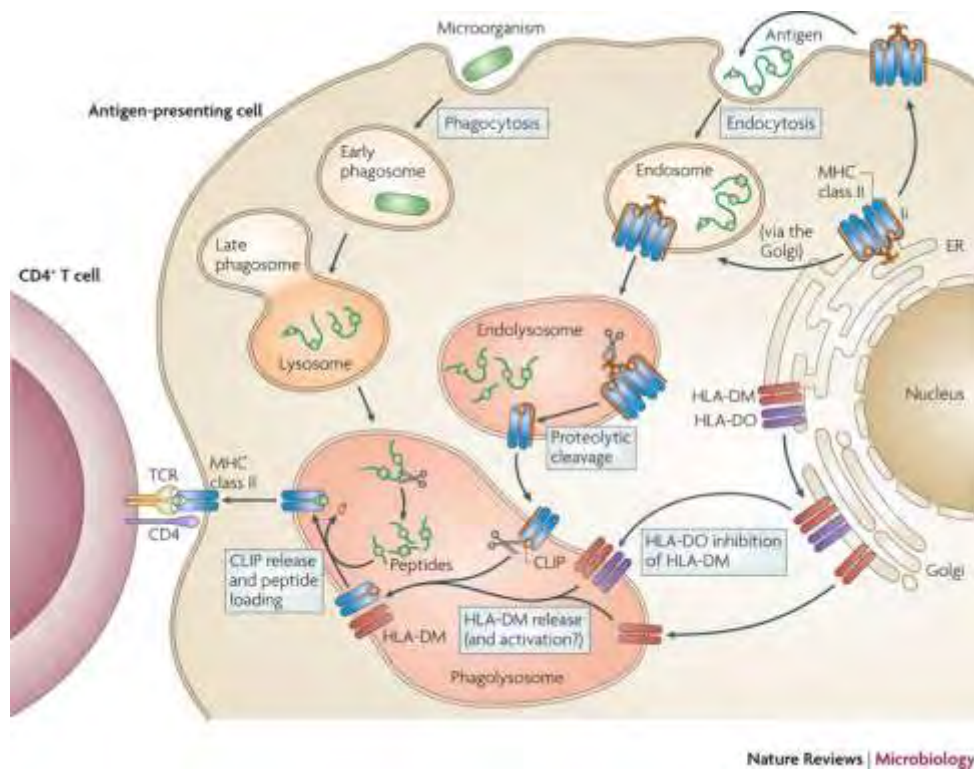


ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

Η ΑΣΘΕΝΙΑ ΤΟΥ ΔΥΤΙΚΟΥ ΝΕΙΛΟΥ – ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΩΝ ΤΟΥ ΜΕΙΖΟΝΟΣ  
ΣΥΜΠΛΕΓΜΑΤΟΣ ΙΣΤΟΣΥΜΒΑΤΟΤΗΤΑΣ (ΜΗC) ΜΕ ΤΗΝ ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑ ΤΟΥ ΕΛΛΗΝΙΚΟΥ  
ΠΛΗΘΥΣΜΟΥ

ΜΑΡΙΑ ΜΑΡΚΑΝΤΩΝΗ



Λάρισα 2014

**Η ΑΣΘΕΝΕΙΑ ΤΟΥ ΔΥΤΙΚΟΥ ΝΕΙΛΟΥ – ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΩΝ  
ΤΟΥ ΜΕΙΖΟΝΟΣ ΣΥΜΠΛΕΓΜΑΤΟΣ ΙΣΤΟΣΥΜΒΑΤΟΤΗΤΑΣ ΜΕ ΤΗΝ  
ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑ ΤΟΥ ΕΛΛΗΝΙΚΟΥ ΠΛΗΘΥΣΜΟΥ**

WEST NILE VIRUS - ANALYSIS OF POLYMORPHISMS OF MAJOR HISTOCOMPATIBILITY  
COMPLEX AND THEIR CORRELATION WITH THE SENSITIVITY OF THE GREEK POPULATION

### **Μέλη τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής**

**κ. Μαμούρης Ζήσης**, Καθηγητής Γενετικής Ζωικών Πληθυσμών,  
Τμήμα Βιοχημείας – Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

**κ. Σαραφίδου Θεολογία**, Λέκτορας Μοριακής Γενετικής Ζωικών  
Οργανισμών, Τμήμα Βιοχημείας – Βιοτεχνολογίας του  
Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

**κ. Χατζηχριστοδούλου Χρήστος**, Καθηγητή Υγιεινής και  
Επιδημιολογίας, Τμήμα Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Η παρούσα διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Γενετικής, Συγκριτικής και Εξελικτικής Βιολογίας. Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά όλους όσους βοήθησαν να γίνει πιο εύκολη η πραγματοποίηση της, ο καθένας με το δικό του τρόπο. Θα ήθελα να ευχαριστήσω πρώτα απ' όλα τον καθηγητή κ. Ζήση Μαμούρη για την βοήθεια και την στήριξη καθ' όλη τη διάρκεια των πειραμάτων. Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω τη λέκτορα κα Θεολογία Σαραφίδου καθώς και τον καθηγητή κ. Χρήστο Χατζηχριστοδούλου. Ένα μεγάλο ευχαριστώ στη υποψήφια διδάκτορα Κωνσταντίνα Σαρρή για την πολύτιμη βοήθεια και τις συμβουλές της. Ευχαριστώ θερμά όλα τα μέλη του εργαστηρίου και ιδιαιτέρως τον υποψήφιο διδάκτορα Γιαννούλη Θεμιστοκλή για το υπέροχο κλίμα που δημιουργεί και τον διδάκτορα Σταμάτη Κώστα για την υπομονή του και την πολύτιμη βοήθεια του σε όλα. Θερμές ευχαριστίες επίσης στον Καθηγητή κ. Αθανάσιο Τσακρή και την Καθηγήτρια κα Άννα Παπά για τα δείγματα τα οποία παρείχαν και έκαναν δυνατή την πραγματοποίηση της διπλωματικής. Ευχαριστώ επίσης τους συναδέλφους Ιωακείμ Φάσσο και Πελαγία Κυριακίδου για την στήριξη στις άσχημες μέρες και τη βοήθεια. Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω την φίλη μου Ελένη Μπούλμπου για την αμέριστη προσοχή της σε ότι και αν με απασχολούσε καθώς και την οικογένεια μου για την πολύτιμη βοήθεια τους.

## Περιεχόμενα

	Σελίδα
<b>Περίληψη</b> .....	7
<b>1. Εισαγωγή</b> .....	9
1.1 Ο ιός του Δυτικού Νείλου.....	10
1.1.1 Γεωγραφική προέλευση και μετάδοση.....	11
1.1.2 Διάγνωση.....	11
1.2 Το MHC (Μείζον Σύμπλεγμα Ιστοσυμβατότητας).....	11
1.2.1 Δομή και λειτουργία των μορίων του MHC κλάση II στα θηλαστικά .....	11
1.2.2 Εξέλιξη του πολυμορφισμού της κλάσης II του MHC .....	11
1.2.3 Συσχετισμοί μεταξύ του πολυμορφισμού του MHC και διαφόρων ασθενειών	13
1.2.4 Το μείζον σύμπλεγμα ιστοσυμβατότητας και ο ιός .....	14
1.3. Toll Like Receptors (TLR) .....	15
1.4 Στόχος .....	17
<b>2. Υλικά και Μέθοδοι</b> .....	19
2.1 Απομόνωση DNA από κύτταρα περιφερικού αίματος .....	20
2.2 Κατασκευή πηκτής αγαρόζης για ποιοτικό προσδιορισμό του DNA μέσω ηλεκτροφόρησης	21
2.3 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR- Polymerase Chain Reaction) .....	22
2.4 Ηλεκτροφόρηση σε πηκτική αγαρόζης .....	26
2.5 SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism) .....	28
2.6 Ηλεκτροφόρηση σε πηκτική πολυακρυλαμίδης .....	29
2.7 Στατιστική επεξεργασία των μοριακών δεδομένων - Ανάλυση και συνδυασμένη στατιστική επεξεργασία μοριακών και επιδημιολογικών δεδομένων	32
<b>3. Αποτελέσματα</b> .....	33
3.1 Το εξώνιο 2 του γονιδίου DPA1 .....	34

3.2 Το εξώνιο 2 του γονιδίου DQA1 .....	36
3.3 Το εξώνιο 2 του γονιδίου DRB1 .....	38
3.4 Το εξώνιο 2 του γονιδίου TLR3 .....	41
3.5 Συζήτηση – Σχόλια .....	43
<b>4. Βιβλιογραφία</b> .....	<b>45</b>

## Περίληψη

Η μόλυνση από τον Ιό του Δυτικού Νείλου (WNV) είναι ασυμπτωματική στα περισσότερα άτομα, ενώ μια μειοψηφία εκδηλώνει συμπτώματα που κυμαίνονται από πυρετό (20% των περιπτώσεων) έως πιο σοβαρές νευροεπεκτατικές ασθένειες όπως η εγκεφαλίτιδα, μηνιγγίτιδα, μηνιγγοεγκεφαλίτιδα και οξεία χαλαρή παράλυση (1% των περιπτώσεων). Μελέτες σε ζώα και ανθρώπους έχουν δείξει ότι τα συστήματα τόσο της φυσικής όσο και της επίκτητης ανοσίας συμμετέχουν στον έλεγχο και την καταπολέμηση του ιού. Ωστόσο, κυκλοφορούντες φλεγμονώδεις παράγοντες μπορεί να διευκολύνουν τη διείσδυση του ιού στο κεντρικό νευρικό σύστημα και η τοπική φλεγμονώδης αντίδραση που απαιτείται για την καταπολέμηση του ιού έχει συνδεθεί με εμφάνιση κλινικών συμπτωμάτων. Τα συμπτώματα της μόλυνσης από τον WNV τείνουν να είναι πιο σοβαρά σε ανοσοκατασταλμένα άτομα, γεγονός που υποδηλώνει τη συμμετοχή του ανοσοποιητικού συστήματος στον έλεγχο των μολύνσεων. Επιπλέον, οι ηλικιωμένοι και τα WNV θετικά άτομα με υποκείμενες παθήσεις, όπως υπέρταση και διαβήτης, έχουν υψηλότερο κίνδυνο να αναπτύξουν νευροεπεκτατική νόσο σε σύγκριση με άλλα WNV θετικά άτομα. Στην παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε η συγκριτική ανάλυση γενετικών πολυμορφισμών των γονιδίων HLA-DPA1 εξώνιο 2, HLA-DQA1 εξώνιο 2, HLA-DRB1 εξώνιο 2, του μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας (MHC) και TLR3 εξώνιο 2 σε 21 συμπτωματικά WNV θετικά άτομα και 34 άτομα μάρτυρες. Πέντε, επτά, 16 και δύο διαφορετικά αλληλόμορφα αντίστοιχα ανιχνεύτηκαν συνολικά στα 55 άτομα. Το πιο ενδιαφέρον αποτέλεσμα της μελέτης ήταν οι στατιστικώς σημαντικές διαφορές στις συχνότητες ορισμένων αλληλομόρφων σε όλα τα γονίδια ανάμεσα στις δυο πληθυσμιακές ομάδες. Αν και το δείγμα που αναλύθηκε είναι μικρό, το αποτέλεσμα αυτό ενδεχομένως υποδηλώνει την ύπαρξη αλληλομόρφων που προσδίδουν ευαισθησία ή ανθεκτικότητα στο κάθε άτομο. Η μελέτη θα συνεχισθεί με την προσθήκη περισσότερων ατόμων και γονιδίων.

## Abstract

West Nile infection exhibits no symptoms on most individuals, while a minority exhibits symptoms that vary from fever (20% of the cases) to more serious neuroinvasive diseases such as encephalitis, meningitis, meningoencephalitis and acute flaccid paralysis (1% of the cases). Studies in humans and animals have shown that both innate and adaptive immune systems are taking part in controlling and clearing the virus. However, circulating inflammatory factors may facilitate the penetration of the virus in the central nervous system and the local inflammatory response that is vital for viral clearance has been linked to clinical outcome. The symptoms of West Nile virus tend to be more serious in immunocompromised individuals, something that suggests the involvement of the immune system in infection control. Furthermore, the elderly and the WNV positive individuals with underlying diseases such as hypertension and diabetes, present a higher risk of developing neuroinvasive disease compared to other WNV positive subjects. In the present study,

comparative analysis of genetic polymorphisms of genes HLA-DPA1 exon 2, HLA-DQA1 exon 2, HLA-DRB1 exon 2, of the Major Histocompatibility Complex, TLR3 exon 2, was held on 21 WNV positive subjects and 34 control subjects. Five, seven, sixteen and two different alleles were detected respectively in a total of 55 individuals. Probably the most interesting result of the analysis was the statistically significant differences in the frequencies of certain alleles in all genes between the two population groups. Although the sample analyzed is small, this result may indicate the existence of alleles which confer susceptibility or resistance to each individual. The study will continue with the addition of more individuals and genes.



# 1. Εισαγωγή

### **1.1 Ο ιός του Δυτικού Νείλου.**

Ο ιός του Δυτικού Νείλου είναι ένας ζωνοσογόνος RNA ιός, ο οποίος ανήκει στους φλαβοϊούς (οικογένεια Flaviviridae, γένος Flavivirus) (Nash et al, 1999) Οι φλαβοϊοί έχουν εικοσαεδρική συμμετρία και γραμμικό μονόκλωνο RNA με μέγεθος από 9,6 έως 12 kb. Ο ιός ακολουθεί τη λυτική οδό μόλυνσης άλλων κυττάρων, διότι ως φλαβοϊός διαθέτει θετικά φορτισμένο νοηματικό RNA, το οποίο αναπαράγεται στο κυτταρόπλασμα των κυττάρων ξενιστών. Το γονιδίωμα του ιού μιμείται το κυτταρικό mRNA σε όλα τα χαρακτηριστικά εκτός από την απουσία της πολύ- Α ουράς. Έτσι ο ιός εκμεταλλεύεται τις λειτουργίες του ξενιστή για να αναπαραχθεί. Αφού ολοκληρωθεί η μετάφραση, προκύπτει μια πολυπρωτεΐνη που διασπάται από ένα συνδυασμό πρωτεασών ώστε να ελευθερωθούν ώριμα πολυπεπίδια. Η μετα-μεταφραστική τροποποίηση δεν είναι δυνατή σε αυτή την περίπτωση, αλλά το πολυπεπίδιο διαθέτει αυτοκαταλυτική ικανότητα και απελευθερώνει ένα συγκεκριμένο ένζυμο το οποίο στη συνέχεια διασπά περαιτέρω το πολυπεπίδιο. Ένα από τα προϊόντα που διασπώνται είναι μια πολυμεράση, υπεύθυνη για τη σύνθεση του (-) νοηματικού RNA μορίου. Αυτό το μόριο δρα ως εκμαγείο για τη σύνθεση του RNA του γονιδιώματος των απογόνων. Ως αποτέλεσμα, νέα σωματίδια του ιού συναρμολογούνται, ο πυρηνικός φάκελος συσσωρεύεται και συμβαίνει η λύση των κυττάρων του ξενιστή. (Le Sommer C et al, 2012)

#### **1.1.1 Γεωγραφική προέλευση και μετάδοση.**

Ο συγκεκριμένος ιός βρίσκεται σε εύκρατα και τροπικά κλίματα και ταυτοποιήθηκε για πρώτη φορά στην υποπεριοχή του Δυτικού Νείλου στην Δυτική Αφρική και πιο συγκεκριμένα στην Ουγκάντα το 1937. Ο ιός βρέθηκε για πρώτη φορά στην Αμερική το 1999 και πιο συγκεκριμένα στην Νέα Υόρκη (Nash et al. 1999). Από τότε ο ιός έχει εξαπλωθεί σε διάφορες χώρες του κόσμου όπως ο Καναδάς, η Καραϊβική και η Ευρώπη, με ένα νέο στέλεχος που ταυτοποιήθηκε μόλις το 2012 (Fox et al., 2013), αλλά και στην Τυνησία μόλις το 2013 (Riabi et al. 2014) Ο ιός του Δυτικού Νείλου μεταδίδεται μέσω θηλυκών κουνουπιών, τα οποία είναι και οι κύριοι φορείς της ασθένειας (Hayes et al. 2005). Με τη σειρά τους τα κουνούπια μεταδίδουν την ασθένεια με κατακόρυφη διαβίβαση σε διάφορα είδη πουλιών, τα οποία αποτελούν τους κύριους ξενιστές και στα οποία η μόλυνση είναι θανατηφόρα μέσα σε 4 με 5 μέρες (Theophilides et al. 2005).

Στα θηλαστικά, τα οποία αποτελούν περιστασιακούς ξενιστές, ο ιός δεν πολλαπλασιάζεται εύκολα (δηλαδή δεν αναπτύσσει υψηλή αιμία κατά τη διάρκεια της λοίμωξης και δεν υπάρχει υψηλή πιθανότητα μετάδοσης από άνθρωπο σε άνθρωπο). Έτσι, τα κουνούπια, τα οποία τσιμπάνε μολυσμένα θηλαστικά, δεν είναι δυνατόν να μολυνθούν και αυτό καθιστά τα θηλαστικά, «ξενιστές-αδιέξοδο».

Πιο σπάνιοι τρόποι μετάδοσης στον άνθρωπο αποτελούν: η μεταμόσχευση οργάνων μολυσμένου δότη, η μετάγγιση μολυσμένου αίματος, η κάθετη μετάδοση από τη μητέρα στο έμβρυο και ο θηλασμός.

Ασχέτως με τον τρόπο μετάδοσης, η μόλυνση από τον Ιό του Δυτικού Νείλου (WNV) είναι ασυμπτωματική στα περισσότερα άτομα, ενώ μια μειοψηφία εκδηλώνει συμπτώματα που κυμαίνονται από πυρετό (20% των περιπτώσεων) έως πιο σοβαρές νευροεπεκτατικές ασθένειες όπως η εγκεφαλίτιδα, μηνιγγίτιδα, μηνιγγοεγκεφαλίτιδα και οξεία χαλαρή παράλυση (1% των περιπτώσεων) (Mostashari et al. 2001). Πιο αναλυτικά

- Ο πυρετός του δυτικού Νείλου: εμφανίζεται σε πάνω από το 20% των περιπτώσεων προκαλεί συμπτώματα παρόμοια με αυτά της γρίπης (Olejnik et al. 1952), τα οποία διαρκούν 3-6 μέρες. Εκτός από τον υψηλό πυρετό, οι ασθενείς παρουσιάζουν πονοκέφαλο, ρίγη, έντονη εφίδρωση, αδυναμία, κόπωση, πρησμένους λεμφαδένες, πόνο στις αρθρώσεις και μερικά γαστρεντερικά συμπτώματα που περιλαμβάνουν ναυτία, εμετό, διάρροια.
- Εγκεφαλίτιδα του δυτικού Νείλου: Είναι η πιο κοινή νευροεκφυλιστική εκδήλωση του ιού και εμφανίζει συμπτώματα παρόμοια με αυτά της κοινής ιικής εγκεφαλίτιδας δηλαδή πυρετό, πονοκεφάλους και μεταβολές της ψυχικής κατάστασης. Ένα σημαντικό εύρημα είναι η μυϊκή αδυναμία στο 30-50% των περιπτώσεων, συχνά με συμπτώματα του κινητικού νευρώνα δηλαδή, χαλαρή παράλυση και ελάττωση αντανακλαστικών χωρίς όμως αισθητηριακές διαταραχές (Flores et al. 2012)
- Νευροεκφυλιστική ασθένεια Δυτικού Νείλου: Συμβαίνει σε λιγότερο από το 1% των προσβλημένων και προκαλεί μόλυνση του κεντρικού νευρικού συστήματος και κατά συνέπεια μηνιγγίτιδα και εγκεφαλίτιδα (Davis et al. 2006)
- Μη νευρολογικές διαταραχές: Περιλαμβάνουν ηπατίτιδα, παγκρεατίτιδα (Asnis DS et al, 2000), μυοκαρδίτιδα, ραβδομύλυση (Montgomery et al, 2005), νεφρίτιδα (Anninger WV et al, 2003), και αιμορραγικό πυρετό (Paddock et al. 2006).

