

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΖΩΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΚΑΙ
ΥΔΑΤΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΓΕΝΙΚΗΣ ΚΑΙ ΕΙΔΙΚΗΣ ΖΩΟΤΕΧΝΙΑΣ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ

ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ *DRB1* ΣΤΗΝ
ΦΥΛΗ ΑΡΓΟΥΣ ΚΑΙ ΣΤΗΝ ΚΟΚΟΒΙΤΙΚΗ ΦΥΛΗ
ΠΡΟΒΑΤΩΝ ΚΑΙ ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΜΕ
ΠΑΡΑΣΙΤΟΛΟΓΙΚΕΣ ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΥΣ

ΠΑΝΩΡΑΙΑ Γ. ΚΥΡΙΑΖΟΠΟΥΛΟΥ

Συμβουλευτική Επιτροπή:

ΜΠΙΖΕΛΗΣ Ι. Αν. Καθηγητής

ΚΟΥΤΣΟΥΛΗ Π. Λέκτορας

ΘΕΟΔΩΡΟΠΟΥΛΟΣ Γ. Καθηγητής

Αθήνα, Ιανουάριος 2015

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΖΩΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΚΑΙ
ΥΔΑΤΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΓΕΝΙΚΗΣ ΚΑΙ ΕΙΔΙΚΗΣ ΖΩΟΤΕΧΝΙΑΣ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ

ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ *DRB1* ΣΤΗΝ
ΦΥΛΗ ΑΡΓΟΥΣ ΚΑΙ ΣΤΗΝ ΚΟΚΟΒΙΤΙΚΗ ΦΥΛΗ
ΠΡΟΒΑΤΩΝ ΚΑΙ ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΜΕ
ΠΑΡΑΣΙΤΟΛΟΓΙΚΕΣ ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΥΣ

ΠΑΝΩΡΑΙΑ Γ. ΚΥΡΙΑΖΟΠΟΥΛΟΥ

Εξεταστική Επιτροπή:

ΜΠΙΖΕΛΗΣ Ι. Αν. Καθηγητής

ΚΟΥΤΣΟΥΛΗ Π. Λέκτορας

ΘΕΟΔΩΡΟΠΟΥΛΟΣ Γ. Καθηγητής

Αθήνα, Ιανουάριος 2015

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

<i>Περίληψη</i>	i
<i>Abstract</i>	iii
1.1 ΜΕΙΖΟΝ ΣΥΣΤΗΜΑ ΙΣΤΟΣΥΜΒΑΤΟΤΗΤΑΣ ΚΑΙ ΑΝΟΣΟΛΟΓΙΚΗ ΑΠΟΚΡΙΣΗ 1	
1.1.1 Μείζον Σύστημα Ιστοσυμβατότητας (MHC) και κυτταρική ανοσία	1
1.1.2 MHC του προβάτου (Ovar-MHC)	3
1.1.3 Γονίδια Ovar-MHC Τάξεως I.....	5
1.1.4. Γονίδια Ovar-MHC της Τάξεως II.....	7
1.1.5. Γονίδια Ovar-MHC της Τάξεως III.....	10
1.1.6 Σημασία πολυμορφισμού του MHC	11
1.2 MHC ΚΑΙ ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ ΣΕ ΑΣΘΕΝΕΙΕΣ.....	13
1.2.1 Σχέση MHC και ασθενειών.....	13
1.2.2 Συσχέτιση του Ovar-MHC με γαστρεντερικές νηματώδεις.....	14
1.3 ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ Ovar- <i>DRB1</i> ΚΑΙ ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ ΣΕ ΑΣΘΕΝΕΙΕΣ.....	15
1.3.1 Πολυμορφισμός του γονιδίου Ovar- <i>DRB1</i> και ανθεκτικότητα σε γαστρεντερικές νηματώδεις.....	16
1.4 ΓΑΣΤΡΕΝΤΕΡΙΚΕΣ ΝΗΜΑΤΩΔΩΣΕΙΣ ΚΑΙ ΕΠΙΠΕΔΑ ΠΕΨΙΝΟΓΟΝΟΥ ΣΤΟ ΠΛΑΣΜΑ	18
ΣΚΟΠΟΣ.....	19
2.1 ΖΩΙΚΟ ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΣΥΛΛΟΓΗ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ.....	20
2.1.1 Κοκοβίτικη φυλή.....	20
2.1.2 Φυλή Άργους.....	22
2.2 ΓΟΝΟΤΥΠΗΣΗ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ Ovar- <i>DRB1</i> -ΒΙΟΜΟΡΙΑΚΕΣ ΑΝΑΛΥΣΕΙΣ.....	24
2.2.1 Απομόνωση γονιδιωματικού DNA από αίμα.....	25
2.2.2 Ενίσχυση τμήματος DNA με PCR.....	26
2.2.3 Ταυτοποίηση αλληλομόρφων με απευθείας αλληλούχηση	27
2.2.4 Ταυτοποίηση νέου αλληλομόρφου	30
2.2.5 Κλωνοποίηση τμήματος DNA	33
2.2.6 Συλλογή αποικιών και PCR	35
2.2.7 Απομόνωση πλασμιδίων	37
2.3 ΓΟΝΟΤΥΠΗΣΗ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ <i>DRA</i>	38
2.4 ΠΑΡΑΣΙΤΟΛΟΓΙΚΕΣ ΑΝΑΛΥΣΕΙΣ	39
2.3.1 Καταμέτρηση αναπαραγωγικών στοιχείων των παρασίτων στα κόπρανα	39
2.3.1.1 Μέθοδος <i>McMaster</i>	39

2.3.1.2 Προσδιορισμός επιπέδων πεψινογόνου στο πλάσμα του αίματος	40
2.4 ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ.....	44
3.1 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΓΟΝΟΤΥΠΗΣΗΣ ΤΟΥ ΕΞΟΝΙΟΥ 2 ΤΟΥ <i>Ovar-DRB1</i>	45
3.1.2 Γονοτυπικές συχνότητες	46
3.1.3 Συχνότητα ομοζυγωτίας.....	48
3.2 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΠΑΡΑΣΙΤΟΛΟΓΙΚΟΥ ΕΛΕΓΧΟΥ	48
3.2.1 Αναπαραγωγικά στοιχεία γαστρεντερικών παρασίτων στα κόπρανα.....	48
3.2.2 Αριθμός αναπαραγωγικών στοιχείων παρασίτων (Τιμές FEC)	52
3.2.3 Συχνότητα προσβολής από παράσιτα	54
3.2.4 Σχέση τιμών FEC με τις κατηγορίες παρασίτων.....	55
3.2.5 Επίπεδα πεψινογόνου στο πλάσμα.....	57
3.2.6 Σχέση τιμών FEC με τα επίπεδα πεψινογόνου στο πλάσμα	58
3.2.7 Σχέση ειδών παρασίτων με τα επίπεδα πεψινογόνου στο πλάσμα του αίματος ...	58
3.3 ΓΟΝΙΔΙΑΚΕΣ ΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ ΕΠΙ ΤΩΝ ΠΑΡΑΣΙΤΟΛΟΓΙΚΩΝ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΩΝ	59
3.3.1 Επίδραση των γονοτύπων στην συχνότητα προσβολής.....	59
3.3.2 Επίδραση της φυλής στο είδος της παρασιτικής μόλυνσης	60
3.3.3 Επίδραση γονοτύπων στις τιμές FEC και στις τιμές mI.U τυροσίνης	60
3.3.4 Επίδραση αλληλομόρφων στις τιμές FEC και στις τιμές mI.U τυροσίνης	62
4.1 ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ <i>Ovar-DRB1</i> ΣΤΙΣ ΜΕΛΕΤΗΘΕΙΣΕΣ ΦΥΛΕΣ	65
4.1.1 Πολυμορφισμός του γονιδίου <i>Ovar-DRB1</i> στις Ελληνικές φυλές.....	70
4.2 ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ <i>Ovar-DQA</i>	72
4.3 ΓΕΝΕΤΙΚΕΣ ΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ ΣΤΙΣ ΤΙΜΕΣ FEC.....	73
4.4 ΕΠΙΠΕΔΑ ΠΕΨΙΝΟΓΟΝΟΥ ΚΑΙ ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΕΝΔΟΠΑΡΑΣΙΤΙΚΗΣ ΛΟΙΜΩΞΗΣ	74
4.5 ΓΕΝΕΤΙΚΕΣ ΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ ΣΤΑ ΕΠΙΠΕΔΑ ΠΕΨΙΝΟΓΟΝΟΥ ΣΤΟ ΠΛΑΣΜΑ	76
4.6 ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΒΑΣΗ ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΣΕ ΠΑΡΑΣΙΤΩΣΕΙΣ.....	77
4.7 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ-ΣΧΟΛΙΑΣΜΟΣ.....	79
4.7.1 Συμπεράσματα	79
4.7.2 Σχολιασμός.....	80
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	82

ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ *DRB1* ΣΤΗΝ ΦΥΛΗ ΑΡΓΟΥΣ ΚΑΙ ΤΗΝ ΚΟΚΟΒΙΤΙΚΗ ΦΥΛΗ ΠΡΟΒΑΤΩΝ ΚΑΙ ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΜΕ ΠΑΡΑΣΙΤΟΛΟΓΙΚΕΣ ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΥΣ

ΠΑΝΩΡΑΙΑ ΚΥΡΙΑΖΟΠΟΥΛΟΥ

*Τμήμα Επιστήμης Ζωικής Παραγωγής και Υδατοκαλλιεργειών, Εργαστήριο
Γενικής και Ειδικής Ζωοτεχνίας, Ιερά Οδός 75, Αθήνα, 11855, e-mail:
mailto:jmpriz@aua.gr*

Περίληψη

Το MHC (Μείζον Σύστημα Ιστοσυμβατότητας) είναι σύμπλοκο γονιδίων που εντοπίζεται σε όλα τα σπονδυλωτά, με ρόλο την κωδικοποίηση μορίων που διαδραματίζουν κεντρικό ρόλο στην ανοσολογική απόκριση. Τα γονίδια του τύπου αυτού χωρίζονται σε τρεις ομάδες (I, II και III) με βάση την δομή και το λειτουργικό τους ρόλο. Ρόλος του *DRB1*, που ανήκει στα γονίδια τάξεως II και είναι από τα πιο πολυμορφικά γονίδια του MHC, είναι να κωδικοποιεί γλυκοπρωτεΐνες που προσδέονται και παρουσιάζουν στον T-κυτταρικό υποδοχέα (TCR) των CD4⁺ T-κυττάρων αντιγονικά πεπτίδια που προέρχονται κατά κύριο λόγο από εξωκυτταρικές πρωτεΐνες και παράσιτα. Καθώς η πλειοψηφία του νουκλεοτιδικού πολυμορφισμού της Τάξεως II εντοπίζεται στο εξόνιο 2, μελέτες με σκοπό την συσχέτιση του πολυμορφισμού του MHC με ανθεκτικότητα σε παρασιτώσεις εστιάζονται σε αυτό.

Για τους σκοπούς του παρόντος πειράματος λήφθηκαν δείγματα αίματος και κοπράνων από 45 Κοκοβίτικα και από 50 Αργίτικα πρόβατα. Απομονώθηκε γονιδιωματικό DNA από κάθε δείγμα αίματος και στην συνέχεια ακολούθησε προσδιορισμός του παρασιτικού φορτίου των ζώων και της έκτασης της βλάβης του γαστρεντερικού βλεννογόνου με μετρήσεις του αριθμού των αυγών των ενήλικων προνυμφών των παρασίτων ανά γραμμάριο κοπράνων (FEC) και των επιπέδων του πεψινογόνου στο πλάσμα του αίματος, αντίστοιχα. Με βάση τα ευρήματα αυτά, επιλέχθηκαν για γονοτύπηση 12 Κοκοβίτικα πρόβατα που εμφάνιζαν τιμές FEC από 0 έως 100 και 14 ζώα που εμφάνιζαν τιμές FEC >400. Από τη φυλή Άργους επιλέχθηκαν 13 ζώα με τιμές FEC από 0 έως 100 και 14 ζώα με τιμές FEC >1300.

Από την αλληλούχηση ταυτοποιήθηκαν 24 αλληλόμορφα, γεγονός που υποδηλώνει υψηλά επίπεδα πολυμορφισμού. Και στις 2 φυλές ο βαθμός ετεροζυγωτίας ήταν πολύ υψηλός και ίσος με 0,90 για την φυλή Άργους και 0,84 για την Κοκοβίτικη φυλή, ενώ και για τις δύο φυλές ταυτοποιήθηκαν από 17 αλληλόμορφα. Από τα 24 αλληλόμορφα που ταυτοποιήθηκαν συνολικά, τα 10 ήταν κοινά για τις 2 φυλές, ενώ τα περισσότερα αλληλόμορφα είχαν ήδη βρεθεί σε μελέτες πολυμορφισμού του *DRB1* σε ελληνικές φυλές (Φριζάρτας, Κοζάνης, Καλαρρύτεκο)

συμπεριλαμβανομένων των αλληλομόρφων *DRB1**1606, *DRB1**2003, *DRB1**1008 και *DRB1**0806 που βρέθηκαν αποκλειστικά σε ελληνικές φυλές. Ανιχνεύθηκε παρόλα αυτά 1 νέο αλληλόμορφο, το *DRB1**2601, στα ζώα της φυλής Άργους. Το νέο αλληλόμορφο παρουσιάζει ενδιαφέρον καθώς εμφανίζει καινούργιες πολυμορφικές θέσεις, αποτελώντας έτσι μια νέα οικογένεια αλληλομόρφων. Αυτό το αλληλόμορφο διαφέρει κατά ένα νουκλεοτίδιο με αλληλόμορφο που έχει βρεθεί στα άγρια πρόβατα της Βορείου Αμερικής (*Ovis canadensis*) εγείροντας ερωτήματα για την εξελικτική πορεία των δύο ειδών.

Για τα ζώα στα οποία βρέθηκε το νέο αλληλόμορφο *DRB1* εξετάστηκε και το γονίδιο χαμηλού πολυμορφισμού *Ovar-DRB1*, με τα ταυτοποιηθέντα αλληλόμορφα να είναι τα *DRB1**0101 και *DRB1**0102. Το *DRB1**0102 εμφανίζεται και στα άγρια πρόβατα (*Ovis canadensis*), γεγονός που δεν προξενεί εντύπωση καθώς τα *DRB1* και *DRB* γονίδια είναι στενά συνδεδεμένα και κληρονομούνται μαζί.

Σχετικά με τις παρασιτολογικές παραμέτρους, τα Κοκοβίτικα πρόβατα εμφάνιζαν χαμηλότερο παρασιτικό φορτίο από ότι τα ζώα της φυλής Άργους, καθώς τα Κοκοβίτικα ήταν εκτρεφόμενα ημiekτατικά σε ορεινές βοσκές με μικρότερη πυκνότητα βοσκής, ενώ η φυλή Άργους εκτρεφόταν σε πεδινές βοσκές όπου είχαν πρόσβαση και άλλα κοπάδια προβάτων, στα οποία δεν ακολουθείται πάντα η σωστή αντιπαρασιτική αγωγή. Οι παρατηρούμενες τιμές πεψινογόνου δεν σχετίζονταν με το είδος παρασίτου ούτε με τους γονότυπους ή συγκεκριμένα αλληλόμορφα, εκτός μιας περίπτωσης όπου για ένα αλληλόμορφο, το *Ovar-DRB1**0105, παρατηρήθηκε αρνητική συσχέτιση με τις τιμές mI.U τυροσίνης και είχε μεγάλη συχνότητα εμφάνισης στις ομάδες υψηλού παρασιτικού φορτίου. Οι έλεγχοι για πιθανή συσχέτιση των διαφόρων γονοτύπων και των αλληλομόρφων με τα παρασιτολογικά χαρακτηριστικά (χαμηλές ή υψηλές τιμές FEC) δεν έδειξαν περαιτέρω στατιστικά σημαντικά αποτελέσματα.

Λέξεις κλειδιά: πρόβατο, *Ovar-DRB1*, exon 2, *Ovar-DRB1*, γενετικός πολυμορφισμός, παράσιτο, νηματώδη

VARIABILITY OF THE *DRB1* GENE IN THE ARGOS AND KOKOVITIKO SHEEP BREED AND ASSOCIATION WITH PARASITOLOGICAL PARAMETERS

PANORAIA KYRIAZOPOULOU

Faculty of Animal Science and Aquaculture, Department of Animal Breeding and Husbandry, 75 Iera Odos Av., Athens, 11855, e-mail:

Abstract

The MHC – Major Histocompatibility Complex is a genetic region within all vertebrates that encodes molecules playing a central role in immunological response. There are three classes of MHC genes (I, II and III) depending on their structure and function. The role of *DRB1* genes, which belong to the Class-II region, and are amongst the most polymorphic genes in the MHC, is to encode glycoproteins which bind and present pathogen peptide fragments to the T-cell receptor (TRC) of circulating CD4+ T cells. These antigen peptides usually derive from extra-cellular proteins such as parasite proteins. As the majority of nucleotide polymorphism at Class II loci locates in the second exon, genotyping studies usually focus on it to associate MHC diversity with resistance or susceptibility to disease.

The purpose of this study was to determine the *DRB1* alleles existing in two Greek breeds (Argos and Kokovitika) and associate them to immunological aspects, such as nematode resistance. Genotyping Greek breeds is important, since from previous studies, a number of new alleles was found and submitted into the Immuno-Polymorphism Database, meaning easier future genotyping and resulting in an updated and sufficiently diverse database. Genotyping these breeds would also help in an effort to preserve them and maintain diversity as well as preserve potentially rare alleles contributing to beneficial traits.

At the start of this study, blood and faecal samples were taken from 45 sheep of the Kokovitiko breed and 50 from the Argos breed. Genomic DNA was prepared and taken to the Moredun Institute. The DNA samples were associated with faecal egg counts per gram (EPG) and linked gastrointestinal parasite species data, quantified and their quality was determined by nanodrop spectrophotometry. The samples were then sorted into groups of high and low EPG. 12 Kokovitika and Argos sheep with $FEC < 100$, as well as 14 Kokovitika with $FEC > 400$ and 14 Argos sheep with $FEC > 1300$, were chosen for genotyping at the *DRB1* locus by sequence based typing. The breeding rams of the Argos breed were also genotyped.

The sequencing resulted in the identification of 24 alleles, showing high diversity levels. For the Argos and the Kokovitika sheep, a total of 17 different alleles were identified per breed. Ten out of these 24 alleles were common for both breeds. Most

of the alleles identified were also identified previously in studies of *DRBI* polymorphism in Greek breeds (Frizarta, Kozani, Boutsiko), including alleles *DRBI*1606* and *DRBI*2003*, *DRBI*1008* and *DRBI*0806* which were specifically found in these Greek breeds.

The alleles with the highest frequency in both breeds were *DRBI*1001* and *DRBI*0806*. Interestingly, allele 1001 appeared in the Argos breed 11 times in the low FEC group and only once in the high FEC group, whereas in the Kokovitika sheep it appeared 7 times in the high FEC group but didn't appear in the low group. In this case, the breed has an effect on the way this allele is expressed. Allele *0105 also appeared more frequently in the high FEC group for both breeds and statistical analysis showed it was related to higher tyrosine counts in the blood's plasma. All other alleles were evenly distributed within the groups and further statistical analysis showed no statistical significance between alleles or genotypes and parasitological parameters. Statistical analysis performed in order to relate FEC counts with pepsinogen levels, showed no significant correlation.

The new allele found in the Argos breed samples is of interest as it presents substantial variation and appears to have novel polymorphic sites, unrelated to all other domestic sheep *DRBI* alleles, representing a novel allelic family (*DRBI*2601*). This allele appears to be closely related to alleles found in wild bighorn sheep in North America (*Ovis canadensis*) raising interesting questions on the evolution of the two sheep species.

In the Class II of the MHC of sheep (OLA) the chain of the DR heterodimer is closely linked to *DRB* and considered almost monomorphic, but because allele *DRBI*2601* was very divergent, it was of interest to link it to a polymorphism in the *DRA* locus, so samples were sent for bidirectional sequencing. The sequencing reads revealed a polymorphic site but the two alleles identified were *DRA*0101* and *DRA*0102*. *DRA*0102* also appears in wild bighorn sheep (*Ovis canadensis*), which is logical since the *DRA* and *DRB* are closely linked and passed on together.

Key words: sheep, Ovar-*DRBI*, exon 2 , Ovar-*DRA*, genetic polymorphism, parasite, nematode infection

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 ΜΕΙΖΟΝ ΣΥΣΤΗΜΑ ΙΣΤΟΣΥΜΒΑΤΟΤΗΤΑΣ ΚΑΙ ΑΝΟΣΟΛΟΓΙΚΗ ΑΠΟΚΡΙΣΗ

1.1.1 Μείζον Σύστημα Ιστοσυμβατότητας (MHC) και κυτταρική ανοσία

Το ανοσολογικό σύστημα των σπονδυλόζων διακρίνεται σε εγγενή και επίκτητα χαρακτηριστικά (Beutler, 2004, Fearon and Locksley, 1996, Medzhitov and Janeway, 2000). Η εγγενής, μη ειδική ανοσία, παρέχει την πρωταρχική γραμμή άμυνας και διαδραματίζει βασικό ρόλο στην έναρξη του μηχανισμού της ειδικής ανοσίας.

Το δέρμα, τα επιθηλιακά κύτταρα της αναπνευστικής και της γαστρεντερικής οδού και οι βλεννογόνοι παρέχουν την πρώτη γραμμή άμυνας, ενώ η φαγοκύτωση που υποβοηθάται από την φλεγμονώδη απόκριση, από αντιμικροβιακούς παράγοντες και από τα φυσικά φονικά T-κύτταρα (NK: Natural Killer), απαρτίζει την δεύτερη γραμμή, αυτή της επίκτητης ανοσίας (Aderem and Underhill, 1999, Biron *et al.*, 1999, Hamerman *et al.*, 2005, Janeway and Travers, 1996, French and Yokoyama, 2003, Podolsky D., 1999).

Οι μηχανισμοί της επίκτητης ανοσίας που αναφέρθηκαν παραπάνω, ενεργοποιούνται άμεσα μετά την είσοδο παθογόνου στον οργανισμό αλλά δεν είναι ειδικοί προς συγκεκριμένα παθογόνα. Προέρχονται από έναν περιορισμένο αριθμό γενετικά προκαθορισμένων υποδοχέων του εγγενούς ανοσολογικού συστήματος. Αυτοί οι υποδοχείς, μέσω της φυσικής επιλογής, εξελίχθηκαν κατά τέτοιο τρόπο ώστε να αναγνωρίζουν υψηλά συντηρημένες δομές εντός πληθυσμών μικροοργανισμών που ο οργανισμός κατά την εξέλιξή του έχει συναντήσει πολλές φορές (Janeway and Medzhitov, 2002).

Αντιθέτως, η ειδική ανοσία του οργανισμού παρέχει πιο αργή απόκριση, με υψηλή εξειδίκευση προς το εκάστοτε παθογόνο, επιτρέποντας στον οργανισμό να αναγνωρίσει και να αναπτύξει ανοσολογική μνήμη ενάντια σε σχεδόν οποιοδήποτε παθογόνο, ακόμα και εάν δεν το έχει ξανασυναντήσει ποτέ (Janeway, 1993).

Πρωτεϊνικά αντιγόνα που το ανοσολογικό σύστημα εντοπίζει για πρώτη φορά, συγκεντρώνονται από αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα (APC: Antigen Presenting Cells). Τα κυριότερα APC είναι τα δενδριτικά κύτταρα (DC: Dendritic Cells), τα μακροφάγα και τα Β-λεμφοκύτταρα (Heath *et al.*, 2004, Janeway, 1993, Ke and Kapp, 1996, Parker, 1993). Ανώριμα DC παγιδεύουν αντιγόνα στους περιφερικούς ιστούς, με υποβοηθούμενη μέσω υποδοχέων, συγκέντρωση των αντιγόνων και μακροπινοκύττωση (Sallusto *et al.*, 1995).

Αυτή η διαδικασία ενεργοποιεί την ωρίμανση και μετακίνηση των DC, προς τα λεμφικά όργανα (Banchereau and Steinman, 1998, Steinman *et al.*, 2000). Εκεί εκθέτουν επεξεργασμένα αντιγονικά πεπτίδια σε υπο-ομάδες των Τ-λεμφοκυττάρων που είναι είτε βοηθητικά, είτε Τ-κυτταροτοξικά. Τα αντιγονικά πεπτίδια εκτίθενται μέσω ειδικών γλυκοπρωτεϊνών της επιφάνειας των κυττάρων, που κωδικοποιούνται από την γονιδιακή περιοχή του Μείζονος Συστήματος Ιστοσυμβατότητας (MHC) (Zinkernagel and Doherty, 1974). Κατά την φάση της αναγνώρισης, δύο ακόμα πρωτεΐνες της επιφάνειας των κυττάρων, οι CD4 και CD8 (CD: Cluster of differentiation), δρουν για τα Τ-βοηθητικά και Τ-κυτταροτοξικά κύτταρα, ως συνυποδοχείς επιφάνειας. Τα CD4⁺ Τ-Κύτταρα προσδένονται στην Τάξη II του MHC, ενώ τα CD8⁺ προσδένονται στην Τάξη I του MHC.

Παρόλα αυτά, η αναγνώριση και μόνο του μοριακού συμπλέγματος που αποτελείται από το αντιγονικό πεπτίδιο συνδεδεμένο σε ένα μόριο MHC, δεν επαρκεί για την ενεργοποίηση των Th0-κυττάρων (T-naïve cells) που δεν έχουν ξανά-αντιμετωπίσει παθογόνο. Είναι απαραίτητο ένα δεύτερο «σήμα» το οποίο προκαλείται από το εγγενές ανοσολογικό σύστημα, το οποίο ενεργοποιεί την διαφοροποίηση των Τ-κυττάρων. Αυτή η διαδικασία αφορά την κυτταρική αναγνώριση και τη διάκριση των αυτόλογων (self) από τα ετερόλογα (Non-self) αντιγόνα (Bretscher and Cohn, 1970).

Το δεύτερο «σήμα» φαίνεται να δίνεται από πρωτεΐνες της κυτταρικής μεμβράνης, που χαρακτηρίζονται ως συνδιεγερτικές (Van der Merwe *et al.*, 1997, Ye *et al.*, 1997). Μικροβιακά τεμάχια και ευδιάλυτοι παράγοντες γνωστοί ως κυτταροκίνες που παράγονται κατά την έναρξη ανοσολογικών αποκρίσεων, ενεργοποιούν τα APC προς παραγωγή αυτών των πρωτεϊνών που αποτελούν μόρια προσκολλησεως (Fearon and Locksley, 1996). Στην επιφάνεια των APC, το σύμπλεγμα του

αντιγονικού πεπτιδίου-μορίου MHC της τάξεως I ή II, αναγνωρίζεται μέσω δέσμησης του κυτταρικού T-υποδοχέα (TCR: T-Cell Receptor) και του αντίστοιχου συνυποδοχέα CD4 ή CD8 που εδράζονται στην κυτταροπλασματική μεμβράνη των T-λεμφοκυττάρων με το σύμπλεγμα πεπτίδιο – μόριο MHC των APC (Garcia, 1999).

1.1.2 MHC του προβάτου (Ovar-MHC)

Το MHC αποτελεί γενετική περιοχή που κωδικοποιεί μόρια που σχετίζονται άμεσα με την δράση του ανοσοποιητικού συστήματος, ενώ βρίσκεται σε όλα τα σπονδυλόζωα, εκτός των αγνάθων (Tizard, 2004). Η δομή του MHC είναι γενικά συντηρημένη εντός των θηλαστικών (Amills *et al.*, 1998), κάτι που αποδεικνύεται μέσω συγκρίσεων των μορίων MHC διαφόρων ειδών (Kelley *et al.*, 2005). Στον άνθρωπο εντοπίζεται στο βραχύ σκέλος του χρωμοσώματος 6, σε απόσταση 17 cM από το κεντρομερίδιο, ενώ στο πρόβατο (*Ovis aries*) εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 20 μεταξύ των περιοχών q15 και q23 (Hediger *et al.*, 1991, Mahdy *et al.*, 1989). Το MHC του προβάτου προσδιορίστηκε το 1978 από τον Millot και σύμφωνα με το σύστημα ονομασίας για το MHC των σπονδυλωτών (Klein *et al.*, 1990), καλείται «Ovar-MHC», από τα αρχικά *Ovis aries*.

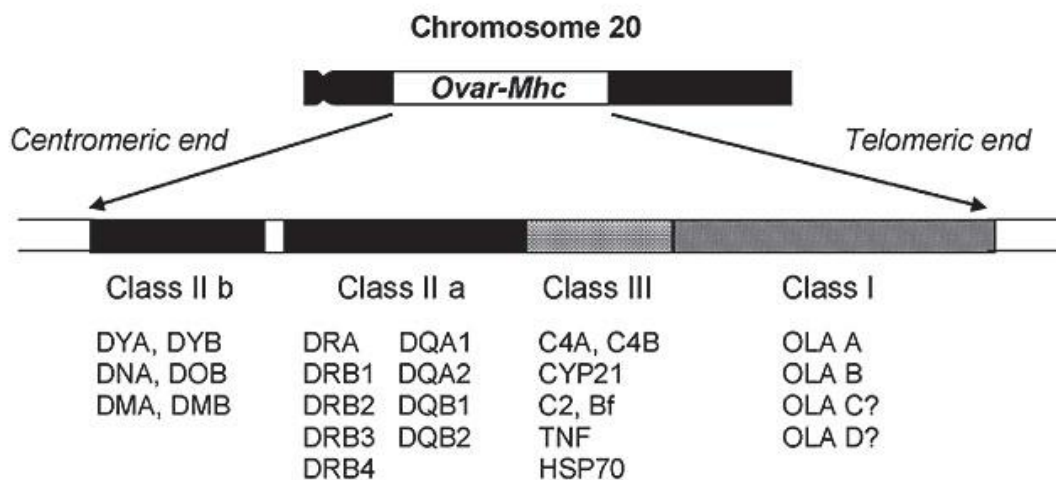
Γενικά, το MHC αποτελείται από εκφραζόμενα γονίδια και ψευδογονίδια που οργανώνονται σε τρεις μεγάλες ομάδες γονιδίων, που χαρακτηρίζονται ως τάξεις του MHC (Klein, 1986). Η σειρά των τάξεων από το κεντρομερίδιο προς το τελομερές έχει ως εξής: Τάξη II, Τάξη III και Τάξη I. Μια ομάδα περισσότερων των 7 γονιδίων που βρίσκεται στο άκρο της περιοχής II, κοντά στο τελομερές, αναφέρεται ως Τάξη IV (Gruen and Weissman, 1997). Κάθε μια από αυτές τις περιοχές αντιστοιχεί σε περισσότερους του ενός γονιδιακούς τόπους (loci), και κάθε τόπος μπορεί να έχει περισσότερα του ενός αλληλόμορφα (alleles) στο χρωμόσωμα. Η περιοχή του MHC θεωρείται ως η πιο πυκνή σε γονίδια, ειδικά στον άνθρωπο, καθώς μετά την χαρτογράφηση των γονιδιακών τόπων και την εύρεση της ολοκληρωμένης αλληλουχίας του ανθρώπινου λευκοκυτταρικού αντιγόνου (HLA, που αποτελεί το ανθρώπινο MHC) από τους Beck *et al.* (1999), βρέθηκε ότι αντιστοιχεί περίπου ένα γονίδιο ανά 16 kbp. Το 40% των εκφραζόμενων γονιδίων του HLA θεωρείται ότι εμπλέκεται στη λειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος.

Μελέτες έχουν δείξει ότι οι περιοχές των τάξεων II και III στα θηλαστικά προέρχονται από κοινό πρόγονο και είναι όμοιες τόσο σε επίπεδο γονιδιακής αλληλουχίας, όσο και στην λειτουργία των παραγόμενων προϊόντων τους (Kulski *et al.*, 2002). Στα μηρυκαστικά όμως, η περιοχή της Τάξεως I, σε αντίθεση με την αντίστοιχη περιοχή στον άνθρωπο, εκφράζει 6 περιοχές, ενώ στα βοοειδή οι απλότυποι της τάξεως I διαφέρουν τόσο στον αριθμό όσο και στην σύνθεσή τους (Ellis and Ballingal, 1999, Ellis *et al.*, 1999, Ellis, 2004). Ακόμα πιο βασική διαφορά ανιχνεύεται στην Τάξη II, που εμφανίζει την ιδιαιτερότητα να χωρίζεται σε δύο ξεχωριστές περιοχές την α και β, από μια απόσταση 25cM (Maddox *et al.*, 2001, van Eijk *et al.*, 1995). Θεωρείται ότι οι περιοχές αυτές προήλθαν από κοινή περιοχή του γονιδιώματος που κάποια στιγμή κατά την εξέλιξη διπλασιάστηκε και κατέλαβε δύο θέσεις που συνέχισαν να αναδιοργανώνονται σταδιακά, δίνοντας τελικά τις περιοχές α και β (Kelley *et al.*, 2005).

Τα γονίδια των τάξεων I και II διαχωρίζονται σε κλασικά και μη κλασικά. Κλασικά χαρακτηρίζονται τα γονίδια που είναι πολυμορφικά και εκφράζονται σε μεγάλο βαθμό κωδικοποιώντας προϊόντα που συμμετέχουν στην αντιγονοπαρουσιαστική δράση των T-κυττάρων, δρώντας ως περιοριστικοί παράγοντες. Ο ορισμός των μη κλασικών γονιδίων δεν είναι πλήρως αποσαφηνισμένος, καθώς κωδικοποιούν προϊόντα με πλήθος ανοσολογικών δράσεων και περιλαμβάνουν την δράση πολλών γονιδίων, των οποίων η λειτουργία δεν είναι απόλυτα γνωστή. Ένας τρόπος για τον διαχωρισμό κλασικών και μη κλασικών γονιδίων αποτελεί η σύγκριση των ποσοστών έκφρασης, καθώς τα μη κλασικά γονίδια εκφράζονται σε χαμηλότερα ποσοστά και έχουν ελάχιστο ή μηδενικό πολυμορφισμό (Braud *et al.*, 1999).

Η βασική δομή του MHC των προβάτων βρέθηκε ότι είναι όμοια, κατά γενικό κανόνα, όχι μόνο με των υπόλοιπων μηρυκαστικών και θηλαστικών και με το HLA του ανθρώπου αλλά και το MHC του ποντικίου (Liu *et al.*, 2006). Το εύρημα αυτό επιβεβαιώνεται και από την δημιουργία γονιδιακού χάρτη με χρήση μικροδορυφόρων (Crawford *et al.*, 1996). Η βασική δομή λοιπόν, είναι σταθερή σε όλα τα θηλαστικά περιλαμβάνοντας τις περιοχές των Τάξεων I, II και III, οι οποίες απεικονίζονται μαζί με τα γονίδια που περιλαμβάνει η κάθε περιοχή στην **Εικόνα 1.1**. Η περιοχή I θεωρείται ότι αποτελείται από τέσσερις γονιδιακούς τόπους (Miltiadiou *et al.*, 2005). Η περιοχή II είναι αυτή που έχει μελετηθεί σε μεγαλύτερο

βαθμό και περιλαμβάνει τα ακόλουθα γονίδια: ένα *DRA*, τέσσερα *DRB*, δύο *DQA*, δύο *DQB* καθώς και ένα από τα ακόλουθα γονίδια: *DNA*, *DOB*, *DYA*, *DYB*, *DMA*, *DMB* (Dutia *et al.*, 1994, Scott *et al.*, 1987, Scott *et al.*, 1991b). Η περιοχή της τάξεως III είναι η περιοχή που έχει μελετηθεί σε μικρότερο βαθμό και αποτελείται από τα γονίδια που κωδικοποιούν τα στοιχεία του συμπληρώματος C4A, C4B, C2, Bf, τον παράγοντα TNF, λεμφοτοξίνες (LT), την πρωτεΐνη θερμικού πλήγματος 70 (HSP70: Heat- Shock Protein 70), την υδροξυλάση (CYP21: CytochromeP 21) και έναν αριθμό γονιδίων των οποίων ο ρόλος δεν έχει βρεθεί (Dukkipati, 2006b).



Εικόνα 1.1 Απεικόνιση της δομής του Ovar-MHC στο χρωμόσωμα 20. Η περιοχή Ovar-MHC αποτελείται από τρεις τάξεις γονιδίων. Η τάξη II διαχωρίζεται σε δύο περιοχές την -α, -β (Dukkipati, 2006b).

1.1.3 Γονίδια Ovar-MHC Τάξεως I

Όπως προαναφέρθηκε, οι γονιδιακοί τόποι της τάξεως I περιλαμβάνουν γονίδια που χαρακτηρίζονται ως κλασικά και ως μη-κλασικά. Τα προϊόντα των κλασικών γονιδίων εμπλέκονται στη έκθεση πεπτιδίων που προέρχονται από ενδοκυττάρια πρωτεΐνες και παράσιτα στα κυτταροτοξικά CD8⁺ T-λεμφοκύτταρα (CTL ή φονικά κύτταρα -NK). Επιπλέον, αλληλεπιδρούν με τα CTL προς αποτροπή της κυτταρικής λύσης από τα NK κύτταρα (Reyburn *et al.*, 1997).

