

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ- ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ**

**ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ
ΤΗΣ ΦΟΙΤΗΤΡΙΑΣ**

ΑΓΟΡΑΣΤΟΥ ΠΟΛΥΞΕΝΗΣ

**« ΜΕΛΕΤΗ ΚΑΙ ΣΗΜΑΣΙΑ ΤΟΥ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΥ ΤΟΥ
ΓΟΝΙΔΙΟΥ DRB ΤΗΣ ΚΛΑΣΗΣ II ΤΟΥ ΜHC ΣΤΟ ΕΙΔΟΣ
L.Euroaeus ΕΛΛΗΝΙΚΩΝ ΠΛΗΘΥΣΜΩΝ ΛΑΓΟΥ - ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ
ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ ΜΕ ΤΗΝ ΣΥΧΝΟΤΗΤΑ ΕΜΦΑΝΙΣΗΣ
ΤΟΥ ΣΥΝΔΡΟΜΟΥ ΤΟΥ ΕΥΡΩΠΑΪΚΟΥ ΚΑΦΕΤΙ ΛΑΓΟΥ »**

**«The importance of genetic polymorphism of the Major
Histocompatibility Complex (MHC) II -DRB for disease
outbreaks in mammals: correlation between the genetic
composition in hare (*Lepus euroaeus*) and the frequency of
european brown hare syndrome»**



ΛΑΡΙΣΑ

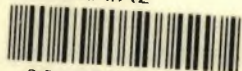
ΑΚΑΔΗΜΑΪΚΟ ΕΤΟΣ:2004-2005



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

Αριθ. Εισ.: 4718/1
Ημερ. Εισ.: 28-02-2006
Δωρεά: Π.Θ.
Ταξιθετικός Κωδικός: ΠΤ - ΒΒ
2005
ΑΓΟ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



004000087835

ΜΕΡΟΣ Α΄

ΠΡΟΛΟΓΟΣ.....	6
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	7
ABSTRACT.....	8
ΣΥΣΤΗΜΑΤΙΚΗ ΚΑΤΑΤΑΞΗ ΤΟΥ <i>L.europeus</i>	9
Το είδος <i>Lepus</i>	9
Α) ΦΥΣΙΚΗ ΚΑΤΑΝΟΜΗ.....	9
Β) ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΚΑ- ΗΘΟΛΟΓΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ.....	9
Γ) ΣΗΜΑΣΙΑ ΓΙΑ ΤΟΝ ΑΝΘΡΩΠΟ.....	10
ΤΟ ΣΥΝΔΡΟΜΟ ΤΟΥ ΕΥΡΩΠΑΪΚΟΥ ΚΑΦΕΤΙ ΛΑΓΟΥ.....	11
ΜΟΡΙΑΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΟΥ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΥ.....	14
1.-ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ.....	14
Α) ΙΣΟΕΝΖΥΜΑ.....	14
ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (PCR).....	15
2.-ΔΕΙΚΤΕΣ ΠΟΥ ΒΑΣΙΖΟΝΤΑΙ ΣΤΟ ΠΥΡΗΝΙΚΟ ΓΟΝΙΔΙΩΜΑ.....	16
α) RAPD.....	16
β) ESTs.....	17
γ) VNTRs.....	17
Γ) ΑΠΕΥΘΕΙΑΣ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΣΗ DNA (DNA SEQUENCING).....	18
Δ) ENZYMA ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΥ- RESTRICTION FRAGMENT LENGTH POLYMORPHISM (RFLP).....	19
α) Southern blotting RFLP.....	19
β) PCR-RFLP.....	19
Ε) Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP).....	19
ΣΤ) Allelic-Specific Oligonucleotide Hybridization (ASO).....	20
Ζ) Allele-Specific PCR (Amplified Refractory Mutation System ARMS).....	20
Η) DNA chips/ microarray.....	21
Θ) (Denaturing High Pressure Liquid Chromatography (DHPLC).....	21
Ι) TAQ-MAN.....	22
Κ) OLA.....	22
Λ) (Single Strand Conformation Polymorphism (SSCP).....	23

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ.....	24
ΠΛΕΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ ΜΕΘΟΔΟΥ SSCP.....	26
3.-ΑΝΤΙΓΟΝΙΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ.....	27
ΑΝΤΙΓΟΝΑ ΤΟΥ ΜΕΙΖΟΝΟΣ ΣΥΜΠΛΕΓΜΑΤΟΣ ΙΣΤΟΣΥΜΒΑΤΟΤΗΤΑΣ (MHC).....	28
Η ΟΡΓΑΝΩΣΗ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΩΜΑΤΟΣ ΤΟΥ ΜHC.....	30
ΓΕΝΕΤΙΚΟΙ ΤΟΠΟΙ ΤΗΣ ΤΑΞΗΣ I.....	32
Η Δομή των μορίων της τάξης I.....	32
ΓΕΝΕΤΙΚΟΙ ΤΟΠΟΙ ΤΗΣ ΤΑΞΗΣ II.....	33
Η Δομή των μορίων της τάξης II.....	34
ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΟΥ ΜΟΡΙΟΥ ΜHC II.....	37
ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΣ ΣΤΟ ΜΟΡΙΟ ΤΟΥ ΜHC.....	38
ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΠΟΥ ΕΥΘΥΝΟΝΤΑΙ ΓΙΑ ΤΟΝ ΥΨΗΛΟ ΒΑΘΜΟ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΥ ΤΩΝ ΜΟΡΙΩΝ ΜHC.....	39
1.Μηχανισμοί που εξαρτώνται από την παρουσία παθογόνων.....	40
2.Μηχανισμοί που δεν εξαρτώνται από την παρουσία παθογόνων.....	40
ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ.....	41

ΜΕΡΟΣ Β΄

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	43
A) Βιολογικό Υλικό- Δείγματα.....	43
B) ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΟΛΙΚΟΥ DNA ΑΠΟ ΙΣΤΟ ΛΑΓΟΥ.....	46
Γ)ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΣ ΣΥΝΟΛΙΚΗΣ ΠΟΣΟΤΗΤΑΣ DNA ΜΕ ΤΗ ΒΟΗΘΕΙΑ ΦΩΤΟΜΕΤΡΟΥ.....	48
Δ) ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟΣ ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΤΟΥ ΕΞΟΝΙΟΥ 2 ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ DRB ΤΗΣ ΚΛΑΣΗΣ II ΤΟΥ ΜHC ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ ΤΗΣ ΑΛΥΣΙΔΩΤΗΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗΣ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (PCR).....	49
E) ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ.....	51
ΣΤ) ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΣΕ ΠΗΚΤΩΜΑ ΑΓΑΡΟΖΗΣ-ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΠΗΚΤΗΣ ΑΓΑΡΟΖΗΣ.....	52
Z) ΦΟΡΤΩΣΗ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ GEL ΑΓΑΡΟΖΗΣ.....	52

H) PCR-SSCP.....	53
Θ) ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΠΗΚΤΗΣ ΠΟΛΥΑΚΡΥΛΑΜΙΔΗΣ ΓΙΑ SSCP.....	53
I) ΧΡΩΣΗ ΝΙΤΡΙΚΟΥ ΑΡΓΥΡΟΥ (Silver Staining).....	54
ΙΑ) ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΠΡΟΪΟΝΤΟΣ ΓΙΑ SEQUENCING.....	56
ΙΒ) ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ DNA (Sequencing).....	58

ΜΕΡΟΣ Γ΄

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	61
A) ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ.....	61
B) ΑΝΑΛΥΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ.....	62

ΜΕΡΟΣ Δ΄

ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	70
Ποικιλομορφία μεταξύ απλοτύπων.....	71
Ποικιλομορφία σε επίπεδο αμινοξικής αλληλουχίας	73
Ποικιλομορφία μεταξύ πληθυσμών.....	73

ΜΕΡΟΣ Ε΄

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	75
-------------------	----

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ- ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΑΓΟΡΑΣΤΟΥ ΠΟΛΥΞΕΝΗ

« ΜΕΛΕΤΗ ΚΑΙ ΣΗΜΑΣΙΑ ΤΟΥ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΥ ΤΟΥ
ΓΟΝΙΔΙΟΥ DRB ΤΗΣ ΚΛΑΣΗΣ II ΤΟΥ MHC ΣΤΟ ΕΙΔΟΣ
***L.Europaeus* ΕΛΛΗΝΙΚΩΝ ΠΛΗΘΥΣΜΩΝ ΛΑΓΟΥ -**
ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ ΜΕ ΤΗΝ ΣΥΧΝΟΤΗΤΑ
ΕΜΦΑΝΙΣΗΣ ΤΟΥ ΣΥΝΔΡΟΜΟΥ ΤΟΥ ΕΥΡΩΠΑΪΚΟΥ ΚΑΦΕΤΙ
ΛΑΓΟΥ »

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:

Z.ΜΑΜΟΥΡΗΣ: ΑΝΑΠΛΗΡΩΤΗΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΖΩΙΚΩΝ
ΠΛΗΘΥΣΜΩΝ (ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ)

A. ΜΟΥΤΟΥ: ΕΠΙΚΟΥΡΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΣΠΟΝΔΥΛΩΤΩΝ

A. ΖΙΦΑ: ΛΕΚΤΟΡΑΣ ΝΕΥΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Γενετικής, Συγκριτικής και Εξελικτικής Βιολογίας του Τμήματος Βιοχημείας – Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας κατά το έτος 2005.

Ευχαριστίες... ..

Θα ήθελα ολόψυχα να ευχαριστήσω τον Αναπληρωτή Καθηγητή Γενετικής Ζωϊκών Πληθυσμών κ. Ζ. Μαμούρη ο οποίος με τίμησε και με εμπιστεύτηκε αναθέτοντάς μου την παρούσα εργασία καθώς και για τις πολύτιμες υποδείξεις του για την ολοκλήρωση της.

Επίσης, θερμότερες ευχαριστίες θα ήθελα να εκφράσω στον υποψήφιο διδάκτορα κ. Κ. Σταμάτη ο οποίος με τη συνεχή του υποστήριξη, την καθοδήγησή του, την κατανόησή του και την ηθική του συμπαράσταση σε όλο το διάστημα διεξαγωγής των πειραμάτων συνέβαλε αποφασιστικά στη διεκπεραίωση του πειραματικού μέρους της εργασίας.

Ευχαριστώ θερμά την Επίκουρο Καθηγήτρια κα. Α. Μούτου για τις συμβουλές της και την ηθική της συμπαράσταση όπως και την Λέκτορα Καθηγήτρια κα. Α. Ζίφα για την ευγένεια με την οποία με δέχθηκε στο εργαστήριο.

Θα ήθελα ακόμη να ευχαριστήσω την υποψήφια διδάκτορα κα Ε. Ψόχιου για την ιδιαίτερα φιλική ατμόσφαιρα στο περιβάλλον του εργαστηρίου, την κατανόηση και τη συμπαράστασή της κατά τη διάρκεια του πειραματικού μέρους της εργασίας.

Τέλος, από τα βάθη της καρδιάς μου ευχαριστώ τους γονείς μου και συναδέλφους μου για την κατανόηση, την υπομονή, την αγάπη και την στήριξη που έδειξαν σε όλη τη διάρκεια των σπουδών μου.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το μέγιστο σύμπλεγμα ιστοσυμβατότητας (MHC) κωδικοποιεί μια ομάδα στενά συνδεδεμένων γονιδίων τα οποία παίζουν πολύ σημαντικό ρόλο στο ανοσοποιητικό σύστημα των σπονδυλωτών. Από μελέτες που έχουν γίνει μέχρι σήμερα σε φυσικούς πληθυσμούς θηλαστικών έχει δειχθεί ότι το μόριο του MHC παρουσιάζει εξαιρετικά υψηλά επίπεδα γενετικής ποικιλομορφίας τόσο όσον αφορά τον αριθμό όσο και την έκταση της ποικιλομορφίας μεταξύ των αλληλομόρφων (Klein 1986; Potts et al., 1993; Nei et al., 1991; Hedrick 1994). Σε προηγούμενη έρευνα στο γονίδιο DQA της τάξης II του MHC στο είδος *Lepus europeus* (Mamuris, 2004) αποκαλύφθηκε χαμηλή γενετική ποικιλομορφία σε σύγκριση με άλλα είδη θηλαστικών. Στην παρούσα μελέτη εξετάζεται η γενετική ποικιλομορφία στο γονίδιο DRB2 της τάξης II του MHC. Το γονίδιο αυτό κωδικοποιεί για μια πολύ σημαντική περιοχή στο μόριο του MHC που παίζει ρόλο στη σύνδεση του αντιγόνου με το αντίσωμα- πεπτίδιο. Χρησιμοποιήθηκαν πληθυσμοί του είδους *L.europeus* από διαφορετικές περιοχές του ελλαδικού χώρου και υποβλήθηκαν σε ανάλυση πολυμορφισμού μονόκλωνης αλυσίδας (SSCP) μετά από ενίσχυση του εξονίου 2 του γονιδίου DRB με την αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης PCR και τη χρήση ειδικών μορίων εκκινητών (primer) από κουνέλια. Από την ανάλυση προέκυψε ότι το γονίδιο DRB2 παρουσιάζει αυξημένη γενετική ποικιλομορφία τόσο ενδοπληθυσμιακά, μέσα στην ίδια γεωγραφική περιοχή, όσο και διαπληθυσμιακά. Τα αποτελέσματα αυτά προτείνουν ότι η ποικιλομορφία του μορίου δεν έχει επηρεαστεί από φαινόμενα στενωπού ή αναπαραγωγική ασυμβατότητα. Αντίθετα, υποστηρίζεται η άποψη ότι η ποικιλομορφία του μορίου πιθανώς σχετίζεται με την παρουσία παθογόνων ιών όπως είναι ο ιός που προκαλεί το σύνδρομο του ευρωπαϊκού καφετί λαγού και προτείνεται ως μηχανισμός προσαρμογής και άμυνας των παραπάνω οργανισμών ενάντια σε παθογόνα.

ABSTRACT

The major histocompatibility complex (MHC) encodes a group of closely linked genes that play a central role in the vertebrate's immune system. Through studies that have been done so far most natural mammalian populations possess high levels of MHC diversity both in terms of the number of alleles present and in the extent of sequence variation among alleles (Klein 1986; Potts and Wakeland 1990; Nei and Hughes 1991; Hedrick 1994). In a previous research in the MHC class II gene DQA in *L.europeaus* (Mamuris, 2004) it was revealed low genetic variability compared to other mammalian species. In this investigation the genetic variability in the MHC class II gene DRB2 is examined. This gene encodes for the antigen binding site and is therefore considered as one of the most important parts of the MHC molecule. Population samples of *L.europeaus* from different places in Greece were used and studied by using primers of the closely related kind of rabbits which were amplified for the exon 2 of DRB gene by PCR technique and single-strand conformation polymorphism. The research shown that the DRB exon 2 appears to be high polymorphic either between individuals within the same group in a certain geographic area nor between individuals among different groups. The results suggest that the genetic variability of the gene DRB2 is not affected by selection pressures, bottleneck effect or by mating system abnormalities. In contrast, high MHC polymorphism is interpreted as a consequence of viremia like the virus which causes the European brown hare Syndrome and it is a mimicry and defensive mechanism against parasites and diseases.

ΣΥΣΤΗΜΑΤΙΚΗ ΚΑΤΑΤΑΞΗ ΤΟΥ *L.europeus*

Βασίλειο: Animal

Φύλο: Chordate

Υπόφυλο: Vertebrate

Κλάση: Mammalia

Τάξη: Lagomorpha

Οικογένεια: Leporidae

Γένος: *Lepus*

Είδος: *Lepus europeus*



Στο γένος *Lepus* ανήκουν και άλλα είδη μεταξύ των οποίων τα πιο γνωστά είναι το είδος *L.timidus*, *L.americanus*, *L.carpensis* και *L.Brachyurus*.

ΤΟ ΕΙΔΟΣ *Lepus Europaes*

Α) ΦΥΣΙΚΗ ΚΑΤΑΝΟΜΗ

Ο ευρωπαϊκός καφετί λαγός (*Lepus europeus* European brown hare Pallas 1778) ανήκει στην τάξη των λαγόμορφων. Είναι ένα είδος με ευρεία κατανομή στην Ευρώπη συμπεριλαμβανομένης και της Ελλάδας, την Κεντρική Ασία (Poli et al, 1991), τη Νότια και Κεντρική Αμερική (Borino and Montenegro, 1997). Στον ελλαδικό χώρο ο ευρωπαϊκός λαγός *Lepus* εντοπίζεται σε όλη την ηπειρωτική Ελλάδα και σε ορισμένα νησιά.

Β) ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΚΑ-ΗΘΟΛΟΓΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ

Το χαρακτηριστικό γνώρισμα του *L.europeus* είναι το μαύρο χρώμα στην επάνω επιφάνεια της ουράς του. Το τρίχωμά του ανάλογα με το περιβάλλον στο οποίο ζει διαφέρει από κιτρινωπό-καφέ έως γκριζο-καφέ και αλλάζει δύο φορές το χρόνο ενώ το χειμώνα είναι πιο κοκκινωπό. Γενικά, στο οπίσθιο τμήμα του το τρίχωμα είναι γκρι ενώ στο πρόσωπο και τα αυτιά του είναι πιο ανοιχτόχρωμο. Το συνολικό μήκος του κυμαίνεται από 600-750mm ενώ το μήκος της ουράς του από 72-110mm. Τα αυτιά του είναι αρκετά μακριά με μαύρα στίγματα, έχουν μήκος που κυμαίνεται από 94-102mm με μαύρες άκρες και είναι γκριζωπά στο εσωτερικό τους (Peterson 1966, Hall et al., 1959). Το βάρος των ενήλικων ατόμων του ευρωπαϊκού λαγού κυμαίνεται από 2,5-6,5Kgr. Διακρίνεται από τα κουνέλια επειδή είναι μεγαλύτερος σε μέγεθος, ψηλότερος και μακροκάνης και δεν έχει παρατηρηθεί φυλετικός διμορφισμός (Bansfield, 1974).

Κατά βάση είναι μοναχικό ζώο αλλά απαντά και σε μορφή ομάδων, συνήθως κατά την αναπαραγωγική περίοδο. Αφθονεί σε αγροτικές περιοχές και κυρίως σε εκτάσεις όπου καλλιεργούνται δημητριακά, ενώ σε μεγάλη κλίμακα επιβιώνει σε βοσκότοπους, σε θαμνώδεις αλλά και δασικές εκτάσεις με υψόμετρο μέχρι 1500μ (Mitchell-Jones, 1999). Κύριο είδος της φυσικής διατροφής του είναι τα χόρτα και τα δημητριακά, οι βλαστοί, τα μανιτάρια, οι φλοιοί και τα κλαριά σπυροφόρων δέντρων και αρόσιμων σπαρτών (Banfield, 1974; Peterson, 1966). Περπατά με αβιαστους βηματισμούς και τρέχει με αλματώδεις δρασκελιές. Είναι νυκτόβιος οργανισμός, με αρκετά αναπτυγμένη αίσθηση της όρασης, της ακοής και της όσφρησης. Όταν αντιλαμβάνεται κινδύνους μπορεί να τρέξει αναπτύσσοντας μεγάλες ταχύτητες ενώ έχει αποδειχθεί ότι άτομα τα οποία έχουν τραυματιστεί από κυνηγούς μπορούν και επιβιώνουν.

Η κυριότερη περίοδος αναπαραγωγής του είναι μεταξύ Ιανουαρίου- Φεβρουαρίου, ενώ ο μεγαλύτερος αριθμός ατόμων που κυοφορούν παρατηρείται τους μήνες Απρίλιο και Μάιο, χωρίς αυτό όμως να σημαίνει ότι δεν υπάρχουν άτομα που αναπαράγονται καθ'όλη τη διάρκεια του έτους. Οι λαγοί του είδους *L.europeaus* φτάνουν τη σεξουαλική τους ωριμότητα 8 με 12 μήνες μετά τη γέννησή τους. Επιπλέον, έχει παρατηρηθεί ότι τα θηλυκά άτομα λαγών *L.europeaus* πριν αλλά και μετά την περίοδο της κυοφορίας δεν μεταναστεύουν σε άλλο περιβάλλον σε σχέση με τα αρσενικά άτομα του είδους. Συνήθως τα άτομα του ευρωπαϊκού καφετι λαγού επιβιώνουν περίπου από ένα έως δώδεκα χρόνια. Στην Ελβετία ύστερα από μελέτες και παρατηρήσεις που καταγράφηκαν από κυνηγητικούς συλλόγους, έχει αναφερθεί ότι ο μέγιστος χρόνος ζωής των ατόμων φτάνει περίπου 1,5 έτη και στην Πολωνία τα 12,5 έτη. Τα άτομα ηλικίας μέχρι ενός έτους είναι πολύ ευαίσθητα σε ασθένειες και πρέπει να τρέφονται συνεχώς προκειμένου να επιβιώνουν (Game Conservancy Trust, January 2002).

Γ) ΣΗΜΑΣΙΑ ΓΙΑ ΤΟΝ ΑΝΘΡΩΠΟ

Το είδος *L.europeaus* ήταν ανέκαθεν θηρεύσιμο είδος. Το κρέας του είναι αρκετά νόστιμο και εξαιρετικής ποιότητας. Αν και το είδος δεν συγκαταλέγεται ανάμεσα στα είδη που απειλούνται με εξαφάνιση μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί μέχρι σήμερα δείχνουν μια σημαντική πτώση των πληθυσμιακών μεγεθών του ανά την Ευρώπη. Επιπλέον, οι διάφοροι εμπλουτισμοί που πραγματοποιούνται σε Ευρωπαϊκή κλίμακα έχουν αλλοιώσει την πληθυσμιακή και γενετική σύσταση του είδους με

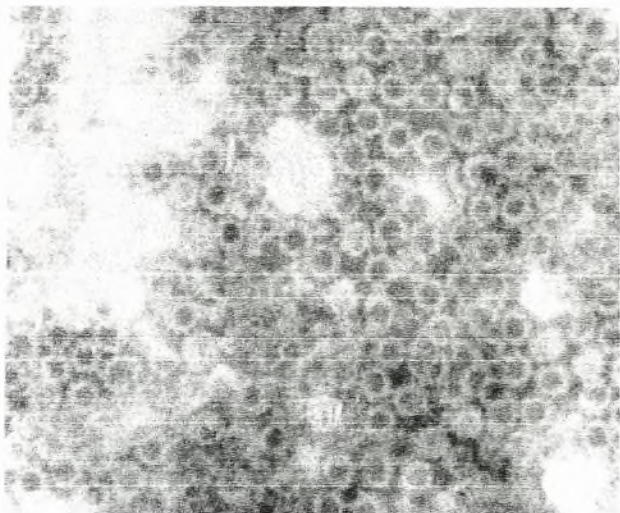
αποτέλεσμα οι γονιδιακές δεξαμενές να βρίσκονται σε κίνδυνο. Μάλιστα, αλλαγή στη γενετική δομή των πληθυσμών του είδους έχει παρατηρηθεί και στην Ελλάδα.

ΤΟ ΣΥΝΔΡΟΜΟ ΤΟΥ ΕΥΡΩΠΑΪΚΟΥ ΚΑΦΕΤΙ ΛΑΓΟΥ

Μεγάλη μείωση των τοπικών πληθυσμών ατόμων του ευρωπαϊκού καφετί λαγού παρατηρήθηκε κυρίως από το 1960. Μερικοί από τους παράγοντες στους οποίους πιθανόν οφείλεται η δραστική πτώση του αριθμού των πληθυσμών των λαγών οφείλονται σε παρεμβάσεις του ανθρώπου πάνω στο οικοσύστημα. Έτσι, η μείωση των αγροτικών και δασικών εκτάσεων, η αλλαγή του φυσικού περιβάλλοντος λόγω ανοικοδόμησης και οι κλιματολογικές αλλαγές που αυτή συνεπάγεται, η καταστροφή της τροφικής αλυσίδας και η επακόλουθη αύξηση πληθυσμών θηρευτών πχ. αλεπούδων που τρέφονται με λαγούς, η έλλειψη ποικιλίας καλλιεργειών που επηρεάζει τις διατροφικές τους συνήθειες, η λαθροθηρία και η παράνομη θανάτωση ατόμων λαγών από αγρότες προκειμένου να προστατεύσουν τις καλλιέργειές τους από πρόκληση ζημιών, συντελούν στην αυξημένη θνησιμότητα του είδους. Εκτός των παραπάνω όμως ένας πολύ σημαντικός παράγοντας που προκαλεί δραστική μείωση των πληθυσμών λαγού *L.europeus* με απρόβλεπτες μέχρι στιγμής συνέπειες για το είδος, φαίνεται ότι είναι η προσβολή των ατόμων από ασθένειες όπως είναι η δυσανατομία στην αιμοσφαρίνη *Lepore*, ασθένειες προκαλούμενες από μύκητες (*coccidiosis*), από τριχομονάδες (πχ. *yersiniosis*, *trichongylosis*) και νηματώδεις σκώληκες όπως ο *Graphidium strigosum* και επιδημικά σύνδρομα όπως το ονομαζόμενο Σύνδρομο του Ευρωπαϊκού καφετί λαγού (*European brown hare Syndrome- EBHS*).

Ειδικότερα, στις αρχές του 1980 στη Σουηδία παρατηρήθηκε σε άτομα του είδους *L.europeus* το EBHS (Gavier et al., 1991) και έκτοτε εμφανίζεται περιστασιακά και σε άλλες ευρωπαϊκές χώρες (Frolich et al., 1996; Leontides et al., 1999). Στην Ελλάδα το σύνδρομο του ευρωπαϊκού καφετί λαγού αναφέρθηκε για πρώτη φορά το 1999 (Leontides et al., 1999). Η ίδια ασθένεια εντοπίστηκε σε πληθυσμούς *L.europeus* στη Γερμανία το 1982 και σήμερα η ασθένεια έχει εξαπλωθεί τόσο στη Δανία όσο και σε περιοχές της Νότιας Σουηδίας. Ωστόσο, παράδοξο φαίνεται να αποτελεί το γεγονός ότι στις γειτονικές σκανδιναβικές χώρες Νορβηγία και Φινλανδία δεν έχουν αναφερθεί μέχρι στιγμής κρούσματα. Στη Σουηδία έχει βρεθεί ότι και τα δύο είδη *Lepus* που ζουν εκεί προσβάλλονται από το σύνδρομο EBHS, ο *L.europaeus* και ο *timidus* (Gavier et al., 1991).

Το EBHS εκδηλώνεται τόσο σε ελεύθερους, άγριους λαγούς όσο και σε εκτρεφόμενα άτομα του είδους, τα οποία χρησιμοποιούνται σε προγράμματα εμπλουτισμών. Η νόσος είναι καθαρά εποχιακή, εξαπλώνεται πιο συχνά κατά τους μήνες Οκτώβριο- Νοέμβριο- Δεκέμβριο κάθε έτους, ενώ παρουσιάζει πολλά κοινά, μακροσκοπικά και μικροσκοπικά, χαρακτηριστικά με την ιογενή αιμορραγική ασθένεια (Viral haemorrhagic disease- VHD) που προσβάλλει τα κουνέλια (*Oryctolagus cuniculus*) (Wirbilch et al., 1994). Η διαφοροποίηση μεταξύ των δύο αυτών ιών είναι δύσκολο να επιτευχθεί καθώς αλληλούχιση του γονιδιώματος των δύο ιών έδειξε ομοιότητα σε ποσοστό 71%. Πολλά κλινικά και παθολογικά συμπτώματα είναι παρόμοια και για τις δύο ασθένειες (Marcato et al., 1991). Επομένως, είναι δύσκολο να προσδιοριστεί αν πρόκειται για τον ίδιο ή διαφορετικά στελέχη του ίδιου ιού ή για διαφορετικούς ιούς. Μεταξύ των άλλων και οι δύο ασθένειες εμφανίζονται με οξύτατη μορφή συνδρόμου που συνοδεύεται από νευρικά και αναπνευστικά συμπτώματα και ρινορραγίες. Σε όλες τις περιπτώσεις προκαλείται βαρύτατη ηπατική βλάβη και οι πολλαπλές αιμορραγίες οδηγούν συχνά σε θανατηφόρα σοκ μεταξύ 48 και 72 ωρών (Chasey et al., 1992). Η ηπατική αλλοίωση (από ερεθισμό των ηπατικών κυττάρων μέχρι και νέκρωση των ηπατικών κυττάρων) προκαλείται άμεσα από κυτταρολυτικούς και έμμεσα από μικροθρομβωτικούς παράγοντες. Πιθανές αιτίες του αιμορραγικού συνδρόμου αποτελούν η ενδοθηλιακή αλλοίωση και η πρωτογενής ή δευτερογενής δυσλειτουργία των παραγόντων πήξης (Marcato et al., 1991).



Εικόνα 1. Ενδοθηλιακά κύτταρα ήπατος λαγού με σύνδρομο EBSH όπως φαίνεται από παρατήρηση με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο.

[Μεγέθυνση (1: 80.000)
www.lgl.bayern.de/.../ebhs_feldhasen.htm]

Τυπικά συμπτώματα που εκδηλώνονται σε άτομα που έχουν προσβληθεί αποτελούν η νεκρωτική ηπατίτιδα, η συμφόρηση, οι αιμορραγίες και το οίδημα των

πνευμόνων και της τραχείας (Marcato et al., 1991). Μέχρι στιγμής η διάγνωση του συνδρόμου γίνεται με ιστοπαθολογική εξέταση.



