΣ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΩΝ ΣΤΟ ΓΟΝΙΔΙΟ MC1R ΣΤΟ ΕΙΔΟΣ LEPUS EUROPAEUS

ΜΠΕΝΙΑΣ ΑΘΑΝΑΣΙΟΣ

Τριμελής επιτροπή:

Μαμούρης Ζήσης (επιβλέπων καθηγητής)

Μούτου Αικατερίνη

Σαραφίδου Θεολογία

Περίληψη

Στην παρούσα εργασία διερευνήσαμε την ύπαρξη πολυμορφισμών του γονιδίου MC1R «υποδοχέας 1 της μελανοκορτίνης» στο είδος *Lepus europaeus*. Το γονίδιο MC1R πιστεύουμε ότι είναι υπεύθυνο για το χρώμα του δέρματος των ζώντων οργανισμών. Έτσι, βρίσκοντας μεταλλάξεις ανάμεσα στα δείγματά μας (τα οποία προέρχονται από διάφορες περιοχές της Ελλάδος και ένα Ευρώπη), αναμέναμε και διαφορετικό χρώμα στο τρίχωμά τους. Οι τεχνικές που χρησιμοποιήσαμε για την εύρεση πολυμορφισμών ήταν οι PCR, ηλεκτροφόρηση, SSCP, αλληλούχηση (η οποία έγινε με την μέθοδο Sanger), και τέλος, η ομοπαράθεση in silico, για την σύγκριση των αλληλουχιών. Επίσης, παρουσιάζει ενδιαφέρον να βρεθούν πολυμορφισμοί, ώστε να μπορεί να γίνει μοριακή αναγνώριση της καταγωγής του κάθε δείγματος και να μελετηθεί η εξέλιξη του είδους. Παρ' όλο το ενδιαφέρον της μελέτης, δεν βρέθηκαν μεταλλάξεις μεταξύ των δειγμάτων που είχαμε, αλλά είναι μια καλή αρχή για την συνέχιση της έρευνας, μιας και δεν υπάρχουν μελέτες αντίστοιχες για το συγκεκριμένο είδος.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Ταξινόμηση του είδους *Lepus europaeus* (ευρωπαϊκός λαγός ή καφέ λαγός).

Κατάταξη

Βασίλειο: Ζώων

Φύλο: Χορδωτά

Υπο-φύλο: Σπονδυλωτά

Κλάση: Θηλαστικά

Τάξη: Λαγόμορφα

Οικογένεια: Leporidae

Γένος: *Lepus*

Είδος: *europaeus*



Εικ. 1: *Lepus europaeus*

Γεωγραφικό εύρος

Η φυσική κατανομή των ευρωπαϊκών λαγών περιλαμβάνει τη Μεγάλη Βρετανία και τη Δυτική Ευρώπη και ανατολικά, τη Μέση Ανατολή μέχρι την Κεντρική Ασία (Lincoln, 1974; Broekhuizen and Maaskamp, 1980; Caillol and Meunier, 1989; Poli *et al.*, 1991). Ο άνθρωπος έχει εισάγει το συγκριμένο είδος και σε άλλες ηπείρους. Στον Καναδά, το *Lepus europaeus* βρίσκεται στο νότιο Οντάριο, γύρω από τις μεγάλες λίμνες, και νότια στα σύνορα του Καναδά ωστόσο δεν κατάφερε να εξαπλωθεί νοτιότερα. Στις ΗΠΑ το *Lepus europaeus* βρίσκεται τώρα στις βορειοανατολικές πολιτείες και γύρω από τις μεγάλες λίμνες (Hall and Kelson, 1959). Επιπλέον, έχει εισαχθεί σε

περιοχές της Νότιας και Κεντρικής Αμερικής, καθώς και στην Αυστραλία [12].

Συνήθειες

Οι ευρωπαϊκοί λαγοί προτιμούν πεδιάδες και βοσκοτόπους οριοθετημένους από δασικές εκτάσεις. Ζουν σε ρηχές φωλιές και συστάδες χόρτου ή θάμνου [12].

Φυσική περιγραφή

Έχουν βάρος 3 έως 5 kg και συνολικό μήκος 600-700 mm. Τα αυτιά τους είναι μακριά γκρι, 94-102 mm, με μαύρες άκρες και με άσπρο στο εσωτερικό. Η ουρά, με μήκος 72-110 mm, είναι μαύρη στο επάνω μέρος και άσπρη στο κάτω. Το τρίχωμά τους αποτελείται από διάφορες αποχρώσεις του καφέ, εκτός από την κοιλιά που είναι γκρι-άσπρη. Το κεφάλι είναι καφέ με χρωματιστούς κύκλους γύρω από τα μάτια. Το χειμώνα το *Lepus europaeus* δεν αλλάζει το τρίχωμά του σε άσπρο, απλώς γίνεται ελαφρώς γκριζο. Δεν έχει παρατηρηθεί σεξουαλικός διμορφισμός, δηλαδή ανάπτυξη ευδιάκριτων μορφολογικών διαφορών μεταξύ θηλυκών και αρσενικών ατόμων [12].

Αναπαραγωγή

Η αναπαραγωγική περίοδος για το *L. europaeus* είναι μεταξύ χειμώνα (Ιανουάριος – Φεβρουάριος) και μέσα καλοκαιριού. Η περίοδος κυοφορίας κυμαίνεται μεταξύ 30 και 42 ημερών [12]. Οι νέοι λαγοί φτάνουν σε σεξουαλική ωριμότητα σε ηλικία οχτώ μηνών έως ενός έτους. Στα θηλυκά η ωχρινοτρόπος ορμόνη μεγιστοποιείται τον Ιούλιο, στο τέλος δηλαδή της αναπαραγωγικής περιόδου [12]. Η μητέρα για να προστατέψει τα νεογνά από κάποια επίθεση θηρευτή, που πιθανόν να τα αφάνιζε, τα σκορπίζει σε μια ευρεία περιοχή και κάνει κύκλους για να τα φροντίσει [12].

Συμπεριφορά

Οι ευρωπαϊκοί λαγοί είναι κυρίως μοναχικά ζώα, με εξαίρεση την περίοδο ζευγαρώματος. Είναι νυκτόβια και αναζητούν τροφή κυρίως την νύχτα. Διαθέτουν ιδιαίτερα αναπτυγμένες τις αισθήσεις της όρασης, της όσφρησης και της ακοής. Μόλις αντιληφθούν θηρευτή, τρέχουν με πολύ μεγάλη ταχύτητα (60 km/h σε ευθεία) με δυνατότητα γρήγορων ελιγμών. Εάν χρειαστεί, βουτούν και στο νερό, καθώς είναι αρκετά καλοί κολυμβητές [12]. Στους θηρευτές τους συμπεριλαμβάνονται οι αλεπούδες, τα κογιότ, τα γεράκια και οι κουκουβάγιες.

Διατροφικές συνήθειες

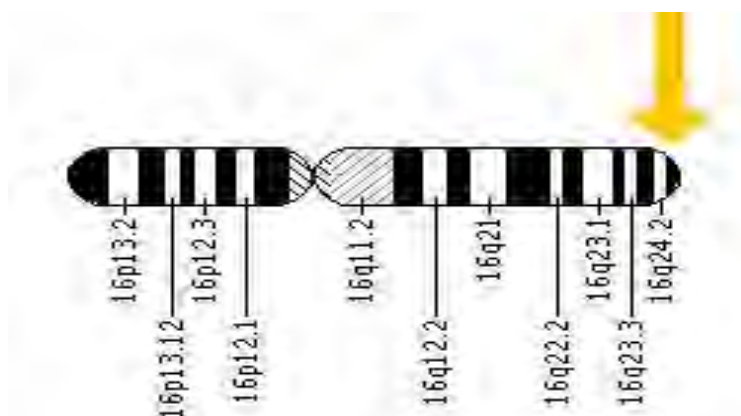
Το *L. europaeus* είναι φυτοφάγο ζώο, καθώς τρώει χόρτα, βότανα και διάφορες σοδιές από χωράφια κατά την διάρκεια του καλοκαιριού. Το χειμώνα τρέφεται με κλαδάκια, μπουμπούκια και φλούδες μικρών οπωροφόρων δέντρων. Χαρακτηριστικό του είναι και η κοπροφαγία. Δύο ή τρεις ευρωπαϊκοί λαγοί μπορούν να φάνε τόσα φυτά όσο ένα πρόβατο [12].

Οικονομική σημασία για τον άνθρωπο

Σε περιοχές όπως η Αργεντινή, η Αυστραλία και η Νότια Αμερική, το *L. europaeus* προκαλεί πολλές καταστροφές στην γεωργία εξαιτίας της γρήγορης αναπαραγωγής του [12]. Ωστόσο στη βόρεια Αμερική αποτελεί ένα σημαντικό θήραμα, λόγω του άσπρου και εξαιρετικά νόστιμου κρέατός του [12].

Το γονίδιο MC1R

Το πλήρες όνομα του γονιδίου είναι «υποδοχέας 1 της μελανοκορτίνης (διεγερτικός υποδοχέας των άλφα μελανοκυττάρων)» και ο συμβολισμός του είναι MC1R. Το γονίδιο βρίσκεται στο χρωμόσωμα 16 όπως αποικονίζεται στην εικόνα 2.