### 1.1.2 Διάγνωση

Η πιο κοινή διαδικασία για τη διάγνωση της ύπαρξης του ιού είναι η ανάλυση του ορού του αίματος ή του εγκεφαλονωτιαίου υγρού του ασθενούς, το οποίο συλλέγεται με οσφυονωτιαία παρακέντηση. Τα τυπικά ευρήματα στους ασθενείς με ιό δυτικού Νείλου περιλαμβάνουν λεμφοκυτταρική πλειοκυττάρωση, αυξημένα επίπεδα πρωτεΐνης, γλυκόζης και γαλακτικό οξύ σε επίπεδα αναφοράς, και καθόλου ερυθροκύτταρα. Παρόλα αυτά, η οριστική διάγνωση προέρχεται από ανίχνευση του, ειδικού για τον ιό, αντίσωμα IgM και ουδετερόφιλων (Tyler et al. 2006)

## 1.2 Το ΜHC (Μείζον Σύμπλεγμα Ιστοσυμβατότητας)

### 1.2.1 Δομή και λειτουργία των μορίων του ΜHC κλάση II στα θηλαστικά

Το μείζον σύμπλεγμα ιστοσυμβατότητας (major histocompatibility complex MHC) είναι μια γονιδιωματική περιοχή που κωδικοποιεί για κυτταρικές πρωτεΐνες, οι οποίες εμπλέκονται στην ανοσολογική απόκριση. Οι βασικές λειτουργίες των μορίων των κλάσης I και της

κλάση II του MHC συνίστανται στο να συνδέονται με τα ανοσογονικά πεπτίδια στο εσωτερικό του κυττάρου και να τα παρουσιάζουν στα T-κύτταρα. Τα μόρια της κλάσης II του MHC είναι ετεροδιμερή που αποτελούνται από μία  $\alpha$  και μία  $\beta$  αλυσίδα και εκφράζονται κυρίως στα κύτταρα που παρουσιάζουν τα αντιγόνα. Κάθε αλυσίδα έχει δύο εξωκυτταρικές περιοχές ( $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$  και  $\beta_1$ ,  $\beta_2$ ). Τα τμήματα  $\alpha_1$  και  $\beta_1$  σχηματίζουν την PBR (peptide-binding region), στην οποία τα πεπτίδια συνδέονται και αναγνωρίζονται από τους υποδοχείς των T-κυττάρων (π.χ. Germain 1994; Browning and McMichael 1996). Η ανάλυση της τρισδιάστατης δομής των ανθρώπινων μορίων της κλάσης II (HLA-DR) αποκάλυψε μοριακές θήκες στην PBR που επηρεάζουν τη σύνδεση των πεπτιδίων και συνεπώς την απόκριση των T-κυττάρων (Brown et al. 1993, Stern et al. 1994).

Ο συνήθης υψηλός πολυμορφισμός που βρέθηκε στα γονίδια της κλάσης II του MHC, επικεντρώνεται κυρίως στο εξόνιο 2, το οποίο βρίσκεται στην PBR στο τμήμα  $\beta_1$ . Μεταξύ των θηλαστικών, όπως τα βοοειδή (*Bos taurus*) και του προβάτου (*Ovis aries*) έχουν χαρακτηριστεί διάφορα γονίδια της κλάσης II (DRA, DRB, DQA, DQB) (Lewin et al. 1999). Περισσότερα από 100 αλληλόμορφα DRB3 είναι ήδη γνωστά στα βοοειδή, ενώ στα πρόβατα η οργάνωση είναι παρόμοια και υπάρχουν διάφορα γονίδια DRB, από τα οποία μόνο το DRB1 βρέθηκε να διαθέτει υψηλό πολυμορφισμό (Dutia et al. 1994, Schwaiger et al. 1996).

Το σύμπλεγμα MHC περιέχει πολλά συνδεδεμένα γονίδια και μέχρι σήμερα δεν είναι σαφές το πώς αυτά αλληλεπιδρούν. Το MHC SEQUENCING CONSORTIUM (1999) (Semple et al. 2002) ταυτοποίησε 224 γονίδια στο ανθρώπινο MHC και για πολλά από αυτά η λειτουργία τους είναι αδιευκρίνιστη. Εκτιμάται ότι περίπου 40% από τα εκφρασμένα αυτά γονίδια έχουν ανοσολογική λειτουργία. Κοινωνικοί και οικολογικοί παράγοντες όπως το σύστημα ζευγαρώματος, η κοινωνική δομή και η οικοθέση παίζουν υποθετικά σημαντικό ρόλο στην εξέλιξη του ανοσολογικού συστήματος. Για παράδειγμα, στα πρωτεύοντα βρέθηκε ότι η συγκέντρωση των λεμφοκυττάρων και των φαγοκυττάρων σχετίζεται θετικά με την ετήσια βροχόπτωση, που ενδεχομένως να οφείλεται στα υψηλότερα ποσοστά παρασιτισμού στις υγρότερες οικοθέσεις (Jordan and Bruford 1998). Η επιλογή συντρόφου (Penn and Potts 1999, Hambuch and Lacey 2002) η κοινωνική δομή (Wegner et al. 2003) και η ποικιλότητα των παρασίτων (Hill et al. 1991) θεωρούνται σημαντικοί παράγοντες για τη διατήρηση της ποικιλότητας του MHC, είτε μέσω άμεσης επιλογής πάνω στα γονίδια του MHC, είτε μέσω έμμεσης επιλογής σε άλλα ανοσολογικά γονίδια στο MHC, είτε τέλος ως συνδυασμός των δύο.

### **1.2.2 Εξέλιξη του πολυμορφισμού της κλάσης II του MHC**

Στα γονίδια της κλάσης II του MHC ο ρυθμός των μη-συνώνυμων αντικαταστάσεων στο δεύτερο εξόνιο είναι υψηλότερος από τον ρυθμό των συνώνυμων αντικαταστάσεων και οι αλληλομορφικές σειρές μπορεί να παραμένουν στους πληθυσμούς για εκατομμύρια χρόνια. Ο Nei και συνεργάτες (1997) πρότειναν ότι τα νέα γονίδια δημιουργούνται με επαναλαμβανόμενους γονιδιακούς αναδιπλασιασμούς. Μερικά αναδιπλασιασμένα γονίδια

διατηρούνται στο γονιδίωμα για αρκετό καιρό, όμως άλλα εξαφανίζονται ή καθίστανται μη λειτουργικά. Οι Hoegstrand and Boehme (1999) συμπέραναν ότι η γονιδιακή σύγκλιση μπορεί να δημιουργήσει νέα αλληλόμορφα του MHC. Οι Gu and Nei (1999) πρότειναν ότι οι βασικοί παράγοντες για τον υψηλό πολυμορφισμό του MHC φαίνεται να είναι η υπερκυριαρχία ή η εξισορροπούσα επιλογή (balancing selection). Ο πολυμορφισμός εντοπίζεται κυρίως μέσα στην περιοχή PBR των μορίων των κλάσεων I και II. Κάποιες μορφές εξισορροπούσας επιλογής μπορεί να διατηρεί το υψηλό επίπεδο μη συνώνυμων αντικαταστάσεων στα εξώνια που κωδικοποιούν για το σημείο σύνδεσης με τα πεπτιδία. (Yeager and Hughes 1999). Αυτό συμφωνεί με την πρόταση των Doherty and Zinkernagel (1975) ότι ο πολυμορφισμός του MHC θα μπορούσε να διατηρηθεί μέσω του πλεονεκτήματος των ετεροζυγωτικών (υπόθεση υπερκυριαρχίας). Η συχνοεξαρθώμενη επιλογή είναι ένα άλλο μοντέλο που θα μπορούσε να διατηρήσει τον πολυμορφισμό του MHC. Η εναλλακτική αυτή προϋποθέτει ότι τα άτομα φορείς ενός μεταλλαγμένου αλληλόμορφου, που δημιουργήθηκε πρόσφατα, έχουν ένα εξελικτικό πλεονέκτημα επειδή τα παθογόνα δεν θα μπορούσαν να έχουν το χρόνο να αναπτύξουν την ικανότητα να προσβάλουν τα κύτταρα που φέρουν το νέο μεταλλαγμένο αντιγόνο. Αυτό καταλήγει σε μια συνεχή εναλλαγή των αλληλομόρφων. Περαιτέρω υποθετικοί μηχανισμοί διατήρησης του πολυμορφισμού του MHC περιλαμβάνουν ουδέτερες αντικαταστάσεις, ασυμβατότητα μητέρας-εμβρύου και προτίμηση ζευγαρώματος.

### **1.2.3 Συσχετισμοί μεταξύ του πολυμορφισμού του MHC και διαφόρων ασθενειών**

Στους ανθρώπους ορισμένες ασθένειες συνδέονται με ειδικά αλληλόμορφα του MHC. Μελέτες έχουν αποδείξει μια συσχέτιση μεταξύ του τύπου του MHC και της προστασίας από σοβαρής μορφής ελονοσία (Hill et al. 1991; Gilbert et al. 1998). Ο Thursz και οι συνεργάτες (1997) βρήκαν ένα πλεονέκτημα για τους ετεροζυγώτες για την κλάση II του MHC στην μόλυνση από ηπατίτιδα Β στους ανθρώπους. Μια μελέτη από τον Carrington και τους συνεργάτες (1999) για το MHC και την μόλυνση από HIV-1 στους ανθρώπους έδειξε ότι η ομοζυγωτία για την κλάση I συνδεόταν με την γρήγορη ανάπτυξη του AIDS. Αναλύσεις της συσχέτισης μεταξύ του πολυμορφισμού του γονιδίου *DRB* της κλάσης II του MHC και της λεμφοκύτωσης που προκαλείται από τον ιό της λευχαιμίας των βοοειδών έδειξε ότι το δεύτερο εξώνιο του *BoLA-DRB3* σχετιζόταν με τα αλληλόμορφα που συνδέονται με την ανθεκτικότητα και την ευαισθησία (Van Eijk et al. 1992; Xu et al. 1993). Η ποικιλότητα του MHC σχετίζεται επίσης με την αυξανόμενη επιβίωση των νέων ατόμων και την ενδοπαρασιτική ανθεκτικότητα στο *Ovis aries* (Paterson et al. 1998).

### **1.2.4 Το μείζον σύμπλεγμα ιστοσυμβατότητας και ο ιός**

Η δυναμική ξενιστή-ιού που αποτελεί τη βάση της ανάπτυξης σοβαρών συμπτωμάτων στη μόλυνση από τον WNV είναι ένα πεδίο έντονης ερευνητικής δραστηριότητας. Παράλληλες μελέτες σε ζώα και ανθρώπους έχουν δείξει ότι τα συστήματα τόσο της φυσικής όσο και

της επίκτητης ανοσίας συμμετέχουν στον έλεγχο και την καταπολέμηση του ιού (Diamond et al. 2009). Ωστόσο, κυκλοφορούντες φλεγμονώδεις παράγοντες μπορεί να διευκολύνουν τη διείσδυση του ιού στο κεντρικό νευρικό σύστημα (Wang et al. 2004) και η τοπική φλεγμονώδης αντίδραση που απαιτείται για την καταπολέμηση του ιού έχει συνδεθεί με απώλεια νευρώνων και εμφάνιση κλινικών συμπτωμάτων (Samuel and Diamond 2006). Έχει προταθεί πως τα ρυθμιστικά CD4+ T κύτταρα (Tregs) θα μπορούσαν να διαδραματίσουν προστατευτικό ρόλο με βάση τα υψηλότερα επίπεδά τους σε ασυμπτωματικά άτομα σε σχέση με συμπτωματικά και την αυξημένη θνησιμότητα που προκαλεί η μόλυνση από τον WNV σε ποντίκια ελλειμματικά σε Tregs (Lanteri et al. 2009). Συνεπώς, τα συμπτώματα της μόλυνσης από τον WNV τείνουν να είναι πιο σοβαρά σε ανοσοκατασταλμένα άτομα, γεγονός που υποδηλώνει τη συμμετοχή του ανοσοποιητικού συστήματος στον έλεγχο των μολύνσεων (Kumar et al. 2004). Επιπλέον, οι ηλικιωμένοι και τα WNV θετικά άτομα με υποκείμενες παθήσεις, όπως υπέρταση και διαβήτη, έχουν υψηλότερο κίνδυνο να αναπτύξουν νευροεπεκτατική νόσο σε σύγκριση με άλλα WNV θετικά άτομα (Jean et al. 2007). Επίσης, γενετικές μεταλλάξεις στον υποδοχέα CCR5 (Glass et al. 2006) και στο γονίδιο *OAS1* έχουν συσχετιστεί με την ανάπτυξη σοβαρής νευροεπεκτατικής νόσου (Samuel et al. 2006, Scherbik et al. 2006).

Η δυναμική ξενιστή-ιού που αποτελεί τη βάση της ανάπτυξης σοβαρών συμπτωμάτων στη μόλυνση από τον WNV είναι ένα πεδίο έντονης ερευνητικής δραστηριότητας. Παράλληλες μελέτες σε ζώα και ανθρώπους έχουν δείξει ότι τα συστήματα τόσο της φυσικής όσο και της επίκτητης ανοσίας συμμετέχουν στον έλεγχο και την καταπολέμηση του ιού (Diamond et al. 2009). Ωστόσο, κυκλοφορούντες φλεγμονώδεις παράγοντες μπορεί να διευκολύνουν τη διείσδυση του ιού στο κεντρικό νευρικό σύστημα (Wang et al. 2004) και η τοπική φλεγμονώδης αντίδραση που απαιτείται για την καταπολέμηση του ιού έχει συνδεθεί με απώλεια νευρώνων και εμφάνιση κλινικών συμπτωμάτων (Samuel and Diamond 2006). Έχει προταθεί πως τα ρυθμιστικά CD4+ T κύτταρα (Tregs) θα μπορούσαν να διαδραματίσουν προστατευτικό ρόλο με βάση τα υψηλότερα επίπεδά τους σε ασυμπτωματικά άτομα σε σχέση με συμπτωματικά και την αυξημένη θνησιμότητα που προκαλεί η μόλυνση από τον WNV σε ποντίκια ελλειμματικά σε Tregs (Lanteri et al. 2009). Συνεπώς, τα συμπτώματα της μόλυνσης από τον WNV τείνουν να είναι πιο σοβαρά σε ανοσοκατασταλμένα άτομα, γεγονός που υποδηλώνει τη συμμετοχή του ανοσοποιητικού συστήματος στον έλεγχο των μολύνσεων (Kumar et al. 2004). Επιπλέον, οι ηλικιωμένοι και τα WNV θετικά άτομα με υποκείμενες παθήσεις, όπως υπέρταση και διαβήτη, έχουν υψηλότερο κίνδυνο να αναπτύξουν νευροεπεκτατική νόσο σε σύγκριση με άλλα WNV θετικά άτομα (Jean et al. 2007). Επίσης, γενετικές μεταλλάξεις στον υποδοχέα CCR5 (Glass

et al. 2006) και στο γονίδιο *OAS1* έχουν συσχετιστεί με την ανάπτυξη σοβαρής νευροεπεκτατικής νόσου (Samuel et al. 2006, Scherbik et al. 2006).

### **1.3. Toll Like Receptors (TLR)**

Οι Toll Like Receptors (TLR) είναι μια τάξη πρωτεϊνών που διαδραματίζουν βασικό ρόλο στην εγγενή ανοσία. Είναι μονοί, μη καταλυτικοί υποδοχείς που εκτείνονται στη μεμβράνη και συνήθως εκφράζονται σε κύτταρα-δείκτες όπως τα μακροφάγα και τα δενδριτικά κύτταρα, τα οποία αναγνωρίζουν δομικά συντηρημένα μόρια, που προέρχονται από τα μικρόβια. Μόλις αυτά τα μικρόβια έχουν παραβιάσει τα φυσικά εμπόδια, όπως το δέρμα ή το βλεννογόνο του εντερικού σωλήνα, αναγνωρίζονται από TLRs, που ενεργοποιούν τις ανοσοποιητικές αντιδράσεις των κυττάρων. Οι TLRs περιλαμβάνουν τα TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6, TLR7, TLR8, TLR9, TLR10, TLR11, TLR12 και TLR13. Πήραν το όνομά τους από την ομοιότητά τους με την πρωτεΐνη που κωδικοποιείται από το γονίδιο που προσδιορίστηκε στην *Drosophila* το 1985 από τον Christiane Nusslein-Volkard (Hansson and Edfeldt, 2005)

#### **Ποικιλομορφία**

Οι TLRs είναι ένας τύπος υποδοχέα αναγνώρισης προτύπων (PRR) και αναγνωρίζουν τα μόρια που υπάρχουν σε πολλά παθογόνα, αλλά είναι διακριτά διαφορετικά από τα αρχικά μόρια, που συλλογικά αναφέρονται ως μοριακά πρότυπα που σχετίζονται με παθογόνα (PAMPs). Οι TLRs μαζί με τους υποδοχείς της ιντερλευκίνης-1 σχηματίζουν μια υπεροικογένεια υποδοχέων, γνωστή ως «υποδοχείς ιντερλευκίνης 1 – TLRs υπεροικογένεια». Όλα τα μέλη αυτής της οικογένειας έχουν την κοινά λεγόμενη TIR (toll-IL-1 υποδοχέας) περιοχή. Υπάρχουν τρεις υποομάδες των περιοχών TIR. Πρωτεΐνες με περιοχές υποομάδας 1 είναι υποδοχείς για ιντερλευκίνες που παράγονται από τα μακροφάγα, μονοκύτταρα, και δενδριτικά κύτταρα και όλα έχουν περιοχές εξκυτταρικής ανοσοσφαιρίνης (Ig). Πρωτεΐνες με περιοχές υποομάδας 2 είναι κλασικοί TLRs και δεσμεύονται άμεσα ή έμμεσα σε μόρια μικροβιακής προέλευσης. Μια τρίτη υποομάδα των πρωτεϊνών που περιέχουν περιοχές TIR αποτελείται από πρωτεΐνες προσαρμογείς, που είναι αποκλειστικά κυτταροπλασματικές και μεσολαβούν στη σηματοδότηση από πρωτεΐνες των υποομάδων 1 και 2. Οι TLRs είναι παρόντες σε σπονδυλωτά, καθώς και σε ασπόνδυλα. Οι μοριακές δομικές μονάδες των TLRs εκπροσωπούνται σε βακτήρια και σε φυτά, και οι υποδοχείς αναγνώρισης προτύπων στα φυτά είναι καλά γνωστό ότι απαιτούνται για την άμυνα του ξενιστή ενάντια στη μόλυνση. Έτσι, οι TLRs φαίνεται να είναι από τα πιο αρχαία, συντηρημένα συστατικά του ανοσοποιητικού συστήματος. Κατά τα τελευταία χρόνια TLRs εντοπίστηκαν επίσης στο νευρικό σύστημα των θηλαστικών. Μέλη της οικογένειας TLR ανιχνεύθηκαν σε νευρογλοία, νευρώνες και επί νευρικών προγονικών κυττάρων, τα οποία ρυθμίζουν τη τύχη των κυττάρων (Rolls et al. 2007).