Εικόνα 2,3. Μακροσκοπική διάγνωση των ατόμων που έχουν προσβληθεί από το σύνδρομο. Εμφάνιση σκούρων κηλίδων σε ευαίσθητες περιοχές του σώματος πχ. στη μύτη του ζώου όπου λόγω ύπαρξης πολλών αιμοφόρων αγγείων παρατηρούνται αιμορραγίες. (www.wiesentbote.de/artikel-3890.html)

Οι προσπάθειες που έχουν γίνει ως τώρα για απομόνωση του ιού πάνω στις κυτταρικές μεμβράνες ατόμων που έχουν προσβληθεί δεν έχουν δώσει αποτέλεσμα. Ωστόσο, σήμερα ο εντοπισμός του ιού σε ομογενοποιημένο ιό με αιμοσυγκόλληση και σήμανση με ηλεκτρονική μικροσκοπία με τη μέθοδο της ELISA δίνει καλά αποτελέσματα (Gavier et al., 1991). Τελευταία, χρησιμοποιείται η τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (PCR) για την ανίχνευση του νουκλεϊκού οξέος του ιού ενώ ταυτόχρονα γίνονται μελέτες για τον καθορισμό των γενοτύπων και της γενετικής ποικιλομορφίας τόσο των ευρωπαϊκών όσο και ελληνικών λαγών έτσι ώστε να καθοριστεί αν υπάρχει και σε ποιο βαθμό υφίσταται αλληλεπίδραση μεταξύ των απελευθερωμένων και ενδογενών ατόμων όσον αφορά την εκδήλωση του Συνδρόμου του Ευρωπαϊκού Καφετί λαγού.

ΜΟΡΙΑΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΑΛΥΣΗ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΥ

Μέχρι σήμερα, η εξέταση της ποικιλομορφίας των ατόμων στηρίζονταν σε μορφολογικά χαρακτηριστικά του είδους, όπως πχ. το χρώμα του τριχώματος, το μέγεθος των αυτιών κ.α. Οποιαδήποτε όμως αλλαγή σε αυτά τα χαρακτηριστικά, λόγω αλλαγών στις περιβαλλοντικές συνθήκες, είτε λόγω μετανάστευσης των ατόμων σε διαφορετικό περιβάλλον, δεν σημαίνει κατά ανάγκη ότι τα άτομα διαφέρουν μεταξύ τους ως προς τη γενετική τους σύσταση. Σήμερα, έχουν αναπτυχθεί διάφορες μοριακές τεχνικές (δείκτες) με τις οποίες επιτυγχάνεται η μελέτη της γενετικής ποικιλομορφίας τόσο ενδοειδικά μεταξύ των πληθυσμών όσο και διαειδικά.

Μερικοί από τους μοριακούς δείκτες που χρησιμοποιούνται για τη μελέτη της γενετικής ποικιλομορφίας είναι οι ακόλουθοι:

1. ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ

A) ΑΛΛΟΕΝΖΥΜΑ

Το αλλοένζυμο είναι μια από τις δύο ή περισσότερες μορφές ενζύμου που κωδικοποιούνται από τον ίδιο γενετικό τόπο. Τα μόρια αυτά είναι δυνατόν να προσδιοριστούν σε πήκτωμα (gel) ηλεκτροφόρησης στο οποίο οι διαφορετικές μορφές του ίδιου ενζύμου διαφαίνονται από τη διαφορετική κινητικότητα που παρουσιάζουν στο πήκτωμα. Ο όρος αλλοένζυμο δεν πρέπει να συγχέεται με τον όρο ισοένζυμο, διότι τα ισοένζυμα είναι οι διάφορες μορφές ενός ενζύμου με τις ίδιες καταλυτικές ιδιότητες που κωδικοποιούνται από διαφορετικούς γενετικούς τόπους στο ίδιο γονιδίωμα. Επιπλέον, τα ισοένζυμα διαφέρουν στη δομή τους και σε ιδιότητες όπως είναι η εξειδίκευση με το υπόστρωμα (Markert et al., 1968). Τα αλλοένζυμα μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τον προσδιορισμό παραμέτρων όπως είναι ο βαθμός ετεροζυγωτίας μεταξύ πληθυσμών ενός είδους, ο αριθμός των αλληλομόρφων ανά γονιδιακό τόπο, ενώ είναι δυνατό να εντοπιστούν μοναδικά αλληλόμορφα για τους πληθυσμούς ενός είδους και να υπολογιστεί ο βαθμός της γενετικής διαφοροποίησης μεταξύ των πληθυσμών. Τα αλλοένζυμα έχουν ισχυρή επίδραση σε φαινοτυπικούς χαρακτήρες οι οποίοι είναι δυνατό να υπόκεινται συχνά σε επιλεκτικές πιέσεις και επειδή ακριβώς εξελίσσονται αρκετά αργά είναι δυνατό να μη διακρίνουν γενετικές διαφορές μεταξύ των ατόμων ενός πληθυσμού ενός είδους αλλά και μεταξύ ατόμων συγγενικών ειδών (Black et al, 1992; Cognato et al., 1995). Μάλιστα μελέτες που έχουν γίνει σε είδη *L. europeaus* με ισοενζυμική ανάλυση δεν έδειξαν σημαντικές γενετικές διαφοροποιήσεις ανάμεσα σε πληθυσμούς που

προήλθαν από διαφορετικές περιοχές της Ευρώπης (Hartl et al., 1992, 1993, Suchentrunk et al., 2000).

ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (PCR)

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) είναι ένα έξυπνο εργαλείο της μοριακής βιολογίας και ανακαλύφθηκε σχετικά πρόσφατα μόλις το 1984 από τον βιοχημικό Kary Mullis και χρησιμοποιείται σήμερα συχνά και σε συνδυασμό με άλλες μοριακές τεχνικές ανάλυσης όπως τα ένζυμα περιορισμού και η ανάλυση Southern blotting. Είναι τόσο ευαίσθητη τεχνική, γρήγορη, εύκολη και αυτοματοποιημένη ώστε ένα απλό μόριο DNA μπορεί να πολλαπλασιαστεί ενζυμικά *in vitro* με την βοήθεια ειδικών πολυμερασών και να ενισχυθεί. Πολυμεράσες είναι ένζυμα τα οποία κάτω από κατάλληλες συνθήκες pH και θερμοκρασίας επιμηκύνουν αλυσίδες νουκλεοτιδίων. Τα παραπάνω ένζυμα απομονώνονται σχετικά εύκολα κυρίως από βακτήρια. Η πιο συνήθης DNA πολυμεράση που χρησιμοποιείται σε αντιδράσεις PCR σήμερα, είναι η Taq πολυμεράση η οποία απομονώθηκε από το θερμόφιλο βακτήριο *Thermus aquaticus* και η οποία δρα σε αρκετά υψηλές για ένζυμα θερμοκρασίες, δρα ακόμη και στους 100°C. Η ιδιότητα αυτή συμβάλλει στην άμεση δράση του ενζύμου πάνω στα μόρια DNA τα οποία στις συνθήκες των 100°C έχουν αποδιαταχθεί και μπορεί η Taq να επιμηκύνει τις πολυνουκλεοτιδικές αλυσίδες. Έτσι γονίδια που απαντώνται ακόμη και ως ένα αντίγραφο μόνο μπορούν να εντοπιστούν από ένα πλήθος αλληλουχιών να ενισχυθούν και να απεικονιστούν στη συνέχεια σε ζώνες με τη χρήση πηκτών αγαρόζης.

Η αρχή λειτουργίας της μεθόδου στηρίζεται στη χρήση πολύ μικρής ποσότητας γενετικού υλικού που χρησιμοποιείται ως μόριο-στόχος για την σύνθεση πανομοιότυπων μορίων (Mullis et al., 1989). Η σύνθεση επιτυγχάνεται με τη βοήθεια ειδικών μορίων εκκινητών (primers). Τα πιο πάνω μόρια είναι εξαιρετικά ευαίσθητα σε συνθήκες θερμοκρασίες, διότι αποτελούνται από μονόκλωνη αλυσίδα συνθετικών ολιγονουκλεοτιδίων και έχουν μέγεθος βάσεων το οποίο δεν ξεπερνά τις 15-20bp. Μετά την προσκόλληση των εκκινητικών μορίων (primers) στα αποδιαταγμένα μόρια DNA, η επιμήκυνση των αλυσίδων γίνεται με τη βοήθεια της Taq πολυμεράσης, ειδικού ρυθμιστικού διαλύματος για την Taq καθώς και διαλύματος MgCl₂ και διαλύματος dNTPs.

2. ΔΕΙΚΤΕΣ ΠΟΥ ΒΑΣΙΖΟΝΤΑΙ ΣΤΟ ΠΥΡΗΝΙΚΟ ΓΟΝΙΔΙΩΜΑ

α) *Random amplified Polymorphic DNA (RAPD)*

Η τεχνική RAPD, ξεπερνώντας τους περιορισμούς που προκύπτουν από την εξέταση της ποικιλομορφίας του γονιδιώματος με βάση τις μορφολογικές διαφορές των οργανισμών ή από την ισοενζυμική ανάλυση, δίνει τη δυνατότητα να ταυτοποιηθεί μεγαλύτερος αριθμός πολυμορφισμών σε ολόκληρο το γονιδίωμα ενός οργανισμού. Βασίζεται στην τυχαία ενίσχυση πολυμορφικού DNA με τη χρήση της τεχνικής PCR. Χρησιμοποιώντας μικρά εκκινητικά μόρια (συνήθως μεγέθους 10 βάσεων) και μετά από ενίσχυσή τους με τη βοήθεια της PCR είναι δυνατό να ελεγχθούν πολλές θέσεις στο γονιδίωμα ταυτόχρονα όσον αφορά την ύπαρξη συντηρημένων αλληλουχιών. Για κάθε εκκινητικό μόριο δυνητικά υπάρχουν δύο τουλάχιστον θέσεις οι οποίες εντοπίζονται αρκετά κοντά στο γονιδίωμα και οποίες επιτρέπουν την ενίσχυση του παρεμβαλλόμενου κλάσματος (primer). Συνεπώς για κάθε primer ένας αριθμός διαφορετικών θέσεων πάνω στο γονιδίωμα προσφέρεται για την ενίσχυσή τους. Έτσι, παράγεται ένας αριθμός κλασμάτων διαφορετικού μεγέθους ενισχυμένων τμημάτων. Τα κλάσματα αυτά στη συνέχεια αναλύονται σε πήκτωμα ηλεκτροφόρησης. Ο μεγάλος αριθμός των θέσεων και κατ' επέκταση των προϊόντων που προκύπτουν μετά την ενίσχυση υποδεικνύει ότι τα άτομα διαφέρουν όσον αφορά το μέγεθος των κλασμάτων των μορίων που έχουν ενισχυθεί γεγονός που δίνει τη δυνατότητα να διαχωριστούν δείγματα ατόμων διαφορετικού γονιδιώματος.

Η μέθοδος RAPD έχει εφαρμοστεί για τη μελέτη της γενωμικής ποικιλότητας και την αναγνώριση γενετικών διαφορών μεταξύ πληθυσμών του ίδιου είδους (Cognato et al., 1995) από τα βακτήρια (Welsch et al., 1990) και τους μύκητες (Lanfanco et al., 1995) έως τα φυτά (Mailier et al., 1994) και τα θηλαστικά πχ. σε ποντίκια (Welsch et al., 1991) αλλά και για τη μελέτη άγνωστων γονιδιωμάτων. Ωστόσο, πρέπει να αναφερθεί ότι η μέθοδος δεν δίνει πάντοτε αξιόπιστα αποτελέσματα διότι μικρές αλλαγές στη συγκέντρωση των εκκινητικών μορίων, στην αλατότητα των διαλυμάτων, στη θερμοκρασία υβριδισμού των εκκινητικών μορίων με την συμπληρωματική αλυσίδα στόχο του DNA μπορεί να οδηγήσουν σε διαφορετικά πρότυπα. Επιπλέον, υπάρχει πιθανότητα κλάσματα διαφορετικών τμημάτων του γενώματος να μεταναστεύουν μαζί, είτε διαφορετικά τμήματα του γενώματος να καλύπτουν την ίδια θέση πάνω στο πήκτωμα της ηλεκτροφόρησης, με αποτέλεσμα η ανάλυση των γενετικών διαφορών να καθίσταται προβληματική.

β) *Expressed sequence tags (ESTs)*

Πρόκειται για μικρά τμήματα μιας ακολουθίας μιας κωδικοποιούσας ή μη πρωτεΐνης που έχει μεταγραφεί από μια αλληλουχία DNA και χρησιμοποιείται για την ταυτοποίηση μεταγράφων ενός γονιδίου. Οι αλληλουχίες EST εκτός από την εύρεση γονιδίων χρησιμοποιούνται και για τον προσδιορισμό της αλληλουχίας τους και δυνητικά για την εύρεση πολυμορφισμών. Αν και μια ακολουθία EST προκύπτει μετά από απευθείας αλληλούχιση κλωνοποιημένου mRNA, εντούτοις το κλάσμα της αλληλουχίας που προκύπτει δεν είναι αξιόπιστο όσον αφορά το μήκος αυτής της αλληλουχίας, ενώ ο αριθμός των νουκλεοτιδίων που δυνητικά χρησιμοποιούνται για την εύρεση EST ακολουθιών δεν ξεπερνά τις 500-800 βάσεις.

γ) *Variable Number of Tandem Repeats (VNTRs)*

Οι γονιδιακές θέσεις που είναι υπεύθυνες για τη δημιουργία των πρωτεϊνών, καλύπτουν μόνο το 3-4% της μάζας του ανθρώπινου γονιδιώματος (30.000350.000 γονιδιακοί επίτοποι). Στον άνθρωπο αλλά και σε άλλα θηλαστικά οι περισσότεροι πολυμορφισμοί συμβαίνουν στο υπόλοιπο 97-98% του γονιδιώματος, που δεν ευθύνεται για την παραγωγή πρωτεϊνών, αλλά σχετίζεται με δομικές και εσωτερικής λειτουργίας (αυτορρύθμιση) δραστηριότητες του γενετικού υλικού. Οι περισσότεροι πολυμορφισμοί που έχουν ταυτοποιηθεί αφορούν σε αλλαγές μόνο ενός νουκλεοτιδίου (Single Nucleotide Polymorphisms - SNPs), στο αποκαλούμενο "junk" DNA ("ασήμαντης" αξίας DNA). Οι περιοχές αυτές του γενετικού υλικού όπου παρατηρούνται οι πολυμορφισμοί βρίσκονται είτε εντός των γονιδίων που κωδικοποιούν για πρωτεΐνες, των εξονίων (exons), είτε μεταξύ των μη πρωτεΐνοπαραγωγών γονιδίων, των εσονίων (introns). Η ποικιλομορφία που εμφανίζεται στις συγκεκριμένες αυτές μη πρωτεΐνοπαραγωγές αλληλουχίες, δεν έχει ουσιώδη λειτουργική επίπτωση κατά τη διαδικασία μετάφρασης του μορίου του DNA. Οι περιοχές αυτές αποτελούνται από συχνά επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες ("DNA repeats"). Από αυτές προκύπτουν οι τυχαία διαταγμένες επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες, οι οποίες μπορούν να εμφανίζουν από 10 έως και 100 σταθερά επαναλαμβανόμενα νουκλεοτίδια (Variable Number Tandem Repeats VNTRs) με μέγεθος 0.5-40kb και είναι μοναδικές και ιδιαίτερες για κάθε άτομο συντελώντας στην εξέταση του γενετικού αποτυπώματος (DNA fingerprinting) ενός οργανισμού. Το χαρακτηριστικό των αλληλουχιών αυτών είναι ότι επαναλαμβάνονται πολλές φορές και είναι τοποθετημένες ή μια μετά την άλλη έτσι ώστε το τέλος της μιας

αλληλουχίας να είναι η αρχή της επόμενης. Έτσι, προκύπτει ένας μεγάλος αριθμός αλληλομόρφων επειδή το συνολικό μέγεθος της επανάληψης μπορεί να διαφέρει από χρωμόσωμα σε χρωμόσωμα.

Ένα κλάσμα των αλληλουχιών αυτών στον άνθρωπο αποτελείται από απλές επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες (Simple Tandem Repeats - STRs), τις περισσότερες φορές δινουκλεοτιδικής αρχής (πχ. CGCGCGCG), αλλά και τρι-, τετρανουκλεοτιδικής και οργανώνονται ως ζεύγος A,C στη μία έλικα και T,G στην άλλη έλικα. Τέτοιες αλληλουχίες της τάξης των 2-5 νουκλεοτιδικών τμημάτων είναι γνωστές ως μικροδορυφορικό DNA .

Εκτός των παραπάνω τεχνικών για την ανάλυση του γονιδιώματος και τη μελέτη του πολυμορφισμού των γονιδίων, έχουν αναπτυχθεί και άλλες μέθοδοι που εξετάζουν απευθείας το γενετικό υλικό. Μερικές από αυτές που χρησιμοποιούνται σήμερα για αυτό το σκοπό αναλύονται παρακάτω.

Γ) ΑΠΕΥΘΕΙΑΣ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΣΗ DNA (DNA SEQUENCING)

Η τεχνική DNA sequencing χρησιμοποιεί αναλυτικές συσκευές και με τη βοήθεια κατάλληλα διαμορφωμένων και αυτοματοποιημένων προγραμμάτων επιτυγχάνεται η ανεύρεση πολυμορφισμών σε συγκεκριμένη περιοχή του γονιδιώματος, ενώ υπάρχει πιθανότητα εντοπισμού και μη γνωστών πολυμορφισμών.

Τα μειονεκτήματα της μεθόδου είναι τα εξής:

1. Αρκετές περιοχές του γονιδιώματος είναι δύσκολο να αλληλουχηθούν διότι περιέχουν μεγαλύτερο αριθμό σε βάσεις G/C.
2. Απαιτείται αλληλούχιση και προς τις δύο κατευθύνσεις του συγκεκριμένου τμήματος του γονιδίου που εξετάζεται προκειμένου να ελαχιστοποιηθούν τα σφάλματα, ειδικότερα όταν το μήκος του εξεταζόμενου τμήματος είναι σχετικά μεγάλο.
3. Είναι αρκετά δαπανηρή μέθοδος για τη μελέτη απλών πολυμορφισμών.
4. Είναι δύσκολο να αναλυθούν και να διαχωριστούν τα ετερόζυγα άτομα.

Δ) Ένζυμα περιορισμού - RESTRICTION FRAGMENT LENGTH POLYMORPHISM (RFLP)

α) Southern blotting RFLP

Η μέθοδος βασίζεται στη χρήση ενζύμων τα οποία κόβουν το γονιδίωμα σε συγκεκριμένες θέσεις. Για τα τμήματα που προκύπτουν μετά την κοπή χρησιμοποιούνται τμήματα ανιχνευτών (probes) οι οποίοι προσκολλώνται ταυτόχρονα σε πολλές διαφορετικές θέσεις και υβριδοποιούνται με το τμήμα του γονιδίου που αναλύεται για την εύρεση πολυμορφισμών (minisatellites). Η μέθοδος δίνει αρκετά καλά αποτελέσματα καθώς διαχωρίζονται πολύ εύκολα τα ετερόζυγα άτομα. Βασικά μειονεκτήματα της μεθόδου είναι ότι απαιτεί μεγάλες σχετικά ποσότητες γενομικού DNA περίπου 5 μικρογραμμάρια, η υβριδοποίηση των probes με το κλάσμα του γενομικού DNA είναι αρκετά επίπονη εργαστηριακή διαδικασία. Παρόλο το γεγονός ότι ανιχνεύεται ο πολυμορφισμός του εξεταζόμενου τμήματος του γονιδίου, δεν προσδιορίζεται η ακριβής θέση που εντοπίζεται ο πολυμορφισμός, ενώ για ανιχνευθεί πραγματικά πολυμορφισμός θα πρέπει να υπάρχει δημιουργία ή απώλεια μιας θέσης κοπής του περιοριστικού ενζύμου που χρησιμοποιείται σε σύγκριση με ήδη γνωστή θέση κοπής για το συγκεκριμένο ένζυμο.

β) PCR-RFLP

Η μέθοδος χαρακτηρίζεται από σχετικά χαμηλό κόστος είναι γρήγορη και δίνει καλά αποτελέσματα διαχωρίζοντας τους ομοζυγώτες από τα ετερόζυγα άτομα. Η PCR-RFLP με τροποποιημένους primers μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον εντοπισμό πολυμορφισμών που δεν δημιουργούν νέες ή προκαλούν απώλεια θέσεων κοπής για τα χρησιμοποιούμενα περιοριστικά ένζυμα.

E) Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP)

Η τεχνική αυτή αποτελεί πιο εξελιγμένη μορφή της τεχνικής RAPD και τυπικά μπορεί να ανιχνεύσει μεγαλύτερο αριθμό πολυμορφισμών σε κάθε αντίδραση σε σύγκριση με την ανάλυση RAPD και RFLP. Βασίζεται στη ταυτόχρονη κοπή γενομικού DNA με τη χρήση δύο περιοριστικών ενζύμων ένα εκ των οποίων κόβει πιο συχνά το γενωμικό υλικό (MseI, με αλληλουχία αναγνώρισης θέσης κοπής μήκους 4bp) και το άλλο πιο σπάνια (EcoRI, με αλληλουχία αναγνώρισης θέσης κοπής 6bp). Τα προϊόντα-κλάσματα που προκύπτουν μετά την κοπή συνδέονται με ειδικά μόρια προσαρμογής και τα αποτελέσματα απεικονίζονται σε πήκτωμα μετέ

από ηλεκτροφόρηση. Η ύπαρξη πολυμορφισμού ανιχνεύεται με την εμφάνιση στο πήκτωμα διαφορετικών ζωνώσεων. Επειδή, όμως ο αριθμός των ζωνών που εμφανίζονται στο πήκτωμα ταυτόχρονα είναι μεγάλος τα αποτελέσματα που λαμβάνονται συνήθως δεν είναι αξιόπιστα διότι μια ζώνη δεν μπορεί να διαχωρίσει τα διαφορετικά αλληλόμορφα που προέρχονται από τον ίδιο γενετικό τόπο.

ΣΤ) ALLELIC-SPECIFIC OLIGONUCLEOTIDE HYBRIDIZATION (ASO)

Η μέθοδος στηρίζεται στη χρήση ενός ολιγονουκλεοτιδίου το οποίο υβριδοποιείται με το μόριο-στόχο του DNA. Η ακινητοποίηση επιτυγχάνεται πάνω σε ειδική μεμβράνη και ανάλογα με τις διακυμάνσεις της θερμοκρασίας επιτυγχάνεται διαφορετικός βαθμός υβριδοποίησης. Το μόριο στόχος συνήθως είναι ενισχυμένο προϊόν της PCR και απαραίτητη προϋπόθεση για την λήψη αποτελεσμάτων με την παραπάνω μέθοδο είναι η χρήση ολιγονουκλεοτιδίων τα οποία ταιριάζουν απόλυτα και υβριδοποιούνται με τις νουκλεοτιδικές αλληλουχίες τόσο του άγριου όσο και του μεταλλαγμένου (mutant) τύπου. Η μέθοδος χρησιμοποιείται με πολύ καλά αποτελέσματα καθώς κάνει πολύ καλό διαχωρισμό των ετεροζυγωτικών ατόμων, ωστόσο παρουσιάζει τα εξής μειονεκτήματα:

A) απαιτεί πολύ καλή γνώση της ύπαρξης πολυμορφισμού στο συγκεκριμένο τμήμα του μορίου- στόχος, ενώ σε κάθε υβριδοποίηση εντοπίζεται η ύπαρξη ενός και μόνο πολυμορφισμού και

B) για την ανάγνωση των αποτελεσμάτων απαιτείται η χρήση ανιχνευτών οι οποίοι συνήθως είναι ραδιενεργοί.

Z) ALLELE-SPECIFIC PCR (Amplification Refractory Mutation System –ARMS)

Η μέθοδος στηρίζεται στο γεγονός ότι η προέκταση του 3'- άκρου με τη βοήθεια της Taq πολυμεράσης δεν είναι εφικτή όταν το ολιγονουκλεοτίδιο που χρησιμοποιείται δεν υβριδοποιείται απόλυτα με το πρότυπο DNA (template).

Αν και η μέθοδος είναι σχετικά απλή, δίνει γρήγορα αποτελέσματα και μπορεί να αναλύει ταυτόχρονα πολλά δείγματα απαιτεί συνεχώς βελτιστοποίηση των συνθηκών της PCR, δεν ανιχνεύει όλους τους πολυμορφισμούς και δεν δίνει αξιόπιστα αποτελέσματα διότι σύνθετα δείγματα DNA μπορεί να δώσουν παραπλανητικά αποτελέσματα.

H) DNA chips/ microarrays

Είναι η αντίστροφη ακριβώς μέθοδος της ASO. Διαφορετικά ολιγονουκλεοτίδια ακινητοποιούνται με μεγάλη πυκνότητα πάνω σε μια γυάλινη ή από νάιλον επιφάνεια. Μερικά ολιγονουκλεοτίδια είναι συμπληρωματικά των αλληλουχιών άγριου τύπου, ενώ άλλα είναι συμπληρωματικά των μεταλλαγμένων αλληλουχιών. Κάτω από συνθήκες υβριδοποίησης ραδιενεργά σημασμένο δείγμα DNA ξεπλένεται πάνω στο chip. Οι κηλίδες που εμφανίζονται αντιστοιχούν σε ολιγονουκλεοτίδιο, ραδιενεργά σημασμένο, το οποίο είναι συμπληρωματικό με την αλληλουχία άγριου τύπου καθώς υβριδοποιείται καλύτερα σε σχέση με την αλληλουχία μεταλλαγμένου DNA. Παρόμοια, όταν το ραδιενεργά σημασμένο ολιγονουκλεοτίδιο είναι μεταλλαγμένο υβριδοποιείται καλύτερα με μεταλλαγμένη αλληλουχία σε σχέση με αλληλουχία άγριου τύπου.

Η παραπάνω μέθοδος δίνει τη δυνατότητα να εντοπιστεί η ποικιλομορφία ολόκληρου του γονιδιώματος ενός οργανισμού και να αποκαλυφθούν νέοι πολυμορφισμοί. Ωστόσο, ο αριθμός των δειγμάτων που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την ανεύρεση όσο το δυνατόν περισσότερων πολυμορφισμών είναι μικρός. Στόχος της ανάλυσης είναι η ανίχνευση κηλίδων πάνω σε ειδικές πλάκες όπου τοποθετούνται τα δείγματα. Όσο μεγαλύτερος είναι ο αριθμός των κηλίδων που εντοπίζονται τόσο μεγαλύτερος είναι ο βαθμός πολυμορφισμού του γονιδιώματος που εξετάζεται. Τα αποτελέσματα δίνονται άμεσα καθώς οι πληροφορίες των DNA/chips διαβάζονται και επεξεργάζονται από ειδικά αυτοματοποιημένα προγράμματα σε Η/Υ τα οποία αυξάνουν το κόστος της μεθόδου.

Θ) Denaturing High Pressure Liquid Chromatography (DHPLC)

Η μέθοδος βασίζεται στο γεγονός ότι τα ετεροδιμερή μόρια DNA εκλούνται πιο γρήγορα από στήλη HPLC σε σύγκριση με ομοδιμερή μόρια. Αρχικά το δείγμα DNA θερμαίνεται, στη συνέχεια ψύχεται με το μόριο DNA αναφοράς σχηματίζοντας ετεροδιμερή καθώς και ομοδιμερή μόρια ανάλογα με το αν το δείγμα DNA διαφέρει ή όχι από το μόριο DNA αναφοράς. Όταν ο ανάμικτος πληθυσμός των μορίων DNA αναλύεται σε στήλη HPLC κάτω από θερμοκρασίες που μερικώς αποδιατάσσουν τα μόρια DNA, τότε τα ετεροδιμερή μόρια DNA εκλούνται από τη στήλη πιο γρήγορα σε σχέση με τα ομοδιμερή επειδή ακριβώς τα ετεροδιμερή αποδιατάσσονται σε χαμηλότερες θερμοκρασίες. Η μέθοδος χρησιμοποιείται όχι μόνο για τον καθορισμό

της ετεροζυγωτίας που παρατηρείται σε ένα μόνο άτομο αλλά μπορεί να χρησιμοποιηθεί ταυτόχρονα σε πολλαπλά δείγματα για την ταυτοποίηση της ποικιλομορφίας μεταξύ των ατόμων. Με την παραπάνω μέθοδο είναι δυνατή η ανίχνευση πολυμορφισμών μορίων DNA μήκους μέχρι 700bp, ωστόσο απαιτείται περαιτέρω αλληλούχιση του μορίου-στόχου ώστε να προσδιοριστεί η φύση της μετάλλαξης που εντοπίστηκε. Αν και η μέθοδος είναι αυτοματοποιημένη και τα αποτελέσματα μπορούν να λαμβάνονται αρκετά γρήγορα, απαιτείται ειδικός εργαστηριακός εξοπλισμός που αυξάνει το κόστος χρήσης της.

I) TAQ-MAN

Η μέθοδος αυτή στηρίζεται σε 3 αρχές:

A) όταν η Taq πολυμεράση δημιουργήσει μια συμπληρωματική αλυσίδα εκτοπίζει οποιαδήποτε προϋπάρχουσα συμπληρωματική αλληλουχία ξεκινώντας με κατεύθυνση από το 5'-άκρο,

B) εάν ένα ολιγονουκλεοτίδιο φέρει προσδεδεμένα ταυτόχρονα μια φθορίζουσα χρωστική (normal) (R) και μια χρωστική Quencher (Q), η φθορίζουσα χρωστική θα φθορίζει ασθενώς λόγω ύπαρξης της χρωστικής Q και

Γ) ολιγονουκλεοτίδια που ταιριάζουν απόλυτα με το μόριο-στόχο DNA υβριδίζονται τέλεια σε σχέση με ολιγονουκλεοτίδια που δεν παρουσιάζουν ομολογία.

Μετά τον πολυμερισμό και την αντίδραση Taq-Man PCR όταν και οι δύο χρωστικές είναι προσκολλημένες στον ολιγονουκλεοτιδικό ανιχνευτή η φθορίζουσα εκπομπή τους καταστέλλεται. Κατά τη διάρκεια των κύκλων επέκτασης της PCR η Taq DNA πολυμεράση εκτοπίζει προϋπάρχοντα συμπληρωματικά μόρια και διαχωρίζει σταδιακά την χρωστική αναφοράς από τον ανιχνευτή. Έτσι, η χρωστική (R) αναφοράς εκπέμπει φθορισμό ο οποίος ανιχνεύεται εύκολα. Συνήθως χρησιμοποιούνται δύο ανιχνευτές. Ένας που φέρει μπλε χρωστική και φέρει αυτούσια τη ολιγονουκλεοτιδική αλληλουχία και ένας που φέρει πράσινη χρωστική και αντιστοιχεί σε ολιγονουκλεοτίδιο μεταλλαγμένου τύπου.