Εικ.2: χαρτογράφηση του γονιδίου MC1R στο χρωμόσωμα 16.

Το γονίδιο MC1R κωδικοποιεί τον υποδοχέα της μελανοκορτίνης και παίζει σημαντικό ρόλο στο φυσιολογικό χρωματισμό. Βρίσκεται, στην επιφάνεια των μελανοκυττάρων, εξειδικευμένων κυττάρων για την παραγωγή μιας χρωστικής ουσίας, της μελανίνης και δίνει στο δέρμα, τις τρίχες και τα μάτια το χρώμα τους. Η μελανίνη επίσης βρίσκεται στον φωτοευαίσθητο ιστό στο πίσω μέρος του ματιού (αμφιβληστροειδής χιτώνας), όπου παίζει σημαντικό ρόλο στην όραση. [8].

Ο γενετικός τύπος Extensions κωδικοποιεί τον υποδοχέα MC1R που είναι μία διαμεμβρανική πρωτεΐνη 7 περιοχών (εικόνα 4) και ανήκει στην οικογένεια των υποδοχέων που συνδέονται με G πρωτεΐνες. Επάνω του προσδέεται η α ορμόνη διεγέρτης των μελανοκυττάρων (α melanocyte -stimulating hormone, αMSH), προκαλώντας την σύνθεση της ευμελανίνης (εικόνα 3). Η Agouti περιοχή κωδικοποιεί την Agouti signaling πρωτεΐνη (ASIP) ένα μόριο παρακινείας σηματοδότησης που επηρεάζει την χρώση, ενεργώντας σαν

ανταγωνιστής του υποδοχέα MC1R, εμποδίζοντας έτσι την αλληλεπίδραση του υποδοχέα α-MSH και προκαλώντας συγκεκριμένο τύπο χρώσης με μεταβολή της παραγωγής από ευμελανίνη σε φαιομελανίνη (Εικ.3) [1].

Τα μελανοκύτταρα συνθέτουν δύο μορφές μελανίνης, την ευμελανίνη και την φαιομελανίνη [8].

Τα ποσά των δύο αυτών χρωστικών βοηθούν για να καθοριστεί το χρώμα μαλλιών και δέρματος του προσώπου. Οι άνθρωποι οι οποίοι παράγουν κυρίως ευμελανίνη τείνουν να έχουν καστανά ή μαύρα μαλλιά και σκούρο δέρμα που μαυρίζει εύκολα. Η ευμελανίνη, επίσης, προστατεύει το δέρμα από τις βλάβες που προκαλούνται από την υπεριώδη ακτινοβολία (UV) όταν εκτεθούν στο ηλιακό φως. Οι άνθρωποι οι οποίοι παράγουν κυρίως φαιομελανίνη, τείνουν να έχουν κόκκινα ή ξανθά μαλλιά, φακίδες και ανοιχτόχρωμο δέρμα που μαυρίζει ελάχιστα. Επειδή η φαιομελανίνη δεν προστατεύει το δέρμα από τις ακτίνες UV, οι άνθρωποι με περισσότερη φαιομελανίνη έχουν αυξημένο κίνδυνο για εγκαύματα στο δέρμα μετά από έκθεσή τους στον ήλιο [8].

Ο MC1R ελέγχει τον τύπο της μελανίνης που παράγεται από τα μελανοκύτταρα. Όταν ο υποδοχέας ενεργοποιείται, δίνει το έναυσμα για μία σειρά χημικών αντιδράσεων μέσα στα μελανοκύτταρα τα οποία διεγείρονται και παράγουν ευμελανίνη. Εάν ο υποδοχέας δεν διεγερθεί ή εμποδιστεί, τα μελανοκύτταρα παράγουν φαιομελανίνη αντί για ευμελανίνη [8].

Οι πολυμορφισμοί στο γονίδιο MC1R συνδέονται με διαφορές στο δέρμα και το χρώμα μαλλιών. Ορισμένοι είναι πιο συχνές σε άτομα με κόκκινα μαλλιά, με ανοιχτό δέρμα, φακίδες, και με αυξημένη ευαισθησία στην ηλιακή έκθεση. Ορισμένοι πολυμορφισμοί του γονιδίου MC1R μειώνουν την ικανότητα του υποδοχέα να διεγερθεί και να παράγει ευμελανίνη και έτσι τα μελανοκύτταρα παράγουν κυρίως φαιομελανίνη. Παρά το γεγονός ότι ο MC1R είναι το γονίδιο-κλειδί στο χρωματισμό του ανθρώπου, φαίνεται πως επιδράσεις και άλλων γονιδίων συμβάλλουν στον χρωματισμό του δέρματος και των τριχών [8].

Ο MC1R είναι επίσης ενεργός και σε άλλα κύτταρα, εκτός των μελανοκυττάρων, συμπεριλαμβανομένων και κυττάρων που εμπλέκονται στις ανοσοποιητικές και φλεγμονώδεις αντιδράσεις του οργανισμού. Η λειτουργία, όμως, του υποδοχέα σε αυτά τα κύτταρα είναι, προς το παρόν, άγνωστη [8].

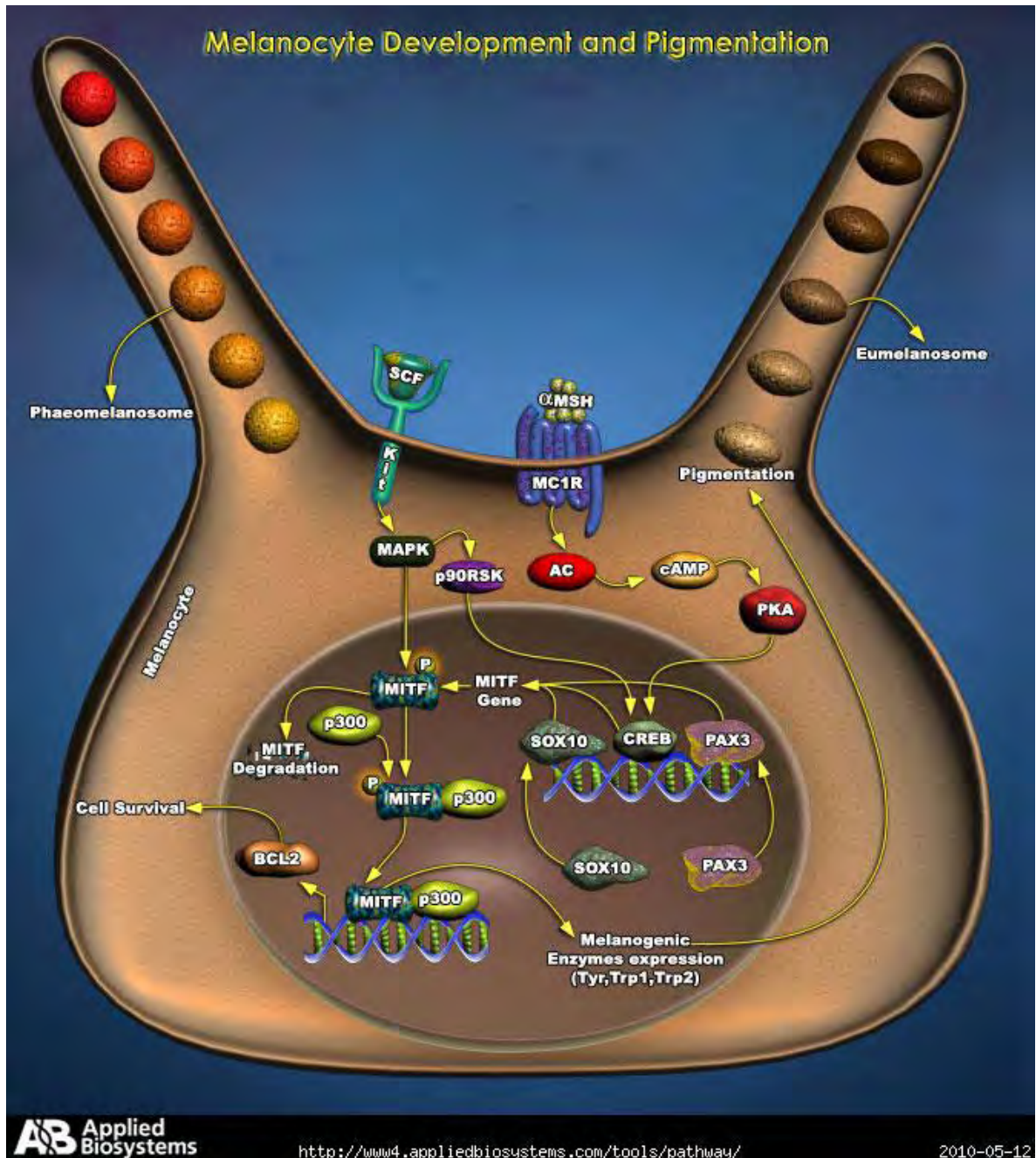
Μεταλλάξεις στο γονίδιο MC1R έχουν συσχετιστεί ότι αυξάνουν τον κίνδυνο για ανάπτυξη καρκίνου του δέρματος, όπως το μελάνωμα που ξεκινάει από μεταλλάξεις στο γονίδιο του υποδοχέα που διαταράσσουν την ικανότητά του να προκαλέσει την παραγωγή ευμελανίνης στα μελανοκύτταρα. Επειδή η ευμελανίνη προστατεύει φυσιολογικά το δέρμα από τις βλαβερές συνέπειες της υπεριώδους ακτινοβολίας, η έλλειψη αυτής της χρωστικής αφήνει το ανοιχτόχρωμο δέρμα πιο ευάλωτο σε κινδύνους από την έκθεσή του στον ήλιο. Αλλοιώσεις στο δέρμα προκαλούνται από την ακτινοβολία UV του ήλιου, που είναι και ο σημαντικότερος παράγοντας κινδύνου για ανάπτυξη μελανώματος και άλλων μορφών καρκίνου του δέρματος [8].