Στο πρόβατο, η περιοχή της Τάξης I του MHC, δεν έχει ακόμα χαρακτηριστεί πλήρως. Ενώ παλαιότερες μελέτες αρχικά ανέφεραν την ύπαρξη μόνο δύο στενά συνδεδεμένων γονιδιακών τόπων, των OLA-A και OLA-B (OLA: Ovine Leucocyte Antigen) (Millot, 1978), αργότερα επιβεβαιώθηκε όχι μόνο η ύπαρξη δύο γονιδιακών τόπων (Cullen *et al.*, 1982, Garrido *et al.*, 1995, Jugo and Vicario, 2001,

Jugo *et al.*, 2002, Stear and Spooner 1981, Stear *et al.*, 1996) αλλά και τριών (Grossberger *et al.*, 1990, Millot *et al.*, 1984, Puri *et al.*, 1987a) και τελευταία και τεσσάρων γονιδιακών τόπων (Miltiadiou *et al.*, 2005). Η διάκριση των αλληλομόρφων της Τάξης I δεν είναι δυνατή μόνο μέσω σύγκρισης των διαφορών που εμφανίζονται στις νουκλεοτιδικές αλληλουχίες (Ellis *et al.*, 1999, Miltiadiou *et al.*, 2005), συνεπώς δεν είναι εύκολα επιτεύξιμη και η ανίχνευση του ακριβούς αριθμού των γονιδιακών τόπων της τάξης I του Ovar-MHC.

Το μόριο MHC της Τάξεως I είναι ετεροδιμερές που αποτελείται από μια γλυκοζιωμένη πολυπεπτιδική αλυσίδα α - και την β 2-μικροσφαιρίνη που προσδένεται με την α αλυσίδα μέσω ομοιοπολικών δεσμών. Η αλυσίδα α - προσδένεται στην κυτταρική μεμβράνη και αναδιπλώνεται σχηματίζοντας τρεις εξωκυτταρικούς δομικούς πυρήνες α 1, α 2 και α 3. Οι δομικοί πυρήνες α 1, α 2 σχηματίζουν την περιοχή δέσμευσης του πεπτιδίου των μορίων MHC της τάξεως I (PBR: Peptide Binding Region) που αλλιώς χαρακτηρίζεται ως σχισμοειδής θήκη. Η αλυσίδα της β 2-μικροσφαιρίνης αποτελείται από έναν εξωκυτταρικό δομικό πυρήνα που χρησιμεύει στην σταθεροποίηση της δομής του αντιγονικού μορίου. Η δομή του μορίου της Τάξεως I απεικονίζεται σχηματικά στην **Εικόνα 1.2**.

Οι δομικοί πυρήνες α 1, α 2, α 3 κωδικοποιούνται από γονιδιακούς τόπους της Τάξεως I, ενώ η πεπτιδική αλυσίδα της β 2-μικροσφαιρίνης κωδικοποιείται από γονιδιακό τόπο εκτός του MHC από γονίδιο που εδράζεται στο χρωμόσωμα 7 των προβάτων (UNIPROT). Η αλυσίδα δεν παρουσιάζει πολυμορφισμό και έχει μεγάλη δομική ομοιότητα με τις ανοσοσφαιρίνες, ενώ η περιοχή πρόσδεσης είναι αρκετά πολυμορφική (Gogolin-Ewens *et al.*, 1985).

Τα μόρια MHC Τάξης I συνδέονται με ενδογενή αντιγόνα μήκους 8-11 αμινοξέων που εκτίθενται ώστε να επέλθει αλληλεπίδραση με τους T-κυτταρικούς υποδοχείς (TCR) των κυτταροτοξικών $CD8^+$ T-λεμφοκυττάρων, που εξειδικεύονται στην αντιμετώπιση κυττάρων μολυσμένων από ιούς και καρκινικών κυττάρων (Harty *et al.*, 2000). Τα CTL φυλάσσουν σε μόνιμη βάση των οργανισμό μέσω των κυτταρικών τους υποδοχέων (TCR).

Το μόριο της Τάξεως I εκφράζεται στην επιφάνεια όλων των εμπύρηνων σωματικών κυττάρων και βρίσκεται σε υψηλότερη συγκέντρωση στα λεμφοκύτταρα και στα μακροφάγα. Ο σχηματισμός των πεπτιδίων που στην συνέχεια συνθέτουν τα μόρια MHC της Τάξεως I διενεργείται μέσω ενός συμπλέγματος πρωτεάσης που ονομάζεται πρωτεόσωμα. Το πρωτεόσωμα διατηρεί σταθερή την ανανέωση των κυτταρικών πρωτεϊνών σε όλα τα κύτταρα, τεμαχίζοντας τις πρωτεΐνες πάλι σε πεπτίδια και δρώντας στο κυτταρόπλασμα (Rivett, 1993). Τα μόρια της Τάξεως I, απουσία μολύνσεως, διαθέτουν αυτόλογα πεπτίδια που προέρχονται από αυτή την φυσιολογική ανανέωση των κυτταρικών πρωτεϊνών (turnover), που επιτελείται διαρκώς. Όταν στο εσωτερικό του κυττάρου υπάρχουν αντιγονικά πεπτίδια λόγω ενδοκυττάρων κυτταροπλασματικών παθογόνων, που συνήθως είναι ιοί, σχηματίζονται αλλογενή πεπτίδια.

Σε περίπτωση που το ίδιο το κύτταρο έχει μετατραπεί σε καρκινικό, παράγει ένα σύνολο μεταλλαγμένων πρωτεϊνών που ομοίως αποτελούν αλλογενείς πρωτεΐνες. Τα πεπτίδια μήκους 8-11 αμινοξέων προσδένονται στο μόριο MHC και εκτίθενται για να αλληλεπιδράσουν με του T-κυτταρικούς υποδοχείς των CD8⁺ T-λεμφοκυττάρων (CTL), που ειδικεύονται στην αντιμετώπιση κυττάρων μολυσμένων από ιούς και καρκινικών κυττάρων καθώς οι T-κυτταρικοί υποδοχείς, όταν συναντούν αλλογενές πεπτίδιο ενεργοποιούν την κυτταροτοξική τους δράση (Janeway and Travers, 1996).

1.1.4. Γονίδια Ovar-MHC της Τάξεως II

Σε αντίθεση με τα γονίδια της Τάξεως I, τα γονίδια της Τάξεως II κωδικοποιούν μακρομόρια που εξειδικεύονται στην έκθεση αντιγονικών πεπτιδίων που προέρχονται κατά κύριο λόγο από εξωκυτταρικές πρωτεΐνες και παράσιτα, στον T-κυτταρικό υποδοχέα (TCR) των CD4⁺ T-κυττάρων. Η Τάξη II του Ovar-MHC αποτελείται από τα κλασικά γονίδια: DY, DN, DO, DM, DQ και DR και από τα μη κλασικά γονίδια: LMP, TAP και TAPBP. Κάθε ομάδα κλασικών γονιδίων περιέχει γονίδια που κωδικοποιούν την α-αλυσίδα και καλούνται A, και γονίδια που κωδικοποιούν την β-αλυσίδα και καλούνται B. Εκτιμάται ότι στην Τάξη II υπάρχουν 7 α- και 24 διαφορετικά β-γονίδια. Γονίδια και για τις δύο αλυσίδες δεν περιέχονται σε όλες τις ομάδες, ενώ ορισμένες περιέχουν πολλά ψευδογονίδια (Tizard, 2004).

Μεταξύ των τριών τάξεων του Ovar-MHC, τα γονίδια της Τάξεως II έχουν μελετηθεί σε μεγαλύτερο βαθμό, ενώ γνώρισμά τους είναι ο ιδιαίτερα έντονος πολυμορφισμός (Hedrick 1994), ο οποίος εκφράζεται μέσω αντικαταστάσεων στην νουκλεοτιδική αλυσίδα. Από 10 έως 12 διαφορετικά μόρια της τάξεως II αναλόγως του ιστού και του οργάνου έχουν βρεθεί να κωδικοποιούνται εντός ενός προβάτου (Puri and Brandon, 1987). Τα γονίδια DR και DQ επιδεικνύουν τον μεγαλύτερο βαθμό πολυμορφισμού στο Ovar-MHC (Amills *et al.*, 1998).

Τα γονίδια DR (*DRA* και *DRB*) είναι στενά συνδεδεμένα γονίδια με μορφή ετεροδιμερούς και κωδικοποιούν προϊόντα που εκφράζονται στην επιφάνεια των μακροφάγων και των λευκοκυττάρων (Outteridge *et al.*, 1996). Το γονίδιο Ovar-*DRA* κωδικοποιεί πολυπεπτιδίο μήκους 253 αμινοξέων. Ο γονιδιακός τύπος του *DRA*, που κωδικοποιεί την α-αλυσίδα του ετεροδιμερούς, θεωρούνταν σχεδόν μονομορφικός, και για αυτόν τον λόγο δεν αποτελούσε αντικείμενο μελέτης, αλλά πρόσφατα μελέτες έδειξαν ότι εμφανίζει πολυμορφισμούς που διαφέρουν έως και σε 5 θέσεις, 4 εκ των οποίων είναι μη σημειακές (Ballingall *et al.*, 1992 και 1997, Fabb and Maddox, 1993). Επιπρόσθετα περιγράφηκε πολυμορφισμός του Ovar-*DRA*, με ένα νέο αλληλόμορφο να διαφέρει κατά 20 νουκλεοτίδια, 12 εκ των οποίων ήταν μη-συνώνυμα (Ballingall *et al.*, 2010). Το ενδιαφέρον με αυτό το αλληλόμορφο έγκειται στο ότι είναι στενά συνδεδεμένο με ένα εξίσου πολυμορφικό αλληλόμορφο του γονιδίου *DRB1*.

Στα πρόβατα το λειτουργικό γονίδιο της περιοχής *DRB*, που απαρτίζεται από τέσσερεις γονιδιακούς τύπους (Scott *et al.*, 1991 b), είναι το γονίδιο *DRB1*, ενώ υπάρχουν και τρία ψευδογονίδια *DRB2*, *DRB3*, *DRB4*, με πρόσθετες ενδείξεις για την ύπαρξη επιπλέον ψευδογονιδίων (Schwaiger *et al.*, 1996). Θεωρείται ότι η περιοχή Ovar-*DRB* παρουσιάζει την μεγαλύτερη παραλλακτικότητα στο MHC του προβάτου (Andersson and Rask, 1998).

Η περιοχή *DQ* φαίνεται να είναι αρκετά πιο πολύπλοκη. Οι Scott *et al.* (1987a) βρήκαν τουλάχιστον 2 περιοχές *DQA* και 3 περιοχές που ομοιάζουν με *DQB*. Από αυτές τις περιοχές κατάφεραν να αλληλουχήσουν 4 ημιτελείς κλώνους, δύο της περιοχής *DQA* (*DQA1* και *DQA2*) και έναν της περιοχής *DQB* (Scott *et al.*, 1991a, b). Έτσι δημιουργήθηκε μέσω κοσμιδιακών κλώνων χάρτης της περιοχής MHC-*DQ*

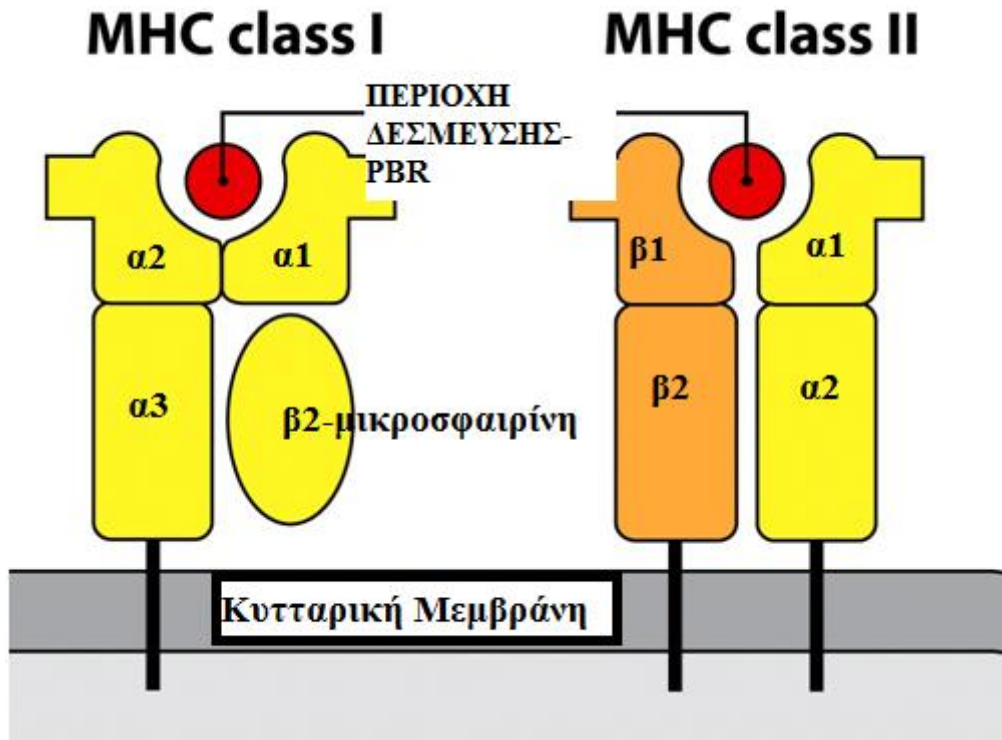
των προβάτων. Η περιοχή αυτή είναι 130 Kb και περιλαμβάνει τις περιοχές *DQA1*, *DQB1*, *DQA2* και *DQB2* με την αναφερθείσα σειρά (Wright and Ballingall, 1994). Ενώ η πλειοψηφία των προβάτων φαίνεται να φέρει ένα αντίτυπο *DQA1* και *DQA2*, ένα μικρό ποσοστό ατόμων δεν διαθέτει καθόλου αυτή την περιοχή (Escayg *et al.*, 1996, Snibson *et al.*, 1998).

Τα μόρια της Τάξεως II του MHC εκφράζονται μόνο σε συγκεκριμένα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος, όπως τα μακροφάγα, τα Β-κύτταρα, τα δενδριτικά, τα μικρογλοιακά κύτταρα του εγκεφάλου που σχετίζονται με τα μακροφάγα και κύτταρα του στρώματος του θύμου αδένου που εξειδικεύονται στην παραγωγή αντιγόνων. Πολλά είδη κυττάρων, μέσω ερεθισμάτων της δράσης της ιντερφερόνης- γ (IFN- γ), μιας κυτταροκίνης, δύνανται να ενεργοποιηθούν και εκφράσουν μόρια της Τάξεως II (Tizard, 2004).

Στο μόριο της Τάξεως II, που απεικονίζεται σχηματικά στην **Εικόνα 1.2** η περιοχή PBR σχηματίζεται από τους δομικούς πυρήνες $\alpha 1$ και $\beta 1$ που προέρχονται από τις πολυπεπτιδικές αλυσίδες $-\alpha-$ και $-\beta-$ αντίστοιχα, οι οποίες κωδικοποιούνται όπως προαναφέρθηκε από γονίδια της περιοχής της Τάξεως II. Οι αλυσίδες $-\alpha-$ και $-\beta-$ ενώνονται με μη-ομοιοπολικό τρόπο (Janeway and Travers, 1996). Η παραλλακτικότητα στην αλληλουχία των μορίων της Τάξεως II εντοπίζεται κυρίως στην περιοχή PBR. Στα θηλαστικά, ο γονιδιακός τύπος της Τάξεως II DR, DP, DQ περιέχει ένα λειτουργικό γονίδιο της αλυσίδας $-\alpha-$ και ένα ή περισσότερα της αλυσίδας $-\beta-$ (Dukkipati, 2006b). Η μεγαλύτερη διαφορά ανάμεσα στα Τάξεως I και II MHC-μόρια εντοπίζεται στο γεγονός ότι στα Τάξεως II MHC-μόρια τα άκρα της σχισμοειδούς θήκης είναι ανοικτά, επιτρέποντας έτσι στα δεσμευμένα πεπτίδια να προεξέχουν από τα N και C άκρα της σχισμοειδούς θήκης (Brown *et al.*, 1993).

Τα μόρια MHC Τάξεως II εκθέτουν αντιγονικά πεπτίδια που προέρχονται από εξωκυτταρικούς παθογόνους παράγοντες (βακτήρια ή παράσιτα) στον T-κυτταρικό υποδοχέα (TCR) των $CD4^+$ T-λεμφοκυττάρων (Fremont *et al.*, 1996, Germain and Margulies, 1993). Τα βοηθητικά $CD4^+$ T-κύτταρα (TH1), σε περίπτωση εκδήλωσης ανοσολογικής απόκρισης, απελευθερώνουν κυττοκίνες που ενεργοποιούν τα Β-λεμφοκύτταρα που παράγουν με την σειρά τους αντισώματα. Τα φλεγμονώδη $CD4^+$ δραστικά κύτταρα (TH2) ασκούν απευθείας κυτταροτοξική

δράση. Η όλη διαδικασία περιλαμβάνει την δέσμευση αντιγόνου και αποδόμηση των πρωτεϊνών σε πεπτίδια 10-30 αμινοξέων, πιο συχνά περί των 12-20, που έπειτα προσδένονται στη σχισμοειδή θήκη (Brown *et al.*, 1993)



Εικόνα 1.2 Τα μόρια της Τάξεως I και II είναι ετεροδιμερή που αποτελούνται από την αλυσίδα α- και β-. Στην περίπτωση της Τάξεως I υπάρχει η γλυκοζυλιωμένη πολυπεπτιδική αλυσίδα α- και η β2-μικροσφαιρίνη. Η α-αλυσίδα μέσω των πτυχώσεών της δημιουργεί τους δομικούς πυρήνες α1, α2 και α3. Οι δομικοί πυρήνες α1 και α2 αποτελούν την σχισμοειδή θήκη. Αντίστοιχα για την Τάξη II, υπάρχουν δύο διαμεμβρανικές αλυσίδες γλυκοπρωτεϊνών και κάθε αλυσίδα διαθέτει 2 εξωκυττάριους δομικούς πυρήνες (α1, α2 και β1, β2). Η σχισμοειδής θήκη για τα μόρια της Τάξεως II σχηματίζεται από τους δομικούς πυρήνες α1 και β1 (Gogolin-Ewens *et al.*, 1985, Puri *et al.*, 1985, Parham, 2009).

1.1.5. Γονίδια Ovar-MHC της Τάξεως III

Τα γονίδια της Τάξεως III, περιέχουν σημαντικό αριθμό νουκλεοτιδίων με γουανίνη και κυτοσίνη και καταλαμβάνουν έκταση 1,1 Mbp μεταξύ των περιοχών I και II του MHC. Η περιοχή αυτή είναι η πιο πυκνή σε γονίδια, ενώ περιέχει και τα λιγότερα ψευδογονίδια (Kulski *et al.*, 2002). Πολλά γονίδια αυτής περιοχής, είτε δεν συμμετέχουν σε ανοσολογικούς μηχανισμούς, είτε ο ρόλος τους δεν έχει αποσαφηνιστεί.

Τα γονίδια που σχετίζονται με την ανοσολογική απόκριση είναι αυτά που ενεργοποιούν τα στοιχεία του συμπληρώματος C4A, C4B, C2, Bf, τον παράγοντα TNF, που αποτελεί παράγοντα νέκρωσης των όγκων καθώς και τις λεμφοτοξίνες (LTA, LTB) (Webb and Chaplin, 1990). Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γονίδιο HSP70 που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη θερμικού πλήγματος 70, η οποία εμπλέκεται και στην διαδικασία απόρριψης όγκων (Srivastava *et al.*, 1998). Τέλος, στην περιοχή βρίσκεται το γονίδιο που κωδικοποιεί την υδροξυλάση (CYP21: Cytochrome P 21) που συμμετέχει στην βιοσύνθεση στεροειδών, ενώ έχει βρεθεί και ένας αριθμός γονιδίων των οποίων ο ρόλος δεν έχει αποσαφηνιστεί (Dukkipati, 2006b).

1.1.6 Σημασία πολυμορφισμού του MHC

Τα γονίδια του MHC είναι τα πιο πολυμορφικά εντός του γονιδιώματος των σπονδυλόζων (Dorak *et al.*, 2005) και οι πολυμορφισμοί συγκεντρώνονται κυρίως στις θέσεις πρόσδεσης των αντιγόνων (σχισμοειδής θήκη) αλλά και στις παρακείμενες περιοχές του μορίου MHC που έρχονται σε επαφή με τον T-κυτταρικό υποδοχέα (Bjorkman *et al.*, 1987, Brown *et al.*, 1993). Ο πολυμορφισμός του MHC έγκειται στην παραλλακτικότητα των αλληλομόρφων του που είναι αποτέλεσμα σημειακών μεταλλάξεων, γενετικού ανασυνδυασμού αλλά οφείλεται και σε γονιδιακή μετάλλαξη (Janeway and Travers, 1996). Ο λόγος που συμβαίνει αυτό θεωρείται κατά τους Falk *et al.* και Rudensky *et al.* (1991) ότι είναι ώστε τα διάφορα αλληλόμορφα να ευνοούν τόσο την πρόσδεση μεγάλου αριθμού διαφορετικών πεπτιδίων, όσο και την δημιουργία χαρακτηριστικών σειρών T-λεμφοκυττάρων (Messaoudi *et al.*, 2002).

Ο πολυμορφισμός του MHC διατηρείται μέσω μηχανισμών εξισορροπούσας επιλογής (balancing selection) (Hedrick P., 1998). Η εξισορροπούσα επιλογή δρα ώστε να μειώνεται η συχνότητα των ομοζυγωτών γονοτύπων και να αυξάνεται η συχνότητα των ετεροζυγωτών. Σε επίπεδο πληθυσμού, αυτά τα επίπεδα πολυμορφισμού εξασφαλίζουν ότι πεπτίδια που προέρχονται από πιθανά παθογόνα θα αναγνωρίζονται από το ανοσοποιητικό σύστημα, από κάποια τουλάχιστον άτομα του πληθυσμού, και κατ' αυτόν τον τρόπο η πιθανότητα το παθογόνο να προσβάλλει το σύνολο του πληθυσμού αποκλείεται. Η εξισορροπούσα επιλογή προκύπτει συνεπώς από την αλληλεπίδραση μεταξύ ξενιστή και παρασίτου (ή γενικά παθογόνου) και οδηγεί σε διατήρηση του πολυμορφισμού μέσω των

μηχανισμών της υπερκυριαρχίας, της υπόθεσης του σπάνιου αλληλομόρφου και την διακύμανση του βαθμού της επιλεκτικής πίεσης (Charbonnel and Pemberton, 2005).

Καθώς τα γονίδια του MHC εκφράζονται συγκυριαρχικά και τα περισσότερα άτομα είναι ετεροζυγωτά, λόγω της εκτενούς παραλλακτικότητας του MHC, συνήθως εκφράζονται 2 αλληλόμορφα από κάθε γονιδιακό τόπο. Έτσι, δεν υπάρχει καθήλωση ή εξάλειψη κάποιου αλληλομόρφου αλλά επικρατεί μια σταθερή ισορροπία ετεροζυγωτών. Άλλωστε θεωρείται ότι ο ετεροζυγωτός γονότυπος έχει μεγαλύτερη δαρβινική προσαρμογή έναντι και των δύο ομοζυγωτών γονοτύπων των αλληλομόρφων που τον απαρτίζουν (Doherty and Zinkernagel, 1975).

Οι γονότυποι του MHC που διαθέτουν ένα σπάνιο αλληλόμορφο θεωρείται ότι έχουν ισχυρό πλεονέκτημα επιλογής καθώς λίγα παθογόνα θα έχουν εκτεθεί και προσαρμοστεί σε αυτό. Όσο πιο συχνά εμφανίζονται τα αλληλόμορφα, τόσο πιο πολύ προσαρμόζονται και τα αντιγόνα, κάτι που μειώνει την ανθεκτικότητα των γονοτύπων MHC που φέρουν αυτά τα αλληλόμορφα (Meyer and Thomson, 2001). Σύμφωνα με την θεωρία του σπάνιου αλληλομόρφου, η αλληλεπίδραση ξενιστή και παρασίτου είναι μια δυναμική διαδικασία. Τα MHC αλληλόμορφα ευνοούνται σε χαμηλές συχνότητες, ενώ αυξάνουν σε συχνότητα μόνο για να προκαλέσουν μια αντίστοιχη μετατόπιση στην γενετική σύνθεση των στοχευμένων παρασιτικών πληθυσμών (Froeschke and Sommer, 2012). Προς ενίσχυση αυτού του μοντέλου, για τα αλληλόμορφα του MHC έχουν βρεθεί σε φυσικούς πληθυσμούς πολλές συσχετίσεις μεταξύ αλληλομόρφων και ανθεκτικότητας σε παρασιτώσεις (Hill *et al.*, 1991, Paterson *et al.*, 1998).

Η διακύμανση του βαθμού της εξελικτικής πίεσης είναι ένας πρόσθετος παράγοντας που συμβάλλει σημαντικά στην διατήρηση του πολυμορφισμού του MHC. Η ένταση και η στοχευμένη επιλογή μπορεί να αλλάζουν συνεχώς στον χρόνο ή και τον χώρο σε σχέση με το είδος και το μέγεθος του πληθυσμού των παθογόνων (Hedrick and Thompson, 1987, Landry and Bernatchez, 2001, Miller *et al.*, 2001, Hedrick, 2002). Η μεταβαλλόμενη επιλογή έχει ερευνηθεί και τεκμηριωθεί σε θεωρητικό επίπεδο (Hedrick, 2002), ενώ αρκετές πρακτικές μελέτες υποστηρίζουν την ιδέα της ετερογένειας στην επιλεκτική πίεση (Bernatchez and Landry, 2003).

Πολλές αντικαταστάσεις αμινοξέων οφείλονται συχνά και στο φαινόμενο της κατευθύνουσας επιλογής που ευνοεί ένα φαινότυπο που μεταβάλλει τη συχνότητα ορισμένων αλληλομόρφων προς μια κατεύθυνση. Τα αλληλόμορφα που προσδίδουν κάποιο πλεονέκτημα αυξάνουν την συχνότητά τους, ανεξαρτήτως κυριαρχίας ή υποτέλειας και σταθεροποιούνται σταδιακά στον πληθυσμό. Η κατευθύνουσα επιλογή δρα κυρίως σε περιπτώσεις μεταναστεύσεων των πληθυσμών ή σε αλλαγή των περιβαλλοντικών συνθηκών.

Με δεδομένο τον ρόλο του MHC και των γονιδίων του στον οργανισμό, αλλά και λαμβάνοντας υπόψη ότι η ανθεκτικότητα ή η ευαισθησία σε ασθένειες σχετίζεται άμεσα με τον τρόπο έκφρασης της ανοσολογικής απόκρισης κάθε οργανισμού, η συσχέτιση απλοτύπων με την έκφραση αυτής είναι αναμενόμενη (Crawford *et al.*, 2006). Έτσι, η ανοσολογική απόκριση έναντι μολυσματικών παραγόντων εξαρτάται άμεσα από το προφίλ των MHC αλληλομόρφων.

1.2 MHC ΚΑΙ ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ ΣΕ ΑΣΘΕΝΕΙΕΣ

Λόγω του δυσπρόστατου ρόλου των μορίων του MHC, από την μια παρουσιάζοντας αντιγονικά πεπτίδια σε T-κύτταρα και από την άλλη ρυθμίζοντας το σύνολο των παραγόμενων T-κυττάρων, έχουν πραγματοποιηθεί εκτενείς μελέτες για την εύρεση των συσχετίσεων αυτών των πρωτεϊνών αλλά και των πιθανών πολυμορφισμών τους, με την ανθεκτικότητα σε ασθένειες.

1.2.1 Σχέση MHC και ασθενειών

Η συσχέτιση ενός πολυμορφικού γονιδίου του MHC και μιας ανοσολογικής απόκρισης ή μεταξύ MHC και μιας ασθένειας, οφείλεται είτε σε άμεση επίδραση του γονιδίου αυτού, είτε στην επίδραση ενός γονιδίου που συνδέεται έμμεσα με σύστημα του MHC. Κατά αυτόν τον τρόπο τόσο ο ρόλος όσο και η φύση του MHC καθιστούν τα γονιδιά του πιθανούς υποψήφιους (Marker genes) για μελέτες συσχετίσεων.

Σε παραγωγικά ζώα, οι μελέτες συσχέτισης που διενεργούνται για το MHC έχουν σαν απώτερο στόχο την γενετική βελτίωση των ζώων ώστε να είναι πιο ανθεκτικά σε μολυσματικές ασθένειες. Με την πραγματοποίηση μελετών διαπιστώθηκε ότι η διατήρηση του πολυμορφισμού και της ετεροζυγωτίας στους πληθυσμούς είναι

ιδιαίτερα σημαντική για τον γονιδιακό αυτό τόπο, καθώς ομοζυγωτία μπορεί να παρέχει ανθεκτικότητα σε συγκεκριμένη ασθένεια, αλλά αυτομάτως το ζώο αποκτά ευαισθησία σε άλλη ασθένεια ή μειώνεται η παραγωγικότητά του. Συνεπώς, η δημιουργία ομοζυγωτών ζώων σε έναν MHC τόπο είναι όχι μόνο δύσκολη αλλά και μη επιθυμητή.

Παρόλα αυτά η μεταβολή της συχνότητας των ανθεκτικών αλληλομόρφων ή απλοτύπων για μια συγκεκριμένη ασθένεια είναι επιθυμητή, ειδικά για τις ασθένειες όπου η ανθεκτικότητα αποτελεί κυρίαρχο χαρακτηριστικό (Lewin *et al.*, 1999). Στα μηρυκαστικά, μελέτες έχουν υποδείξει την συσχέτιση μεταξύ του MHC των βοοειδών και ανθεκτικότητας στον Ιό της Λευχαιμίας των Βοοειδών (BVL: Bovine Leukemia Virus) ή με την ανθεκτικότητα σε μαστίτιδες (Lewin, 1996, Lewin *et al.*, 1999, Takeshima and Aida, 2006). Επιπρόσθετα, στο πρόβατο έχουν βρεθεί συσχετίσεις του Ovar-MHC με την τρομώδη νόσο (Scrapie) και με παρασιτώσεις (Dietert, 1996, Stear and Wakelin, 1998).

Ο ακριβής μηχανισμός με τον οποίο το MHC σχετίζεται με ανθεκτικότητα ή ευαισθησία σε ασθένειες δεν είναι γνωστός αλλά θεωρείται ότι σχετίζεται με την ειδικευση που εμφανίζεται στην πρόσδεση των πεπτιδίων. Ζώα με διαφορετικά γονίδια MHC, προσδένονται επιλεκτικά και εκθέτουν συγκεκριμένα πεπτίδια στα T-κύτταρα, τα οποία με την σειρά τους μπορεί να εμπλέκονται στην παθογένεια της ασθένειας ή στην προστασία του οργανισμού (Thorsby, 1997).

Είναι επίσης πιθανό ότι ζώα με διαφορετικά αλληλόμορφα και ενδογενούς προέλευσης πεπτίδια αποκτούν ανοχή σε διαφορετικά αυτόλογα αντιγόνα και αποκτούν συγκεκριμένες ομάδες T-κυττάρων, γεγονός που επηρεάζει το μέγεθος και την ειδικότητα των ανοσολογικών δράσεων του οργανισμού ενάντια σε παθογόνα (Messaoudi *et al.*, 2002). Συμπερασματικά, ο πολυμορφισμός του MHC πιθανόν να δικαιολογεί την ανθεκτικότητα ή ευαισθησία σε παθογόνα.

1.2.2 Συσχέτιση του Ovar-MHC με γαστρεντερικές νηματωδώσεις

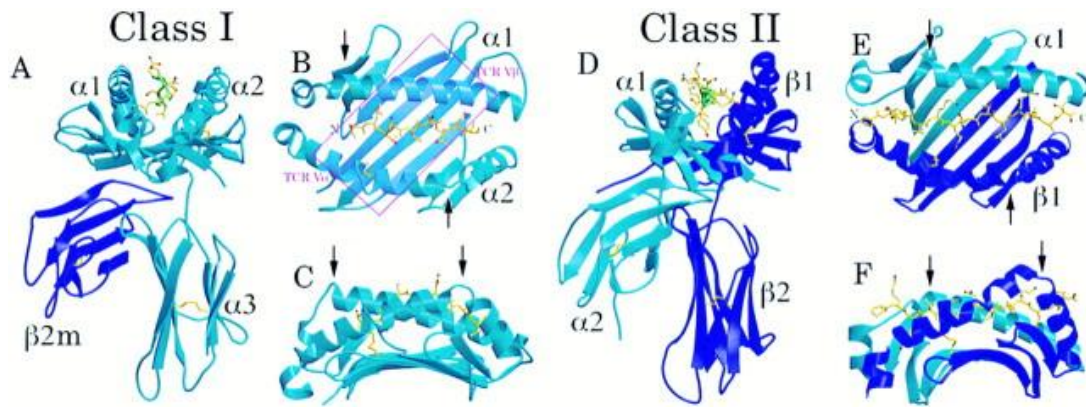
Συσχέτιση μεταξύ του Ovar-MHC με γαστρεντερικές νηματωδώσεις έχουν βρεθεί στα πρόβατα και αφορούν τα παθογόνα *Trichostrongylus colubriformis* (Hobenhause and Outteridge, 1995), *Ostertagia (Teladorsagia) circumcincta* (Buitkamp *et al.*, 1996, Charon *et al.*, 2001, Dukkipati *et al.*, 2006, Schwaiger *et al.*, 1995, Stear *et*

al., 1996) και *Haemonchus contortus* (Hohenhaus and Outteridge, 1995, Luffau *et al.*, 1990). Παρόλα αυτά στην εκτίμηση αυτών των συσχετίσεων υπάρχουν δυσκολίες (Spooner *et al.*, 1988) καθώς λόγω του υψηλού αριθμού των ευρισκόμενων αλληλομόρφων, του υψηλού ποσοστού ετεροζυγωτίας, του μεγάλου αριθμού ζώων που απαιτείται για την λήψη στατιστικά σημαντικών αποτελεσμάτων, η στατιστική επεξεργασία καθίσταται αρκετά δύσκολη.

Τα γαστρεντερικά νηματώδη αποτελούν την πιο συχνή μορφή παρασίτωσης που επιφέρει παραγωγικές και οικονομικές απώλειες, ενώ η ανθελμινθική θεραπεία με φαρμακευτικά σκευάσματα αποτελεί ακριβή μέθοδο καταπολέμησης που οδηγεί εκτός των άλλων και σε ανάπτυξη μηχανισμών ανθεκτικότητας των παρασίτων έναντι των φαρμάκων (Roos, 1997). Συνεπώς η εύρεση αλληλομόρφων που σχετίζεται με ανθεκτικότητα και η εφαρμογή κατάλληλων προγραμμάτων διασταύρωσης θα αποτελούσε μια πραγματική λύση στην αντιμετώπιση αυτού του προβλήματος.

1.3 ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ *Ovar-DRB1* ΚΑΙ ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ ΣΕ ΑΣΘΕΝΕΙΕΣ

Το γονίδιο *Ovar-DRB1* κωδικοποιεί την β-πολυπεπτιδική αλυσίδα του μορίου *Ovar-MHC* της Τάξεως II και είναι το γονίδιο που εμφανίζει τον μεγαλύτερο πολυμορφισμό. Ο μέγιστος βαθμός παραλλακτικότητας του εντοπίζεται σε συγκεκριμένες θέσεις του εξονίου 2 (270 bp), το οποίο και κωδικοποιεί το δομικό μόριο β1, συμμετέχοντας κατά αυτόν τον τρόπο ενεργά στην διαμόρφωση της περιοχής δέσμευσης του αντιγονικού πεπτιδίου (PBR) (Marsh and Bodmer, 1993). Ομοίως, η ανάλυση της τρισδιάστατης δομής του μορίου *Ovar-MHC* της Τάξεως II που απεικονίζεται στη **Εικόνα 1.3** φανερώνει ότι η παραλλακτικότητα των αμινοξέων εντοπίζεται στον β1-δομικό πυρήνα του PBR (Brown *et al.*, 1993).



Εικόνα 1.3 Τρισδιάστατη δομή των μορίων Ovar-MHC (Bjorkman, 1997).

Το πολυμορφικό πρότυπο διάταξης των αμινοξέων της περιοχής PBR καθορίζει την στερεοδιαμόρφωση και το ηλεκτρικό της φορτίο, με αποτέλεσμα την δημιουργία ισχυρών υδροφοβικών δεσμών με πολύ συγκεκριμένα αντιγονικά πεπτίδια που ταιριάζουν με την δομή του PBR κάθε μορίου (Stern *et al.*, 1994, Thorsby, 1999). Λόγω αυτού, το πλήθος των αλληλομόρφων του γονιδίου Ovar-DRB1 ευνοεί την δέσμευση πολλών και διαφορετικών αντιγόνων, ενώ, είναι πιθανό ο πολυμορφισμός του εξονίου 2 του Ovar-DRB1 να συσχετίζεται με την διαφορετική ικανότητα των ατόμων ενός πληθυσμού να εμφανίζουν ανθεκτικότητα ή ευαισθησία σε ασθένειες.

Όσον αφορά τη συσχέτιση πολυμορφισμού των γονιδίων του Ovar-MHC της τάξεως II με ασθένειες, βρέθηκε ότι στο άγριο πρόβατο της Αμερικής (*Ovis canadensis*- Bighorn sheep), η μειωμένη ποικιλότητα των αλληλομόρφων της Τάξεως II αποτελεί παράγοντα που ευθύνεται για χαμηλότερο τίτλο αντισωμάτων έναντι της λευκοτοξίνης του παθογόνου βακτηρίου *Mannheimia haemolytica*, σε σχέση με τον αντίστοιχο τίτλο αντισωμάτων που εμφανίζονται στα οικόσιτα πρόβατα (*Ovis aries*) (Subramaniam *et al.*, 2012). Το φαινόμενο αυτό, που αποτελεί παράδειγμα κατευθύνουσας επιλογής, δείχνει την διαφορετική εξελικτική διαδρομή των δύο ειδών που προσαρμόστηκαν εξελικτικά με βάση τις διαφορετικές ανάγκες λόγω του περιβάλλοντός τους.