K) Oligonucleotide Ligation assay (OLA)

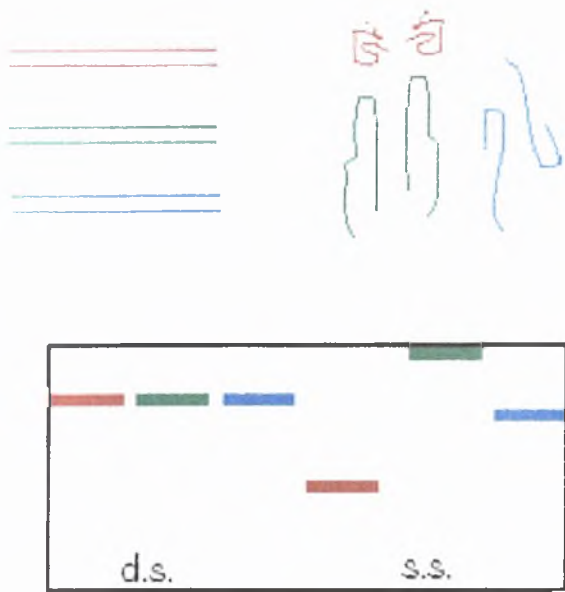
Η μέθοδος βασίζεται στο γεγονός ότι η επανασύνδεση των αποδιαταγμένων αλυσίδων από ένα δίκλωνο τμήμα DNA πραγματοποιείται μόνο όταν όλες οι βάσεις της συγκεκριμένης περιοχής του γονιδιώματος είναι απόλυτα συμπληρωματικές. Η

μέθοδος απαιτεί 3 ανιχνευτές. Έναν κοινό ανιχνευτή που φέρει μια φθορίζουσα χρωστική και υβριδίζεται στην αλυσίδα DNA αμέσως μετά από τη θέση που εντοπίζεται ο πολυμορφισμός και δύο διακριτούς ανιχνευτές που διαφέρουν σε μήκος και στην αλληλουχία του 3'-άκρου εκ των οποίων ο ένας είναι συμπληρωματικός με την αλληλουχία άγριου τύπου και ο δεύτερος με την μεταλλαγμένη αλληλουχία. Όταν το δείγμα DNA είναι άγριου τύπου τότε ο ανιχνευτής άγριου τύπου προσδένεται σε αυτό. Όταν το δείγμα DNA είναι μεταλλαγμένο τότε προσδένεται σε αυτό ο μεταλλαγμένος ανιχνευτής ενώ όταν το δείγμα είναι φορέας του μεταλλαγμένου τύπου τότε παρατηρείται πρόσδεση και των δύο ανιχνευτών. Μετά από την αντίδραση επανασύνδεσης τα προϊόντα μετουσιώνονται και κλασματώνονται με βάση το μέγεθός τους σε gel υψηλού διαχωρισμού. Αν και η μέθοδος είναι απλή στην εφαρμογή και μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ανάλυση πολλών δειγμάτων ταυτόχρονα εντούτοις τα αποτελέσματα μπορεί να είναι παραπλανητικά όταν χρησιμοποιούνται σύνθετα δείγματα. Επίσης απαιτείται πολύ καλή γνώση του πολυμορφισμού που παρουσιάζουν τα εξεταζόμενα δείγματα ενώ τα χρησιμοποιούμενα αντιδραστήρια έχουν εξαιρετικά υψηλό κόστος.

A) Single strand conformation polymorphism (SSCP)

Στην παρούσα εργασία ως μοριακή μέθοδος ανάλυσης του πολυμορφισμού του γονιδίου DRB2 χρησιμοποιήθηκε η ανάλυση του πολυμορφισμού μονόκλωνης αλυσίδας ενώ για την λήψη και ανάγνωση των αποτελεσμάτων χρησιμοποιούνται κατάλληλα αποδιατακτικά πηκτώματα πολυακρυλαμίδης τα οποία υπόκεινται σε ειδική χρώση. Αυτή περιλαμβάνει είτε προσθήκη ραδιενεργών είτε χρώση με νιτρικό άργυρο. Συνήθως και για μεγαλύτερη ασφάλεια χρησιμοποιείται η χρώση νιτρικού αργύρου. Είναι γνωστό ότι η κινητικότητα των δίκλωνων μορίων DNA σε πήκτωμα εξαρτάται από το μήκος και το μέγεθος αλλά είναι σχετικά ανεξάρτητη από το είδος της νουκλεοτιδικής αλυσίδας. Η κινητικότητα των μονόκλωνων αλυσίδων, ωστόσο επηρεάζεται αξιοσημείωτα από πολύ μικρές αλλαγές της αλληλουχίας, πιθανώς ακόμη και από μία αλλαγή σε σύνολο αρκετών εκατοντάδων βάσεων. Οι μικρές αλλαγές είναι αξιοσημείωτες εξαιτίας της ασταθούς φύσης του μονόκλωνου μορίου DNA. Αυτό συμβαίνει διότι απουσία της συμπληρωματικής αλυσίδας, το μονόκλωνο τμήμα μπορεί να υποστεί διμερισμό με τμήμα της ίδιας αλληλουχίας, δημιουργώντας με αυτό τον τρόπο βρόγχους και αναδιπλώσεις οι οποίες δίνουν στη μονόκλωνη

αλυσίδα μοναδική τριτοταγή δομή. Η μέθοδος SSCP εκμεταλλεύεται την παραπάνω ιδιότητα των μονόκλωνων μορίων DNA και περιλαμβάνει ηλεκτροφορητικό διαχωρισμό μονόκλωνων αλυσίδων νουκλεϊνικών οξέων. Βασίζεται σε πολύ μικρές διαφορές της αλληλουχίας (ακόμη και διαφορά σε μία βάση), ιδιότητα η οποία τροποποιεί τη δευτεροταγή δομή και επηρεάζει την κινητικότητα των μορίων όταν διαπερνούν μέσα από πήκτωμα κάτω από την επίδραση ηλεκτρικής τάσης (Melcher, 2000)



Εικόνα 12. Στην ακόλουθη εικόνα φαίνεται η διαφορετική κινητικότητα που παρουσιάζουν τα δίκλινα μόρια DNA ίδιου μήκους από τα αντίστοιχα μονόκλινα μόρια ίδιας αλληλουχίας DNA.

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ SSCP

Η αρχή λειτουργίας της μεθόδου σε γενικές γραμμές περιλαμβάνει:

- διάσπαση του γενομικού DNA
- μετουσίωση των μορίων DNA με βασικό (αλκαλικό) διάλυμα
- ηλεκτροφόρηση σε ουδέτερο πήκτωμα πολυακρυλαμίδης
- μεταφορά σε νάιλον μεμβράνη
- υβριδισμό με μόρια ανιχνευτές (κλάσματα DNA συμπληρωματικά ή κλάσματα RNA που φέρουν ραδιενεργά μόρια τα οποία φθορίζουν κάτω από συνθήκες UV) είτε χρώση με κατάλληλες χρωστικές πχ. AgNO₃ (Orita et al., 1989).

Η όλη διαδικασία απαιτεί χαμηλή θερμοκρασία και κατάλληλες αποδιατακτικές συνθήκες. Οι αλυσίδες DNA αποκτούν τέτοια δομή ώστε μεταναστεύουν σύμφωνα με το σχήμα τους. Αλυσίδες διαφορετικών αλληλουχιών γενικά δεν έχουν το ίδιο σχήμα. Συνεπώς έχουν διαφορετική κινητικότητα στο πήκτωμα. Πρόσφατες μελέτες

έχουν δείξει ότι αυτή η διαφορά στη κινητικότητα των μορίων οφείλεται στην τριτοταγή παρά την δευτεροταγή τους μορφή. Η ευαισθησία της τεχνικής έγκειται γενικά στην αναλογία μεγέθους των κλασμάτων ssDNA. ssDNA αλυσίδες έως 750bp αναλύονται επιτυχώς. Τροποποιώντας συνθήκες όπως αλλαγή της θερμοκρασίας, σύνθεση του ρυθμιστικού διαλύματος (buffer) και του πηκτώματος καθώς και συνθήκες που τρέχουν τα δείγματα μπορούμε να πάρουμε πληροφορίες για όλες τις διαφορές που προκύπτουν μεταξύ των δειγμάτων. Τρία χαρακτηριστικά που μπορούν να επηρεάσουν τις συνθήκες SSCP ανάλυσης είναι:

1.-Το μήκος του πηκτώματος (μικρά σε διαστάσεις πηκτώματα δίνουν ευθύγραμμες ζώνες που πλησιάζουν τις πραγματικές διαστάσεις των μορίων και η μετακίνηση τους είναι πιο γρήγορη)

2.-Το μέγεθος του προϊόντος PCR (η σχέση μοριακού βάρους με την απόσταση μετακίνησης δεν είναι ακριβής αλλά υπάρχει η θεωρία ότι μικρότερα προϊόντα PCR τρέχουν πιο γρήγορα). Σε βέλτιστες συνθήκες το μέγεθος των κλασμάτων DNA θα πρέπει να κυμαίνεται από 150-300 bp ενώ η SSCP ανάλυση για RNA επιτρέπει μεγαλύτερο μέγεθος κλασμάτων (Wagner, 2002).

3.-Το δυναμικό εφαρμογής (παίζει ρόλο στο σχηματισμό πιο γραμμικών ζωνών).

4.-Η κινητικότητα των μονόκλωνων αλυσίδων εξαρτάται από τη θερμοκρασία. Για καλύτερα αποτελέσματα η ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων πρέπει να συμβαίνει κάτω από σταθερή θερμοκρασία και τέλος,

5.- έχει βρεθεί ότι η ευαισθησία της μεθόδου SSCP εξαρτάται και από τις συνθήκες pH. Τα δίκλινα μόρια DNA συνήθως αποδιατάσσονται μετά από έκθεσή τους σε βασικό περιβάλλον και επομένως σε υψηλό pH. Οι Kukita et al., 1997 απέδειξαν ότι με την προσθήκη γλυκερόλης στο πήκτωμα πολυακρυλαμίδης ελαττώνεται η τιμή του pH του διαλύματος ηλεκτροφόρησης που καθορίζεται από την παρουσία του ρυθμιστικού διαλύματος Tris-HCl, με αποτέλεσμα να αυξάνεται η ευαισθησία της SSCP ανάλυσης και να λαμβάνονται πιο ευδιάκριτα αποτελέσματα.

ΠΛΕΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ ΜΕΘΟΔΟΥ SSCP

Η μέθοδος είναι απλή, φθηνή, ευαίσθητη και ικανή να προσδιορίζει εάν κλάσματα DNA είναι πανομοιότυπα σε αλληλουχία ή όχι χρησιμοποιώντας μία μόνο αντίδραση PCR (Sunnucks et al., 2000), ενώ κάτω από σταθερές εργαστηριακές συνθήκες ανιχνεύονται όλες οι δυνατές αλλαγές βάσεων σε ποσοστό που φθάνει το 80-90% (Wagner, 2002). Έτσι, αποφεύγεται η διαδικασία περαιτέρω αλληλούχισης (sequencing). Είναι αρκετά ευέλικτη μέθοδος προσδιορισμού διαφορών μεταξύ δύο ή περισσότερων αλληλουχιών καθώς δεν απαιτείται εξειδικευμένος εξοπλισμός. Δεν απαιτείται κάποιο ένζυμο προκειμένου να πραγματοποιηθεί κάποια αντίδραση και απαιτείται ελάχιστος εξοπλισμός για την βελτιστοποίηση των αποτελεσμάτων. Επιπρόσθετα, το προϊόν PCR μπορεί να αναλυθεί τόσο για το μήκος όσο και την ποικιλομορφία της αλληλουχίας του, να ξαναχρησιμοποιηθεί σε άλλες εφαρμογές ή να απομονωθεί για περαιτέρω αλληλούχιση.

Η μέθοδος εφαρμόζεται ευρέως στην κλινική διάγνωση σε συνδυασμό με διαδικασίες αλληλούχισης (sequencing), καθώς πολλές ασθένειες σχετίζονται με σπάνιες μεταλλάξεις οι οποίες μπορούν να ανιχνευθούν με την παραπάνω μέθοδο. Αυτό είναι ιδιαίτερα κρίσιμο σημείο διότι σε κλινικό επίπεδο αποτυχία προσδιορισμού αλλαγής μιας βάσης μπορεί κυριολεκτικά να αποτελέσει θέμα ζωής ή θανάτου. Ωστόσο, μέχρι σήμερα στην πληθυσμιακή γενετική λίγες μελέτες έχουν γίνει με τη χρήση της παραπάνω μεθόδου. Κύριος στόχος σε τέτοιες μελέτες ουσιαστικά είναι ο υπολογισμός του αριθμού των γενετικών διαφορών μεταξύ των ατόμων ή ομάδων ατόμων. Κατά συνέπεια, μικρός αριθμός μη προσδιοριζόμενων διαφορών ουσιαστικά να μην έχει ανατρεπτικό αποτέλεσμα όσον αφορά τα χαρακτηριστικά των ατόμων. Σε σύγκριση μάλιστα με την μέθοδο PCR-RFLP, η SSCP μπορεί να ανιχνεύσει μεγαλύτερο αριθμό διαφορών. Εφαρμογή της μεθόδου SSCP έχει γίνει για έλεγχο γενετικών διαφορών σε περιοχές μικροδορυφορικού DNA μεταξύ πληθυσμών καγκουρά από περιοχές της Αυστραλίας. Από την παραπάνω διαδικασία προέκυψε ότι παρά το ίδιο μήκος γονιδιώματος των αλληλομόρφων που εξετάστηκαν υπήρχε διαφορά ως προς την αλληλουχία μεταξύ των πληθυσμών και μάλιστα διαφορά και ως προς το μήκος των αλληλουχιών. Αυτό βοηθά στο να αποφεύγονται λανθασμένα συμπεράσματα για τις διαδικασίες εξέλιξης στους πληθυσμούς ατόμων.

3. ΑΝΤΙΓΟΝΙΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ

Το περιβάλλον περιλαμβάνει μια μεγάλη ποικιλία μολυσματικών μικροβίων-ιούς, βακτήρια, μύκητες, πρωτόζωα και πολυκύτταρα παράσιτα. Όλα αυτά μπορούν να προκαλέσουν νόσο και αν πολλαπλασιαστούν ανεξέλεγκτα, μπορεί τελικά να σκοτώσουν τον ξενιστή τους. Οι περισσότερες μολύνσεις στα φυσιολογικά άτομα είναι μικρής διάρκειας και δεν αφήνουν σημαντική βλάβη. Αυτό οφείλεται στο ανοσοποιητικό σύστημα, το οποίο καταπολεμά τους μολυσματικούς παράγοντες. Επειδή, ακριβώς, υπάρχουν πολλά είδη μικροοργανισμών απαιτείται και μεγάλη ποικιλία ανοσοποιητικών αποκρίσεων για να είναι δυνατή η αντιμετώπιση κάθε είδους μόλυνσης. Διακρίνονται δύο είδη ανοσοποιητικής απόκρισης: η έμφυτη ανοσία και οι προσαρμοζόμενες ανοσοποιητικές αποκρίσεις. Η διαφορά ανάμεσα στα δύο είδη είναι ότι η προσαρμοζόμενη απόκριση σε εξωκυτταρικό παθογόνο εμφανίζει υψηλή εξειδίκευση γεγονός που σημαίνει ότι το προσαρμόσιμο ανοσοποιητικό σύστημα "θυμάται" τον μολυσματικό παράγοντα και μπορεί να τον εμποδίσει να προκαλέσει νόσο. Επομένως, τα δύο κύρια χαρακτηριστικά της προσαρμοζόμενης ανοσοποιητικής απόκρισης είναι η *εξειδίκευση* και η *μνήμη*. Τα κύτταρα που εμπλέκονται στις προσαρμοζόμενες ανοσοποιητικές αποκρίσεις ενός οργανισμού και τα οποία ανήκουν στην ομάδα των λευκοκυττάρων είναι τα *λεμφοκύτταρα*. Τα κύτταρα αυτά έχουν την ικανότητα να αναγνωρίζουν με αυστηρή εξειδίκευση συγκεκριμένα παθογόνα είτε αυτά βρίσκονται μέσα σε κύτταρα του ξενιστή είτε έξω, στα υγρά του σώματος ή στο αίμα. Τα λεμφοκύτταρα διακρίνονται με τη σειρά τους στα Β και Τ-λεμφοκύτταρα. Όλα πάντως προέρχονται από προγονικά κύτταρα του μυελού των οστών, αλλά στη συνέχεια τα Τ λεμφοκύτταρα εξελίσσονται στο θύμο αδένα, ενώ τα Β στο μυελό των οστών σε ενήλικα άτομα θηλαστικών. Τα Β λεμφοκύτταρα είναι γενετικά προγραμματισμένα να κωδικοποιούν για έναν υποδοχέα στην επιφάνειά τους, ειδικό για ένα συγκεκριμένο αντιγόνο. Όταν αναγνωρίσουν το αντιγόνο τους, τα κύτταρα αυτά πολλαπλασιάζονται και διαφοροποιούνται σε πλασματοκύτταρα, τα οποία εκκρίνουν μεγάλες ποσότητες ενός υποδοχέα σε διαλυτή μορφή, τα γνωστά αντισώματα, τα οποία συνδέονται με τα αντιγόνα που ενεργοποίησαν αρχικά την παραγωγή των Β λεμφοκυττάρων. Από την άλλη πλευρά, τα Τ-λεμφοκύτταρα κατατάσσονται σε διαφορετικούς τύπους ανάλογα με τις ποικίλες λειτουργίες τους πχ. λεμφοκύτταρα που αλληλεπιδρούν με Β-λεμφοκύτταρα, με μονοπύρηννα φαγοκύτταρα (ονομαζόμενα βοηθητικά Τ-λεμφοκύτταρα) καθώς και με κυτταροτοξικά Τ-λεμφοκύτταρα. Σε κάθε περίπτωση

τα T-λεμφοκύτταρα αναγνωρίζουν τα αντιγόνα αλλά μόνον όταν αυτά εκτίθενται στην επιφάνεια άλλων κυττάρων μαζί με τα ονομαζόμενα μόρια MHC (Major Histocompatibility Complex). Αυτό επιτυγχάνεται με τη βοήθεια ενός ειδικού υποδοχέα που ονομάζεται υποδοχέας του αντιγόνου του T-λεμφοκυττάρου (TCR – υποδοχέας). Στη συνέχεια τα T-λεμφοκύτταρα απελευθερώνουν διαλυτές κυτοκίνες οι οποίες μεταφέρουν μηνύματα σε άλλα κύτταρα, είτε επιδρούν άμεσα με διακυτταρικές αλληλεπιδράσεις προκειμένου να καταστρέψουν το αντιγόνο. Τα λεμφοκύτταρα εκφράζουν στην επιφάνειά τους χαρακτηριστικά πρωτεϊνικά μόρια “δείκτες” τα οποία μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη διάκριση των διαφόρων κυτταρικών υποπληθυσμών. Οι κυτταρικοί αυτοί δείκτες κατατάσσονται σε οικογένειες οι οποίες έχουν πιθανώς εξελιχθεί από λίγα προγονικά γονίδια. Αυτές οι οικογένειες οι οποίες ξεχωρίζουν με βάση τη μοριακή τους δομή περιλαμβάνουν τις ακόλουθες μεγάλες πρωτεϊνικές ομάδες:

A) την οικογένεια των ιντεγκρινών η οποία αποτελείται από ετεροδιμερή μόρια με α,β αλυσίδες,

B) τις σελεκτίνες (E, L και P) που εκφράζονται σε λεμφοκύτταρα και σε ενεργοποιημένα ενδοθηλιακά κύτταρα

Γ) τις πρωτεογλυκάνες με τυπικό εκπρόσωπο την CD44, τον παράγοντα νέκρωσης όγκων (TNF), την υπεροικογένεια των υποδοχέων του αυξητικού παράγοντα των νευρικών κυττάρων (NGF), την υπεροικογένεια των λεκτινών C-τύπου, τη υπεροικογένεια των διαμεμβρανικών υποδοχέων (πχ. II-6) και

Δ) την υπεροικογένεια των ανοσοσφαιρινών που περιλαμβάνει τους δείκτες CD2, CD3, CD4, CD8, **MHC I και MHC II** (Roitt, Brostoff, Male, Ανοσολογία, 2000).

ΑΝΤΙΓΟΝΑ ΤΟΥ ΜΕΙΖΟΝΟΣ ΣΥΜΠΛΕΓΜΑΤΟΣ ΙΣΤΟΣΥΜΒΑΤΟΤΗΤΑΣ (MHC)

Οι γενετικοί τόποι που εμπλέκονται στην απόρριψη των ξένων μικροοργανισμών και παθογόνων σχηματίζουν μια περιοχή γνωστή ως μείζον σύμπλεγμα ιστοσυμβατότητας (MHC).

Δεν έχει ακόμη προσδιοριστεί σαφώς το αρχέγονο γονίδιο που κωδικοποιεί για πρωτεΐνες των μορίων MHC. Ωστόσο, έχουν διατυπωθεί διάφορες θεωρίες για την προέλευση του. Η πρώτη υπόθεση υποστηρίζει ότι το μόριο MHC που εμφανίστηκε πρώτο στην ιστορία της εξέλιξης ανήκει στην τάξη II (Hughes et al., 1993), ενώ

σύμφωνα με άλλη θεωρία υποστηρίζεται ότι πρώτα δημιουργήθηκαν τα μόρια τάξης I ως αποτέλεσμα ανασυνδυασμού ανάμεσα στην καρβοξυτελική C-περιοχή μιας πρωτεΐνης, όμοιας με την αιμογλοβίνη, και τη πεπτιδοδεσμεύουσα περιοχή της πρωτεΐνης θερμικού σοκ, HSP-70 (Flaznik et al., 1991). Φυλογενετική ανάλυση που πραγματοποίησαν οι Hughes et al., 1993, έδειξε ότι υπάρχει σχέση ανάμεσα στις πρωτεϊνικές αλυσίδες που δομούν τα μόρια τάξης I και II και μάλιστα φάνηκε ότι το πρόδρομο MHC μόριο παρουσίαζε δομική ομοιότητα με τα μόρια MHC II τα οποία στη συνέχεια έδωσαν γένεση στα μόρια του MHC I (Hughes et. al., 1993; Lawlor et al., 1990 & Klein et al., 1993). Οι υποθέσεις ωστόσο αυτές δεν μπορούν να εξηγήσουν τη φύση του πρώτου γονιδίου που κωδικοποιεί για το MHC. Ο Ohno (1987) προτείνει ότι οι πρωτεΐνες προσκόλλησης που εντοπίζονται στη πλασματική μεμβράνη των κυττάρων (N-CAM) και εμπλέκονται στις διαδικασίες ανάπτυξης των οργανισμών και οργανογένεσης,. Από πολύ παλιά αποτελούσαν τα θεμελιώδη προγονικά μόρια του ανοσοποιητικού συστήματος και αυτό διότι παρουσιάζουν δομικές ομοιότητες με τη β₂-μικρογλοβουλίνη καθώς αποτελούνται από τέσσερις πρωτεϊνικές περιοχές.

Οι Hughes και Nei έχοντας υπόψη τους τα παραπάνω δεδομένα και στη προσπάθειά τους να βρουν τις εξελικτικές σχέσεις ανάμεσα στα μόρια τάξης I και II υπολόγισαν τον χρόνο διαχωρισμού των γονιδίων A και B που κωδικοποιούν τις αλυσίδες α, β αντίστοιχα του μορίου MHC II, ο οποίος κυμαίνεται μεταξύ 446 και 521 εκατομμυρίων ετών ανάλογα με την μέθοδο υπολογισμού (Hughes et al., 1990). Τα δεδομένα αυτά συνηγορούν υπέρ της παρατήρησης ότι οργανισμοί όπως τα αμφίβια τα οποία διαχωρίστηκαν πριν από 370 χρόνια διαθέτουν και τα δύο γονίδια A και B του MHC II. Ετσι, η παρουσία όλων των γονιδίων της τάξης I, II και III του MHC στο αμφίβιο *Xenopus* προτείνει ότι η περιοχή του γονιδιώματος που κωδικοποιεί για τα μόρια του MHC είναι τόσο παλιά, που υπολογίζεται σε 370 εκατομμύρια χρόνια ή και περισσότερο.

Το μοναδικό ανοσοποιητικό σύστημα στα ασπόνδυλα είναι το ενδογενές ανοσοποιητικό σύστημα. Το σύστημα αυτό, εκτός από το προσαρμόσιμο ανοσοποιητικό σύστημα με τα συστατικά μόρια των MHC, TCR και Ig γονιδίων καθώς και ενζύμων με δράση αντιγραφάσης όπως είναι η πρωτεΐνη RAG 1 απαντάται και στα σπονδυλωτά. Επιπλέον, έχει δειχθεί ότι τα παραπάνω πρωτεϊνικά συστατικά αυτού του ανοσοποιητικού συστήματος απουσιάζουν στα ασπόνδυλα αλλά και σε προγονικά σπονδυλωτά ψάρια του είδους *agnatha* (Klein et al., 1998; Matsunaga et

al., 1998). Έτσι, εξελικτικά αν και δεν υπάρχει σαφής μοριακός δείκτης που να προσδιορίζει τη σύνδεση του ανοσοποιητικού συστήματος των σπονδυλωτών με τα συστήματα αλληλοαναγνώρισης των ασπόνδυλων, το προσαρμόσιμο ανοσοποιητικό σύστημα φαίνεται να έχει προέλθει από τα προγονικά σπονδυλωτά με σιαγόνα πχ. καρχαρίες και σαλάχια αμέσως μετά τον εξελικτικό διαχωρισμό των ειδών agnatha (σπονδυλωτών άνευ σιαγόνων).

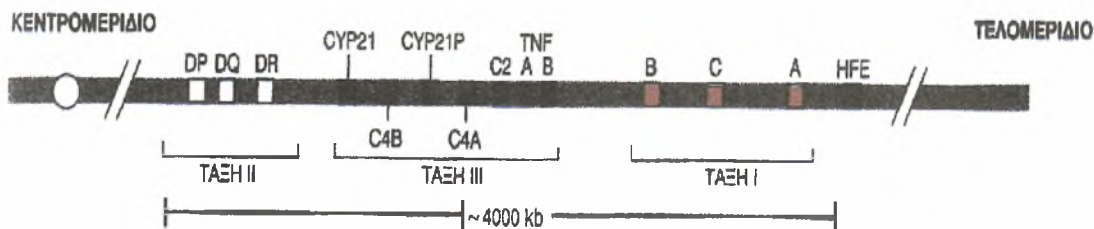
Όσον αφορά τα μόρια MHC σε αμφίβια και πτηνά αυτά παρουσιάζουν ομοιότητες με τα μόρια MHC των θηλαστικών ενώ σαφείς ενδείξεις για ύπαρξη πολυμορφισμού των μορίων MHC τάξης I και II υπάρχουν και για τα ερπετά. Ωστόσο, μεταξύ των θηλαστικών εντοπίζονται διαφορές μεταξύ των μορίων MHC και δεν είναι ξεκάθαρο αν αυτές είναι αποτέλεσμα κάποιου ιστορικού εξελικτικού γεγονότος ή κάποιας είδους επιλογή που ασκείται λόγω διαφορετικού τρόπου ζωής ή είναι αποτέλεσμα επιδράσεων του περιβάλλοντος.

Από μελέτες προσδιορισμού της συνολικής οργάνωσης των μορίων MHC του ανθρώπου και ποντικού αλλά και σε αρκετά είδη πτηνών, ιχθύων και αμφιβίων έχει προκύψει ότι, το MHC είναι μια πολυγονιδιακή οικογένεια (clusters) τουλάχιστον 200 γονιδίων (Penn et al, 1999), η οποία ενεργοποιείται ως απόκριση του ανοσοποιητικού συστήματος του οργανισμού σε μολυσματικές ασθένειες και κωδικοποιεί τρεις τάξεις μορίων (μόρια των τάξεων I, II και III). Τα μόρια αυτά είναι πρωτεΐνες –υποδοχείς, συνήθως γλυκοπρωτεΐνες, της επιφάνειας μιας ποικιλίας κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος οι οποίες προσδένουν κλάσματα πρωτεϊνών από τα κύτταρα του ανοσοποιητικού με αποτέλεσμα το σύμπλοκο να αναγνωρίζεται από τα T-λεμφοκύτταρα και να ενεργοποιεί το μονοπάτι της ανοσολογικής απόκρισης (Kappes et al., 1988, Ploegh et al., 1998) το οποίο περιλαμβάνει την ενεργοποίηση των T-λεμφοκυττάρων, τον γρήγορο πολλαπλασιασμό τους και την αυτόματη λύση των προσβεβλημένων κυττάρων ή των σχηματισμό αντισωμάτων (Klein, 1986; Falk et al.,1991).

Η ΟΡΓΑΝΩΣΗ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΩΜΑΤΟΣ ΤΟΥ MHC

Στον άνθρωπο τα μόρια του MHC κωδικοποιούνται από μια εκτεταμένη περιοχή του γενώματος η οποία καλύπτει μήκος περίπου 4 εκατομμυρίων βάσεων (bp) στο βραχύ άκρο του χρωμοσώματος 6 και ειδικότερα μεταξύ των θέσεων 6p21.31 και 6p21.32.1 (Naik, 2003). Η οικογένεια αυτή των γονιδίων του MHC σε θηλαστικά διακρίνεται σε τρεις κύριες υποοικογένειες: τα γονίδια τάξης I (HLA-A, HLA-B,

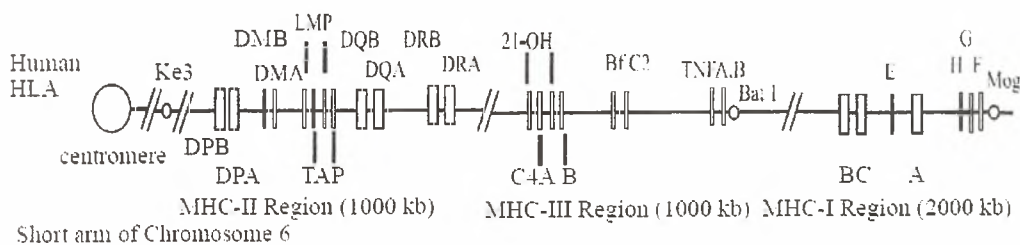
HLA-C), τα γονίδια τάξης II (DP, DQ, και DR) και τα γονίδια τάξης III όπως φαίνεται στην εικόνα που ακολουθεί.