Μελέτες έχουν δείξει ότι μεταλλάξεις στο γονίδιο MC1R μπορούν επίσης να αυξήσουν τον κίνδυνο εκδήλωσης μελανώματος ελλείψει υπεριώδους ακτινοβολίας. Σε αυτές τις περιπτώσεις, το μελάνωμα μπορεί να εμφανιστεί σε ανθρώπους με σκούρο ή ανοιχτό χρώμα δέρματος. Αυτοί οι τύποι καρκίνοι συχνά σχετίζονται με μεταλλάξεις και σε επιπλέον γονίδια. Οι ερευνητές προσπαθούν να εξηγήσουν την πολύπλοκη σχέση μεταξύ των μεταλλάξεων του MC1R καθώς και άλλων γενετικών ή και περιβαλλοντικών παραγόντων που ευθύνονται για την ανάπτυξη μελανώματος. [8]

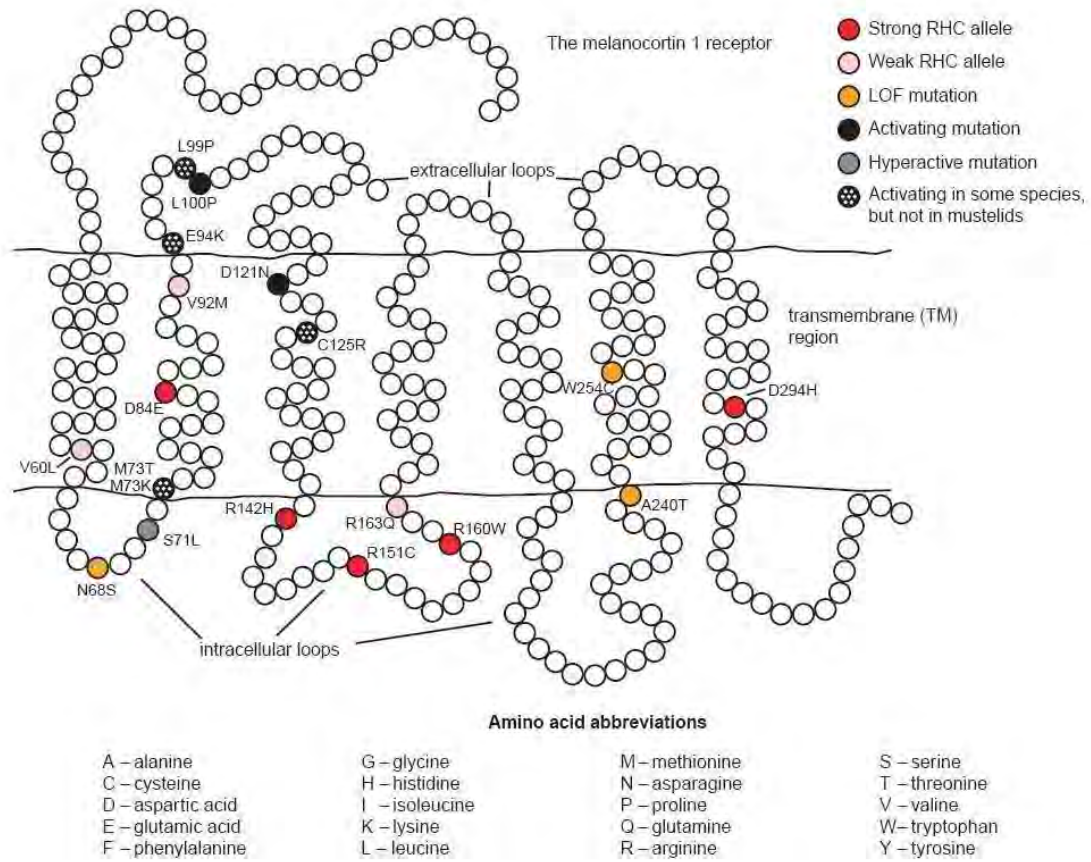
Ένας μεγάλος αριθμός φαινοτύπων ως προς το χρώμα δέρματος έχει περιγραφεί σε διάφορα είδη θηλαστικών. Η ποικιλία αυτή, οφείλεται στην παρουσία, τη διανομή και την βιοχημική δραστηριότητα των μελανοκυττάρων. Οι γονιδιακές περιοχές *Extension* και *Agouti* είναι οι κύριες περιοχές που επηρεάζουν τα σχετικά ποσά ευμελανίνης και φαιομελανίνης που παράγονται στα κύτταρα. Αυτοί οι τύποι είναι που παρουσιάζουν επιστατικές αλληλεπιδράσεις σε διάφορα θηλαστικά. Τα επικρατή αλληλόμορφα στο γενετικό τόπο *Extension* προκαλούν μαύρο χρωματισμό, ενώ τα υπολειπόμενα αλληλόμορφα προκαλούν την

παραγωγή της φαιομελανίνης, καθορίζοντας έτσι το κόκκινο, κίτρινο και ανοιχτό χρώμα. Μεταλλάξεις στην περιοχή Agouti έχουν, γενικά, αντίθετο μοντέλο δράσης, π.χ. τα επικρατή αλληλόμορφα καθορίζουν τον φαινότυπο που δίνει η φαιομελανίνη, ενώ τα υποτελή αλληλόμορφα προκαλούν μαύρο χρώμα τριχώματος, με μερικές εξαιρέσεις. [1].

Έχουν περιγραφεί διάφορες μεταλλάξεις στο γονίδιο MC1R που επηρεάζουν το χρώμα τριχώματος σε διάφορα θηλαστικά, όπως ποντίκια, ανθρώπους, ινδικά χοιρίδια, βοοειδή, άλογα, πρόβατα, σκυλιά, αρκούδες, κουνέλια, και σε αυτά, η υπερέκφραση παράγει μαύρο/ σκούρο χρώμα τριχώματος, ενώ η απώλεια λειτουργίας κόκκινο/ κίτρινο ή λευκό χρώμα τριχώματος. [1].



Εικ.3: Το μονοπάτι ενεργοποίησης παραγωγής φαιομελανίνης και ευμελανίνης στα μελανοκύτταρα μέσω της ορμόνης α MSH. Η ορμόνη α -MSH παράγεται μαζί με άλλα πεπτίδια μέσω πρωτεόλυσης μια μεγάλης πρόδρομης πρωτεΐνης της POMC (προοπιομελανοκορτίνη). Όταν η α -MSH προσδένεται στον υποδοχέα MC1R ενεργοποιείται η AC (αδενυλική κυκλάση) η οποία με τη σειρά της προκαλεί αύξηση του ενδοκυττάρου cAMP (κυκλική μονοφωσφορική αδενοσίνη). Το cAMP με την σειρά του ενεργοποιεί την PKA (πρωτεϊνική κινάση A) η οποία φωσφορυλιώνει και ενεργοποιεί την πρωτεΐνη CREB (πρωτεΐνη πρόσδεσης ανταποκρινόμενη στο cAMP, μεταγραφικός παράγοντας) η οποία προσδένεται στον υποκινητή του γονιδίου MITF (γονίδιο για την μικροθφαλία) διεγείροντας έτσι την μεταγραφή του. Επιπλέον το cAMP αυξάνει την συγγένεια πρόσδεσης μεταξύ της MITF και των υποκινητών γονιδίων που κωδικοποιούν ένζυμα υπεύθυνα για την μελανογένεση [13].



Εικ. 4: Η δομή του υποδοχέα MC1R. Φαίνονται οι 7 διαμεμβρανικές περιοχές του υποδοχέα, το εξωτερικό αμινο-τελικό άκρο, καθώς και το εσωτερικό καρβοξυ-τελικό άκρο. Επίσης διακρίνονται και αρκετές θέσεις μεταλλάξεων. [11].

Σκοπός

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν διερεύνηση πολυμορφισμών, του γονιδίου MC1R στο είδος *Lepus europaeus* συγκρίνοντάς το με αυτά που βρέθηκαν σε άλλους πυρηνικούς και μιτοχονδριακούς μοριακούς δείκτες, και να μελετήσουμε την εξελικτική πορεία και τις εξελικτικές σχέσεις όσον αφορά το χρώμα του τριχώματος σε διαφορετικά είδη *Lepus europaeus*. Στην εξελικτική βιολογία είναι μεγάλης σημασίας η αποσαφήνιση της γενετικής βάσης των προσαρμοστικών αλλαγών στον φαινότυπο και στα συστήματα που είναι υπεύθυνα για το χρώμα του τριχώματος. Περαιτέρω, έχει αποδειχθεί ότι υπάρχει στενή σχέση μεταξύ του είδους *Lepus europaeus*, και σημαντικότερα ότι υπάρχει γενετική ακεραιότητα, εξαρτώμενη σε μεγάλο βαθμό σε διαφορές στην συμπεριφορά και στην οικολογία που καλύτερα εκφράζεται με την διαπερατή απομόνωση. Αυτά τα ευρήματα, έχουν βαθιά σχέση με όλες τις φυλογεωγραφικές και συστηματικές έρευνες, στους Ευρωπαϊκούς λαγούς και συμπεριλαμβανομένου τους πυρηνικούς μάρτυρες θα είναι απαραίτητα για έρευνες στο μέλλον.