Οι TLR υποδοχείς πλέον συγκαταλέγονται μεταξύ των βασικών μορίων που ειδοποιούν το ανοσοποιητικό σύστημα στην παρουσία μικροβιακών μολύνσεων. Είναι γνωστοί για την ομοιότητά τους με διόδια, έναν υποδοχέα που εντοπίστηκε για πρώτη φορά στη μύγα των φρούτων *Drosophila melanogaster*, και αρχικά ήταν γνωστός για την αναπτυξιακή λειτουργία του στον εν λόγω οργανισμό. Το 1996, ο toll βρέθηκε από τους Jules A. Hoffmann και τους συνεργάτες του, να έχει ουσιαστικό ρόλο στην ανοσία της μύγας στην προσβολή από μύκητες (Lemaitre et al. 1997), το οποίο επιτυγχάνεται με την ενεργοποίηση της σύνθεσης των αντιμικροβιακών πεπτιδίων. Τα φυτικά ομόλογα ανακαλύφθηκαν από την Pamela Ronald το 1995 (ρύζι XA21) (Song et al. 1995) και τον Thomas Boller το 2000 (*Arabidopsis* FLS2 (Gomez-Gomez et al. 2000)). Η πρώτη αναφορά σε ανθρώπινους TLR περιγράφεται από τον Nomura και τους συνεργάτες του το 1994 (Nomura et al. 1994), αλλά χαρτογραφήθηκαν σε χρωμοσώματα από τον Taguchi και τους συνεργάτες του το 1996 (Taguchi et al. 1996). Επειδή η ανοσοποιητική λειτουργία των toll στη *Drosophila* δεν ήταν τότε γνωστή, θεωρήθηκε ότι οι TIL (γνωστή σήμερα ως TLR1) θα μπορούσαν να συμμετάσχουν στην ανάπτυξη των θηλαστικών. Ωστόσο, το 1991 (πριν από την ανακάλυψη του TIL) παρατηρήθηκε ότι ένα μόριο με σαφή ρόλο στη λειτουργία του ανοσοποιητικού σε θηλαστικά, ο υποδοχέας της ιντερλευκίνης-1 (IL-1), είχε επίσης ομολογία με το toll της δροσόφιλας και αποδείχθηκε ότι τα κυτταροπλασματικά τμήματα και των δύο μορίων ήταν παρόμοια (Gay and Keith 1991). Το 1997, ο Charles Janeway και Ruslan Medzhiton έδειξε ότι ο TLR τώρα γνωστός ως TLR4 θα μπορούσε, όταν προσδεθεί τεχνητά με τη χρήση αντισωμάτων να επάγει την ενεργοποίηση ορισμένων γονιδίων που είναι απαραίτητα για την έναρξη μιας ανοσολογική απάντησης (Medzhiton et al. 1997). Η ανακάλυψη ότι οι TLR 4 λειτουργούν ως υποδοχείς που διαισθάνονται την παρουσία LPS ανακαλύφθηκε από τον Bruce A. Beutler και τους συνεργάτες του (Poltorak et al. 1998). Αυτοί χρησιμοποίησαν τεχνικές κλωνοποίησης θέσης για να αποδείξουν ότι τα ποντίκια που δεν μπορούσαν να ανταποκριθούν σε LPS είχαν μεταλλάξεις που κατάργησαν τη λειτουργία του TLR4. Αυτό προσδιόρισε τον TLR4 ως ένα από τα βασικά συστατικά του υποδοχέα για LPS. Έπειτα, τα άλλα TLR γονίδια εντοπίστηκαν σε ποντικούς με γονιδιακή στόχευση, σε μεγάλο βαθμό στο εργαστήριο του Shizuo Akira και των συνεργατών του. Κάθε TLR πιστεύεται τώρα ότι μπορεί να ανιχνεύσει μια διακριτή συλλογή μορίων - μερικά μικροβιακής προέλευσης και ορισμένα προϊόντα κυτταρικής βλάβης - και για να σηματοδοτήσει την παρουσία λοιμώξεων.

Έχει εκτιμηθεί ότι τα περισσότερα είδη θηλαστικών έχουν μεταξύ δέκα και δεκαπέντε τύπους Toll υποδοχέων. Δεκατρείς TLRs (που ονομάζονται απλά TLR1 έως TLR13) έχουν αναγνωριστεί σε ανθρώπους και ποντίκια μαζί, και ισοδύναμες μορφές πολλών από αυτούς έχουν βρεθεί σε άλλα είδη θηλαστικών (Du et al. 2000, Chuang and Ulevitch 2000, Tabet et al. 2004). Ωστόσο, ισοδύναμα ορισμένων TLR που βρέθηκαν σε ανθρώπους δεν είναι παρόντα σε όλα τα θηλαστικά. Για παράδειγμα, ένα γονίδιο που κωδικοποιεί για μία πρωτεΐνη ανάλογη με το TLR10 στον άνθρωπο είναι παρούσα σε ποντικούς, αλλά φαίνεται να έχει καταστραφεί σε κάποιο σημείο στο παρελθόν από έναν ρετροϊό. Από την άλλη



πλευρά, οι ποντικοί εκφράζουν τους TLRs 11, 12, και 13, κανείς από τους οποίους δεν αντιπροσωπεύεται στον άνθρωπο. Άλλα θηλαστικά μπορούν να εκφράζουν TLRs που δεν βρίσκονται στον άνθρωπο. Άλλα μη θηλαστικά είδη μπορεί να έχουν διαφορετικούς TLRs από τα θηλαστικά, όπως καταδεικνύεται από τον TLR14, ο οποίος βρίσκεται στο ψάρι Takifugu (Roach et al. 2005). Αυτό μπορεί να περιπλέξει τη διαδικασία στην οποία γίνεται χρήση πειραματόζων ως μοντέλα για την ανθρώπινη εγγενή ανοσία.

### **TLR3**

Ο TLR3 είναι ο μόνος υποδοχέας που δε χρησιμοποιεί το MyD88 εξαρτώμενο μονοπάτι. Ο προσδέτης του είναι είναι δίκλωνο RNA (dsRNA), το οποίο ενεργοποιεί το σηματοδοτικό μονοπάτι εξαρτώμενο από TRIF. Για τη διερεύνηση του ρόλου αυτού του μονοπατιού, χρησιμοποιήθηκαν τεχνικές Knockdown για τον TLR3 και το TRIF και τα αποτελέσματα έδειξαν ότι μόνο το μονοπάτι του TLR3 απαιτείται για την πλήρη επαγωγή της έκφρασης του γονιδίου-στόχου από τον φορέα έκφρασης ρετροϊού. Αυτή η ρετροϊκή έκφραση τεσσάρων μεταγραφικών παραγόντων (Oct4, Sox2, Klf4 και c-Myc) προκαλεί πολυδυναμία σε σωματικά κύτταρα. Αυτό υποστηρίζεται από τη μελέτη, η οποία δείχνει, ότι η αποδοτικότητα και η ποσότητα της ανθρώπινης iPSC γενιάς, χρησιμοποιώντας ρετροϊκούς φορείς, μειώνεται με την απενεργοποίηση του μονοπατιού με αναστολείς πεπτιδίου ή shRNA knockdown του TLR3 ή της πρωτεΐνης προσαρμογέα του (TRIF). Στο σύνολό τους, η διέγερση της TLR3 προκαλεί μεγάλες αλλαγές στην αναδιαμόρφωση της χρωματίνης και τον πυρηνικό επαναπρογραμματισμό, και η ενεργοποίηση των φλεγμονωδών οδών απαιτείται για αυτές τις αλλαγές, η επαγωγή των πολυδύναμων γονιδίων και η παραγωγή των ανθρώπινων επαγόμενων πολυδύναμων αποικιών βλαστικών κύτταρων (iPSC) (Lee et al. 2012).

### **1.4 Στόχος**

Στο παρόν πρωτόκολλο η ιδέα είναι η συγκριτική ανάλυση γενετικών πολυμορφισμών του μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας (MHC) του χρωμοσώματος 6 σε ασυμπτωματικά και συμπτωματικά WNV θετικά άτομα (Lichtman 2005). Η περιοχή I του MHC κωδικοποιεί μόρια HLA τάξης I, συμπεριλαμβανομένων των HLA-A, HLA-B, και HLA-C, ενώ περιοχή II του MHC κωδικοποιεί για τα μόρια HLA τάξης II, συμπεριλαμβανομένων των HLA-DP, HLA-DQ, και HLA-DR (Lichtman 2005). Αυτές οι πρωτεΐνες αποτελούν βασικές συνιστώσες της επίκτητης ανοσολογικής απόκρισης, λόγω της συμμετοχής τους στην παρουσίαση του αντιγόνου. Στα εμπύρηννα κύτταρα, τα μόρια HLA τάξης I παρουσιάζουν ενδοκυτταρικά αντιγόνα στα CD8+ T κύτταρα, ενώ οι πρωτεΐνες HLA τάξης II παρουσιάζουν εξωκυτταρικά αντιγόνα στα CD4+ T κύτταρα (Lichtman 2005). Επομένως, η επίκτητη ανοσολογική απόκριση του ξενιστή εξαρτάται από την ικανότητα των αντιγόνου-

παρουσιαστικών κυττάρων να παρουσιάσουν πεπτίδια, που προέρχονται από τα παθογόνα, στα CD4+ και CD8+ T κύτταρα.

Τα γονίδια που κωδικοποιούν μόρια HLA τάξης I και II είναι σε υψηλό βαθμό πολυμορφικά (Schreuder et al. 2001) γεγονός που συνεπάγεται μικρές διαφοροποιήσεις των αμινοξέων στους βασικούς τομείς του HLA-πεπτιδίου στις θέσεις σύνδεσης (Bade-Doeding et al. 2010) επηρεάζοντας την ικανότητα των πρωτεϊνών HLA να παρουσιάσουν τα ειδικά πεπτίδια που προέρχονται από τα παθογόνα (Elamin et al. 2010, Wang et al. 2010, Axelsson-Robertson et al. 2011). Ως εκ τούτου, η μεγάλη μεταβλητότητα των μορίων HLA μπορεί να μεταφραστεί σε διαφορετική ικανότητα παρουσίασης αντιγόνων προκειμένου να προκληθεί η ανοσολογική απόκριση εναντίον εισβολέων (Huang et al. 2010). Πολλές μελέτες έχουν αναφέρει συσχετίσεις μεταξύ πολυμορφισμών των HLA και των αποτελεσμάτων μολυσματικών ασθενειών (Louie et al. 1999, Kuhn et al. 2004, Neumann-Haefelin et al. 2006, Hraber et al. 2007, Kamatani et al. 2009, van Manen et al. 2009), συμπεριλαμβανομένων των ασθενειών από φλαβοϊούς (LaFleur et al. 2002, Zivna et al. 2002, Stephens et al. 2002, Polizel et al. 2004, Sierra et al. 2007, Nguyen et al. 2008, Falcon-Lezama et al. 2009, Appanna et al. 2010).

Επομένως έχει αξία μια σύγκριση των αλληλόμορφων HLA σε ομάδες ατόμων WNV θετικών που είναι ασυμπτωματικοί και συμπτωματικοί. "Ευαίσθητα" αλληλόμορφα HLA αναμένεται να βρίσκονται στατιστικώς συχνότερα σε άτομα με νευροεπεκτατική νόσο σε σχέση με ασυμπτωματικά άτομα. Αντίθετα, τα "προστατευτικά" αλληλόμορφα HLA αναμένεται να εμφανίζονται πιο συχνά σε ασυμπτωματικά άτομα.

## 2. Υλικά και μέθοδοι

Η συγκριτική ανάλυση γενετικών πολυμορφισμών των γονιδίων HLA-DPA1 εξώνιο 2, HLA-DQA1 εξώνιο 2, HLA-DRB1 εξώνιο 2, του μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας (MHC) και TLR3 εξώνιο 2 πραγματοποιήθηκε σε 23 συμπτωματικά WNV άτομα και 34 άτομα μάρτυρες. Οι ασθενείς προήρθαν από το Εργαστήριο Μικροβιολογίας, Ιατρική Σχολή, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών (Επιστημονικός υπεύθυνος: Καθηγητής Αθανάσιος Τσακρής) και το Εργαστήριο Αναφοράς Αρμποϊών, Α΄ Μικροβιολογικό Εργαστήριο, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης (Επιστημονική υπεύθυνη: Καθηγήτρια Άννα Παπά)

## **2.1 Απομόνωση DNA από κύτταρα περιφερικού αίματος.**

Η απομόνωση του DNA έγινε από 23 άτομα θετικά για τον ιό του Δυτικού Νείλου και τα δείγματα δόθηκαν από . Η απομόνωση DNA έχει ως σκοπό τον διαχωρισμό του από τα υπόλοιπα συστατικά του κυττάρου, διότι η παρουσία τους μπορεί να αλλοιώσει την ποιότητα του.

Η απομόνωση έγινε με το πρωτόκολλο επώασης με πρωτεΐνάση K και εκχύλισης με φαινόλη/ χλωροφόρμιο.

Τα αντιδραστήρια τα οποία χρησιμοποιήθηκαν είναι:

- SSC (Standard Sodium Citrate) : για κατακρήμνιση
- Οξικό Νάτριο: για καθίζηση μεμβρανών και διαλυτοποιημένων πρωτεϊνών
- SDS: είναι ανιονικό απορρυπαντικό και χρησιμοποιείται για την καταστροφή των πρωτεϊνών της κυτταρικής μεμβράνης και των λιπιδίων και οδηγεί σε λύση του κυττάρου.
- Πρωτεΐνάση K: είναι μια πρωτεΐνάση σερίνης η οποία απελευθερώνει το DNA με ταυτόχρονη διάσπαση των νουκλεασών που μπορεί να καταστρέψουν το DNA.
- Φαινόλη/ χλωροφόρμιο: τα οποία χρησιμοποιούνται για τον διαχωρισμό του DNA από τα λιπίδια και τις πρωτεΐνες. Το DNA παραμένει στην υδατική φάση του διαλύματος ενώ τα λιπίδια στην οργανική.
- Ισοπροπανόλη: είναι αλκοόλη που χρησιμοποιείται για τη κατακρήμνιση των νουκλεϊκών οξέων
- Αιθανόλη 75%: για καθαρισμό του δείγματος από προηγούμενα διαλύματα (όπως SDS).

## Διαδικασία

1. Αφού ξεπαγώσουν τα δείγματα, μεταφέρεται 0,5ml δείγματος σε σωληνάριο Eppendorf στο οποίο προσθέτουμε 1ml SSC buffer. Έπειτα γίνεται ανάδευση στη συσκευή vortex και ακολουθεί φυγοκέντρηση για 3 min στις 13000rpm.
2. Μετά τη φυγοκέντρηση απομακρύνουμε το υπερκείμενο που έχει σχηματιστεί και στο ίζημα προσθέτουμε εκ νέου 1ml SSC buffer. Γίνεται ανάδευση με vortex και φυγοκέντρηση για 3 min στις 13000rpm.
3. Αφού απομακρυνθεί το υπερκείμενο, γίνεται προσθήκη 0,5ml οξικού νατρίου ( $\text{CH}_3\text{COONa}$ ), 50μl SDS 5% και 10ml διαλύματος πρωτεϊνάσης K. Ακολουθεί ανάδευση σε vortex και στη συνέχεια τα δείγματα επώάζονται στους  $55^\circ\text{C}$  για 1 ώρα ενώ αναδεύονται ήπια.
4. Αφού ολοκληρωθεί η ανάδευση, προστίθεται σε κάθε δείγμα 0,5 ml φαινόλης και 0,5 ml χλωροφορμίου και φυγοκέντρηση για 10min στις 13000rpm.
5. Μετά την φυγοκέντρηση το υπερκείμενο μεταφέρεται σε νέο σωληνάριο Eppendorf και προστίθεται 1ml χλωροφορμίου. Ακολουθεί ανάδευση σε vortex και φυγοκέντρηση για 5min στις 13000rpm.
6. Αφαιρείται το υπερκείμενο το οποίο το μεταφέρουμε σε νέους σωλήνες Eppendorf όπου γίνεται προσθήκη 1ml ισοπροπανόλης και ακολουθείται από επώαση για 20min στους  $-20^\circ\text{C}$ .
7. Στο τέλος της επώασης γίνεται φυγοκέντρηση για 20min στις 13000rpm ώστε να γίνει κατακρήμνιση του DNA.
8. Αδειάζουμε το περιεχόμενο των eppendorfs και προσθέτουμε 1ml αιθανόλης 75% και γίνεται φυγοκέντρηση για 5min στις 13000rpm.
9. Μετά τη φυγοκέντρηση αδειάζουμε το περιεχόμενο και τοποθετούμε τα eppendorfs στο φούρνο για να εξατμιστεί η ποσότητα της αιθανόλης που έχει απομείνει.
10. Αφού στεγνώσει εντελώς, γίνεται προσθήκη 100μl ddH<sub>2</sub>O, κάνουμε ανάδευση και αποθηκεύουμε τα δείγματα στους  $-20^\circ\text{C}$ .

## 2.2 Κατασκευή πηκτής αγαρόζης για ποιοτικό προσδιορισμό του DNA μέσω ηλεκτροφόρησης.

Για την κατασκευή της πηκτής:

- Προσθήκη 0,6 gr αγαρόζης και 40 ml TAE 1x σε κωνική φιάλη

- Θέρμανση του διαλύματος έως ότου η αгарόζη διαλυθεί πλήρως
- Προσθήκη 4 ml βρωμιούχου αιθιδίου (EtBr)
- Το διάλυμα στη συνέχεια μεταφέρεται σε ειδικό καλούπι όπου και αφήνεται μέχρι να πήξει.