1.3.1 Πολυμορφισμός του γονιδίου Ovar-DRB1 και ανθεκτικότητα σε γαστρεντερικές νηματώδεις

Για την διερεύνηση της επίδρασης των γονιδίων της Τάξεως II, και ειδικότερα του γονιδίου Ovar-DRB1, στην ανθεκτικότητα έναντι γαστρεντερικών νηματωδών

χρησιμοποιούνται κατά κύριο λόγο μοριακές μέθοδοι. Με εφαρμογή της μεθόδου RFLP ανιχνεύθηκε με μοριακό ανιχνευτή το ανθρώπινο γονίδιο DRB από τους Wetherall *et al.* (1991). Στη μελέτη αυτή υπήρξε σημαντική συσχέτιση μεταξύ ενός τεμαχίου DRB, μήκους 19 kb και ευαισθησίας στα γαστρεντερικά νηματώδη σε προβατίνες αλλά όχι στους κριούς. Η μέθοδος RFLP ταυτοποιεί μικρό αριθμό αλληλομόρφων και πιθανότατα να μην δίνει έγκυρα αποτελέσματα (Buitkamp and Erplen, 1996).

Για την φυλή Scottish Blackface, κατόπιν φυσικής μόλυνσης των ζώων με το παράσιτο *Teladorsagia circumcincta* βρέθηκε, μέσω χρήσης της μεθόδου RFLP, ότι τα αλληλόμορφα Ovar-DRB1 σχετίζονται με τις τιμές FEC. Στις μελέτες που επιβεβαιώθηκε το παραπάνω συμπέρασμα μελετήθηκε ο πολυμορφισμός ενός μικροδορυφόρου στο ιντρόνιο 2 και ο υβριδισμός ολιγονουκλεοτιδίων εντός του εξονίου 2 (270 bp) από τους Buitkamp *et al.* (1994), Buitkamp and Erplen (1996), Dukkipati *et al.* (2006), Schwaiger *et al.* (1995) και Stear *et al.* (1996). Επιπρόσθετα, ανιχνεύθηκε ότι αντικατάσταση του αλληλομόρφου DRB1*1001 από το DRB1*0203, προσέδιδε ανθεκτικότητα στα νηματώδη. Η επιβεβαίωση ότι το αλληλόμορφο αυτό σχετίζεται με τις τιμές FEC ήρθε με την μελέτη των Stear *et al.* (2005) σε πρόβατα της φυλής Scottish Blackface.

Σε αντιπαράθεση με την εργασία των Stear *et al.* (2005), σε εργασία που χρησιμοποιήθηκε αντιγόνο του ορού του αίματος για την ανίχνευση των αντιγόνων του παρασίτου *T. circumcincta* σε πρόβατα της φυλής Scottish Blackface δεν εμφανίστηκε συσχέτιση των γονιδίων Ovar-DRB1 με την αναγνώριση παρασιτικών αντιγόνων (McCririe *et al.*, 1997), και ότι το αλληλόμορφο DRB1*0203 δεν αναγνώριζε το ίδιο σύνολο παρασιτικών αντιγόνων σε όλα τα πρόβατα που το διέθεταν. Το γεγονός αυτό υποδηλώνει ότι πιθανότατα τα αλληλόμορφα του DRB1 δεν οφείλονται αποκλειστικά στην έκφραση της ανθεκτικότητας αλλά ότι είναι δυνατόν να συσχετίζονται με αλληλόμορφα άλλων γονιδιακών τόπων και με συνεργατική και συνδυαστική δράση να προσδίδουν στο ζώο ανθεκτικότητα. Καθώς οι γονιδιακοί τόποι που βρίσκονται πλησίον ο ένας του άλλου στο χρωμόσωμα τείνουν να μένουν μαζί κατά την διάρκεια της μείωσης, το ενδεχόμενο αυτό είναι αρκετά πιθανό (McCririe *et al.*, 1997).

Σε εργασία των Sayers *et al.* (2005) που διενεργήθηκε σε πρόβατα των φυλών Texel και Suffolk, πραγματοποιήθηκε αλληλούχηση του εξονίου 2 του γονιδίου Ovar-DRB1 και το αλληλόμορφο DRB1*0203 βρέθηκε για ακόμα μια φορά στα πρόβατα Suffolk να σχετίζεται με χαμηλές τιμές FEC, ενώ δύο άλλα αλληλόμορφα σχετίστηκαν με υψηλές τιμές. Για την φυλή Texel δεν υπήρξαν τα ανάλογα αποτελέσματα, εάν και υπήρξε συσχέτιση των αλληλομόρφων Ovar-DRB1 με τις τιμές FEC. Η διαφορά των FEC που παρατηρήθηκε αποδόθηκε στα διαφορετικά αλληλόμορφα που βρέθηκαν στις 2 φυλές.

Μέσω RFLP πολυμορφισμού ενός ακόμα μικροδορυφόρου στο ιντρόνιο 2 του γονιδίου Ovar-DRB1, μετά από γονοτύπησή του, ανιχνεύθηκε σημαντική επίδραση της μελετηθείσας περιοχής στην ανθεκτικότητα έναντι των *H. contortus*, *T. colubriformis* (Outteridge *et al.*, 1996, Charon *et al.*, 2002) και *T. circumcincta* (Paterson *et al.*, 1998).

1.4 ΓΑΣΤΡΕΝΤΕΡΙΚΕΣ ΝΗΜΑΤΩΔΩΣΕΙΣ ΚΑΙ ΕΠΙΠΕΔΑ

ΠΕΨΙΝΟΓΟΝΟΥ ΣΤΟ ΠΛΑΣΜΑ

Ο καθορισμός της συγκέντρωσης του πεψινογόνου στο πλάσμα του αίματος προτάθηκε από τους Anderson *et al.* (1965) να χρησιμοποιείται σαν κριτήριο και σαν βοηθητική τεχνική διάγνωσης ενδοπαρασιτικών λοιμώξεων των μηρυκαστικών. Κατά αυτόν τον τρόπο, μπορεί να εκτιμηθεί η έκταση της βλάβης στον γαστρικό βλεννογόνο των ζώων από τα γαστρεντερικά παράσιτα καθώς θεωρείται ότι το πεψινογόνο στο πλάσμα μπορεί να αυξηθεί μέσω τριών μηχανισμών. Ο πρώτος αφορά στην αυξημένη περατότητα του βλεννογόνου λόγω βλαβών που προκαλούνται από τα παράσιτα, επιτρέποντας έτσι την διέλευση μακρομορίων όπως αυτό το πεψινογόνο (Murray, 1969). Δεύτερος παράγοντας είναι η αυξημένη μετατροπή του πεψινογόνου σε πεψίνη λόγω χαμηλότερου pH του ηνύστρου κατά την μόλυνση (Jennings *et al.*, 1966) και τρίτον, λόγω αύξησης της παραγωγής πεψινογόνου, ως αντίδραση στην εκκριτική δραστηριότητα των παρασίτων (McKellar *et al.*, 1990).

ΣΚΟΠΟΣ

Ο πολυμορφισμός του γονιδίου *Ovar- DRBI* παρουσιάζει μεγάλο ενδιαφέρον, καθώς υπάρχουν αρκετές μελέτες που έχουν συσχετίσει την ύπαρξη κάποιων αλληλομόρφων με ανθεκτικότητα σε ασθένειες, αλλά και με ορισμένα παραγωγικά χαρακτηριστικά.

Έρευνες έχουν διεξαχθεί σε πλήθος ξένων φυλών, κυρίως με κρεοπαραγωγική και εριοπαραγωγική κατεύθυνση. Φυλές που έχουν μελετηθεί είναι ενδεικτικά οι Scottish Blackface, Suffolk, Texel, Polish Lowland, Polish Heath. Από το σύνολο των ελληνικών φυλών που ανήκουν στο γαλακτοπαραγωγό τύπο προβάτου, έχουν μελετηθεί οι φυλές Φριζάρτας, Καλαρρύτεκη, Χίου και Κοζάνης (Σπετσαρίας 2009, 2013)

Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η μελέτη εκ νέου του πολυμορφισμού του *Ovar- DRBI* σε δύο σπάνιες, υπό εξαφάνιση ελληνικές φυλές με διαφορετικό παραγωγικό προφίλ και διαφορετικές συνθήκες εκτροφής. Συγκεκριμένα επιδιώχθηκε:

1. Ταυτοποίηση νέων αλληλομόρφων του γονιδίου *Ovar- DRBI* εντός των δύο πληθυσμών.
2. Εύρεση πιθανών συσχετίσεων των αλληλομόρφων του γονιδίου *Ovar- DRBI* με παρασιτολογικά χαρακτηριστικά.

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 ΖΩΙΚΟ ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΣΥΛΛΟΓΗ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

Για την πραγματοποίηση της μελέτης επιλέχθηκαν δύο σπάνιες φυλές προβάτων, η φυλή Άργους και η Κοκοβίτικη. Οι δύο φυλές διαφέρουν σε πολλά σημεία, κυρίως όμως ως προς το παραγωγικό επίπεδο αλλά και ως προς το σύστημα εκτροφής.

2.1.1 Κοκοβίτικη φυλή

Στη φυλή αυτή υπάρχουν ελάχιστα άτομα και χαρακτηρίζεται ως σπάνια, με κίνδυνο να εξαφανιστεί. Η περιοχή εκτροφής είναι η κεντρική ορεινή περιοχή της Πελοποννήσου, κυρίως στην περιοχή της Γορτυνίας, στα όρια των νομών Αρκαδίας, Ηλείας και Αχαΐας. Χαρακτηριστικό της περιοχής είναι το γεγονός ότι είναι δύσβατη, ορεινή και απομακρυσμένη από μεγάλες πόλεις και τις κύριες οδικές αρτηρίες.

Τα ποιμνια του Κοκοβίτικου προβάτου από τα οποία λήφθηκαν δείγματα εκτρέφονται στα χωριά Κοντοβάζαινα, Βούτσης και Νυμφασία του νομού Αρκαδίας.

Αναφορικά με την καταγωγή των προβάτων, αναφέρεται ότι το Κοκοβίτικο πρόβατο είναι εξέλιξη του ορεινού προβάτου της Πελοποννήσου. Η διαφοροποίησή του έγινε λόγω των ειδικών συνθηκών εκτροφής του στις συγκεκριμένες περιοχές. Κατά συνέπεια, διαμορφώθηκε σε ένα ιδιαίτερο τύπο προβάτου, μικρού σωματικού μεγέθους και παραγωγικότητας, αλλά μεγάλης ανθεκτικότητας σε αντίξοες συνθήκες διαβίωσης. Κατά τους παραγωγούς η φυλή αυτή είναι άριστα προσαρμοσμένη χωρίς να εμφανίζει ευαισθησία σε ασθένειες και παρασιτώσεις (Ρογδάκης, 2002).

2.1.1.1 Μορφολογικά χαρακτηριστικά της φυλής

- Είναι μικρόσωμα πρόβατα με μέσο ύψος ακρωμίου να ανέρχεται στους κριούς στα 65 cm και στις προβατίνες στα 55 cm, και τα σωματικά τους βάρη να κυμαίνονται στα 56 kg και 41 kg αντίστοιχα.
- Τα ζώα αυτά έχουν μικρή κεφαλή με κωνοειδές πρόσωπο, τριγωνικό, που λεπταίνει προς την περιοχή του στόματος. Το επιρρίνιο είναι ευθύ και τα

αυτιά είναι μικρά, μάλλον όρθια. Σε ορισμένα άτομα δε είναι τόσο μικρά, ώστε φαίνεται να εκλείπουν.

- Τα αρσενικά φέρουν ισχυρά και μεγάλα κέρατα τα οποία περιελίσσονται και στα περισσότερα τα κέρατα κόβονται για την αποφυγή τραυματισμών. Τα θηλυκά δεν έχουν κέρατα.
- Τα άκρα τους είναι μικρά, περίπου 30 cm, αλλά είναι ισχυρά.
- Το μήκος σώματος είναι κατά μέσο όρο 60 cm, το εύρος του στήθους 14 cm και το βάθος του 25 cm, ενώ η περίμετρος του θώρακα είναι κατά μέσο όρο 77 cm.
- Η ουρά είναι αρκετά μακριά και στενή φτάνοντας τα 31cm.
- Ο μαστός είναι καλής διάπλασης με πολύ ισχυρή πρόσφυση, και οι θηλές έχουν διαγώνια κατεύθυνση με μέσο μήκος τα 4 cm.
- Ο χρωματισμός είναι κατά κύριο λόγο λευκός στο σώμα αλλά ποικίλλει στο κεφάλι. Διακρίνονται πρόβατα με εντελώς λευκό πρόσωπο και άλλα με μαύρους ή κοκκινόμαυρους δακτυλίους γύρω από τα μάτια, τα αυτιά και το στόμα, άλλα με κοκκινόμαυρα στίγματα σε όλο το πρόσωπο και τα άκρα και άλλα με κοκκινόμαυρο όλο το πρόσωπο. Υπάρχουν και εξ' ολοκλήρου κοκκινόμαυρα άτομα.

2.1.1.2 Διατροφή και σταυλισμός

Η διατροφή τους στηρίζεται εξ' ολοκλήρου στην βλάστηση που υπάρχει στις περιοχές που εκτρέφονται, ενώ τους προσφέρονται μικρές ποσότητες δημητριακών καρπών και μηδικής κατά την εποχή των τοκετών τους χειμερινούς μήνες. Ο σταυλισμός γίνεται σε παραδοσιακές εγκαταστάσεις, πρόχειρα κατασκευασμένες.

2.1.1.3 Τοκετοί- Γαλακτοπαραγωγή

Το ποσοστό πολυδυμίας της φυλής εκτιμάται από 1,3 έως 1,7 και τα ζώα γεννούν την περίοδο του χειμώνα, από Δεκέμβριο έως Φεβρουάριο. Τα απογαλακτιζόμενα ζώα έχουν βάρος περί των 15 kg εντός 3 μηνών.

Οι προβατίνες αρμέγονται 2 φορές την ημέρα μετά τον απογαλακτισμό των αρνιών έως το τέλος του Αυγούστου και η παραγωγή είναι περίπου 0,5-1 kg γάλα την ημέρα. Η εμπορεύσιμη γαλακτοπαραγωγή είναι 60-90 kg γάλακτος ανά αμελκτική περίοδο.

2.1.2 Φυλή Άργους

Το πρόβατο αυτό πήρε την ονομασία του από την περιοχή όπου και εκτρεφόταν, την πεδινή περιοχή δηλαδή που περιβάλλει την πόλη του Άργους. Το πρόβατο της φυλής Άργους θεωρείται ότι δημιουργήθηκε στην περιοχή της Αργολίδος ύστερα από διασταυρώσεις που πραγματοποιήθηκαν μεταξύ ενός ντόπιου προβάτου και ενός πλατύουρου προβάτου Ασιατικής καταγωγής (πιθανώς της φυλής Χίου) αλλά και μέσω συνεχούς φυσικής και τεχνητής επιλογής για την ανάδειξη βέλτιστων χαρακτηριστικών που θα επέτρεπαν στην φυλή να προσαρμοστεί στις συνθήκες της περιοχής.

Μέχρι πρόσφατα υπήρχαν αμιγή ποίμνια στην ευρύτερη περιοχή της Μεσσηνίας και κυρίως στο χωριό Άμμος της Μεσσηνίας. Υπάρχουν καθαρόαιμα άτομα διασκορπισμένα σε ποίμνια του νομού αυτού. Σήμερα το μοναδικό αμιγές ποίμνιο βρίσκεται στον Ορχομενό και αποτελείται από περίπου 100 άτομα.

Παρά τα σημαντικά πλεονεκτήματα της φυλής που φαίνεται να είναι ιδιαίτερα ανθεκτική και προσαρμοσμένη στην περιοχή, έχοντας παράλληλα άριστες παραγωγικές ιδιότητες, τείνει να εξαφανισθεί εξαιτίας κυρίως της εισαγωγής κριαριών φυλής Φριςλανδίας και Χίου (Ρογδάκης, 2002).

2.1.2.1 Μορφολογικά χαρακτηριστικά της φυλής

- Μεγαλόσωμο πρόβατο με ύψος ακρωμίου για τους κριούς στα 85 cm και για τις προβατίνες στα 70 cm. Τα σωματικά βάρη κυμαίνονται στα 70 κιλά για τους κριούς και στα 60 κιλά για τις προβατίνες.
- Το κεφάλι είναι μικρού μεγέθους σε σχέση με το σώμα και τριγωνικού σχήματος. Έχει ελαφρώς κυρτό επιρρίνιο και μεγάλα ημικρεμάμενα αυτιά.
- Μεγάλο ποσοστό κριών φέρουν μεγάλα και ισχυρά κέρατα, ενώ τα θηλυκά είναι ακέρατα σε μεγάλο ποσοστό.
- Τα πόδια είναι αρκετά ψηλά και δεν είναι ιδιαίτερα ισχυρά.
- Το σώμα του Αργίτικου προβάτου έχει μήκος 65-75 cm και η περίμετρος του θώρακα είναι κατά μέσο όρο 100 cm. Το στήθος του είναι αρκετά βαθύ αλλά όχι ευρύ.

- Η ουρά του προβάτου αυτού διαφέρει σε σχέση με των υπόλοιπων Ελληνικών φυλών, καθώς έχει σχήμα στρογγυλό με μήκος 20 cm και πλάτος 17 cm. Σε μερικά άτομα παρουσιάζει μικρή εκλέπτυνση στο κάτω άκρο της ενώ σε άλλα η ουρά έχει σχήμα σιγμοειδές ή και χοανοειδές.
- Ο μαστός εμφανίζει καλή ανάπτυξη με καλή συγκράτηση μέσω των κοιλιακών μυών, ενώ οι θηλές του με μέγεθος να κυμαίνεται στα 2,8 cm, είναι οι μικρότερες όλων των ελληνικών προβάτων.
- Το πρόβατο της φυλής Άργους είναι αναμικτόμαλλο με λίγες σχετικά αγανώδεις τρίχες. Μερικά άτομα έχουν μαλλί όμοιο των ομοιόμαλλων φυλών, γεγονός που αποτελεί περαιτέρω απόδειξη ότι στη δημιουργία της φυλής πιθανόν μετείχε κατά κάποιο ποσοστό και το χιώτικο πρόβατο.
- Ο χρωματισμός του προβάτου παρουσιάζει μεγάλη ομοιομορφία με λίγες αποκλίσεις. Το σώμα του είναι λευκό με μαύρο πρόσωπο και άσπρη κορυφή κεφαλής. Ορισμένα ζώα φέρουν άσπρες κηλίδες στα αυτιά και στην κάτω γνάθο, ενώ κάποια φέρουν άσπρη ρίγα κατά μήκος της μύτης. Τα πόδια είναι λευκά.

2.1.2.2 Διατροφή και σταλισμός

Η βόσκηση των ζώων πραγματοποιείται σε ιδιόκτητες βοσκές, πλούσιες σε νομή καθ' όλη τη διάρκεια του έτους. Παράλληλα χορηγείται χόρτο μηδικής και συμπυκνώματα κατά το πρώτο στάδιο της γαλουχίας. Τα ζώα σταυλίζονται και δεν ακολουθείται το κατά βάση εκτατικό σύστημα που προαναφέρθηκε στα πρόβατα της Κοκοβίτικης φυλής.

2.1.2.3 Τοκετοί- Γαλακτοπαραγωγή

Η γονιμοποίηση των προβατίνων γίνεται κατά τους μήνες Ιούνιο και Ιούλιο ενώ οι τοκετοί πραγματοποιούνται κατά το διάστημα Δεκεμβρίου-Ιανουαρίου. Η φυλή χαρακτηρίζεται σχετικά πρόωμη καθώς οι αμνάδες γονιμοποιούνται συνήθως από το πρώτο έτος της ηλικίας τους.

Η πολυδυμία κυμαίνεται από 1,5 έως 1,8 αρνιά. Ο απογαλακτισμός των αρνιών γίνεται στην ηλικία των 30 περίπου ημερών με βάρος απογαλακτισμού 12-13 kg (Ρογδάκης, 2002).

Το πρόβατο Άργους έχει υψηλή παραγωγικότητα με μέση ετήσια εμπορεύσιμη γαλακτοπαραγωγή τα 150 -180 λίτρα/προβατίνα. (<http://www.aua.gr/probata/index>)

2.2 ΓΟΝΟΤΥΠΗΣΗ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ *Ovar-DRB1*- ΒΙΟΜΟΡΙΑΚΕΣ ΑΝΑΛΥΣΕΙΣ

Τα αποτελέσματα των εξετάσεων των κοπράνων χωρίστηκαν σε ομάδες ώστε να επιλεγθούν τα ζώα στα οποία θα πραγματοποιούνταν η γονοτύπηση. Ανάλογα με το σχετικό αριθμό αυγών που μετρήθηκε κατά τις εξετάσεις, δημιουργήθηκαν τρεις ομάδες (Πίνακας 2.1). Η πρώτη περιελάμβανε τα ζώα με υψηλό αριθμό μετρήσεων αυγών (για τα Κοκοβίτικα το κατώφλι ήταν >500 μονάδων FEC και για τα ζώα της φυλής Άργους ήταν άνω των 1300 μονάδων FEC), η δεύτερη με ενδιάμεσο αριθμό αυγών παρασίτων και η τρίτη με χαμηλό ή μηδενικό αριθμό αυγών παρασίτων (0-100 FEC και για τις δύο φυλές). Επιλέχθηκαν έπειτα οι δύο ακραίες ομάδες ώστε να μας δείξουν τυχόν αλληλόμορφα που θα σχετίζονταν με αυτές τις ακραίες τιμές.

Πίνακας 2.1 Αριθμός ζώων που γονοτυπήθηκαν με κριτήριο επιλογής ανάλογα τον αριθμό FEC.

ΦΥΛΗ	Αριθμός ζώων με υψηλές τιμές FEC	Αριθμός ζώων με μεσαίες τιμές FEC	Αριθμός ζώων με χαμηλές τιμές FEC
Άργους	14 FEC>400	-	12 FEC<<100
Κοκοβίτικη	14 FEC>1300	3 100<FEC<1300	13 FEC<<100

Η μέθοδος γονοτύπησης που επιλέχθηκε ήταν η γονοτύπηση με αλληλούχηση, καθώς προσφέρει υψηλή ακρίβεια και ευκολία και σχετικά χαμηλότερο κόστος σε σύγκριση με άλλες τεχνικές.

Διεξήχθη PCR για ενίσχυση του υποστρώματος του απομονωμένου γονιδιωματικού DNA των ζώων που επιλέχθηκαν προς γονοτύπηση.

Στο απομονωμένο γονιδιωματικό DNA του ζώου όπου εντοπίστηκε το νέο αλληλόμορφο *Ovar-DRB1*, διεξήχθη Nested PCR, με αρκετούς συνδυασμούς εκκινητών, ώστε να επιτευχθεί η ενίσχυση του εξονίου 2 του νέου αλληλομόρφου.

Καθώς δεν ήταν δυνατή η ενίσχυση ολόκληρου του εξονίου, μιας και οι εκκινητές δεν μπορούσαν, για αδιευκρίνιστους ακόμα λόγους, να προσδεθούν και να ενισχύσουν το άκρο 3' της αλληλουχίας, αποφασίστηκε το εξόνιο να μελετηθεί με δύο διαφορετικά ζεύγη εκκινητών, ώστε να ληφθεί τμηματικά η συνολική του αλληλουχία.

Τα προϊόντα των PCR που πραγματοποιήθηκαν, κλωνοποιήθηκαν σε καλλιέργεια μετασηματισμένων βακτηριακών κυττάρων στην οποία ενσωματώθηκαν ως ενθέματα μέσω πλασμιδιακών φορέων. Έπειτα ελέγχθηκε το περιεχόμενο των μετασηματισμένων αποικιών με Colony PCR.

Τα προϊόντα της PRC υπέστησαν πέψη με το ένζυμο περιορισμού RsaI, προς επιλογή των αποικιών που περιείχαν το νέο αλληλόμορφο Ovar-*DRB1*. Το ένζυμο αυτό δεν τέμνει την νουκλεοτιδική αλληλουχία του αλληλομόρφου αυτού, αλλά καθώς το ζώο ήταν ετεροζυγώτο η ανίχνευσή του έγινε μέσω της μεθόδου του αποκλεισμού καθώς το RsaI τέμνει το αλληλόμορφο *1001 (το 2^ο αλληλομόρφο) σε 3 σημεία. Οι αποικίες που αντιστοιχούσαν σε μη τεμνόμενες μπάντες στο πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου, ήταν αυτές που περιείχαν το νέο αλληλόμορφο.

Τα ανασυνδυνασμένα πλασμίδια που έφεραν τα εκάστοτε τμήματα της αλληλουχίας του εξονίου 2 του νέου αλληλομόρφου, απομονώθηκαν από τις αντίστοιχες μετασηματισμένες βακτηριακές αποικίες και ακολούθησε αλληλούχηση του ενθέματος.

2.2.1 Απομόνωση γονιδιωματικού DNA από αίμα

Για την απομόνωση του γονιδιωματικού DNA χρησιμοποιήθηκε το τυποποιημένο σύστημα αντιδραστηρίων PureLink® Genomic DNA Mini Kit της Invitrogen™, μέσω του οποίου απομονώθηκαν 100 με 200 μl DNA από την επεξεργασία 200 μl αίματος.

Η διαδικασία που ακολουθείται, είναι συνοπτικά:

- i. Διαχωρισμός του γονιδιωματικού DNA με επώαση του αίματος σε διάλυμα που διασπά τα κυτταρικά συστατικά (Proteinase, RNase, Lysis/Binding Buffer).

- ii. Δέσμευση του αποδεσμευμένου DNA στο ειδικό φίλτρο της παρεχόμενης στήλης διήθησης.
- iii. Έκπλυση του φίλτρου.
- iv. Εκχύλιση του καθαρού γονιδιωματικού DNA.

2.2.2 Ενίσχυση τμήματος DNA με PCR

Για κάθε δείγμα διεξήχθη PCR για την ενίσχυση τμήματος DNA 340 bp, που περιείχε το εξόνιο 2 του γονιδίου *Ovar-DRB1*. Ο συνολικός όγκος της αντίδρασης ήταν 50 μl και περιείχε:

DNA	Γονιδιωματικό DNA	2 μl
Μείγμα Mastermix	H ₂ O	22,5 μl
	Πρόσθιος εκκινητής 455 for (10 pmol/μl)	0,25μl
	Αντίστροφος εκκινητής 329 rev (10 pmol/μl)	0,25μl
	25 μl Go-taq Πολυμεράση	25μl

Χρησιμοποιήθηκε το εξής ζεύγος εκκινητών (αδημοσίευτο υλικό και Ballingall και Tassi, 2010):

455	Intron 1/Exon 2 -16 to 8	Forward (Πρόσθιος)	TATCCCGTCTCTGCAGC ACATTTTC	24bp
329	Exon 2/Intron 2 263 to +15	Reverse (Οπίσθιος)	CACCCCCGCGCTCACCT CGCCGC	23bp

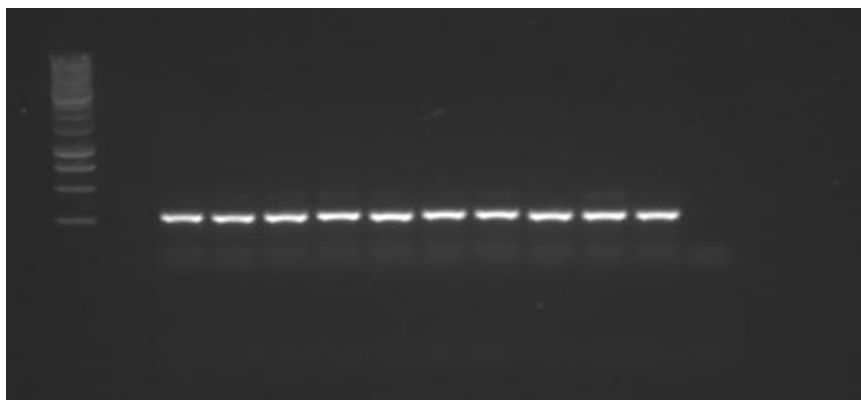
Η αντίδραση έλαβε χώρα σε αυτόματη συσκευή θερμοκυκλοποιητή Techne TC-Plus (Bibby Scientific Limited, Stone, UK), με τις παρακάτω συνθήκες:

Συνθήκες Αντίδρασης PCR			
ΣΤΑΔΙΟ	ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑ	ΧΡΟΝΟΣ	ΚΥΚΛΟΙ
Προθέρμανση	+105° C	5 min	-
Αποδιάταξη	+94° C	30 sec	35
Υβριδισμός	+55° C	30 sec	
Σύνθεση -α' στάδιο	+72° C	30 sec	
Σύνθεση- β' στάδιο	+72° C	5 min	1

Παρασκευή πηκτώματος αγαρόζης:

Η αγαρόζη αποτελεί γραμμικό πολυμερές που απομονώνεται από φύκια και σχηματίζει μια πηκτωματώδη διάταξη που χρησιμοποιείται για τον διαχωρισμό τεμαχίων DNA και RNA, με βάση το μοριακό τους βάρος, όταν αυτά βρεθούν σε ηλεκτρικό πεδίο συγκεκριμένης έντασης.

Το πήκτωμα αγαρόζης που παρασκευάζεται είναι 1%, συνεπώς προστίθενται 1 g αγαρόζης σε 100 ml Buffer TAE. Προστίθενται 5μl GelRed για χρώση, ενώ στο σταθεροποιημένο πήκτωμα εισάγεται περίπου το ήμισυ του δείγματος (12,5 μl) και στην πρώτη θέση τοποθετείται κατάλληλος δείκτης (marker). Έπειτα συνδέονται τα ηλεκτρόδια και ρυθμίζεται σταθερή τάση ~ 80-100 Volt. Μετά από 1-1,5 ώρα διακόπτεται η ηλεκτροφόρηση. Το πήκτωμα αφαιρείται με προσοχή και τοποθετείται σε συσκευή εκπομπής υπεριώδους ακτινοβολίας (320 nm) και φωτογραφίζεται με ψηφιακή κάμερα, συνδεδεμένη με ηλεκτρονικό υπολογιστή και με χρήση ειδικού λογισμικού.



Εικόνα 2.1 Έλεγχος της ενίσχυσης του εξονίου 2 μέσω της PCR. Τα δείγματα εισάγονται σε πήκτωμα αγαρόζης 1% και φωτογραφίζονται μέσω ειδικού λογισμικού. Οι μπάντες αποτελούν ένδειξη της ενίσχυσης.

2.2.3 Ταυτοποίηση αλληλομόρφων με απευθείας αλληλούχηση

Τα προϊόντα της PCR, αφού απομονώνονταν σε καθαρή μορφή με την χρήση της τυποποιημένης συσκευασίας αντιδραστηρίων Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System της εταιρείας Promega, υποβάλλονταν σε απευθείας αλληλούχηση (Direct sequencing), με σκοπό την ταυτοποίηση της αλληλουχίας τους.

Η αλληλούχηση των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε στα εργαστήρια της εταιρείας Eurofins, UK. Για την ταυτοποίηση των αλληλομόρφων χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό πακέτο DNASTAR® για ταυτοποίηση των αμφισημιών εντός των

αλληλουχιών και εύρεση των πολυμορφισμών, ενώ για ταυτοποίηση των εκάστοτε αλληλομόρφων χρησιμοποιήθηκε η βάση δεδομένων των αλληλομόρφων του ερευνητικού Ιδρύματος Moredun καθώς και το λογισμικό «Nucleotide BLAST Basic Local Alignment Search Tool».

Στο λογισμικό πακέτο DNASTAR® εισήχθησαν ταυτόχρονα δύο αρχεία που ελήφθησαν από την απευθείας αλληλούχηση των προϊόντων της PCR, και αντιστοιχούσαν στην πρόσθια και αντίστροφη αλληλούχηση της υπό μελέτη νουκλεοτιδικής αλληλουχίας. Μετά από συνδυασμό των καμπυλών αλληλούχησης και προσαρμογής του μεγέθους των δύο αλληλουχιών μέσω αφαίρεσης των άκρων όπου προσδένονταν οι χρησιμοποιούμενοι εκκινητές, οι αλληλουχίες των οποίων παρατίθενται στον **Πίνακα 2.3**, προέκυπτε μια μοναδική αλληλουχία των αλληλομόρφων του εξονίου 2. Τις περισσότερες φορές η αλληλουχία αυτή περιείχε άνω της 1 νουκλεοτιδικές αμφισημίες σε περίπτωση που το ζώο ήταν ετεροζυγωτό.

Η αλληλουχία αυτή έπειτα επιλεγόταν και εισαγόταν σε ένα από τα 2 προαναφερθέντα λογισμικά με σκοπό την σύγκρισή της με τις αλληλουχίες του εξονίου 2 του γονιδίου *Ovar-DRBI* που έχουν ταυτοποιηθεί μέχρι σήμερα και έχουν εισαχθεί στην Διεθνή Βάση Δεδομένων Ανοσοπολυμορφισμού για το *Ovar-MHC*. Για την εύρεση των ζευγών αλληλομόρφων, χρησιμοποιήθηκε ο κώδικας IUPAC (**Πίνακας 2.2**), επειδή σε κάθε νουκλεοτιδική αμφισημία αντιστοιχεί συγκεκριμένο ζεύγος διαφορετικών νουκλεοτιδίων. Τα αλληλόμορφα του ζεύγους υπό μελέτη, θα έπρεπε να έχουν αλληλουχία που να αντιστοιχεί με κάποια από τις αλληλουχίες που έχουν ήδη κατατεθεί μέσα στα λογισμικά.

Εάν για κάποια αλληλουχία, όπως συνέβη σε μία περίπτωση στην παρούσα μελέτη, δεν αντιστοιχεί 100% ομοιότητα με κάποια αλληλουχία, θεωρείται ότι έχει βρεθεί νέο αλληλόμορφο.

Πίνακας 2.2: Η αντιστοιχία αμινοξέων στον κώδικα κατά IUPAC		
Σύστημα κωδικοποίησης IUPAC		
	Κώδικας	Αντιστοιχία
A: Αδενίνη	M	A ή C
C: Κυτοσίνη	R	A ή G
G: Γουανίνη	W	A ή T
T: Θυμίνη	S	C ή G
U: Ουρακίλη	Y	T ή C
	K	T ή G

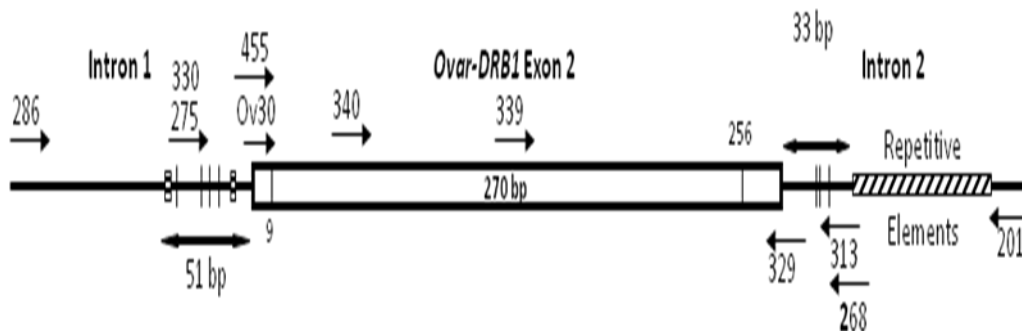
Πίνακας 2.3: Το σύνολο των χρησιμοποιούμενων εκκινήτων με τις θέσεις πρόσδεσής τους και την αλληλουχία νουκλεοτιδίων τους			
Εκκινήτης	Τοποθεσία	Κατεύθυνση	Αλληλουχία
286	Intron 1 -165 έως - 146)	F	TAGTTGGGGTGCCAGTGGAG
201	Intron 2 +240 έως +263	R	CGTACCCAGAKTGAGTGAAGTATC
275	Intron 1 -55 έως -35	F	ATTAGCCTCTCCCCAGGAGTC
313	Intron 2 +21 έως +39	R	ACACACTGCTCCACACTGG
268	Intron 2 +25 έως +44	R	CACACACACACTGCTCCACA
329	Exon 2/Intron 2 263 έως +15	R	CACCCCCGCGCTCACCTCGCCGC
330	Intron 1 -55 έως -35	F	ATTAGCCTCYCCCCAGGAGKC
455	Intron 1/Exon 2 -16 έως 8	F	TATCCCGTCTCTGCAGCACATTTC
339	Intron 2 +159 έως +178	F	ACGCCAAGYAMTGG AACAGC
340	Intron 2 +59 έως +78	F	GCGGTTCTGGAMAGATACT

2.2.4 Ταυτοποίηση νέου αλληλομόρφου

Για την ταυτοποίηση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας του νέου αλληλομόρφου διεξήχθη κλωνοποίηση και αλληλούχηση (Cloning and sequencing).