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Με την PCR ενισχύθηκε το 3' άκρο του εξονίου1 του γονιδίου MC1R μεγέθους 444 pb (βάσεων).

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

DNA	500ng
Buffer (10x)	3μl
MgCl ₂ (50mM)	0.9
dNTPs (10mM –το κεθένα)	0.6
Primer F (50pmoles/μl)	0.6
Primer R (50pmoles/μl)	0.6
Taq polymerase 5units/μl	0.15
ddH ₂ O	21.8

- Το DNA δρα ως εκμαγείο που περιέχει το τμήμα προς ενίσχυση
- Το ρυθμιστικό διάλυμα 10x περιέχει 500 mM KCl, 100 mM Tris-HCl pH9 και περιέχει το κατάλληλο χημικό περιβάλλον για τη δράση της DNA πολυμεράσης
- Τα ιόντα Mg²⁺ είναι απαραίτητα για τη δράση της πολυμεράσης και η αυξομείωση της συγκέντρωσης τους ρυθμίζει την πιστότητα της αντιγραφής. Σημειώνεται ότι η Taq πολυμεράση δε διαθέτει

δράση 3' - 5' εξωνουκλεάσης και, άρα, δεν έχει τη δυνατότητα να επιδιορθώνει τα λάθη της

- Τα τριφωσφορικά δεοξυριβονουκλεοτίδια (dNTPs) αποτελούν την πρώτη ύλη για την επιμήκυνση των νέων αλυσίδων από την πολυμεράση
- Η Taq πολυμεράση, η οποία έχει απομονωθεί από το βακτήριο *Thermus aquaticus*, είναι θερμοσταθερή σε θερμοκρασία 94 – 95°C
- Οι εκκινητές (primers) που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση του γονιδίου MC1R κατασκευάστηκαν από την εταιρεία και είναι οι ακόλουθοι:

MC1R2F: 5' CTACCACAGCATCGTGACGCTGC

MC1R2R: 5' GCATAGATGAGCGGGTCCACGATG

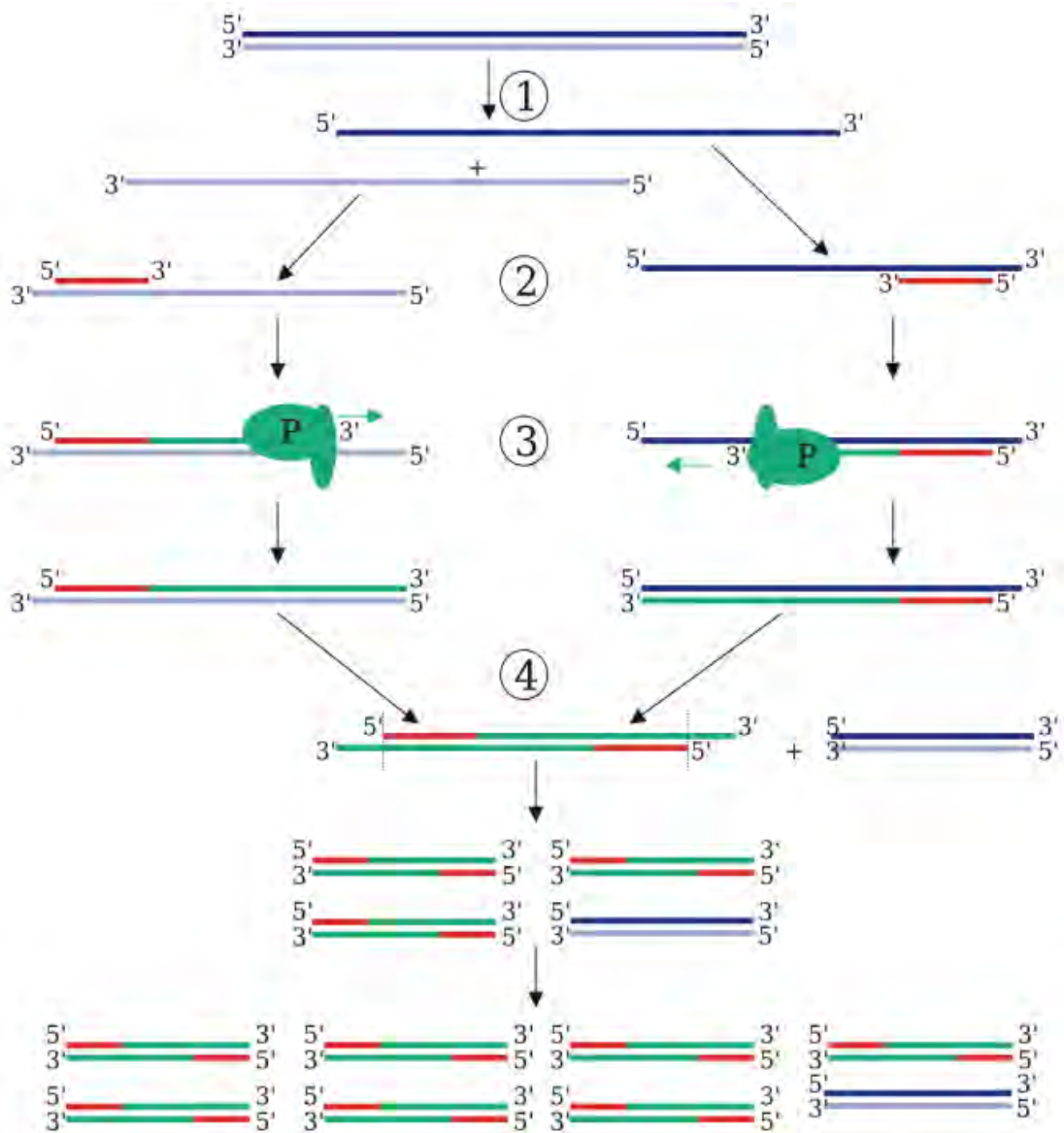
Η επιλογή του μήκους και της θερμοκρασίας (T_m) των εκκινητών εξαρτάται από πολλούς παράγοντες. Η T_m ενός εκκινητή ορίζεται ως η θερμοκρασία στην οποία οι μισές περιοχές πρόσδεσης των εκκινητών είναι κατελημμένες. Η T_m αυξάνεται ανάλογα με το μήκος του εκκινητή. Πολύ υψηλές τιμές T_m (πάνω από 80°C)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

Οι συνθήκες ενίσχυσης του γονιδίου MC1R στην PCR είναι οι ακόλουθες, και η διαδικασία της PCR απεικονίζεται στην εικόνα 5.

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

1. Αρχική αποδιάταξη: Το μείγμα θερμαίνεται στους 95°C για 5 min για την αποδιάταξη των δειγμάτων.
2. Αποδιάταξη: Με τη θέρμανση στους 95°C για 45 sec επιτυγχάνεται το σπάσιμο των διπλών δεσμών (A=T), καθώς και των τριπλών δεσμών (G≡C) μεταξύ των δίκλωνων αλυσίδων του DNA, και η μετατροπή τους σε μονόκλωνη μορφή. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι η θερμοκρασία της αρχικής αποδιάταξης, όσο και της αποδιάταξης, είναι υψηλή και δε θα πρέπει να διαρκεί περισσότερο χρόνο, διότι ελαττώνεται η ενεργότητα της πολυμεράσης.
3. Υβριδοποίηση εκκινητών: Στο στάδιο αυτό οι εκκινητές έχουν μεγάλη κινητικότητα μέσα στο δείγμα. Ιονικοί δεσμοί διαρκώς δημιουργούνται και διασπώνται μεταξύ των μονόκλωνων εκκινητών και των μονόκλωνων εκμαγείων DNA. Οι πιο σταθεροί δεσμοί (εκκινητές που είναι απόλυτα συμπληρωματικοί) διαρκούν λίγο περισσότερο και σε αυτό το τμήμα δίκλωνου DNA (εκκινητής – εκμαγείο), η πολυμεράση μπορεί να προσδεθεί και να ξεκινήσει την αντιγραφή. Μόλις προστεθούν λίγες βάσεις, οι δεσμοί υδρογόνου μεταξύ του εκκινητή και του εκμαγείου είναι τόσο ισχυροί, που δεν μπορούν πλέον να διασπαστούν.

4. Επιμήκυνση: Η θερμοκρασία 72°C αποτελεί την ιδανική θερμοκρασία δράσης για την πολυμεράση. Οι εκκινητές που δεν είναι τελείως συμπληρωματικοί με την αλληλουχία που υβριδοποιήθηκαν, αναδιατάσσονται από αυτήν (εξαιτίας της υψηλής θερμοκρασίας) και έτσι δεν επιμηκύνεται.
5. Τελική επιμήκυνση: Αυτό το βήμα συχνά χρησιμοποιείται μετά τον τελευταίο κύκλο για να διασφαλίσει ότι κάθε μονόκλωνο τμήμα DNA έχει ολοκληρώσει την αντιγραφή του.