Στη συνέχεια πραγματοποιείται ηλεκτροφόρηση στην πηκτή για τον ποιοτικό προσδιορισμό του DNA. Η διαδικασία έχει ως εξής

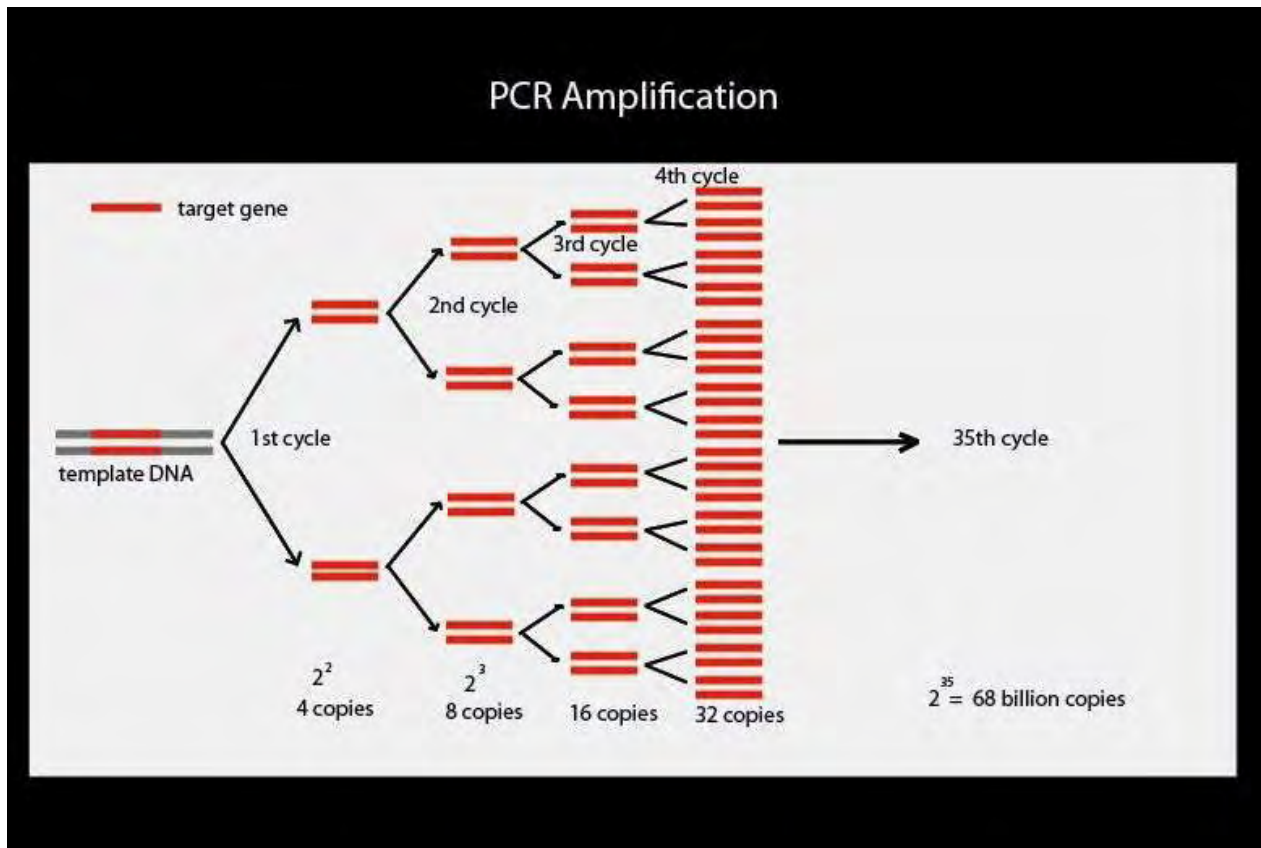
- Τοποθέτηση πηκτώματος στη συσκευή ηλεκτροφόρησης
- Προσθήκη 3 ml δείγματος DNA σε κάθε πηγαδάκι μαζί με 5μl loading buffer.
- Εφαρμογή τάσης 150 V για περίπου 20 min
- Τέλος, μεταφορά δειγμάτων στη συσκευή UV για παρατήρηση.

### **2.3 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR- Polymerase Chain Reaction)**

Η μέθοδος της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης έγινε γνωστή στην επιστημονική κοινότητα το 1985 από τον Kary Mullis ο οποίος τιμήθηκε με βραβείο Νόμπελ για αυτή την ανακάλυψη. Η PCR αποτελεί μια απλή και ταχεία μέθοδο για τον πολλαπλασιασμό σε πολλά αντίγραφα μιας νουκλεοτιδικής αλληλουχίας, με τη βοήθεια του ενζύμου πολυμεράση. Ο πολλαπλασιασμός επιτυγχάνεται με την επανάληψη τριών αντιδράσεων σε διαφορετικές θερμοκρασίες το κάθε ένα. Κάθε κύκλος της PCR αποτελείται από τα εξής στάδια:

1. Αποδιάταξη του DNA. (Denaturation)
2. Υβριδισμός των εκκινητών στο DNA στόχο. (Annealing)
3. Επιμήκυνση του 3' άκρου των εκκινητών και σύνθεση συμπληρωματικών κλώνων του DNA με τη βοήθεια του ενζύμου Taq πολυμεράση. (Extension)

Ένας πλήρης κύκλος PCR περιλαμβάνει την επώαση των δειγμάτων σε τρεις διαφορετικές θερμοκρασίες. Πιο συγκεκριμένα το DNA των δειγμάτων αποδιατάσσεται με θέρμανση στους 95°C. Στη συνέχεια οι εκκινητές οι οποίοι βρίσκονται σε περίσσεια, υβριδίζονται στις συμπληρωματικές αλληλουχίες του DNA στόχου με μείωση της θερμοκρασίας στους 50°C-60°C. Οι εκκινητές είναι συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια, μήκους 18-30 βάσεων τα οποία υβριδίζονται με την αλληλουχία DNA στόχος. Ακολουθεί επώαση των εκκινητών στους 72°C για την επιμήκυνση των εκκινητών και τη σύνθεση συμπληρωματικών κλώνων του DNA με τη βοήθεια του ενζύμου Taq πολυμεράση η οποία είναι θερμοανθεκτικό ένζυμο και επιτρέπει τη σύνθεση του DNA σε κατεύθυνση 5' προς 3' και συνθέτει περίπου 2000 νουκλεοτίδια ανά λεπτό.



**Εικόνα 1:** Η διαδικασία της PCR.

Η διαδικασία για μια αντίδραση PCR περιλαμβάνει:

1. Παρασκευή του μείγματος της αντίδρασης που αποτελείται από PCR buffer,  $MgCl_2$ ,  $dH_2O$ , τους εκκινητές, dNTPs, και την Taq πολυμεράση να προστίθεται τελευταία στο μείγμα. Ακολουθεί στιγμιαία φυγοκέντρηση.
2. Στη συνέχεια γίνεται προσθήκη του έτοιμου μείγματος στα tubes που ήδη περιέχουν την κατάλληλη ποσότητα DNA, σε ίσους όγκους για το κάθε tube.
3. Ακολουθεί μια ακόμη στιγμιαία φυγοκέντρηση και τα δείγματα τοποθετούνται στη συσκευή PCR (thermal cycler)
4. Στο τέλος της αντίδρασης PCR τα δείγματα φυλάσσονται στους  $-20^\circ C$ .

Οι ποσότητες και οι συγκεντρώσεις των αντιδραστηρίων για κάθε αντίδραση φαίνονται στον παρακάτω πίνακα.

Αντιδραστήρια	Τελική συγκέντρωση	Τελικός όγκος
dH <sub>2</sub> O		40,5μl
PCR buffer +Mg	1X	5μl
MgCl <sub>2</sub>	2mM	0,25μl
dNTPs	0,8mM	1μl
Primer FW	1pmol/μl	1μl
Primer RV	1pmol/μl	1μl
Taq polymerase	1 unit	0,25μl
DNA		1μl
Τελικός όγκος		50μl

Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε αντίδραση PCR για κάθε ένα γονίδιο με συνθήκες που παρουσιάζονται παρακάτω:

Συνθήκες για την ενίσχυση του γονιδίου DPA1

Συνθήκες PCR	Θερμοκρασία/ Χρόνος
Αρχική αποδιάταξη	95° C για 4min
Αποδιάταξη	95° C για 40 sec
Υβριδοποίηση εκκινητών	59° C για 45 sec
Επέκταση τμημάτων	72° C για 45 sec
Τελική επέκταση	72° C για 10min
	Διατήρηση δειγμάτων στους 4° C.



Συνθήκες για την ενίσχυση του γονιδίου DQA1

Συνθήκες PCR	Θερμοκρασία/ Χρόνος
Αρχική αποδιάταξη	95° C για 4min
Αποδιάταξη	95° C για 40 sec
Υβριδοποίηση εκκινητών	60° C για 45 sec
Επέκταση τμημάτων	72° C για 45 sec
Τελική επέκταση	72° C για 10min
	Διατήρηση δειγμάτων στους 4° C.

Συνθήκες για την ενίσχυση του γονιδίου DRB1

Συνθήκες PCR	Θερμοκρασία/ Χρόνος
Αρχική αποδιάταξη	95° C για 4min
Αποδιάταξη	95° C για 40 sec
Υβριδοποίηση εκκινητών	56° C για 45 sec
Επέκταση τμημάτων	72° C για 45 sec
Τελική επέκταση	72° C για 10min
	Διατήρηση δειγμάτων στους 4° C.

Συνθήκες για την ενίσχυση του γονιδίου TLR3

Συνθήκες PCR	Θερμοκρασία/ Χρόνος
Αρχική αποδιάταξη	95° C για 4min
Αποδιάταξη	95° C για 40 sec
Υβριδοποίηση εκκινητών	56° C για 35 sec
Επέκταση τμημάτων	72° C για 30 sec
Τελική επέκταση	72° C για 10min
	Διατήρηση δειγμάτων στους 4° C.

Με το πέρας της αντίδρασης PCR πραγματοποιείται ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων σε πηκτή αγαρόζης με σκοπό την παρατήρηση τους καθώς διαχωρίζονται σύμφωνα με το μέγεθος τους. Τα μόρια του DNA διαθέτουν αρνητικά φορτισμένες φωσφορικές ομάδες σε κάθε νουκλεοτίδιο με αποτέλεσμα να κινούνται προς το θετικό ηλεκτρόδιο κατά την ηλεκτροφόρηση τους. Τα μόρια μεγάλου μεγέθους κινούνται πιο αργά από αυτά με μικρό μέγεθος και ως αποτέλεσμα να συμβαίνει διαχωρισμός των μορίων σε “ζώνες”. Στο πήκτωμα επίσης προστίθεται η φθορίζουσα χρωστική βρωμιούχο αιθίδιο, η οποία συνδέεται με το DNA μεταξύ των ζευγών βάσεων και με τη τοποθέτηση του πηκτώματος σε υπεριώδες (UV) φως, οι περιοχές του DNA φθορίζουν έντονα. (Harvey et al. 2000)

#### **2.4 Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης**

Η ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό των μορίων του DNA ανάλογα με το μέγεθος. Επίσης είναι δυνατή η εκτίμηση του μεγέθους μορίων αγνώστου μήκους συγκρίνοντας τη μετακίνησή τους σε σχέση με μόρια γνωστού μήκους. Είναι γνωστό ότι τα μόρια του DNA έχουν αρνητικά φορτισμένες φωσφορικές ομάδες σε κάθε νουκλεοτίδιο. Ως αποτέλεσμα, τα μόρια DNA και RNA κινούνται προς το θετικό ηλεκτρόδιο κατά την ηλεκτροφόρηση του πηκτώματος. Τα μικρότερα μόρια κινούνται ευκολότερα από τα μεγαλύτερα μόρια, έτσι ώστε τα μόρια διαφορετικού μήκους να διαχωριστούν. Ο διαχωρισμός γίνεται σε «ζώνες», των οποίων το πλάτος ισούται με τα πηγαδάκια όπου το αρχικό μείγμα DNA τοποθετήθηκε. Στο πήκτωμα προστίθεται η φθορίζουσα χρωστική ουσία βρωμιούχο αιθίδιο. Αυτή συνδέεται με το DNA μεταξύ των ζευγών βάσεων. Ως αποτέλεσμα, όταν το πήκτωμα φωτίζεται στο UV, οι περιοχές που περιέχουν DNA φθορίζουν έντονα. (Harvey et al. 2000).

Υπάρχουν διάφορες παράμετροι που καθορίζουν την κίνηση των μορίων DNA στο πήκτωμα. Κάποιες από αυτές είναι:

1. Το μοριακό βάρος του DNA: τα μεγαλύτερα μόρια μεταναστεύουν πιο αργά καθώς περνούν μέσα από τους πόρους της πηκτής και λιγότερο αποτελεσματικά από ότι τα μικρότερα.
2. Η διαμόρφωση του DNA: το υπερελικωμένο κυκλικό DNA, το διακεκομένο κυκλικό DNA και το γραμμικό DNA μεταναστεύουν με διαφορετικούς ρυθμούς.
3. Η χρωστική βρωμιούχο αιθίδιο: η παρουσία της χρωστικής προκαλεί μείωση του αρνητικού φορτίου και της κινητικότητας.
4. Η εφαρμοζόμενη τάση: σε χαμηλές τάσεις η μετανάστευση των γραμμικών τμημάτων DNA είναι ανάλογη με τη τάση που εφαρμόζεται. Ωστόσο, δεδομένου ότι

η ισχύς του ηλεκτρικού πεδίου αυξάνεται, η κινητικότητα των τμημάτων με υψηλό μοριακό βάρος αυξάνει διαφορικά.

### **Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης**

Διαλύματα:

*50x TAE (2M Tris – acetate/ 0,5 M EDTA)*

121 gr Tris base

28,5 ml Acetic acid

50 ml EDTA 0,5M

Έως τα 500ml ddH<sub>2</sub>O

Για τη Παρασκευή διαλύματος 1X TAE αραιώνουμε το διάλυμα 50X TAE

*6X loading buffer*

1 ml bromophenol blue 1% w/v

1 ml 10X TBE

5 ml γλυκερόλη 100%

Έως τα 10 ml ddH<sub>2</sub>O

### **Διαδικασία**

1. Προετοιμασία της ειδικής πλάκας για τη παρασκευή του gel τοποθετώντας ταινία στις δύο πλευρές.
2. Σε κωνική φιάλη προστίθενται 0,6 gr αγαρόζης και 40 ml 1X TAE.
3. Το διάλυμα θερμαίνεται έως ότου διαλυθεί η αγαρόζη.
4. Γίνεται προσθήκη 4μl βρωμιούχου αιθιδίου και γίνεται καλή ανάδευση του διαλύματος.
5. Το παρασκεύασμα χύνεται στη ειδική πλάκα και τοποθετούνται τα χτενάκια για να δημιουργηθούν τα πηγαδάκια της πηκτής.

6. Το διάλυμα της αγαρόζης αφήνεται να πήξει για 30 λεπτά περίπου και στη συνέχεια τα χτενάκια αφαιρούνται.

Στη συνέχεια πραγματοποιείται η ηλεκτροφόρηση:

1. Η πηκτή τοποθετείται στην συσκευή ηλεκτροφόρησης την οποία έχουμε γεμίσει με ρυθμιστικό διάλυμα 1X TAE.
2. Ανάμειξη 3μl loading buffer με 5μl προιόντος PCR και φόρτωση στα πηγαδάκια.
3. Παροχή ρεύματος στα 100 volt.
4. Η ηλεκτροφόρηση διαρκεί περίπου 20 λεπτά μέχρι η χρωστική να διατρέξει αρκετή απόσταση μέσα στο πήκτωμα.
5. Γίνεται, τέλος, παρατήρηση του gel στη συσκευή UV και φωτογραφίζεται το αποτέλεσμα.

## **2.5 SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism)**

Η μέθοδος αυτή ορίζεται ως πολυμορφισμός διαμόρφωσης μονής αλυσίδας και είναι ουσιαστικά η διαφορά στη διαμόρφωση νουκλεοτιδικών αλληλουχιών μονής αλυσίδας ίδιου μήκους, όπως αυτή προκαλείται από διαφορές στις αλληλουχίες. Αυτή η ιδιότητα επιτρέπει στις αλληλουχίες να διαχωριστούν με ηλεκτροφόρηση η οποία τα διαχωρίζει ανάλογα με τις διαφορετικές διαμορφώσεις τους (Masato et al. 1989).

### *Βάση της μεθόδου*

Η κινητικότητα του δίκλωνου DNA στην ηλεκτροφόρηση εξαρτάται από το μέγεθος του κλώνου και το μήκος του αλλά είναι σχετικά ανεξάρτητη από την αλληλουχία των νουκλεοτιδίων. Η κινητικότητα όμως των μονόκλωνων μορίων, εξαρτάται εμφανώς από πολύ μικρές αλλαγές στην αλληλουχία, πιθανόν και αλλαγή ενός μόνο νουκλεοτιδίου ανά πολλές χιλιάδες. Οι μικρές αλλαγές είναι αξιοσημείωτες λόγω της σχετικά ασταθούς φύσης του μονόκλωνου DNA. Με την απουσία συμπληρωματικού κλώνου, ο μονός κλώνος μπορεί να υποστεί διακλωνικό ζευγαρωμα βάσεων, κάτι το οποίο οδηγεί σε δημιουργία θηλιών και πτυχώσεων οι οποίες προσδίδουν στον μονό κλώνο μια μοναδική τρισδιάστατη δομή, ανεξαρτήτως μεγέθους. Μια μόνο αλλαγή νουκλεοτιδίου μπορεί να επηρεάσει δραματικά τη κινητικότητα του κλώνου μέσα στο gel με το να μεταβάλλει το διακλωνικό ζευγάρωμα βάσεων και την προκύπτουσα τρισδιάστατη δομή (Melcher et al. 2000).

## 2.6 Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμίδης

Τα πηκτώματα πολυακρυλαμίδης είναι πιο αποτελεσματικά για το διαχωρισμό μικρών τμημάτων DNA (5-500 bp). Η αναλυτική ισχύς τους είναι εξαιρετικά υψηλή και τα τμήματα του DNA που διαφέρουν σε μέγεθος μόνο 1 bp στο μήκος ή στο 0,1% της μάζας τους μπορεί να διαχωριστούν σε ορισμένα πηκτώματα πολυακρυλαμίδης. Οι πηκτές πολυακρυλαμίδιου τρέχουν σε κάθετη διαμόρφωση σε σταθερό ηλεκτρικό πεδίο (Sambrook and Russel 2001).

*Παρασκευή πηκτής πολυακρυλαμίδης 8%:*

Διαλύματα

- 10X TBE (890mM Tris, 890mM Boric acid, 20mM EDTA)

121 gr Tris base

61,7 gr boric acid

80 ml EDTA 0,5 M

Έως τα 2lt ddH<sub>2</sub>O

- APS 20%

2 gr ammonium persulfate

10 ml ddH<sub>2</sub>O

*Διαδικασία ( για κατασκευή 2 gel)*

1. Σε ποτήρι ζέσεως των 100 ml προσθέτουμε

10 gr πολυακρυλαμίδη

0,25 gr Bis-acrylamide

7,5 ml TBE 10X

8 gr ουρία

2. Στη συνέχεια γίνεται καλή ανάδευση σε μαγνητικό αναδευτήρα ώστε να διαλυτοποιηθεί η ουρία πλήρως.
3. Το διάλυμα διηθείται, με τη χρήση διηθητικού χαρτιού σε ογκομετρικό σωλήνα και ο ογκος ρυθμίζεται με ddH<sub>2</sub>O έως τα 125 ml.