Εικόνα 4.

Διάγραμμα του ανθρώπινου μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας στο βραχύ σκέλος του χρωμοσώματος 6. Αν και δεν έχει αποτυπωθεί σε κλίμακα, στο παραπάνω διάγραμμα φαίνονται οι σχετικές θέσεις μερικών από τα πιο σημαντικά γονίδια του συμπλέγματος συμπεριλαμβανομένων των γονιδίων της τάξης I HLA A, B, C και των γονιδίων της τάξης II DP, DQ και DR. (Αρχές Ιατρικής Γενετικής.

Thomas D. Geleluter, Francis S. Collins, David Ginsburg, Ιατρικές Εκδόσεις Πασχολίδη, Αθήνα 2003)



Εικόνα 5. Γενετικός χάρτης MHC

Ειδικότερα, στον άνθρωπο τα γονίδια που κωδικοποιούν τα μόρια MHC I και MHC II εντοπίζονται σε διαφορετικές περιοχές αλλά σε πολύ κοντινούς γενετικούς τόπους στο χρωμόσωμα 6. Τα προϊόντα των γονιδίων των τάξεων I και II σε γενικές γραμμές καλούνται ανθρώπινα λευκοκυτταρικά αντιγόνα (HLA από τα αρχικά human leucocyte antigens) και έχουν παρόμοια δομή. Τα HLA-DP γονίδια (DPA= γονίδια που κωδικοποιούν για την α αλυσίδα και DPB γονίδια που κωδικοποιούν για την β αλυσίδα) βρίσκονται πολύ κοντά στο κεντρομερίδιο στο βραχύ σκέλος του χρωμοσώματος 6 και συνδέονται με τα γονίδια που κωδικοποιούν για τα HLA-DM μόρια (DMA και DMB). Ανάμεσά τους και μεταξύ των DQ γονιδίων βρίσκονται τα LMP γονίδια που κωδικοποιούν για χαμηλού μοριακού βάρους πρωτεΐνες καθώς και

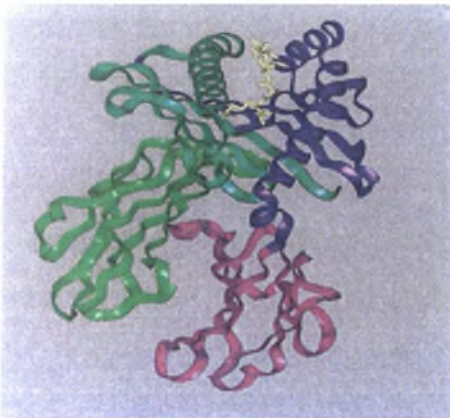
τα γονίδια TAP που κωδικοποιούν για πρωτεϊνικούς μεταφορείς του MHC που σχετίζονται με την παρουσίαση του αντιγόνου Αντίθετα, η περιοχή της τάξης III περιέχει περισσότερα από 20 γονίδια τα οποία εκτός των άλλων κωδικοποιούν για κάποια μόρια του συμπληρώματος (C2, C4, παράγων B) για την 21-OH υδροξυλάση καθώς και μόρια που εμπλέκονται στην επεξεργασία των αντιγόνων, ενώ δεν υπάρχουν επιβεβαιωμένες λειτουργικές ή δομικές ομοιότητες μεταξύ των προϊόντων των γονιδίων της τάξης III και των μορίων της τάξης I ή II.

ΓΕΝΕΤΙΚΟΙ ΤΟΠΟΙ ΤΗΣ ΤΑΞΗΣ I

Η περιοχή τάξης I στον άνθρωπο περιλαμβάνει τρεις γενετικούς τόπους που ονομάζονται HLA-A, HLA-B, HLA-C. Κάθε γενετικός τόπος κωδικοποιεί τη βαριά αλυσίδα ενός κλασικού αντιγόνου MHC τάξης I ενώ όλη η περιοχή του γονιδιώματος αποτελείται από περισσότερες από 1,5 εκατομμύριο βάσεις του DNA.

Η δομή των μορίων MHC της τάξης I

Το μόριο MHC I είναι μια μονομερής διαμεμβρανική πρωτεΐνη που διαπερνά μια φορά την κυτταρική μεμβράνη. Αποτελείται από μια γλυκοσυλιωμένη βαριά αλυσίδα (M.B 45kDa) που συνδέεται μη-ομοιοπολικά με τη β_2 - μικροσφαιρίνη (M.B 12kDa) η οποία είναι ένα πολυπεπτίδιο το οποίο βρίσκεται ελεύθερο στον ορό. Η βαριά αλυσίδα της τάξης I αποτελείται από τρεις εξωκυττάρειες επικράτειες που χαρακτηρίζονται ως $\alpha 1$ (N-άκρο), $\alpha 2$ και $\alpha 3$ και είναι γλυκοσυλιωμένες. Η κάθε μια αποτελείται από 90 περίπου αμινοξέα, μια υδρόφοβη διαμεμβρανική περιοχή από 25 αμινοξέα, τα οποία διαπερνούν την λιπιδιακή διπλοστιβάδα πιθανόν με μορφή α -έλικας και μια υδρόφιλη κυτταροπλασματική ουρά μήκους 30-40 αμινοξέων, η οποία μπορεί να φωσφορυλιωθεί *in vivo*.



Εικόνα 6. Τρισδιάστατη δομή του μορίου MHC τάξης I. (www.cryst.bbk.ac.uk/.../coadwell/004.htm)

Η συγκρότηση των αντιγόνων τάξης I λαμβάνει χώρα στο κοκκιώδες ενδοπλασματικό δίκτυο του κυττάρου. Στόχος των γλυκοπρωτεϊνών του συμπλόκου MHC I είναι να συλλέγουν από το βιοσυνθετικό μονοπάτι του κυττάρου κλάσματα πρωτεϊνών που συνθέτονται κατά την φυσιολογική απόκριση του κυττάρου μετά από προσβολή του από κάποιο παθογόνο ιό, ενδοκυτταρικό παράσιτο ή πρωτεϊνικό μόριο του ίδιου του κυττάρου (ενδογενή αντιγόνα που συνθέτονται στο κύτταρο-στόχο, και στη συνέχεια εκθέτουν τα μοριακά αυτά κλάσματα στην κυτταρική επιφάνεια. Το σύμπλοκο MHC I-πεπτιδίο το οποίο συνδέεται με την κυτταρική μεμβράνη του κυττάρου εκτίθεται πρώτα στο κύτταρο APC και στη συνέχεια στα T-λεμφοκύτταρα ενεργοποιώντας το κυτταρολυτικό μονοπάτι του αντιγονοπαρουσιαστικού κυττάρου ή την έκκριση κυτταροκινών από τα T-λεμφοκύτταρα. Η αλληλεπίδραση με τον TCR υποδοχέα είναι κατά κανόνα ειδική έτσι ώστε ο TCR να μην προσδέεται με μόρια MHC τα οποία δεν φέρουν τα κατάλληλα πεπτιδία. Τα πεπτιδία της τάξης I δημιουργούνται από πρωτεΐνες του κυτταρολήματος οι οποίες υφίστανται αποικοδόμηση στο πρωτεόσωμα. Το πρωτεόσωμα για το σκοπό αυτό, περιέχει πρωτεΐνες με ειδική δράση ενδοπεπτιδασών. Η μεταφορά των πεπτιδίων από το κυτόπλασμα στο ενδοπλασματικό δίκτυο πραγματοποιείται με τη βοήθεια της πρωτεΐνης TAP που είναι ένας εσωτερικός μεμβρανικός μεταφορέας και κωδικοποιείται από τα γονίδια TAP1 και TAP 2. Μετά τη μεταφορά μέσα στο ενδοπλασματικό δίκτυο τα πεπτιδία ενώνονται με τα μόρια της τάξης I. Η συγκρότηση των μορίων της τάξης I είναι μια πολύπλοκη διαδικασία η οποία περιλαμβάνει μοριακές συνοδούς όπως είναι η πρωτεΐνη καλνεξίνη. Αυτές οι πρωτεΐνες προωθούν και καθοδηγούν τη συναρμολόγηση ενός σταθερού συμπλέγματος αποτελούμενου από βαριά αλυσίδα τάξης I –β2 μικροσφαιρίνη-πεπτιδίο και το σύμπλεγμα μεταφέρεται στην επιφάνεια του κυττάρου. Τα συμπλέγματα της τάξης I, που δεν διαθέτουν τα παραπάνω πεπτιδία, είναι ασταθή και μη λειτουργικά.

ΓΕΝΕΤΙΚΟΙ ΤΟΠΟΙ ΤΑΞΗΣ II

Τα γονίδια του MHC I σε θηλαστικά διαφορετικών τάξεων δεν είναι ορθόλογα σε αντίθεση με τον γενετικό τόπο MHC II (Hughes et al., 1990). Ορθόλογα είναι τα γονίδια εκείνα που κωδικοποιούν για όμοιες ακολουθίες ίδιας λειτουργίας σε δύο διαφορετικούς οργανισμούς και διαχωρίζονται μετά από κάποιο γεγονός ειδογένεσης. Για παράδειγμα, ο γενετικός τόπος HLA-C απαντά μόνο στον άνθρωπο, το γορίλλα

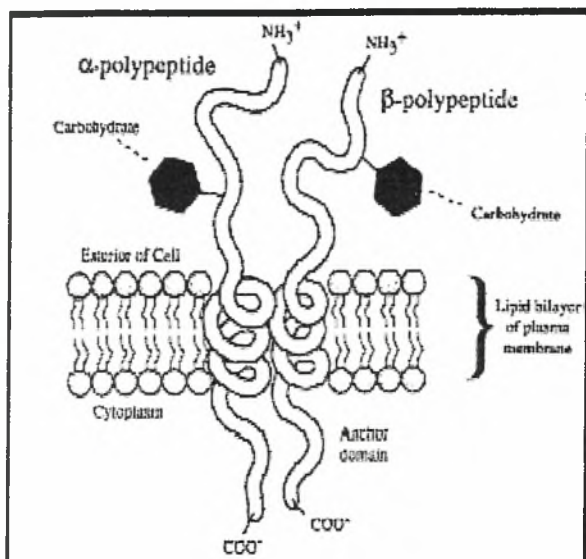
και τον χιμπατζή ενώ απουσιάζει σε άτομα μαϊμούδων (Boyson et al., 1996). Οι γενετικοί τόποι των MHC II φαίνεται λοιπόν να προέκυψαν πριν από το διαχωρισμό της τάξης των πλακουντοφόρων.

Εκτός των γενετικών τόπων HLA-DP, HLA-DM, LPM και TAP, στην περιοχή που κωδικοποιεί για το μόριο MHC II σημαντική θέση κατέχουν τα γονίδια HLA-DRA και HLA-DRB τα οποία κωδικοποιούν για τις αλυσίδες του HLA-DR μορίου το οποίο είναι το κυριότερο αντιγονοπαρουσιαστικό στοιχείο. Η οικογένεια των DR περιλαμβάνει μόνο ένα γονίδιο α (DRA) και μέχρι εννέα γονίδια β (DRB1-9), συμπεριλαμβανομένων και ψευδογονιδίων (1). Οι αριθμοί 1 έως 9 αντιστοιχούν στον αριθμό εξονίων που αποτελούν τον κάθε γενετικό τόπο. Μέσα στον γενετικό τόπο του DRB λαμβάνουν χώρα ποικίλες διαφορετικές ανακατατάξεις. Η οργάνωση και το μήκος της περιοχής DRB ποικίλλει στους διάφορους απλοτύπους εκφράζοντας διαφορετικό αριθμούς αλυσίδων β . Ο γενετικός τόπος DRB2 είναι ένα ψευδογονίδιο. Οι γενετικοί τόποι DRB1, DRB3 και DRB4 συνήθως εκφράζονται. Τα γονίδια DPA2, DPB2 και DQB3 είναι εν γένει ψευδογονίδια και επομένως δεν εκφράζονται ενώ αντίθετα τα γονίδια DNA, DOB, DQB2 και DQA2 μπορεί να είναι λειτουργικά.

Η δομή των μορίων MHC της τάξης II

Το μόριο του MHC II είναι ένα ετεροδιμερές, διαμεμβρανικό μόριο «κλειδί». Αποτελείται από μια βαριά αλυσίδα (α) και μια ελαφριά (β) γλυκοπρωτεϊνική αλυσίδα και εκφράζεται στα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα (Brown et al., 1993). Κάθε μια από τις πρωτεΐνες του έχει παρόμοιο μέγεθος. Οι α αλυσίδες έχουν μέγεθος από 30-34 Kd ενώ οι β αλυσίδες ανάλογα με τον γενετικό τόπο που εμπλέκεται κυμαίνονται περίπου από 26-29Kd. Η διαφορά στα MB οφείλεται στο διαφορετικό βαθμό γλυκοσυλίωσης των αλυσίδων.

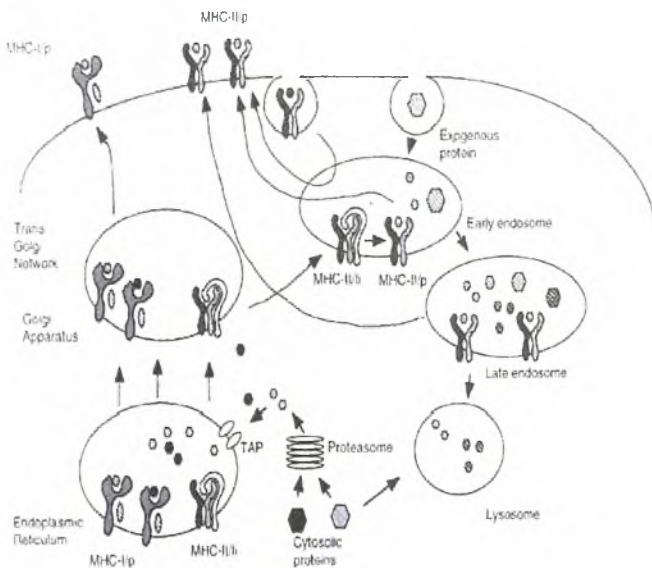
(1) *Ψευδογονίδια*: γονίδια που έχουν ομόλογες δομές με άλλα γονίδια, αλλά δεν είναι σε θέση όμως να εκφραστούν και επομένως είναι μη λειτουργικά



Εικόνα 7. Δομή του μορίου MHC II (www.nanomedicine.com/NMI/List.Figures.htm)

Για κάθε μια αλυσίδα έχει βρεθεί και το αντίστοιχο γονίδιο. Το γονίδιο A (DRA) για την α-αλυσίδα και το γονίδιο B (DRB) για την αλυσίδα B. Κάθε αλυσίδα έχει δύο εξωκυττάριας περιοχές. Οι περιοχές αυτές καλούνται alpha-1 ($\alpha 1$), alpha-2 ($\alpha 2$), beta-1 ($\beta 1$), και beta-2 ($\beta 2$) αντίστοιχα για κάθε μια πρωτεΐνη.

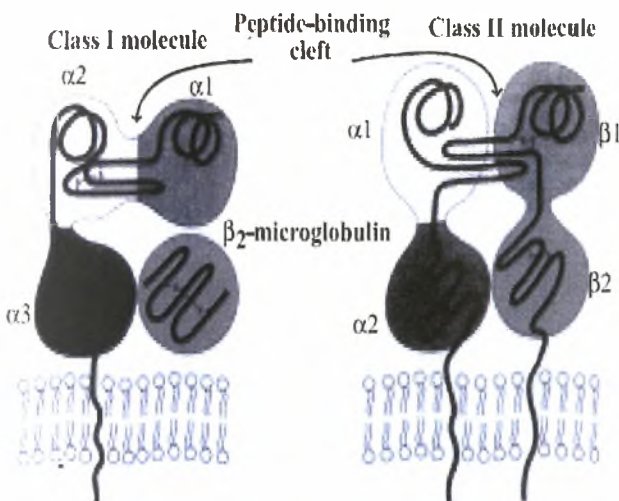
Τα τμήματα $\alpha 1$ και $\beta 1$ σχηματίζουν μια περιοχή σύνδεσης, την περιοχή PBR (peptide-binding region), στην οποία συνδέονται τα αντιγονικά πεπτίδια και αναγνωρίζονται από τους υποδοχείς των βοηθητικών T-κυττάρων. Οι δύο πρωτεΐνες του μορίου συνδέονται μεταξύ τους χωρίς την ύπαρξη ομοιοπολικών δεσμών. Οι αλυσίδες α και β των μορίων τάξης II εντοπίζονται στο αδρό ενδοπλασματικό δίκτυο συμπλεγμένες με ένα πολυπεπτίδιο που καλείται αμετάβλητη αλυσίδα (Ii). Αυτή η πρωτεΐνη κωδικοποιείται από ένα γονίδιο που δεν ανήκει στο MHC. Η αμετάβλητη αλυσίδα Ii έχει διττό ρόλο. Από τη μια δρα ως πρωτεΐνη μεταφορέας (chaperon) όπου μαζί με το ετεροδιμερές σύμπλεγμα $\alpha\beta$ -Ii μεταφέρεται μέσω του συμπλέγματος Golgi σε ένα όξινο ενδοσωμικό ή λυσοσωματικό διαμέρισμα όπου απελευθερώνεται η Ii. Από την άλλη προστατεύει την πεπτιδοδεσμεύουσα περιοχή του MHC II ούτως ώστε αυτή να μη δεσμεύει ενδογενή πεπτίδια αλλά προαιρετικά εξωγενή πεπτίδια. Η πρωτεΐνη Ii αποκόβεται από το σύμπλεγμα $\alpha\beta$ συνδεδεμένη με ένα πεπτίδιο με τη μορφή συμπλόκου Ii-CLIP και η όλη διαδικασία απαιτεί την παρουσία ενός μορίου όμοιου με το μόριο MHC II το οποίο καλείται HLA-DM. Το σύμπλεγμα $\alpha\beta$ παραμένει στο διαμέρισμα αυτό για 1-3 ώρες και στη συνέχεια μεταφέρεται στην επιφάνεια του κυττάρου όπου στη συνέχεια μέσω του TCR υποδοχέα αλληλεπιδρά με τα T-λεμφοκύτταρα και τα ενεργοποιεί. Συνοπτικά τα δύο μονοπάτια ανοσολογικής απόκρισης φαίνονται στην ακόλουθη εικόνα.



Εικόνα 8. Απεικόνιση του ενδογενούς και εξωγενούς μονοπατιού επεξεργασίας των αντιγόνων τάξης I και II. (Sita Naik, The human HLA System, J Indian Rheumatol Assoc 2003:11:79-83)

Η πεπτιδοδεσμεύουσα θέση PBR σε ένα μόριο MHC διαθέτει μια ποικιλία θυλάκων, αυλάκων επαρμάτων, εσοχών και εντυπωμάτων. Η ακριβής τοπογραφία της εξαρτάται από τη φύση των αμινοξέων μέσα στην αύλακα και επομένως ποικίλει από τον ένα απλότυπο στον άλλο.

Η παραπάνω θέση πρόσδεσης απαντάται τόσο σε μόρια MHC της τάξης I όσο και σε μόρια MHC της τάξης II με τη διαφορά ότι στην αύλακα της τάξης II τα άκρα της πολυπεπτιδικής αλυσίδας δεν είναι κλειστά και αυτό έχει ως αποτέλεσμα τα πεπτίδια που προσδέονται στα μόρια της τάξης II να προεξέχουν από τα άκρα της αύλακας.



Εικόνα 9. Δομή των μορίων MHC I και II στην οποία διακρίνονται οι θέσεις πρόσδεσης των πεπτιδίων I και II (Sita Naik, The human HLA System, J Indian Rheumatol Assoc 2003:11:79-83)

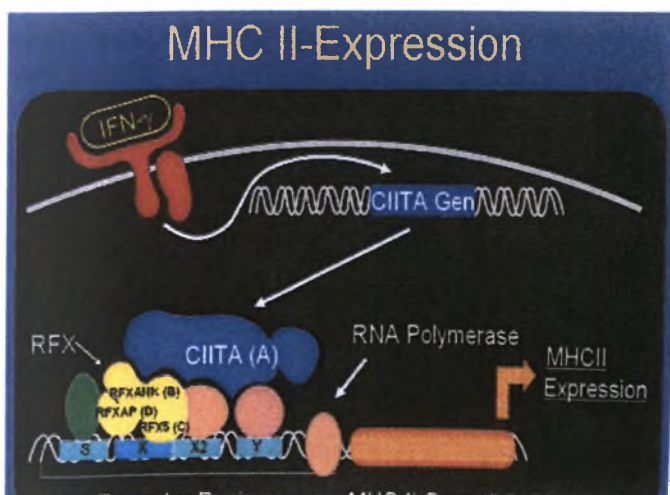
Έτσι τα μόρια της τάξης II τείνουν να είναι μεγαλύτερα σε μέγεθος-αριθμό αμινοξέων- περίπου 15 αμινοξέα. Σε πεπτίδια τάξης II έχουν προσδιοριστεί συντηρημένα σταθεροποιητικά αμινοξέα αν και η αποκάλυψη αυτών είναι πιο

δύσκολη από ότι των πεπτιδίων της τάξης I εξαιτίας των τεμαχισμένων άκρων τους και της πλέον ομαλής κατανομής των δεσμών οι οποίοι προσδένουν το πεπτίδιο στην αύλακα της τάξης II.

Στα άκρα της πεπτιδοδεσμεύουσας αύλακας παρατηρείται επίσης μια σημαντική διαφορά. Στα αντιγόνα της τάξης I αλληλεπιδράσεις στα καρβοξυ-και στα άμινο-τελικά άκρα περιορίζουν το πεπτίδιο μέσα στην αύλακα ενώ στα μόρια της τάξης II τα πεπτίδια μπορεί να προεξέχουν από τα άκρα της αύλακας.

ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΟΥ ΜΟΡΙΟΥ MHC II

Η έκφραση του MHC I και II πάνω στα κύτταρα ελέγχεται από διαλυτές κυτταροκίνες όπως είναι η ιντερφερόνη IFN- γ και ο παράγοντας νέκρωσης όγκων TNF. Ειδικότερα, η ρύθμιση της έκφρασης του μορίου εμφανίζεται πρωταρχικά σε μεταγραφικό επίπεδο. Το σηματοδοτικό μονοπάτι που οδηγεί σε έκφραση των γονιδίων του MHC II σε απόκριση στην ιντερφερόνη γ ξεκινά από την ενεργοποίηση των πρωτεϊνών κινάσων τυροσίνης JAK 1 και JAK 2. Οι ενεργοποιημένες JAK κινάσες φωσφορυλιώνουν σε κατάλοιπα τυροσίνης την πρωτεΐνη STAT 1 η οποία διμερίζεται. Έπειτα τα διμερή των STAT 1 μεταφέρονται στον πυρήνα. Εκεί, συνδέονται με τα στοιχεία μιας αλληλουχίας που καλείται GAS τα οποία έχουν ενεργοποιηθεί από την IFN- γ . Τα στοιχεία της αλληλουχίας GAS βρίσκονται στον προαγωγέα των γονιδίων που αποκρίνονται στην IFN- γ (Bach et al., 1997) Τα γονίδια αυτά κωδικοποιούν για δύο μεταγραφικούς παράγοντες. Τον μεταγραφικό παράγοντα IRF-1 και τον μεταγραφικό συν-ενεργοποιητή των μορίων της τάξης II, CIITA, ο οποίος αν και δεν συνδέεται άμεσα πάνω στις αλληλουχίες του προαγωγέα των γονιδίων του μορίου MHC II (Harada et al., 1989; Muhlethaler et al., 1998), εντούτοις σχηματίζει σύμπλοκα με παράγοντες όπως είναι ο RFX (εικόνα 10), επιτρέποντας την RNA πολυμεράση να ξεκινήσει τη διαδικασία της μεταγραφής των γονιδίων DR, DP, DQ του μορίου MHC II.



Εικόνα 10.

Το σηματοδοτικό μονοπάτι που ρυθμίζει την έκφραση των γονιδίων του μορίου MHC II. Η έκφραση του μορίου MHC επάγεται από την διαλυτή IFN- γ μέσα στον πυρήνα. (www.immunodefekt.de/cgi-bin/movies.cgi?id=9)

Μάλιστα, μελέτη των Giroux et al.(2003), έδειξε ότι η πρωτεϊνική κινάση PKC-α παίζει σημαντικό ρόλο στην έκφραση των μορίων MHC II, που επάγονται από την IFN- γ , καθώς ρυθμίζει την δράση του παράγοντα IRF-1, όσον αφορά την τρανσενεργοποίηση του προαγωγέα IV του παράγοντα CIITA. Όταν ο IRF-1 επαχθεί μέσω της PKC-α από την IFN- γ , τότε συνδέεται πάνω στις αλληλουχίες του προαγωγέα γνωστές ως ISREs (IFN-stimulated responsive elements) (Steimle et al., 1994) και στη συνέχεια επάγει τον παράγοντα CIITA.

ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΣ ΣΤΟ ΜΟΡΙΟ MHC

Ένα χαρακτηριστικό του MHC είναι ο υπερβολικά υψηλός βαθμός πολυμορφισμού και η δομική ποικιλότητα των μορίων που κωδικοποιούνται από αυτό. Ο πολυμορφισμός δεν είναι ομοιόμορφα κατανεμημένος σε όλο το MHC. Επικεντρώνεται συνήθως μέσα και γύρω από την πεπτιδοδεσμεύουσα αύλακα (PBR), έχει διαπιστωθεί όμως ότι το ποσοστό πολυμορφισμού μεταξύ των διαφόρων τάξεων και ειδών είναι κυμαινόμενο. Για παράδειγμα σε μελέτες των Swarbrick et al., 1995 στα προϊόντα των γονιδίων DRB στα είδη ελαφιού *Odocoileus virginianus* και *Cervus elaphus*, που κωδικοποιούν για τα αμινοξέα στις θέσεις 11 και 54 της PBR περιοχής του MHC, παρατηρήθηκε υψηλός βαθμός πολυμορφισμού. Μέσα σε ένα συγκεκριμένο μόριο της τάξης I ή της τάξης II ο δομικός πολυμορφισμός συσσωρεύεται σε συγκεκριμένες περιοχές του μορίου. Η μεταβλητότητα της αλληλουχίας των αμινοξέων στα αντιγόνα της τάξης I συσσωρεύεται σε τρεις κύριες περιοχές των επικρατειών α_1 και α_2 ενώ η επικράτεια α_3 φαίνεται πολύ συντηρημένη.

Ο αρχαιότερος, πολυμορφικά, γονδιακός τόπος του MHC II φαίνεται να είναι αυτός του HLA- DQA1 ενώ υπάρχουν ενδείξεις ότι τα γονίδια του MHC II υπόκεινται σε διαδικασίες "γένεσης και θανάτου" (Nei M et al., 1997). Αυτό σημαίνει ότι τα νέα γονίδια προκύπτουν από επαναλαμβανόμενο διπλασιασμό και μερικά από αυτά, όντας διπλασιασμένα διατηρούνται στο γονιδίωμα με τη μορφή αυτή για μεγάλο χρονικό διάστημα, ενώ άλλα διαγράφονται είτε χάνουν τη λειτουργικότητά τους λόγω καταστροφικών μεταλλάξεων. Η ιδέα αυτή έρχεται σε αντίθεση με τη θεωρία ότι η ποικιλομορφία του MHC II είναι σύμφωνη με τους μηχανισμούς εξέλιξης των πολυγονιδιακών οικογενειών των μορίων των υπόλοιπων τάξεων του MHC και των γονιδίων των ανοσοσφαιρινών (Ig). Τα αλληλόμορφα του MHC II φαίνεται ότι έχουν υψηλό ρυθμό σύνθεσης και αποικοδόμησης (turnover). Μάλιστα, η έλλειψη αντιστοιχίας αλληλομόρφων του, μεταξύ ανθρώπου και χιμπατζή, ο

εξελικτικός διαχωρισμός των οποίων συνέβη πριν από 5 εκατομμύρια χρόνια, δείχνει ότι τα αλληλόμορφα του MHC II υφίστανται συνεχώς τροποποιήσεις κατά τη διάρκεια της εξέλιξης των ειδών (Parham et al., 1996).

Στα μόρια της τάξης II ο βαθμός της μεταβλητότητας εξαρτάται από την υποπεριοχή και από την πολυπεπτιδική αλυσίδα. Για παράδειγμα, στον άνθρωπο, ο μεγαλύτερος πολυμορφισμός απαντάται στις αλυσίδες DRB και DQB ενώ οι αλυσίδες DPB εμφανίζουν λιγότερη ποικιλομορφία. Η αλυσίδα DQA είναι πολυμορφική ενώ η αλυσίδα DRA είναι ουσιαστικά αμετάβλητη, οι δε αλυσίδες DRA αντιπροσωπεύονται από δύο αλληλόμορφα. Σε μη αιμομικτικούς πληθυσμούς όπου τα άτομα διαθέτουν δύο MHC γονότυπους μπορούν να παραχθούν υβριδικά μόρια της τάξης II με μια αλυσίδα από κάθε γονότυπο. Αυτό δημιουργεί επιπλέον ποικιλομορφία και δομική ποικιλία εκφραζόμενων μορίων. Τα περισσότερα από τα πολυμορφικά αμινοξέα των αντιγόνων της τάξης I και II βρίσκονται στην κορυφή του μορίου στη μεγάλη αύλακα η οποία δρα ως πεπτιδοδεσμεύουσα θέση. Έτσι η ποικιλότητα επικεντρώνεται σχεδόν αποκλειστικά στη βάση της αντιγονοδεσμεύουσας αύλακας ή ξεχωρίζει από τις πλευρές της περιοχής της αέλικας (Roitt, Brostoff, Male, Ανοσολογία, 2000).

ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΠΟΥ ΕΥΘΥΝΟΝΤΑΙ ΓΙΑ ΤΟΝ ΥΨΗΛΟ ΒΑΘΜΟ

ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΥ ΤΩΝ ΜΟΡΙΩΝ MHC

Μελέτες έχουν δείξει ότι η διατήρηση της άφθονης γενετικής ποικιλότητας των αλληλομόρφων στο μόριο του MHC σε διάφορα ζωικά είδη ενισχύεται από παράγοντες όπως είναι η βαθμιαία συσσώρευση αυτόματων γενετικών αλλαγών κατά τη διάρκεια εξέλιξης των ειδών, οι διαδικασίες επιλογής που διατηρούν εκείνες τις γενετικές αλλαγές οι οποίες δεν επηρεάζουν την αλληλεπίδραση περιοχών των αντιγόνων MHC με τους TCR υποδοχείς καθώς και φαινόμενα ενδογονιδιακού (ενδοαλληλομορφικού) ή πιο σπάνια διαγονιδιακού ανασυνδυασμού των γονιδίων του MHC. Εκτός από τον υψηλό ρυθμό μεταλλαξιγένεσης και την αναστροφή τμημάτων γονιδίων πάνω στο ίδιο χρωμόσωμα έχουν διατυπωθεί διάφορες θεωρίες που εξηγούν τον υψηλό βαθμό πολυμορφισμού των γενετικών τόπων του MHC. Η πρώτη θεωρία στηρίζεται στην επιλεκτική υπερκυριαρχία (overdominant selection) εκείνων των γενετικών τόπων του MHC που καθιστούν τα ετερόζυγα άτομα ικανά να αποφεύγουν αντιξοότητες που προκαλούν οι διαταραχές του περιβάλλοντος (Lerner, 1954; Zouros et al., 1980).

Από τη στιγμή που τα παθογόνα αντιγόνα έχουν πολλαπλά επιτόπια θα πρέπει και τα μόρια του MHC να υποστούν ανάλογη προσαρμογή. Εδώ η θέση των ετεροζυγωτικών ατόμων είναι πλεονεκτική σε σχέση με τα ομόζυγα άτομα για τα μόρια MHC (Flaherty et al., 1988). Δύο χαρακτηριστικά παραδείγματα που έχουν μέχρι σήμερα αναφερθεί και δείχνουν την πλεονεκτική υπεροχή του ετεροζυγώτη σε μολυσματικές ασθένειες όσον αφορά τον άνθρωπο είναι ο συγκεκριμένος γονότυπος που εμφανίζεται σε άτομα που έχουν προσβληθεί από τη ασθένεια του HIV (Hepatitis Infection Virus) (Carrington et al., 1999) καθώς και από την ασθένεια του HBV (Hepatitis B Virus) (Thursz et al., 1997).

1. Μηχανισμοί που εξαρτώνται από την παρουσία παθογόνων

Η επιλογή που ασκείται από την παρουσία παθογόνων φαίνεται ότι ευνοεί τους σπάνιους γονότυπους του MHC και αυτό συμβαίνει διότι τα παθογόνα είναι ικανά να αναπτύσσουν μηχανισμούς ώστε με χαρακτηριστική επιδεξιότητα να αποφύγουν την ανοσοποίησή τους από τα μόρια του MHC που κωδικοποιούνται από τους συνήθεις γονότυπους (Potts et al., 1993). Δεν υπάρχουν πολλά μοντέλα που έχουν προταθεί να υποστηρίξουν τη σχέση της ποικιλομορφίας των μορίων MHC με τη μείωση πληθυσμών ατόμων που έχουν προσβληθεί από συγκεκριμένες ασθένειες που οφείλονται σε παθογόνα. Ωστόσο, τα πιο καλά μελετημένα παραδείγματα που υποστηρίζουν τη παραπάνω σχέση είναι της ασθένειας του Marek's σε κοτόπουλα (Briles et al., 1983), η παρουσία παρασίτων στο πρόβατο της ποικιλίας Soay (Paterson et al., 1998) και η ασθένεια της ελονοσίας στον άνθρωπο (Hill et al., 1991). Αντίθετα, στο πρόβατο *Ovis Canadensis* (Gustavo et al., 2001) και στους κάστορες και τα ελάφια των ειδών *Capreolus capreolus* και *Alces Americana* (Mikko et al., 1999) στα οποία εκδηλώνονται επιδημικές ασθένειες από παθογόνα παρά το γεγονός ότι παρουσιάζουν χαμηλή γενετική ποικιλομορφία στο μόριο του MHC, παρατηρήθηκε αυξημένη εξάπλωση των πληθυσμών σε περιοχές της Σουηδίας κατά τη διάρκεια του τελευταίου αιώνα, προτείνοντας ότι μηχανισμοί που δεν επιδρούν άμεσα στο γονιδίωμα μπορούν να επιφέρουν αλλαγές στο μέγεθος των φυσικών πληθυσμών ενός είδους.

2. Μηχανισμοί που δεν εξαρτώνται από την παρουσία παθογόνων

Το ζευγάρισμα (mating preference) μεταξύ των ατόμων εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από την ικανότητα να έρθουν σε επαφή μεταξύ τους. Πρώτο κριτήριο για

ζευγάριωμα αποτελεί η υγεία και ευρωστία των ατόμων τα οποία φέρουν αλληλόμορφα που δεν φέρουν αρνητικές μεταλλάξεις και οι φαινοτυπικές τους ιδιότητες δεν έχουν επηρεαστεί από την παρουσία παθογόνων -υπόθεση του κινούμενου στόχου- σύμφωνα με τους Penn et al., 1999. Εκτός αυτού όμως καθοριστικό ρόλο στη διαδικασία του ζευγαρώματος φαίνεται ότι παίζουν και τα μόρια του MHC. Στην περίπτωση αυτή, ο πολυμορφισμός των μορίων MHC λειτουργεί ως ένας μηχανισμός ώστε να αποφεύγεται η διασταύρωση μεταξύ συγγενικών ατόμων του είδους όπως πχ. το ασυμβίβαστο στα φυτά ή όπως συμβαίνει πχ. με διάφορες οσμές που προσελκύουν ή απωθούν το ζευγάριωμα θηλυκών και αρσενικών ατόμων ενός είδους, σύμφωνα με τους Penn et al., 2002. Το γενετικό πλεονέκτημα των μορίων MHC, να εμφανίζουν υψηλό βαθμό πολυμορφισμού, οδηγεί σε παραγωγή εύρωστων ετερόζυγων απογόνων και κατά συνέπεια με αυξημένη ανθεκτικότητα έναντι σε παθογόνα.

ΣΚΟΠΟΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Ένα από τα σημαντικότερα ερωτήματα της εξελικτικής βιολογίας είναι η διασάφηση των μηχανισμών φυσικής επιλογής που καθιστούν τα είδη ικανά να προσαρμόζονται σε αλλαγές όπως είναι η γονιδιακή ροή, η γενετική παρέκκλιση και η μεταλλαξιγένεση. Παρά το γεγονός ότι έχουν ταυτοποιηθεί πολυάριθμα γονίδια, τα οποία δυνητικά υπόκεινται στην επίδραση θετικής επιλογής, εξακολουθούν να υπάρχουν πρακτικά θεμελιώδεις περιορισμοί που εμποδίζουν τη μελέτη των παραπάνω διαδικασιών σε επίπεδο DNA σε πολλούς οργανισμούς. Αυτό συμβαίνει διότι είναι δύσκολο να εντοπιστούν τα γονίδια τα οποία είναι κατάλληλα για μελέτη σε οργανισμούς που δεν έχουν χρησιμοποιηθεί ως πρότυπα μελέτης και ταυτόχρονα διότι οι πληροφορίες που υπάρχουν για τη λειτουργία των γονιδίων αυτών δεν είναι επαρκείς. Επειδή ακριβώς τα μόρια του MHC ασκούν επίδραση στη φυσική κατάσταση ενός οργανισμού, εκτός από το λειτουργικό τους ρόλο στην ανοσοποίηση του έναντι σε παθογόνα, σχετίζονται με διαδικασίες όπως η βιωσιμότητα, η επιλογή του συντρόφου, η δυναμική του σπέρματος, τα επίπεδα της τεστοστερόνης και παραγωγής ωαρίων και γάλακτος (Finch et al., 1995; Schantz et al., 1996). Έτσι, τα γονίδια του MHC προσφέρουν αρκετές πληροφορίες και αποτελούν ίσως τα μοναδικά γονίδια (Potts et al., 1990; Hedrick, 1994) για μελέτες προσαρμογής των

φυσικών πληθυσμών διαφόρων ειδών. Μάλιστα, μέχρι σήμερα έχουν μελετηθεί αρκετοί γενετικοί τόποι των μορίων τόσο της τάξης I όσο και της τάξης II σε πλήθος οργανισμών συμπεριλαμβανομένων των θηλαστικών (Trowsdale, 1995), των πτηνών (Edwards et al., 1996), των ψαριών (Dixon et al., 1995), των ερπετών (Grossberger, 1992), και των αμφιβίων (Radtkey et al., 1996).

Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η μελέτη του πολυμορφισμού του γονιδίου DRB 2 που κωδικοποιεί για την β-αλυσίδα της πρωτεΐνης του μορίου του MHC II σε φυσικούς πληθυσμούς του είδους *Lepus europeaus* από διάφορες περιοχές του ελλαδικού χώρου με τη χρήση μοριακών τεχνικών. Ειδικότερα, προσδιορίζεται ο βαθμός πολυμορφισμού του γονιδίου μετά από τον καθορισμό των διαφορετικών απλοτύπων ανά περιοχή του ελλαδικού χώρου που εξετάζεται, με μελέτη του πολυμορφισμού μονόκλωνης αλυσίδας DNA (SSCP) του γονιδίου DRB 2, μετά από ενίσχυση συγκεκριμένου τμήματός του με τη χρήση της μεθόδου PCR. Εκτιμώντας τον βαθμό πολυμορφισμού του συγκεκριμένου γονιδίου και γνωρίζοντας από μελέτες που έχουν ήδη πραγματοποιηθεί σε επίπεδο mtDNA ότι η εισαγωγή αλλόχθονων πληθυσμών του είδους από προγράμματα εμπλουτισμών είναι δυνατόν να επηρεάσουν αρνητικά τη γενετική δομή των πληθυσμών μειώνοντας τη γενετική ποικιλομορφία, μπορούμε να οδηγηθούμε σε συμπεράσματα που να αιτιολογούν την μείωση των τοπικών πληθυσμών που παρατηρείται τις τελευταίες δεκαετίες στο είδος *L.europeaus* με την εμφάνιση του συνδρόμου του Ευρωπαϊκού Καφετί Λαγού.

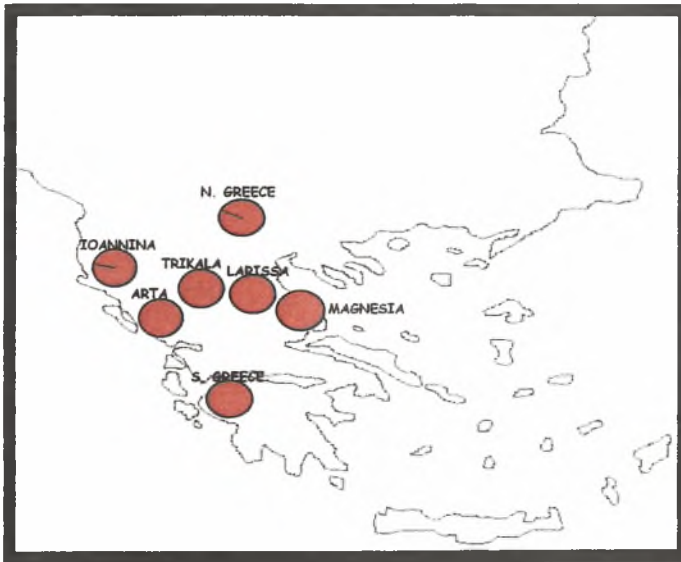
ΜΕΡΟΣ Β'

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ:

A) Βιολογικό Υλικό - Δείγματα:

Οι ιστοί που χρησιμοποιήθηκαν συλλέχθηκαν από διαφορετικά σημεία του σώματος λαγών, όπως νεφροί, μυς, συκώτι και πνεύμονες. Η συγκομιδή των ατόμων ή ιστών τους πραγματοποιήθηκε από κυνηγετικούς συλλόγους διάφορων περιοχών της Ελλάδας όπως φαίνεται στην εικόνα 11.



Εικόνα 11. Με κόκκινο τονίζονται οι περιοχές από τις οποίες προήλθαν τα δείγματα.

Τα δείγματα ακινητοποιήθηκαν σε 100% διάλυμα αιθανόλης και διατηρήθηκαν σε θερμοκρασία 4^oC μέχρι την εφαρμογή διαδικασίας απομόνωσης DNA.

Χρησιμοποιήθηκαν 81 δείγματα λαγών *L.europeus* τα οποία προέρχονταν από διαφορετικές περιοχές του ελλαδικού χώρου. Στον πίνακα που ακολουθεί περιγράφονται αναλυτικά οι περιοχές δειγματοληψίας.

Πίνακας 1. Περιοχές του ελλαδικού χώρου από τις οποίες απομονώθηκαν οι εξεταζόμενοι ιστοί – και η ειδική ονομασία αυτών.

A/A	Περιοχές από τις οποίες απομονώθηκαν τα άτομα & ειδική ονομασία αυτών	A/A	Περιοχές από τις οποίες απομονώθηκαν τα άτομα & ειδική ονομασία αυτών
1	Μυρσίνη Πρεβ.1	22	Παραμυθιά 2
2	Αμπέλια Άρτας 1	23	Λ.11-Ζαγόρι
3	Λ.16 *	24	Λ.32-Χαλκιδική
4	Πατιόπουλο Άρτας 1	25	Ολίτσικα Ζάλ. 17
5	Μαγνησία 3	26	Δέση 4
6	Σπηλιά 38	27	Ιωάννινα 37
7	Λ.8-Ζαγόρι	28	Αγχίαλος 3
8	Ιωάννινα 19	29	Σπηλιά 8
9	Ιωάννινα 33	30	Λ.29-Άρτα
10	Ανώγειο Άρτας 2	31	Ιωάννινα 2
11	Λιβάδι Ελασ. 1	32	Ζάλογγο 10
12	Βροντερό 1	33	Ιωάννινα 52
13	Ιωάννινα 15	34	Μαγνησία 1
14	Ιωάννινα 42	35	Λ.1-Ζαγόρι
15	Λ 34 Καλαμπάκα	36	Ιωάννινα 43
16	Μαγνησία 12	37	Αυλότοπος Άρτας 1
17	Σπηλιά 17	38	Λ.12-Πτολεμαίδα
18	Όλυμπος 1	39	Λ.30-Κέρκυρα
19	Λ.31-Χαλκιδική	40	Κάπουρνα 10
20	Ιωάννινα 51	41	Ζάλογγο 4
21	Ολίτσικα Ζάλ. 14	42	Καταράκτης Άρτας 1

	Περιοχές από τις οποίες απομονώθηκαν τα άτομα & ειδική ονομασία αυτών		Περιοχές από τις οποίες απομονώθηκαν τα άτομα & ειδική ονομασία αυτών
43	Λ.2-Ζαγόρι	65	Α-6789
44	Μαγνησία 5	66	Λ.33-Ηλεία
45	Ιωάννινα 35	67	Κάπουρνα 9
46	Κάπουρνα 8	68	Σπηλιά 44
47	Λ.7-Άρτα	69	Αγχίαλος 1
48	Λ-632	70	Μαγνησία 6
50	Λ-147	71	Κάπουρνα 6
51	Ιωάννινα 26	72	Ιωάννινα 46
52	Κάπουρνα 5	73	Ιωάννινα 11
53	Μαγνησία 11	74	Μαγνησία 2
54	Μαγνησία 4	75	Ολίτσικα Ζάλ. 16
55	Κρασιά 1	76	Αγχίαλος 2
56	Μαγνησία 8	77	Μαγνησία 7
57	Ιωάννινα 5	78	Σπηλιά 21
58	Άρτα 4	79	Ζάλογγο 7
59	Σπηλιά 18	80	Ιωάννινα 8
60	Κάπουρνα 7	81	Ιωάννινα 56
61	Ιωάννινα 4		
62	Κάπουρνα 4		
63	Ιωάννινα 18		
64	Κάπουρνα 3		

* Με το γράμμα Λ χαρακτηρίζονται τα άτομα *L.europeaus* που έχουν βρεθεί θετικά στο Σύνδρομο (EBHS).

B) ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΟΛΙΚΟΥ DNA ΑΠΟ ΙΣΤΟ ΛΑΓΟΥ

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

ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ:

- **Extraction buffer** (100ml)

Το διάλυμα αυτό αποτελείται από:

- 2ml Tris-HCL 2M-pH:8,5, το οποίο ρυθμίζει το pH.
- 2ml EDTA 0,5M, το οποίο χρησιμοποιείται ως χηλικός παράγοντας δεσμεύοντας κατιόντα Ca^{++} και Mg^{++} τα οποία είναι απαραίτητα για τη δράση νουκλεασών. Συνεπώς το διάλυμα που περιέχει EDTA απενεργοποιεί τη δράση των νουκλεασών προστατεύοντας το DNA από διάσπαση.
- 4ml NaCl 5M, το οποίο συμβάλλει στην διάσπαση των κυτταρικών μεμβρανών και την ομογενοποίηση του ιστού.
- 92ml d.d H₂O.

Τα παραπάνω διάλυμα αποθηκεύεται στους 4°C.

- **Digestion buffer** (20ml)

Το διάλυμα αυτό αποτελείται από:

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

Το παραπάνω διάλυμα αποθηκεύεται και αυτό στους 4°C.

Ιστός: Για την απομόνωση χρησιμοποιείται ιστός περίπου 50-100mg από μυ, σπλήνα, καρδιά και πνεύμονες λαγού.

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ:

- 1.-Αρχικά τοποθετούμε τον ιστό αρκετά τεμαχισμένο σε σωλήνα erpendorf του 1,5ml και προσθέτουμε 1ml *extraction buffer*.
- 2.-Αναδεύουμε έντονα (vortex) και φυγοκεντρούμε σε θερμοκρασία δωματίου (φυγόκεντρος erpendorf) στις 10.000στροφές για 2min.
- 3.-Έπειτα αδειάζουμε το υπερκείμενο προσεκτικά και προσθέτουμε ξανά 1ml *extraction buffer* ακολουθώντας το προηγούμενο στάδιο.
- 4.-Απομακρύνουμε το υπερκείμενο προσεκτικά, προσθέτουμε 400μl *digestion buffer* το οποίο προηγουμένως έχουμε ανακινήσει αρκετά.
- 5.-Αναδεύουμε έντονα (vortex) ώστε να αναμιχθεί ο ιστός – ίζημα με το διάλυμα.
- 6.-Τοποθετούμε τα δείγματα σε υδατόλουτρο (Medingen) στους 37^{oC} για δύο περίπου ώρες.
- 7.-Κάθε μισή ώρα ανακινούμε τα δείγματα ώστε να επαναιωρηθεί το ίζημα.
- 8.-Στη συνέχεια προσθέτουμε 150μl οξικού Na (CH₃COONa 3M, pH=5.2)
- 9.-Ανακινούμε έντονα και τοποθετούμε τα δείγματα στους -20^{oC} για 15min.
- 10.-Φυγοκεντρούμε στις 13.000στροφές για 10min στους 4^{oC}.
- 11.-Μεταφέρουμε το υπερκείμενο σε σωλήνα erpendorf.
- 12.-Προσθέτουμε 1ml εξισορροπημένης φαινόλης προκειμένου να διαλυθούν οι πρωτεΐνες. Η φαινόλη είναι ισχυρός αποδιατακτικός παράγοντας των πρωτεϊνών. Έτσι μετά την προσθήκη φαινόλης πραγματοποιείται διαχωρισμός λιπιδίων, πρωτεϊνών και νουκλεϊνικών οξέων με αποτέλεσμα να επιτυγχάνεται εκχύλιση του DNA. Ειδικότερα το διάλυμα της φαινόλης θα πρέπει να έχει τουλάχιστον pH=7 ώστε το DNA μετά την εκχύλιση να κατανέμεται στην επάνω υδατική φάση.
- 13.-Ακολουθεί έντονη ανάδευση σε vortex.
- 14.-Φυγοκέντρωση στις 13.000στροφές για 20min στους 4^{oC}.
- 15.-Γίνεται προσεκτική μεταφορά της επάνω υδατικής φάσης σε νέο σωλήνα erpendorf.
- 16.-Κατόπιν γίνεται προσθήκη 0,5ml φαινόλης και 0,5ml χλωροφρμίου-ισοαμυλικής αλκοόλης (24V:1V) και μικρή ανάδευση στο vortex. Το χλωροφόρμιο διευκολύνει το διαχωρισμό των φάσεων λόγω μεγάλης πυκνότητας απομακρύνει τη διαλυμένη φαινόλη από την υδατική φάση και συντελεί στην μετουσίωση των πρωτεϊνών, ενώ πόλος της ισοαμυλικής αλκοόλης είναι η σταθεροποίηση του χλωροφρμίου.

- 17.-Φυγοκέντρωση στις 13.000 στροφές για 5min στους 4^oC.
- 18.-Μεταφορά της επάνω υδατικής φάσης σε νέο σωλήνα erpendorf.
- 19.-Προσθήκη 1ml χλωροφορμίου- ισοαμλικής (24V:1V)
- 20.-Μικρή ανάδευση σε vortex.
- 21.-Φυγοκέντρωση στις 13.000 στροφές για 5min στους 4^oC.
- 22.-Μεταφορά της επάνω υδατικής φάσης σε νέο σωλήνα erpendorf.
- 23.-Προσθέτουμε 1ml παγωμένης αλκοόλης (αιθανόλης) 100% και τοποθετούμε τα δείγματα στους -20^oC για όλο το βράδυ. Η παγωμένη αιθανόλη αφυδατώνει το DNA και προκαλεί την κατακρύμνισή του.
- 24.-Μετά την κατάψυξη φυγοκεντρούμε στις 13.000 στροφές για 20min στους 4^oC
- 26.-Απομακρύνουμε προσεκτικά το υπερκείμενο παρατηρώντας το ίζημα
- 31.-Στεγνώνουμε τα δείγματα στον κλίβανο στους 37^oC για +/- 1ώρα παρατηρώντας ώστε να μην υπάρχουν μικροσταγονίδια στα τοιχώματα του erpendorf.
- 32.-Διαλύουμε το ίζημα του DNA σε 100μl ddH₂O
- 33.-Τα παραπάνω δείγματα συντηρούνται στο ψυγείο στους 4^oC όταν πρόκειται να χρησιμοποιηθούν άμεσα ή στους -20^oC για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα αποθήκευσης.

Γ) ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΣ ΣΥΝΟΛΙΚΗΣ ΠΟΣΟΤΗΤΑΣ DNA ΜΕ ΤΗ ΒΟΗΘΕΙΑ ΦΩΤΟΜΕΤΡΟΥ

Μετά την επαναιώρηση των δειγμάτων γίνεται μέτρηση του κάθε δείγματος στο φωτόμετρο προκειμένου να πιστοποιήσουμε σε ένα πρώτο βήμα αν τα δείγματα που απομονώθηκαν με την παραπάνω διαδικασία περιέχουν αρκετή ποσότητα DNA.

Για τη φωτομέτρηση χρησιμοποιούμε 1μl διαλύματος από το κάθε δείγμα (DNA+100μl H₂O) και προσθέτουμε 49μl ddH₂O. Φωτομετρούμε αφού πρώτα κάνουμε πρώτα ένα spin. Ενδείξεις του φωτομέτρου οι οποίες κυμαίνονται πάνω από 250ng/μl σημαίνει ότι οι ποσότητες DNA που απομονώθηκαν από την παραπάνω διαδικασία είναι ικανοποιητικές.

Στόχος του πειράματος ήταν η ενίσχυση του εξονίου 2 του γονιδίου DRB της κλάσης II του MHC με τη βοήθεια της αντίδρασης PCR.

Δ) ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟΣ ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΤΟΥ ΕΞΟΝΙΟΥ 2 ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ DRB ΤΗΣ ΚΛΑΣΗΣ II ΤΟΥ ΜHC ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ ΤΗΣ ΑΛΥΣΙΔΩΤΗΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗΣ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (PCR)

Το τμήμα του DNA-στόχος που θέλουμε να ενισχυθεί έχει μέγεθος που κυμαίνεται μεταξύ 220-250 ζευγών βάσεων.

Για μια αντίδραση PCR των 30μl χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω:

- Ⓢ DNA 500ngr για το κάθε δείγμα. Το DNA προέρχεται από ιστούς διαφορετικών ατόμων από τα οποία έγινε η απομόνωση. Αυτή η μικρή ποσότητα του DNA θα αποτελέσει μόριο- μήτρα για την ενίσχυση του γονιδίου DRB.
- Ⓢ 3 μl ρυθμιστικού διαλύματος (Buffer) 50mM. Το ρυθμιστικό διάλυμα περιέχει 500mM KCl, 100mM Tris-HCl pH 9.0
- Ⓢ 1μl. MgCl₂ 50mM. Τα ιόντα Mg⁺² είναι δυνατόν να επηρεάσουν την ενίσχυση των primer, τη θερμοκρασία στην οποία θα γίνει η αποδιάταξη των αλυσίδων, το PCR προϊόν, την ειδικότητα του προϊόντος, τον σχηματισμό ψευδοδιμερών primer καθώς και την ενζυμική ενεργότητα και πιστότητα. Επίσης για να δράσει η Taq πολυμεράση απαιτείται ελεύθερο Mg η οποία με τη σειρά της θα ενώσει το μόριο του DNA με τους primers και τα dNTPs. Η παρουσία EDTA ή άλλων χηλικών ενώσεων δρα αρνητικά στην ενίσχυση του DNA.
- Ⓢ 0,6 μl μίγματος dNTPs συγκέντρωσης 10mM για το καθένα. Η σταθερότητα των δεοξυνουκλεοτιδίων είναι αρκετά μεγάλη μετά από επαναλαμβανόμενους κύκλους επομένως η συγκέντρωσή τους θα πρέπει να είναι ελάχιστη διότι η εξειδίκευσή τους και η πιστότητά τους αυξάνεται σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις
- Ⓢ 30pmoles από κάθε εκκινητή
- Ⓢ 1 unit Taq DNA polymerase η οποία έχει απομονωθεί από το βακτήριο *Thermus aquaticus* και είναι θερμοσταθερή σε θερμοκρασίες 94-95^oC.
- Ⓢ dH₂O 22,2μl

Οι εκκινητές (primers) που χρησιμοποιήθηκαν είναι οι ακόλουθοι:

A] DRB2Forward : 5'-gTgTCATTTCTACAACgggACgC -3' (M.J.M.Smulders et al, 2003) &

B]DRB2-Reverse: με την αλληλουχία 5'-CTCCCgAACCCCGTAGTTgTgTTTgC -3' (Erlich and Bugawan, 1990).

Τα γονίδια του εξονίου 2 κωδικοποιούν για την πολύ σημαντική λειτουργικά περιοχή ABS (Brown et al. 1988, 1993). Η επιλογή των primers γίνεται με βάση την περιεκτικότητα σε βάσεις G-C η οποία θα πρέπει να ξεπερνά το 50% των επιλεγόμενων βάσεων. Επιπλέον θα πρέπει να μην υπάρχουν αλληλουχίες που να περιέχουν πολυπυρίνες, πολυπυριμιδίνες και άλλες ασυνήθιστες αλληλουχίες καθώς και επικαλύψεις στο 3' άκρο διότι κάτι τέτοιο οδηγεί σε σχηματισμό διμερών μορφών primer και παράλληλα θα πρέπει να έχουν παραπλήσια θερμοκρασία τήξεως (T_m).

Οι συνθήκες ενίσχυσης των PCR προϊόντων είναι οι ακόλουθες:

- | | | |
|--------------------------|----------------------------|-------------|
| 1. Αρχική αποδιάταξη | 95 ^{oC} για 5min. | } 35 κύκλοι |
| 2. Αποδιάταξη | 95 ^{oC} για 45sec | |
| 3. Επικόλληση των | | |
| 4. εκκινητών (Annealing) | 60 ^{oC} για 50sec | |
| 5. Επέκταση | 72 ^{oC} για 30sec | |
| 6. Τελική επέκταση | 72 ^{oC} για 7min | |

Αναλυτικά σε κάθε βήμα συμβαίνουν τα εξής:

1. Η θέρμανση στην θερμοκρασία των 95^{oC} συμβάλλει στην αρχική αποδιάταξη του DNA και στη διάσπαση ειδικών πρωτεϊνικών μορίων, των ιστονών με τις οποίες συνδέονται τα μόρια του DNA και οι οποίες διατηρούν τα μόρια DNA στη συμπαγή τους μορφή. Το στάδιο αυτό είναι πολύ σημαντικό για να πετύχει η αντίδραση της PCR διότι από την ολική αποδιάταξη του DNA στόχου θα εξαρτηθεί η συγκέντρωση του προϊόντος που παράγεται σε κάθε κύκλο.
2. Με τη θέρμανση στους 95^{oC} για 45sec επιτυγχάνεται το σπάσιμο των διπλών και τριπλών δεσμών μεταξύ των δίκλωνων αλυσίδων των μορίων DNA και η μετατροπή τους από τη δίκλωνη στη μονόκλωνη μορφή. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι η θερμοκρασία της αρχικής αποδιάταξης όσο και της αποδιάταξης είναι υψηλή και θα πρέπει να μη διαρκεί περισσότερο χρόνο γιατί ελαττώνεται η ενεργότητα του ενζύμου.

3. Ακολουθεί μείωση της θερμοκρασίας η οποία μπορεί να κυμαίνεται από 50°C έως 65°C. Στο στάδιο αυτό πραγματοποιείται πρόσδεση- υβριδισμός των εκκινητών (primers) με τις συμπληρωματικές αλυσίδες DNA (μητρικά μόρια). Αυξάνοντας τη θερμοκρασία σταδιακά αυξάνεται και η ειδικότητα του τελικού προϊόντος με αποτέλεσμα να περιορίζεται η υβριδοποίηση των ολιγονουκλεοτιδίων σε μη ειδικές περιοχές.
4. Στη συνέχεια η μικρή άνοδος της θερμοκρασίας στους 72°C και για 30sec εμποδίζει την προσκόλληση επιπλέον εκκινητικών μορίων και επιτρέπει την Taq polymerase να προσθέτει 35-100 νουκλεοτίδια ανά δευτερόλεπτο, παρουσία MgCl₂ και dNTPs επεκτείνοντας την συμπληρωματική αλυσίδα του μορίου που συντίθεται. Τέλος ακολουθεί τελική επέκταση στους 70-78°C.