Εικ.5: Σχηματική απεικόνιση της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR). (1) Αποδιάταξη στους 95°C. (2) Επαναδιάταξη στους 60°C. (3) Επιμήκυνση στους 72°C (P=polymerase). (4) Ολοκλήρωση πρώτου κύκλου. Σε κάθε κύκλο και οι δύο κλώνοι DNA αποτελούν εκμαγείο για τον επόμενο κύκλο, με αποτέλεσμα να διπλασιάζεται το ποσό του αντιγραφόμενου DNA για κάθε νέο κύκλο (επάνω φαίνεται το συνολικό αποτέλεσμα 3 κύκλων) [15].

Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης

Η ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης είναι μία μέθοδος για το διαχωρισμό τμημάτων DNA σύμφωνα με το μέγεθος και για την εκτίμηση του μεγέθους των τμημάτων αυτών συγκρίνοντάς τα με τα τμήματα γνωστού μεγέθους (DNA ladder = μάρτυρας) (Εικ.6). Αυτό επιτυγχάνεται, καθώς τα αρνητικά φορτισμένα μόρια DNA γλιστράνε πάνω σε μια πηκτή αγαρόζης με ηλεκτρικό πεδίο. Τα πιο μικρά δίκλινα μόρια κινούνται γρηγορότερα από τα μεγαλύτερα μέσα από τους πόρους της πηκτής.

Ο πιο σημαντικός παράγοντας μπορεί να είναι το μήκος του μορίου DNA, αλλά και η διαμόρφωση παίζει επίσης πολύ σημαντικό ρόλο στην ταχύτητα κίνησης (κυκλικό < γραμμικό < υπερελίκωμενο).

Η βασική χρώση, όσον αφορά στις πηκτές αγαρόζης, είναι το EtBr, που, αν και είναι εξαιρετικά καρκινογόνο, διαθέτει την ιδιότητα να φθορίζει στο υπεριώδες φως όταν προσδένεται στο DNA. Εάν βάλουμε το DNA σε πηκτή αγαρόζης που περιέχει EtBr και μετά εκθέσουμε την πηκτή σε υπεριώδες φως, γίνονται ορατές διακριτές ζώνες DNA.

Τα ρυθμιστικά διαλύματα φόρτωσης (loading buffers) προστίθενται μαζί με το DNA, έτσι ώστε να το καταστήσουν ορατό και να το κάνουν να καταβυθίζεται μέσα στο πηγάδι της πηκτής. Ως χρωστικές, για αυτόν τον σκοπό, συνήθως χρησιμοποιούνται τα Xylene cyanol και Bromophenol blue, ενώ η γλυκερόλη και η φικόλη συμβάλλουν στην καταβύθιση.

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

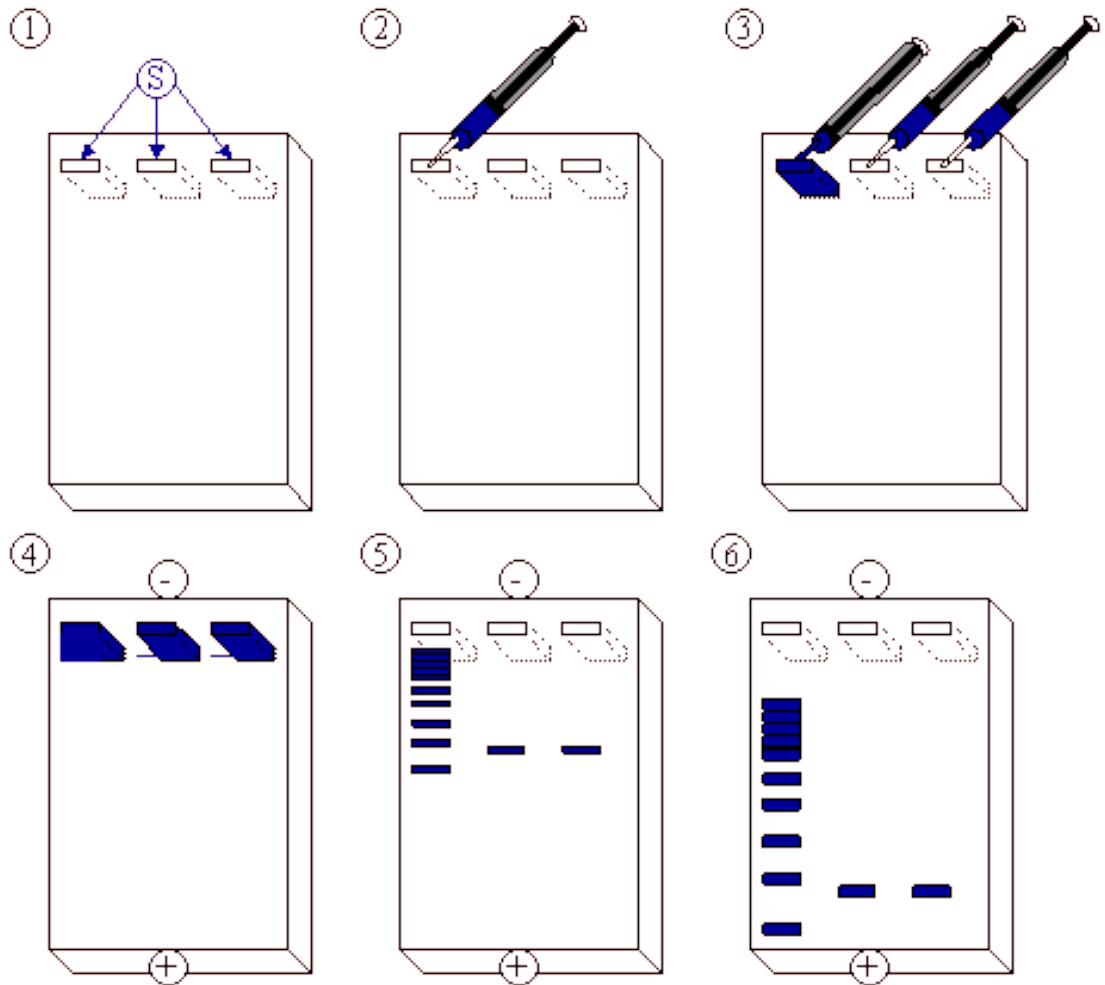
Για την παρασκευή πηκτής αγαρόζης 2% χρησιμοποιούμε τα εξής:

- 30ml TAE (ανάλογα με το μέγεθος του gel)
- 0.6gr αγαρόζη
- 2.5μl βρωμιούχο αιθίδιο (10mg/ml)

Διαδικασία

Ζυγίζουμε και τοποθετούμε 0.6gr αγαρόζης σε κωνική φιάλη των 100ml, αφού έχουμε προσθέσει προηγουμένως 30 ml TAE. Το μείγμα αγαρόζης – TAE θερμαίνεται κατάλληλα για τη διάλυση της αγαρόζης και ακολούθως, αφού αφηθεί σε θερμοκρασία δωματίου, ακολουθεί προσθήκη 2.5μl βρωμιούχου αιθιδίου (EtBr) κάτω από τον απαγωγό, επειδή το βρωμιούχο αιθίδιο, λόγω της πτητικότητας του μέσω των ατμών του μείγματος, καθίσταται εξαιρετικά επιβλαβές. Στη συνέχεια γίνεται έκχυση του διαλύματος σε μήτρα για ηλεκτροφόρηση, στην οποία προσαρμόζονται και ειδικά χτενάκια για την δημιουργία «πηγαδιών». Το διάλυμα αφήνεται να πήξει μέσα στη μήτρα για λίγα λεπτά και, όταν σταθεροποιηθεί, αφαιρείται το χτενάκι. Τέλος, η πηκτή που προκύπτει μαζί με τη μήτρα, τοποθετούνται σε μια συσκευή ηλεκτροφόρησης που περιέχει TAE 1x.

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



Εικ.6: Σχηματική απεικόνιση φόρτωσης πηκτής αγαρόζης. Στο (6) φαίνονται καθαρά πια οι ζώνες του DNA και μπορεί να γίνει η σύγκρισή τους με τις ζώνες του μάρτυρα (ladder) γνωστού μήκους που έτρεξαν στο πρώτο πηγάδι. Έτσι υπολογίζεται το μέγεθος του τμήματος DNA που ενισχύθηκε νωρίτερα με τη PCR, όπως επίσης υπολογίζεται προσεγγιστικά και η σχετική ποσότητα του DNA, ανάλογα με τη ένταση φωτεινότητας της ζώνης [16].

Από κάθε θετικό δείγμα (με επαρκή ποσότητα DNA) που προέκυψε μετά την ηλεκτροφόρηση στην πηκτή αγαρόζης, αφαιρέθηκαν 6 μl και προστέθηκαν σε 20 μl αποδιατακτικού διαλύματος (denaturation buffer).