4. Το διάλυμα μεταφέρεται σε κωνική φιάλη και προστίθενται 125 μl TEMED και 700 μl APS.
5. Τοποθετείται το χτενάκι για να δημιουργηθούν τα πηγαδάκια στη συσκευή ηλεκτροφόρησης.
6. Το διάλυμα περιχύνεται στη συσκευή όπου και πολυμερίζεται για 45 λεπτά περίπου.
7. Αφαιρείται το χτενάκι και καθαρίζονται τα πηγαδάκια προσεκτικά για τυχόν υπολείμματα πηκτής.

#### *Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων στη πηκτή*

- Τοποθετούμε την πηκτή σε κάθετη συσκευή ηλεκτροφόρησης
- Γεμίζουμε με 1X TBE τη συσκευή
- Τοποθετούμε τα προϊόντα της PCR (10μl) μαζί με 5μl loading buffer στα πηγαδάκια
- Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται σε θερμοκρασία δωματίου overnight με τάση 200 volts

#### *Χρώση με νιτρικό άργυρο (silver staining)*

Η χρώση με νιτρικό άργυρο είναι μια ιδιαίτερα ευαίσθητη τεχνική για τη μετα-ηλεκτροφορητική ανίχνευση των ζωνών DNA σε πηκτές πολυακρυλαμίδης. Η διακριτική ικανότητα είναι <1 ng DNA (Sambrook et al, 2001)

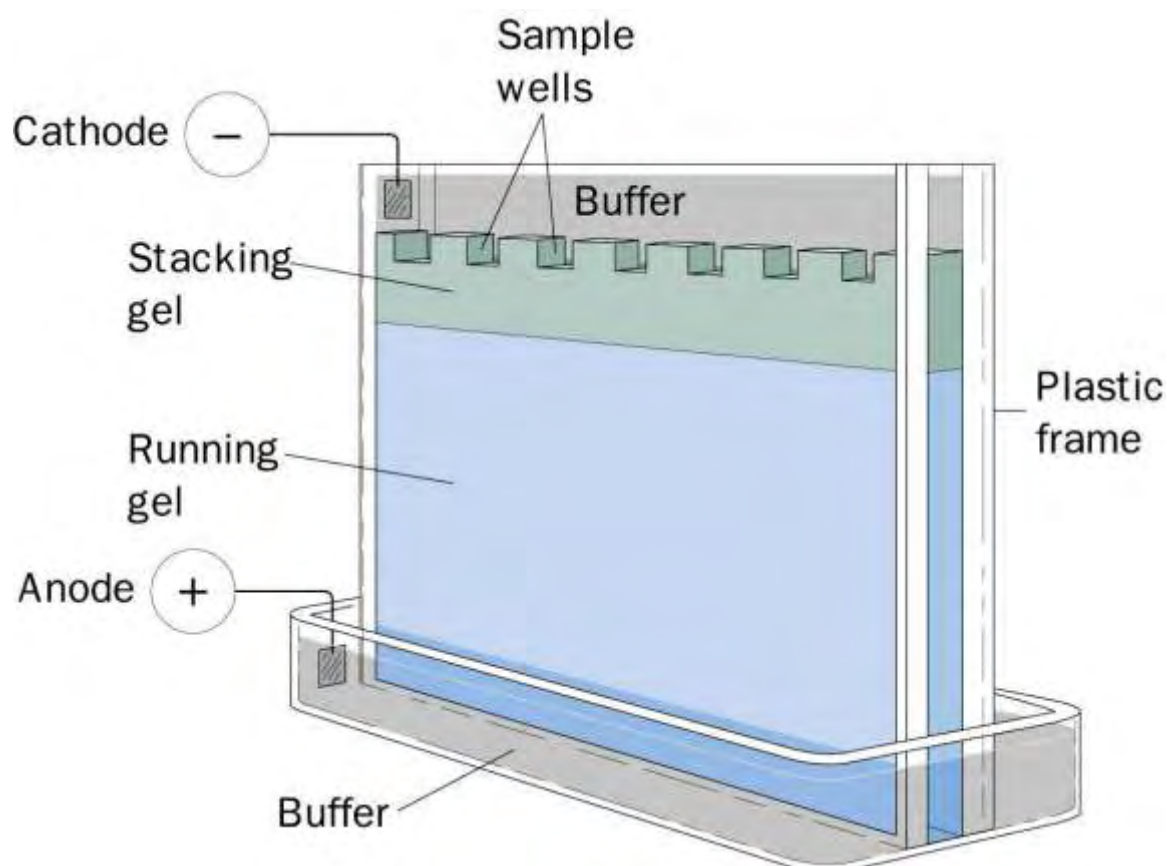
#### *Διαλύματα*

- Διάλυμα Α  
10 ml αιθανόλη 100%  
0,5 ml οξικό οξύ 99%  
Έως τα 400 ml ddH<sub>2</sub>O
- Διάλυμα Β (νιτρικού αργύρου)  
200 ml ddH<sub>2</sub>O  
0,2 gr AgNO<sub>3</sub>
- Διάλυμα Γ  
3 gr NaOH

0,01 gr NaBH<sub>4</sub>

1 ml φορμαλδεύδη

Έως τα 200 ml ddH<sub>2</sub>O



Εικόνα 2: Η ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμίδης

### Διαδικασία silver staining

- Οι πηκτές επωάζονται δύο φορές με το διάλυμα Α για τρία λεπτά ενώ αναδεύονται την ίδια στιγμή. Ακολουθεί πλύση με απεσταγμένο νερό για ένα λεπτό.
- Γίνεται επώαση με το διάλυμα Β και ταυτόχρονη ανάδευση για δεκαπέντε λεπτά ενώ ακολουθεί πλύση με απεσταγμένο νερό για ένα επίσης λεπτό,
- Τέλος γίνεται επώαση με το διάλυμα Γ μέχρι την εμφάνιση των ζωνών στην πηκτή (περίπου είκοσι λεπτά).
- Η πηκτή παρατηρείται και γίνεται καταγραφή αποτελεσμάτων.

## **2.7 Στατιστική επεξεργασία των μοριακών δεδομένων - Ανάλυση και συνδυασμένη στατιστική επεξεργασία μοριακών και επιδημιολογικών δεδομένων**

Για τη σύγκριση των αλληλουχιών μεταξύ τους, αλλά και με τις ήδη υπάρχουσες στις βάσεις δεδομένων χρησιμοποιήθηκε το προγράμματα ClustalW και BLAST. Οι αλληλομορφικές συχνότητες, οι εκτιμήσεις κατά NEI (1978) της αναμενόμενης (He) και παρατηρούμενης (Ho) ετεροζυγωτίας και ο μέσος αριθμός των αλληλομόρφων ανά τόπο πραγματοποιήθηκε με το στατιστικό πακέτο BIOSYS-1. Το στατιστικό πακέτο GENEPOP version 3.2, χρησιμοποιήθηκε για τον έλεγχο των αποκλίσεων των γενοτυπικών συχνοτήτων από τις αναμενόμενες κατά Hardy-Weinberg καθώς και για τον έλεγχο της ανισορροπίας σύνδεσης.

Για να εξεταστεί η συσχέτιση του κάθε αλληλομόρφου με τα αποτελέσματα των μολύνσεων από τον WNV, ελέγχθηκε η συχνότητα των αλληλομόρφων στις δύο ομάδες ατόμων. Η κατανομή των συχνοτήτων συγκρίθηκε ανά δύο με τον έλεγχο  $\chi^2$  κατά Fisher με τη χρήση της διαδικασίας FREQ (SAS/STAT 9.1.3) και τα διαστήματα εμπιστοσύνης (CIs) για άτομα με ειδικό αλληλομορφικό φαινότυπο ή αλληλομορφικές συχνότητες υπολογίστηκαν με τη μέθοδο Woolf (1955). Όλες οι πιθανότητες διορθώθηκαν για σύγκριση πολλαπλών δειγμάτων.



### 3. Αποτελέσματα – Συζήτηση

### 3.1 Το εξώνιο 2 του γονιδίου DPA1

Τα πέντε αλληλόμορφα που ανιχνεύτηκαν για το εξώνιο 2 του γονιδίου DPA1 (Εικόνα 3) δεν έχουν αναφερθεί στην παγκόσμια βιβλιογραφία και εμφανίζονται για πρώτη φορά στον ελληνικό πληθυσμό. Το αλληλόμορφο DPA1\_1 βρέθηκε σε υψηλές συχνότητες και στις δύο πληθυσμιακές ομάδες, ενώ οι συχνότητες των υπολοίπων τεσσάρων αλληλομόρφων κυμάνθηκαν από 0,00 έως 0,013 (Πίνακας 1, Εικόνα 4). Τα ποσοστά ετεροζυγωτίας ήταν ίδια ανάμεσα στις δύο ομάδες (Πίνακας 1).

Σημαντικές διαφορές ανάμεσα στις συχνότητες των αλληλομόρφων μεταξύ των δύο ομάδων εμφάνισαν τα αλληλόμορφα DPA1\_2, DPA1\_3, DPA1\_4, ενώ το αλληλόμορφο DPA1\_5 δεν ανιχνεύτηκε στην ομάδα ελέγχου.

	10	20	30	40	50	60
DPA1_1	GACCACTTGC	ATATTCAAAC	TGACATTTTG	TCCTGTTTTT	CTCTACTGTC	TTTATGCAGC
DPA1_2	GACCACTTGC	ATATTCAAAC	TGACATTTTG	TCATGTTTTT	CTCTACTTTC	TTTATGCAGC
DPA1_3	GACCACTTGC	ATATTCAAAC	TGACATTTTG	TCATGTTTTT	CTCTACTTTC	TTTATGCAGC
DPA1_4	GACCACTTGC	ATATTCAAAC	TGACATTTTG	TCATGTTTTT	CTCTACTTTC	TTTATGCAGC
DPA1_5	GACCACTTGC	ATATTCAAAC	TGACATTTTG	TCCTGTTTTT	CTCTACTGTC	TTTATGCAGC
	70	80	90	100	110	120
DPA1_1	GGACCATGTG	TCAACTTATG	CCGCGTTTGT	ACAGACGCAT	AGACCAACAG	GGGAGTTTAT
DPA1_2	GGACCATGTG	TCAACTTATG	CCGCGTTTGT	ACAGACCCAT	AGACCAACAG	GGGAGTTTAT
DPA1_3	GGACCATGTG	TCAACTTATG	CCATGTTTGT	ACAGACCCAT	AGACCAACAG	GAGAGTTTAT
DPA1_4	GGACCATGTG	TCAACTTATG	CCGCGTTTGT	ACAGACGCAT	AGACCAACAG	GGGAGTTTAT
DPA1_5	GGACCATGTG	TCAACTTATG	CCGCGTTTGT	ACAGACGCAT	AGACCAACAG	GGGAGTTTAT
	130	140	150	160	170	180
DPA1_1	GTTTGAATTT	GATGAAGATG	AGATGTTCTA	TGTGGATCTG	GACAAGAAGG	AGACCGTCTG
DPA1_2	GTTTGAATTT	GATGAAGATG	AGCAGTTCTA	TGTGGATCTG	GATAAAGAAGG	AGACCGTCTG
DPA1_3	GTTTGAATTT	GATGAAGATG	AGCAGTTCTA	TGTGGATCTG	GATAAAGAAGG	AGACCGTCTG
DPA1_4	GTTTGAATTT	GATGAAGATG	AGCAGTTCTA	TGTGGATCTG	GATAAAGAAGG	AGACCGTCTG
DPA1_5	GTTTGAATTT	GATGAAGATG	AGATGTTCTA	TGTGGATCTG	GACAAGAAGG	AGACCGTCTG
	190	200	210	220	230	240
DPA1_1	GCATCTGGAG	GAGTTTGGCC	AAGCCTTTTC	CTTTGAGGCT	CAGGGCGGGC	TGGCTAACAT
DPA1_2	GCATCTGGAG	GAGTTTGGCC	GAGCCTTTTC	CTTTGAGGCT	CAGGGCGGGC	TGGCTAACAT
DPA1_3	GCATCTGGAG	GAGTTTGGCC	GAGCCTTTTC	CTTTGAGGCT	CAGGGCGGGC	TGGCTAACAT
DPA1_4	GCATCTGGAG	GAGTTTGGCC	GAGCCTTTTC	CTTTGAGGCT	CAGGGCGGGC	TGGCTAACAT
DPA1_5	GCATCTGGAG	GAGTTTGGCC	AAGCCTTTTC	CTTTGAGGCT	CAGGGCGGGC	TGGCTAACAT
	250	260	270	280	290	300
DPA1_1	TGCTATATTT	AACAACAAC	TGAATACCTT	GATCCAGCGT	TCCAACCACA	CTCAGGCCAC
DPA1_2	TGCTATATTT	AACAACAAC	TGAATACCTT	GATCCAGCGT	TCCAACCACA	CTCAGGCCGC
DPA1_3	TGCTATATTT	AACAACAAC	TGAATACCTT	GATCCAGCGT	TCCAACCACA	CTCAGGCCGC
DPA1_4	TGCTATATTT	AACAACAAC	TGAATACCTT	GATCCAGCGT	TCCAACCACA	CTCAGGCCGC

DPA1\_5 TGCTATATTG AACAACAAC TGAATACCTT GATCCAGCGT TCCAACCACA CTCAGGCCGC

310 320 330

DPA1\_1 CAACGGTACG GCCTATCTTT GCCTCTTCCT CTGTA

DPA1\_2 CAATGGTACT GCCTATCTTT GCCTCTTCCT CTGTA

DPA1\_3 CAATGGTACT GCCTATCTTT GCCTCTTCCT CTGTA

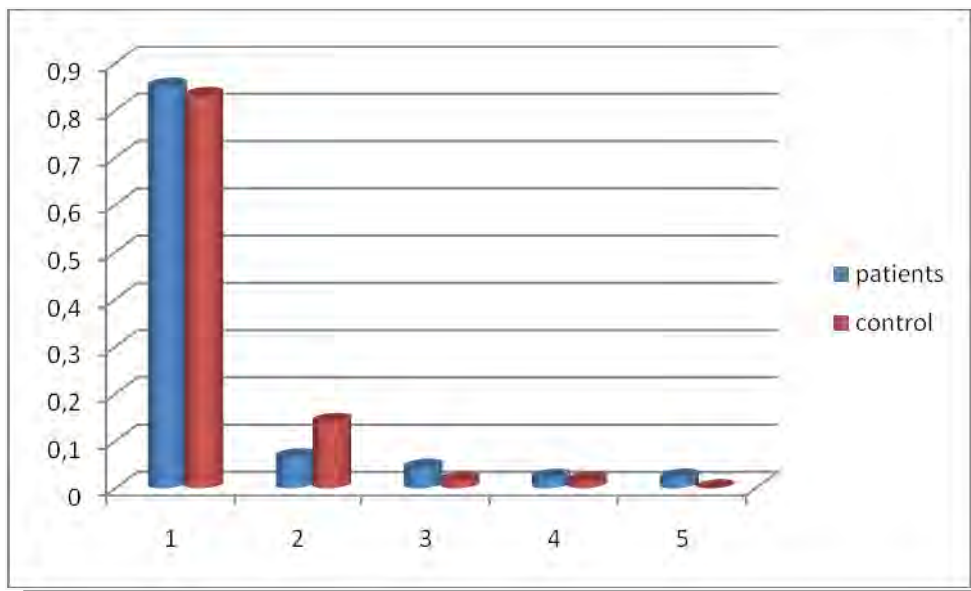
DPA1\_4 CAATGGTACT GCCTATCTTT GCCTCTTCCT CTGTA

DPA1\_5 CAATGGTACT GCCTATCTTT GCCTCTTCCT CTGTA

**Εικόνα 3.** Αλληλουχίες και στοίχιση των πέντε αλληλομόρφων του DPA1

**Πίνακας 1.** Αριθμοί και συχνότητες, σε παρένθεση, των πέντε αλληλομόρφων του DPA1 και τα παρατηρούμενα ποσοστά ετεροζυγωτίας στις δύο πληθυσμιακές ομάδες

Αλληλόμορφα	Ασθενείς (n=23)	Control (n=34)
DPA1_1	39 (0,85)	53 (0,78)
DPA1_2	3 (0,065)	9 (0,13)
DPA1_3	2 (0,043)	1 (0,014)
DPA1_4	1 (0,022)	1 (0,014)
DPA1_5	1 (0,022)	0
<b>Ετεροζυγωτία (Ho)</b>	<b>30%</b>	<b>30,1%</b>



**Εικόνα 4.** Ιστογράμματα της κατανομής των συχνοτήτων των πέντε αλληλομόρφων του DPA1 στις δύο πληθυσμιακές ομάδες

### 3.2 Το εξώνιο 2 του γονιδίου DQA1

Τα έξι αλληλόμορφα που ανιχνεύτηκαν για το εξώνιο 2 του γονιδίου DQA1 (Εικόνα 5) έχουν αναφερθεί στην παγκόσμια βιβλιογραφία να εμφανίζονται και σε άλλες ομάδες πληθυσμών εκτός του ελληνικού. Οι συχνότητες των αλληλομόρφων κυμάνθηκαν από 0,00 έως 0,39 (Πίνακας 2, Εικόνα 6). Τα ποσοστά ετεροζυγωτίας εμφανίστηκαν σημαντικά αυξημένα στην ομάδα ελέγχου σε σχέση με την ομάδα των ασθενών (Πίνακας 2). Και τα έξι αλληλόμορφα εμφάνισαν στατιστικώς σημαντικές διαφορές ανάμεσα στις δύο ομάδες. Το αλληλόμορφο DQA1\_5 απουσίαζε από την ομάδα ελέγχου, ενώ το αλληλόμορφο DQA1\_6 απουσίαζε από την ομάδα των ασθενών (Πίνακας 2).