Τα βήματα 2-5 της διαδικασίας PCR επαναλαμβάνονται για 35 κύκλους. Ο αριθμός των επαναλαμβανόμενων κύκλων καθορίζεται από τη συγκέντρωση του προϊόντος που ενισχύεται καθώς και από την απόδοση της PCR η οποία εξαρτάται από τη διατήρηση σταθερών των συνθηκών της. Αν ο αριθμός των κύκλων είναι μεγαλύτερος τότε αυξάνεται ο αριθμός των μη ειδικών προϊόντων ενώ αν ο αριθμός των κύκλων είναι μικρότερος τότε ο αριθμός των παραγόμενων προϊόντων είναι μικρότερος γεγονός που δεν ευνοεί την ανίχνευσή τους σε επόμενο στάδιο.

Ε) ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ

Η ηλεκτροφόρηση είναι μια απλή και γρήγορη τεχνική. Χρησιμοποιείται για τον διαχωρισμό μακρομορίων (νουκλεϊνικών οξέων και πρωτεϊνών). Ο διαχωρισμός γίνεται με βάση το ηλεκτρικό φορτίο των μορίων και το μοριακό τους βάρος μετά από εφαρμογή ηλεκτρικού πεδίου σε κατάλληλη πηκτή. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιούνται πηκτές αγαρόζης και πολυακρυλαμίδης. Επομένως είναι εύκολος ο διαχωρισμός δύο ή και περισσότερων τμημάτων DNA διαφορετικού μεγέθους. Σύμφωνα με το παρόν πρωτόκολλο χρησιμοποιούνται και τα δύο είδη πηκτών. Σε πρώτη φάση για την ανίχνευση των ενισχυμένων προϊόντων του DNA στόχου που προέκυψε από την αντίδραση της PCR χρησιμοποιείται η πηκτή αγαρόζης.

ΣΤ) ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΣΕ ΠΗΚΤΩΜΑ ΑΓΑΡΟΖΗΣ - ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΠΗΚΤΗΣ ΑΓΑΡΟΖΗΣ

Για την παρασκευή πηκτής αγαρόζης 2% χρησιμοποιούμε τα εξής:

- Ⓞ 30ml TAE 1X (Tris-Acetic-EDTA).
- Ⓞ 0,6gr αγαρόζης
- Ⓞ 2,5μl βρωμιούχο αιθίδιο (10mg/ml)

Ζυγίζουμε και τοποθετούμε 0,6gr αγαρόζης σε κωνική φιάλη των 100ml αφού έχουμε προσθέσει προηγουμένως 30ml TAE. Το μίγμα αγαρόζης – TAE θερμαίνεται κατάλληλα για τη διάλυση της αγαρόζης και ακολούθως αφού αφηθεί σε θερμοκρασία δωματίου ακολουθεί προσθήκη 2,5 μl βρωμιούχου αιθιδίου, η οποία πραγματοποιείται σε απαγωγό εστία επειδή το τοξικό βρωμιούχο αιθίδιο λόγω και της πτητικότητάς του καθίσταται ακόμη πιο επιβλαβές. Στη συνέχεια γίνεται έκχυση του διαλύματος σε ειδικό πιάτο που χρησιμοποιείται για την ηλεκτροφόρηση στο οποίο τοποθετούνται ειδικές χτένες για τη δημιουργία πηγαδιών. Το διάλυμα αφήνεται να πήξει μέσα στην συσκευή και να σταθεροποιηθεί για λίγα λεπτά.

Το TAE είναι ένα ρυθμιστικό διάλυμα το οποίο χρησιμοποιείται συνήθως για την παρασκευή της πηκτής αγαρόζης και για TAE 50X η περιεκτικότητά του κάθε συστατικού είναι:

- 1.-Tris base 121gr
- 2.-Acetic acid 28,5ml
- 3.-EDTA 0,5M 50ml

Για TAE 1X buffer χρειάζεται να γίνει ανάμιξη 20ml του 50X TAE με 980ml ddH₂O.

Ζ) ΦΟΡΤΩΣΗ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ GEL ΑΓΑΡΟΖΗΣ

Για τη φόρτωση των δειγμάτων χρειαζόμαστε:

- Ⓞ 2,5μl loading buffer 6X

Το παραπάνω διάλυμα περιέχει μπλε της βρωμοφαινόλης, γλυκερόλη και Tris. Το μπλε της βρωμοφαινόλης είναι ένα αλογονωμένο παράγωγο της φαινόλης το οποίο έχει την ιδιότητα λόγω φορτίου, να δεσμεύει όξινα μόρια, στην προκειμένη περίπτωση τα μόρια του DNA στόχου. Έτσι, δείγματα που περιέχουν αρκετή ποσότητα DNA μετά την αντίδραση PCR ανιχνεύονται στο πήκτωμα κάτω από UV. Η γλυκερόλη συμβάλλει στην καθίζηση του δείγματος μέσα στα πηγαδάκια του πηκτώματος ηλεκτροφόρησης, ενώ το Tris είναι ρυθμιστικό διάλυμα κατάλληλο για τη ρύθμιση του pH του κάθε διαλύματος.

Ⓢ 5μl PCR προϊόν

Ⓢ 2μl ladder (100bp). Το διάλυμα αυτό περιέχει αλληλουχίες μορίων DNA γνωστού μήκους 100 βάσεων.

Συνήθεις εργαστηριακές συνθήκες για την πραγματοποίηση της ηλεκτροφόρησης είναι η εφαρμογή τάσης των 100Volt σε θερμοκρασία 25°C. Τα δείγματα τρέχουν στο πήκτωμα για χρόνο ίσο μέχρι να διανύσουν τα 2/3 της διαδρομής του πηκτώματος και αφού διανύσουν την πιο πάνω απόσταση ελέγχονται κάτω από ακτίνες UV. Τα δείγματα που δίνουν θετικό αποτέλεσμα (ανίχνευση ζωνών) χρησιμοποιούνται για ανάλυση SSCP.

Η) PCR-SSCP

Από τα θετικά δείγματα που προέκυψαν μετά την ανίχνευση σε πηκτική αгарόζης αφαιρέθηκαν 3λ και έγινε προσθήκη αποδιατακτικού διαλύματος (denaturation buffer) 10μl το οποίο αποδιάτασσει τα δίκλινα μόρια του PCR προϊόντος. Μετά την αποδιάταξη πραγματοποιείται φυγοκέντρηση (spin) για λίγα δευτερόλεπτα. Στη συνέχεια με εφαρμογή ενός προγράμματος της PCR για 8 λεπτά στους 96°C πραγματοποιείται πλήρης αποδιάταξη των δίκλωνων μορίων DNA. Τα δείγματα προς το τέλος του 7^{ου} λεπτού εξέρχονται της συσκευής PCR και τοποθετούνται αμέσως σε πάγο προκειμένου να μην συμβεί επανασύνδεση των μονόκλωνων μορίων DNA. Ακολούθως τα δείγματα φορτώνονται σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης 10% με γλυκερόλη για SSCP .

Θ) ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΠΗΚΤΗΣ ΠΟΛΥΑΚΡΥΛΑΜΙΔΗΣ ΓΙΑ SSCP

Ανάλογα με το πόσο γρήγορα είναι επιθυμητό να τρέξουν τα δείγματα και κατά πόσο ακριβή αποτελέσματα (ανίχνευση μπαντών) θέλουμε να πάρουμε χρησιμοποιούνται διαφορετικά πηκτώματα πολυακρυλαμίδης με συγκεντρώσεις 6%, 8% και 10%. Όσο πιο μικρό σε μήκος- αριθμό βάσεων είναι το τμήμα του εξεταζόμενου δείγματος (μονόκλινο μόριο DNA) για SSCP τόσο πιο πυκνό θα πρέπει να είναι το πήκτωμα πολυακρυλαμίδης για να επιτευχθεί καλύτερη ανάγνωση των αποτελεσμάτων. Για το λόγο αυτό χρησιμοποιείται πήκτωμα πολυακρυλαμίδης 10%.

Για την παρασκευή πηκτώματος πολυακρυλαμίδης 10% οι ποσότητες των συστατικών που χρησιμοποιήθηκαν είναι οι ακόλουθες:

38,5% μητρικό δ/μα	13,3ml
50% glycerol	8,3ml
10X TBE	4,2ml
DdH ₂ O έως	50ml
TEMED	66μl
APS 20%	335μl

Το πήκτωμα πολυακρυλαμίδης τοποθετείται σε κατάλληλη συσκευή ηλεκτροφόρησης με ρυθμιστικό διάλυμα TBE 0,5X. Στη συσκευή εφαρμόζεται τάση $V \sim 180\text{Volts}$ και τα δείγματα αφήνονται να τρέξουν στο πήκτωμα για 16-18 ώρες (over night) σε θερμοκρασία 4°C . Για την λήψη των αποτελεσμάτων ακολουθεί χρώση του πηκτώματος. Αυτό γίνεται είτε με βρωμιούχο αιθίδιο (Yap,McGee, 1992) είτε με νιτρικό άργυρο (Ainsworth et al.,1991)

1) ΧΡΩΣΗ ΝΙΤΡΙΚΟΥ ΑΡΓΥΡΟΥ (SILVER STAINING)

Η διαδικασία περιλαμβάνει τα εξής στάδια:

1^ο ΣΤΑΔΙΟ:

Παρασκευή διαλύματος I το οποίο περιέχει:

72ml H₂O + 8ml ethanol + 0,5ml οξικό οξύ

και έχει τελικό όγκο $V_{\text{τελ}}=400\text{ml}$. Ακολουθούν 2πλύσεις. Η κάθε μια διαρκεί χρόνο 3 min.

2^ο ΣΤΑΔΙΟ:

Παρασκευή διαλύματος II το οποίο περιέχει:

AgNO₃ 1gr/lit με τελικό όγκο $V_{\text{τελ}}=200\text{ml}$. Η Παρασκευή του διαλύματος γίνεται με προσθήκη 1 gr AgNO₃ σε 1lit dH₂O.

Ο χρόνος που διαρκεί η πλύση είναι $\sim 15\text{min}$ και ακολουθούν 2 ξεπλύματα με dH₂O

3^ο ΣΤΑΔΙΟ:

Παρασκευή διαλύματος III το οποίο περιέχει τα εξής:

3gr NaOH,

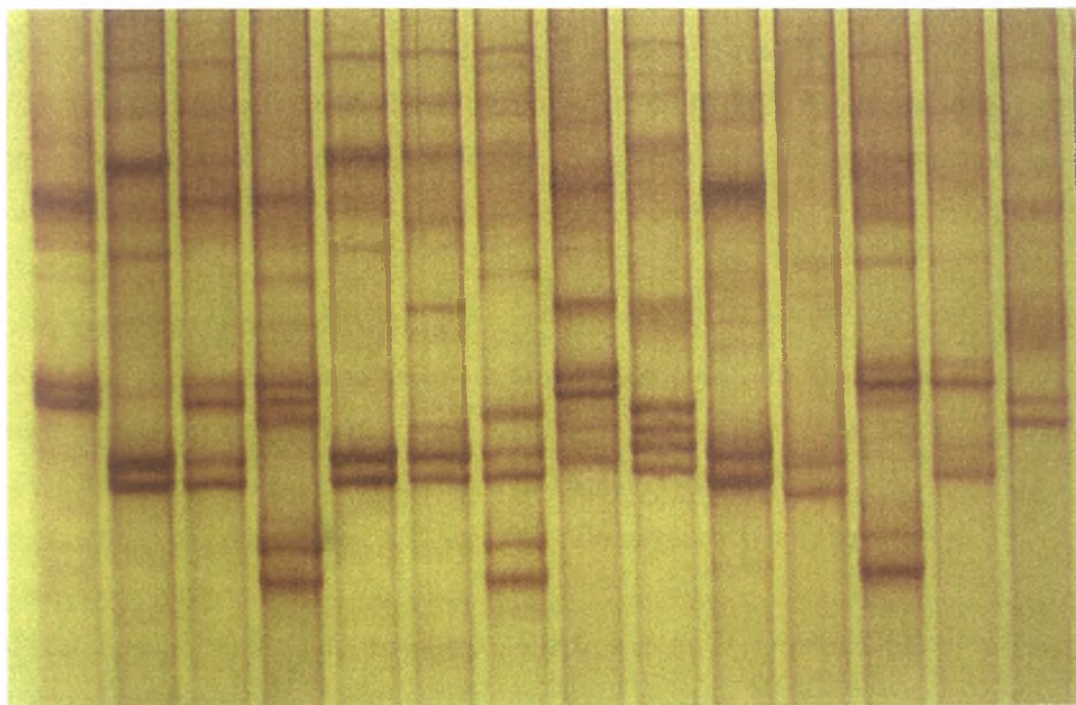
0,01gr NaHB₄

0,8ml HCHO σε τελικό όγκο $V_{\text{τελ}} = 200\text{ml}$ για χρόνο 15-20min και ακολουθεί πλύση με dH₂O.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΠΟΥ ΠΡΟΕΚΥΨΑΝ ΑΠΟ ΠΗΚΤΩΜΑ SSCP

Στην εικόνα που ακολουθεί απεικονίζονται πρότυπα ηλεκτροφόρησης που προέκυψαν μετά από ανάλυση SSCP για 14 από τα 81 συνολικά άτομα που εξετάστηκαν.

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



1 2 * * 3 4

Εικόνα 12. Αποτελέσματα ανάλυσης SSCP 14 ατόμων.

Στο πήκτωμα διακρίνονται 12 διαφορετικά πρότυπα ηλεκτροφόρησης. Τα άτομα στις θέσεις 5, 6 εμφανίζουν το ίδιο πρότυπο ηλεκτροφόρησης με το άτομο στη θέση 2. Οι αριθμοί με έντονο χρώμα αντιστοιχούν πιθανώς σε πρότυπα ομοζυγωτικών ατόμων. Η υπόθεση αυτή υποστηρίζεται από το γεγονός ότι το άτομο στη θέση 3 που σημειώνεται με κόκκινο αστερίσκο εμφανίζει πρότυπο ηλεκτροφόρησης το οποίο προκύπτει από συνδυασμό των ζωνών των ατόμων στις θέσεις 1, 2. Με ανάλογο

τρόπο το άτομο στη θέση 9 (με πράσινο αστερίσκο) εμφανίζει πρότυπο το οποίο φαίνεται να έχει προκύψει από συνδυασμό των ζωνών των ατόμων στις θέσεις 2, 14, υποδεικνύοντας τελικά ότι τα άτομα στις θέσεις 3, 9 είναι ετεροζυγωτικά. Με αντίστοιχο τρόπο εξετάστηκαν με τυχαία σειρά όλα τα δείγματα. Στο παραπάνω πηκτώμα τα υπόλοιπα άτομα όπως για παράδειγμα τα άτομα στις θέσεις 4, 7, 12 πιθανώς αντιστοιχούν σε ετεροζυγωτικά άτομα τα οποία έχουν προκύψει από συνδυασμό ζωνών προτύπων ομοζυγωτικών ατόμων που δεν υπάρχουν στο παρόν πηκτώμα. Μετά από σύγκριση όλων των δειγμάτων σε πηκτώματα πολυακρυλαμίδης επιλέχθηκαν τα άτομα εκείνα που εμφάνισαν καθαρά διαφορετικά πρότυπα ηλεκτροφόρησης τα οποία μετά από κατάλληλο καθαρισμό στάλθηκαν για ανάλυση της αλληλουχίας τους.

ΙΑ) ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΠΡΟΪΟΝΤΟΣ PCR ΓΙΑ SEQUENCING

Ο καθαρισμός του DNA έγινε με βάση το GFX PCR DNA και Gel Band Purification Kit της Amersham Biosciences. Το πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε ήταν το εξής:

A) από gel

- 1.-Ζυγίζουμε ένα άδειο eppendorf.
- 2.-Κόβουμε την μπάντα που θέλουμε να καθαρίσουμε και ζυγίζουμε αφού την τοποθετήσουμε στο eppendorf.
- 3.-Για κάθε 10mg του gel προσθέτουμε 10μl capture buffer.
- 4.-Επιδιώκουμε το δείγμα στους 60^oC από 5-15min μέχρι να λιώσει η αγαρόζη
- 5.-Φυγοκεντρούμε το δείγμα για 30sec
- 6.-Μεταφέρουμε το δείγμα στη στήλη GFX και φυγοκεντρούμε με τη μέγιστη ταχύτητα για 30sec.
- 7.-Αδειάζουμε το διάλυμα από τη στήλη και τοποθετούμε τη στήλη GFX μέσα σε νέο σωλήνα eppendorf.
- 8.-Προσθέτουμε 500μl του wash buffer στη στήλη GFX. Φυγοκεντρούμε στη μέγιστη ταχύτητα για 30sec.
- 9.-Προσθέτουμε 50μl ddH₂O (όχι μικρότερη ποσότητα από 10μl) μέσα στο σωλήνα eppendorf με τη στήλη GFX και επιδιώκουμε σε θερμοκρασία δωματίου για 1 min.
- 11.-Φυγοκέντρωση σε μέγιστη ταχύτητα για 1min για ανάκτηση του DNA.

B) Από διάλυμα

- 1.-Τοποθετούμε τη στήλη GFX σε σωλήνα συλλογής για τον καθαρισμό.
- 2.-Προσθέτουμε 500μl του capture buffer στη στήλη GFX
- 3.-Μεταφέρουμε το διάλυμα DNA (100μl) στη στήλη GFX
- 4.-Αναμιγνύουμε τα δείγματα με την πιπέτα
- 5.-Φυγοκεντρούμε στη μικρή φυγόκεντρο σε μέγιστη ταχύτητα για 30 sec.
- 6.-Απορρίπτουμε το διάλυμα αδειάζοντας το σωλήνα συλλογής. Τοποθετούμε πάλι τη στήλη GFX στο σωλήνα συλλογής.
- 7.-Τοποθετούμε το wash buffer στη στήλη και φυγοκεντρούμε στη μέγιστη ταχύτητα για 30 sec
- 8.-Απορρίπτουμε τον σωλήνα συλλογής και μεταφέρουμε τη στήλη GFX σε νέο σωλήνα erpendorf.
- 9.-Προσθέτουμε 50μl elution buffer (10ml Tris-HCl-pH 8.0) ή ddH₂O στη κορυφή της στήλης GFX
- 10.-Επιάζουμε τα δείγματα για 1min
- 11.-Φυγοκέντρωση σε μέγιστη ταχύτητα για 1min για ανάκτηση του καθαρισμένου DNA.

Ακολουθεί υπολογισμός της ποσότητας του PCR προϊόντος ποσοτικά με φωτόμετρο ή ποιοτικά με gel αγαρόζης.

Συνήθως στέλνουμε το DNA για sequencing σε στερεά μορφή και όχι σε διάλυμα.

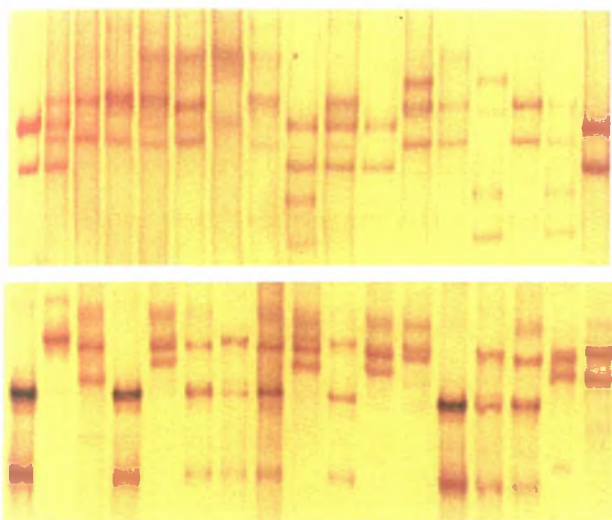
Γι' αυτό κατακρυμνίζουμε το DNA με αιθανόλη και sodium acetate buffer solution.

Για 50μl δείγμα χρειαζόμαστε 1/10 =5μl sodium acetate buffer solution και 250μl αιθανόλη.

Τα αφήνουμε όλη τη νύχτα σε $\theta = -20^{\circ}\text{C}$ και την επόμενη φυγοκεντρούμε στους -4°C στις 13.000rpm για 20min και στεγνώνουμε τα δείγματα στους 37°C για 1ώρα.

IB) ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ DNA (Sequencing)

Από τα 81 δείγματα που εξετάστηκαν, μετά από ανάλυση SSCP προέκυψαν 20 διαφορετικά πρότυπα ηλεκτροφόρησης.



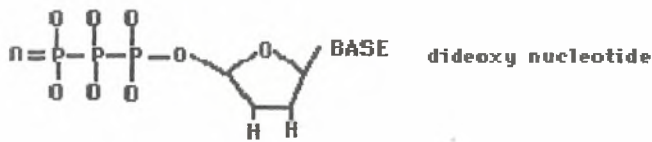
Εικόνα 13.

Αποτελέσματα ανάλυσης SSCP σε πηκτική πολυακρυλαμίδης μετά από χρώση (silver staining). Στην εικόνα φαίνονται και όλα τα διαφορετικά πρότυπα ηλεκτροφόρησης.

Για το σκοπό αυτό καθαρίστηκαν με το παραπάνω πρωτόκολλο και στη συνέχεια στάλθηκαν για προσδιορισμό της αλληλουχίας του DNA στην εταιρεία MWG. Ο προσδιορισμός της αλληλουχίας κάθε δείγματος βασίστηκε στην τεχνική κατά Sanger (Sanger et. al, 1977).

Η μέθοδος Sanger σχεδιάστηκε για πρώτη φορά το 1975 και είναι μια τεχνική που επιτρέπει την ανάλυση γονιδίων σε επίπεδο νουκλεϊνικών οξέων. Η τεχνική Sanger είναι ένα πολύτιμο εργαλείο της μοριακής βιολογίας που βρίσκει εφαρμογή σε πολλά πεδία έρευνας. Όσον αφορά τα ευκαρυωτικά γονίδια η αλληλούχιση του γονιδιώματος έδωσε τη δυνατότητα στους ερευνητές να ταυτοποιήσουν άμεσα συντηρημένες αλληλουχίες και μοτίβα αλληλουχιών και να προσδιορίσουν τη σημασία τους. Η παραπάνω διαδικασία μέχρι πρόσφατα γινόταν έμμεσα με την αλληλούχιση πρωτεϊνών και την αντιστοιχία των αμινοξέων με κομμάτια cDNA. Εκτός αυτών, όμως, σήμερα η μέθοδος απευθείας αλληλούχισης του γονιδιώματος δίνει τη δυνατότητα στους μοριακούς βιολόγους να προσδιορίσουν τη θέση στην οποία μπορεί να συμβεί μια αλλαγή σε μια βάση (point mutation).

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



Εικόνα 14.

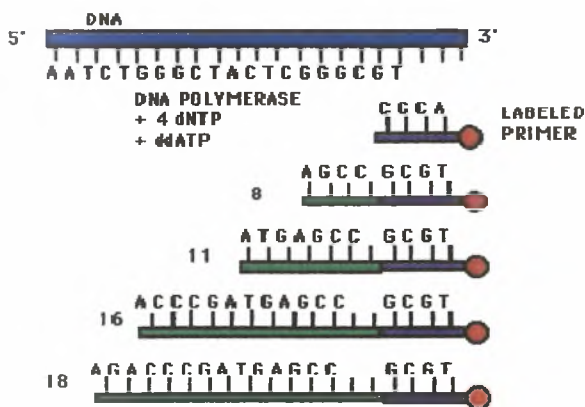
Δομή ενός
διδεοξυνουκλεοτιδίου

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

A) Την αλυσίδα που υφίσταται αλληλούχιση (η οποία προκύπτει μετά από αποδιάταξη παρουσία NaOH)

B) Εκκινητικά μόρια DNA (primers), τα οποία είναι συμπληρωματικά τμήματα DNA με την αλυσίδα που υφίσταται αλληλούχιση και ραδιενεργά σημασμένα στο 5'-άκρο τους

Γ) Ένα μίγμα από συγκεκριμένα μόρια ddNTPs (πχ.ddATP) μαζί με κανονικά δεοξυνουκλεοτίδια (dATP, dCTP, dGTP, dTTP). Η συγκέντρωση των ddATP δε θα πρέπει να ξεπερνά το 1% της συγκέντρωσης των dATP. Η λογική που κρύβεται πίσω από αυτό το ποσοστό συγκέντρωσης είναι ότι μετά την προσθήκη της DNA πολυμεράσης ο πολυμερισμός που λαμβάνει χώρα θα τερματίσει όταν ολόκληρη η ποσότητα των ddATP θα έχει ενσωματωθεί στην επιμηκυνόμενη αλυσίδα. Αν τα ddATP αποτελούν μόνο το 1% της συνολικής ποσότητας των dATP τότε θα προκύψει μια σειρά από αλληλουχίες καθεμία από τις οποίες θα έχει και διαφορετικό μήκος ανάλογα με τη θέση που προστίθεται η βάση στην εξεταζόμενη αλυσίδα.



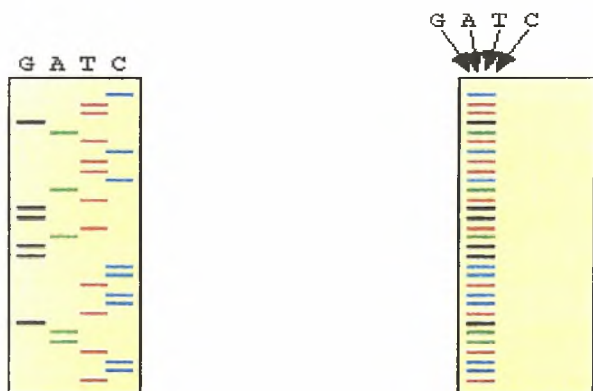
Εικόνα 15. Στην εικόνα φαίνονται τα συστατικά μόρια μιας αντίδρασης Sanger καθώς και οι αλληλουχίες διαφορετικών μηκών που έχουν προκύψει.(Elizabeth Canfield, Sanger Method for DNA Sequencing, 1999)

Η παραπάνω αντίδραση πραγματοποιείται τέσσερις φορές χρησιμοποιώντας κάθε φορά και διαφορετικά ddNTP όπως φαίνεται στην ακόλουθη εικόνα.



Εικόνα 16. Τέσσερις αντιδράσεις με διαφορετικά ddNTPs.

Όταν όλες οι αντιδράσεις ολοκληρωθούν τότε τα προϊόντα υπόκεινται σε ηλεκτροφόρηση σε ειδική πηκτή πολυακρυλαμίδης (PAGE). Στο πήκτωμα διακρίνονται 4 γραμμές καθεμιά από τις οποίες αντιστοιχεί σε μια από τις παραπάνω αντιδράσεις. Το πήκτωμα μεταφέρεται σε φίλτρο νιτροκυτταρίνης και υπόκειται σε αυτοραδιογραφία στην οποία μόνο τα ραδιοσημασμένα 5' άκρα είναι ορατά. Στην PAGE τα μικρότερα τμήματα DNA μεταναστεύουν πιο πολύ. Συνεπώς η πρώτη ζώνη στη βάση του πηκτώματος υποδεικνύει το πρώτο διδεοξυνουκλεοτίδιο το οποίο προστέθηκε στην αντίδραση Sanger.



Στο πήκτωμα κάθε γραμμή αντιπροσωπεύει συνολικά όλες τις αντιδράσεις που έχουν γίνει για κάθε ddNTP

Στο πήκτωμα όλες οι αντιδράσεις απεικονίζονται σε μια γραμμή η οποία διαβάζεται από κάτω προς τα επάνω για την εύρεση της αλληλουχίας

Εικόνα 17.

Απεικόνιση σε PAGE της αλληλούχησης τμήματος DNA με τη μέθοδο Sanger (<http://www.csun.edu/~hcbio027/biotechnology/lec3/sanger.html>)

ΜΕΡΟΣ Γ΄

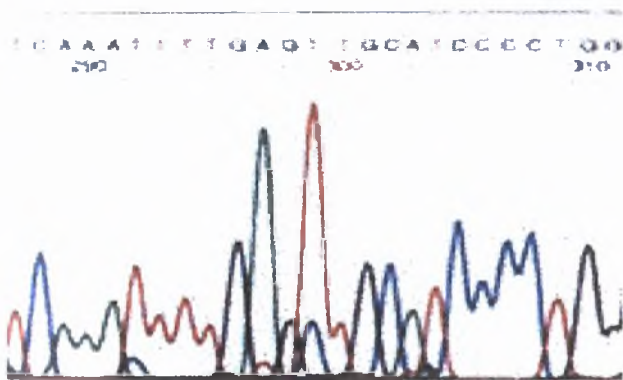
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Α) ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Για την στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω προγράμματα:

- BIOEDIT 7.0
- CLUSTAL X 1.8
- TREEVIEW

Μετά από την ανάλυση των αλληλουχιών (sequencing) και τη χρήση του προγράμματος Bioedit 7.0 προέκυψαν τελικά 20 ακολουθίες του γονιδίου DRB2 των δειγμάτων που χρησιμοποιήθηκαν αρχικά σε σύνολο 81 ατόμων που εξετάστηκαν (πίνακας 1).



Εικόνα 18.