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

- 95°C formamide
- 10% γλυκερόλη
- 0.05% bromophenol blue

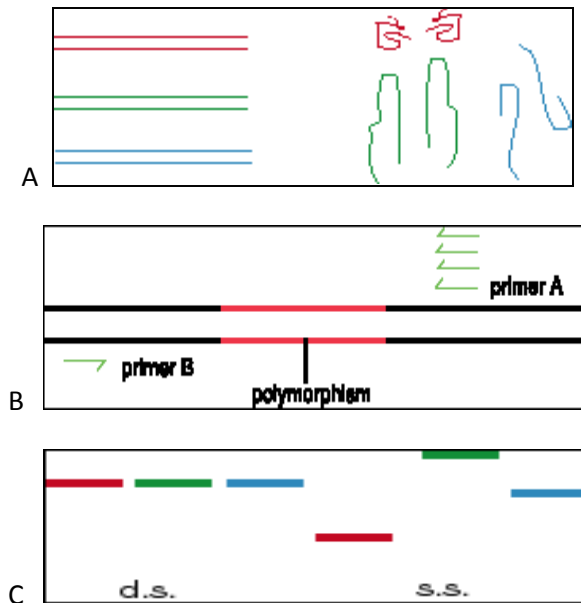
- 0.05% xylene cyanol
- 10mM NaOH

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

Η μέθοδος SSCP στην ανάλυση πολυμορφισμών

Η μέθοδος SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism) ή «πολυμορφισμός διαμόρφωσης μονού κλώνου» είναι ο ηλεκτροφορητικός διαχωρισμός μονόκλωνων νουκλεϊκών οξέων, με βάση μικρές διαφορές στην αλληλουχία (συχνά ακόμη και σε ένα ζεύγος βάσεων), οι οποίες δίνουν διαφορετική δευτεροταγή δομή και μία διακριτή διαφορά στην κινητικότητα σε πηκτή πολυακρυλαμίδης.

Η κινητικότητα του δίκλωνου DNA στην ηλεκτροφόρηση σε πηκτή εξαρτάται από το μέγεθος του μορίου και το μήκος, αλλά είναι σχετικά ανεξάρτητη της αλληλουχίας. Ωστόσο, η κινητικότητα των μονών κλώνων επηρεάζεται σημαντικά από πολύ μικρές αλλαγές στην αλληλουχία, πιθανόν και από ένα μόνο νουκλεοτίδιο ανάμεσα σε εκατοντάδες. Αυτές τις μικρές αλλαγές μπορούμε να τις παρατηρήσουμε λόγω της ασταθούς φύσης του μονόκλωνου DNA. Απουσία του συμπληρωματικού κλώνου, ένας μονός κλώνος αναδιπλώνεται, λόγω δεσμών υδρογόνου που δημιουργούνται μεταξύ διαφόρων βάσεων της αλληλουχίας του. Αυτή η τριτοταγής δομή είναι μοναδική και ανεξάρτητη από το μήκος του κλώνου (Εικ. 7)[14].



Εικ.7. Η διαδικασία της ανάλυσης SSCP: (A) Τα τρία τμήματα του δίκλωνου DNA με τις αντίστοιχες μονόκλωνες τρισιδιάστατες δομές (το κόκκινο τμήμα αναδιπλώνεται στο μικρότερο μόριο και το πράσινο τμήμα στο μεγαλύτερο). (B) Ο επιθυμητός πολυμορφισμός επιλέγεται με τους κατάλληλους εκκινητές.(C) Και τα δίκλινα και τα μονόκλινα τμήματα ηλεκτροφορούνται σε πηκτή.Τα μονόκλινα μόρια, ωστόσο, παρουσιάζουν σημαντική διαφορά στην κινητικότητα : το μικρό κόκκινο μόριο κινείται πιο γρήγορα στην πηκτή, τόσο από το μπλε όσο και από το μεγάλο πράσινο μόριο. Σύμφωνα με αυτά τα αποτελέσματα SSCP, είναι εμφανές ότι οι διαφορετικές ζώνες (κόκκινη, μπλε, πράσινη) περιέχουν κλώνους με διαφορετικές αλληλουχίες. Όσο πιο μακριά είναι οι ζώνες μεταξύ τους, τόσο περισσότερο διαφέρουν οι νουκλεοτιδικές αλληλουχίες [14].

Η ανάλυση SSCP μπορεί να ανιχνεύσει πολυμορφισμούς DNA και μεταλλάξεις σε πολλαπλές θέσεις τμημάτων DNA (Orita et al., 1989). Επίσης σαν τεχνική ανίχνευσης μεταλλάξεων, η μέθοδος SSCP χρησιμοποιείται και για ιατρικές διαγνώσεις [14].

Η αρχή λειτουργίας της μεθόδου σε γενικές γραμμές περιλαμβάνει:

- Πέψη του γενωμικού DNA με ένζυμα περιορισμού
- Μετουσίωση των μορίων DNA σε αλκαλικό διάλυμα
- Ηλεκτροφόρηση μορίων DNA σε πηκτή πολυακρυλαμίδης, σε μη αποδιατακτικές συνθήκες
- Μεταφορά, σε νάιλον μεμβράνη

- Υβριδισμό με DNA ή RNA ανιχνευτές, είτε χρώση με κατάλληλες χρωστικές π.χ. νιτρικό άργυρο (AgNO_3)

Επειδή η κινητικότητα των μονόκλωνων αλυσίδων εξαρτάται από τη θερμοκρασία, η ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων, για καλύτερα αποτελέσματα, πρέπει να διενεργείται σε σταθερή θερμοκρασία μέχρι το τέλος.

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

Ακόμη, το μήκος του τμήματος επηρεάζει την ανάλυση SSCP. Για βέλτιστα αποτελέσματα, το μέγεθος των τμημάτων DNA θα πρέπει να κυμαίνεται μεταξύ 150-300 pb, παρόλο που η ανάλυση SSCP του RNA επιτρέπει μεγαλύτερο μέγεθος τμημάτων (Wagner, 2002). Η παρουσία γλυκερόλης στην πηκτή μπορεί και αυτή να επιτρέψει την ανάλυση μεγαλύτερων τμημάτων DNA [14].

Ανάλυση SSCP (προετοιμασία πηκτής)

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

Οι πηκτές πολυακρυλαμίδης σχηματίζονται με πολυμερισμό ακρυλαμίδης και του διακλαδωτή N,N'-methylene bisacrylamide. Ο πολύ αργός αυτός πολυμερισμός επιταχύνεται εξαιρετικά από ελεύθερες ρίζες που απελευθερώνονται από το APS (ammonium persulfate) υπό την παρουσία του TEMED

(tetramethylethylenediamine). Η πυκνότητα της πηκτής εξαρτάται από την ποσότητα της ακρυλαμίδης και του διακλαδωτή στο μείγμα. Όσο πιο μεγάλοι είναι οι πόροι της πηκτής, τόσο πιο γρήγορα κινούνται τα μόρια DNA.

Πριν την έναρξη της όλης διαδικασίας θα πρέπει να υπάρχει έτοιμο μητρικό διάλυμα ακρυλαμίδης 38.5%. 100ml μητρικού διαλύματος φτιάχνονται διαλύοντας 37,5 gr ακρυλαμίδης και 1gr N,N' methylene bisacrylamide σε 60ml ddH₂O, το διάλυμα διηθείται και προστίθεται νερό μέχρι τον όγκο των 100ml. Φυλάσσεται στους 4°C μέχρι περίπου 15 μέρες.

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

- 13ml μητρικού διαλύματος 38.5%
- 2.5ml TBE 10x
- 5μl γλυκερόλη
- H₂O μέχρι τον όγκο των 50ml
και στη συνέχεια προστίθενται:
- 50μl TEMED
- 250μl APS 20%

Αφού σταθεροποιηθεί η πηκτή, τοποθετείται σε κατάλληλη συσκευή ηλεκτροφόρησης (Εικ.8) με ρυθμιστικό διάλυμα TBE 0.5x. Στη συνέχεια τα δείγματα τοποθετούνται στα πηγαδάκια της πηκτής. Στη συσκευή εφαρμόζεται τάση \sim 180V και τα δείγματα αφήνονται να τρέξουν για 16-18 ώρες (over night) σε θερμοκρασία 4°C. Για την εμφάνιση των αποτελεσμάτων ακολουθεί χρώση της πηκτής με νιτρικό άργυρο (AgNO₃).



Εικ.8: Συσκευή ηλεκτροφόρησης για SSCP

Χρώση με νιτρικό άργυρο (AgNO_3) – Silver staining

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

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

1. Παρασκευή Διαλύματος **I**, το οποίο περιέχει: 8ml + 0.5ml οξικό οξύ, σε τελικό όγκο $V_{\text{τελ}} = 400\text{ml}$. Ακολουθούν δύο πλύσεις με το Διάλυμα **I**, για 3 min η κάθε μια και στη συνέχεια μια πλύση με ddH_2O

2. Παρασκευή Διαλύματος **II** το οποίο περιέχει: AgNO₃ 1gr/lit, σε τελικό όγκο V_{τελ}=200ml. Η πλύση διαρκεί 15min και ακολουθούν δύο πλύσεις με ddH₂O
3. Παρασκευή Διαλύματος **III** το οποίο περιέχει: 3gr NaOH + 0.01gr NaBH₄ + 1ml HCHO σε τελικό όγκο V_{τελ}= 200ml

Η πηκτή παραμένει μέσα στο διάλυμα **III** για 15 – 20 λεπτά (μέχρι να εμφανιστούν καλά οι ζώνες των δειγμάτων) και ακολουθεί πλύση με ddH₂O.