	10	20	30	40	50	60
DQA1_1	TACGCCTTCC	TGCTTGTCAT	CTTCACTCAT	CAGCTGACCA	CGTTGCCTCT	TGTGGTGTAA
DQA1_2	TACGCCTTCC	TGCTTGTCAT	CTTCACTCAT	CAGCTGACCA	CGTTGCCTCT	TGTGGTGTAA
DQA1_3	TACGCCTTCC	TGCTTGTCAT	CTTCACTCAT	CAGCTGACCA	TGTTGCCTCT	TGTGGTGTAA
DQA1_4	TACGCCTTCC	TGCTTGTCAT	CTTCACTCAT	CAGCTGACCA	TGTTGCCTCT	TACGGTGTAA
DQA1_5	TACGCCTTCC	TGCTTGTCAT	CTTCACTCAT	CAGCTGACCA	CGTTGCCTCT	TACGGTGTAA
DQA1_6	TACGCCTTCC	TGCTTGTCAT	CTTCACTCAT	CAGCTGACCA	CGTTGCCTCT	TGTGGTGTAA

	70	80	90	100	110	120
DQA1_1	ACTTGATACCA	GTTTTACGGT	CCCTCTGGCC	AGTACACCCA	TGAATTTGAT	GGAGATGAGC
DQA1_2	ACTTGATACCA	GTTTTACGGT	CCCTCTGGCC	AGTACACCCA	TGAATTTGAT	GGAGATGAGG
DQA1_3	ACTTGATACCA	GTTTTACGGT	CCCTCTGGCC	AGTACACCCA	TGAATTTGAT	GGAGATGAGC
DQA1_4	ACTTGATACCA	GTTTACGGT	CCCTCTGGCC	AGTACACCCA	TGAATTTGAT	GGAGATGAGG
DQA1_5	ACTTGATACCA	GTTTACGGT	CCCTCTGGCC	AGTACACCCA	TGAATTTGAT	GGAGATGAGG
DQA1_6	ACTTGATACCA	GTTTTACGGT	CCCTCTGGCC	AGTACACCCA	TGAATTTGAT	GGAGATGAGG

	130	140	150	160	170	180
DQA1_1	AGTTCTACGT	GGACCTGGAG	AGGAAGGAGA	CTGCCCTGGC	GTGGCCTGAG	TTCAGCAAAT
DQA1_2	AGTTCTACGT	GGACCTGGAG	AGGAAGGAGA	CTGCCCTGGC	GTGGCCTGAG	TTCAGCAAAT
DQA1_3	AGTTCTACGT	GGACCTGGAG	AGGAAGGAGA	CTGCCCTGGC	GTGGCCTGAG	TTCAGCAAAT
DQA1_4	AGTTCTACGT	GGACCTGGAG	AGGAAGGAGA	CTGCCCTGGC	GTGGCCTGAG	TTCAGCAAAT
DQA1_5	AGTTCTACGT	GGACCTGGAG	AGGAAGGAGA	CTGCCCTGGC	GTGGCCTGAG	TTCAGCAAAT
DQA1_6	AGTTCTACGT	GGACCTGGAG	AGGAAGGAGA	CTGCCCTGGC	GTGGCCTGAG	TTCAGCAAAT

	190	200	210	220	230	240
DQA1_1	TTGGAGGTTT	TGACCCGCAG	GGTGCACTGA	GAAACATGGC	TGTGGCAAAA	CACAACCTGA
DQA1_2	TTGGAGGTTT	TGACCCGCAG	GGTGCACTGA	GAAACATGGC	TGTGGCAAAA	CACAACCTGA
DQA1_3	TTGGAGGTTT	TGACCCGCAG	GGTGCACTGA	GAAACATGGC	TGTGGCAAAA	CACAACCTGA
DQA1_4	TTAGAAAGATT	TGACCCGCAG	GGTGCACTGA	GAAACATGGC	TGTGGCAAAA	CACAACCTGA
DQA1_5	TTA---GATT	TGACCCGCAG	GGTGCACTGA	GAAACATGGC	TGTGGCAAAA	CACAACCTGA
DQA1_6	TTGGAGGTTT	TGACCCGCAG	GGTGCACTGA	GAAACATGGC	TGTGGCAAAA	CACAACCTGA

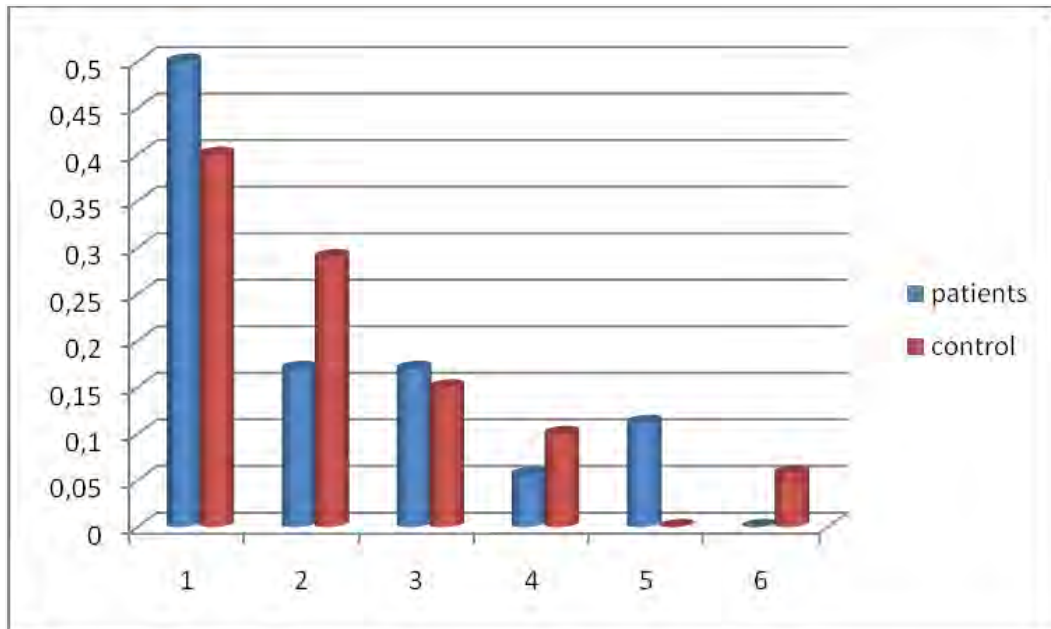
	250	260	270	280	290
DQA1_1	ACATCATGAT	TAAACGCTAC	AACTCTACCG	CTGCTACCAA	TGGTATGCGT
DQA1_2	ACATCATGAT	TAAACGCTAC	AACTCTACCG	CTGCTACCAA	TGGTATGCGT

DQA1\_3 ACATCATGAT TAAACGCTAC AACTCTACCG CTGCTACCAA TGGTATGCGT CC  
DQA1\_4 ACATCCTGAT TAAACGCTCC AACTCTACCG CTGCTACCAA TGGTATGCGT CC  
DQA1\_5 ACATCCTGAT TAAACGCTCC AACTCTACCG CTGCTACCAA TGGTATGCGT CC  
DQA1\_6 ACATCATGAT TAAACGCTAC AACTCTACCG CTGCTACCAA TGGTATGCGT CC

**Εικόνα 5.** Αλληλουχίες και στοίχιση των έξι αλληλομόρφων του DQA1

**Πίνακας 2.** Αριθμοί και συχνότητες, σε παρένθεση, των έξι αλληλομόρφων του DQA1 και τα παρατηρούμενα ποσοστά ετεροζυγωτίας στις δύο πληθυσμιακές ομάδες

Αλληλόμορφα	Ασθενείς (n=23)	Control (n=34)
DQA1_1	18 (0,39)	21 (0,31)
DQA1_2	6 (0,13)	15 (0,23)
DQA1_3	6 (0,13)	6 (0,09)
DQA1_4	2 (0,04)	5 (0,73)
DQA1_5	4 (0,08)	0
DQA1_6	0	2 (0,03)
<b>Ετεροζυγωτία (Ho)</b>	<b>11,1%</b>	<b>19,2%</b>



**Εικόνα 6.** Ιστογράμματα της κατανομής των συχνοτήτων των έξι αλληλομόρφων του DQA1 στις δύο πληθυσμιακές ομάδες

### 3.3 Το εξώνιο 2 του γονιδίου DRB1

Από τα 16 αλληλόμορφα που ανιχνεύτηκαν για το εξώνιο 2 του γονιδίου DRB1 (Εικόνα 7), τέσσερα (DRB1\_1, DRB1\_3, DRB1\_14, DRB1\_16) δεν έχουν αναφερθεί στην παγκόσμια βιβλιογραφία και εμφανίζονται για πρώτη φορά στον ελληνικό πληθυσμό, ενώ τα υπόλοιπα 12 έχουν αναφερθεί να εμφανίζονται και σε άλλες ομάδες πληθυσμών εκτός του ελληνικού. Οι συχνότητες των αλληλομόρφων κυμάνθηκαν από 0,00 έως 0,25 (Πίνακας 3, Εικόνα 8). Τα ποσοστά ετεροζυγωτίας εμφανίστηκαν μειωμένα στην ομάδα ελέγχου σε σχέση με την ομάδα των ασθενών (Πίνακας 3). Πέντε αλληλόμορφα (DRB1\_2, DRB1\_3, DRB1\_6, DRB1\_9, DRB1\_11) εμφάνισαν στατιστικώς σημαντικές διαφορές ανάμεσα στις δύο ομάδες. Τα αλληλόμορφα DQA1\_1, DQA1\_8, DQA1\_16 απουσίαζαν από την ομάδα των ασθενών, ενώ τα αλληλόμορφα DQA1\_4, DQA1\_12, DQA1\_14, DQA1\_15 απουσίαζαν από την ομάδα ελέγχου (Πίνακας 3).

	10	20	30	40	50	60
DRB1_1	CGCCC-TGTG	ACCGGATGGT	TCGTGTCCCC	ACAGCACGTT	TCCTGTGGCA	GCCTAAGAGG
DRB1_2	CGCCC-TGTG	ACCGGATGGT	TCGTGTCCCC	ACAGCACGTT	TCCTGTGGCA	GCCTAAGAGG
DRB1_3	CGCCC-TGTG	ACCGGATGGT	TCGTGTCCCC	ACAGCACGTT	TCCTGTGGCA	GCCTAAGAGG
DRB1_4	CGCCC-TGTG	ACCGGATGGT	TCGTGTCCCC	ACAGCACGTT	TCCTGTGGCA	GCCTAAGAGG
DRB1_5	CGCCC-TGTG	ACCGGATGGT	TCGTGTCCCC	ACAGCACGTT	TCCTGTGGCA	GCCTAAGAGG
DRB1_6	CGCCTGTGTG	ACTGGATCGT	TCGTGTCCCC	ACAGCACGTT	TCTTGGAGTA	CTCTACGTCT
DRB1_7	CGCCTGTGTG	ACTGGATCGT	TCGTGTCCCC	ACAGCACGTT	TCTTGGAGTA	CTCTACGTCT
DRB1_8	CGCCTGTGTG	ACTGGATCGT	TCGTGTCCCC	ACAGCACGTT	TCTTGGAGTA	CTCTACGTCT
DRB1_9	CGCCTGTGTG	ACTGGATCGT	TCGTGTCCCC	ACAGCACGTT	TCTTGGAGTA	CTCTACGTCT
DRB1_10	CGCCTGTGTG	ACTGGATCGT	TCGTGTCCCC	ACAGCACGTT	TCTTGGAGTA	CTCTACGTCT
DRB1_11	CGCCTGTGTG	ACTGGATCGT	TCGTGTCCCC	ACAGCACGTT	TCTTGGAGTA	CTCTACGTCT
DRB1_12	CGCCTGTGTG	ACTGGATCGT	TCGTGTCCCC	ACAGCACGTT	TCTTGGAGTA	CTCTACGGGT
DRB1_13	CGCCTGTGTG	ACTGGATCGT	TCGTGTCCCC	ACAGCACGTT	TCTTGGAGTA	CTCTACGTCT
DRB1_14	CGCCTGTGTG	ACTGGATCGT	TCGTGTCCCC	ACAGCACGTT	TCTTGGAGTA	CTCTACGTCT
DRB1_15	CGCCTGTGTG	ACTGGATCGT	TCGTGTCCCC	ACAGCACGTT	TCTTGGAGTA	CTCTACGGGT
DRB1_16	CGCCTGTGTG	ACTGGATCGT	TCGTGTCCCC	ACAGCACGTT	TCTTGGAGTA	CTCTACGGGT

	70	80	90	100	110	120
DRB1_1	GAGTGTCAATT	TCTTCAATGG	GACGGAGCGG	GTGCGGTTCC	TGGACAGATA	CTTCTATAAC
DRB1_2	GAGTGTCAATT	TCTTCAATGG	GACGGAGCGG	GTGCGGTTCC	TGGACAGATA	CTTCTATAAC
DRB1_3	GAGTGTCAATT	TCTTCAATGG	GACGGAGCGG	GTGCGGTTCC	TGGACAGATA	CTTCTATAAC
DRB1_4	GAGTGTCAATT	TCTTCAATGG	GACGGAGCGG	GTGCGGTTCC	TGGACAGATA	CTTCTATAAC
DRB1_5	GAGTGTCAATT	TCTTCAATGG	GACGGAGCGG	GTGCGGTTCC	TGGACAGATA	CTTCTATAAC
DRB1_6	GAGTGTCAATT	TCTTCAATGG	GACGGAGCGG	GTGCGGTTCC	TGGACAGATA	CTTCTATAAC
DRB1_7	GAGTGTCAATT	TCTTCAATGG	GACGGAGCGG	GTGCGGTTCC	TGGACAGATA	CTTCTATAAC
DRB1_8	GAGTGTCAATT	TCTTCAATGG	GACGGAGCGG	GTGCGGTTCC	TGGACAGATA	CTTCTATAAC
DRB1_9	GAGTGTCAATT	TCTTCAATGG	GACGGAGCGG	GTGCGGTTCC	TGGACAGATA	CTTCTATAAC
DRB1_10	GAGTGTCAATT	TCTTCAATGG	GACGGAGCGG	GTGCGGTTCC	TGGACAGATA	CTTCTATAAC

DRB1_11	GAGTGT <b>C</b> ATT	TCTTCAATGG	GACGGAGCGG	GTGCGGTTCC	TGGACAGATA	CTT <b>C</b> CATAAC
DRB1_12	GAGTGT <b>T</b> ATT	TCTTCAATGG	GACGGAGCGG	GTGCGGTTCC	TGGACAGATA	CTTCTATAAC
DRB1_13	GAGTGT <b>C</b> ATT	TCTTCAATGG	GACGGAGCGG	GTGCGG <b>T</b> ACC	TGGACAGATA	CTT <b>C</b> CATAAC
DRB1_14	GAGTGT <b>C</b> ATT	TCTTCAATGG	GACGGAGCGG	GTGCGGTTCC	TGGACAGATA	CTTCTATAAC
DRB1_15	GAGTGT <b>T</b> ATT	TCTTCAATGG	GACGGAGCGG	GTGCGGTTCC	TGGACAGATA	CTTCTATAAC
DRB1_16	GAGTGT <b>T</b> ATT	TCTTCAATGG	GACGGAGCGG	GTGCGGTTCC	TGGAGAG <b>A</b> CA	CTT <b>C</b> CATAAC

	130	140	150	160	170	180
	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....
DRB1_1	CAGGAGGAGT	CCGTGCGCTT	CGACAGCGAC	GTGGGGGAGT	ACCGGGCGGT	GACGGAGCTG
DRB1_2	CAGGAGGAGT	CCGTGCGCTT	CGACAGCGAC	GTGGGGGAGT	TCCGGGCGGT	GACGGAGCTG
DRB1_3	CAGGAGGAGT	CCGTGCGCTT	CGACAGCGAC	GTGGGGGAGT	ACCGGGCGGT	GACGGAGCTG
DRB1_4	CAGGAGGAGT	CCGTGCGCTT	CGACAGCGAC	GTGGGGGAGT	ACCGGGCGGT	GACGGAGCTG
DRB1_5	CAGGAGGAGT	CCGTGCGCTT	CGACAGCGAC	GTGGGGGAGT	TCCGGGCGGT	GACGGAGCTG
DRB1_6	CA <b>A</b> AGGAGT	ACGTGCGCTT	CGACAGCGAC	GTGGGGGAGT	TCCGGGCGGT	GACGGAGCTG
DRB1_7	CA <b>A</b> AGGAGT	ACGTGCGCTT	CGACAGCGAC	GTGGGGGAGT	TCCGGGCGGT	GACGGAGCTG
DRB1_8	CAGGAGGAGT	T <b>C</b> GTGCGCTT	CGACAGCGAC	GTGGGGGAGT	ACCGGGCGGT	GACGGAGCTG
DRB1_9	CAGGAGGAG <b>A</b>	ACGTGCGCTT	CGACAGCGAC	GTGGGGGAGT	TCCGGGCGGT	GACGGAGCTG
DRB1_10	CAGGAGGAGT	T <b>C</b> GTGCGCTT	CGACAGCGAC	GTGGGGGAGT	ACCGGGCGGT	GACGGAGCTG
DRB1_11	CAGGAGGAG <b>A</b>	ACGTGCGCTT	CGACAGCGAC	GTGGGGGAGT	TCCGGGCGGT	GACGGAGCTG
DRB1_12	CA <b>A</b> AGGAGT	ACGTGCGCTT	CGACAGCGAC	GTGGGGGAGT	ACCGGGCGGT	GACGGAGCTG
DRB1_13	CAGGAGGAG <b>A</b>	ACGTGCGCTT	CGACAGCGAC	GTGGGGGAGT	TCCGGGCGGT	GACGGAGCTG
DRB1_14	CA <b>A</b> AGGAGT	ACGTGCGCTT	CGACAGCGAC	GTGGGGGAGT	ACCGGGCGGT	GACGGAGCTG
DRB1_15	CA <b>A</b> AGGAGT	ACGTGCGCTT	CGACAGCGAC	GTGGGGGAGT	ACCGGGCGGT	GACGGAGCTG
DRB1_16	CAGGAGGAGT	T <b>C</b> GTGCGCTT	CGACAGCGAC	GTGGGGGAGT	TCCGGGCGGT	GACGGAGCTG

	190	200	210	220	230	240
	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....
DRB1_1	GGGCGGCCTG	ACGCTGAGTA	CTGGAACAGC	CAGAAGGACT	TCCTGGAAGA	CAGGCG <b>C</b> GCC
DRB1_2	GGGCGGCCTG	ACGCTGAGTA	CTGGAACAGC	CAGAAGGACA	TCCTGGA <b>G</b> CA	GG <b>C</b> CGGGGCC
DRB1_3	GGGCGGCCTG	ACGCTGAGTA	CTGGAACAGC	CAGAAGGACT	TCCTGGAAGA	CAGGCG <b>C</b> GCC
DRB1_4	GGGCGGCCTG	ACGCTGAGTA	CTGGAACAGC	CAGAAGGAC	TCCTGGAAGA	CAGGCG <b>C</b> GCC
DRB1_5	GGGCGGCCTG	ACGCTGAGTA	CTGGAACAGC	CAGAAGGACA	TCCTGGA <b>G</b> CA	GG <b>C</b> CGGGGCC
DRB1_6	GGGCGGCCTG	ATGAGGAGTA	CTGGAACAGC	CAGAAGGACT	TCCTGGAAGA	CAGGCGGGCC
DRB1_7	GGGCGGCCTG	ATGAGGAGTA	CTGGAACAGC	CAGAAGGACT	TCCTGGAAGA	CAGGCGGGCC
DRB1_8	GGGCGGCCTG	CTG <b>C</b> GGAG <b>C</b> A	CTGGAACAGC	CAGAAGGAC	TCCTGGA <b>G</b> CG	GAGGCGGGCC
DRB1_9	GGGCGGCCTG	ATG <b>C</b> CGAGTA	CTGGAACAGC	CAGAAGGACA	TCCTGGAAGA	<b>C</b> G <b>A</b> CGGGCC
DRB1_10	GGGCGGCCTG	CTG <b>C</b> GGAG <b>C</b> A	CTGGAACAGC	CAGAAGGACC	TCCTGGA <b>G</b> CG	GAGGCGGGCC
DRB1_11	GGGCGGCCTG	ATG <b>C</b> CGAGTA	CTGGAACAGC	CAGAAGGACA	TCCTGGAAGA	<b>C</b> G <b>A</b> CGGGCC
DRB1_12	GGGCGGCCTG	ATG <b>C</b> CGAGTA	CTGGAACAGC	CAGAAGGACT	TCCTGGAAGA	CAGGCGGGCC
DRB1_13	GGGCGGCCTG	ATG <b>C</b> CGAGTA	CTGGAACAGC	CAGAAGGAC	TCCTGGA <b>G</b> CA	G <b>A</b> AGCGGG <b>G</b> C
DRB1_14	GGGCGGC <b>T</b> A	G <b>C</b> G <b>C</b> CGAGTA	CTGGAACAGC	CAGAAGGACT	TCCTGGAAGA	CA <b>A</b> CGGGCC
DRB1_15	GGGCGGC <b>T</b> A	G <b>C</b> G <b>C</b> CGAGTA	CTGGAACAGC	CAGAAGGACT	TCCTGGAAGA	CAGGCGGGCC
DRB1_16	GGGCGGC <b>T</b> G	T <b>C</b> G <b>C</b> CGAG <b>T</b> C	CTGGAACAGC	CAGAAGGACA	TCCTGGAAGA	CAGGCG <b>C</b> GCC