Καταρχήν, στο απομονωμένο γονιδιωματικό DNA του ζώου, στο οποίο ανευρέθηκε το νέο αλληλόμορφο, διενεργήθηκε απλή PCR με διαφορετικό αντίστροφο εκκινητή (*DRB1*-313 rev) σε σχέση με αυτόν που χρησιμοποιήθηκε προηγουμένα (*DRB1*-329 rev). Με την PCR αυτή, ενώ η πλειοψηφία των φορών ενισχύεται τμήμα DNA μήκους 364 bp, περιέχοντας το εξόνιο 2 του *Ovar-DRB1*, στην περίπτωση αυτή εάν και ενισχύθηκε το τμήμα αυτό, δεν ενισχυόταν το καινούργιο αλληλόμορφο παρά μόνο το ζεύγος του *1001.

Δοκιμάστηκαν διάφορα ζεύγη εκκινητών (*DRB1*-330/*DRB1*-329, *DRB1*-330/*DRB1*-268, *DRB1*-275/*DRB1*-313, *DRB1*-275/*DRB1*-268), οι θέσεις πρόσδεσης των οποίων στο εξόνιο 2 απεικονίζεται στην **Εικόνα 2.1**, αλλά μόνο ένα ζεύγος οδήγησε σε ενίσχυση του νέου αλληλομόρφου (*DRB1*-330/*DRB1*-329). Αυτό το ζεύγος εκκινητών όμως είχε το μειονέκτημα ότι δεν ενίσχυε ολόκληρη την ζητούμενη αλληλουχία ώστε να περιλαμβάνεται στο σύνολό του το εξόνιο 2. Κατά συνέπεια αποφασίστηκε να μελετηθεί τμηματικά η αλληλουχία, ξεχωριστά για το άκρο-5' και ξεχωριστά για το άκρο -3'.



Εικόνα 2.1 Σχηματική απεικόνιση του εξονίου 2 *Ovar-DRB1* με τις αντίστοιχες Ιντρονικές περιοχές εκατέρωθεν του. Παρουσιάζονται επίσης και οι χρησιμοποιούμενοι εκκινητές και οι κατ' εκτίμηση θέσεις πρόσδεσής τους (Balligall and Tassi, 2009).

Ολοκλήρωση άκρου 5':

- Ενίσχυση με τους εκκινητές *DRBI-330/DRBI-329*

Πρωτόκολλο χρησιμοποιούμενης PCR (Συνολικός όγκος 50 μl):

DNA	Γονιδιωματικό DNA	2 μl
Μείγμα Mastermix	H ₂ O	22,5 μl
	Πρόσθιος εκκινητής 330 for (10 pmol/μl)	0,25μl
	Αντίστροφος εκκινητής r 329 rev (10 pmol/μl)	0,25μl
	Go-taq Πολυμεράση (Promega)	25μl

- Κλωνοποίηση σε καλλιέργεια επιδεκτικών βακτηρίων για επιβεβαίωση και ταυτοποίηση του αλληλομόρφου *1001.

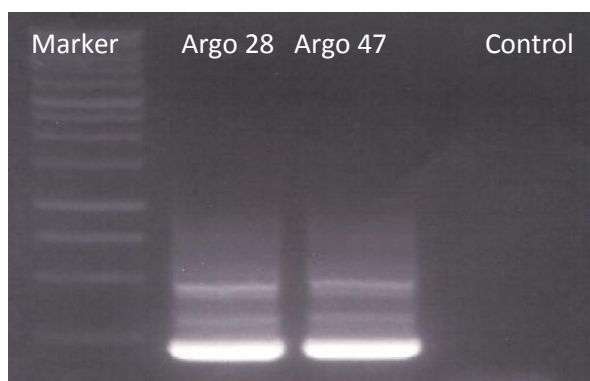
Ολοκλήρωση του άκρου 3':

- Δημιουργία ενός νέου εκκινητή, ειδικού ως προς το νέο αλληλόμορφο που επί της ουσίας ενισχύει μόνο το νέο αλληλόμορφο και όχι το αλληλόμορφο *1001. Αυτό πραγματοποιήθηκε με στοίχιση της νέας αλληλουχίας με την αλληλουχία του *1001 και βρίσκοντας την θέση όπου οι τρεις τελευταίες βάσεις του εκκινητή ήταν μοναδικές ως προς το νέο αλληλόμορφο. Ο εκκινητής αυτός ονομάστηκε *DRBI-462 for* και η αλληλουχία του είναι -CGGGCCGAGGTGGACACGGTG.
- Διεξαγωγή Nested –PCR:
 - Πρώτη φάση: Εκκινητές *DRBI- 455/ DRBI- 201*, με επέκταση στους 55° C για 30 κύκλους.
 - Δεύτερη φάση: Χρήση 2 μl από το προϊόν της PCR της 1ης φάσης και χρήση των εκκινητών *DRBI-462/DRBI-201*. Η επέκταση πραγματοποιήθηκε στους 60° C για 35 κύκλους.

Συνθήκες Αντίδρασης Nested- PCR			
1 ^η φάση <i>DRBI</i> - 455/ <i>DRBI</i> - 201			
ΣΤΑΔΙΟ	ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑ	ΧΡΟΝΟΣ	ΚΥΚΛΟΙ
Προθέρμανση	+105° C	5 min	-
Αποδιάταξη	+94° C	30 sec	30
Υβριδισμός	+55° C	30 sec	
Σύνθεση -α' στάδιο	+72° C	30 sec	
Σύνθεση- β' στάδιο	+72° C	5 min	1
2 ^η φάση			
ΣΤΑΔΙΟ	ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑ	ΧΡΟΝΟΣ	ΚΥΚΛΟΙ
Προθέρμανση	+105° C	5 min	-
Αποδιάταξη	+94° C	30 sec	35
Υβριδισμός	+60° C	30 sec	
Σύνθεση -α' στάδιο	+72° C	30 sec	
Σύνθεση- β' στάδιο	+72° C	5 min	1

Η αντίδραση έλαβε χώρα σε αυτόματη συσκευή θερμοκυκλοποιητή Techne TC-Plus (Bibby Scientific Limited, Stone, UK).

Το αποτέλεσμα της διαδικασίας «Gel clean up» και αλληλούχησης σε πήκτωμα αγαρόζης, για την ειδική προς το νέο αλληλόμορφο «Άργους 28» ενίσχυση του άκρου-3, φαίνεται στην **Εικόνα 2.2**, που επέδειξε επιτυχή ενίσχυση του επιθυμητού τεμαχίου του εξονίου 2.



Εικόνα 2.2. Το αποτέλεσμα της διαδικασίας «Gel clean up» και αλληλούχησης σε πήκτωμα αγαρόζης, για την ειδική προς το νέο αλληλόμορφο «Άργους 28» ενίσχυση του άκρου-3.

- Προς επικύρωση της αλληλουχίας, το τεμάχιο αυτό κλωνοποιήθηκε σε T-vector με σκοπό την αλληλούχησή του.

2.2.5 Κλωνοποίηση τμήματος DNA

Η διαδικασία κλωνοποίησης του εξονίου 2 *Onar-DRBI* πραγματοποιήθηκε σε δύο στάδια:

1. Αντίδραση της λιγάσης (ligation)

Σε αυτό το στάδιο γίνεται ανασυνδυασμός του πλασμιδιακού φορέα με εισαγωγή και ενσωμάτωση του εξονίου 2, ως ένθεμα, στην θέση του πλασμιδίου όπου είναι δυνατή η προσκόλλησή του (cloning site).

2. Μετασηματισμός επιδεικτικών βακτηρίων (transformation)

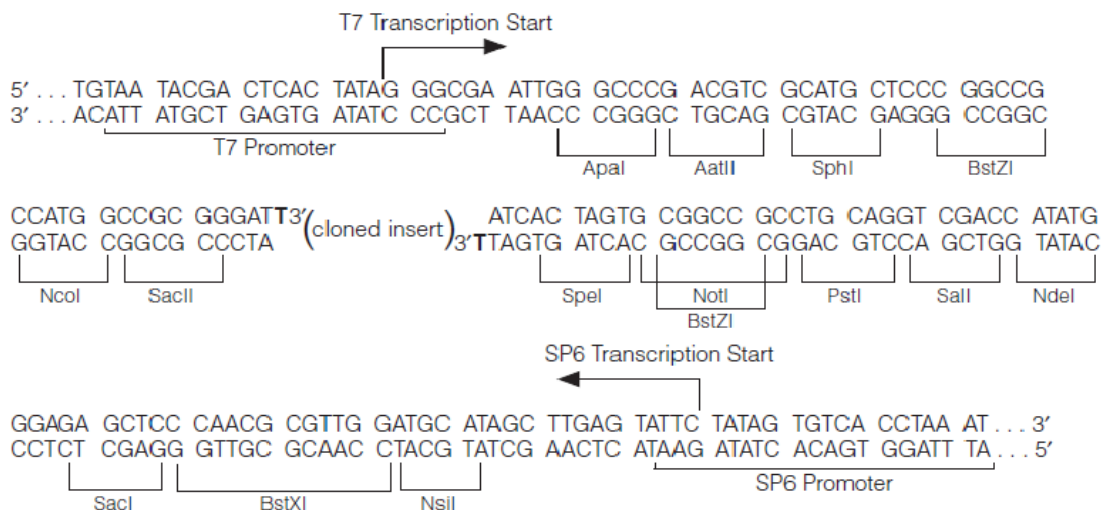
Το στάδιο αυτό περιλαμβάνει την παραγωγή κλώνων του ανασυνδυασμένου πλασμιδίου αφού αυτό εισαχθεί σε μετασηματισμένα επιδεικτικά βακτήρια. Μετά το στάδιο της αντίδρασης της λιγάσης, το απομονωμένο τμήμα DNA που έφερε το τμήμα του εξονίου 2 που είχε ενισχυθεί με τα εκάστοτε ζεύγη εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν, ενσωματώθηκε ως ένθεμα στον πλασμιδιακό φορέα T-vector που παρέχεται μέσω του συσκευασίας αντιδραστηρίων pGEM®-T Easy Vector Systems, της Promega.

Ο συνολικός όγκος της αντίδρασης ανερχόταν σε 10 μl και περιείχε:

DNA	Ένθεμα DNA	1μl
Μείγμα Ligation	Ρυθμιστικό διάλυμα T4 DNA λιγάσης (Ligation Buffer)	5μl
	Πλασμιδιακός φορέας T-Vector	1μl
	T4 DNA Λιγάση	1μl
	Dd H ₂ O	2μl

Το μείγμα Ligation επωάστηκε για μία ώρα σε θερμοκρασία δωματίου. Η επιλογή του πλασμιδιακού φορέα πραγματοποιήθηκε με κριτήριο την παρουσία προεξοχών δεοξυθυμιδίνης στα άκρα 3' (3' T-Overhangs). Η ύπαρξη αυτών των προεξοχών βελτιώνει την αποδοτικότητα της αντίδρασης της λιγάσης, αποτρέποντας συστροφή του πλασμιδιακού φορέα και επιτρέποντας την κλωνοποίηση τμημάτων DNA που

διαθέτουν στα άκρα τους τις αντίστοιχες συμπληρωματικές προεξοχές δεοξυαδενοσίνης (3'- A overhangs) (**Εικόνα 2.3**). Επιπρόσθετα, το πλασμίδιο αυτό διαθέτει ένα γονίδιο-δείκτη (selectable marker) που το καθιστά ανθεκτικό στην αμικικιλίνη. Κατ' αυτόν τον τρόπο, αναπτύσσονται σε καλλιέργεια παρουσία αμικικιλίνης μόνο τα βακτήρια που διαθέτουν το πλασμίδιο αυτό. Πρόσθετο πλεονέκτημα είναι ότι οι μετασχηματισμένες βακτηριακές αποικίες ανιχνεύονται με βάση το χρώμα τους. Αυτό συμβαίνει καθώς ο πλασμιδιακός φορέας κωδικοποιεί μέσω του γονιδίου *lacZ* το ένζυμο β-γαλακτοζιδάση, η οποία παρουσία υποστρώματος γαλακτοπυρανοσίδης (X-Gal) αναπτύσσει κυανές αποικίες. Απενεργοποίηση του α-πεπτιδίου, μέσω εισαγωγής του επιλεγμένου τεμαχίου στον πλασμιδιακό φορέα, επιτρέπει την ανίχνευση των ανασυνδυασμένων πλασμιδίων καθώς αυτά δεν χρωματίζονται κυανά αλλά παρουσιάζονται ως υπόλευκα.



Εικόνα 2.3 Παρουσιάζονται οι προεξοχές δεοξυθυμιδίνης στα άκρα 3' που αποτελούν τις θέσεις εισαγωγής του κλωνοποιημένου ενθέματος στον πλασμιδιακό φορέα. (Από πρωτόκολλο της εταιρείας Promega).

Ο μετασχηματισμός των επιδεκτικών βακτηρίων πραγματοποιήθηκε ως εξής:

- Προετοιμασία LB τρυβλίων με αμικικιλίνη/ IPTG.X-Gal (IPTG: Isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside, X-Gal: 5-bromo-4chloro-3-indolyl-D-galactosidase). Απαιτούνται 2 για κάθε δείγμα, ώστε να χρησιμοποιηθούν διαφορετικές συγκεντρώσεις βακτηρίων και να προσδιοριστεί η

αποδοτικότητα του μετασχηματισμού. Τα τρυβλία πρέπει να βρίσκονται σε θερμοκρασία δωματίου.

- Χρήση αποστειρωμένου θρεπτικού υλικού.
- Επώαση 100 μl κυττάρων με 2μl προϊόντος της αντίδρασης της λιγάσης σε θερμοκρασία δωματίου για περίπου 30 λεπτά.
- Απόψυξη, μέσα σε πάγο των επιδεικτικών βακτηριακών κυττάρων *Escherichia coli*, στελέχους JM 109 (Promega).
- Μεταφορά 50μl κυττάρων σε κάθε προετοιμασμένο erpendorf και ήπια ανακίνηση.
- Τοποθέτηση σε πάγο για 20 λεπτά.
- Τοποθέτηση σε υδατόλουτρο ή heating-block για 45-50 δευτερόλεπτα αυστηρά στους 42° C, χωρίς ανακίνηση.
- Επαναφορά στον πάγο για 2 λεπτά.
- Προσθήκη 950 μl θρεπτικού υλικού χωρίς αμπικιλίνη και ανακίνηση στις 150 rpm, στους 37° C για 1,5 ώρα.
- Επίστρωση δύο τρυβλίων με 150μl και 300μl για κάθε δείγμα.
- Επώαση των καλλιέργειών στους 37° C για 16-24 ώρες. Περαιτέρω επώαση δίνει πιο έντονο κυανό χρώμα, αλλά σε περιπτώσεις οδηγεί σε σχηματισμό «δορυφορικών αποικιών» γύρω από τις σχηματιζόμενες πρώτες αποικίες.
- Επιλογή των λευκών αποικιών στις οποίες εμπεριέχεται το κλωνοποιημένο εξόνιο 2 του *Ovar-DRBI*.

2.2.6 Συλλογή αποικιών και PCR

Για την εύρεση των κλωνοποιημένων αλληλομόρφων στις βακτηριακές καλλιέργειες εφαρμόστηκε PCR με «συλλογή» λευκών βακτηριακών αποικιών (Colony screening PCR). Ο όγκος της αντίδρασης ήταν 25 μl και ουσιαστικά το σύνολό του καταλάμβανε ο όγκος του νερού, της πολυμεράσης και των εκκινητών ενώ ο όγκος της αποικίας θεωρούνταν αμελητέος, καθώς συλλεγόταν με pipette tips και το tip παρέμενε μέσα στο erpendorf με το μείγμα Mastermix για λίγα λεπτά.

Βακτηριακή αποικία		Συλλογή με pipette tips
Μείγμα Mastermix	dd H ₂ O	12,0 μl
	Πρόσθιος εκκινητής 330 ή 462 for (10 pmol/ μl)	0,25 μl
	Αντίστροφος εκκινητής r 329 ή 201 rev (10 pmol/ μl)	0,25 μl

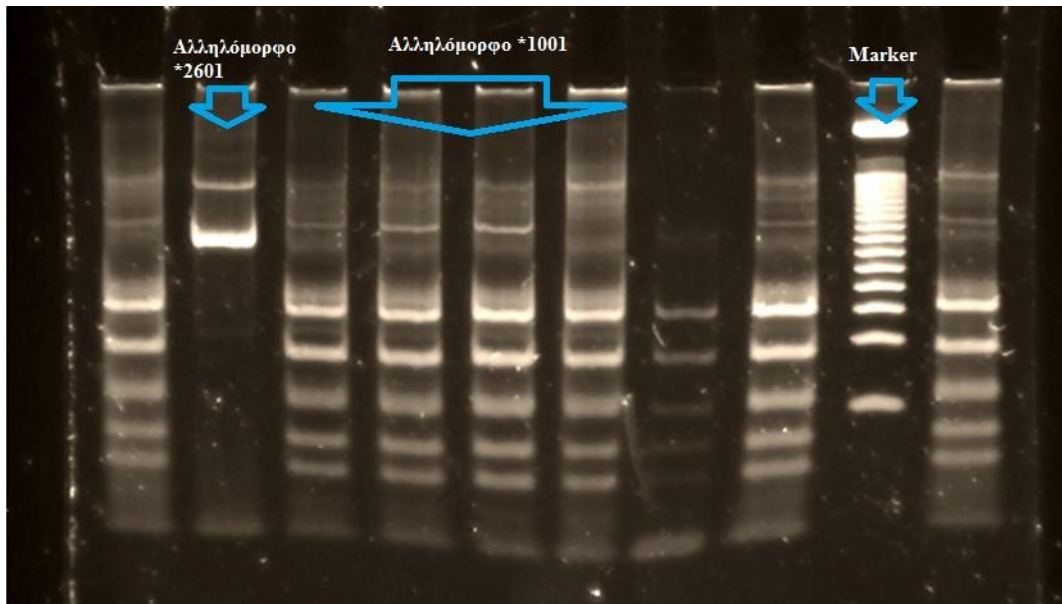
	Go-taq Πολυμεράση (Promega)	12,5 μl
--	--------------------------------	---------

Η αντίδραση έλαβε χώρα σε αυτόματη συσκευή θερμοκυκλοποιητή Techne TC-Plus (Bibby Scientific Limited, Stone, UK), με τις παρακάτω συνθήκες:

Συνθήκες Αντίδρασης PCR			
ΣΤΑΔΙΟ	ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑ	ΧΡΟΝΟΣ	ΚΥΚΛΟΙ
Προθέρμανση	+105° C	5 min	-
Αποδιάταξη	+94° C	30 sec	30
Υβριδισμός	+55° C	30 sec	
Σύνθεση- α' στάδιο	+72° C	30 sec	
Σύνθεση- β' στάδιο	+72° C	5 min	1
Διατήρηση	+4° C	-	-

Την πρώτη φορά που διεξήχθη έλεγχος για εντοπισμό και των δύο αλληλομόρφων που αποτελούσαν τον γονότυπο του ετεροζυγωτού ζώου στις βακτηριακές αποικίες διεξήχθη Colony- Screening PCR σε 15 αποικίες και ακολούθησε ενζυμική πέψη 10 μl των προϊόντων της αντίδρασης. Για τον σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν 10 U ενζύμου περιορισμού RsaI ώστε να βρεθεί από τα πρότυπα πέψης, σε ποιες από τις ληφθείσες αποικίες είναι οι κλώνοι των δύο αλληλομόρφων. Στην συγκεκριμένη περίπτωση το RsaI δεν έτεμνε το νέο αλληλόμορφο *2601, αλλά έτεμνε το *DRBI**1001 σε τρεις θέσεις, καθιστώντας τα εύκολα διαχωρίσιμα (**Εικόνα 1.4**).

Για την εξακρίβωση των παραπάνω η ενζυμική πέψη διενεργήθηκε σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου. Η πολυακρυλαμίδη πολυμερίζεται παρουσία υπερθειϊκού αμμωνίου (ammonium persulfate) με καταλύτη την τετραμεθυλαιθυλαμίνη (TEMED) και έχει μεγαλύτερη ικανότητα διαχωρισμού τεμαχίων DNA, καθώς διαχωρίζει τεμάχια που μπορεί να διαφέρουν μόνο σε ένα νουκλεοτίδιο (Sambrook *et al.*, 1989). Το πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου που χρησιμοποιήθηκε ήταν 5%.



Εικόνα 2.4 Εμφάνιση των θέσεων τομής των 2 αλληλομόρφων του ζώου Άργους 28, μέσω χρήσης του περιοριστικού ενζύμου RsaI, μετά από ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδιου. Το καινούργιο αλληλόμορφο *2601, δεν τέμνεται από το συγκεκριμένο περιοριστικό ένζυμο, καθιστώντας το εύκολα αναγνωρίσιμο, όντας στην εικόνα η 2^η μπάντα. Οι υπόλοιπες μπάντες πέραν του Marker ανήκουν στο αλληλόμορφο *1001.

2.2.7 Απομόνωση πλασμιδίων

Στις μετασχηματισμένες βακτηριακές αποικίες που περιείχαν τους κλώνους του εξονίου 2 του αλληλομόρφου προς αλληλούχηση εφαρμόστηκε η διαδικασία απομόνωσης πλασμιδίων.

Το πρώτο βήμα για την διαδικασία αυτή είναι η επώαση 20 μl υδατικού διαλύματος αποικίας σε 100 μl LB Medium που περιείχε 10 μl αμπικιλίνη. Η καλλιέργεια έπειτα ανακινείται στις 200 rpm για 16-18h στους 37° C. Το στάδιο αυτό είναι σημαντικό για την ανάπτυξη περισσότερων βακτηριακών κυττάρων, ώστε να απομονωθεί επαρκής αριθμός ανασυνδυασμένων πλασμιδίων.

Για την απομόνωση των πλασμιδίων χρησιμοποιήθηκε η τυποποιημένη συσκευασία αντιδραστηρίων Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System της Promega με εφαρμογή των παρακάτω βημάτων:

- 1) Παραγωγή καθαρού διαλύματος:
 - Φυγοκέντρηση 3 μl υγρής καλλιέργειας για 5 λεπτά για συγκέντρωση και καθίζηση των βακτηριών σε μορφή ιζήματος (pellet).

- Λύση του κυτταρικού τοιχώματος των βακτηρίων με την χρήση των διαλυμάτων:
Cell Resuspension Solution, Cell Lysis Solution, Alkaline Protease και Neutralization Solution.
- Ενδιάμεσα πραγματοποιούνται βήματα φυγοκέντρησης ώστε να διαχωριστούν τα πλέον ελεύθερα πλασμίδια από τα υπολείμματα της κυτταρικής λύσης των βακτηρίων.

2) Δέσμευση του πλασμιδιακού DNA σε ειδικό φίλτρο σε στήλη διήθησης.

3) Έκπλυση της στήλης: Με ειδικό διάλυμα έκπλυσης (Wash Solution).

4) Εκχύλιση του πλασμιδιακού DNA.

5) Προσθήκη υπερκαθαρού νερού και συντήρηση των δειγμάτων στους -20°C .

2.3 ΓΟΝΟΤΥΠΗΣΗ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ *DRA*

Στο απομονωμένο γονιδιωματικό DNA των ζώων όπου εντοπίστηκε το νέο αλληλόμορφο *Ovar-DRB1*, διεξήχθη μελέτη και προς το γονίδιο *DRA*.

Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν (Ballingall *et al.*,2010) για την ενίσχυση του επιλεγμένου τμήματος του γονιδίου ήταν οι :

Forward 320: CACCTCAAGACACCAAAGAAG

Reverse 321: CTCTCTAACAAAGTCCGTTACC

Συνθήκες Αντίδρασης PCR			
ΣΤΑΔΙΟ	ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑ	ΧΡΟΝΟΣ	ΚΥΚΛΟΙ
Προθέρμανση	$+105^{\circ}\text{C}$	5 min	-
Αποδιάταξη	$+94^{\circ}\text{C}$	30 sec	35
Υβριδισμός	$+55^{\circ}\text{C}$	30 sec	
Σύνθεση -α' στάδιο	$+72^{\circ}\text{C}$	30 sec	
Σύνθεση- β' στάδιο	$+72^{\circ}\text{C}$	5 min	1

Τα ζώα βρέθηκαν ετεροζυγωτά και γονοτυπήθηκαν τα αλληλόμορφα *Ovar-DRA*0101* και *Ovar-DRA*0102*.

2.4 ΠΑΡΑΣΙΤΟΛΟΓΙΚΕΣ ΑΝΑΛΥΣΕΙΣ

Για την μελέτη αυτή πραγματοποιήθηκε κοπρανολογική καταμέτρηση των αναπαραγωγικών στοιχείων των γαστρεντερικών παρασίτων με εφαρμογή της μεθόδου McMaster καθώς και προσδιορισμός των επιπέδων του πεψινογόνου στο πλάσμα του αίματος με την μέθοδο Hirschowitz (1955), με εφαρμογή των τροποποιήσεων κατά Korot'ko and Islyamova (1963).

2.3.1 Καταμέτρηση αναπαραγωγικών στοιχείων των παρασίτων στα κόπρανα

Η κοπρανολογική καταμέτρηση των αναπαραγωγικών στοιχείων (Faecal Egg Counting- FEC) που αφορά τα αυγά, τις προνύμφες, τις ωοκύστες, τις προγλωττίδες κ.α. των παρασίτων, είναι ποσοτική μέθοδος που εφαρμόζεται για την καταμέτρηση αυγών γαστρεντερικών παρασίτων. Η καταμέτρηση διεξήχθη με την ποσοτική παρασιτολογική μέθοδο McMaster.

Στην παρούσα μελέτη καταμετρήθηκαν τα αυγά των παρασίτων που ανήκουν στην ταξινομική κλάση των Trichostrongyloidea, ενώ καταμετρήθηκαν και ταυτοποιήθηκαν και τα αυγά των ειδών *Nematodirus* spp. και *Strongyloides* spp., καθώς και των ωοκύστεων των κοκκιδίων (*Eimeria* spp.).

Ως μονάδα μέτρησης λαμβάνεται ο αριθμός αυγών ανά γραμμάριο κοπράνων (Eggs Per Fram/ EPG) που χαρακτηρίζει μια τιμή FEC. Οι τιμές FEC αποτελούν ένδειξη του παρασιτικού φορτίου των ζώων.

2.3.1.1 Μέθοδος McMaster

- Λήψη δείγματος κοπράνων

Το δείγμα λαμβάνεται με γάντι μιας χρήσεως από το απευθυσμένο του προβάτου και αφαιρείται με αναστροφή ώστε να διατηρηθεί το δείγμα για περαιτέρω χρήση. Τα δείγματα που λαμβάνονται δύνανται να εξεταστούν εντός 3 ημερών. Στο διάστημα αυτό φυλάσσονται στους +4° C.

- Μέθοδος

Από το κάθε δείγμα ζυγίζεται και τοποθετείται σε ποτήρι μιας χρήσεως 1 g κοπράνων. Στο κάθε ποτήρι με κόπρανα προστίθενται 30 ml ζαχαρούχου διαλύματος με ειδικό βάρος 1,2 και πραγματοποιείται καλή ανάμειξη.

Το ζαχαρούχο διάλυμα που χρησιμοποιείται παρασκευάζεται με χρήση 1300 g κοινής ζάχαρης, 1000 ml υπερκαθαρού νερού και 20 ml φορμαλδεύδης. Το διάλυμα αναμειγνύεται σε μαγνητικό αναδευτήρα με θέρμανση έως να γίνει διαυγές. Η υψηλή θέρμανση οδηγεί σε σκοτεινότερο χρωματισμό του διαλύματος, χαρακτηριστικό μη επιθυμητό. Το διάλυμα, πριν την χρήση του μετράται ως προς την πυκνότητά του (απαιτούμενη πυκνότητα 1,100-1,200), με πυκνόμετρο.

Αφού διαλυθούν τα τεμάχια κοπράνων, το διάλυμα μεταφέρεται με πιπέττες Pasteur σε πλακίδιο McMaster με δύο θαλάμους και μετά από 5 λεπτά, χρόνος που απαιτείται για την άνοδο των αυγών στην επιφάνεια του πλακιδίου, τα αυγά καταμετρώνται σε οπτικό μικροσκόπιο με μεγέθυνση 10x. Τα αυγά ανέρχονται στην επιφάνεια λόγω του χαμηλότερου ειδικού τους βάρους σε σχέση με το ζαχαρούχο διάλυμα. Καθυστέρηση μπορεί να οδηγήσει σε καταστροφή των αυγών λόγω ώσμωσης και να ληφθούν λάθος μετρήσεις.

Το χρησιμοποιούμενο πλακίδιο McMaster αποτελείται από δύο αντικειμενοφόρες πλάκες μεταξύ των οποίων σχηματίζονται δύο θάλαμοι ύψους 0,15 cm. Στην πάνω πλευρά του πλακιδίου είναι χαραγμένα δύο τετράγωνα με πλευρά μήκους 1 cm. Το διάλυμα των κοπράνων γεμίζει τους θαλάμους αλλά η εξεταζόμενη περιοχή είναι μόνο αυτή η οποία καλύπτεται από τα τετράγωνα. Για τον υπολογισμό του αριθμού αυγών ανά γραμμάριο κοπράνων χρησιμοποιείται ο τύπος $EPG = (\text{Αριθμός αυγών } 1^{\text{ου}} \text{ θαλάμου} + \text{αριθμός αυγών } 2^{\text{ου}} \text{ θαλάμου}) * 100$.

2.3.1.2 Προσδιορισμός επιπέδων πεψινογόνου στο πλάσμα του αίματος

Η διακύμανση των τιμών του πεψινογόνου στο πλάσμα του αίματος των μηρυκαστικών έχει διαγνωστική σημασία καθώς αποτελεί μέτρο προσδιορισμού της βλάβης του γαστρεντερικού βλεννογόνου λόγω αλλοιώσεων από τα γαστρεντερικά παράσιτα.

Ο μηχανισμός με τον οποίο το πεψινογόνο φτάνει στο αίμα είναι ο εξής:

Οι προνύμφες που εγκαθίστανται στον αυλό των γαστρεντερικών αδένων προκαλούν φλεγμονή του βλεννογόνου του ηνύστρου, καθώς καταστρέφονται και καλυπτήρια κύτταρα που έχουν ως σκοπό την παραγωγή HCl. Κατά αυτόν τον

τρόπο, το επιθήλιο νεκρώνεται και τα κύτταρα αντικαθίστανται από αδιαφοροποίητα κύτταρα με υψηλό ρυθμό αναπαραγωγής που αντί για HCl παράγουν βλέννη. Συνέπεια της μειωμένης παραγωγής HCl είναι η αύξηση του pH του ηνύστρου από 2,0, σε τιμές έως και άνω των 5,0 και η μη μετατροπή του πεψινογόνου σε πεψίνη.

Το πεψινογόνο, που παράγεται από τα ζυμογόνα κύτταρα των γαστρικών αδένων, είναι ανενεργός πρόδρομος της πεψίνης, η οποία με την σειρά της λειτουργεί ως πεπτιδάση καταλύοντας πεπτιδικούς δεσμούς που σχηματίζονται από τα αρωματικά αμινοξέα (τυροσίνη, τρυπτοφάνη, φαινυλαλανίνη) των πρωτεϊνών των τροφίμων. Η έλλειψη επαρκούς ποσότητας HCl δεν επιτρέπει την μετατροπή του πεψινογόνου σε πεψίνη, αλλά λόγω αύξησης της διαπερατότητας του ηνύστρου, το πεψινογόνο εισέρχεται στην κυκλοφορία του αίματος. Η φυσιολογική τιμή του πεψινογόνου στο πλάσμα του αίματος των προβάτων είναι μικρότερη των 375 ml.U. τυροσίνης.

Η συγκέντρωση πεψινογόνου στο πλάσμα είναι ανάλογη του παρασιτικού φορτίου που αφορά το σύνολο των μολυσματικών προνυμφών που προσβάλλουν τα ζώα κατά την βοσκή. Η αύξηση της συγκέντρωσης του πεψινογόνου στο πλάσμα, αν και υποδηλώνει βλάβη του γαστρικού βλεννογόνου, δεν υποδηλώνει απαραίτητα την παρουσία παρασίτων, καθώς αυξημένη τιμή πεψινογόνου στο πλάσμα μπορεί να οφείλεται σε ένα σύνολο γαστρικών ανωμαλιών ή σε συνδυαστικά προβλήματα.

Για την μέτρηση της συγκέντρωσης του πεψινογόνου στο πλάσμα του αίματος κάθε ζώου χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος Hirschowitz (1955) με προσαρμογή της κατά τους Korot'ko and Islyamova (1963).

Μέθοδος

Συλλογή πλάσματος από το αίμα

- Φυγοκέντρηση των δειγμάτων στις 3000 rpm για 30 min.
- Συλλογή του υπερκείμενου πλάσματος με πιπέττα Pasteur και συντήρησή του σε erpendorf των 5 ml, στους -20° C.

Παρασκευή αντιδραστηρίων

Για την πειραματική διαδικασία παρασκευάστηκαν:

- TCA (Τριχλωρικό οξύ) 10%, με προσθήκη 50 g TCA σε 500 ml υπερκαθαρού νερού.
- HCl (0,06 N), με προσθήκη 3 ml πυκνού HCl σε 500 ml υπερκαθαρού νερού.
- NaOH (0,05 N), με προσθήκη 10 g NaOH σε 500 ml υπερκαθαρού νερού.

Παρασκευάστηκε επίσης και απόθεμα τυροσίνης καθώς και 6 πρότυπα τυροσίνης, διαφορετικών συγκεντρώσεων και διάλυμα χρώσης Folin-ciocalteau, σύμφωνα με την παρακάτω μεθοδολογία.

Παρασκευή τυροσίνης (2 mg/ml) με προσθήκη 1 g τυροσίνης σε 500 ml 0,06 N HCl, που συντηρείται έως και 6 μήνες στους -20° C.

Παρασκευή 6 προτύπων τυροσίνης (Standards, STD) με διαφορετικές συγκεντρώσεις:

Πρότυπα Τυροσίνης	Παρασκευή		Συνολικός όγκος
STD 100 (100 mg/ml)	1 ml αποθέματος τυροσίνης	19 ml dd H ₂ O	20 ml STD 100
STD 75 (75 mg/ ml)	7,5 ml STD 100	2,5 ml dd H ₂ O	10 ml STD 75
STD 50 (50 mg/ ml)	5 ml STD 100	5 ml dd H ₂ O	10 ml STD 50
STD 25 (25 mg/ ml)	5 ml STD 50	5 ml dd H ₂ O	10 ml STD 25
STD 10 (10 mg/ ml)	5 ml STD 25	7,5 ml dd H ₂ O	12,5 ml STD 10
STD 5 (5 mg/ ml)	5 ml STD 10	5 ml dd H ₂ O	10 ml STD 5

Παρασκευή υδατικού διαλύματος χρώσης Folin-ciocalteau. Το διάλυμα παρασκευάζεται άμεσα, πριν την χρήση του, με αραιώση 1:1 με δισαπενταγμένο νερό. Το διάλυμα χωρίζεται για κάθε εξέταση σε 0,5 ml ανά σωληνάριο.

Για τα περίπου 100 δείγματα προς εξέταση απαιτήθηκαν 100*0,5 ml= 50 ml διαλύματος χρώσης. Για το πείραμα χρειάστηκαν και 6 σωληνάρια με πρότυπα τυροσίνης (STDs), χρησιμοποιώντας 6* 0,5 ml =3 ml διαλύματος. Επίσης, χρησιμοποιείται ένα σωληνάριο με το δείγμα του μάρτυρα (Control) συν ένα σωληνάριο με το τυφλό δείγμα (blank), για τα οποία απαιτήθηκαν 0,5 ml +0,5 ml = 1 ml διαλύματος. Συνολικά απαιτήθηκαν 53 ml διαλύματος χρώσης Folin-ciocalteau.

Μέτρηση επιπέδων πεψινογόνου στο πλάσμα του αίματος

1. Λήψη 0,5 ml από κάθε δείγμα και τοποθέτηση σε Falcon .
2. Παρασκευή μάρτυρα. Από κάθε δείγμα λήφθηκε 0,5 ml πλάσματος, που αναμείχθηκαν συνολικά σε ένα Falcon. Από αυτό το μείγμα, λήφθηκε πάλι 0,5 ml που επανατοποθετήθηκε σε καινούργιο Falcon, με την ένδειξη «μάρτυρας».
3. Προσθήκη 2 ml TCA 10% στο σωληνάριο του μάρτυρα και ανάδευση με μέγιστη ταχύτητα, ώστε το ίζημα να κατακαθίσει στον πυθμένα.
4. Προσθήκη 2,5 ml HCl 0,06 N σε όλα τα δείγματα πλάσματος αλλά και στον μάρτυρα και επώαση στους +37° C για 3 h.
5. Προσθήκη 2 ml TCA 10% σε όλα τα δείγματα εκτός του μάρτυρα, που ήδη περιέχει TCA, ανάμειξη και παραμονή στον πάγκο για 10 min.
6. Φυγοκέντρηση όλων των δειγμάτων, και του μάρτυρα, για 10 λεπτά στις 3000 rpm.
7. Τοποθέτηση 1 ml υπερκείμενου υγρού, από κάθε δείγμα, συμπεριλαμβανομένου και του μάρτυρα, σε καθαρά σωληνάκια με αναγραφόμενη την ένδειξή τους.
8. Προσθήκη 2 ml NaOH 0,5 N, σε κάθε σωληνάριο με το υπερκείμενο υγρό.
9. Προσθήκη 0,5 ml Folin-ciocalteau και ανάδευση.
10. Παρασκευή 6 σωληναρίων με την ένδειξη STANDARD , όπου το κάθε ένα περιείχε 1 ml τιτλοποιημένου διαλύματος τυροσίνης με συγκέντρωση 5, 10, 25, 50 , 75 και 100 µg/ ml αντίστοιχα.
11. Παρασκευή σωληναρίου με την ένδειξη «BLANK» που περιείχε 1 ml δισαπεσταγμένο νερό.
12. Στα Falcon με τις ενδείξεις STANDARD, και BLANK προστέθηκαν 2 ml NaOH 0,5 N και 0,5 ml Folin-ciocalteau, όπως προηγουμένως.
13. Μέτρηση της οπτικής πυκνότητας στα 560 nm του STANDARD, των προτύπων, του μάρτυρα και του περιεχομένου των Falcon.
14. Υπολογισμός της περιεκτικότητας των δειγμάτων σε πεψινογόνο, που δίνεται ως τιμή mI.U. τυροσίνης. Ο υπολογισμός έγινε μετά από γραμμική παλινδρόμηση της οπτικής πυκνότητας (O.D.) των δειγμάτων

με αυτή του BLANK και των προτύπων, αφού αφαιρέθηκε η οπτική πυκνότητα του μάρτυρα.