Καθαρισμός DNA από το διάλυμα

Ο καθαρισμός του DNA έγινε σύμφωνα με τις οδηγίες της εταιρείας. Ο μέγιστος όγκος διαλύματος προϊόντος PCR/DNA που μπορούμε να επεξεργαστούμε με το συγκεκριμένο πρωτόκολλο είναι 100ml.

Προσδιορισμός της αλληλουχίας DNA (Sequencing)

Μετά τον καθαρισμό, τα δείγματα αποστάλθηκαν στην εταιρία Macrogen για προσδιορισμό τη αλληλουχίας τους.

Η επεξεργασία των αλληλουχιών έγινε με τη βοήθεια των προγραμμάτων BioEdit 7.0 και Clustal. Τα προγράμματα αυτά έχουν την ικανότητα ομοπαράθεσης αρκετών αλληλουχιών μαζί και εύρεσης των διαφορών τους.

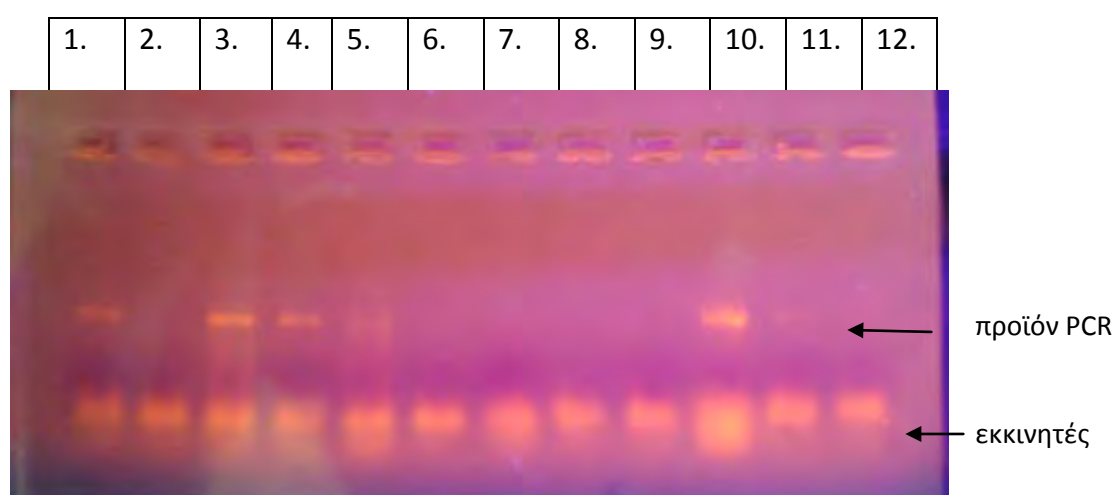
Δείγματα

Τα δείγματα που αναλύθηκαν, ήταν 20 και είχαν τις εξής ονομασίες:

1. 604 DNA Lepus
2. Λ17 DNA Lepus
3. Billinis 602 (L) Le DNA
4. Μεγάλο Περιβόλι 5
5. Πύρρα 14
6. Λ11 Le DNA
7. Billinis 648 le DNA
8. Λ40 Le DNA
9. 594 DNA Lepus
10. Βελεστίνο 2
11. Μ. Περιβόλι 7
12. Ζάλογγο 10
13. Σμόλικας 1
14. Πύρρα 18
15. 590 DNA
16. Βραδέτο 11
17. Α100 DNA
18. Κόζιακας 16 DNA
19. GPTG 17 Lepus
20. Switz 80 LeMC1R

Αποτελέσματα

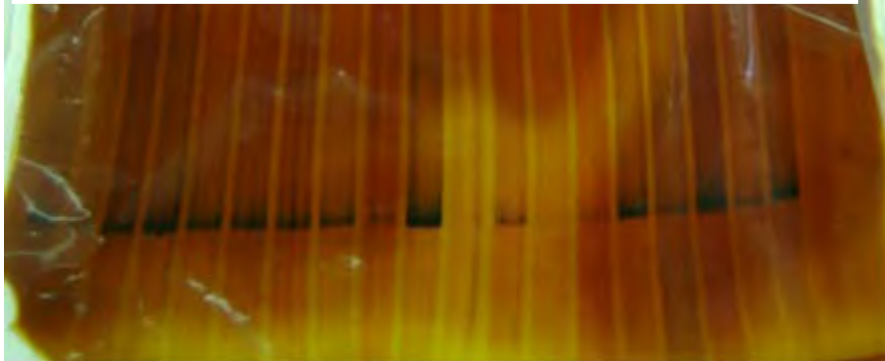
Στα δείγματά μας τα οποία προέρχονται από περιοχές της Ελλάδος πραγματοποιήθηκε PCR για την ενίσχυση του 3' άκρου του εξονίου1 του γονιδίου MC1R 444 βάσεων. Ενδεικτικά, στην Εικ.9 φαίνεται η ηλεκτροφόρηση με τους εκκινητές (βλέπε υλικά και μέθοδοι) και τα προϊόντα της PCR.



Εικ. 9: Αποτελέσματα ηλεκτροφόρησης από την PCR του γονιδίου MC1R . Το προϊόν ανιχνεύεται σε όλα τα δείγματα που εξετάστηκαν καθώς οι ζώνες έχουν το ίδιο μέγεθος. Τα νούμερα αντιστοιχούν στα δείγματα που αναφέρονται στο κεφάλαιο υλικά και μέθοδοι.

Στη συνέχεια για τη διερεύνηση της ύπαρξης πολυμορφισμών έγινε ανάλυση SSCP. Τα αποτελέσματα φαίνονται στην Εικ.10. Από την ανάλυση μπορούμε να διακρίνουμε ότι δεν υπάρχουν διαφορετικά πρότυπα μεταξύ των δειγμάτων

1-2-3-4-5-6-7-8-9-10-11-12-13-14-15-16-17-18-19-20



Εικ. 10: Βλέπουμε τα αποτελέσματα από την ανάλυση SSCP του γονιδίου MC1R από 20 διαφορετικά δείγματα. Οι αριθμοί αντιστοιχούν στα δείγματα με την ίδια σειρά όπως αναφέρονται στο κεφάλαιο υλικά και μέθοδοι.

Μετά την ανάλυση SSC, 20 δείγματα στάλθηκαν για καθαρισμό, ποσοτικοποίηση και αλληλούχιση.

Η αλληλουχία του DNA και η πρωτεΐνη που σχηματίζεται είναι η εξής:

```
ctaccacagcatcgtgacgctgcccagggcgcggtgcattgccctggccgctctggggggcc  
Y H S I V T L P R A R C I A L A V W G A  
agtgccacctccagctccctcttcgctcgcctactacgaccacacggccgctgctgctctgc  
S A T S S S L F V A Y Y D H T A V L L C  
ctcgtcagcctcttcttgccatgctggtcctcatggcggttttgacgtccacatgttc  
L V S L F L A M L V L M A V L H V H M F  
accggggcgtgcccagcatgcccagggcatcggccggctccacaagggacagcggccagcc  
T R A C Q H A Q G I A R L H K G Q R P A  
caccagggctctggcctcaaggggtgctgcccaccctcaccatcctcctgggcattttcttc  
H Q G S G L K G A A T L T I L L G I F F  
ttttgctggggcccttcttcctgcacctcgcgctcatcgtgctctgcccctcggcacc  
F C W G P F F L H L A L I V L C P R H P  
acttgcagctgcgtctttaagaacttcaacctcttcctcaccctcatcatctgcaactcc  
T C S C V F K N F N L F L T L I I C N S  
atcgtggaccggctcatctatgc  
I V D P L I Y
```

ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΚΑΙ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Σε αυτήν την εργασία διερευνήσαμε την ύπαρξη πολυμορφισμών στο γονίδιο MC1R στο είδος *Lepus europaeus* και να δούμε αν αυτοί οι πολυμορφισμοί σχετίζονται με διαφορές στο χρώμα της γούνας τους. Η επιλογή του συγκεκριμένου γονιδίου δεν έγινε τυχαία, καθώς σε διάφορα άλλα είδη (βοοειδή, κατσίκες, γουρούνια) έχει αποδειχθεί ότι κάθε πολυμορφισμός σχετίζεται και με διαφορετικό χρώμα. Εκτός από το χρώμα, η συγκεκριμένη μελέτη μπορεί να φανεί χρήσιμη για την ταυτοποίηση της προέλευσης του κρέατος μοριακά. Οι μεταλλάξεις του γονιδίου MC1R χρησιμοποιούνται ήδη για την ταυτοποίηση της προέλευσης του κρέατος σε είδη όπως τα γουρούνια, κατσίκες κ.α. κυρίως με PCR-RFLP [5].