	250	260	270	280	290	300
	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....
DRB1_1	GCGGTGGACA	CCTACTGCAG	ACACA <b>A</b> CTAC	GGGGTTGTGG	AGAGCTT <b>C</b> AC	AGTGCAGCGG
DRB1_2	GCGGTGGACA	CCTACTGCAG	ACACA <b>A</b> CTAC	GGGGTTGTGG	AGAGCTT <b>C</b> AC	AGTGCAGCGG
DRB1_3	GCGGTGGACA	CCTACTGCAG	ACACA <b>A</b> CTAC	GGGGTTG <b>G</b> TG	AGAGCTT <b>C</b> AC	AGTGCAGCGG
DRB1_4	GCGGTGGACA	CCTACTGCAG	ACACA <b>A</b> CTAC	GGGGTTG <b>G</b> TG	AGAGCTT <b>C</b> AC	AGTGCAGCGG
DRB1_5	GCGGTGGACA	CCTACTGCAG	ACACA <b>A</b> CTAC	GGGGTTG <b>G</b> TG	AGAGCTT <b>C</b> AC	AGTGCAGCGG
DRB1_6	GCGGTGGACA	CCTACTGCAG	ACACA <b>A</b> CTAC	GGGGTTG <b>G</b> TG	AGAGCTT <b>C</b> AC	AGTGCAGCGG
DRB1_7	GCGGTGGACA	CCTACTGCAG	ACACA <b>A</b> CTAC	GGGGTTGTGG	AGAGCTT <b>C</b> AC	AGTGCAGCGG
DRB1_8	G <b>A</b> GGTGGACA	CCTA <b>T</b> TGCAG	ACACA <b>A</b> CTAC	GGGGTTGTGG	AGAGCTT <b>C</b> AC	AGTGCAGCGG
DRB1_9	GCGGTGGACA	CCTACTGCAG	ACACA <b>A</b> CTAC	GGGGTTG <b>G</b> TG	AGAGCTT <b>C</b> AC	AGTGCAGCGG
DRB1_10	G <b>A</b> GGTGGACA	CCTA <b>T</b> TGCAG	ACACA <b>A</b> CTAC	GGGGTTGTGG	<b>A</b> AGCTT <b>C</b> AC	AGTGCAGCGG
DRB1_11	GCGGTGGACA	CCTACTGCAG	ACACA <b>A</b> CTAC	GGGGTTGTGG	AGAGCTT <b>C</b> AC	AGTGCAGCGG
DRB1_12	CTGGTGGACA	CCTACTGCAG	ACACA <b>A</b> CTAC	GGGGTTGTGG	AGAGCTT <b>C</b> AC	AGTGCAGCGG
DRB1_13	CGGGTGGACA	ACTACTGCAG	ACACA <b>A</b> CTAC	GGGGTTGTGG	AGAGCTT <b>C</b> AC	AGTGCAGCGG

```

DRB1_14 GCGGTGGACA CCTACTGCAG ACACAACCTAC GGGTTGTTG AGAGCTTCAC GGTGCAGCGG
DRB1_15 CTGGTGGACA CCTACTGCAG ACACAACCTAC GGGTTGTTG AGAGCTTCAC GGTGCAGCGG
DRB1_16 GCGGTGGACA CCTACTGCAG ACACAACCTAC GGGTTGTTG AGAGCTTCAC AGTGCAGCGG

```

```

          310          320          330
.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.
DRB1_1 CGAGGTGAGC GCGGCGCGGG GCGGGGCCTG AGTCCC
DRB1_2 CGAGGTGAGC ATGGC CGCGG GCGGGGCCTG AGTCCC
DRB1_3 CGAGGTGAGC ATGGT CGGGG GCGGGGCCTG GTCCCT
DRB1_4 CGAGGTGAGC ATGGT GGGGG GCGGGGCCTG GTCCCT
DRB1_5 CGAGGTGAGC ATGGC CGCGG GCGGGGCCTG AGTCCC
DRB1_6 CGAGGTGAGC GCGGCGCGGG GCGGGGCCTG AGTCCC
DRB1_7 CGAGGTGAGC GCGGCGCGGG GCGGGGCCTG AGTCCC
DRB1_8 CGAGGTGAGC GCGGCGCGGG GCGGGGCCTG AGTCCC
DRB1_9 CGAGGTGAGC GCGGCGCGGG GCGGGGCCTG AGTCCC
DRB1_10 CGAGGTGAGC GCGGCGCGGG GCGGGGCCTG AGTCCC
DRB1_11 CGAGGTGAGC GCGGCGCGGG GCGGGGCCTG AGTCCC
DRB1_12 CGAGGTGAGC GCGGCGCGGG GCGGGGCCTG AGTCCC
DRB1_13 CGAGGTGAGC GCGGCGCGGG GCGGGGCCTG AGTCCC
DRB1_14 CGAGGTGAGC GCGGCGCGGG GCGGGGCCTG AGTCCC
DRB1_15 CGAGGTGAGC GCGGCGCGGG GCGGGGCCTG AGTCCC
DRB1_16 CGAGGTGAGC GCGGCGCGGG GCGGGGCCTG AGTCCC

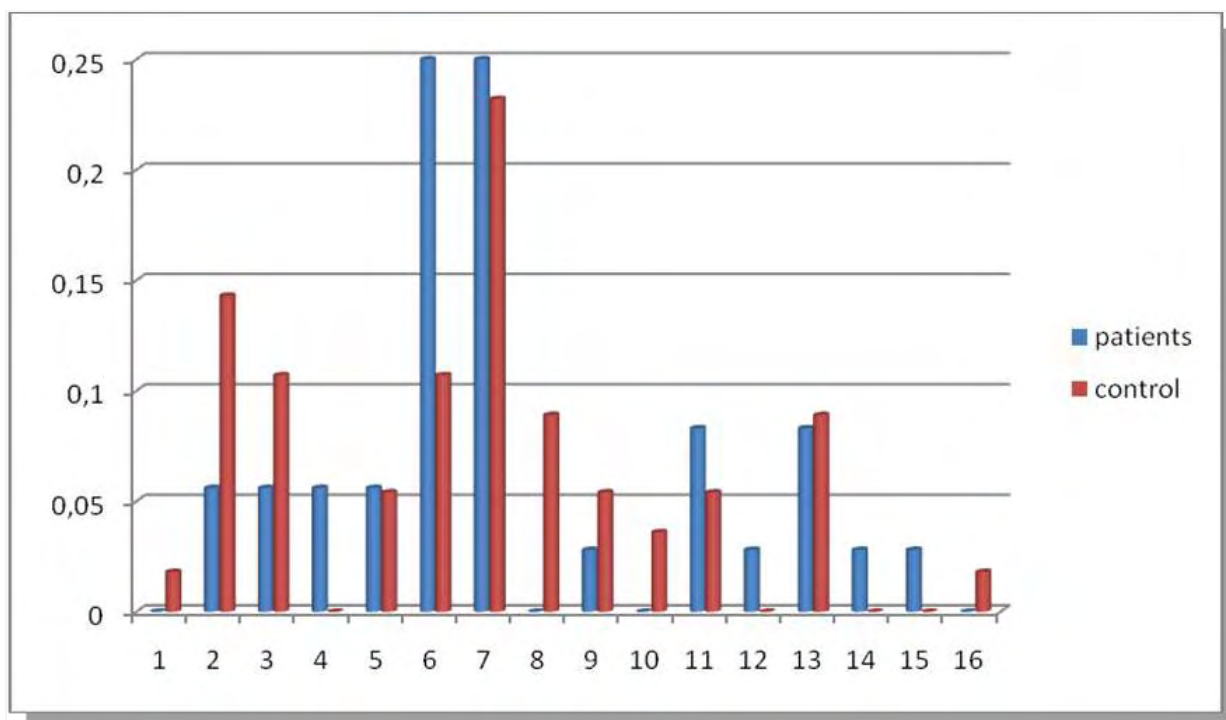
```

**Εικόνα 7.** Αλληλουχίες και στοίχιση των 16 αλληλομόρφων του DRB1

**Πίνακας 3.** Αριθμοί και συχνότητες, σε παρένθεση, των 16 αλληλομόρφων του DRB1 και τα παρατηρούμενα ποσοστά ετεροζυγωτίας στις δύο πληθυσμιακές ομάδες

Αλληλόμορφα	Ασθενείς (n=23)	Control (n=34)
DRB1_1	0	1 (0,018)
DRB1_2	2 (0,056)	8 (0,143)
DRB1_3	2 (0,056)	6 (0,107)
DRB1_4	2 (0,056)	0
DRB1_5	2 (0,056)	3 (0,054)
DRB1_6	9 (0,25)	6 (0,107)
DRB1_7	9 (0,25)	13 (0,232)
DRB1_8	0	5 (0,089)
DRB1_9	1 (0,028)	3 (0,054)
DRB1_10	0	2 (0,036)
DRB1_11	3 (0,083)	3 (0,054)
DRB1_12	1 (0,028)	0
DRB1_13	3 (0,083)	5 (0,089)
DRB1_14	1 (0,028)	0
DRB1_15	1 (0,028)	0
DRB1_16	0	1 (0,018)
<b>Ετεροζυγωτία (Ho)</b>	<b>38,9%</b>	<b>32,1%</b>

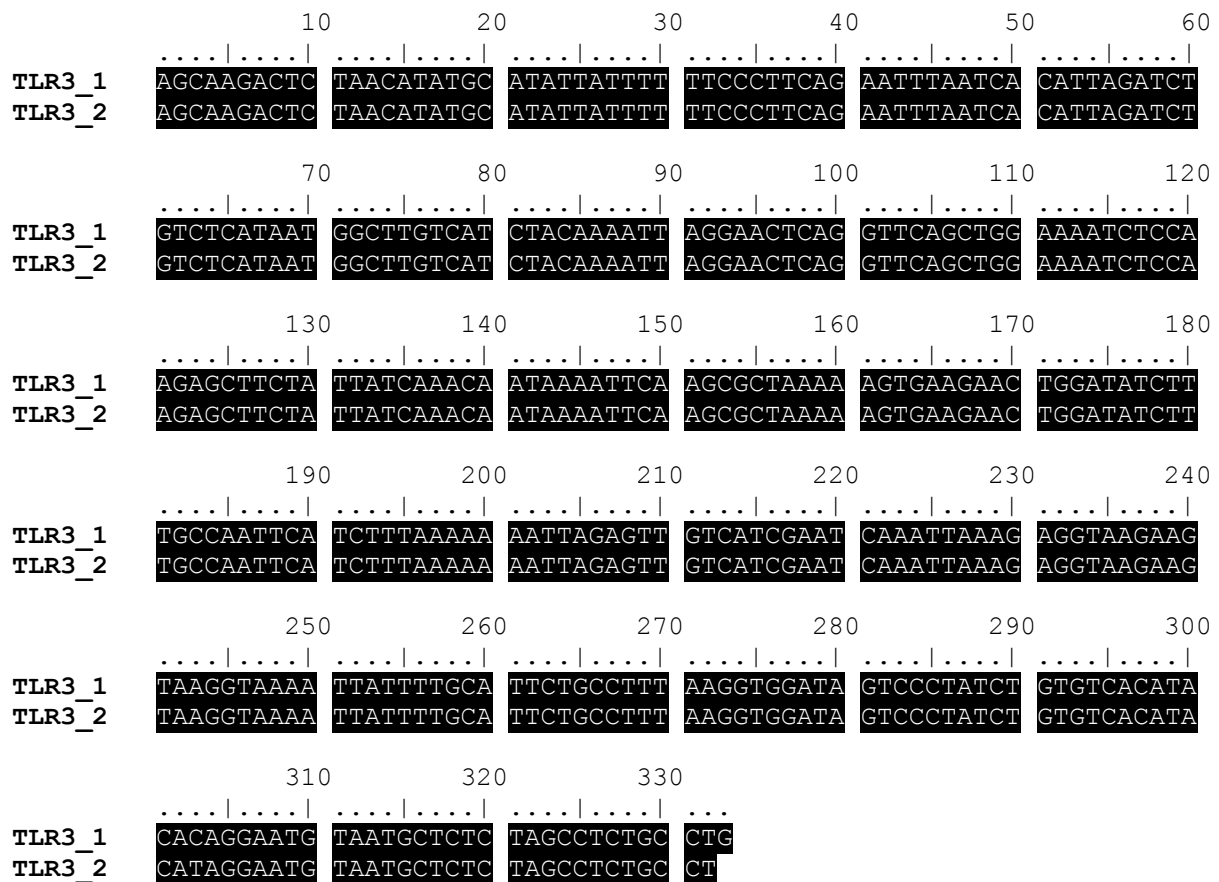




**Εικόνα 8.** Ιστογράμματα της κατανομής των συχνοτήτων των 16 αλληλομόρφων του DRB1 στις δύο πληθυσμιακές ομάδες

### 3.4 Το εξώνιο 2 του γονιδίου TLR3

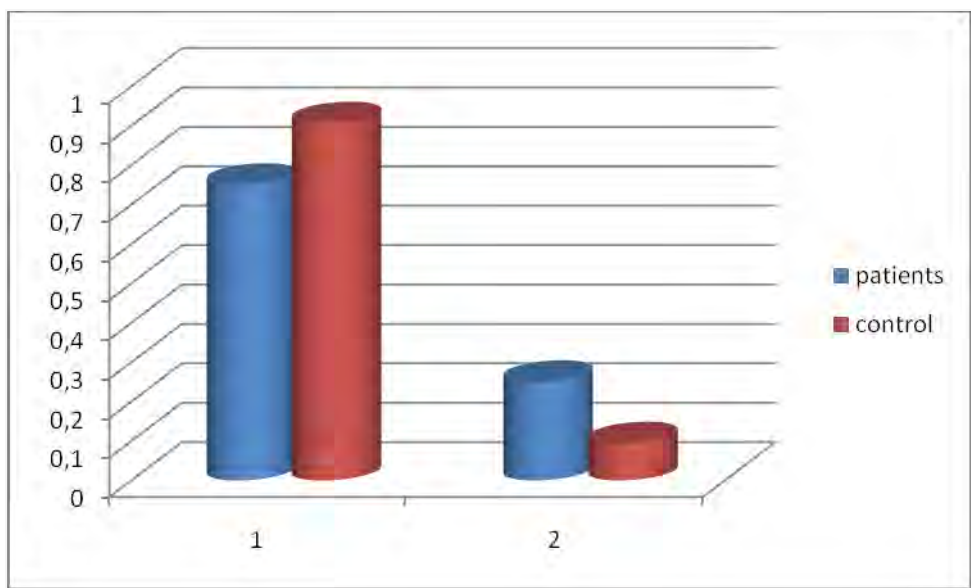
Κανένα από τα δύο αλληλόμορφα που ανιχνεύτηκαν για το εξώνιο 2 του γονιδίου TLR3 (Εικόνα 9) δεν έχουν αναφερθεί στην παγκόσμια βιβλιογραφία και εμφανίζονται για πρώτη φορά στον ελληνικό πληθυσμό. Οι συχνότητες των αλληλομόρφων κυμάνθηκαν από 0,094 έως 0,906 (Πίνακας 4, Εικόνα 10). Τα ποσοστά ετεροζυγωτίας εμφανίστηκαν σημαντικά μειωμένα στην ομάδα ελέγχου σε σχέση με την ομάδα των ασθενών (Πίνακας 4). Και τα δύο αλληλόμορφα εμφάνισαν στατιστικώς σημαντικές διαφορές ανάμεσα στις δύο ομάδες. (Πίνακας 4).



**Εικόνα 9.** Αλληλουχίες και στοίχιση των επτά αλληλομόρφων του TLR3

**Πίνακας 4.** Αριθμοί και συχνότητες, σε παρένθεση, των δύο αλληλομόρφων του TLR3 και τα παρατηρούμενα ποσοστά ετεροζυγωτίας στις δύο πληθυσμιακές ομάδες

Αλληλόμορφα	Ασθενείς (n=23)	Control (n=34)
1	17 (0,75)	31 (0,906)
2	6 (0,25)	3 (0,094)
<b>Ετεροζυγωτία (Ho)</b>	<b>39%</b>	<b>12,7%</b>



**Εικόνα 10.** Ιστογράμματα της κατανομής των συχνοτήτων των δύο αλληλομόρφων του TLR3 στις δύο πληθυσμιακές ομάδες

### 3.5 Συζήτηση – Σχόλια

Τρία είναι τα σημαντικότερα στοιχεία που αναδεικνύονται από την παρούσα μελέτη.

Το πρώτο αφορά στην ανεύρεση αλληλομόρφων τα οποία εντοπίζονται για πρώτη φορά παγκοσμίως στον Ελληνικό πληθυσμό σε τρία από τα τέσσερα γονίδια που μελετήθηκαν, αποτελώντας την πρώτη προσπάθεια καταγραφής και χαρτογράφησης των συστημάτων ιστοσυμβατότητας για την Ελλάδα.

Το δεύτερο αφορά στις ετεροζυγωτίες για τα συγκεκριμένα γονίδια. Αν και η θεωρία προβλέπει ότι αυξημένα ποσοστά ετεροζυγωτίας θα μπορούσαν να συμβάλουν θετικά στην ανθεκτικότητα των ατόμων, η ανάλυση δεν έδειξε ένα κοινό πρότυπο, εφόσον για το DPA1 το ποσοστό είναι παρόμοιο στα DRB1 και TLR3 η αύξηση της ετεροζυγωτίας εμφανίζεται στην ομάδα των ασθενών και τέλος για το DQA αυξημένη ετεροζυγωτία εμφανίζεται στην ομάδα ελέγχου.

Το πιο ενδιαφέρον όμως αποτέλεσμα της μελέτης ήταν οι στατιστικώς σημαντικές διαφορές στις συχνότητες ορισμένων αλληλομόρφων σε όλα τα γονίδια ανάμεσα στις δυο πληθυσμιακές ομάδες. Πολλές μελέτες έχουν αναφέρει συσχετίσεις μεταξύ πολυμορφισμών των HLA και των αποτελεσμάτων μολυσματικών ασθενειών (Louie et al. 1999, Kuhn et al. 2004, Neumann-Haefelin et al. 2006, Hrabec et al. 2007, Kamatani et al. 2009, van Manen et al. 2009), συμπεριλαμβανομένων των ασθενειών από φλαβοϊούς (LaFleur et al. 2002, Zivna et al. 2002, Stephens et al. 2002, Polizel et al. 2004, Sierra et al. 2007, Nguyen et al. 2008, Falcon-Lezama et al. 2009, Appanna et al. 2010). Ωστόσο, το αποτέλεσμα αυτό θα πρέπει να καταγραφεί με σοβαρές επιφυλάξεις δεδομένου ότι αν και

υποδηλώνει την ύπαρξη αλληλομόρφων που προσδίδουν ευαισθησία ή ανθεκτικότητα στο κάθε άτομο, το δείγμα που αναλύθηκε είναι μικρό. Η προσθήκη περισσότερων ατόμων και γονιδίων είναι απαραίτητη προκειμένου να διακριβωθεί η ύπαρξη συσχέτισης των αλληλομόρφων του ανοσοποιητικού με την ανθεκτικότητα ή όχι στον ιό του Δυτικού Νείλου.