Η περιεκτικότητα του πλάσματος των δειγμάτων αίματος σε πεψινογόνο δίδεται ως I.U. tyrosine από τον τύπο:

$$\bullet \text{ I.U.} = (\text{mcg tyr.}) (1000 \text{ ml/1 lit}) (1/180 \text{ min.}) (1/0.2) (1/181.2) \Rightarrow \text{I.U.} = (\text{mcg tyr.}) \times 0,153299 \Rightarrow \text{I.U.} = \mu\text{moles tyr./min./l plasma}$$

Και:

$\text{mcg tyr. δείγματος (x)} = (y - \beta) / \alpha = ((\text{O.D. δείγματος} - \text{O.D. Control}) - \beta) / \alpha$
όπου x ανεξάρτητη μεταβλητή, y, εξαρτημένη μεταβλητή,
y= O.D. των προτύπων, $y = ax + \beta$, με α, β να δίνονται από την ευθεία της γραμμικής παλινδρόμησης.

2.4 ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ

Οι συχνότητες των αλληλομόρφων του γονιδίου *Ovar-DRBI* εκτιμήθηκαν με την χρήση του προγράμματος GENEPOP (Raymond and Rousset 1995, Rousset 2008). Με το ίδιο πρόγραμμα υπολογίστηκε και η αναμενόμενη και παρατηρηθείσα συχνότητα των ομοζυγωτών και ετεροζυγωτών ατόμων.

Ο έλεγχος για την εύρεση στατιστικά σημαντικών διαφορών σε επίπεδο συσχέτισης γονιδίων ή αλληλομόρφων με τα παρασιτολογικά χαρακτηριστικά, έγινε με την χρήση του υπολογιστικού προγράμματος StatGraphics (Centurion XV, 2014) και με το στατιστικό πρόγραμμα SPSS (Statistical Package for Social Sciences, SPSS Inc., Chicago, IL.) Επειδή τα περισσότερα δείγματα δεν ακολουθούσαν την κανονική κατανομή, χρησιμοποιήθηκαν οι μη παραμετρικοί έλεγχοι Kruskal- Wallis στην περίπτωση που υπήρχαν τρία επίπεδα μελέτης κάποιου χαρακτηριστικού ή ομαδοποίηση σε πάνω από 2 κατηγορίες, ενώ για δεδομένα που ομαδοποιούνταν έως και σε δύο κατηγορίες, πραγματοποιήθηκε ο έλεγχος Mann-Whitney. Σε κάποιες περιπτώσεις όπου τα δείγματα δεν ακολουθούν κανονική κατανομή, το καταλληλότερο στατιστικό μέτρο κεντρικής θέσης κρίθηκε δε ότι είναι οι διάμεσοι.

Ο έλεγχος της πιθανής συσχέτισης των γονότυπων με το είδος του παρασίτου, πραγματοποιήθηκε αρχικά με έναν χ^2 έλεγχο ανεξαρτησίας Pearson και στη συνέχεια, επειδή υπήρχαν πολλές περιπτώσεις με αριθμό παρατηρήσεων μικρότερο του 5, προτιμήθηκε ο έλεγχος προσομοίωσης Monte-Carlo.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΓΟΝΟΤΥΠΗΣΗΣ ΤΟΥ ΕΞΟΝΙΟΥ 2 ΤΟΥ *Ovar-DRB1*

Ταυτοποιήθηκαν συνολικά 24 αλληλόμορφα, 23 εκ των οποίων ήταν ήδη γνωστά και καταχωρημένα στην Βάση Δεδομένων Ανοσοπολυμορφισμού για το *Ovar-MHC*, ενώ μόνο ένα προέκυψε ως νέο αλληλόμορφο για την φυλή Άργους. Στον Πίνακα 3.1 παρουσιάζονται οι γονιδιακές συχνότητες των αλληλομόρφων *Ovar-DRB1* στις δύο φυλές.

Στην φυλή Άργους, από δείγμα 30 ατόμων, ταυτοποιήθηκαν 17 αλληλόμορφα και στην Κοκοβίτικη φυλή, από δείγμα 26 ατόμων, ταυτοποιήθηκαν ομοίως 17 αλληλόμορφα. Τα αλληλόμορφα καθώς και η συχνότητά τους παρατίθενται στον Πίνακα 3.1.

Αλληλόμορφο	Συχνότητα		Αλληλόμορφο	Συχνότητα	
	Άργους	Κοκοβίτικη		Άργους	Κοκοβίτικη
*0105	0,1	0,019	*1003	0,016	0,019
*0201	0,033	-	*1004	0,05	-
*0311	0,033	-	*1005	0,016	-
*0312	0,033	0,096	*1008	0,016	0,019
*0401	-	0,019	*1301	0,016	0,052
*0402	-	0,019	*1303	0,033	-
*0702	0,016	0,096	*1501	-	0,019
*0801	-	0,019	*1604	-	0,057
*0806	0,2	0,19	*1606	0,15	0,057
*0901	0,016	0,057	*2003	-	0,076
*1001	0,2	0,13	*2101	-	0,057
*1002	0,016	-	*2601	0,033	-

Τα αλληλόμορφα *0201, *0311, *1002, *1004, *1005, *1303, *2601 ήταν χαρακτηριστικά για την φυλή Άργους και δεν ανιχνεύθηκαν στα Κοκοβίτικα πρόβατα. Το αλληλόμορφο *2601, που βρέθηκε σε 2 ζώα της φυλής Άργους, ήταν καινούργιο και αναφέρεται για πρώτη φορά στη βιβλιογραφία, αφού βρέθηκε η συνολική αλληλουχία του εξονίου 2 και καταχωρήθηκε στην Βάση Δεδομένων Ανοσοπολυμορφισμού. Με μεγαλύτερη συχνότητα εμφάνισης για την φυλή αυτή και με φθίνουσα σειρά ανιχνεύθηκαν τα αλληλόμορφα : *0806, *1001, *1606 και *0105 με συχνότητες 0,20, 0,20, 0,15 και 0,10 αντίστοιχα. Η αθροιστική τους συχνότητα ήταν 0,65.

Αντίστοιχα τα αλληλόμορφα *0401, *0402, *0801, *1501, *1604, *2003, *2101 ανιχνεύθηκαν μόνο στην Κοκοβίτικη φυλή. Στην φυλή αυτή τα αλληλόμορφα με την μεγαλύτερη συχνότητα εμφάνισης ήταν ομοίως το *0806 και *1001 με συχνότητες 0,19 και 0,13 αντίστοιχα, ενώ με ελαφρώς μικρότερη συχνότητα (0,096) ανιχνεύθηκαν και τα αλληλόμορφα *0312 και *0702. Η αθροιστική συχνότητα των παραπάνω αλληλομόρφων ήταν ίση με 0,512.

Τη μεγαλύτερη συχνότητα εμφάνισης και στις δύο φυλές, με φθίνουσα σειρά, είχαν τα αλληλόμορφα: *0806, *1001 και *1606 με συχνότητες 0,196, 0,169 και 0,107 αντίστοιχα. Η συνολική αθροιστική τους συχνότητα ήταν ίση με 0,472.

3.1.2 Γονοτυπικές συχνότητες

Σε συνολικό δείγμα 56 ατόμων ταυτοποιήθηκαν 36 διαφορετικοί γονότυποι. Στην Κοκοβίτικη φυλή ταυτοποιήθηκαν 19 (**Πίνακας 3.3**) και στην φυλή Άργους 23 (**Πίνακας 3.2**). Οι κοινοί γονότυποι ήταν πέντε και ήταν οι εξής: *0806-*0806, *1001-*1001, *0105-*1606, *0702-*0806 και *0806-*1301. Ανιχνεύθηκαν 3 ομοζυγωτοί τύποι στο σύνολό τους: *0311-*0311, *0806-*0806 και *1001-*1001. Στην φυλή Άργους βρέθηκαν και οι τρεις, ενώ στην Κοκοβίτικη βρέθηκαν οι γονότυποι *0806-*0806 και *1001-*1001. Και στους δύο πληθυσμούς το πλήθος των γονοτύπων είναι ιδιαίτερα μεγάλο και αντιπροσωπεύεται με μικρή συχνότητα.

Την μεγαλύτερη συχνότητα κατά φθίνουσα σειρά, για το σύνολο των ζώων είχαν οι γονότυποι: *0806-*1001 (4 φορές), *0806-*0806 (3 φορές), *0806-*1606 (3 φορές), *1001-*1001 (3 φορές) και *1001-*2003 (3 φορές).

Πίνακας 3.2: Γονοτυπικές συχνότητες (Π: Παρατηρηθέντες γονότυποι, Α: Θεωρητικά αναμενόμενοι) στη φυλή Άργους		
Γονότυπος	Π	Α
*0105-*1001	1	1,1069
*0105-*1002	1	0,1695
*0105-*1606	2	0,7627
*0105-*2601	1	0,1695
*0201-*0806	1	0,4068
*0201-*1004	1	0,1356
*0311-*0311	1	0,0169
*0312-*1008	1	0,0339
*0312-*1604	1	0,0678
*0702-*0806	1	0,2034
*0806-*1301	1	0,2034
*0806-*0806	1	1,1186
*0806-*1001	4	2,4407
*0806-*1606	3	1,8305
*0901-*1001	1	0,2034
*1001-*1001	1	1,1186
*1001-*1604	1	0,4068
*1001-*1606	2	1,8305
*1001-*2601	1	0,4068
*1003-*1606	1	0,1278
*1004-*1005	1	0,0678
*1004-*1303	1	0,1356
*1004-*1606	1	0,6102

Πίνακας 3.3: Γονοτυπικές συχνότητες (Π: Παρατηρηθέντες γονότυποι, Α: Θεωρητικά αναμενόμενοι) στην Κοκοβίτικη φυλή		
Γονότυπος	Π	Α
*0105-*1606	1	0,1176
*0312-*0702	2	0,4902
*0312-*0806	1	0,4068
*0312-*0901	1	0,2941
*0312-*2003	1	0,3922
*0401-*1003	1	0,1960
*0402-*0801	1	0,0196
*0702-*0806	2	0,9804
*0702-*0901	1	0,2941
*0806-*0806	2	0,8824
*0806-*1301	1	0,3922

*0806-*1604	2	0,0588
*0901-*1606	1	0,1765
*1001-*1001	2	0,2941
*1001-*2003	3	0,4706
*1008-*1604	1	0,0588
*1301-*2101	1	0,4068
*1501-*2101	1	0,1176
*1606-*2101	1	0,1765

3.1.3 Συχνότητα ομοζυγωτίας

Από τα 56 πρόβατα που γονοτυπήθηκαν, μόνο 7 βρέθηκαν ομοζυγωτά, 4 για την Κοκοβίτικη φυλή και 3 για την φυλή Άργους. Η παρατηρηθείσα συχνότητα ομοζυγωτίας είναι για την φυλή Άργους $p_{\phi}=3/30=0,100\pm 0,039$ και για την Κοκοβίτικη φυλή $4/27=0,148\pm 0,049$. Οι αντίστοιχες τιμές για την παρατηρηθείσα ετεροζυγωτία ήταν ίσες με 0,900 και 0,852 στις φυλές Άργους και Κοκοβίτικη. Οι τιμές αυτές δεν διέφεραν στατιστικά ($z=0,548$, $P>0,05$).

Τα υψηλά ποσοστά ετεροζυγωτίας δικαιολογούνται από το γεγονός ότι ο γονιδιακός τύπος *Ovar-DRB1* παρουσιάζει την μεγαλύτερη παραλλακτικότητα μεταξύ όλων των γονιδίων του *Ovar-MHC* (Andersson and Rask, 1988).

3.2 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΠΑΡΑΣΙΤΟΛΟΓΙΚΟΥ ΕΛΕΓΧΟΥ

3.2.1 Αναπαραγωγικά στοιχεία γαστρεντερικών παρασίτων στα κόπρανα

Εξετάστηκαν κόπρανα από 50 ζώα της φυλής Άργους και 41 Κοκοβίτικα πρόβατα για την ανεύρεση αναπαραγωγικών στοιχείων γαστρεντερικών παρασίτων. Στο σύνολο των 91 ζώων βρέθηκαν θετικά σε παράσιτα 83 ζώα (91,2 %), για την φυλή Άργους το ποσοστό των θετικών ζώων ήταν 92,0% και για την Κοκοβίτικη φυλή 90,2%. Παρακάτω απεικονίζονται τα αναπαραγωγικά στοιχεία των γαστρεντερικών παρασίτων που βρέθηκαν στα κόπρανα των προβάτων και των 2 φυλών.



Εικόνα 3.1 Αναπαραγωγικά στοιχεία παρασίτων που ανιχνεύθηκαν στα δείγματα κοπράνων των προβάτων.

Στα κόπρανα των προβάτων της φυλής Άργους βρέθηκαν:

- **Ωοκύστες πρωτοζώου του είδους *Eimeria* spp (Coccidia)**
μεγέθους 20-25 μm x 20 μm.
- **Αυγά νηματωδών (Nematoda)**
Στρογγυλοειδή αυγά (Strongyle- type eggs, Strongyles)

Ως στρογγυλοειδή κατατάσσονται τα αυγά μεγέθους περίπου 80 μm, των ειδών νηματωδών *Trichostrongylus* spp., *Haemonchus* spp., *Teladorsagia* spp, *Bunostomum* spp., *Oesophagostomum* spp., *Cooperia* spp. και *Chabertia* spp.

- **Αυγά του *Strongyloides papillosus***
Μεγέθους 47-65 μm.

Στα κόπρανα των προβάτων της Κοκοβίτικης φυλής εντοπίστηκαν:

- **Ωοκύστες πρωτοζώου του είδους *Eimeria* spp (Coccidia)**
μεγέθους 20-25 μm x 20 μm.
- **Αυγά του κεστώδους πλατυέλμινθα *Moniezia expansa* (Cestoda)**
μεγέθους 50-60 μm.

- **Αυγά νηματωδών (Nematoda)**

Στρογγυλοειδή αυγά (Strongyle- type eggs, Strongyles)

Ως στρογγυλοειδή κατατάσσονται τα αυγά μεγέθους περίπου 80 μm, των ειδών νηματωδών *Trichostrongylus* spp., *Haemonchus* spp., *Teladorsagia* spp, *Bunostomum* spp., *Oesophagostomum* spp., *Cooperia* spp. και *Chabertia* spp.

Αυγά του *Strongyloides papillosus*

Μεγέθους 47-65 μm.

Αυγά του *Nematodirus filicollis*

μεγέθους 150 μm x 75 μm.

Τα παραπάνω παράσιτα συγκεντρωτικά απεικονίζονται στην **Εικόνα 3.1** που λήφθηκε κατά τις κοπρανολογικές αναλύσεις.

Στον Πίνακα 3.4 συγκεντρώνονται τα είδη των παρασίτων και ο αριθμός των ζώων στα κόπρανα των οποίων βρέθηκε το κάθε είδος.

Πίνακας 3.4: Αριθμός Προβάτων με αναπαραγωγικά στοιχεία παρασίτων		
	Άργους	Κοκοβίτικα
Μεμονωμένα είδη αναπαραγωγικών στοιχείων	Αριθμός ζώων	
Ωοκύστες <i>Eimeria</i> spp	22	29
Στρογγυλοειδή αυγά	41	15
Αυγά <i>Strongyloides papillosus</i>	25	1
Αυγά <i>Moniezia expansa</i>	-	4
Αυγά <i>Nematodirus filicollis</i>	-	3
Μεικτά είδη αναπαραγωγικών στοιχείων	Αριθμός ζώων	
Ωοκύστες <i>Eimeria</i> spp, Στρογγυλοειδή αυγά	7	4
Στρογγυλοειδή αυγά, Αυγά <i>Strongyloides papillosus</i>	11	-
Ωοκύστες <i>Eimeria</i> spp, Αυγά <i>Moniezia expansa</i>	-	1
Στρογγυλοειδή αυγά, Αυγά <i>Moniezia expansa</i>	-	2
Ωοκύστες <i>Eimeria</i> spp, Στρογγυλοειδή αυγά, Αυγά <i>Strongyloides papillosus</i>	12	1
Ωοκύστες <i>Eimeria</i> spp, Στρογγυλοειδή αυγά, Αυγά <i>Nematodirus filicollis</i>	-	2
Ωοκύστες <i>Eimeria</i> spp, Στρογγυλοειδή αυγά, Αυγά <i>Nematodirus filicollis</i> , Αυγά <i>Moniezia expansa</i>	-	1

Στην φυλή Άργους τα περισσότερα ζώα ήταν προσβεβλημένα από αυγά στρογγυλοειδών παρασίτων, σε ποσοστό 82 % και δευτερευόντως από αυγά *Strongyloides papillosus*, σε ποσοστό 50 %. Στην Κοκοβίτικη φυλή οι ωοκύστες του *Eimeria* spp ήταν αυτές που ανιχνεύθηκαν σε μεγαλύτερο ποσοστό (70,7 %) ενώ αναπαραγωγικά στοιχεία των παρασίτων *Moniezia expansa* και *Nematodirus filicollis* ήταν αποκλειστικά για την φυλή αυτή.

Στην φυλή Άργους βρέθηκε ο μεγαλύτερος αριθμός συνδυαστικής προσβολής από παράσιτα, σε ποσοστό 60 % σε σύγκριση με την Κοκοβίτικη φυλή που το ποσοστό ήταν 26,8 %. Ο πιο συχνός συνδυασμός αναπαραγωγικών στοιχείων ήταν η συνύπαρξη ωοκυστών *Eimeria* spp, στρογγυλοειδών αυγών και αυγών *Strongyloides papillosus* σε ποσοστό 14,28 % επί του συνόλου των εξεταζόμενων ζώων.

3.2.2 Αριθμός αναπαραγωγικών στοιχείων παρασίτων (Τιμές FEC)

Στους Πίνακες 3.5.1 και 3.5.2 αναφέρονται ο αριθμός των Αργίτικων και Κοκοβίτικων προβάτων στα οποία ανιχνεύτηκαν αναπαραγωγικά στοιχεία γαστρεντερικών παρασίτων, τα είδη των αναπαραγωγικών στοιχείων και οι αντίστοιχες τιμές FEC εκφραζόμενες σε EPG.

Πίνακας 3.5.1: Αναπαραγωγικά στοιχεία παρασίτων και τιμές FEC (EPG) στην φυλή Άργους					
Ζώα	Είδη αναπαραγωγικών στοιχείων παρασίτων	EPG	Ζώα	Είδη αναπαραγωγικών στοιχείων παρασίτων	EPG
1	<i>Eimeria</i> spp	100	1	<i>Eimeria</i> spp+ Στρογγυλοειδή αυγά+ <i>Strongyloides papillosus</i>	900
5	Στρογγυλοειδή αυγά		2	<i>Eimeria</i> spp+ Στρογγυλοειδή αυγά	1000
2	<i>Strongyloides papillosus</i>		1	<i>Eimeria</i> spp+ Στρογγυλοειδή αυγά	1100
1	Στρογγυλοειδή αυγά+ <i>Strongyloides papillosus</i>	200	1	<i>Eimeria</i> spp+ Στρογγυλοειδή αυγά	1300
1	Στρογγυλοειδή αυγά+ <i>Strongyloides papillosus</i>	300	1	<i>Eimeria</i> spp+ Στρογγυλοειδή αυγά+ <i>Strongyloides papillosus</i>	
3	<i>Eimeria</i> spp+ Στρογγυλοειδή αυγά		1	<i>Eimeria</i> spp+ Στρογγυλοειδή αυγά	1400
1	<i>Eimeria</i> spp+ Στρογγυλοειδή αυγά+ <i>Strongyloides papillosus</i>		2	Στρογγυλοειδή αυγά+ <i>Strongyloides papillosus</i>	
1	Στρογγυλοειδή αυγά+ <i>Strongyloides papillosus</i>	400	1	<i>Eimeria</i> spp+ Στρογγυλοειδή αυγά+ <i>Strongyloides papillosus</i>	1600
2	Στρογγυλοειδή αυγά+ <i>Strongyloides papillosus</i>	500	1	<i>Eimeria</i> spp	1800
2	<i>Eimeria</i> spp+		2	<i>Eimeria</i> spp+ Στρογγυλοειδή αυγά+	2000

	Στρογγυλοειδή αυγά			<i>Strongyloides papillosus</i>	
1	<i>Eimeria</i> spp+ Στρογγυλοειδή αυγά+ <i>Strongyloides papillosus</i>		1	<i>Eimeria</i> spp+ Στρογγυλοειδή αυγά+ <i>Strongyloides papillosus</i>	2100
1	Στρογγυλοειδή αυγά	600	2	<i>Eimeria</i> spp+ Στρογγυλοειδή αυγά+ <i>Strongyloides papillosus</i>	2900
1	Στρογγυλοειδή αυγά+ <i>Strongyloides papillosus</i>	700	1	Στρογγυλοειδή αυγά+ <i>Strongyloides papillosus</i>	3500
1	Στρογγυλοειδή αυγά+ <i>Strongyloides papillosus</i>	800	1	<i>Eimeria</i> spp+ Στρογγυλοειδή αυγά+ <i>Strongyloides papillosus</i>	4000
1	Στρογγυλοειδή αυγά				

Από τα 50 πρόβατα της φυλής Άργους στα 41 ζώα (92,0 %) βρέθηκαν αναπαραγωγικά στοιχεία παρασίτων. Σε 28 ζώα καταμετρήθηκαν τιμές FEC άνω των 500 EPG με μέγιστη τιμή τα 4.000 EPG. Οι τιμές FEC άνω των 500 είναι αυτές που συνήθως χαρακτηρίζονται ως παθολογικές.

Πίνακας 3.5.2: Αναπαραγωγικά στοιχεία παρασίτων και τιμές FEC (EPG) στην Κοκοβίτικη φυλή					
Ζώα	Είδη αναπαραγωγικών στοιχείων παρασίτων	EPG	Ζώα	Είδη αναπαραγωγικών στοιχείων παρασίτων	EPG
6	<i>Eimeria</i> spp	100	1	Στρογγυλοειδή αυγά	600
2	Στρογγυλοειδή αυγά		1	<i>Eimeria</i> spp+ Στρογγυλοειδή αυγά+ <i>Nematodirus filicollis</i> <i>Eimeria</i> spp	700
2	Στρογγυλοειδή αυγά+ <i>Moniezia expansa</i>	200	1	<i>Eimeria</i> spp	
2	Στρογγυλοειδή αυγά				

1	<i>Eimeria</i> spp+ Στρογγυλοειδή αυγά		1	<i>Eimeria</i> spp	800
3	<i>Eimeria</i> spp				
1	<i>Eimeria</i> spp	300	1	Στρογγυλοειδή αυγά+ <i>Moniezia expansa</i> + <i>Nematodirus filicollis</i>	900
2	Στρογγυλοειδή αυγά+ <i>Eimeria</i> spp		1	<i>Eimeria</i> spp	2400
2	<i>Eimeria</i> spp+ <i>Moniezia expansa</i>				
1	Στρογγυλοειδή αυγά+ <i>Eimeria</i> spp+ <i>Nematodirus filicollis</i>	500	1	<i>Eimeria</i> spp+ Στρογγυλοειδή αυγά+ <i>Strongyloides papillosus</i>	13000
4	<i>Eimeria</i> spp				

Στα Κοκοβίτικα πρόβατα οι τιμές ήταν γενικά χαμηλότερες, ενώ σε 12 ζώα από τα 36 ζώα που ήταν θετικά σε παράσιτα (90,2 %) εμφανίστηκαν παθολογικές τιμές (>500 EPG). Η μέγιστη τιμή που παρατηρήθηκε στα Κοκοβίτικα πρόβατα ήταν 13.000, ενώ η προηγούμενη υψηλότερη ήταν 2.400 EPG.

3.2.3 Συχνότητα προσβολής από παράσιτα

Για τον προσδιορισμό της συχνότητας προσβολής από γαστρεντερικά παράσιτα υπολογίστηκε σε κάθε φυλή το άθροισμα των αναπαραγωγικών στοιχείων των παρασίτων. Τα είδη παρασίτων που λήφθηκαν υπόψιν ήταν νηματώδη (αυγά Στρογγυλοειδών, αυγά *Strongyloides papillosus* και αυγά *Nematodirus filicollis*) και πρωτόζωα (ωοκύστες *Eimeria* spp.-Coccidia), ενώ δεν λήφθηκαν υπόψη τα αυγά κεστωδών (*Moniezia expansa*), καθώς βρέθηκαν σε 2 ζώα μόνο και δεν ήταν δυνατή η στατιστική επεξεργασία τόσο χαμηλού δείγματος.

Πίνακας 3.6: Αριθμός ατόμων που προσβλήθηκαν από γαστρεντερικά παράσιτα στις δύο φυλές (ποσοστό προσβολής % σε κάθε φυλή)				
Είδος παράσιτου		Άργους (n=30)	Κοκοβίτικο (n=26)	Σύνολο ζώων

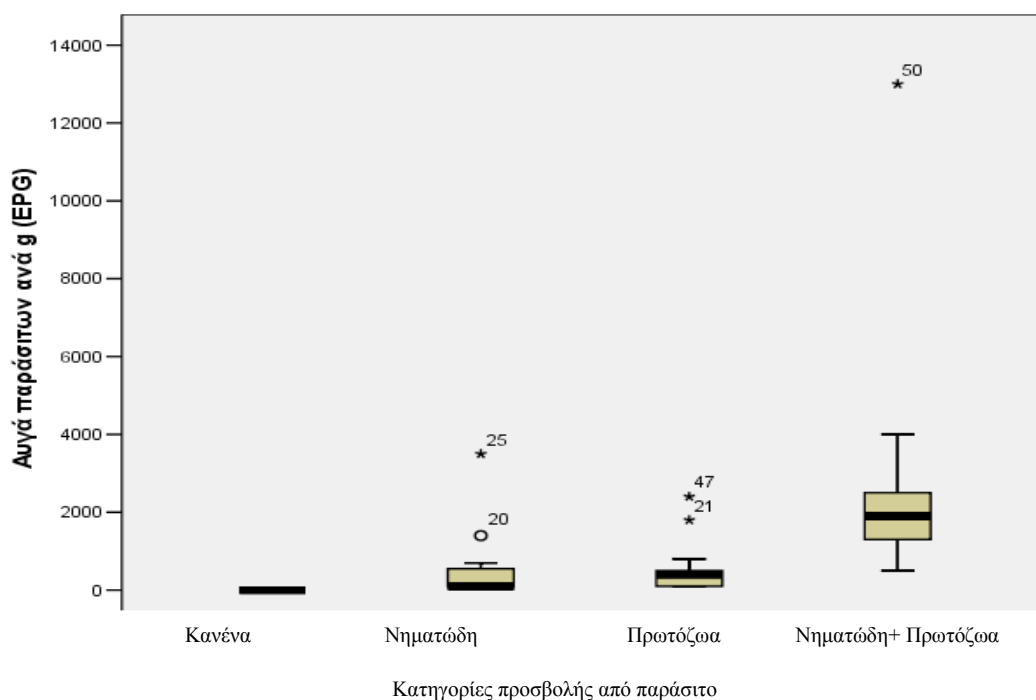
Κανένα παράσιτο	<i>Παρατηρηθέντα</i>	4 (13,33)	4 (15,38)	8 (14,28)
	<i>Αναμενόμενα</i>	4,286	3,714	8
Νηματώδη	<i>Παρατηρηθέντα</i>	12 (40,00)	3(11,53)	15 (26,78)
	<i>Αναμενόμενα</i>	8,036	6,964	15
Πρωτόζωα	<i>Παρατηρηθέντα</i>	2 (6,67)	15 (57,69)	17 (30,35)
	<i>Αναμενόμενα</i>	9,107	7,893	17
Νηματώδη & πρωτόζωα	<i>Παρατηρηθέντα</i>	12 (40,00)	4 (15,38)	16 (28,57)
	<i>Αναμενόμενα</i>	8,571	7,429	16
Συνολικό δείγμα (n=56)		30	26	56

Για την φυλή Άργους, η συχνότητα προσβολής ήταν $12+2+12$ δια του συνόλου των ζώων ($N=30$) που ισούται με $0,866$. Ανάλογα, στην Κοκοβίτικη φυλή η συχνότητα προσβολής είναι $3+15+4/26=0,846$. Οι συχνότητες των μη προσβεβλημένων ζώων ήταν $0,133$ και $0,153$ αντίστοιχα.

3.2.4 Σχέση τιμών FEC με τις κατηγορίες παρασίτων

Με σκοπό την συσχέτιση των τιμών FEC με τις διάφορες κατηγορίες παρασίτων που βρέθηκαν κατά την μελέτη των κοπράνων, πραγματοποιήθηκε έλεγχος με την μέθοδο Kruskal-Wallis, για το σύνολο του πληθυσμού, αλλά και για την κάθε φυλή ξεχωριστά. Στον **Πίνακα 3.7** παρατίθενται τα αποτελέσματα αυτά, που έδειξαν ότι στο σύνολο των ζώων η τιμή $P=0,00<0,05$, γεγονός που υποδηλώνει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των κατηγοριών προσβολής από παράσιτα.

Η κατηγορία που περιλάμβανε την συνδυαστική προσβολή από παράσιτα εμφάνιζε την υψηλότερη ενδιάμεση τιμή, κάτι το οποίο παρατηρείται και από το θηκόγραμμα της **Εικόνας 3.2**.



Εικόνα 3.2 Θηκόγραμμα όπου παρουσιάζονται οι διάμεσες τιμές EPG ανα κατηγορία παρασιτικής μόλυνσης.

Στην φυλή Άργους, υπήρξαν επίσης στατιστικά σημαντικές διαφορές τόσο μεταξύ της κατηγορίας προσβολής από πρωτόζωα σε σχέση με την προσβολή από νηματώδη, όσο και μεταξύ της κατηγορίας συνδυαστικής προσβολής σε σχέση με τις υπόλοιπες κατηγορίες. Ομοίως για την Κοκοβίτικη φυλή η κατηγορία που περιελάμβανε το σύνολο των παρασίτων βρέθηκε να έχει την μεγαλύτερη διάμεση τιμή και να διαφέρει σε στατιστικά σημαντικό επίπεδο συγκριτικά με τις άλλες κατηγορίες. Τέλος, επειδή βρέθηκαν μόνο 2 ζώα που είχαν αυγά από κεστώδη σε συνδυασμό με νηματώδη και πρωτόζωα, η κατηγορία αυτή δεν συμπεριλήφθηκε στην ανάλυση.

Πίνακας 3.7: Συσχέτιση τιμών FEC με τις κατηγορίες παρασίτων		
Σύνολο Ζώων (N=56)		
Κατηγορία Παρασίτων	Άτομα	Διάμεσος
Κανένα	8	0
Νηματώδη	15	100
Πρωτόζωα	17	400

Νηματώδη +Πρωτόζωα	16	1900
P=0,00<0,05 , γεγονός που υποδηλώνει ότι υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά της διαμέσου της κατηγορίας «Νηματώδη+ Πρωτόζωα» με τις υπόλοιπες τρεις κατηγορίες.		
Άργους (N=30)		
Κατηγορία Παρασίτων	Άτομα	Διάμεσος
Κανένα	4	0
Νηματώδη	12	100
Πρωτόζωα	2	950
Νηματώδη +Πρωτόζωα	12	1950
P=0,00<0,05 , γεγονός που υποδηλώνει ότι υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά της διαμέσου της κατηγορίας «Νηματώδη+ Πρωτόζωα» με τις υπόλοιπες τρεις κατηγορίες.		
Κοκοβίτικα (N=26)		
Κατηγορία Παρασίτων	Άτομα	Διάμεσος
Κανένα	4	0
Νηματώδη	3	100
Πρωτόζωα	15	400
Νηματώδη +Πρωτόζωα	4	800
P=0,002<0,05 Υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά της διαμέσου της κατηγορίας «Νηματώδη+ Πρωτόζωα» με τις υπόλοιπες τρεις κατηγορίες.		

3.2.5 Επίπεδα πεψινογόνου στο πλάσμα

Παθολογικές τιμές άνω των 375 mI.U τυροσίνης βρέθηκαν σε 6 από τα 30 πρόβατα της φυλής Άργους που γονοτυπήθηκαν (2 %), ενώ στα Κοκοβίτικα 16 από το σύνολο των 26 ζώων που γονοτυπήθηκαν (61 %). Χαρακτηριστικό ήταν επίσης ότι στην Κοκοβίτικη φυλή, αν και ο αριθμός αυγών παρασίτων που μετρήθηκε ήταν χαμηλότερος σε σχέση με το EPG των ζώων της φυλής Άργους, οι τιμές του πεψινογόνου ήταν πολύ υψηλότερες, φτάνοντας έως 11.030 μονάδες mI.U τυροσίνης. Η μέγιστη τιμή που σημειώθηκε στα πρόβατα της φυλής Άργους ήταν 691 mI.U τυροσίνης.

3.2.6 Σχέση τιμών FEC με τα επίπεδα πεψινογόνου στο πλάσμα

Μετά από εκτίμηση του συντελεστή συσχέτισης κατά Spearman μεταξύ των τιμών FEC και των επιπέδων του πεψινογόνου στο πλάσμα του αίματος βρέθηκε ότι δεν υπήρξε συσχέτιση μεταξύ των δύο μεταβλητών καθώς ο συντελεστής συσχέτισης P βρέθηκε μεγαλύτερος της τιμής 0,05.

3.2.7 Σχέση ειδών παρασίτων με τα επίπεδα πεψινογόνου στο πλάσμα του αίματος

Πραγματοποιήθηκε έλεγχος Kruskal- Wallis στο σύνολο των ζώων, με σκοπό την διερεύνηση της υπόθεσης εάν υπήρχε συσχέτιση των τιμών mIU τυροσίνης με τις κατηγορίες γαστρεντερικών παρασίτων. Οι κατηγορίες που επιλέχθηκαν απεικονίζονται στον Πίνακα 3.8 και κωδικοποιήθηκαν ως 0: κανένα είδος παρασίτου, 1: Πρωτόζωα, 2: Πρωτόζωα και Νηματώδη, 3: Συνδυασμός όλων των παρασίτων. Δεν παρατηρήθηκε σημαντική συσχέτιση παρότι η ευρεθείσα τιμή δείχνει τάσεις συσχέτισης ($P=0,074>0,05$).

Πίνακας 3.8: Διάμεσες τιμές (M) και ενδοτεταρτημοριακό εύρος (Qr) των τιμών mIU Τυροσίνης σε σχέση με το είδος παράσιτο			
Κατηγορία Παρασίτων	N	M	Qr
0	8	173,177	893,745
1	15	184,554	585,414
2	16	517,975	632,936
3	17	194,476	407,805
Στατιστικός Έλεγχος Kruskal- Wallis ($P=0,074>0,05$)			
0: κανένα είδος παρασίτου, 1: Πρωτόζωα, 2: Πρωτόζωα και Νηματώδη, 3: Συνδυασμός όλων των παρασίτων			

3.3 ΓΟΝΙΔΙΑΚΕΣ ΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ ΕΠΙ ΤΩΝ ΠΑΡΑΣΙΤΟΛΟΓΙΚΩΝ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΩΝ

3.3.1 Επίδραση των γονοτύπων στην συχνότητα προσβολής

Για την διερεύνηση των επιδράσεων των γονοτύπων, καθώς τα αλληλόμορφα *Onar-DRBI* ανιχνεύθηκαν σε πολύ χαμηλές συχνότητες, επιλέχθηκαν να μελετηθούν οι γονότυποι που εμφανίστηκαν στο σύνολο των ζώων με μεγαλύτερη συχνότητα. Οι γονότυποι αυτοί ήταν: *DRBI*1001+ X* αλληλόμορφο, *DRBI*1001+ DRBI*0806*, *DRBI*0806+ X* αλληλόμορφο, *DRBI*0105+ X* αλληλόμορφο και οι ομοζυγωτοί γονότυποι με την μεγαλύτερη συχνότητα (*DRBI*0806- DRBI*0806*, *DRBI*1001+ DRBI*1001*). Δημιουργήθηκε τέλος μια ομάδα που περιλάμβανε το σύνολο των υπόλοιπων γονοτύπων.