Στην εικόνα φαίνεται το χρωματογράφημα που προκύπτει μετά από ανάλυση ενός τυχαίου τμήματος μιας ακολουθίας (sequencing) με τη βοήθεια του προγράμματος Bioedit 7.0

Οι αλληλουχίες των 20 προτύπων ηλεκτροφόρησης ομοπαρατέθηκαν με τη βοήθεια του προγράμματος CLUSTAL X 1.8. (Thomson et al., 1997). Το πρόγραμμα αυτό είναι πρόγραμμα πολλαπλής ομοπαραθέσης που εμφανίζει πάνω στην οθόνη όλες τις επιλεγμένες αλληλουχίες και ομοπαραθέσεις κατά ζεύγη αναζητώντας ομοιότητες μεταξύ των αλληλουχιών. Στην επιφάνεια εργασίας οι συντηρημένες ακολουθίες χρωματίζονται με τη βοήθεια χρωματιστού προγράμματος το οποίο είναι ενσωματωμένο ενώ η ομοιότητα των χαρακτήρων για όλες τις αλληλουχίες που ομοπαρατέθηκαν φαίνεται ως αστερίσκος (*). Στόχος του προγράμματος και των επιλογών που διαθέτει ο κατάλογος του προγράμματος είναι η ανεύρεση όσον το δυνατόν μεγαλύτερου αριθμού ομοιοτήτων και η στοίχιση των αλληλουχιών ώστε οι όμοιοι χαρακτήρες να βρίσκονται στην ίδια στήλη όπως φαίνεται στην εικόνα που ακολουθεί.

```

Ioan12 TTGTGTCATTTCTACAAACCGGACCGCAGCGGGTCCGCTCCGAGGAGAGGCTTTCTACAAACCGGAGGAGTTCGTGCGCTTCGACAGCGACGTGGGGAGTACCGGGCGGTGACCG 115
Ioan5 TTGTGTCATTTCTACAAACCGGACCGCAGCGGGTCCGCTCCGAGGAGAGGCTTTCTACAAACCGGAGGAGTTCGTGCGCTTCGACAGCGACGTGGGGAGTACCGGGCGGTGACCG 115
Ioan37 TTGTGTCATTTCTACAAACCGGACCGCAGCGGGTCCGCTCCGAGGAGAGGCTTTCTACAAACCGGAGGAGTTCGTGCGCTTCGACAGCGACGTGGGGAGTACCGGGCGGTGACCG 115
Ioan43 TTGTGTCATTTCTACAAACCGGACCGCAGCGGGTCCGCTCCGAGGAGAGGCTTTCTACAAACCGGAGGAGTTCGTGCGCTTCGACAGCGACGTGGGGAGTACCGGGCGGTGACCG 115
Ioan46 TTGTGTCATTTCTACAAACCGGACCGCAGCGGGTCCGCTCCGAGGAGAGGCTTTCTACAAACCGGAGGAGTTCGTGCGCTTCGACAGCGACGTGGGGAGTACCGGGCGGTGACCG 115
Kapou1 TTGTGTCATTTCTACAAACCGGACCGCAGCGGGTCCGCTCCGAGGAGAGGCTTTCTACAAACCGGAGGAGTTCGTGCGCTTCGACAGCGACGTGGGGAGTACCGGGCGGTGACCG 115
Magne1 TTGTGTCATTTCTACAAACCGGACCGCAGCGGGTCCGCTCCGAGGAGAGGCTTTCTACAAACCGGAGGAGTTCGTGCGCTTCGACAGCGACGTGGGGAGTACCGGGCGGTGACCG 115
Magne2 TTGTGTCATTTCTACAAACCGGACCGCAGCGGGTCCGCTCCGAGGAGAGGCTTTCTACAAACCGGAGGAGTTCGTGCGCTTCGACAGCGACGTGGGGAGTACCGGGCGGTGACCG 115
Magne3 TTGTGTCATTTCTACAAACCGGACCGCAGCGGGTCCGCTCCGAGGAGAGGCTTTCTACAAACCGGAGGAGTTCGTGCGCTTCGACAGCGACGTGGGGAGTACCGGGCGGTGACCG 115
Kapou5 TTGTGTCATTTCTACAAACCGGACCGCAGCGGGTCCGCTCCGAGGAGAGGCTTTCTACAAACCGGAGGAGTTCGTGCGCTTCGACAGCGACGTGGGGAGTACCGGGCGGTGACCG 115
Kapou9 TTGTGTCATTTCTACAAACCGGACCGCAGCGGGTCCGCTCCGAGGAGAGGCTTTCTACAAACCGGAGGAGTTCGTGCGCTTCGACAGCGACGTGGGGAGTACCGGGCGGTGACCG 115
Kala13 TTGTGTCATTTCTACAAACCGGACCGCAGCGGGTCCGCTCCGAGGAGAGGCTTTCTACAAACCGGAGGAGTTCGTGCGCTTCGACAGCGACGTGGGGAGTACCGGGCGGTGACCG 115
Live1 TTGTGTCATTTCTACAAACCGGACCGCAGCGGGTCCGCTCCGAGGAGAGGCTTTCTACAAACCGGAGGAGTTCGTGCGCTTCGACAGCGACGTGGGGAGTACCGGGCGGTGACCG 115
Vrcn1 TTGTGTCATTTCTACAAACCGGACCGCAGCGGGTCCGCTCCGAGGAGAGGCTTTCTACAAACCGGAGGAGTTCGTGCGCTTCGACAGCGACGTGGGGAGTACCGGGCGGTGACCG 115
Spi18 TTGTGTCATTTCTACAAACCGGACCGCAGCGGGTCCGCTCCGAGGAGAGGCTTTCTACAAACCGGAGGAGTTCGTGCGCTTCGACAGCGACGTGGGGAGTACCGGGCGGTGACCG 115
Anch3 TTGTGTCATTTCTACAAACCGGACCGCAGCGGGTCCGCTCCGAGGAGAGGCTTTCTACAAACCGGAGGAGTTCGTGCGCTTCGACAGCGACGTGGGGAGTACCGGGCGGTGACCG 115
Magne3 TTGTGTCATTTCTACAAACCGGACCGCAGCGGGTCCGCTCCGAGGAGAGGCTTTCTACAAACCGGAGGAGTTCGTGCGCTTCGACAGCGACGTGGGGAGTACCGGGCGGTGACCG 115
Kapou10 TTGTGTCATTTCTACAAACCGGACCGCAGCGGGTCCGCTCCGAGGAGAGGCTTTCTACAAACCGGAGGAGTTCGTGCGCTTCGACAGCGACGTGGGGAGTACCGGGCGGTGACCG 115
Ioan2 TTGTGTCATTTCTACAAACCGGACCGCAGCGGGTCCGCTCCGAGGAGAGGCTTTCTACAAACCGGAGGAGTTCGTGCGCTTCGACAGCGACGTGGGGAGTACCGGGCGGTGACCG 115
Ioan9 TTGTGTCATTTCTACAAACCGGACCGCAGCGGGTCCGCTCCGAGGAGAGGCTTTCTACAAACCGGAGGAGTTCGTGCGCTTCGACAGCGACGTGGGGAGTACCGGGCGGTGACCG 115

```

```

Ioan53 AGCTGGCCCGCCCTTACGCCAAGGACTGGAAACGCCCGCCGAGACTTCGTGGAGGACAGCGCGGCCATCCGTGGACACGTACTCCAAACACAACTACCGGGTTCGGGAGA 223
Ioan5 AGCTGGCCCGCCCTTACGCCAAGGACTGGAAACGCCCGCCGAGACTTCGTGGAGGACAGCGCGGCCATCCGTGGACACGTACTCCAAACACAACTACCGGGTTCGGGAGA 223
Ioan37 AGCTGGCCCGCCCTTACGCCAAGGACTGGAAACGCCCGCCGAGACTTCGTGGAGGACAGCGCGGCCATCCGTGGACACGTACTCCAAACACAACTACCGGGTTCGGGAGA 223
Ioan43 AGCTGGCCCGCCCGGACGCCAAGGACTGGAAACGCCCGCCGAGACTTCGTGGAGGACAGCGCGGCCATCCGTGGACACGTACTCCAAACACAACTACCGGGTTCGGGAGA 223
Ioan46 AGCTGGCCCGCCCGGACGCCAAGGACTGGAAACGCCCGCCGAGACTTCGTGGAGGACAGCGCGGCCATCCGTGGACACGTACTCCAAACACAACTACCGGGTTCGGGAGA 223
Kapou4 AGCTGGCCCGCCCGGACGCCAAGGACTGGAAACGCCCGCCGAGACTTCGTGGAGGACAGCGCGGCCATCCGTGGACACGTACTCCAAACACAACTACCGGGTTCGGGAGA 223
Magne4 AGCTGGCCCGCCCGGACGCCAAGGACTGGAAACGCCCGCCGAGACTTCGTGGAGGACAGCGCGGCCATCCGTGGACACGTACTCCAAACACAACTACCGGGTTCGGGAGA 223
Magne2 AGCTGGCCCGCCCGGACGCCAAGGACTGGAAACGCCCGCCGAGACTTCGTGGAGGACAGCGCGGCCATCCGTGGACACGTACTCCAAACACAACTACCGGGTTCGGGAGA 223
Magne5 AGCTGGCCCGCCCGGACGCCAAGGACTGGAAACGCCCGCCGAGACTTCGTGGAGGACAGCGCGGCCATCCGTGGACACGTACTCCAAACACAACTACCGGGTTCGGGAGA 223
Kapou5 AGCTGGCCCGCCCGGACGCCAAGGACTGGAAACGCCCGCCGAGACTTCGTGGAGGACAGCGCGGCCATCCGTGGACACGTACTCCAAACACAACTACCGGGTTCGGGAGA 223
Kapou9 AGCTGGCCCGCCCGGACGCCAAGGACTGGAAACGCCCGCCGAGACTTCGTGGAGGACAGCGCGGCCATCCGTGGACACGTACTCCAAACACAACTACCGGGTTCGGGAGA 223
Kala13 AGCTGGCCCGCCCGGACGCCAAGGACTGGAAACGCCCGCCGAGACTTCGTGGAGGACAGCGCGGCCATCCGTGGACACGTACTCCAAACACAACTACCGGGTTCGGGAGA 223
Live1 AGCTGGCCCGCCCTTACGCCAAGGACTGGAAACGCCCGCCGAGACTTCGTGGAGGACAGCGCGGCCATCCGTGGACACGTACTCCAAACACAACTACCGGGTTCGGGAGA 223
Vrcn1 AGCTGGCCCGCCCGGACGCCAAGGACTGGAAACGCCCGCCGAGACTTCGTGGAGGACAGCGCGGCCATCCGTGGACACGTACTCCAAACACAACTACCGGGTTCGGGAGA 223
Spi18 AGCTGGCCCGCCCTTACGCCAAGGACTGGAAACGCCCGCCGAGACTTCGTGGAGGACAGCGCGGCCATCCGTGGACACGTACTCCAAACACAACTACCGGGTTCGGGAGA 223
Anch3 AGCTGGCCCGCCCGGACGCCAAGGACTGGAAACGCCCGCCGAGACTTCGTGGAGGACAGCGCGGCCATCCGTGGACACGTACTCCAAACACAACTACCGGGTTCGGGAGA 223
Magne3 AGCTGGCCCGCCCGGACGCCAAGGACTGGAAACGCCCGCCGAGACTTCGTGGAGGACAGCGCGGCCATCCGTGGACACGTACTCCAAACACAACTACCGGGTTCGGGAGA 223
Kapou10 AGCTGGCCCGCCCGGACGCCAAGGACTGGAAACGCCCGCCGAGACTTCGTGGAGGACAGCGCGGCCATCCGTGGACACGTACTCCAAACACAACTACCGGGTTCGGGAGA 223
Ioan2 AGCTGGCCCGCCCGGACGCCAAGGACTGGAAACGCCCGCCGAGACTTCGTGGAGGACAGCGCGGCCATCCGTGGACACGTACTCCAAACACAACTACCGGGTTCGGGAGA 223
Ioan9 AGCTGGCCCGCCCTTACGCCAAGGACTGGAAACGCCCGCCGAGACTTCGTGGAGGACAGCGCGGCCATCCGTGGACACGTACTCCAAACACAACTACCGGGTTCGGGAGA 223

```

Εικόνα 19. Αποτελέσματα πολλαπλής ομοπαράθεσης

ΑΝΑΛΥΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Μετά από πολλαπλή ομοπαράθεση των αλληλουχιών των ατόμων που στάλθηκαν για sequencing οι 20 αλληλουχίες που προέκυψαν είχαν μήκος 223 νουκλεοτιδίων. Οι παραπάνω αλληλουχίες που συνολικά αντιστοιχούν σε 20 διαφορετικά πρότυπα ηλεκτροφόρησης έχουν προκύψει από τουλάχιστον επτά διαφορετικούς απλότυπους.

Τα παραπάνω πρότυπα με τη σειρά τους ομαδοποιήθηκαν όπως φαίνονται στον πίνακα που ακολουθεί.

Πίνακας 2. Ομαδοποίηση των εξεταζόμενων ατόμων σε 20 διαφορετικά πρότυπα.

ΑΠΛΟΥΠΟΣ 1	ΑΠΛΟΥΠΟΣ 2	ΑΠΛΟΥΠΟΣ 3	ΑΠΛΟΥΠΟΣ 4	ΑΠΛΟΥΠΟΣ 5	ΑΠΛΟΥΠΟΣ 6
Κάπουρνα 5 Δέση 4	Ιωάννινα 52	Σπηλιά 38	Ιωάννινα 37	Ιωάννινα 35	Λιβάδι Ελασ. 1
				Κάπουρνα 8	Σπηλιά 44
				Λ.7-Άρτα	
				Ιωάννινα 5	
				Λ.29-Άρτα	
				Λ.8-Ζαγόρι	
				Λ.31- Χαλκιδική	
				Σπηλιά 21	
				Μαγνησία 7	
				Ιωάννινα 23	

ΑΠΛΟΥΠΟΣ 7	ΑΠΛΟΥΠΟΣ 8	ΑΠΛΟΥΠΟΣ 9	ΑΠΛΟΥΠΟΣ 10	ΑΠΛΟΥΠΟΣ 11	ΑΠΛΟΥΠΟΣ 12
Ιωάννινα 19	Αγχιάλος 3	Βροντερό 1	Κάπουρνα 10	Μαγνησία 3	Ιωάννινα 2
					Ιωάννινα 3
					Σπηλιά 8
					Λ.16
					Ανώγειο Άρτας 2
					Πατιόπουλο Άρτας 1
					Ολίτσικα Ζάλ. 17
					Μυρσίνη Πρεβ.1

ΑΠΛΟΤΥΠΟΣ 13	ΑΠΛΟΤΥΠΟΣ 14	ΑΠΛΟΤΥΠΟΣ 15	ΑΠΛΟΤΥΠΟΣ 16
Ιωάννινα 46	Μαγνησία 2	Κάπουρνα 4	Ιωάννινα 43
	Κάπουρνα 6	Λ-147	Ιωάννινα 56
	Ιωάννινα 26	Μαγνησία 11	

ΑΠΛΟΤΥΠΟΣ 17	ΑΠΛΟΤΥΠΟΣ 18	ΑΠΛΟΤΥΠΟΣ 19	ΑΠΛΟΤΥΠΟΣ 20
Κάπουρνα 7	Μαγνησία 5	Λ.33-Ηλεία	Κάπουρνα 9
Μαγνησία 4	Μαγνησία 6		Ιωάννινα 11
Κάπουρνα 3	Λ-632		Ιωάννινα 42
Ιωάννινα 4	Σπηλιά 18		Μαγνησία 8
Ιωάννινα 8			Ολίτσικα Ζάλ. 14
Ιωάννινα 15			Ολίτσικα Ζάλ. 16
Ιωάννινα 18			Καταράκτης Άρτας 1
Ιωάννινα 51			Αγγιάλος 1
Παραμυθιά 2			Αγγιάλος 2
Λ.12- Πτολεμαίδα Α-6789			Λ.32- Χαλκιδική Άρτα 4
Αμπέλια Άρτας 1			Ζάλογγο 4
Μαγνησία 1			Ζάλογγο 7
Μαγνησία 12			Ζάλογγο 10
Όλυμπος 1			Κρασιά 1
Αυλότοπος Άρτας 1			Σπηλιά 17
Λ.1-Ζαγόρι			
Λ.2-Ζαγόρι			
Λ.11-Ζαγόρι			
Λ.30- Κέρκυρα			
Λ.34- Καλαμπάκα			

* Οι απλότυποι σε πράσινο πλαίσιο αντιστοιχούν σε αλληλουχίες ετεροζυγωτικών ατόμων που έχουν προκύψει μετά από sequencing, ενώ οι απλότυποι σε λευκό πλαίσιο αντιστοιχούν σε αλληλουχίες ομοζυγωτικών ατόμων.

** Τα ετεροζυγωτικά άτομα στο πρόγραμμα που εκτελεί ομοπαράθεση διακρίνονται από τα ομοζυγωτικά επειδή στην νουκλεοτιδική αλληλουχία οι βάσεις που δεν διαβάζονται ευδιάκριτα [εμφανίζονται στο χρωματογράφημα με δύο κορυφές (peak)] συμβολίζονται με N.

*** Οι χρωματισμοί αντιστοιχούν στις γεωγραφικές περιοχές από τις οποίες ελήφθησαν τα δείγματα.

Αποκλείοντας τους απλότυπους των ετεροζυγωτικών ατόμων και συγκρίνοντας τις νουκλεοτιδικές αλληλουχίες των ομοζυγωτικών με τη μέθοδο Neighbor Joining κατασκευάστηκε ένα δενδρόγραμμα και υπολογίστηκαν οι αποστάσεις μεταξύ των ακολουθιών των ομοζυγωτικών ατόμων οι οποίες ομοπαράτεθηκαν και οι οποίες φανερώνουν την ποσοστιαία ποικιλότητα των προτύπων. Για την απεικόνιση των αποτελεσμάτων της πολλαπλής ομοπαράθεσης χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα Treeview. Από την ομοπαράθεση προέκυψαν έξι διαφορετικοί απλότυποι. Οι έξι (6) απλότυποι του εξονίου 2 του γονιδίου DRB των λαγών *L. europeaus* κατατάχτηκαν σε 3 ομάδες. Στην 1^η ομάδα ανήκουν οι απλότυποι 14 & 7, στην 2^η ομάδα οι απλότυποι 12 & 5 και στην 3^η ομάδα οι απλότυποι 9 & 10 (εικόνα 19). Εδώ, πρέπει να αναφερθεί ότι κάθε κλάδος μιας ομάδας αντιπροσωπεύει διαφορετικό απλότυπο και το μήκος σε κάθε κλάδο μιας ομάδας είναι διαφορετικό, γεγονός που αντιστοιχεί στον διαφορετικό εξελικτικό ρυθμό που παρουσιάζουν τα άτομα που περιλαμβάνει ο κάθε απλότυπος όπως προκύπτει από τον πίνακα 1.

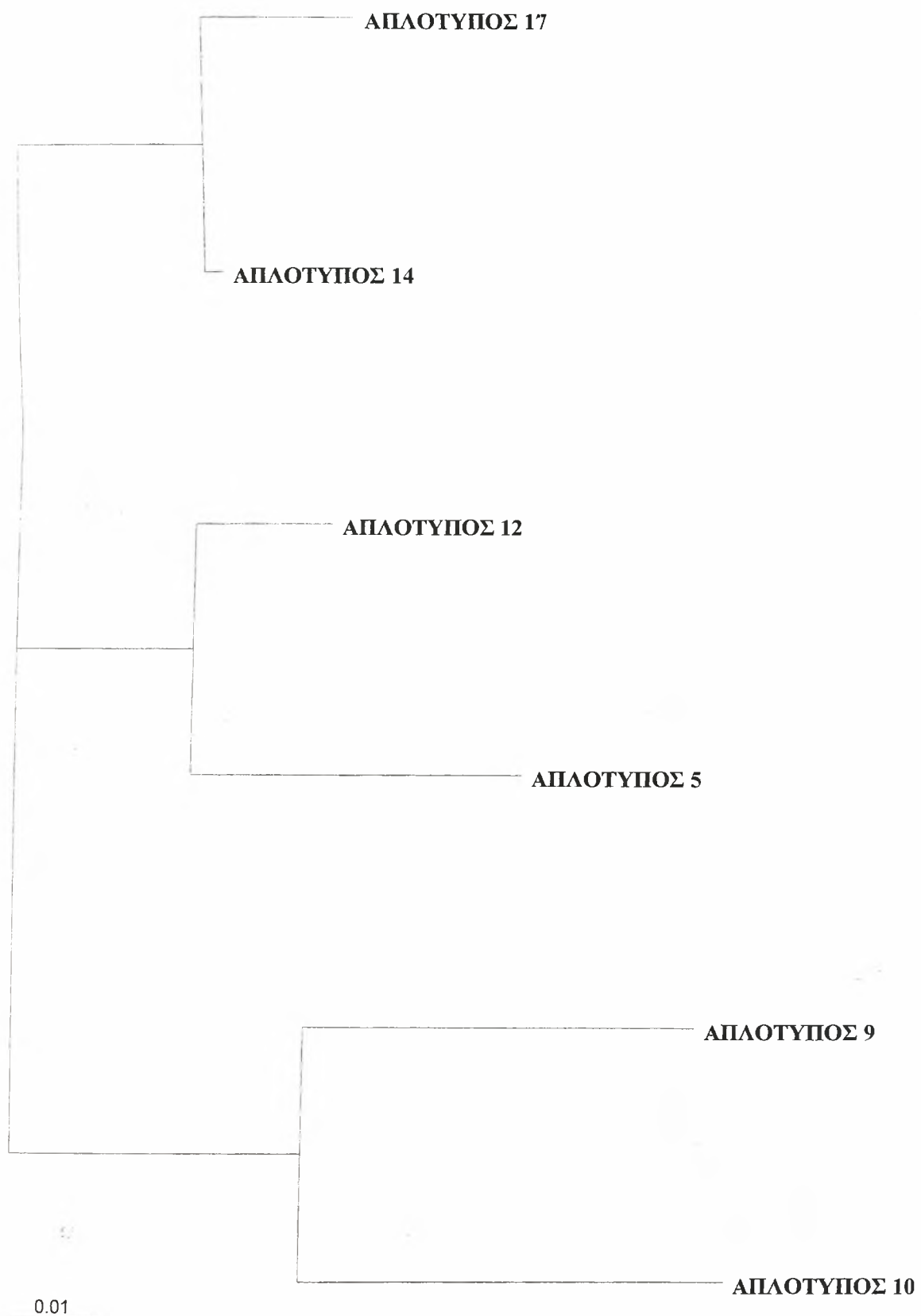
Στον πίνακα που ακολουθεί συγκρίνονται οι ομοιότητες σε επίπεδο νουκλεοτιδικής αλληλουχίας μεταξύ των απλοτύπων των ομοζυγωτικών δειγμάτων.

Πίνακας 6. Στον πίνακα απεικονίζεται η ποσοστιαία % ομοιότητα της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας μεταξύ των απλοτύπων των ομοζυγωτικών ατόμων.

	ΑΠΛΟΤΥΠΟΣ 17	ΑΠΛΟΤΥΠΟΣ 14	ΑΠΛΟΤΥΠΟΣ 12	ΑΠΛΟΤΥΠΟΣ 5	ΑΠΛΟΤΥΠΟΣ 9	ΑΠΛΟΤΥΠΟΣ 10
ΑΠΛΟΤΥΠΟΣ 17	-					
ΑΠΛΟΤΥΠΟΣ 14	98,2	-				
ΑΠΛΟΤΥΠΟΣ 12	92,3	94,1	-			
ΑΠΛΟΤΥΠΟΣ 5	91,4	93,2	95,0	-		
ΑΠΛΟΤΥΠΟΣ 9	90,1	90,1	90,5	86,0	-	
ΑΠΛΟΤΥΠΟΣ 10	88,7	90,1	89,2	87,4	91,4	-

Πίνακας 7. Ο ακόλουθος πίνακας έχει προκύψει από την εικόνα 19. Στην εικόνα 19 τα συντηρημένα νουκλεοτίδια χρωματίζονται με διαφορετικά χρώματα. Όπως είναι γνωστό οι αλληλουχίες των εξεταζόμενων προτύπων έχουν μέγεθος 223 νουκλεοτίδια. Με τη βοήθεια εφαρμογής του προγράμματος Bioedit 7.0 υπολογίστηκε συνολικά πόσες φορές επαναλαμβάνεται σε κάθε απλότυπο κάθε ένα από τα τέσσερα διαφορετικά νουκλεοτίδια καθώς και ο λόγος G+C /A+T για κάθε απλότυπο.

ΑΠΛΟΤΥΠΟΙ	A	C	G	T
17	44	58	85	36
14	44	58	82	39
12	46	56	85	36
5	48	54	82	39
9	48	57	83	35
10	47	57	82	37



Εικόνα 20. Το φυλογενετικό διάγραμμα παριστάνει ομαδοποιημένους τους 6 απλοτύπους των ομοζυγωτικών ατόμων που περιγράφονται στον πίνακα 3.

Αποκλείοντας τα άτομα που ελήφθησαν από τις περιοχές της Μακεδονίας, Θεσπρωτίας και των Επτανήσων των οποίων ο αριθμός είναι πολύ μικρός και συγκρίνοντας μεγαλύτερο αριθμό δειγμάτων που ελήφθησαν από περιοχές της Θεσσαλίας (Ν. Μαγνησίας και Ν. Λάρισας) και της Ηπείρου (Ν. Άρτας και Ν. Ιωαννίνων) προκύπτει ο ακόλουθος πίνακας.

Πίνακας 5.

ΑΠΛΟΤΥΠΟΙ	ΗΠΕΙΡΟΣ		ΘΕΣΣΑΛΙΑ	
	Ν. ΑΡΤΑΣ	Ν. ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ	Ν. ΜΑΓΝΗΣΙΑΣ	Ν. ΛΑΡΙΣΑΣ
	1			+
2		+		
3				+
4		+		
5	+	+	+	+
6				+
7		+		
8			+	
9			+	
10			+	
11			+	
12	+	+		+
13		+		
14		+	+	
15			+	
16		+		
17	+	+	+	+
18			+	+
19				
20	+	+	+	+

	10	20	30	40	50	60	70	
S1-Magnesia4-drb	LCHFYWT	RVRFLERLFY	IRREEFMRFDS	VDVEYRAVTE	LARPDADKW	SRPDRLEY	ARAAAVDT	FCKHLYVRE 74
S31-Magnesia2-drb						L	T	S 74
Ioannina2-DRB		YV	YV		Y	Q	L	DR
S13-L7-Arta-drb		YMD	V		I	L	DR	S
Vrondero1-DRB		Y	YV		EY	Q	T	D
Kapournal0-DRB		D	Y	S	TV	EY	L	F

Εικόνα 21. Απεικόνιση πολλαπλής ομοπαράθεσης σε επίπεδο αμινοξικής αλληλουχίας.

Ποικιλομορφία σε επίπεδο αμινοξικής αλληλουχίας

Από την πολλαπλή ομοπαράθεση σε επίπεδο αμινοξικής αλληλουχίας των έξι (6) απλοτύπων με τη χρήση του προγράμματος Bioedit 7.0, διαπιστώθηκε συνολικά ότι 20 από τα 74 αμινοξέα που κωδικοποιεί η αλληλουχία του κάθε απλότυπου είναι μεταβλητά (ποσοστό ~27%) ενώ για κάθε απλότυπο οι μεταβλητές θέσεις για τα αμινοξέα κυμαίνονται από 3 έως 14. Τα αποτελέσματα αυτά είναι σύμφωνα με αντίστοιχες μελέτες που έχουν γίνει αναφορικά με την ποικιλομορφία του γονιδίου DRB2 σε ευρασιατικούς κάστορες του είδους *Castor fiber*. Για το παραπάνω είδος βρέθηκε ότι σε σύνολο 76 δειγμάτων που εξετάστηκαν και σε επίπεδο αμινοξέων, 15 από τα 57 συνολικά αμινοξέα που κωδικοποιεί η νουκλεοτιδική αλυσίδα είναι μεταβλητά (ποσοστό ~26,3%) (Babik et al., 2005).

ΜΕΡΟΣ Δ΄

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η διατήρηση της γενετικής σύστασης ενός ζωϊκού είδους αποτελεί ένα από τα σημαντικότερα θέματα που απασχολούν τη σύγχρονη βιολογία ήδη από τη δεκαετία του 1950 (Simon, 1984). Βιολογικοί, οικονομικοί, ηθολογικοί και συναισθηματικής φύσεως είναι μερικοί από τους λόγους που δικαιολογούν την πρωτοβουλία επιστημόνων οι οποίοι επιχειρούν την εύρεση μεθόδων ώστε να αποφεύγεται η απώλεια της γενετικής ποικιλότητας των φυσικών πληθυσμών η οποία είναι απαραίτητη για την διατήρηση αυτόχθονων πληθυσμών. Από προηγούμενες μελέτες έχει δειχθεί ότι η γενετική ποικιλότητα στο είδος *L.europeaus* στον ελλαδικό χώρο έχει επηρεαστεί από προγράμματα εμπλουτισμών και έχει προταθεί ότι όταν αυτά πραγματοποιούνται κάτω από ελεγχόμενες συνθήκες και σε ποσότητες που οι φυσικοί πληθυσμοί δεν διέρχονται από φάσεις μείωσης των πληθυσμιακών μεγεθών, αυξάνουν τη γενετική ποικιλομορφία καθώς προκαλείται ανάμειξη των γονιδιακών δεξαμενών. Όταν όμως οι απελευθερώσεις γίνονται ανεξέλεγκτα τότε μπορούν να επηρεάσουν και να μειώσουν τη γενετική ποικιλομορφία. Στην παρούσα μελέτη στόχος ήταν να προσδιοριστεί εάν και κατά πόσο η ποικιλομορφία στο μόριο του MHC II και στον γονιδιακό τόπο DRB 2 του είδους *L.europeaus* επηρεάζεται από την παρουσία παθογόνων και να προταθούν μηχανισμοί που πιθανώς συμβάλλουν στη διατήρηση της ποικιλομορφίας του μορίου. Πράγματι, παρατηρήθηκε ότι οι πληθυσμοί του είδους *L.europeaus* στον ελλαδικό χώρο εμφανίζουν εκτεταμένο γενετικό πολυμορφισμό στο γονίδιο DRB2 του MHC II όπως φάνηκε από τον αριθμό των διαφορετικών απλοτύπων και τον υψηλό βαθμό ετεροζυγωτίας. Σε ελληνικούς πληθυσμούς του είδους *L.europeaus* ταυτοποιήθηκαν 20 διαφορετικοί απλότυποι και ο αριθμός αυτός είναι συγκριτικά μεγαλύτερος από τον αριθμό των διαφορετικών απλοτύπων για τον ίδιο γονιδιακό τόπο που έχει βρεθεί από αντίστοιχες μελέτες που έχουν γίνει σε άλλα είδη θηλαστικών πχ. σε μηρυκαστικά και σε πληθυσμούς από ελάφια του είδους *Moschus moschiferus*, *Alces Americana*, *Cervus elaphus* (Mikko et al., 1995;1997) και σε ζαρκάδια του γένους *Capreolus capreolus* (Swarbrick et al., 1995). Ο μεγάλος βαθμός γενετικής ποικιλομορφίας ο οποίος είναι σύμφωνος με προηγούμενα δεδομένα πάνω στη γενετική ποικιλομορφία του mtDNA στο άτομα του ίδιου είδους, αποδεικνύει ότι υπάρχει μεγάλο γενετικό απόθεμα όσον αφορά το πυρηνικό γονιδίωμα.