Το γονίδιο MC1R είναι, ένα συντηρημένο γονίδιο και εμφανίζει μεγάλη ομολογία ανάμεσα στα είδη π.χ. στα γουρούνια παρουσιάζει ομολογία 86%, ακολουθούν με 83% τα άλογα και τα βοοειδή και με 80% και 75% οι άνθρωποι και τα ποντίκια αντίστοιχα. Επίσης το σύστημα χρωματισμού βρίσκεται υπό την πίεση της φυσικής επιλογής. Πιο συγκεκριμένα, το σύστημα χρωματισμού στα ζώα είναι σημαντικό για το καμουφλάζ τους για να επιλέγουν ταίρι και για πολλά είναι το σήμα κατατεθέν τους. Όλα αυτά τα χαρακτηριστικά έχουν ασκήσει επιλεκτική πίεση στο MC1R, που έχει διατηρήσει κάθε πολυμορφισμό που είναι χαρακτηριστικός σε πολλές φυλές σε κάθε διαφορετικό είδος [5].

Μέχρι τώρα τέσσερα ξεχωριστά αλληλόμορφα MC1R σχετίζονται με το διαφορετικό φαινότυπο στο χρώμα μεταξύ των αγριόχοιρων και των χοίρων. Τα άγριου τύπου αλληλόμορφα σχετίζονται με ποικίλες αποχρώσεις του καφέ στο δέρμα των αγριόχοιρων. Δύο αλληλόμορφα είναι υπεύθυνα για τον μαύρο φαινότυπο: το πρώτο παρατηρείται στην φυλή Meishan διαφέροντας από τα άγριου τύπου αλληλόμορφα σε δύο συνώνυμες και δύο μη συνώνυμες υποκαταστάσεις. Η άλλη διαφορά στα αλληλόμορφα εντοπίζεται μόνο στην φυλή Hampshire και είναι μία έλλειψη μονού νουκλεοτιδίου σε σχέση με την άγριου τύπου αλληλουχία. Είναι επίσης ενδιαφέρον να αναφέρουμε ότι το επικρατές

αλληλόμορφο για το μαύρο (Hampshire) είναι το ίδιο με αυτό για τις μαύρες κηλίδες (Pietrain) και το λευκό χρώμα (Large White), από το οποίο μπορούμε να συμπεράνουμε ότι και άλλες περιοχές του γονιδιώματος, εκτός του γονιδίου MC1R, συμβάλλουν σημαντικά στο πρότυπο του χρώματος. Τέλος, υπάρχει ένα υποτελής αλληλόμορφο υπεύθυνο για το κόκκινο χρώμα. [1].

Επίσης, έρευνα έγινε στις αίγες από 6 διαφορετικές φυλές, στο γονίδιο MC1R στην κωδικοποιούσα περιοχή, που είχαν διαφορετικά χρώματα (Girgentana λευκό κρεμώδες με συνήθως κόκκινες μικρές κηλίδες στο πρόσωπο, Maltese λευκό με μαύρα μάγουλα και αυτιά, Derivata di Siria στερεό κόκκινο, Murciano-Granadina στερεό μαύρο ή στερεό καφέ, Camoscita delle Alpi καστανό με μαύρες ρίγες, Saanen λευκό, F1 γενιάς και οι γονείς αυτών). Πέντε μονού πολυμορφισμού νουκλεοτίδια (SNPs) αναγνωρίστηκαν: μία μη νοηματική μετάλλαξη (p.Q225X), μία έλλειψη (p.A81V, p.F250V και p.C267W), και μία σιωπηλή μετάλλαξη. Το κωδικόνιο τερματισμού στην θέση 225 προκαλεί την παραγωγή μιας μικρότερης πρωτεΐνης mc1r, η οποία δεν είναι λειτουργική. Τα συγκεκριμένα SNPs ερευνήθηκαν σε ένα αρκετά μεγάλο δείγμα που ανήκει στις 6 φυλές που αναφέρθηκαν. Στη φυλή Girgentana ταίριαζε σχεδόν το αλληλόμορφο p.225X. Ωστόσο, δεν υπήρξε πλήρης σύνδεση μεταξύ της παρουσίας ερυθρών κηλίδων στο πρόσωπο και της παρουσίας του αλληλόμορφου γονιδίου σε ομόζυγη κατάσταση. Το ίδιο αλληλόμορφο εντοπίστηκε και στην φυλή Derivata di Siria. Εντούτοις, η συχνότητά του ήταν 33%, παρά το γεγονός ότι αυτά τα ζώα ήταν εντελώς κόκκινα. Το αλληλόμορφο p.267W υπήρχε στις φυλές Murciano-Granadina (μαύρες κατσίκες), ενώ ποτέ δεν εντοπίστηκε στις καφέ. Επιπλέον, η ίδια υποκατάσταση ήταν παρούσα σε όλες σχεδόν τις κατσίκες Maltese, δίνοντας ενδείξεις ότι αυτή υποκατάσταση σχετίζεται με το μαύρο χρώμα γούνας. Σύμφωνα με αυτήν την έρευνα, οι μεταλλάξεις στο MC1R γονίδιο πιθανό να καθορίζουν το φαινότυπο της φαιομελανίνης και της ευμελανίνης. Ωστόσο, προφανώς, δεν είναι οι μόνοι παράγοντες. Συγκεκριμένα, δεν υπάρχει πλήρης σύνδεση της μη νοηματικής μετάλλαξης (p.Q225X) με το κόκκινο χρώμα στο τρίχωμα και, έτσι, αυξάνεται η υπόθεση ότι

εμπλέκονται και άλλα γονίδια για τον καθορισμό του φαινοτύπου της φαιομελανίνης. [7].

Από το συγκεκριμένο πείραμα, μπορούμε να συμπεράνουμε ότι, δεν ταυτοποιήθηκαν πολυμορφισμοί του γονιδίου MC1R στα δείγματα που μελετήσαμε, και το χρώμα της γούνας τους πρέπει να είναι το ίδιο, κάτι το οποίο ισχύει. Οι συγκεκριμένοι λαγοί είναι του ίδιου είδους (*Lepus europaeus*) και έχουν το ίδιο χρώμα παρά την διαφορετικότητα της περιοχής στην οποία ζουν. Περαιτέρω έρευνες θα βοηθούσαν ιδιαίτερα στην εύρεση πολυμορφισμών σε μεγαλύτερο, ίσως, δείγμα, σε όλο το μήκος του γονιδίου αλλά και σε άλλα είδη λαγών.

Βιβλιογραφία

- [1]. Missense and nonsense mutations in melanocortin 1 receptor (MC1R) gene of different goat breeds: association with red and black coat colour phenotypes but with unexpected evidences. Fontanesi L, Beretti F, Riggio V, Dall'Olio S, González EG, Finocchiaro R, Davoli R, Russo V, Portolano B., BMC Genet. 2009 Aug 25;10:47.
- [2]. The genetic basis of adaptive melanism in pocket mice, Nachman MW, Hoekstra HE, D'Agostino SL, Proc Natl Acad Sci U S A. 2003 Apr 29;100(9):5268-73.
- [3]. Evolution and phylogenetic utility of the melanocortin-1 receptor gene (MC1R) in Cetartiodactyla, Ayoub NA, McGowen MR, Clark C, Springer MS, Gatesy J, Mol Phylogenet Evol. 2009 Aug;52(2):550-7
- [4]. Comparative genomics of major histocompatibility complexes, Kelley J, Walter L, Trowsdale J, Immunogenetics. 2005 Jan;56(10):683-95
- [5]. Detection of hybrids between wild boars (*Sus scrofa scrofa*) and domestic pigs (*Sus scrofa* f. *domestica*) in Greece, using the PCR-RFLP method on melanocortin 1 receptor (MC1R) mutations, Evagelia A. Koutsogiannouli, Katerina A. Moutou, Theologia Sarafidou, Costas Stamatis, Zissis Mamuris, Mammalian Biology, 2008
- [6]. The genetic basis of the plumage polymorphism in red-footed boobies (*Sula sula*): a melanocortin-1 receptor (MC1R) analysis, Baião PC, Schreiber E, Parker PG, J Hered. 2007 Jul-Aug;98(4):287-92
- [7]. A nucleotide substitution responsible for the tawny coat color mutation carried by the MSKR inbred strain of mice, Wada A, Kunieda T, Nishimura M, Kakizoe-Ishida Y, Watanabe N, Ohkawa K, Tsudzuki M, J Hered. 2005 Mar-Apr;96(2):145-9
- [8]. <http://ghr.nlm.nih.gov/gene/MC1R>
- [9]. <http://www5.appliedbiosystems.com/tools/pathway/pathway.php?pathway=Melanocyte%20Development%20and%20Pigmentation>
- [10]. <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=Mc1r>
- [11]. http://criticalbiomass.freeblog.hu/files/2006_07/mc1r/mc1r.gif
- [12]. http://animaldiversity.ummz.umich.edu/site/accounts/information/Lepus_europaeus.html#9354612985562cbbbc505ff8bff0e678
- [13]. Aoki H, Moro O. Involvement of microphthalmia-associated transcription factor (MITF) in expression of human melanocortin-1 receptor (MC1R). Life Sci. 2002 Sep 20.

[14]. <http://www.bio.davidson.edu/Courses/Molbio/MolStudents/spring2003/Parker/method.html>

[15]. <http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Pcr.png>

[16]. <http://www.biocrawler.com/w/images/index.php?dir=a/ab/&sort=date&order=asc>