Πίνακας 3.9: Παρατηρηθείσες και Αναμενόμενες τιμές συχνότητας προσβολής σε σχέση με τους πιο κοινούς γονότυπους							
EPG		Γονότυπος					
		*1001+ X	*1001+ *0806	*0806+ X	*0105+ X	Ομοζυγωτοί γονότυποι	Υπόλοιποι γονότυποι
0-100	<i>Παρατηρηθέντα</i>	5	3	8	1	3	13
	<i>Αναμενόμενα</i>	4,125	2,94	7,07	3,53	3,53	11,8
>500	<i>Παρατηρηθέντα</i>	2	4	5	5	3	7
	<i>Αναμενόμενα</i>	2,87	4,92	2,46	2,46	2,46	8,21
Σύνολο	<i>Παρατηρηθέντα</i>	7	5	12	6	6	20
	<i>Αναμενόμενα</i>	7	5	12	6	6	20

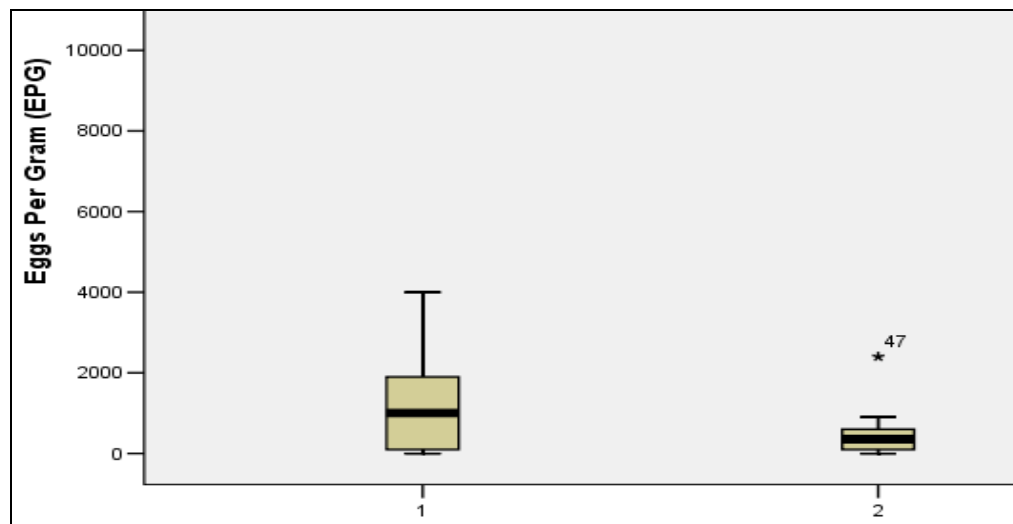
Στον Πίνακα 3.9 παρουσιάζονται οι παρατηρηθείσες και αναμενόμενες τιμές της συχνότητας προσβολής από παράσιτα σε σχέση με την παραπάνω ομαδοποίηση των γονοτύπων.

Για την εκτίμηση της συχνότητας προσβολής δημιουργήθηκαν 2 ομάδες που περιλάμβαναν τα ζώα που είχαν από 0 έως και 100 EPG και από 500 EPG και άνω.

Το κριτήριο αυτό επιλέχθηκε με βάση το ότι και η γονοτύπηση των ζώων έγινε με αυτόν τον διαχωρισμό. Με έλεγχο χ^2 (Pearson) για την ανεξαρτησία των συνδυασμών των επιπέδων προσβολής από παράσιτα των παραπάνω γονοτύπων, με διόρθωση Monte Carlo, δεν βρέθηκε ο παράγοντας γονότυπος να έχει στατιστικά σημαντική επίδραση επί της προσβολής από παράσιτα, καθώς η τιμή P ήταν $0,368 > 0,05$.

3.3.2 Επίδραση της φυλής στο είδος της παρασιτικής μόλυνσης

Μεταξύ των φυλών δεν βρέθηκε να υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφοροποίηση ως προς το είδος των παρασίτων (φυλή Άργους: Διάμεση Τιμή (M)= 1000 και Κοκοβίτικη φυλή: Διάμεση Τιμή (M)=350) (Εικόνα 3.3). Περαιτέρω ανάλυση για τις διαφοροποιήσεις μεταξύ των φυλών δεν είναι δυνατές, καθώς εκτρέφονται σε διαφορετικό περιβάλλον, με διαφορετικό σιτηρέσιο και διαφορετικές συνθήκες έκθεσης σε μολυσματικούς παράγοντες.



Εικόνα 3.3 Θηκόγραμμα που εμφανίζει την διαφορά των διάμεσων τιμών που αφορούν στο είδος παρασίτου, μεταξύ των φυλών (1= φυλή Άργους, 2= Κοκοβίτικη φυλή. Δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά.

3.3.3 Επίδραση γονοτύπων στις τιμές FEC και στις τιμές mI.U τυροσίνης

Για την βέλτιστη εφαρμογή στατιστικού ελέγχου, δεν επιλέχθηκαν στο σύνολό τους οι γονότυποι, καθώς οι περισσότεροι από αυτούς εμφανίζονταν με ιδιαίτερα χαμηλή συχνότητα. Επιλέχθηκαν για στατιστική επεξεργασία και για μελέτη της συσχέτισής τους με τις τιμές FEC και με τις τιμές mI.U τυροσίνης, οι γονότυποι που

εμφανίστηκαν στο σύνολο των ζώων με μεγαλύτερη συχνότητα: $DRBI*1001+ X$ αλληλόμορφο, $DRBI*1001+ DRBI*0806$, $DRBI*0806+ X$ αλληλόμορφο, $DRBI*0105+ X$ αλληλόμορφο, οι ομοζυγωτοί γονότυποι με την μεγαλύτερη συχνότητα ($DRBI*0806- DRBI*0806$, $DRBI*1001+ DRBI*1001$) και τέλος δημιουργήθηκε μια ομάδα που περιλάμβανε το σύνολο των υπόλοιπων γονοτύπων.

Πίνακας 3.10: Διάμεσες τιμές (M) και ενδοτεταρτημοριακό εύρος (Qr) των τιμών FEC στους διάφορους γονότυπους- Επίδραση γονοτύπων στις τιμές FEC		
Γονότυπος	M	Qr
$DRBI*1001+ X$	100	400
$DRBI*1001+ DRBI*0806$	0	1550
$DRBI*0806+ X$	550	1600
$DRBI*0105+X$	1750	1850
Ομοζυγωτοί γονότυποι ($DRBI*1001+ DRBI*1001$, $DRBI*0806+ DRBI*0806$)	200	1650
Υπόλοιποι γονότυποι	250	960
Έλεγχος Kruskal- Wallis, $P=0,118>0,05$		

Ο έλεγχος διάμεσων τιμών που πραγματοποιήθηκε, έδειξε ότι υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά στην συχνότητα εμφάνισης των επιλεγόμενων ομάδων, αλλά μετά από έλεγχο Kruskal- Wallis, δεν ανιχνεύθηκαν στατιστικά σημαντικές επιδράσεις των γονοτύπων επί του παρασιτικού φορτίου καθώς $P=0,118>0,05$ (Πίνακας 3.10).

Πίνακας 3.11: Διάμεσες τιμές (M) και ενδοτεταρτημοριακό εύρος (Qr) των τιμών mL.U τυροσίνης στους διάφορους γονότυπους- Επίδραση γονοτύπων στις τιμές mL.U τυροσίνης		
Γονότυπος	M	Qr
$DRBI*1001+ X$	174,63	611,21
$DRBI*1001+ DRBI*0806$	15,87	258,97

<i>DRBI*0806+ X</i>	144,86	1100,44
<i>DRBI*0105+X</i>	204,39	477,26
Ομοζυγωτοί γονότυποι (<i>DRBI*1001+ DRBI*1001, DRBI*0806+ DRBI*0806</i>)	353,82	517,56
Υπόλοιποι γονότυποι	309,75	564,84
Έλεγχος Kruskal-Wallis, P=0,147>0,05		

Αναφορικά με τα επίπεδα τυροσίνης σε σχέση με τους γονότυπους που επιλέχθηκαν προς μελέτη, μέσω του ελέγχου Kruskal-Wallis, δεν βρέθηκαν για ακόμη μια φορά σημαντικές διαφορές P=0,147>0,05 (Πίνακας 3.11).

3.3.4 Επίδραση αλληλομόρφων στις τιμές FEC και στις τιμές mI.U τυροσίνης

Καθώς τα αλληλόμορφα εμφανίστηκαν με πολύ μικρή συχνότητα, τόσο εντός των φυλών, όσο και στο σύνολο των μελετηθέντων ζώων, για να είναι εφικτή η εκτίμηση της επίδρασης τους στο FEC και στις mI.U τυροσίνης, επιλέχθηκαν να μελετηθούν τα αλληλόμορφα με την μεγαλύτερη συχνότητα εντός του συνόλου των δειγμάτων. Τα αλληλόμορφα αυτά ήταν: Ovar-*DRBI*0105*, Ovar-*DRBI*0312*, Ovar-*DRBI*0702*, Ovar-*DRBI*0806*, Ovar-*DRBI*1001*, Ovar-*DRBI*1004* και Ovar-*DRBI*1606*.

Οι τιμές FEC και mI.U τυροσίνης δεν ακολουθούν την κανονική κατανομή, συνεπώς υπολογίζεται η διάμεσος τιμή (M) και το ενδοτεταρτημοριακό εύρος (Qr), μέσω του ελέγχου Kruskal-Wallis για τα 3 επίπεδα του εκάστοτε αλληλομόρφου: 0 αντιστοιχούσε σε κανένα αντίγραφο του αλληλομόρφου, 1 σε ένα αντίγραφο και 2 σε δύο αντίγραφα, δηλαδή στην ομοζυγωτή μορφή. Για τα αλληλόμορφα που βρέθηκαν μόνο σε 0 ή 1 αντίγραφο πραγματοποιήθηκε ο έλεγχος Mann-Whitney.

Πίνακας 3.12.1: Διάμεσες τιμές (M) και ενδοτεταρτημοριακό εύρος (Qr) των τιμών FEC στα διάφορα αλληλόμορφα- Επίδραση αλληλομόρφων στις τιμές FEC				
Αλληλόμορφο	Αριθμός αντίγραφων αλληλομόρφου	Αριθμός ζώων με τους αντίστοιχους γονότυπους (N)	M	Qr
DRB1*1004	0	52	500	1300
	1	4	100	1425
	2	0	-	-
Στατιστικός έλεγχος Mann-Whitney P=0,333>0,05				
DRB1*0806	0	37	500	1350
	1	16	500	1675
	2	3	100	1400
Στατιστικός έλεγχος Kruskal-Wallis P=0,698>0,05				
DRB1*0105	0	51	300	1200
	1	5	1600	2350
	2	0	-	-
Στατιστικός έλεγχος Mann-Whitney P=0,273>0,05				
DRB1*1001	0	40	650	1775
	1	13	100	450
	2	3	300	800
Στατιστικός έλεγχος Kruskal-Wallis P=0,183>0,05				
DRB1*0312	0	49	500	1400
	1	7	563	1336
	2	0	-	-
Στατιστικός έλεγχος Mann-Whitney P=0,959>0,05				
DRB1*0702	0	50	500	1550
	1	6	100	200
	2	0	-	-
Στατιστικός έλεγχος Mann-Whitney P=0,093>0,05				
DRB1*1606	0	44	350	1100
	1	12	1000	1656
	2	0	-	-
Στατιστικός έλεγχος Mann-Whitney P=0,153>0,05				

Πίνακας 3.12.2: Διάμεσες τιμές (M) και ενδοτεταρτημοριακό εύρος (Qr) των τιμών mI.U Τυροσίνης στους διάφορους γονότυπους (Επίδραση αλληλομόρφων στις τιμές mI.U Τυροσίνης)				
Αλληλόμορφο	Αριθμός αντίγραφων αλληλομόρφου	Αριθμός ζώων με τους αντίστοιχους γονότυπους (N)	M	Qr
DRB1*1004	0	52	272,1055	575,49
	1	4	164	188,52
	2	0	-	-
Στατιστικός έλεγχος Mann-Whitney P=0,544>0,05				

DRB1*0806	0	37	304,122	481,2305
	1	16	129,9815	785,2913
	2	3	191,567	323,346
Στατιστικός έλεγχος Kruskal-Wallis P=0,419>0,05				
DRB1*0105	0	51	270,356	509,688
	1	5	25,798	511,989
	2	0	-	-
Στατιστικός έλεγχος Mann-Whitney P=0,042<0,05				
DRB1*1001	0	40	288,9885	469,0013
	1	13	154,787	472,3
	2	3	690,59	517,749
Στατιστικός έλεγχος Kruskal-Wallis P=0,126>0,05				
DRB1*0312	0	49	225,334	542,8265
	1	7	562,997	1336,488
	2	0	-	-
Στατιστικός έλεγχος Mann-Whitney P=0,087>0,05				
DRB1*0702	0	50	230,9615	534,3695
	1	6	568,6245	597,2737
	2	0	-	-
Στατιστικός έλεγχος Mann-Whitney P=0,332>0,05				
DRB1*1606	0	44	350	1100
	1	12	1000	1650
	2	0	-	-
Στατιστικός έλεγχος Mann-Whitney P=0,275>0,05				

Μέσω των Πινάκων 3.12.1 και 3.12.2 παρατηρούμε ότι δεν βρέθηκαν επιδράσεις των αλληλομόρφων στις τιμές FEC, με εξαίρεση για το αλληλόμορφο Ovar-DRB1*0702 όπου παρατηρούμε μια τάση διαφοροποίησης ($P=0,09>0,05$). Όσον αφορά την επίδραση των γονοτύπων στα επίπεδα τυροσίνης, για το αλληλόμορφο Ovar-DRB1*0105, ($P=0,042<0,05$) παρατηρούμε αρνητική συσχέτιση της ύπαρξης του αλληλομόρφου με τα επίπεδα τυροσίνης, ενώ παρατηρούμε τάσεις διαφοροποίησης και για το αλληλόμορφο Ovar-DRB1*0312 ($P=0,08>0,05$). Επίσης το αλληλόμορφο *0105 φαίνεται να εμφανίζεται συχνά και στις δύο φυλές στην ομάδα υψηλού παρασιτικού φορτίου.

ΣΧΟΛΙΑΣΜΟΣ

Το Μείζον Σύστημα Ιστοσυμβατότητας του προβάτου (Ovar-MHC) αλλά και όλων των σπονδυλωτών, παρουσιάζει πολύ έντονο πολυμορφισμό ο οποίος εστιάζεται στο εξόνιο 2 του γονιδίου *Ovar-DRB1*. Η διεθνής Βάση Δεδομένων Ανοσοπολυμορφισμού για το Ovar-MHC (Immuno Polymorphism Database, IPD-MHC Database, www.ebi.ac.uk/ipd/mhc) του European Bioinformatics Institute (EMBL-EBI), διαθέτει συγκεντρωτικά τις νουκλεοτιδικές αλληλουχίες του εξονίου 2 των αλληλομόρφων του *Ovar-DRB1*, που έχουν ταυτοποιηθεί σε διάφορες φυλές προβάτων διεθνώς από την Ασία, την Ευρώπη μέχρι και σε απομακρυσμένες περιοχές της γης.

Η μελέτη της παραλλακτικότητας του γονιδίου *Ovar-DRB1*, σε σχέση με την ανοσολογική απόκριση αλλά και την ανθεκτικότητα σε ασθένειες, είναι μεγάλης σημασίας και η ταυτοποίηση νέων αλληλομόρφων έχει βοηθήσει ώστε να δημιουργηθεί μια αξιόπιστη Τράπεζα Δεδομένων. Έτσι, πλέον μπορεί να γίνεται με ευκολία και αποτελεσματικά η γονοτύπηση πληθυσμών που δεν έχουν ξαναμελετηθεί και να γίνεται αμεσότερη η εύρεση του λειτουργικού ρόλου των πολυμορφισμών του γονιδίου αυτού.

4.1 ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ *Ovar-DRB1* ΣΤΙΣ ΜΕΛΕΤΗΘΕΙΣΕΣ ΦΥΛΕΣ

Στην μελέτη αυτή, ταυτοποιήθηκαν συνολικά και στις 2 φυλές, 24 αλληλόμορφα *Ovar-DRB1*, εκ των οποίων τα 23 ήταν ήδη γνωστά και καταχωρημένα στην διεθνή Βάση Δεδομένων Ανοσοπολυμορφισμού ή είχαν ταυτοποιηθεί σε προηγούμενες μελέτες για το γονίδιο αυτό, σε ελληνικές φυλές προβάτων (Φριζάρτα, Κοζάνης, Μπούτσικο) (Σπετσαριάς, 2009 και 2013), συμπεριλαμβανομένων των αλληλομόρφων *DRB1*1606*, *DRB1*2003*, *DRB1*1008* και *DRB1*0806* που είχαν βρεθεί αποκλειστικά στις ελληνικές φυλές.

Στην φυλή Άργους και στην Κοκοβίτικη φυλή ταυτοποιήθηκαν από 17 αλληλόμορφα, ενώ 10 από αυτά ήταν κοινά και για τις 2 φυλές. Και στις 2 φυλές παρατηρήθηκε μικρός αριθμός ομοζυγωτών γονοτύπων, κάτι το οποίο μπορεί να

δικαιολογηθεί από το γεγονός ότι και οι δύο αποτελούν σπάνιες φυλές, σχετικά απομονωμένες αλλά και από το γεγονός ότι το Μείζον Σύστημα Ιστοσυμβατότητας, όντας ρυθμιστής του Ανοσοποιητικού Συστήματος, ευνοείται από την ύπαρξη πολυμορφισμών, καθώς τυχαίοι συνδυασμοί αλληλομόρφων μπορεί να δίνουν γονοτύπους ανθεκτικούς σε πλήθος ασθενειών ή βελτιωμένα παραγωγικά χαρακτηριστικά. Η ύπαρξη τόσο μεγάλου αριθμού διαφορετικών αλληλομόρφων σε σχετικά μικρό αριθμό ζώων δείχνει την σημαντική παραλλακτικότητα της περιοχής *Onar-DRB1* και μάλιστα σε δύο σπάνιες φυλές προβάτων όπου λόγω του φαινομένου της εξελικτικής στενωπού (Bottle-neck effect), θα περίμενε κανείς περιορισμένο βαθμό πολυμορφισμού όπως εμφανίστηκε σε Μεγακέρατα πρόβατα της Βορείου Αμερικής που απομονώθηκαν σε νησιωτική περιοχή (Hedrick *et al.*, 2001) ή στην αίγα των Πυρηναίων, στην Ισπανία (Amills *et al.*, 2004).

Η ομοζυγωτία δεν είναι ιδιαίτερα επιθυμητό χαρακτηριστικό και ειδικότερα στους πληθυσμούς που είναι υπό εξαφάνιση, καθώς συχνά είναι φαινόμενο ομομεικτικού εκφυλισμού (Inbreeding depression). Ο ομομεικτικός εκφυλισμός έχει σαν αποτέλεσμα, μέσω συνεχών διασταυρώσεων εντός ενός και μόνο πληθυσμού, την αύξηση των ομοζυγωτών ατόμων, κάτι που συχνά οδηγεί σε μειωμένη ανθεκτικότητα των ζώων σε ασθένειες ή μειωμένη παραγωγικότητα (Tollenaere *et al.*, 2008, Dione *et al.*, 2008, Oliver *et al.*, 2009, Sommer *et al.*, 2005, Summers *et al.*, 2003). Η υπόθεση αυτή βασίζεται στο ότι τα ετεροζυγωτά άτομα έχουν μεγαλύτερη ικανότητα ανίχνευσης και αυξημένη αντιγονοπαρουσιαστική δράση, αυξάνοντας κατά αυτόν τον τρόπο την σχετική ανθεκτικότητά τους σε σχέση με τα άτομα που είναι ομοζυγωτικά ως προς τα γονίδια του MHC (Clarke and Kirby, 1996, Hedrick and Kim, 1998, Stear *et al.*, 2005, Sommer *et al.*, 2005). Ο μεγάλος αριθμός αλληλομόρφων που βρέθηκαν στις μελετηθείσες σπάνιες ελληνικές φυλές είναι σημαντικός και δείχνει πιθανότατα στοιχεία τόσο για την προέλευση αυτών των ζώων όσο και ενισχύει την άποψη ότι τα αλληλόμορφα αυτά έχουν ξεχωριστή φυσιολογική σημασία.

Ο εκτεταμένος πολυμορφισμός στην συγκεκριμένη γονιδιακή περιοχή είναι αποτέλεσμα των διαφορών που παρουσιάζουν τα αλληλόμορφα στην νουκλεοτιδική τους αλληλουχία, αντανακλώντας πιθανότατα ξεχωριστές φυσιολογικές λειτουργίες. Εάν δύο αλληλόμορφα διαφέρουν έστω και κατά ένα νουκλεοτίδιο,

αυτό συνεπάγεται διαφορετικό κωδικοποιημένο αμινοξύ και ως τελικό προϊόν ένα διαφορετικό πολυπεπτίδιο με πιθανότατα διαφορετικό ρόλο.

Η αλλαγή αυτή αφορά, σε πρωτεϊνικό επίπεδο, αλλαγή της τριτοταγούς δομής (Lehnhinger, 2008), αλλά αλλαγή και της τελικής στερεοδιαμόρφωσης της πρωτεΐνης. Αυτό δικαιολογείται από το ότι η αντικατάσταση ενός αμινοξέος μπορεί να επηρεάσει τα ηλεκτρικά φορτία που αλληλεπιδρούν εντός μιας πεπτιδικής αλυσίδας αλλά και με τα φορτία γειτονικών μορίων και χημικών στοιχείων, με αποτέλεσμα την διαφορετική στερεοδιαμόρφωση αλλά και λειτουργικότητα της πρωτεΐνης (Solomons, 1999).

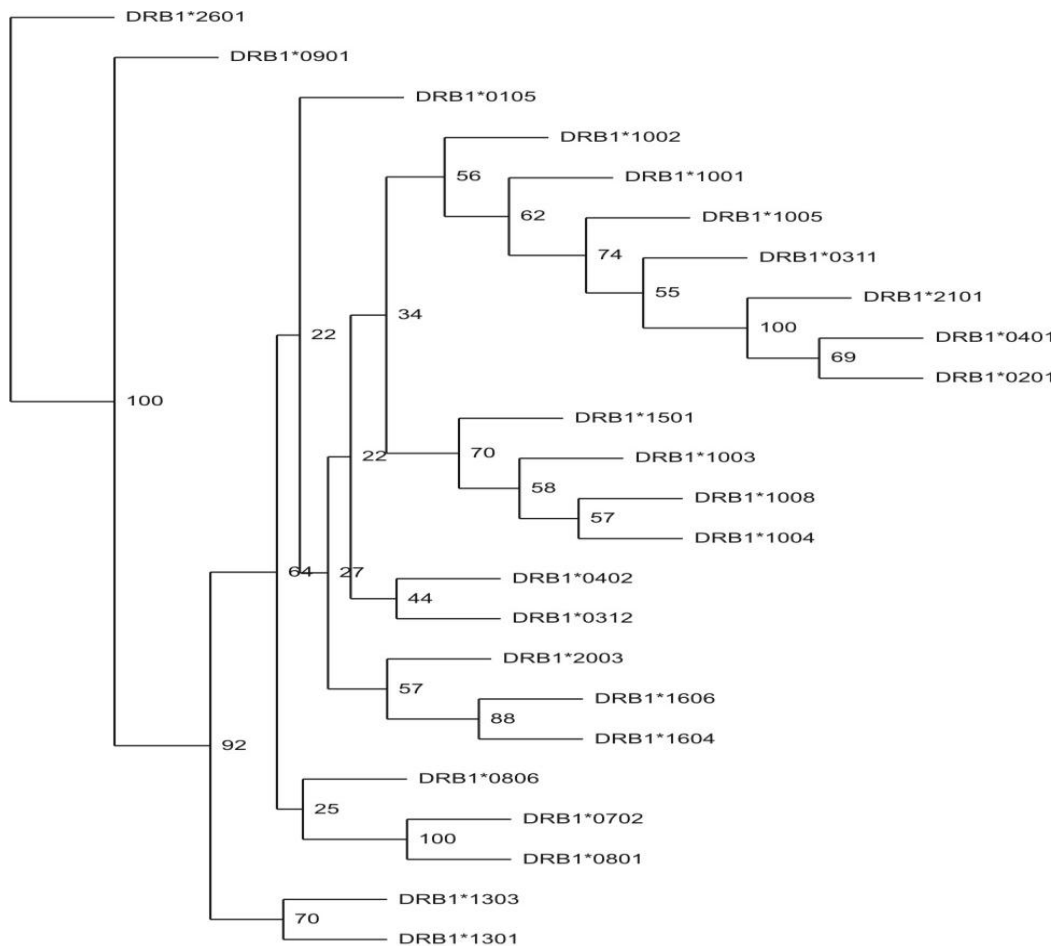
Με βάση τα παραπάνω και σύμφωνα με τους Dukkipati *et al.* (2006), η νουκλεοτιδική αλληλουχία του εξονίου 2 των αλληλομόρφων Ovar-*DRB1*, εξειδικεύει την στερεοδιαμόρφωση της περιοχής δέσμευσης αντιγονικών πεπτιδίων (PBR) των μορίων Ovar-MHC της τάξεως II, καθορίζοντας ποιο αντιγονικό πεπτίδιο δύναται να δεσμευθεί.

Οι νουκλεοτιδικές διαφορές εντός των αλληλουχιών των αλληλομόρφων δεν εμφανίζονται σε τυχαίες θέσεις, αλλά εδράζονται γενικά σε πολύ συγκεκριμένα σημεία επί αυτών (Brown *et al.*, 1993, Janeway and Travers, 1996). Το γεγονός αυτό σχετίζεται με την τελική στερεοδιαμόρφωση της θέσεως πρόσδεσης των αντιγονικών τεμαχίων (PBR), καθώς είναι πιθανό στις θέσεις αυτές να υπάρχουν νουκλεοτιδικές τριπλέτες (κωδικόνια) που να κωδικοποιούν συγκεκριμένα αμινοξέα τα οποία διαδραματίζουν βασικό ρόλο στην στερεοδιαμόρφωση της περιοχής αυτής.

Το νέο αλληλόμορφο *DRB1*2601* που βρέθηκε σε αυτήν την μελέτη, είναι πολυμορφικό σε πλήθος σημείων. Επιπλέον, εμφανίζει πολυμορφισμό σε θέσεις που δεν έχουν ξαναεμφανιστεί επί της αλληλουχίας των *DRB1* αλληλομόρφων στα κατοικίδια πρόβατα εντός της IPD-MHC βάσης δεδομένων. Αυτό το γεγονός τοποθετεί το αλληλόμορφο αυτό σε μια νέα οικογένεια αλληλομόρφων και δημιουργεί ερωτήματα ως προς την πιθανή λειτουργικότητα των διαφορών αυτών ή την επίδραση που μπορεί να έχει επί της στερεοδιάταξης των παραγόμενων πεπτιδίων. Παρόμοια διαφοροποίηση με ύπαρξη καινούργιων θέσεων πολυμορφισμού εμφάνισε και το αλληλόμορφο *DRB1*0901*, το οποίο σχετιζόταν

και με έναν μοναδικό πολυμορφισμό στο γονίδιο *Ovar-DQA* (Ballingall *et al.*, 2010).

Μελετήθηκε και η φυλογενετική σχέση των αλληλομόρφων που βρέθηκαν στην παρούσα εργασία, μέσω του υπολογιστικού προγράμματος «Phylip» με την εφαρμογή «Neighbour-joining» 100 φορές με την χρήση της μεθόδου bootstrapping για μεγαλύτερη ακρίβεια ως προς τις συγγενικές αλληλουχίες. Τα αλληλόμορφα ομαδοποιήθηκαν σε μεγάλο βαθμό κατά τρόπο αναμενόμενο, με τις γνωστές οικογένειες αλληλομόρφων να βρίσκονται σε μικρές αποστάσεις μεταξύ τους, ενώ ενδιαφέρον είναι το γεγονός ότι τα αλληλόμορφα *DRB1*0901* και *DRB1*2601*, έχουν την μεγαλύτερη φυλογενετική απόσταση και αποτελούν απόλυτα ξεχωριστούς κλάδους (**Εικόνα 4.1**).



Εικόνα 4.1 Δενδρόγραμμα τύπου Kimura που αποτυπώνει την συγγένεια μεταξύ των αλληλομόρφων της παρούσας μελέτης. Λήφθηκε μέσω Neighbour-joining με bootstrapping 100 φορές, ενώ οι τιμές εντός των εσωτερικών γωνιών μας δείχνουν τον αριθμό των επαναλήψεων που τα αλληλόμορφα τοποθετήθηκαν σε αυτές τις κοντινότερες αποστάσεις. Τα αλληλόμορφα *2601 και *0901, λόγω του πολυμορφισμού που παρουσιάζουν τοποθετούνται σε ξεχωριστούς κλάδους.

Στην παρακάτω αλληλουχία σημειώνονται με κόκκινο χρώμα οι νέες πολυμορφικές θέσεις του αλληλομόρφου *2601 σε σχέση με τα υπόλοιπα καταχωρημένα αλληλόμορφα.

```
CACATTTCTGAGTATTATAAGGGCGAGTGTCATTTCTTCAACGGGACC  
GAGTTCGACAGCGACTGGGGCGAGTTCCGGGCGGTGACCCAGCAGGGG  
CAGGAGGACGCCGAGCACTGGAACAGCCAGAAGGAGATCCTGGAGCGG  
AAGCGGGCCGAGGTGGACACGGTGTGCAGACACAACCTATGGGGTCGTTG  
AGAGTTTCACTGTGCAGCGGCGAG
```

Τέλος, το γεγονός ότι το *Ovis Canadensis*, ένα εκ των τριών ορεινών άγριων ειδών προβάτων της Βόρειας Αμερικής και της Σιβηρίας, φαίνεται να έχει ένα αλληλόμορφο που διαφέρει κατά ένα μόνο νουκλεοτίδιο σε σχέση με το αλληλόμορφο *DRB1*2601*, που βρέθηκε σε κατοικίδια φυλή προβάτων στην Ελλάδα, εγείρει ενδιαφέροντα ερωτήματα για την προέλευση της φυλής αυτής και γενικά για την εξέλιξη των κατοικίδιων φυλών προβάτων.

Τα άγρια Μεγακέρατα πρόβατα πέρασαν τον Βερίγγειο Πορθμό που ένωνε την Σιβηρία με την Αμερική, περί τα 750.000 χρόνια πριν και εξαπλώθηκαν στην δυτική Βόρεια Αμερική μέχρι την περιοχή Baja της Καλιφόρνιας, φτάνοντας έως την ενδοχώρα του Μεξικού. Φαίνεται να αποσχίστηκαν δε από τον κοντινότερο πρόγονο τους των άγριων προβάτων, το Ασιατικό πρόβατο του χιονιού (snow sheep), πριν 600.000 χρόνια (Cowan, 1940). Συνεπώς ο εντοπισμός κοινών αλληλομόρφων ή αλληλομόρφων που να μοιάζουν σε τέτοιο βαθμό προκαλεί εντύπωση. Τα άγρια Μεγακέρατα πρόβατα μοιράζονται με τα κατοικίδια πρόβατα ακόμα ένα αλληλόμορφο του χρωμοσώματος Y, το aA-oY1, ενώ έρευνες που αφορούν τον πολυμορφισμό της γενετικής ποικιλότητας και της προέλευσης της κατοικιδιοποίησης των προβάτων, με την χρήση αυτοσωμικών μικροδορυφόρων και μέσω μελέτης του μιτοχονδριακού γονιδιώματος, έχουν συντελέσει στην ανίχνευση ομοιοτήτων και πιθανώς των «ριζών» της κοινής προέλευσης των ειδών εντός της οικογένειας *ovis* (Meadows *et al.*, 2006).

Αλληλόμορφα με υψηλό ποσοστό ομολογίας με το *2601	Ζεύγη Βάσεων	Ποσοστό ομολογίας	Κωδικός εύρεσης στην βάση δεδομένων
Ovis aries partial Ovar-DRB1 gene for MHC class II antigen, breed Argos, allele Ovar-DRB1*2601, exon 2	499	100%	LN613183.1
Ovis aries breed Kazak MHC class II antigen (Ovar-DRB1) gene, Ovar-DRB1*20 allele, exon 2 and partial cds	499	100%	KC733421.1
Ovis canadensis MHC class II antigen (DRB) mRNA, DRB*2 allele, partial cds	488	99%	JN081875.1
Ovis canadensis MHC class II antigen (DRB) mRNA, DRB*3 allele, partial cds	488	99%	JN081873.1
Ovis canadensis MHC class II antigen (DRB) mRNA, DRB*24 allele, partial cds	483	99%	JN081876.1
Ovis canadensis MHC class II beta chain (DRB) gene, DRB*3 allele, exon 2 and partial cds	449	99%	AF324842.1
Ovis canadensis MHC class II beta chain (DRB) gene, DRB*2 allele, exon 2 and partial cds	449	99%	AF324841.1
Ovis canadensis partial HLA-DRB gene for MHC class II antigen, HLA-DRB*2 allele, exon 2	449	99%	AJ968653.1
Ovis dalli partial HLA-DRB gene for MHC class II antigen, HLA-DRB*6 allele, exon 2	449	99%	AJ920401.1

Εικόνα 4.1 Παράθεση εικόνας που λήφθηκε με χρήση του λογιστικού προγράμματος **BLAST®**, όπου καταγράφεται το ποσοστό ομολογίας του αλληλομόρφου *DRB1**2601 με αλληλόμορφα των ειδών *Ovis canadensis*, *Ovis dalli* και των προβάτων της φυλής Kazak. Δεξιά αναγράφονται και οι κωδικοί εύρεσής τους στην βάση δεδομένων.

4.1.1 Πολυμορφισμός του γονιδίου *Ovar-DRB1* στις Ελληνικές φυλές

Η σύγκριση των αποτελεσμάτων της παρούσας μελέτης ως προς τον αριθμό των αλληλομόρφων που ταυτοποιήθηκαν σε σχέση με άλλες ελληνικές φυλές έγινε με αντίστοιχες μελέτες που εφάρμοσαν την μέθοδο της αλληλούχησης (Σπετσαριάς, 2009, 2013 και αδημοσίευτα δεδομένα). Ένας μεγάλος αριθμός των αλληλομόρφων είναι αποκλειστικός για τις ελληνικές φυλές. Στον **Πίνακα 4.1** παρατίθενται τα αλληλόμορφα που έχουν βρεθεί σε ελληνικές φυλές καθώς και η κάθε φυλή. Με χρώμα έχουν σκιαστεί τα αλληλόμορφα των φυλών αυτής της μελέτης. Το αλληλόμορφο *0702 έχει βρεθεί και στο Ασιατικό είδος *Ovis dali*, που υποδηλώνει την πιθανή κοινή καταγωγή του αλληλομόρφου αυτού, ενώ το αλληλόμορφο *1008 έχει βρεθεί και αυτό στα *Ovis canadensis*, αποτελώντας έναν ακόμα σύνδεσμο με τα άγρια αυτά πρόβατα.

Αλληλόμορφο	Φυλή	Αλληλόμορφο	Φυλή
*0101	Φριζάρτας, Καλαρρύτεκη	*1005	Άργους
*0102	Φριζάρτας,	*1008**	Φριζάρτας, Άργους,

	Καλαρρύτεκη		Κοκοβίτικη
*0104	Φριζάρτας	*1102	Καλαρρύτεκη
*0105	Άργους, Κοκοβίτικη	*1301	Καλαρρύτεκη, Άργους, Κοκοβίτικη
*0201	Άργους	*1302	Καλαρρύτεκη
*0302	Φριζάρτας	*1303	Άργους
*0304	Φριζάρτας, Καλαρρύτεκη	*1403	Φριζάρτας
*0308	Φριζάρτας	*1501	Φριζάρτας, Κοκοβίτικο
*0311	Φριζάρτας, Καλαρρύτεκη, Άργους	*1601	Φριζάρτας, Καλαρρύτεκη
*0312	Άργους, Κοκοβίτικη	*1602	Καλαρρύτεκη
*0401	Κοκοβίτικο	*1602.02	Φριζάρτας, Κοζάνης
*0402	Φριζάρτας, Καλαρρύτεκη, Κοκοβίτικη	*1604	Καλαρρύτεκη, Κοκοβίτικη
*0403	Καλαρρύτεκη	*1605	Καλαρρύτεκη
*0405	Κοζάνης	*1606	Φριζάρτας, Άργους, Κοκοβίτικη, Κοζάνης, Μπούτσικο
*0601	Φριζάρτας, Καλαρρύτεκη	*1607	Φριζάρτας, Κοζάνης, Καλαρρύτεκη
0702	Καλαρρύτεκη, Άργους, Κοκοβίτικη	*1608	Άρτας, Κοζάνης
*0801	Φριζάρτας, Καλαρρύτεκη, Άργους, Κοκοβίτικη	*1901	Φριζάρτας
*0803	Καλαρρύτεκη	*2001	Φριζάρτας
*0806	Φριζάρτας, Άργους, Κοκοβίτικη	*2003	Φριζάρτας, Κοκοβίτικη
*0901	Φριζάρτας, Καλαρρύτεκη, Κοκοβίτικη	*2101	Φριζάρτας, Καλαρρύτεκη, Κοκοβίτικη

*1001	Φριζάρτας, Άργους, Κοκοβίτικη	*2201	Φριζάρτας
*1002	Άργους	*2401	Καλαρρύτεκη
*1003	Φριζάρτας, Κοκοβίτικη	*2502	Φριζάρτας
*1004	Άργους	*2601	Άργους
*Το αλληλόμορφο *0702 έχει βρεθεί στα <i>Ovis dali</i> , που υποδηλώνει πιθανή συσχέτιση των φυλών αυτών με τα Ασιατικά πρόβατα του είδους αυτού.			
**Το αλληλόμορφο *1008 έχει βρεθεί και στο <i>Ovis canadensis</i> .			