#### 4. Βιβλιογραφία

Anninger WV, Lomeo MD, Dingle J, Epstein AD, Lubow M (2003). "West Nile virus-associated optic neuritis and chorioretinitis". *Am. J. Ophthalmol.* 136 (6): 1183–5. doi:10.1016/S0002-9394(03)00738-4. PMID 14644244.

Appanna R, Ponnampalavanar S, Lum Chai See L, Sekaran SD (2010) Susceptible and protective HLA class 1 alleles against dengue fever and dengue hemorrhagic fever patients in a Malaysian population. *PLoS One* 5. doi: 10.1371/journal.pone.0013029.

Asnis DS, Conetta R, Teixeira AA, Waldman G, Sampson BA (March 2000). "The West Nile Virus outbreak of 1999 in New York: the Flushing Hospital experience". *Clin. Infect. Dis.* 30 (3): 413–8. doi:10.1086/313737. PMID 10722421.

Axelsson-Robertson R, Ahmed RK, Weichold FF, Ehlers MM, Kock MM, et al.(2011) HLA-A\*3001 and A\*3002 show distinct peptide binding patterns of the Mycobacterium tuberculosis protein TB10.4: consequences for immune recognition. *Clin Vaccine Immunol* 18: 125–134.

Bade-Doeding C, Theodossis A, Gras S, Kjer-Nielsen L, Eiz-Vesper B, et al. (2010) The impact of human leucocyte antigen (HLA) micropolymorphism on ligand specificity within the HLA-B\*41 allotypic family. *Haematologica* 96:110–118.

Brown J.H., Jardetzky T. S., Gorga J. C., Stern L. J., Urban R. G., Strominger J. L. and Wiley D. C. (1993). Three-dimensional structure of the human class II histocompatibility antigen HLA-DR1. *Nature* 364: 33-39.

Browning M. and McMichael A. (eds.) (1996). HLA and MHC genes, molecules and function. Bios Scientific Publishers Ltd, Oxford.

Carrington M., Nelson G. W., Martin M. P., Kissner T., Vlahov D., Goedert J. J., Kaslow R., Buchbinder S., Hoots K., O'Brien St. (1999). HLA and HIV-1 Heterozygote Advantage and B\*35-Cw\*04 Disadvantage. *Science* 283:1748-1752.

Chuang TH, Ulevitch RJ (2000). "Cloning and characterization of a sub-family of human toll-like receptors: hTLR7, hTLR8 and hTLR9". *Eur. Cytokine Netw.* 11: 372–8.

Davis LE, DeBiasi R, Goade DE et al. (Sep 2006). "West Nile virus neuroinvasive disease". *Ann Neurol* 60 (3): 286–300. doi:10.1002/ana.20959. PMID 16983682.

Diamond MS, Mehlhop E, Oliphant T, Samuel MA (2009) The host immunologic response to West Nile encephalitis virus. *Front Biosci* 14:3024–3034.

Doherty P.C. and Zinkernagel R.M. (1975). Enhanced immunological surveillance in mice heterozygous at the H-2 gene complex. *Nature* 256(11):50-52.

Du X, Poltorak A, Wei Y, Beutler B (2000). "Three novel mammalian toll-like receptors: gene structure, expression, and evolution". *Eur. Cytokine Netw.* 11: 362–71.

Dutia B.M., McConnell I., Ballingall K.T., Keating P., Hopkins J. (1994). Evidence of the expression of two distinct MHC class II DRB like molecules in the sheep. *Animal Genetics* 25:235-241.

Elamin NE, Bade-Doeding C, Blasczyk R, Eiz-Vesper B (2010) Polymorphism between HLA-A\*0301 and A\*0302 located outside the pocket F alters the P $\Omega$  peptide motif. *Tissue Antigens* 76: 487–490.

Falcon-Lezama JA, Ramos C, Zuniga J, Juarez-Palma L, Rangel-Flores H, et al. (2009) HLA class I and II polymorphisms in Mexican Mestizo patients with dengue fever. *Acta Trop* 112: 193–197.

Flores Anticona EM, Zainah H, Ouellette DR, Johnson LE (2012). "Two case reports of neuroinvasive west nile virus infection in the critical care unit". *Case Rep Infect Dis* 2012: 839458. doi:10.1155/2012/839458. PMC 3433121. PMID 22966470.

Fox, M. (May 13, 2013). "2012 was deadliest year for West Nile in US, CDC says". *NBC News*. Retrieved May 13, 2013.

Gay NJ, Keith FJ (1991). "Drosophila Toll and IL-1 receptor". *Nature* 351: 355–6

Germain R.N. (1994). MHC-Dependent Antigen Processing and Peptide Presentation: Providing Ligands for T Lymphocyte Activation. *Cell* 76:287-299.

Gilbert S.C., Plebanski M., Gupta S., Morris J., Cox M., Aidoo M., Kwiatkowski D., Greenwood B. M., Whittle H. C., Hill A. V. S. (1998). Association of Malaria Parasite Population Structure, HLA, and Immunological Antagonism. *Science* 279:1173-1176.

Gomez-Gomez, L. Boller, T. et al (2000). "FLS2: an LRR receptor-like kinase involved in the perception of the bacterial elicitor flagellin in Arabidopsis". *Molecular Cell* 5: 1003–1011.

Gu X. and Nei M. (1999). Locus Specificity of Polymorphic Alleles and Evolution by a Birth-and-Death Process in Mammalian MHC Genes. *Mol. Biol. Evol.* 16(2):147-156.

Hambuch T.M., Lacey E.A. (2002). Enhanced selection for MHC diversity in social tuco-tucos. *Evolution* 56:841-845.

Hansson GK, Edfeldt K (2005). "Toll to be paid at the gateway to the vessel wall". *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 25: 1085–7.

Hayes EB, Komar N, Nasci RS, Montgomery SP, O'Leary DR, Campbell GL (2005). "Epidemiology and transmission dynamics of West Nile virus disease". *Emerging Infect. Dis.* 11 (8): 1167–73. doi:10.3201/eid1108.050289a. PMC 3320478. PMID 16102302.

Hill A. V. S., Allsopp C. E. M., Kwiatkowski D., Anstey N. M., Twumasi P., Rowe P. A., Bennett S., Brewster D., McMichael A. J., Greenwood B. M. (1991). Common West African HLA antigens are associated with protection from severe malaria. *Nature* 352:595-600.

Högstrand K., Böhme J. (1999). Gene conversion can create new MHC alleles. *Immunological Rev.* 167:305-317.

Hraber P, Kuiken C, Yusim K (2007) Evidence for human leukocyte antigen heterozygote advantage against hepatitis C virus infection. *Hepatology* 46: 1713–1721.

Huang J, Zarnitsyna VI, Liu B, Edwards LJ, Jiang N, et al. (2010) The kinetics of two-dimensional TCR and pMHC interactions determine T-cell responsiveness. *Nature* 464: 932–936.

Jordan W.C., Bruford W.M., (1998). New perspectives on mate choice and the MHC. *Heredity* 81:127-133.

Kamatani Y, Wattanapokayakit S, Ochi H, Kawaguchi T, Takahashi A, et al. (2009) A genome-wide association study identifies variants in the HLA-DP locus associated with chronic hepatitis B in Asians. *Nat Genet* 41: 591–595.

Kuhn L, Abrams EJ, Palumbo P, Bulterys M, Aga R, et al. (2004) Maternal versus paternal inheritance of HLA class I alleles among HIV-infected children: consequences for clinical disease progression. *Aids* 18: 1281–1289.

Kumar D, Drebot MA, Wong SJ, Lim G, Artsob H, et al. (2004) A seroprevalence study of west Nile virus infection in solid organ transplant recipients. *Am J Transplant* 4: 1883 1888.

LaFleur C, Granados J, Vargas-Alarcon G, Ruiz-Morales J, Villarreal-Garza C, et al. (2002) HLA-DR antigen frequencies in Mexican patients with dengue virus infection: HLA-DR4 as a possible genetic resistance factor for dengue hemorrhagic fever. *Hum Immunol* 63: 1039–1044.

Lanteri MC, O'Brien KM, Purtha WE, Cameron MJ, Lund JM, et al. (2009) Tregs control the development of symptomatic West Nile virus infection in humans and mice. *J Clin Invest* 119: 3266–3277.

Lee J, Sayed N, Hunter A, Au KF, Wong WH, Mocarski ES et al. (2012) Activation of innate immunity is required for efficient nuclear reprogramming. *Cell* 151: 547-58.

Lemaitre B, Nicolas E, Michaut L, Reichhart JM, Hoffmann JA (1996). "The dorsoventral regulatory gene cassette *spätzle/Toll/cactus* controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults". *Cell* 86: 973–83.

Le Sommer C, Barrows NJ, Bradrick SS, Pearson JL, Garcia-Blanco MA (2012). "G protein-coupled receptor kinase 2 promotes flaviviridae entry and replication". In Michael, Scott F. *PLoS Negl Trop Dis* 6 (9): e1820. doi:10.1371/journal.pntd.0001820.

Lewin H. A., Russel G. C., Glass E. J. (1999). Comparative organisation and function of the major histocompatibility complex of domesticated cattle. *Immunological Rev.* 167: 145-158.

Lichtman AKAaAH, ed. (2005) *Cellular and molecular Immunology*. 5th ed Elsevier Saunders. 564 p.

Louie L, Ng S, Hajjeh R, Johnson R, Vugia D, et al. (1999) Influence of host genetics on the severity of coccidioidomycosis. *Emerg Infect Dis* 5: 672–680.

van Manen D, Kootstra NA, Boeser-Nunnink B, Handulle MA, van't Wout AB, et al. (2009) Association of HLA-C and HCP5 gene regions with the clinical course of HIV-1 infection. *Aids* 23: 19–28.

Masato Orita, Hiroyuki Iwahana, Hiroshi Knazawa, Kenshi Hayashi and Takato Sekiya Detection of the polymorphisms of human DNA by gelelectrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. *Proc. Natd.Acad. Sci. USA* 86, 2766-2770, 1989.

Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway CA (1997). "A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity". *Nature* 388: 394–7.

Melcher, Ulrich. SSCP. <<http://opbs.okstate.edu/~melcher/MG/MGW1/MG11129.html>>. Accessed 2003 February 17.

Montgomery SP, Chow CC, Smith SW, Marfin AA, O'Leary DR, Campbell GL (2005). "Rhabdomyolysis in patients with west nile encephalitis and meningitis". *Vector-Borne and Zoonotic Diseases* 5 (3): 252–7. doi:10.1089/vbz.2005.5.252. PMID 16187894.

Nash D, Mostashari F, Fine A, et al. (June 2001). "The outbreak of West Nile virus infection in the New York City area in 1999". *N. Engl. J. Med.*

Nei M., Gu X., Sitnikova T. (1997). Evolution by the birth-and-death process in multigene families of the vertebrate immune system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:7799-7806.

Neumann-Haefelin C, McKiernan S, Ward S, Viazov S, Spangenberg HC, et al. (2006) Dominant influence of an HLA-B27 restricted CD8+ T cell response in mediating HCV clearance and evolution. *Hepatology* 43: 563–572.

Nguyen TP, Kikuchi M, Vu TQ, Do QH, Tran TT, et al. (2008) Protective and enhancing HLA alleles, HLA-DRB1\*0901 and HLA-A\*24, for severe forms of dengue virus infection, dengue hemorrhagic fever and dengue shock syndrome. *PLoS Negl Trop Dis* 2: e304.



Nomura N, Miyajima N, Sazuka T, et al. (1994). "Prediction of the coding sequences of unidentified human genes. I. The coding sequences of 40 new genes (KIAA0001-KIAA0040) deduced by analysis of randomly sampled cDNA clones from human immature myeloid cell line KG-1". *DNA Res.* 1: 27–35.

Olejnik E (1952). "Infectious adenitis transmitted by *Culex molestus*". *Bull Res Counc Isr* 2: 210–1.

Paddock CD, Nicholson WL, Bhatnagar J, et al. (June 2006). "Fatal hemorrhagic fever caused by West Nile virus in the United States". *Clin. Infect. Dis.* 42 (11): 1527–35. doi:10.1086/503841. PMID 16652309.

Paterson S., Wilson K., Pemberton J. M. (1998). Major histocompatibility complex variation associated with juvenile survival and parasite resistance in a large unmanaged ungulate population (*Ovis aries* L.). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:3714-3719.

Penn D.J., Potts W.K. (1999). The evolution of mating preferences and major histocompatibility complex genes. *Am Nat.* 153:145-164.

Polizel JR, Bueno D, Visentainer JE, Sell AM, Borelli SD, et al. (2004) Association of human leukocyte antigen DQ1 and dengue fever in a white Southern Brazilian population. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 99: 559–562.

Poltorak A, He X, Smirnova I, et al. (1998). "Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in *Tlr4* gene". *Science* 282: 2085–8.

Riabi S, Gaaloul I, Mastouri M, Hassine M, Aouni M. "An outbreak of West Nile Virus infection in the region of Monastir, Tunisia, 2003. *Pathog Glob Health.* 2014 Apr;108(3):148-57. doi: 10.1179/2047773214Y.0000000137.

Roach JC, Glusman G, Rowen L, Kaur A, Purcell MK, Smith KD, Hood LE, Aderem A (2005). "The evolution of vertebrate Toll-like receptors". *Proc Natl Acad Sci USA* 102: 9577–9582.

Rolls A., Shechter R., London A., et al. (2007). "Toll-like receptors modulate adult hippocampal neurogenesis". *Nat. Cell Biol.* 9: 1081–8.

Sambrook J., Russel D., 2001, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, third ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Springs Harbor, NY

Samuel MA, Diamond MS (2006) Pathogenesis of West Nile Virus infection: a balance between virulence, innate and adaptive immunity, and viral evasion. *J Virol* 80: 9349–9360.

Schreuder GM, Hurley CK, Marsh SG, Lau M, Maiers M, et al. (2001) The HLA Dictionary 2001: 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. *Eur J Immunogenet* 28: 565–596.

Schwaiger F.W., Maddox J., Ballingall J., Buitkamp J., Crawford A.M., Dutia B.M., Epplen J.T., Ferguson E.D., Groth D., Hopkins J., Rhind S.M., Sargan D., Wetherall J., Wright H. (1996). The ovine major histocompatibility complex. In Schook L.B., Lamont S.J. editors. The major histocompatibility complex of domestic species. Boca Raton: CRC: p 121-176.

Semple S., Cowlishaw G., Bennett P.M. (2002). Immune system evolution among anthropoid primates: parasites, injury risk and predators. *Proc. R. Soc. Lond. B* 269:1031-1037.

Sierra B, Alegre R, Perez AB, Garcia G, Sturn-Ramirez K, et al. (2007) HLA-A, -B, -C, and -DRB1 allele frequencies in Cuban individuals with antecedents of dengue 2 disease: advantages of the Cuban population for HLA studies of dengue virus infection. *Hum Immunol* 68: 531–540.

Song, W.Y. et al.; (1995). "A receptor kinase-like protein encoded by the rice disease resistance gene, XA21". *Science* 270: 1804-1806.

Stephens HA, Klaythong R, Sirikong M, Vaughn DW, Green S, et al. (2002) HLA-A and -B allele associations with secondary dengue virus infections correlate with disease severity and the infecting viral serotype in ethnic Thais. *Tissue Antigens* 60: 309–318.

Stern L.J., Brown J.H., Jardetzky T.S., Gorga J.C., Urban R.G., Strominger J.L., Wiley D.C. (1994). Crystal structure of the human class II MHC protein HLA-DR1 complexed with an influenza virus peptide. *Nature* 68: 215-221

Tabeta K, Georgel P, Janssen E, et al.; (2004). "Toll-like receptors 9 and 3 as essential components of innate immune defense against mouse cytomegalovirus infection". *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101: 3516–21.

Taguchi T, Mitcham JL, Dower SK, Sims JE, Testa JR (1996). "Chromosomal localization of TIL, a gene encoding a protein related to the *Drosophila* transmembrane receptor Toll, to human chromosome 4p14". *Genomics* 32: 486–8.

Theophilides C.N, Ahearn S.C, Binkowski E.S, Paul W.S, Gibbs K (2005). "First evidence of West Nile virus amplification and relationship to human infections". *International Journal of Geographical Information Science* Vol. 20, No. 1, January 2006, 103–115

Thursz M. R., Thomas H. C., Greenwood B. M., Hill A. V. S. (1997). Heterozygote advantage for HLA class-II type in hepatitis B virus infection. *Nature genetics* 17:11-12.

Tyler KL, Pape J, Goody RJ, Corkill M, Kleinschmidt-DeMasters BK (February 2006). "CSF findings in 250 patients with serologically confirmed West Nile virus meningitis and encephalitis". *Neurology* 66 (3): 361–5. doi:10.1212/01.wnl.0000195890.70898.1f. PMID 16382032.

Van Eijk M. J. T., Stewart-Haynes J. A., Beever J. E., Fernando R. L., Lewin H. A. (1992). Development of persistent lymphocytosis in cattle in closely associated with DRB2. *Immunogenetics* 37:64-68.

Wang P, Sidney J, Kim Y, Sette A, Lund O, et al. (2010) Peptide binding predictions for HLA DR, DP and DQ molecules. *BMC Bioinformatics* 11: 568.

Wang T, Town T, Alexopoulou L, Anderson JF, Fikrig E, et al. (2004) Toll-like receptor 3 mediates West Nile virus entry into the brain causing lethal encephalitis. *Nat Med* 10: 1366–1373.

Wegner K.M., Reusch T.B.H., Kalbe M., (2003). Multiple parasites are driving major histocompatibility complex polymorphism in the wild. *J. Evol. Biol.* 16:224-232.

Xu A., Van Eijk M. J. T., Park C., Lewin H. A. (1993). Polymorphism in BoLA-DRB3 Exon 2 Correlates with Resistance to Persistent Lymphocytosis Caused by Bovine Leukaemia Virus. *J. of Immunology* 151:6977-6985.

Yeager M., Hughes A. (1999). Evolution of the mammalian MHC: natural selection, recombination, and convergent evolution. *Immunological Rev.* 167:45-58.

Zivna I, Green S, Vaughn DW, Kalayanarooj S, Stephens HA, et al. (2002) T cell responses to an HLA-B\*07-restricted epitope on the dengue NS3 protein correlate with disease severity. *J Immunol* 168: 5959–5965.

Π. Νικολαΐδης «Λοίμωξη από τον ιό του Δυτικού Νείλου. Φυσική πορεία νόσου – Τρόποι μετάδοσης – Επιδημίες»