Ποικιλομορφία μεταξύ των απλοτύπων

Παρατηρούμε ότι τα άτομα που εξετάστηκαν παρουσίασαν υψηλό ποσοστό ποικιλομορφίας το οποίο κυμαίνεται σε 24,6% (από τα 81 άτομα προέκυψαν 20 διαφορετικά πρότυπα ηλεκτροφόρησης), δηλαδή συνολικά ανά τέσσερα περίπου άτομα εμφανίζεται διαφορετικό πρότυπο. Στα 81 συνολικά άτομα τα 65 ήταν φυσιολογικά (ομοζυγωτικά-ετεροζυγωτικά) ενώ τα 16 που εξετάστηκαν ήταν παθολογικά (θετικά στο σύνδρομο)(ομοζυγωτικά-ετεροζυγωτικά). Επίσης ο λόγος των ομοζυγωτικών παθολογικών ατόμων προς τα ετεροζυγωτικά παθολογικά άτομα είναι $12/4 > 1$. Το γεγονός ότι τα παθολογικά άτομα που είναι ομόζυγα ως προς μια μορφή αλληλομόρφων είναι περισσότερα σε αριθμό ενισχύει την άποψη ότι τα άτομα αυτά είναι επιρρεπή σε παθογόνα και εκδηλώνουν σίγουρα το σύνδρομο σε αντίθεση με τα ετεροζυγωτικά που καθίστανται παθολογικά κάτω από την επίδραση ειδικών συνθηκών. Όπως φαίνεται και στον πίνακα 1 τα περισσότερα παθολογικά άτομα που είναι ομόζυγα αντιστοιχούν στους απλοτύπους 5 και 17.

Επίσης στα 20 διαφορετικά πρότυπα που προέκυψαν, τα 6 από αυτά αντιστοιχούν σε ομοζυγωτικά άτομα (ποσοστό 30%), απλότυποι No 5, No 9, No 10, No 12, No 13, No 14, No 17, ενώ οι υπόλοιποι 14 απλότυποι ανήκουν σε ετεροζυγωτικά άτομα (ποσοστό 70%) και είναι οι απλότυποι No 1, No 2, No 3, No 4, No 6, No 7, No 8, No 11, No 13, No 15, No 16, No 18, No 19, No 20. Το υψηλό ποσοστό των ετεροζυγωτικών ατόμων στο σύνολο των δειγμάτων μας, πιθανώς δικαιολογεί ότι τα ετερόζυγα άτομα για το συγκεκριμένο γονιδιακό τόπο του εξονίου 2 του γονιδίου DRB είναι ικανά να προσδένουν και να παρουσιάζουν μια ευρύτερη ποικιλία αντιγονικών πεπτιδίων σε σύγκριση με τα ομοζυγωτικά άτομα. Η αρμοστικότητα τους είναι μεγαλύτερη και κατά συνέπεια είναι ικανά να αναπτύσσουν έντονη ανοσοποιητική απόκριση και περισσότερο ανθεκτικά έναντι σε μεγαλύτερη ποικιλία παθογόνων. Η παρατήρηση αυτή είναι σύμφωνη με την υπόθεση της υπερκυριαρχίας του ετεροζυγώτη (overdominance selection), ωστόσο, δεν μπορούμε με σιγουριά να γενικεύσουμε τα αποτελέσματα για το είδος *L.europeaus* διότι και σε άλλους φυσικούς πληθυσμούς διαφόρων ειδών, τα άτομα είναι ετερόζυγα για τον συγκεκριμένο γονιδιακό τόπο του MHC II, χωρίς ωστόσο να ασκείται επιλογή από την παρουσία παθογόνων.

Θα πρέπει επίσης να τονιστεί ότι ο αριθμός των δειγμάτων είναι αρκετά μικρός και είναι πιθανό να μην αντιπροσωπεύει το σύνολο για την ποικιλομορφία των πληθυσμών. Για το λόγο αυτό πιο ξεκάθαρα αποτελέσματα για το ποσοστό της

ποικιλομορφίας των απλοτύπων λαμβάνονται όταν ξεχωρίσουμε τους απλότυπους των ομοζυγωτικών ατόμων από εκείνους των ετεροζυγωτικών στο σύνολο των δειγμάτων. Οι απλότυποι των ετεροζυγωτικών ατόμων θα πρέπει να κλώνοποιηθούν σε κατάλληλα πλασμίδια και να υποβληθούν σε αλληλούχιση (sequencing) εκ νέου ώστε να ταυτοποιηθεί η θέση της σημειακής μετάλλαξης στα δύο αλληλόμορφα που δημιουργεί τη διαφορετικότητα των απλοτύπων.

Αξίζει να σημειωθεί ότι τα άτομα με τους απλότυπους 9 και 10 αντιστοιχούν σε λαγούς που προήλθαν από διαφορετικές περιοχές του Ν. Μαγνησίας. Τα άτομα αυτά παρ'ότι στο δενδρόγραμμα κατατάσσονται στην ίδια ομάδα, σε επίπεδο DNA όπως φαίνεται από το μήκος των κλάδων εντοπίζονται διαφορές γεγονός που δείχνει ότι η μορφολογική και η βιοχημική εξέλιξη έγιναν με διαφορετικούς ρυθμούς.

Επίσης, πρέπει να αναφέρουμε ότι όπως φαίνεται από τον πίνακα 3, τα περισσότερα θετικά άτομα στο Σύνδρομο του EBHS εμφανίζουν τους απλότυπους 5 και 17 όπως και το μεγαλύτερο ποσοστό των φυσιολογικών ατόμων. Έτσι, τα παθολογικά άτομα με απλότυπους 5 & 17 αντιστοιχούν σε ποσοστό 73% στο σύνολο των παθολογικών ατόμων και ~14% στο σύνολο των δειγμάτων που ελέγχθησαν, ενώ τα φυσιολογικά άτομα με τους ίδιους απλότυπους αντιπροσωπεύουν ποσοστό 30% στο σύνολο των φυσιολογικών ατόμων και ~25% στο σύνολο των δειγμάτων.

Τα θετικά άτομα στο σύνδρομο που περιλαμβάνονται στον απλότυπο 5 προέρχονται από περιοχές της Ηπείρου και Κεντρικής Μακεδονίας ενώ τα θετικά άτομα στον απλότυπο 17 προέρχονται από τα Επτάνησα, την Ηπειρο και την Δυτική Μακεδονία. Οι παραπάνω απλότυποι βέβαια ανήκουν σε δύο διαφορετικές ομάδες όπως φαίνονται στο διάγραμμα με πιο πρόσφατο από άποψη εξελικτικού ρυθμού τον απλότυπο 5.

Επίσης από την νουκλεοτιδική ομοπαράθεση των έξι (6) απλοτύπων παρατηρήθηκε ότι εμφανίζονται 4 συντηρημένες περιοχές νουκλεοτιδίων (ελάχιστο μήκος συντηρημένης νουκλεοτιδικής περιοχής 15bp). Τα συντηρημένα τμήματα των αλληλουχιών εντοπίστηκαν στις θέσεις 1-37, 74-102, 104-128 και 195-223bp. Οι συντηρημένες αλληλουχίες πιθανώς σχετίζονται με τη διατήρηση της δομικής σταθερότητας της θέσης ABS (antigen-binding site) όπως μάλιστα έχει αποδειχθεί για τον ίδιο γενετικό τόπο του DRB2 και σε άλλα είδη χωρίς όμως κάτι τέτοιο να αποκλείει την ύπαρξη ποικιλομορφίας στη συγκεκριμένη θέση.

Ποικιλομορφία σε επίπεδο αμινοξικής αλληλουχίας

Από την πολλαπλή ομοπαράθεση σε επίπεδο αμινοξικής αλληλουχίας των έξι (6) απλοτύπων με τη χρήση του προγράμματος Bioedit 7.0, διαπιστώθηκε συνολικά ότι 20 από τα 74 αμινοξέα που κωδικοποιεί η αλληλουχία του κάθε απλότυπου είναι μεταβλητά (ποσοστό ~27%) ενώ για κάθε απλότυπο οι μεταβλητές θέσεις για τα αμινοξέα κυμαίνονται από 3 έως 14. Τα αποτελέσματα αυτά είναι σύμφωνα με αντίστοιχες μελέτες που έχουν γίνει αναφορικά με την ποικιλομορφία του γονιδίου DRB2 σε ευρασιατικούς κάστορες του είδους *Castor fiber*. Για το παραπάνω είδος βρέθηκε ότι σε σύνολο 76 δειγμάτων που εξετάστηκαν και σε επίπεδο αμινοξέων, 15 από τα 57 συνολικά αμινοξέα που κωδικοποιεί η νουκλεοτιδική αλυσίδα είναι μεταβλητά (ποσοστό ~26,3%) (Babik et al., 2005).

Ποικιλομορφία μεταξύ των πληθυσμών

Αν και ο συνολικός αριθμός των δειγμάτων που εξετάστηκαν είναι σχετικά μικρός αλλά και το γεγονός ότι από κάθε γεωγραφική περιοχή δεν εξετάστηκε ίδιος αριθμός ατόμων ώστε να μπορούμε να μιλήσουμε συγκριτικά και να οδηγηθούμε σε ξεκάθαρα και γενικευμένα αποτελέσματα όσον αφορά την ποικιλομορφία των πληθυσμών παρατηρούμε ότι τα άτομα της Κεντρικής Ελλάδας εμφανίζουν το μεγαλύτερο ποσοστό διαφορετικών απλοτύπων

Αν και δεν υπάρχουν φυσικοί φραγμοί που να εμποδίζουν τη γονιδιακή ροή μεταξύ των πληθυσμών που προέρχονται από περιοχές της Θεσσαλίας, μπορούμε να υποθέσουμε ότι μη- επιλεκτικοί παράγοντες πιθανόν να διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στον καθορισμό της ποικιλομορφίας σε αυτό τον γονιδιακό τόπο. Η παραπάνω υπόθεση μπορεί να ενισχυθεί από ευρύματα των Mamuris et al. 2001 οι οποίοι σε άρθρο τους πάνω στην μελέτη του γενετικού πολυμορφισμού των λαγών *L. europeaus* σε επίπεδο mtDNA αναφέρουν ότι σε ανάλογα δείγματα που λήφθηκαν από τις ανωτέρω περιοχές παρατηρείται αντίστοιχη ποικιλομορφία μεταξύ των απλοτύπων και αυτό διότι τα τελευταία 10 χρόνια άτομα του είδους που εισήχθησαν από περιοχές της Ευρώπης και εκτράφηκαν σε ελληνικές φάρμες, στη συνέχεια απελευθερώθηκαν σε περιοχές της Κεντρικής Ελλάδας. Παρατηρούμε έτσι, ότι η γενετική ποικιλομορφία του γονιδιακού τόπου DRB 2 είναι ανεξάρτητη από τις γεωγραφικές αποστάσεις

Από τον πίνακα 5 φαίνεται ότι οι πιο κοινοί απλότυποι είναι ο απλότυπος 5, ο 17 και ο 20 οι οποίοι παρατηρήθηκαν εκτός από τα άτομα των περιοχών που φαίνονται στον πίνακα 5, και στα άτομα από τις υπόλοιπες περιοχές του ελλαδικού χώρου που

εξετάστηκαν, ενώ ο απλότυπος 12 και σύμφωνα με τον πίνακα δεν εμφανίζεται στα άτομα που προέρχονται από τον Ν. Μαγνησίας. Εδώ βέβαια, θα πρέπει να σημειωθεί ότι δεν ελήφθησαν δείγματα από περιοχές της Θράκης, της Πελοποννήσου και των νησιών.

Από την ανάλυση των δεδομένων προέκυψε ότι τόσο τα φυσιολογικά όσο και τα παθολογικά άτομα εμφανίζουν χαρακτηριστικά και με μεγαλύτερη συχνότητα δύο συγκεκριμένους απλότυπους. Ωστόσο, δεν μπορούμε με σιγουριά να πούμε ότι η μείωση των πληθυσμών που παρατηρείται στο είδος οφείλεται στο σύνδρομο και αυτό διότι στη παρούσα μελέτη, μελετήσαμε μόνο έναν γονιδιακό τόπο του MHC II από τον αρκετά μεγάλο αριθμό γονιδίων που εμπλέκονται στην ανοσοποιητική απόκριση, ο οποίος φάνηκε ότι είναι εξαιρετικά πολυμορφικός.

ΜΕΡΟΣ Ε΄

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Ainsworth P., Surth L., Coulter- Mackie M. (1991). Diagnostic single strand conformation polymorphism, (SSCP): a simplified non- radioisotopic method as applied to Tay-Sachs B1 variant. *Nucleic Acids Res.* **19**, p.405-406
- Αρχές Γενετικής Ιατρικής, Thomas D. Gelehrter, Fransis S. Collins, David Ginsburg, Ιατρικές Εκδόσεις Πασχαλίδη, Αθήνα , 2003
- Bach. E. A., M. Aguet, R. D. Schreiber. 1997. The IFN- γ receptor: a paradigm for cytokine receptor signaling. *Annu. Rev. Immunol.* **15**:563.
- Babik W., W. Durka and J. Radwan. Sequence diversity of the MHC DRB gene in the Eurasian beaver (*Castor fiber*), *Molecular Ecology* (2005) **14**, 4249-4257
- Bansfield, A. (1974). *Mammals of Canada*. Toronto: University of Toronto Press
- Black .W. C., Du Teau, N. M., Puterka, G. J., Nechols, J. R. and Petorrini, J.M. (1992) Use of the Random amplified polymorphic DNA polymerase chain reaction (RAPD-PCR) to detect DNA polymorphisms in aphids (Homoptera:amphidae) *Bulletin of Entomological Research.* **82**: 151-159
- Borino, N., Montenegro, A. (1997). Reproduction of the European Hare in Pantagonia, Argentina. *Acta Theriologica*, **42** (1): 47-54
- Boyson JE, Shufflebotham C, Cadavid LF, Urvater JA, Knapp LA, Hughes AL, Watkins DI: The MHC class I genes of the rhesus monkey. Different evolutionary histories of the MHC class I and II genes in primates. *Journal of Immunology* **156**: 4656, 1996
- Briles WE, Briles RW, Taffs RE: Resistance to a malignant disease in chickens in mapped to subregion of major Histocompatibility (B) complex. *Science* **219**:977, 1983
- Brown JH, Jardedtsky T, Saper MA (1998), A hypothetical model of the foreign antigen- binding site of class II histocompatibility molecules. *Nature* **332**: 845-850
- Brown JH, Jardedtsky TS, Gorga JC, Stern LJ, Urban RG, Strominger JL, Wiley DC (1993), Three dimensional structure og the human class II histocompatibility antigen HLA-DR1, *Nature* **364**: 33- 39
- Carrington M, Nelson GW, Martin MP, Kissner T, Vlahov D, Goedert JJ, Kaslow R, Buchbinder S, Hoots K, O'Brien SJ: HLA and HIV-1: heterozygote advantage and B*35-Cw*04 disadvantage. *Science* **283**:1748, 1999

Chasey D., Lucas M., Westcott D., Williams M. (1992) European brown hare Syndrome in the U.K.; a calicivirus related to but distinct from that of viral hemorrhagic disease in rabbits. *Arch. Virol.* 124: 363-370

Cognato, A. I., Rogers, S.O. and Teale, S. A. (1995) Species diagnosis and phylogeny of the *Ips grandicollis* group (coleopteran:Scotylidae) using random amplified polymorphic DNA. *Ann. Entom. Soc. Am.* 88-397

Dixon, B., S.H.M.van Erp, P.N. S. Rodrigues, E. Egberts, and R. J. M. Stet. 1995. Fish major histocompatibility complex genes: an expansion. *Developmental and Comparative Immunology* 19:109-133

Edwards, S.V., and W. Hedrick. 1998. Evolution and ecology of MHC molecules from genomics to sexual selection. *Trends in ecology and evolution* 13: 305-311

Erlich HA, T.L Buggan (1990), HLA DNA typing. In: Innis MA, Gelfand DH, Srinivasy JJ, White TJ (eds) PCR protocols. Academic Press, New York, pp 261-271

Falk, K., O. Rotzschke, S. Stevanovic, G. Jung, and H.G.Ramensee. 1991. Allele-specific motifs revealed by sequencing of self-peptides eluted from MHC molecules. *Nature* 351: 290-296

Finch, C.E, and M.R. Rose. 1995. Hormones and physiological architecture of life history evolution. *Quarterly Review of Biology* 70: 1-70

Flaherty L: Major histocompatibility complex polymorphism: a nonimmune theory for selection. *Human Immunology* 21:3, 1988

Flanjik MF, Canel C, Kramer J, Kasahara M: Which came first, MHC class I or class II? *Immunogenetics* 33:295, 1991

Frolich K., Meyer H.H.D., Pielowski Z., Ronsholt L., Seck-Lanzendorf S.v., Stolte M. (1996). European brown hare Syndrome in free-ranging hares in Poland. *J. Wildl. Dis.* 32: 280-285

Game Controversy Trust January, 2002:
<http://www.gct.org.uk/menus/research.html>

Gavier-widen D, Morner T- : Epidemiology and diagnosis of EBHS in Scandinavian countries: a review, *Sci Tech* 1991 Jun; 10(2) 453-8

Giroux Melanie, Schmidt Manuel and Descoteaux Albert, IFN- γ -Induced MHC Class II Expression: Transactivation of Class II Transactivator Promoter IV by IFN Regulatory Factor-1 is Regulated by Protein Kinase C- α *The Journal of Immunology*, 2003, 171: 4187-4194.

Grossberger, D, and P. Parham. 1992. Reptilian class I major Histocompatibility complex genes reveal conserved elements in class I structure. *Immunogenetics* 36: 166-174

Gustavo A. Gutierrez-Espeleta, Philip W. Hedrick, Steven T. Kalinowski, Daniel Garrigan & Walter M. Boyce, Is the decline of desert bighorn sheep from infectious disease the result of low MHC variation, *Heredity* 86 (2001) 439-450

Hall, E., Kelson, K., (1959). *Mammals of North America*. New York: The Ronald Press Co.

Harada, H., T. Fujita, M. Miyamoto, Y. Kimura, M. Maruyama, A. Furia, T. Miyata, T. Taniguchi. 1989. Structurally similar but functionally distinct factors, IRF-1 and IRF-2, bind to the same regulatory elements of IFN and IFN-inducible genes. *Cell* 58:729.

Harton, J. A., J. P. Ting. 2000. Class II transactivator: mastering the art of major histocompatibility complex expression. *Mol. Cell. Biol.* 20:6183

Hartl, G. B., Markowski, J., Swiatecki, A., Janisewski, T. and Willing, R. (1992). Genetic diversity in the Polish brown hare *Lepus europeus* Pallas, 1778: implications for conservation and management. *Acta Theriol.* 37: 15-25.

Hartl, G. B., Suckentruk, F., Nadlinger, K. and Willing, R. (1993). An integrative analysis of genetic differentiation in the brown hare *Lepus europeus* based on morphology, allozymes and mitochondrial DNA. *Acta Theriologica* 38, Suppl. 2:33-57.

Hedrick PW (1994) Evolutionary genetics of the major histocompatibility complex. *Am Nat* 143:945-964

Hill AV, Allsopp CE, Kwiatkowski D, Anstey NM, Twumasi P, Rowe PA, Bennett S, Brewster D, McMichael AJ, Greenwood BM: Common west African HLA antigens are associated with protection from severe malaria. *Nature* 352:595, 1991

Hodgkinson, Virginia, et al. Rapid Identification of Mitochondrial Cytochrome B Haplotypes by SSCP in *Lutzomyia longipalpis* Populations. Accessed 2003 February 17.

Hugnes AI, Nei M: Evolutionary relationships of class II major histocompatibility complex genes in mammals. *Molecular Biology & Evolution* 7: 491, 1990

Hugnes AI, Nei M: Evolutionary relationships of the classes of the major histocompatibility complex genes. *Immunogenetics* 37: 337-, 1993

Immunology Fifth Edition, by Ivan Roitt, Jonathan Brostoff, David Male, Επιστημονικές Εκδόσεις Παρισιανου, Αθήνα, 2000

Kappes D and J.L. Strominger, 1988, Human class II major histocompatibility complex, genes and protein, *Annu.Rev.Biochem*, 59: 991-1028

Klein J (1986) Natural History of the major Histocompatibility complex

Klein J, o; hUigin C: Composite origin of the major histocompatibility complex genes [Review]. *Current Opinio in Genetics & Developmnet* 3: 923, 1993

Klein J, Sato A: Birth of the major histocompatibility complex. *Scandinavian Journal of Immunology* 47: 199, 1998

Kukita, Y., et al. SSCP Analysis of Long DNA Fragments in Low pH Gel. *Human Mutation*; 1997, (10): 400-7.

Lafranco, L., Wyss, P., Marzachi, C. and Bontante, P. (1995) Generation of RAPD-PCR primers for the identification of isolates of *Glomus mosseae*, an arbuscular myccoriza fungus. *Molec. Ecol.* 4: 61-68

Lawlor DA, Zemmour J, Ennis PD, Parham P: Evolution of class-I MHC genes and proteins: from natural selection to thymic selection. *Annual Review of Immunology* 8:23, 1990

Leontides, s., Psychas, V., Kanteres, D. And Gogos, C (1999). European brown hare Syndrome (necrotic hepatitis) in farmed and wild hares. *Proc. 8th Hellenic Veterinary congress, Athens, 199, p 63*

Lerner, I.M.1954. Genetic homeostasis. Oliver & Boyd, Edinburgh. [6,7]

Mailer, R. J., Scarth, R., and Fristensky, B. 91994). Discrimination among cultivars of rapessed (*Brassica napus* L.) using DNA polymorphisms amplified from arbitrary primers.*Theor.Appl.Genet.* 87: 697-704

Marcato PS, Benazzi C, Yecchi G, Galleoti M, Della Saldal, Sarli G, Lucidi P. “ Clinical and pathological features of viral haemorrhagic disease of rabbits and EBHS”, *Sci Tech*, 1991 Jun; 10(2)Q 371-92

Mark Thomas Lectures, www.ucl.ac.uk/tcga/Teachin/C337/C337-MT-lect2.htm

Matsugana T, Rahman a: What brought the adaptive immune system to vertebrates? *Immunological Reviews* 166: 177, 1998

Mélanie Giroux, Manuel Schmidt and Albert Descoteaux, IFN- γ -Induced MHC Class II Expression: Transactivation of Class II Transactivator Promoter IV by IFN Regulatory Factor-1 is Regulated by Protein Kinase C- α **The Journal of Immunology**, 2003, 171: 4187-4194

Melcher, Ulrich.
SSCPs.www.opbs.okstate.edu/~melcher/MG/MGW1/MG11129.html Accessed
2003 February 17

Mikko, S, Roed, K., Schmutz, S. and Andersson, L. 1999. Monomorphism and polymorphism at MHC DRB loci in domestic and wild ruminants. *Immunol. Rev.*, 167: 169-178

Mitchell-Jones, S. J., Amori, G. Bogdanowich, W., Krystufek, B., Reijnder, P.J., Spitzenberger, F., Stubbe, M., Thissen, J.B.M., Vohalik, V., and Zima, J. (1999). *The Atlas of the European mammals*, Poyser Natural History. Published By T & A. D. Poyser for the Societas Europea Mammalogica.

Muhlethaler-Mottet, A., W. Di Berardino, L. A. Otten, B. Mach. 1998. Activation of the MHC class II transactivator CIITA by interferon- γ requires cooperative interaction between Stat1 and USF-1. *Immunity* 8:157.

Mullis, K.B and Faloona, F.A.(1987) Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase –catalysed chain reaction. *Methods in Enzymology*. 155: 335-350

Nei M, Gu X, Sitnikova T: Evolution by the birth and death process in multigene families of the vertebrate immune system. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 94: 7799, 1997

Nei M, Hugnes AL (1991) Polymorphism and evolution of the major histocompatibility complex loci in mammals. In selander RK, Clark AG, Whittam TS (eds* *Evolution at the molecular level*. Sinauer, Sunderland, Mass, pp 222-247

Ohno S: The ancestor of the adaptive immune system was the CAM system for organogenesis. *Experimental & Clinical Immunogenetics* 4: 181, 1987

Orita, M., et al. Detection of Polymorphisms of Human DNA by Gel Electrophoresis as SSCPs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*; 1989, (86): 2766-70.

Parham P, Ohta T: population biology of antigen presentation by MHC class I molecules, *Science* 272: 67, 1996

Paterson S, Wilson K, Pemberton JM: Major histocompatibility complex variation associated with juvenile survival and parasite resistance in a large unmanaged ungulate population. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 95:3714, 1998

Penn, D. J., K Damjanovich, and W. K. Potts. 2002. MHC heterozygosity confers a selective advantage against multiple –strain infection. *Proceedings of the national Academy of Science, USA* 99: 11260-11264

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

Peterson, R., (1966) *The mammals of the Eastern Canada*. Oxford University Press

Ploegh H. & Watts, C. 1998. Antigen recognition. *Curr. Opin. Immunol.* 10:57-58

Poli, A., Nigro, M., Gallazi, D., Sironi, G., Lavazz, A. (1991). Acute Hepatosis in the European Brown Hare (*Lepus europeaus*) in Italy. *Journal of Wildlife Diseases* 621-629

Potts WK, Wakeland EK: Evolution of MHC genetic diversity: a tale of incest, pestilence and sexual preferences. *Trends in Genetics* 9:408, 1993

Radtkey, R. R., B. Becker, R. D. Miller, R. Riblet, and T. J. Case. 1996. Variation and evolution of class I MHC in sexual and parthenogenetic geckos. *Proceedings of the Royal Society of London B* 263: 1023-1032

Sanger F., Nicklen S. and Coulson A.R. (1977) DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences in the USA*, 74 : 5463- 5467

Simon D. (1984). Conservation of animal genetic resources. A review. *Livest. Prod. Sci.* 11, p.23-26

Simone Somer, Dorothea Schwab, Jorg U. Ganzhorn, MHC diversity of endemic Malagasy rodents in relation to geographic range and social system, *Behav Ecol Sociobiol* (2002), 51: 214-221

Sita Naik, The Human HLA System, *J Indian Rheumatol Assos* 2003: 11: 79-83

M.J.M Smulders, L.B Snoek, G.Booy, B.Vosman (2003), Complete loss of MHC genetic diversity in the Common Hamster (*Cricetus cricetus*) population in the Netherlands. Consequences for conservation strategies, *Conservation Genetics* 4: 441-451

Steimle, V., C. A. Siegrist, A. Mottet, B. Lisowska-Grospierre, B. Mach. 1994. Regulation of MHC class II expression by interferon- γ mediated by the transactivator gene CIITA. *Science* 265:106.

Suchentrunk, F., Michailov, C., Markov, G. and Haiden, a. (2000). Population genetics of Bulgarian brown hares *Lepus europeaus*: allozymic diversity at zoogeographical crossroads. *Acta Theriologica* 45 (1): 1-12.

Sunnucks, P., et al. SSCP Is Not So Difficult: The Application and Utility of Single-Stranded Conformation Polymorphism in Evolutionary Biology and Molecular Ecology. *Molecular Ecology*; 2000, (9): 1699-710.

Swabrick Pa, Schwaiger F-W, Epplen Jt, Buchan GS Griffin JFT, Crawford AM (1995), Cloning and sequencing of expressed DRB genes of the red deer (*Cervus elaphus*) Mhc. *Immunogenetics* 42: 1-9

Thompson, J.D., Gibson, T.J., Plewniak, F., Jeanmougin, F. and Higgins, D.G. (1997) The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research*, 24:4876-4882.

Thursz MR, Thomas HC, Greenwood BM, Hill AV: Heterozygote advantage for HLA class-II type in hepatitis B virus infection [letter]. *Nature Genetics* 17:11, 1997

Trowsdale, J.1995. Both man and bird and beat: comparative organization of the MHC genes. *Immunogenetics* 41: 1-17

Wagner, John. Screening Methods for Detection of Unknown Point Mutations. www-users.med.cornell.edu/~jawagne/screening_for_mutations.html#Single-Strand.Conformational.Polymorphism. Accessed 2003 February 17.

Welsch, J., and Mc Clelland, M. (1990). Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Research*. 18: 7213-7218

Welsch, J., Peterson, C., and Mc Clelland M., (1991). Polymorphisms generated by arbitrarily primed PCR in the mouse: application to strain identification and genetic mapping. *Nucleic Acids Res*. 19: 303-306

www.cryst.bbk.ac.uk/.../coadwell/004.htm

www.csun.edu/~hcbio027/biotechnology/lec3/sanger.html

www.lgl.bavarn.de/.../ebhs_feldhasen.htm

www.nanomedicine.com/NMI/List Figures.htm

www.wiesentbote.de/artikel-3890.html

Christoph Wirblich, Gregor Meyers, Volker F. Ohlinger, Lorenzo Capucci, Ulrich Eskens, Bernd Haas, Heinz-Jur Gen Thiel, European Brown Hare Syndrome Virus: Relationship to Rabbit Hemorrhagic Disease Virus and Other Caliciviruses, *Journal of Virology*, Aug. 1994, p. 5164-5173

Yap E., McGee J. (1992). Nonisotopic SSCP detection in PCR products by ethidium bromide staining. *Trends Genet.* 8, p.49.

Zouros, E., S.M. Singh, and H.E, Miles. 1980 Growth rate in oysters: an overdominant phenotype and its possible explanation