4. 2 ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ *Ovar-DQA*

Το γονίδιο αυτό εμφανίζει γενικά πολύ χαμηλά επίπεδα πολυμορφισμού, με τις σημειακές αλλαγές, σε ένα ή δύο σημεία μόνο εντός της αλληλουχίας, να μην έχουν κάποιο αποτέλεσμα ως προς τον φαινότυπο ή τα παραγωγικά χαρακτηριστικά των ζώων (Ballingall *et al.*, 1997). Παρόλα αυτά, ανιχνεύθηκε από τους Ballingall *et al.* (2010), πολυμορφισμός στο γονίδιο *DRA* (*Ovar-DRA*0201*) που διέφερε από τις αλληλουχίες αναφοράς κατά 20 νουκλεοτίδια, 12 εκ των οποίων φαίνεται να μην αντιστοιχούν σε συνώνυμα.

Ο πολυμορφισμός που ανιχνεύθηκε σχετιζόμενος με το γονίδιο *DRBI*0901* συμβαδίζει με την ανεξάρτητη εξελικτική πορεία των γονιδίων *DR* εντός του συγκεκριμένου απλοτύπου του *MHC*, καθώς κανένας ανασυνδυασμός δεν ανιχνεύθηκε μεταξύ των πολυμορφικών *DRA* και *B* γονιδίων σε ένα μεγάλο εύρος φυλών. Το ζευγάρι αλληλομόρφων *DRA*0201* και *DRBI*0901* πιθανολογείται να έχει ιδιαίτερα αρχαία καταγωγή και να βρίσκεται στον αρχικό πληθυσμό προβάτων από τον οποίο προήλθαν οι σύγχρονες κατοικίδιες φυλές προβάτων. Η διατήρηση αυτού του ζεύγους υποδηλώνει την ύπαρξη κάποιων μηχανισμών επιλογής που μπορεί να σχετίζεται με την παρουσίαση αντιγόνων από παθογόνα στα T-κύτταρα και την επαγωγή ανοσολογικών μηχανισμών.

Για τους παραπάνω λόγους θεωρήθηκε σκόπιμη η διερεύνηση ύπαρξης κάποιου σχετιζόμενου πολυμορφισμού σε επίπεδο *DRA* γονιδίων με το νέο αλληλόμορφο *DRBI*2601* καθώς, όπως και το *DRBI*0901*, εμφάνιζε χαρακτηριστικό

πολυμορφισμό σε νέες θέσεις εντός της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας. Μετά από χρήση των τεχνικών που περιγράφηκαν από τους Ballingall *et al.* (2010), που αναφέρονται παραπάνω στην παρούσα εργασία, δεν ανιχνεύθηκε κάποιος νέος πολυμορφισμός για το υπό μελέτη γονίδιο. Τα ζώα που μελετήθηκαν βρέθηκαν πολυμορφικά για την θέση του *DRA*, με αλληλόμορφα τα *DRA*0101* και *DRA*0102*. Το αλληλόμορφο *DRA*0102* βρίσκεται συχνά στις αίγες (GenBank: AB008755.1) και στα Άγρια πρόβατα της Βορείου Αμερικής (Μεγακέρατα-Bighorn Sheep) (GenBank: FM986340.1). Αυτό το γεγονός, για μια ακόμη φορά, εγείρει ενδιαφέροντα ερωτήματα για την προέλευση και την φυλογενετική πορεία της φυλής Άργους στη διάρκεια του χρόνου.

4.3 ΓΕΝΕΤΙΚΕΣ ΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ ΣΤΙΣ ΤΙΜΕΣ FEC

Στο 61,62 % του συνόλου των μελετηθέντων ζώων βρέθηκαν αναπαραγωγικά στοιχεία γαστρεντερικών παρασίτων. Από τα 50 πρόβατα της φυλής Άργους στα 41 ζώα (92,0 %) βρέθηκαν αναπαραγωγικά στοιχεία παρασίτων. Σε 28 ζώα καταμετρήθηκαν τιμές FEC άνω των 500 EPG με μέγιστη τιμή τα 4.000 EPG. Αντίστοιχα, στα Κοκοβίτικα πρόβατα οι τιμές ήταν γενικά χαμηλότερες, ενώ σε 12 ζώα από τα 36 ζώα που ήταν θετικά σε παράσιτα (90,2 %) εμφανίστηκαν παθολογικές τιμές (>500 EPG). Η μέγιστη τιμή που παρατηρήθηκε στα Κοκοβίτικα πρόβατα ήταν 13.000, ενώ η προηγούμενη υψηλότερη ήταν 2.400 EPG.

Το παράσιτο με την μεγαλύτερη συχνότητα εμφάνισης αναπαραγωγικών στοιχείων ήταν το *Eimeria* spp (πρωτόζωο), ενώ δευτερευόντως μεγάλος αριθμός αυγών ανιχνεύθηκε και για τα στρογγυλοειδή. Αυγά του νηματώδους *Strongyloides papillosus*, το οποίο θεωρείται και ιδιαίτερα μολυσματικό, βρέθηκαν κυρίως στην φυλή Άργους, ενώ αυγά του κεστώδους *Moniezia expansa* και του νηματώδους *Nematodirus filicollis* εντοπίστηκαν αποκλειστικά στην Κοκοβίτικη φυλή. Περισσότερα του ενός αναπαραγωγικά στοιχεία βρέθηκαν στο 86,1 % των ζώων Άργους και στο 30,5 % των Κοκοβίτικων ζώων.

Σύμφωνα με τον οδηγό Κτηνιατρικής Παρασιτολογικής Διαγνωστικής RCV/FAO, ο αριθμός των καταμετρημένων αναπαραγωγικών στοιχείων των παρασίτων, τείνει να αποκλίνει από το πραγματικό παρασιτικό φορτίο του ζώου σε ενήλικα παράσιτα, γεγονός που μπορεί να δικαιολογεί και μερικώς τα αυξημένα επίπεδα πειννογόνου

στο πλάσμα, παρά την φαινομενικά χαμηλή προσβολή. Οι παράγοντες που σχετίζονται με την απόκλιση αυτή αφορούν: Το είδος του παρασίτου, καθώς κάποια παράσιτα παράγουν μεγαλύτερο αριθμό αυγών σε σχέση με άλλα, την ηλικία και το φύλο του παρασίτου καθώς αυγά παράγονται από γόνιμα θηλυκά (ή ερμαφρόδιτα) παράσιτα σε κατάλληλο στάδιο ωριμότητας. Άλλοι παράγοντες είναι η αντίσταση και η ηλικία του ξενιστή μιας και σε ανοσοποιημένους ξενιστές η παραγωγή αναπαραγωγικών στοιχείων τείνει να είναι χαμηλή, η διατροφή του ξενιστή, καθώς ξενιστές που υποσιτίζονται τείνουν να είναι πιο ευάλωτοι σε παρασιτώσεις, ενώ και το είδος τροφής έχει σημασία. Η ένταση της μόλυνσης έχει ιδιαίτερη σημασία καθώς μεγάλη συγκέντρωση παρασίτων προκαλεί μείωση των αναπαραγωγικών στοιχείων (λόγω εποχής στον κύκλο ζωής του παρασίτου), ενώ αντίθετα, μεγάλος αριθμός αναπαραγωγικών στοιχείων σχετίζεται με χαμηλό αριθμό παρασίτων. Τέλος, η εποχή και οι κλιματολογικές συνθήκες αποτελούν παράγοντα απόκλισης επειδή η εποχικότητα των παρασίτων είναι κρίσιμος παράγοντας στις παρασιτικές μολύνσεις των μυρμηκαστικών, ενώ επίσης αυξημένα επίπεδα υγρασίας σχετίζονται με αυξημένη μολυσματικότητα, ενώ η συχνότητα αφοδεύσεων, η ποσότητα και η σύσταση των κοπράνων καθώς και οι συνθήκες υγιεινής επηρεάζουν την ένταση των παρασιτώσεων καθώς όσο μεγαλύτερη είναι η συχνότητα αφοδεύσης ανα 24ωρο, τόσο περισσότερο αραιώνεται και συγκέντρωση των αναπαραγωγικών στοιχείων των παρασίτων.

Στην μελέτη αυτή, δεν διαπιστώθηκε σημαντική συσχέτιση γονοτύπων και αλληλομόρφων με το είδος της παρασιτικής μόλυνσης ή τις τιμές FEC.

4.4 ΕΠΙΠΕΔΑ ΠΕΨΙΝΟΓΟΝΟΥ ΚΑΙ ΔΙΑΓΝΩΣΗ

ΕΝΔΟΠΑΡΑΣΙΤΙΚΗΣ ΛΟΙΜΩΞΗΣ

Ο καθορισμός των επιπέδων του πεψινογόνου στο πλάσμα του αίματος αποτελεί μια βοηθητική τεχνική στην διάγνωση παρασιτικών λοιμώξεων και χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά από τους Anderson *et al.* (1965). Η συγκέντρωση του πεψινογόνου στο πλάσμα εκφράζει την αντίδραση του ξενιστή σε μόλυνση από νηματώδη, ενώ οι τιμές FEC εκφράζουν γενικά την συμπεριφορά των παρασίτων εντός του ξενιστή (Stear *et al.*, 1995 a, b και Ciarlini *et al.*, 2000). Στα πειράματα των Stear *et al.* (2005), ενήλικα πρόβατα που είχαν υποστεί φυσική μόλυνση από

γαστρεντερικά νηματώδη εμφάνιζαν αύξηση της συγκέντρωσης του πεψινογόνου στο πλάσμα του αίματος, που σχετίζεται με την ανοσολογική απόκριση του ζώου και δεν αποτελεί κριτήριο υπολογισμού του παρασιτικού φορτίου. Η αύξηση της συγκέντρωσης του πεψινογόνου στο πλάσμα του αίματος ενήλικων προβατινών που βόσκουν σε βοσκοτόπους όπου και εκτίθενται σε προνύμφες παρασίτων, οφείλεται στην ανοσολογική αντίδραση υπερευαισθησίας που οδηγεί σε αύξηση της διαπερατότητας του βλεννογόνου του ηνύστρου (Yakoob *et al.*, 1983).

Αναστολή της αντίδρασης υπερευαισθησίας επέρχεται μέσω του φαινομένου της ανοσοκαταστολής που λαμβάνει χώρα 2 εβδομάδες πριν τον τοκετό και διαρκεί έως και για 8 εβδομάδες μετά τον τοκετό. Σε αυτήν την φάση δεν παρατηρείται αύξηση του πεψινογόνου. Μετά την φάση αυτή, όπου και αυξάνεται πάλι το πεψινογόνο στο πλάσμα, τα ζώα αποκρίνονται πιο αποτελεσματικά στην μόλυνση από παράσιτα, όντας ανοσοκατεσταλμένα μέσω της ορμονικής δράσης της προλακτίνης και άλλων ουσιών που παράγονται κατά τον τοκετό (Ciarlini *et al.*, 2000).

Μολυσματικές τιμές πεψινογόνου θεωρούνται αυτές άνω των 375 mI.U τυροσίνης, οπότε και υπάρχει εκδήλωση κλινικών συμπτωμάτων. Σε περίπτωση μόλυνσης ήδη ανοσοποιημένων ζώων, δεν υπάρχουν κλινικές ενδείξεις αλλά οι τιμές τυροσίνης εμφανίζονται αυξημένες. Αυτό συμβαίνει επειδή ο οργανισμός δρα με τον μηχανισμό της αντίδρασης της υπερευαισθησίας.

Η πλειοψηφία των μελετών που αφορούν στην συγκέντρωση πεψινογόνου στο πλάσμα, γίνονται συνήθως με παράλληλο προσδιορισμό των τιμών FEC, καθιστώντας ευκολότερη την ταυτοποίηση ανθεκτικών ή μη ζώων. Τα περισσότερα πειράματα έχουν διεξαχθεί σε τεχνητώς μολυσμένα ζώα (Coop 1971, Yakoob *et al.*, 1983 b, Fox *et al.*, 1988, Mostofa *et al.*, 1990 και Lawton *et al.*, 2005), ενώ κάποιες μελέτες έχουν διεξαχθεί και σε προβατίνες με φυσική μόλυνση (Thomas and Waller 1975, Yakoob *et al.*, 1983 a).

Σημαντική είναι η εκτίμηση των επιπέδων πεψινογόνου σε περιοχές με συχνές μολύνσεις από *Ostertagia* spp. ή *Haemonchus* sp., ενώ συχνά μετράται και ο αιματοκρίτης για εκτίμηση της αναιμίας, που αποτελεί κλινική ένδειξη νηματώδωσης. Επίσης για τα είδη *Ostertagia* spp και *Cooperia* spp. χρησιμοποιείται η ορολογική διαγνωστική τεχνική ELISA, χωρίς όμως να έχουν

βρεθεί σημαντικές συσχετίσεις μεταξύ ορολογικών τίτλων και παρασιτικού φορτίου.

Μια νέα μέθοδος που βασίζεται στον προσδιορισμό των επιπέδων των ανοσοσφαιρινών A (IgA) του ξενιστή, αποτελεί την πιο ακριβή και ασφαλή μέθοδο επιλογής προβάτων ως προς την φυσική ανοσία για τα τριχοστρογγύλιδα είδη (*Haemonchus* spp, *Ostertagia* spp, *Trichostrongylus* spp) (Shaw *et al.*, 2012). Τα IgA γενικά αναγνωρίζουν ως μοναδικό αντιγόνο έναν υδατάνθρακα που εντοπίζεται στην επιφάνεια των L3 προνυμφών και ονομάζεται CarLA (Carbohydrate Larval Antigen) και μετράται στην σίελο με εφαρμογή της ELISA. Στο πείραμα των Shaw *et al.* (2012) μετρήθηκαν οι τιμές FEC και οι τίτλοι ανοσοσφαιρινών και συγκρίθηκαν με διάφορα παραγωγικά χαρακτηριστικά. Η ουσία αντί- CarLA IgA στην σίελο έχει μεγαλύτερο συντελεστή κληρονόμησης ($h^2=0,3$) σε σχέση με άλλες ανοσοσφαιρίνες, παρουσιάζοντας αρνητική συσχέτιση με τις τιμές FEC ($r=-0,5$). Τα ζώα με υψηλά επίπεδα αντί- CarLA IgA έχουν μειωμένο FEC 20-30% σε σχέση με ζώα με χαμηλούς ή μηδενικούς τίτλους, ενώ έχουν και μεγαλύτερο ρυθμό ανάπτυξης. Παρά το αυξημένο κόστος της μεθόδου, αποτελεί μια απλή και χρήσιμη μέθοδο, μιας και η δειγματοληψία είναι γρήγορη και εύκολη και τα ζώα μπορούν να ταυτοποιηθούν με παράλληλη εφαρμογή ανθελμινθικής θεραπείας.

4.5 ΓΕΝΕΤΙΚΕΣ ΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ ΣΤΑ ΕΠΙΠΕΔΑ ΠΕΨΙΝΟΓΟΝΟΥ ΣΤΟ ΠΛΑΣΜΑ

Στην παρούσα μελέτη δεν βρέθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ των τιμών mI.U τυροσίνης και τιμών FEC. Επίσης σε καμία από τις δύο φυλές δεν βρέθηκε σχέση μεταξύ των τιμών mI.U τυροσίνης και του είδους αναπαραγωγικών στοιχείων των παρασίτων. Παρότι οι τιμές mI.U τυροσίνης και FEC σχετίζονται γενικά μεταξύ τους, δεν πρέπει να θεωρείται ότι η συσχέτιση αυτή είναι ευθέως ανάλογη.

Στην φυλή Άργους το ποσοστό των ζώων με παθολογικές τιμές mI.U τυροσίνης (>375 mI.U τυροσίνης) ήταν 20 %, ενώ στην Κοκοβίτικη φυλή ήταν 61 %. Στην Κοκοβίτικη φυλή επίσης παρατηρήθηκαν ιδιαίτερα ακραίες υψηλές τιμές της τάξεως των 11.000 mI.U τυροσίνης. Το γεγονός αυτό δεν συμβαδίζει απόλυτα με την εύρεση χαμηλού EPG για την φυλή αυτή και αυτό πιθανόν οφείλεται στην

ύπαρξη μεγάλου αριθμού ενήλικων και γόνιμων παρασίτων, που δρώντας στον οργανισμό ενισχύουν την ανοσολογική απόκριση υπερευαισθησίας των ζώων, η οποία με την σειρά της επιφέρει μεγαλύτερη διαπερατότητα στον βλεννογόνο του ηνύστρου, με συνέπεια τις παρατηρηθείσες τιμές mI.U τυροσίνης (Yakoob *et al.*, 1983b).

Η εξέταση των επιδράσεων των αλληλομόρφων Ovar-DRBI ως προς τις τιμές τυροσίνης πραγματοποιήθηκε στο σύνολο των ζώων και με χρήση των συχνότερα παρατηρούμενων αλληλομόρφων. Αυτό συνέβη τόσο λόγω μικρού αριθμού δείγματος, όσο και λόγω δράσεων διαφορετικών περιβαλλοντικών παραγόντων που δεν επιτρέπει σύγκριση σε επίπεδο φυλής.

Παρά το γεγονός ότι το αλληλόμορφο *1001 στην φυλή Άργους εμφανίστηκε τις περισσότερες φορές στην ομάδα χαμηλού παρασιτικού φορτίου, ενώ στην Κοκοβίτικη φυλή εμφανίστηκε αποκλειστικά στην ομάδα υψηλού παρασιτικού φορτίου, δεν υπήρξε στατιστικά σημαντική συσχέτιση του αλληλομόρφου με το FEC. Αυτό σημαίνει ότι πιθανώς ο τρόπος έκφρασης του αλληλομόρφου αυτού ή η συσχέτισή του με παρασιτολογικές παραμέτρους εξαρτάται έντονα από τον παράγοντα «φυλή».

Αναφορικά με την επίδραση των γονοτύπων στα επίπεδα τυροσίνης, για το αλληλόμορφο Ovar-DRBI*0105, παρατηρήθηκε αρνητική συσχέτιση ($P=0,042<0,05$) της ύπαρξης του αλληλομόρφου με τα επίπεδα τυροσίνης, ύπαρξη δηλαδή του αλληλομόρφου σχετιζόταν με υψηλότερες τιμές, ενώ παρατηρήθηκε και τάση διαφοροποίησης και για το αλληλόμορφο Ovar-DRBI*0312 ($P=0,08>0,05$).

4.6 ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΒΑΣΗ ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΣΕ ΠΑΡΑΣΙΤΩΣΕΙΣ

Οι διαφορές στην ευαισθησία μόλυνσης των ξενιστών από διάφορα είδη παρασίτων, έγκεινται σε μεγάλο βαθμό στην συσχέτιση μεταξύ των γονιδίων του ανοσοποιητικού συστήματος σε αλληλεπίδραση με τα παρασιτικά αντιγόνα. Σε ότι αφορά τους γενετικούς παράγοντες, ο πολυμορφισμός των γονιδίων του MHC και κυρίως των γονιδίων της Τάξεως II, αποτελούν σημαντικό παράγοντα ανθεκτικότητας ή ευαισθησίας σε ασθένειες (Behneke *et al.*, 2003 και 2006).

Μελέτες των Davies *et al.* (2006) σε πρόβατα Scottish Blackface, έδειξαν οι QTLs των χρωμοσωμάτων 2, 3, 4 και 20 συνδέονται με την ανθεκτικότητα σε νηματώδη, και ότι στο χρωμόσωμα 3 και 30 εδράζονται QTLs που συνδέονται με την εξειδίκευση που παρουσιάζουν τα IgA έναντι των νηματωδών. Ομοίως, μελέτη σε διασταυρωμένα πρόβατα από τους Crawford *et al.* (2006), έδειξε την συσχέτιση QTL του χρωμοσώματος 8 με ανθεκτικότητα σε παρασιτώσεις.

Τα αλληλόμορφα DRB του MHC έχουν συσχετιστεί με ανθεκτικότητα σε νηματώδη σε αιγοπρόβατα, βοοειδή, σε ποντίκια (Stear *et al.*, 1988, Stear *et al.*, 1990, Gasbarre, 1993, Outteridge *et al.*, 1996, Froeschke and Sommer 2005, Sayers *et al.*, 2005 και Stear *et al.*, 2005). Μελέτες των Froeschke and Sommer (2005 και 2012), έδειξαν σημαντική συσχέτιση των αλληλομόρφων DRB του είδους ποντικού *Rabdomys pumilio*. Συγκεκριμένα τα αλληλόμορφα Rhry-DRB*1, Rhry-DRB*38 βρέθηκαν να σχετίζονται με υψηλό παρασιτικό φορτίο, ενώ το αλληλόμορφο Rhry-DRB*8 με χαμηλό παρασιτικό φορτίο. Γενικά, το ποντίκι αποτελεί αντικείμενο πολλών μελετών όπου γονίδια του MHC έχουν συσχετισθεί με την ανθεκτικότητα σε μολύνσεις νηματωδών (Wassom and Kelly, 1990, Dainichi *et al.*, 2004), αλλά και με την εξειδίκευση της ανοσολογικής απόκρισης (Kennedy, 1989).

Άλλη μέθοδος που χρησιμοποιείται για την συσχέτιση MHC και ανθεκτικότητας σε νηματώδη είναι οι μικροσυστοιχίες DNA. Συγκριτική μελέτη που πραγματοποιήθηκε για την ανάλυση του ιστού του δωδεκαδάκτυλου ανθεκτικών και ευπαθών αρνιών που είχαν μολυνθεί φυσικά, έδειξε αυξημένη έκφραση γονιδίων, μεταξύ των οποίων και πολλά DRB1, DRA, DQA1, της Τάξεως II του MHC (Diez –Taycon *et al.*, 2005, Keane *et al.*, 2007). Με τον παραπάνω τρόπο παρατηρήθηκαν οι διαφορές μεταξύ ανθεκτικών και μη ζώων στην πρώιμη φάση της ανοσολογικής απόκρισης.

Κατά τους Stear *et al.* (2005), ο στατιστικός έλεγχος της σχέσης του πολυμορφισμού του MHC με τις παρασιτολογικές παραμέτρους στην φυλή Scottish Blackface έδειξε ότι το αλληλόμορφο G2 ή DRB1*1101, σχετίζεται με χαμηλό αριθμό αυγών παρασίτων, με μειωμένο αριθμό ενήλικων *Teladorsagia circumcincta*, ενώ μελέτη των Hassan *et al.* (2011) έδειξε ότι το εν λόγω αλληλόμορφο σχετίζεται με αυξημένη ανθεκτικότητα έναντι του νηματώδους αυτού και σε αρνιά της φυλής Suffolk. Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι μέσω της

μελέτης του βιοχημικού και φυσιολογικού ρόλου του Ovar-*DRBI**1101 στην παραπάνω εργασία, βρέθηκε ότι η ανθεκτικότητα που προσδίδει το αλληλόμορφο αυτό είναι επίκτητη και όχι έμφυτη, τονίζοντας έτσι την επίδραση που έχει το παράσιτο επί του ξενιστή, ασκώντας εξελικτική πίεση.

Αναφορικά με την επίδραση των παρασίτων επί της εξέλιξης της πολυμορφισμού του MHC, που αποτελεί μηχανισμό «δράσης-αντίδρασης», οδηγώντας την μεταβολή ενός εκ των δύο παραμέτρων διαρκώς, το παράσιτο *Trichostrongylus colubriformis* βρέθηκε να ρυθμίζει αρνητικά πολλά γονίδια *DRBI* και *DRA* των μεταναστευτικών κυττάρων της προσαγωγού λέμφου (Knight *et al.*, 2010).

Κατά γενικό κανόνα, οι γενετικοί παράγοντες διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην ανθεκτικότητα των ζώων σε ασθένειες που προκαλούνται από νηματώδη (Bisset *et al.*, 1992, Bishop *et al.*, 2004, Kemper 2010). Παρόλα αυτά, οι μελέτες που προσπαθούν να συσχετίσουν αλληλόμορφα και γονοτύπους με παρασιτολογικά χαρακτηριστικά και ανθεκτικότητα, συχνά χαρακτηρίζονται από αντικρουόμενα και ετερογενή αποτελέσματα. Αυτό οφείλεται στο μεγάλο εύρος παρασιτικών ειδών, στην διαφορά συνθηκών εκτροφής και διατροφής, στο σύνολο των περιβαλλοντικών παραγόντων που εκτίθενται τα ζώα και τέλος στην δραστηριότητα των IgA καθώς και στις αλληλεπιδράσεις που δύνανται να υπάρχουν μεταξύ των γονιδίων (Lee *et al.*, 2011).

4.7 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ-ΣΧΟΛΙΑΣΜΟΣ

4.7.1 Συμπεράσματα

- Μελετήθηκε και χαρακτηρίστηκε το γονοτυπικό προφίλ δύο σπάνιων Ελληνικών φυλών, που βρίσκονται υπό εξαφάνιση: της φυλής Άργους και της Κοκοβίτικης φυλής. Οι δύο φυλές είχαν σημαντικά υψηλό βαθμό πολυμορφισμού της γονιδιακής περιοχής του εξονίου 2 του γονιδίου *DRBI* του MHC. Το γεγονός αυτό έχει ιδιαίτερη σημασία στην προσπάθεια διατήρησης των φυλών αυτών, στην εκτέλεση πιθανών σχεδίων βελτίωσης και στην διατήρηση του πολυμορφισμού του MHC.
- Ταυτοποιήθηκε ένα νέο σπάνιο αλληλόμορφο στην φυλή Άργους, με ιδιαίζουσα σημασία για την προέλευση της φυλής αυτής.

- Μελέτη του άμεσα συσχετιζόμενου γονιδίου DQA για το δείγμα στο οποίο έφερε το νέο αλληλόμορφο, δεν έδειξε κάποιο νέο πολυμορφισμό στην εν λόγω περιοχή, κατέδειξε όμως την μεγάλη ομοιότητά του με την αντίστοιχη αλληλουχία των αιγών και των άγριων Μεγακέρατων προβάτων της Βορείου Αμερικής.

Αναφορικά με συσχετίσεις των γονιδιακών παραμέτρων με τις παρασιτολογικές παραμέτρους και με τα επίπεδα πεψινογόνου, δεν υπήρξαν σημαντικά ευρήματα, με εξαίρεση το αλληλόμορφο DRB1*0105 όπου παρατηρήθηκε αρνητική συσχέτιση του με τα επίπεδα mI.U τυροσίνης που καταμετρήθηκαν στο σύνολο των ζώων.

4.7.2 Σχολιασμός

Οι πολύπλοκοι μηχανισμοί και τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά των γονιδίων του MHC τα καθιστούν ανάμεσα στους καλύτερους γενετικούς δείκτες για μελέτες των μηχανισμών και της σημασίας της μοριακής προσαρμογής στα σπονδυλόζωα. Ο πολυμορφισμός του MHC αντανακλά εξελικτικές και προσαρμοστικές διαδικασίες εντός των πληθυσμών, ενώ η πίεση που ασκείται από τα διάφορα παθογόνα φαίνεται να είναι κινητήριος δύναμη στην διατήρηση του πολυμορφισμού αυτού.

Είναι πιθανή η υπόθεση ότι η διατήρηση και η ανανέωση των πολυμορφισμών των λειτουργικών τμημάτων του MHC, όπως είναι οι θέσεις πρόσδεσης των αντιγόνων, είναι το κύριο μέσο που διαθέτουν οι οργανισμοί στην αντιμετώπιση των συνεχώς εξελισσόμενων παθογόνων. Για αυτόν τον λόγο κρίνεται σημαντική η μελέτη των γονιδίων και των αλληλομόρφων του συστήματος αυτού, έτσι ώστε να ανιχνευθούν περαιτέρω καινούργια αλληλόμορφα που θα προσδίδουν ενδιαφέροντα χαρακτηριστικά στους ζωικούς πληθυσμούς καθώς και να μελετηθούν σε μεγαλύτερο βαθμό οι θετικές ή αρνητικές επιδράσεις των αλληλομόρφων αυτών.

Η μελέτη της συσχέτισης των αλληλομόρφων Ovar-DRB1 με παρασιτολογικές παραμέτρους είναι ένα αντικείμενο που έχει απασχολήσει πλήθος ερευνών καθώς υπάρχουν στοιχεία συσχέτισης των αλληλομόρφων αυτών με την παραγωγή αντισωμάτων, την ύπαρξη χαμηλότερων μετρήσεων αυγών παρασίτων και μεγαλύτερη ανθεκτικότητα σε ένα σύνολο ασθενειών.

Η μελέτη αυτή, παρά το γεγονός ότι δεν βρέθηκε μεγάλος αριθμός καινούργιων αλληλομόρφων, δείχνει ότι οι Ελληνικές φυλές μοιράζονται ένα μεγάλο αριθμό αλληλομόρφων και ότι πλέον μπορεί κανείς σε έναν τυχαίο πληθυσμό, σπάνιας ή μη φυλής, να εντοπίσει την γονιδιακή ποικιλομορφία του γονιδιακού τόπου DRB με μεγάλη ευκολία καθώς έχουν βρεθεί σε μεγάλο ποσοστό τα αλληλόμορφα που χαρακτηρίζουν τις ελληνικές φυλές. Το νέο αλληλόμορφο που βρέθηκε δείχνει πώς τα σπάνια αλληλόμορφα μπορεί μέσω μηχανισμών επιλογής να διατηρηθούν κατά την εξέλιξη μιας φυλής ή και εντός των ειδών, πιθανότατα επειδή προσδίδουν συνδυαστικά με άλλα γονίδια, σημαντικά παραγωγικά ή ανοσολογικά χαρακτηριστικά, κάτι το οποίο θα είχε ενδιαφέρον να μελετηθεί, ειδικά μέσω φυλογενετικών συσχετίσεων με τα πρόβατα της Ασιατικής Ηπείρου και τα Μεγακέρατα πρόβατα της Βορείου Αμερικής.

Η εύρεση αλληλομόρφων και γονοτύπων που θα προσδίδουν ανθεκτικότητα σε ασθένειες ή αυξημένα παραγωγικά χαρακτηριστικά θα μπορούσε να αποτελέσει βασικό κριτήριο προγραμμάτων επιλογής στα πρόβατα, έτσι ώστε να υπάρχει μεγιστοποίηση της παραγωγής και να μειωθούν τα έξοδα χορήγησης φαρμακευτικής αγωγής. Ειδικά μεγάλο ενδιαφέρον για τις ελληνικές φυλές θα είχε η διατήρηση και η περαιτέρω μελέτη σπάνιων αλληλομόρφων που πιθανά να προσδίδουν βελτιωμένα χαρακτηριστικά στην γαλακτοπαραγωγή, καθώς στο σύνολό τους οι φυλές αυτές είναι γαλακτοπαραγωγικής κατεύθυνσης.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Aderem A and DM Underhill DM (1999) Molecular mechanisms of phagocytosis. *Ann Rev Immunol* 17:593-623

Amills M, Ramiya V, Norimine J and Lewin HA (1998). The major histocompatibility complex of ruminants. *Rev. Sci. Tech. - O.I.E.* (Off. Int. Epizoot.) 17: 108-120.

Amills M, Jiménez N, Jordana J, Riccardi A (2004). Low diversity in the major histocompatibility complex class II DRB1 gene of the Spanish ibex (*Capra pyrenaica*) *Hered.* 93:266-272.

Anderson RC (1965). Nematode parasites of vertebrates- Their development and transmission, *CABI publishing*.

Andersson L (1988). Organisation of the bovine MHC class II region as revealed by genomic hybridizations. *Anim. Genet.* 19: 32-34.

Andersson L, Lunden A, Sigurdardottir S, Davies CJ, *et al.* (1988). Linkage relationships in the bovine MHC region. High recombination frequency between class II subregions. *Immunogenetics* 27: 273-280.

Andersson L, Rask L. (1988). Characterization of the MHC class II region in cattle: The number of DQ genes varies between haplotypes. *Immunogenetics* 27: 110-120.

Ballingall KT, Fardoe K, Mc Keever DJ (2008) Genomic organization and allelic diversity within coding and non-coding regions of the Ovar-DRB1 locus. *Immunogenetics* 60: 95-103.

Ballingall KT, Luyai A and McKeever DJ (1997). Analysis of genetic diversity at the DQA loci in African cattle: evidence for a *Bota-DQA3* locus. *Immunogenetics* 46: 237-244.

Ballingall KT, Rocchi MS, McKeever DJ, Wright F (2010). Trans-Species Polymorphism and Selection in the MHC Class II DRA Genes of Domestic Sheep . *PLOS ONE* 2010 DOI: 10.1371/journal.pone.0011402 PLOS ONE

Ballingall KT, Tassi R (2010). Sequence-based genotyping of the sheep MHC class II DRB1 locus. *Immunogenetics* 62: 31-39.

Ballingall KT, Wright H, Redmond J, Dutia BM, *et al.* (1992). Expression and characterization of ovine major histocompatibility complex class II (OLA-DR) genes. *Anim. Genet.* 23: 347-359.

Banchereau J, Steinman RM (1998). Dendritic cells and the control of immunity, *Nature.* Mar 19;392(6673):245-52

- Beck S and Trowsdale J (1999), The human Major Histocompatibility Complex: Lessons from the DNA Sequence, *Annual Review of Genomics and Human Genetics* Vol. 1: 117-137 (Volume publication date September 2000) DOI: 10.1146/annurev.genom.1.1.117
- Bernatchez L, Landry C (2003). MHC studies in non model vertebrates: what have we learned about natural selection in 15 years. *J Evol Biol* **16**: 363–377
- Beutler, B. 2004. Innate immunity: an overview. *Mol. Immunol.* **40**: 845–859.
- Biron, C. A., Nguyen, K. B., Pien, G. C., Cousens, L. P. & Salazar-Mather, T. P. (1999). Natural killer cells in antiviral defense: function and regulation by innate cytokines. *Annu Rev Immunol* **17**, 189–220.
- Bishop SC, Bairden K, McKellar QA, Park M, and Stear MJ (1996). Genetic parameters for faecal egg count following mixed, natural, predominantly *Ostertagia circumcincta* infection and relationships with live weight in young lambs. *Animal Science* **63** (3): 423–428.
- Bishop SC, Jackson F, Coop RL, Stear MJ (2004). Genetic parameters for resistance to nematode infections in Texel lambs and their utility in breeding programmes. *Animal Science*. **78** (2): 185–194.
- Bissett SA, Vlassoff A, Morris CA, Southey BR, Baker RL, Parker AGH (1992). Heritability and genetic correlations among faecal egg counts and productivity traits in Romney sheep. *New Zealand Journal of Agricultural Research*. **35** (1): 51-58.
- Bjorkman PJ (1997). MHC Restriction in Three Dimensions: A View of T Cell Receptor/Ligand Interactions. *Cell, Elsevier*. Volume 89, Issue 2, p167–170, DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80195-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80195-6)
- Bjorkman PJ, Samraoui B, Bennet WS, Strominger JL, Wiley DC (1987). The foreign antigen binding site and T cell recognition regions of class I histocompatibility antigens. *Nature* **329**, 512 - 518; doi:10.1038/329512a0
- Braud VM, Allan DS, McMichael AJ (1999). Functions of nonclassical MHC and non-MHC-encoded class I molecules, *Curr Opin Immunol*. 1999 Feb;11(1):100-8.
- Bretscher P, Cohn M (1979). A theory of self-non-self discrimination. *Science* **169** (950): 1042-1049.
- Brown JH, Jardetzky TS, Gorga JC, Stern LJ, *et al.* (1993). Three-dimensional structure of the human class II histocompatibility antigen HLA-DR1. *Nature* **364**: 33-39.
- Buitkamp J, Epplen JT (1996). Major histocompatibility and T-cell receptor genes in artiodactyls: characterization, polymorphism and genetic resistance to a helminthic infection. *J. Anim. Breed. Genet.* **113**: 287-291.

- Buitkamp J, Gostomski D, Schwaiger FW, Stear MJ, Epplen JT (1994). Association between the ovine major histocompatibility complex DRB1 gene and resistance to *Ostertagia circumcincta* infestation. *Animal Genetics* 25: 59-60.
- Buitkamp J, Filmether P, Stear MJ, Epplen JT (1996). Class I and class II major histocompatibility complex alleles are associated with faecal egg counts following natural, predominantly *Ostertagia circumcincta* infection. *Parasitology Research* 82: 693-696.
- Charbonnel N, Pemberton J (2005). A long-term genetic survey of an ungulate population reveals balancing selection acting on MHC through spatial and temporal fluctuations in selection. *Heredity* 95: 377-388.
- Charon KM, Moskwa B, Kuryl J, Gruszczynska J, *et al.* (2001). Relationship between polymorphism in locus OMHC1 (MHC class I) and resistance to nematodes in Polish Heatherhead sheep. *Anim. Sci. Pap. Rep.* 19: 285-292.
- Charon KM, Moskwa B, Rutkowski R, Gruszczynska J, Swiderek W (2002). Microsatellite polymorphism in DRB1 gene (MHC class II) and its relation to nematode faecal egg count in Polish Heath sheep. *J. Anim. Feed. Sci.* 11: 47-58.
- Ciarlini PC, Motta T, Kohayagawa A, Alencar NX, Amarante AFT, Lopes RS, Lenz, FF (2000). Serum pepsinogen concentration in Suffolk and Polwarth ewes at the end of gestation, during lactation and after weaning. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinaria* 9 (1): 17-21. 123
- Clarke B, Kirby DR (1996). Maintenance of histocompatibility polymorphisms. *Nature* 211: 999-1000.
- Coop RL (1971). The effect of large doses of *Haemonchus contortus* on the level of plasma pepsinogen and the concentration of electrolytes in the abomasal fluid of sheep. *Journal of Comparative Pathology* 81 (2): 213-9.
- Cowan, I. McT (1940). Distribution and variation in the native sheep of North America. *American Midland Naturalist* 24 (3): 505–580. doi:10.2307/2420858. JSTOR 2420858
- Crawford, A.M., Cuthbertson, R.P., (1996). Mutations in sheep microsatellites. *Genome Res.* 6, 876– 879.
- Crawford AM, Paterson KA, Dodds KG, Diez-Tascon C, *et al.* (2006). Discovery of quantitative trait loci for resistance to parasitic nematode infection in sheep: I. Analysis of outcross pedigrees. *BMG Genomics* 7: 178.
- Cullen PR, Bunch C, Brownlie J, Morris PJ (1982). Sheep lymphocyte antigens: a preliminary study. *Animal Blood Groups and Biomedical Genetics* 13: 149-159.
- Dainichi T, Maekawa Y, Ishii K *et al.* (2001). Nippocystatin, a cysteine protease

inhibitor from *Nippostrongylus brasiliensis*, inhibits antigen processing and modulates antigen-specific immune response. *Infection and Immunity* 69 (12): 7380–7386.

Davies G, Stear MJ, Benothman M, Abugob O, Kerr A, Mitchell S, Bishop SC (2006). Quantitative trait loci associated with parasite infection in Scottish blackface sheep. *Heredity* 96: 252-258.

Dietert RR, Miller TE and Golemboski KA (1996). Macrophages, polymorphonuclear neutrophils, and natural killer cells: The rapid response sector of the immune system, *The Physiology of Immunity*. CRC Press, Inc., Boca Raton, FL. pp.45-77

Diez-Tascon C, Keane OM, Wilson T, Zadissa A, Hyndman DL, *et al.* (2005). Microarray analysis of selection lines from outbred populations to identify genes involved with nematode parasite resistance in sheep. *Physiol. Genomics* 21: 59-69.

Dionne M, Miller KM, Dodson JJ, Bernatchez L (2009). MHC standing genetic variation and pathogen resistance in wild Atlantic salmon. *Phil Trans R Soc B* 364: 1555–1565.

Doherty PC, Zinkernagel RM (1975). Enhanced immunological surveillance in mice heterozygous at the H-2 gene complex. *Nature* 256: 50

Dorak MT (2005). Major histocompatibility complex. <http://dorakmt.tripod.com/mhc/mhc.html>. Accessed November 1, 2005.

Dukkipati VSR, Blair HT, Garrick DJ and Murray A (2006). ‘*Ovar-Mhc*’ - Ovine major histocompatibility complex: role in genetic resistance to diseases. *N. Z. Vet. J.* 54: 153-160.

Dutia BM, Hopkins J, Allington MP, Bujdoso R, *et al.* (1990). Characterization of monoclonal antibodies specific for alpha- and beta-chains of sheep MHC class II. *Immunology* 70: 27-32.

Dutia BM, McConnell I, Ballingall KT, Keating P, *et al.* (1994). Evidence for the expression of two distinct MHC class II DR beta like molecules in the sheep. *Anim. Genet.* 25: 235-241.

Ellis SA and Ballingall KT (1999). [Cattle MHC: evolution in action?](#). *Immunological Reviews*. 167(1):159 - 168.

Ellis S (2004). The cattle major histocompatibility complex: is it unique? *Vet Immunol Immunopathol.* 2004 Nov;102(1-2):1-8. Review.

Ellis SA, Holmes EC, Staines KA, Smith KB, Stear MJ, McKeever DJ, MacHugh ND, Morrison WI (1999). Variation in the number of expressed **MHC** genes in different cattle class I haplotypes, *Immunogenetics* Dec;50(5-6):319-28.

Escayg AP, Hickford JG, Montgomery GW, Dodds KG, *et al.* (1996). Polymorphism at the ovine major histocompatibility complex class II loci. *Anim. Genet.* 27: 305-312.

- Escayg AP, Montgomery GW, Hickford JG, Bullock DW (1993). A BgIII-RFLP at the ovine MHC class II DRA locus. *Animal Genetics* (24): 217.
- Escayg AP, Montgomery GW, Hickford JG, Bullock DW (1997). Association between alleles of the ovine major histocompatibility complex and resistance to footrot. *Research in Veterinary Science* 63 (3): 283-287.
- Fabb SA, Maddox JF, Gogolin-Ewens KJ, Baker L, Wu MJ, *et al.* (1993) Isolation, characterization and evolution of ovine major histocompatibility complex class II DRA and DQA genes. *Anim Genet* 24: 249–255.
- Falk, K., Rötzschke, O., Stefanovic, S., Jung, G., and Rammensee, H.-G. Allele specific motifs revealed by sequencing of self peptides eluted from MHC molecules. *Nature*. 1991; 351: 290–296
- Fearon DT, Locksley RM (1996). The Instructive Role of Innate Immunity in the Acquired Immune Response, *Science* : **272** (5258), 50-54.
- Forrest RHJ, Zhou H, Fang Q, Smyth A, Frampton CM, Hickford JGH (2010). No evidence for a universal association between variation in faecal egg count for a mixedfield-challenge of gastrointestinal parasites and the presence of the Ovar-DQA1 null haplotype in sheep. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 135 (3-4): 303–305.
- Fox MT, Pitt SR, Gerrelli D, Jacobs DE, Adhikari DR, Goddard PJ (1988). Use of blood gastrin assay in the diagnosis of ovine haemonchiasis. *The Veterinary Record* 122 (6): 136-137.
- Fremont DH, Hendrickson WA, Marrack P, Kappler J (1996). Structures of an MHC class II molecule with covalently bound single peptides. *Science* 17; 272(5264):1001-1004.
- French AR, Yokoyama WM (2003). Natural killer cells and autoimmunity, *Arthritis Res Ther*; 6(1): 8–14. December 9. doi: 10.1186/ar1034
- Froeschke G, Sommer S (2005). MHC class II DRB variability and parasite load in the striped mouse (*Rhabdomys pumilio*) in the Southern Kalahari. *Molecular Biology and Evolution* 22 (5): 1254–1259.
- Froeschke G, Sommer S (2012) Insights into the complex associations between MHC class II DRB polymorphism and multiple gastrointestinal parasite infestations in the Striped Mouse (*Rhabdomys pumilio*) in southern Africa. *PLoS ONE*, 7(2), e31820.
- Garcia CK (1999). Structural basis of T cell recognition. *Annual Immunological Reviews* 17: 369-397.
- Garrido JJ, de Andres DF, Pintado CO, Llanes D, Stear MJ (1995). Serologically defined lymphocyte alloantigens in Spanish sheep. *Exp. Clin. Immunogenetics* 12: 268-271.

- Gasbarre LC, Leighton EA, Davies CJ (1993). Influence of host genetics upon antibody responses against gastrointestinal nematode infections in cattle. *Veterinary Parasitology* 46 (1-4): 81–91.
- Gastrointestinal Parasites of Ruminants: Introduction The Merck Veterinary Manual <http://www.merckvetmanual.com/mvm/index.jsp?cfile=htm/bc/22400.htm>
- Germain RN, Margulies DH (1993). The biochemistry and cell biology of antigen processing and presentation. *Annual Review of Immunology* 11: 403-450.
- Gogolin-Ewens KJ, Mackay CR, Mercer WR, Brandon MR (1985). Sheep lymphocyte antigens (OLA). I. Major histocompatibility complex class I molecules. *Immunology* 56: 717-723.
- Grossberger D, Hein W, Marcuz A (1990). Class I major histocompatibility complex cDNA clones from sheep thymus: alternative splicing could make a long cytoplasmic tail. *Immunogenetics* 32: 77-87.
- Gruen JR, Weissman SM (1997). Evolving views of the major histocompatibility complex. *Blood* 90: 4252-4265.
- Hamerman JA, Ogasawara K, Lanier LL (2005). NK cells in innate immunity. *Curr Opin Immunol.* Feb;17(1):29-35. Review. PMID:15653307
- Hamilton WD (1980). Sex versus non-sex versus parasite. *Oikos* 35: 282-290.
- Harty, J.T., Tvinnereim, A.R., and White, D.W. (2000). CD8+ T cell effector mechanisms in resistance to infection. *Annu. Rev. Immunol.* 18, 275–308.
- Hassan M, Good B, Hanrahan JP, Campion D, Sayers G, Mulcahy G, Sweeney T (2011). The dynamic influence of the DRB1*1101 allele on the resistance of sheep to experimental *Teladorsagia circumcincta* infection. *Veterinary Research* 42 (1): 46.doi: 10.1186/1297-9716-42-46.
- Heath WR, Belz GT, Behrens GM, Smith CM, Forehan SP, Parish IA, Davey GM, Wilson NS, Carbone FR, Villadangos JA (2004). Cross-presentation, dendritic cell subsets, and the generation of immunity to cellular antigens. *Immunol. Rev.*; 199:9–26
- Hediger R, Ansari HA, Stranzinger GF (1991). Chromosome banding and gene localizations support extensive conservation of chromosome structure between cattle and sheep. *Cytogenet. Cell Genet.* 57: 127-134.
- Hedrick PW, Gutierrez-Espeleta GA, Lee RN(2001). Founder effects in an island population of bighorn sheep. *Mol Ecol*, 10:851-857.

Hedrick PW (1994). Evolutionary genetics of the major histocompatibility complex. *Am. Nat.* 143:945–964. -2002. Pathogen resistance and genetic variation at MHC loci. *Evolution* 56:1902–1908.

Hedrick PW (2002). Pathogen resistance and genetic variation at MHC loci. *Evolution* 56: 1902-1908.

Hedrick PW, Kim TJ (1998). Genetics of complex polymorphisms: parasites and maintenance of MHC variation (Evolutionary Genetics from Molecules to Morphology by Singh RS & Krimbas CK, Cambridge University Press, New York).

Hedrick PW, Thompson G (1987). Evolutionary genetics and HLA: another classical example. *Biol J Linn Soc* 31: 311–331.

Hill AVS, Allsopp CEM, Kwiatowski D, Anstey NM, Twumasi P, Rowe PA *et al* (1991). Common West African HLA antigens are associated with protection from severe malaria. *Nature* 352: 595–600

Hirschowitz BI (1955). Pepsinogen in the blood. *J. of Lab. Clin. Med.* 46: 568-579.
127

Hohenhaus MA, Outteridge PM (1995). The immunogenetics of resistance to *Trichostrongylus colubriformis* and *Haemonchus contortus* parasites in sheep, *Br Vet J.* Mar-Apr;151(2):119-40.

ICAR (2003): International Agreement of Recording Practices. International Committee for Animal Recording ed., Interlaken, Switzerland.

Janeway CA (1993). How the immune system recognizes invaders. *Scientific American*: 41-47.

Janeway CA Jr, Medzhitov R (2002). Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol.*;20:197

Janeway CA, Travers P (1996). *Immunobiology: The Immune System in Health and Disease* 2nd ed. Current Biology Publications, London.

Jennings FW, Armour J, Lawson DD, Roberts R (1966). Experimental *Ostertagia ostertagi* infection in calves; Studies with abomasal cannulas. *American Journal of Veterinary Research.* (27): 1249-1257.

Jugo BM, Joosten I, Grosfeld-Stulemeyer M, Amorena B, Hensen EJ (2002). Immunoprecipitation and isoelectric focusing of sheep MHC class I antigens reveal higher complexity than serology. *European Journal of Immunogenetics* 29: 391-399.

Jugo BM, Vicario A (2001). Lymphocyte antigens in sheep: linkage to the MHC class II DRB1 gene. *European Journal of Immunogenetics* 28: 451-458.

Ke Y, Kapp JA. Oral antigen inhibits priming of CD8+ CTL, CD4+ T cells, and antibody responses while activating CD8+ suppressor T cells. *J Immunol.* 1996 Feb 1;156(3):916–921

Keane OM, Dodds KG, Crawford AM, McEwan JC (2007). Transcriptional profiling of *Ovis aries* identifies Ovar-DQA1 allele frequency differences between nematoderesistant and susceptible selection lines. *Physiological Genomics* 30 (3): 253–261.

Kelley J, Walter L, Trowsdale J (2005). Comparative genomics of major histocompatibility complexes. *Immunogenetics* 56: 683-695.

Kemper KE, Palmer DG, Liu SM, Greeff JC, Bishop SC, Karlsson LJ (2010). Reduction of faecal worm egg count, worm numbers and worm fecundity in sheep selected for worm resistance following artificial infection with *Teladorsagia circumcincta* and *Trichostrongylus colubriformis*. *Veterinary Parasitology* 171 (3-4): 238-246.

Kennedy MW. (1989). Genetic control of the immune repertoire in nematode infections. *Parasitology Today* 5: 316-324.

Khan WI (2008). Physiological changes in the gastrointestinal tract and host protective immunity: learning from the mouse-*Trichinella spiralis* model. *Parasitology* 135 (6) 671–682.

Klein J (1986). Natural history of the major histocompatibility complex. John Wiley and Sons Inc., New York, NY, USA.

Klein J, Bontrop RE, Dawkins RL, Erlich HA, *et al.* (1990). Nomenclature for the major histocompatibility complexes of different species: a proposal. *Immunogenetics* 31: 217-219.

Klein J, Satta Y, O’huigin C and Takahata N (1993). The molecular descent of the major histocompatibility complex. *Annu. Rev. Immunol.* 11: 269-295.

Klein J, Sato A and O’huigin C (1998). Evolution by gene duplication in the major histocompatibility complex. *Cytogenet. Cell Genet.* 80: 123-127.

Knight JS, Baird DB, Hein WR, Pernthaner A (2010). The gastrointestinal nematode *Trichostrongylus colubriformis* down-regulates immune gene expression in migratory cells in afferent lymph. *BMC Immunology*, vol. 11, article 51.

Konnai S, Nagaoka Y, Takesima S, Onuma M, *et al.* (2003b). Sequences and diversity of 17 new Ovar-DRB1 alleles from three breeds of sheep. *Eur. J. Immunogenet.* 30: 275-282.

Konnai S, Nagaoka Y, Takesima S, Onuma M, Aida Y. (2003c). Technical note: DNA typing for ovine MHC DRB1 using polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP). *J. Dairy Sci.* 86: 3362-3365.129

- Konnai S, Takesima S, Tajima S, Yin SA, Okada K, Onuma M, Aida Y (2003a). The influence of ovine MHC class II DRB1 alleles on immune response in bovine leukaemia virus infection. *Microbiology and Immunology* 47: 223-232.
- Korot'ko GF, Islyamova ME (1963). Determination of the proteolytic activity of gastric juice, urine, and serum. *Sib. Sci. Trans. Andrharsk. Med. Inst.* 4: 114-126.
- Kulski JK, Shiina T, Anzai T, Kohara S, *et al.* (2002). Comparative genome analysis of the MHC: the evolution of class I duplication blocks, diversity and complexity from shark to man. *Immunological Reviews* 190: 95-122.
- Landry C, Bernatchez L (2001). Comparative analysis of population structure across environments and geographical scales at major histocompatibility complex and microsatellite loci in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Mol Ecol* 10: 2525–2539
- Lawton, AP, Prigozy TI, Brossay L, Pei B, Khurana A, Martin D, Zhu T, Spate K, Ozga M, Honing S, Bakke O and Kronenberg M. (2005). The mouse CD1d cytoplasmic tail mediates CD1d trafficking and antigen presentation by adaptor protein 3-dependent and -independent mechanisms. *J Immunol*, Vol. 174, (6), pp. 3179-3186
- Lawton DE, Reynolds GW, Hodgkinson SM, Pomroy WE, Simpson HV (1996). Infection of sheep with adult and larval *Ostertagia circumcincta*: effects on abomasal pH and serum gastrin and pepsinogen. *International Journal for Parasitology* 26 (10): 1063-74.
- Lee N, Llano M, Carretero M, Ishitani A, *et al.* (1998). HLA-E is a major ligand for the natural killer inhibitory receptor CD94/NKG2A. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 5199-5204.
- Lee CY, Munyard KA, Gregg K, Wetherall JD, Stear MJ, Groth DM (2011). The influence of MHC and immunoglobulins a and e on host resistance to gastrointestinal nematodes in sheep. *Journal of Parasitology Research* doi: 10.1155/2011/101848. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3092517/#__ffn_sectitle
- Lehninger, Albert L.; Nelson, David L.; Cox, Michael M. (2008). Principles of Biochemistry (5th ed.). *New York, NY: W.H. Freeman and Company*
- Lewin HA (1996). Genetic organization, polymorphism and function of the bovine major histocompatibility complex, L. B. Schook and S. J. Lamont (eds.), *The Major Histocompatibility Complex of Domestic Animal Species. CRC Press*, pp. 65-98.
- Lewin, AY, Long CP and Carroll TN (1999). The Coevolution of New Organizational Forms, *Organization Science*, vol. 10, no. 5, pp. 535-550
- Liu X, Fu Y, Liu Z, Lin B, Xie Y, Liu Y, *et al* (2006). An ancient balanced polymorphism in a regulatory region of human major histocompatibility complex is retained in Chinese minorities but lost worldwide. *American Journal of Human Genetics* ;78:393.

- Luffau G, Khang JTV, Bouix J, Nguyen TG, Cullen P, Ricordeau G. (1990). Resistance to experimental infections with *Haemonchus contortus* in Romanov sheep. *Genetics, Selection, Evolution* 22: 205-229
- Maddox JF (1999). Single strand conformational polymorphisms in the second exons of the ovine DMB, DYA and DYB genes. *Anim. Genet.* 30: 382-383.
- Maddox JF, Davies KP, Crawford AM, Hulme DJ, Vaiman D, Cribiu EP *et al* (2001). An enhanced linkage map of the sheep genome comprising more than 1000 loci. *Genome Res* 11: 1275–1289
- Mahdy EA, Makinen A, Chowdhary BP, Andersson L, Gustavsson I (1989). Chromosomal localization of the ovine major histocompatibility complex (OLA) by *in situ* hybridization. *Hereditas* 111: 87-90.
- Marsh SGE and Bodmer JG (1993) *Hum Immunol* 36,44
- McCrie L, Bairden K, Britton C, Buitkamp J, *et al.* (1997). Heterogeneity in the recognition of *Ostertagia circumcincta* antigens by serum antibody from mature, infected sheep. *Parasite Immunology* 19: 235-242.
- McKellar QA, Mostofa M, Eckersall PD (1990). Stimulated pepsinogen secretion from dispersed abomasal glands exposed to *Ostertagia* species secretion. *Research in Veterinary Science* 48 (1): 6-11.
- Meadows JR, Hanotte O, Drögemüller C, Calvo J, Godfrey R, Coltman D, Maddox JF, Marzanov N, Kantanen J, Kijas JW (2006). Globally dispersed Y chromosomal haplotypes in wild and domestic sheep., *Anim Genet.* Oct;37(5):444-53.
- Medzhitov R, Janeway C Jr (2000). Innate immunity, *N Engl J Med.*;343(5):338-44.
- Messaoudi E, Ying SW, Kanhema T, Croll SD, and Bramham CR (2002) Brain-derived neurotrophic factor triggers transcription-dependent, late phase long-term potentiation in vivo. *J Neurosci* 22: 7453-7461
- Meyer-Lucht Y, Sommer S (2005). MHC diversity and the association to nematode parasitism in the yellow-necked mouse (*Apodemus flavicollis*). *Molecular Ecology* 14 (7): 2233-2243.
- Meyer D, Thomson G (2001). How selection shapes variation of the human major histocompatibility complex: a review. *Annu Hum Genet* 65: 1–26
- MHC Sequencing Consortium (1999). Complete sequence and gene map of a human major histocompatibility complex. *Nature* 401: 921-923.
- Miller KM, Kaukinen KH, Beacham TD, Withler ME (2001). Geographic heterogeneity in natural selection on an MHC locus in sockeye salmon. *Genetica* 111: 237–257

- Millot P (1978). The major histocompatibility complex of sheep (OLA) and two minor loci. *Anim. Blood Groups Biochem. Genet.* 9: 115-121.
- Millot P (1984). The OLA major histocompatibility complex of sheep. Study of six new factors and evidence of a third locus of the complex: OLA-C. *Exp. Clin. Immunogenet.* 1: 31-42.
- Miltiadou D, Ballingall KT, Ellis SA, Russel GC, *et al.* (2005). Haplotype characterization of transcribed ovine major histocompatibility complex (MHC) class I genes. *Immunogenetics* 57: 499-509.
- Mostofa M, McKellar QA, Eckersall PD, Gray D (1990). Pepsinogen types in wormfree sheep and in sheep infected with *Ostertagia circumcincta* and *Haemonchus contortus*. *Research in Veterinary Science* 48 (1): 108-111.
- Murray M (1969). Structural changes in bovine ostertagiasis associated with increased permeability of the bowel wall to macromolecules. *Gastroenterology.* 56 (4): 763-72.
- Oliver MK, Telfer S, Piertney SB (2009) Major histocompatibility complex (MHC) heterozygote superiority to natural multi-parasite infections in the water vole (*Arvicola terrestris*). *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 276: 1119–1128
- Outteridge PM, Andersson L, Douch PGC, Green RS, *et al.* (1996). The PCR typing of MHC-DRB genes in the sheep using primers for an intronic microsatellite: application to nematode parasite resistance. *Immunol. Cell Biol.* 74: 330-336.
- Outteridge PM, Windon RG, Dineen JK (1985). An association between a lymphocyte antigen in sheep and response to vaccination against the parasite *Trichostrongylus colubriformis*. *International Journal for Parasitology* 15: 121-127.
- Parham P (2009). *The Immune System, Garland Science*
- Parker DC (1993). T cell-dependent B cell activation, *Annual review of immunology* 11 (1), 331-360
- Paterson S (1998). Evidence for balancing selection at the major histocompatibility complex in a free-living ruminant. *J Hered* 89: 289–294.
- Paterson S, Wilson K, Pemberton JM (1998). Major histocompatibility complex variation associated with juvenile survival and parasite resistance in a large unmanaged ungulate population (*Ovis aries* L.). *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 3714–3719
- Pemberton JM, Smith JA, Coulson TN, Marshall TC, Slate J, Paterson S *et al* (1996). The maintenance of genetic polymorphism in small island populations: large mammals in the Hebrides. *Philos Trans R Soc Lond Ser B* 351: 745–752.

Podolsky D (1999). Mucosal immunity and inflammation. V. Innate mechanisms of mucosal defense and repair: The best offense is a good defense. *Am J Physiol* 277: G495–G499

Puri NK, Brandon MR (1987). Sheep MHC class II molecules: II. Identification and characterization of four distinct subsets of sheep MHC class II molecules. *Immunology* 62: 575-580.

Puri NK, Gogolin-Ewens KJ, Brandon MR (1987a). Monoclonal antibodies to sheep MHC class I and II molecules: biochemical characterization of three class I gene products and four distinct subpopulations of class II molecules. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 15: 59-86.

Puri NK, Mackay CR, Brandon MR (1985). Sheep lymphocyte antigens (OLA). II. Major histocompatibility complex class II molecules. *Immunology* 56: 725-733.

Puri NK, Scott SC, Choi CL, Brandon MR (1987d). Biochemical and molecular analysis of sheep MHC class II molecules. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 17: 231-241

Reyburn H, Mandelboim O, Vales-Gomez M, Sheu EG, *et al.* (1997). Human NK cells: their ligands, receptors and functions. *Immunol. Rev.* 155: 119-125.

Rhodes D, Trowsdale J (1998). Genetics and molecular genetics of the MHC. <http://www-immuno.path.cam.ac.uk/~immuno/mhc/mhc.html>.

Rivett AJ (1993). Proteasomes: multicatalytic proteinase complexes. *Biochem. J.* 291: 1-10.

Ρογδάκης Εμ, Γενετική Βελτίωση των Αγροτικών Ζώων, Γ.Π.Α. (Αθήνα 1993).

Ρογδάκης Εμ, Εγχώριες Φυλές Προβάτων: Περιγραφή, Φυλογένεια, Γενετική Βελτίωση, Διαφύλαξη. Εκδόσεις ΑγροΤύπος ΑΕ (Αθήνα 2002).

Roos MH (1997). The role of drugs in the control of parasitic nematode infections: must we do without? *Parasitology* 114: 437-438.

Rousset F (2008). Genepop'007: A complete reimplementation of the Genepop software for Windows and Linux. *Mol. Ecol. Resources* (8): 103-106.

Rudensky AY, Prestonhurplburt P, Hong SC, *et al.* (1991). Sequence analysis of peptides bound to MHC class II molecules. *Nature* 353: 622-627.

Sallusto, F., Cella, M., Danieli, C. & Lanzavecchia, A. (1995) Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate macromolecules in the major histocompatibility complex II compartment: downregulation by cytokines and bacterial products. *Journal of Experimental Medicine*, 182, 389± 400.

Saberivand A, Sackey D, Hohenraus MA, Outteridge PM (1998). Microsatellite

genotyping of MHC-DRB genes in sheep and goats. Paper presented at the 6th World 134 Congress on Genetics Applied to Livestock Production, January 11-16, Armidale, NSW, Australia.

Sallusto F., Schaerli P., Loetscher P., Scharniel C., Lenig D., Mackay C.R., Qin S., Lanzavecchia A. Rapid and coordinated switch in chemokine receptor expression during dendritic cell maturation. *Eur. J. Immunol.* 1998;28:2760–2769.

Sambrook J, Fritsch FE, Maniatis T (1989). *Molecular cloning. A Laboratory Manual* 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Sayers G, Good B, Hanrahan JP, Ryan M, *et al.* (2005). Major histocompatibility complex DRB1 gene: its role in nematode resistance in Suffolk and Texel sheep breeds. *Parasitology* 131: 403-409.

Schwaiger FW and Epplen JT (1995). Exonic MHC-DRB polymorphisms and intronic simple repeat sequences: Janus' faces of DNA sequence evolution. *Immunol. Rev.* 143: 199-224.

Schwaiger FW, Buitkamp J, Weyers E and Epplen JT (1993a). Typing of artiodactyl MHC-DRB genes with the help of intronic simple repeated DNA sequences. *Mol. Ecol.* 2: 55-59.

Schwaiger FW, Weyers E, Epplen C, Brun J, *et al.* (1993b). The paradox of MHC-DRB exon/intron evolution: alpha-helix and beta-sheet encoding regions diverge while hypervariable intronic simple repeats coevolve with beta-sheet codons. *J. Mol. Evol.* 37: 260-272.

Schwaiger FW, Weyers E, Buitkamp J, Ede AJ, *et al.* (1994). Interdependent MHC-DRB exon-plus-intron evolution in artiodactyls. *Mol. Biol. Evol.* 11: 239-249.

Schwaiger FW, Gostomski D, Stear MJ, Duncan JL, *et al.* (1995). An ovine major histocompatibility complex DRB1 allele is associated with low faecal egg counts following natural, predominantly *Ostertagia circumcincta* infection. *Int. J. Parasitol.* 25: 815-822.

Schwaiger FW, Maddox J, Ballingall K, Buitkamp J, *et al.* (1996). The ovine major histocompatibility complex. In: *The major histocompatibility complex region of domestic animal species* (Schook LB and Lamont SJ, eds.). CRC Press, Inc., Boca Raton, FL, USA, 121-176.

SCOPS (Sustainable Control of Parasites in Sheep), Sustainable Worm Control Strategies for Sheep 3rd Edition, Abbott KA, Taylor M, Stubbings LA. A Technical Manual for Veterinary Surgeons and Advisers (2009). *Context Publications*.

Scott PC, Choi CL and Brandon MR (1987). Genetic organization of the ovine MHC class II region. *Immunogenetics* 25: 116-122.

Scott PC, Gogolin-Ewens KJ, Adams TE and Brandon MR (1991a). Nucleotide sequence, polymorphism, and evolution of ovine MHC class II DQA genes. *Immunogenetics* 34: 69-79.

Scott PC, Maddox JF, Gogolin-Ewens KJ and Brandon MR (1991b). The nucleotide sequence and evolution of ovine MHC class II B genes: DQB and DRB. *Immunogenetics* 34: 80-87.

Shaw RJ, Morris CA, Wheeler M, Tate M, Sutherland IA (2012). Salivary IgA: a suitable measure of immunity to gastrointestinal nematodes in sheep. *Veterinary Parasitology* 186 (1-2): 109-17.

SHEEP 201, A Beginners Guide to Raising Sheep, www.sheep201.info
135 Sheep Vet online Australia, Faecal Egg Counts and Effective Worm Control
Simms EL (2000). Defining tolerance as a norm of reaction. *Evolutionary Ecology* 14:563-570.

Slate J, Kruuk L, Marshall T, Pemberton J, Clutton-Brook T(2000) Inbreeding depression influences lifetime breeding success in a wild population of red deer (*Cervus elaphus*). *Proc R Soc Lond B*, 267:1657-1662

Snibson, K. J., J. F. Maddox, S. A. Fabb, and M. R. Brandon (1998). Allelic variation of ovine MHC class II *DQA1* and *DQA2* genes. *Anim. Genet.* 29:356–362.

Solomons Graham T.W., (1999). Chimica Organica. Seconda edizione italiana a cura di Ortaggi G. Misiti D. *Zanichelli*. Sonstegard TS, Gasbarre LC (2001). Genomic tools to improve parasite resistance. *Veterinary Parasitology* 101: 387-403. Open Access Highly Accessed Review

Sommer S (2005). The importance of immune gene variability (MHC) in evolutionary ecology and conservation , *Animal Ecology & Conservation, Biocentre Grindel, University of Hamburg, Martin-Luther-King-Platz 3, D-20146 Hamburg, Germany, Frontiers in Zoology* 2005, 2:16 doi:10.1186/1742-9994-2-16

Spooner RL, Innes EA, Glass EJ, Millar P and Brown CGD (1988). Bovine mononuclear cell lines transforms by *Theileria parva* or *Theileria annulata* express different subpopulation markers. *Parasite Immunology* 10, 619-629

Σπετσαρίας Σταύρος (Φεβρουάριος 2009). Παραλλακτικότητα του γονιδίου DRB1 του Μείζονος Συστήματος Ιστικής Συμβατότητας σε ελληνικές φυλές προβάτων» Μεταπτυχιακή Μελέτη. Εργαστήριο Γενικής και Ειδικής Ζωοτεχνίας, Τμήμα Επιστήμης Ζωικής Παραγωγής και Υδατοκαλλιεργειών, Γ.Π.Α

Σπετσαρίας Σταύρος (Δεκέμβριος 2013) «Παραλλακτικότητα του γονιδίου DRB1 σε ελληνικές φυλές προβάτων και συσχετισμός των αλληλομόρφων του με παρασιτολογικές και παραγωγικές παραμέτρους». Διδακτορική Διατριβή. Εργαστήριο Γενικής και Ειδικής Ζωοτεχνίας, Τμήμα Επιστήμης Ζωικής Παραγωγής και Υδατοκαλλιεργειών, Γ.Π.Α

Srivastava PK, Menoret A, Basu S, Binder RJ, *et al.* (1998). Heat-shock proteins come of age: primitive functions acquire new roles in an adaptive world. *Immunity* 8: 657-665.

Stear MJ, Abuagob O, Benothman M, Bishop SC, Innocent G, Kerr A, Mitchell S (2006). Variation among faecal egg counts following natural nematode infection in Scottish Blackface lambs. *Parasitology* 132: 275-280.

Stear MJ, Bairden K, Bishop SC *et al.* (1997a). The genetic basis of resistance to *Ostertagia circumcincta* in lambs. *Veterinary Journal* 154 (2): 111-119.

Stear MJ, Bairden K, Bishop SC, Buitkamp J, *et al.* (1996). An ovine lymphocyte antigen is associated with reduced faecal egg counts in four-month-old lambs following natural, predominantly *Ostertagia circumcincta* infection. *International Journal for Parasitology* 26: 423-428.

Stear MJ, Bairden K, Duncan JL *et al.* (1997b). How hosts control worms. *Nature*, 389: 27.

Stear MJ, Belch A, Donskow-Schmelter K *et al.* (2007). Detection of genes with moderate effects on disease resistance using ovine mhc and resistance to nematodes as an example. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 120 (1-2): 3-9.

Stear MJ, Bishop SC, Doligalska M, Duncan JL, Holmes PH, Irvine J, McCririe L, McKellar QA, Sinski E, Murray M (1995a). Regulation of egg production, worm burden, worm length and worm fecundity by host responses in sheep infected with *Ostertagia circumcincta*. *Parasite Immunology* 17 (12): 643-652.136

Stear MJ, Bishop SC, Duncan JL, McKellar QA, Murray M (1995b). The repeatability of faecal egg counts, peripheral eosinophil counts, and plasma pepsinogen concentrations during deliberate infections with *Ostertagia circumcincta*. *International Journal for Parasitology* 25 (3): 375-380.

Stear MJ, Bishop SC, Mallard BA, Raadsma H (2001). The sustainability, feasibility and desirability of breeding livestock for disease resistance. *Research in Veterinary Science* 71(1): 1-7.

Stear MJ, Hetzel DJ, Brown SC, Gershwin LJ, Mackinnon MJ, Nicholas FW (1990). The relationships among ecto- and endoparasite levels, class I antigens of the bovine major histocompatibility system, immunoglobulin E levels and weight gain. *Veterinary Parasitology* 34(4): 303-321.

Stear MJ, Innocent GT, Buitkamp J (2005). The evolution and maintenance of polymorphism in the major histocompatibility complex. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 108: 53-57.

Stear MJ, Spooner RL (1981). Lymphocyte antigens in sheep. *Anim. Blood Groups Biochem. Genet.* 12: 272-276.

- Stear MJ, Tierney TJ, Baldock FC, Brown SC, Nicholas FW, Rudder TH (1988). Class I antigens of the bovine major histocompatibility system are weakly associated with variation in faecal worm egg counts in naturally infected cattle. *Animal Genetics* 19 (2): 115–122.
- Stear, M.J., Wakelin, D., 1998. Genetic resistance to parasitic infection. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.* 17, 143-153.
- Steinman R.M., Turley S., Mellman I., Inaba K. The induction of tolerance by dendritic cells that have captured apoptotic cells. *J. Exp. Med.* 2000;191:411–416.
- Stern LJ, Brown JH, Jardetzky TS, Gorga JC, Urban RG, Strominger JL, Wiley DC. (1994). Crystal structure of the human class II MHC protein HLA-DR1 complexed with an influenza virus peptide. *Nature, London* 368: 215-221.
- Subramaniam R, White SN, Herrmann-Hoesing LM, Srikumaran S (2012). MHC class II DR allelic diversity in bighorn sheep. *Gene* (1): 217-22.
- Summers K, McKeon S, Sellars J *et al.* (2003). Parasite exploitation as an engine of diversity. *Biological Reviews.* 78: 639–675.
- Takeshima SN and AIDA Y (2006). Structure, function and disease susceptibility of the bovine major histocompatibility complex, *Animal Science Journal* (2006) **77**, 138–150
- Θεοδωρόπουλος Γ (2000). Εργαστηριακές Μέθοδοι Εργαστηρίου Παρασιτολογίας. Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών. 137
- Θεοδωρόπουλος Γ (1991). Τα παράσιτα των μηρυκαστικών. Σημειώσεις Κτηνιατρικής. Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών. The RVC/FAO Guide to Veterinary Diagnostic Parasitology <http://www.rvc.ac.uk/review/parasitology/RuminantEggs/Common.htm>
- Thomas RJ, Waller PJ (1975). Significance of serum pepsinogen and abomasal pH levels in a field infection of *O circumcincta* in lambs. *The Veterinary Record* 97 (24): 468-71.
- Thorsby E. (1999). MHC structure and function. *Transplantation Proceedings* 31, 713-716.
- Tizard IR (2004). Acquired immunity: antigen-presenting receptors. In: *Veterinary Immunology: an introduction. Elsevier, Philadelphia, PA, USA, 67-77.*
- Tollenaere C, Bryja J, Galan M, Cadet P, Deter J, *et al.* (2008) Multiple parasites mediate balancing selection at two MHC class II genes in the fossorial water vole: insights from multivariate analyses and population genetics. *J Evol Biol* 21: 1307–1320.

van der Merwe PA, Bodian DL, Daenke S, Linsley P, and Davis S.J (1997). CD80 (B7-1) binds both CD28 and CTLA-4 with a low affinity and very fast kinetics. *J. Exp. Med.* **185**, 393–403.

van Eijk MJ, Beever JE, Da Y, Stewart JA, *et al.* (1995). Genetic mapping of BoLA-A, CYP21, DRB3, DYA and PRL on BTA23. *Mamm. Genome* 6: 151-152.

Wassom DL, Kelly EAB (1990). The role of the major histocompatibility complex in resistance to parasite infections. *Critical Reviews in Immunology* 10 (1): 31–52.

Webb GC and Chaplin DD (1990). Genetic variability at the human tumor necrosis factor loci. *J. Immunol.* 145: 1278-1285.

Yakoob AY, Holmes PH, Parkins JJ, Armour J (1983a). Plasma protein loss associated with gastrointestinal parasitism in grazing sheep. *Research in Veterinary Science.* 34 (1): 58-63.

Yakoob A, Holmes PH, Armour J (1983b). Pathophysiology of gastrointestinal trichostrongyles in sheep: plasma losses and changes in plasma pepsinogen levels associated with parasite challenge of immune animals. *Research in Veterinary Science.* 34 (3): 305-9.

Ye BH, Cattoretti G, Shen Q, Zhang, J, Hawe N, de Waard R, Leung C, Nouri-Shirazi M, Orazi A, Chaganti RS (1997). The BCL-6 proto-oncogene controls germinal-centre formation and Th2-type inflammation. *Nat. Genet.* 16, 161-170.

Zinkernagel RM, Doherty PC (1974). Immunological surveillance against altered selfcomponents by sensitised T lymphocytes in lymphocytic choriomeningitis. *Nature* 251: 547-548