

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

«Μοριακή ανάλυση του Μείζονος Συμπλέγματος Ιστοσυμβατότητας (MHC) σε φυσικούς και εκτρεφόμενους πληθυσμούς ζωικών ειδών»

ΕΥΑΓΓΕΛΙΑ Α. ΚΟΥΤΣΟΓΙΑΝΝΟΥΛΗ

Εργαστήριο Γενετικής, Συγκριτικής και Εξελικτικής Βιολογίας

Επιβλέπων Καθηγητής: Ζ. Μαμούρης

Λάρισα, Απρίλιος 2011

Επιβλέπων Καθηγητής

Z. Μαμούρης (Καθηγητής)

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή

Z. Μαμούρης (Καθηγητής)

K. Μαθιόπουλος (Αν. Καθηγητής)

K. Μούτου (Αν. Καθηγήτρια)

Επταμελής Εξεταστική Επιτροπή

Ζήσης Μαμούρης

Καθηγητής, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Ζαχαρίας Σκούρας

Καθηγητής, Τμήμα Βιολογίας, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης

Απόστολος Αποστολίδης

Αν. Καθηγητής, Γεωπονική Σχολή, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης

Κωνσταντίνος Μαθιόπουλος

Αν. Καθηγητής, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Κατερίνα Μούτου

Αν. Καθηγήτρια, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Χαράλαμπος Μπιλλίνης

Αν. Καθηγητής, Τμήμα Κτηνιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Νικόλαος Παπανικολάου

Επ. Καθηγητής, Τμήμα Ιατρικής, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η προσαρμοστική σημασία του γενετικού πολυμορφισμού είναι ένα θεμελιώδες ερώτημα στη βιολογία. Καλύτερη κατανόηση της σχετικής συνεισφοράς των εξελικτικών δυνάμεων απαιτεί γνώση των αλληλεπιδράσεων ανάμεσα στο γενετικό πολυμορφισμό και την αρμοστικότητα. Τα γονίδια του μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας (MHC) συγκαταλέγονται μεταξύ των πλέον πολυμορφικών τόπων του πυρηνικού γονιδιώματος των θηλαστικών με καλά μελετημένη τη λειτουργία τους σε μοριακό επίπεδο. Το MHC είναι μία πολυγονιδιακή οικογένεια υποδοχέων που προσδέχουν και παρουσιάζουν αντιγονικά πεπτίδια στα T-κύτταρα. Το πρότυπο ποικιλομορφίας σε αυτά τα γονίδια υποδεικνύει ότι αυτά επιλέγονται. Επομένως η μελέτη τους βοηθά στην κατανόηση του τρόπου με τον οποίο η φυσική επιλογή μπορεί να διαμορφώσει τη γενετική ποικιλομορφία και προβάλλουν ως πιθανό μοντέλο για τον έλεγχο των υποθέσεων που αφορούν στις αιτίες και τις συνέπειες της επιλογής. Η μελέτη φυσικών πληθυσμών μη προτυποποιημένων ειδών με παγκόσμια εξάπλωση θα μπορούσε να συνεισφέρει σημαντικά σε αυτή την κατεύθυνση. Στην παρούσα μελέτη εξετάστηκαν τα επίπεδα ενδο- και δια-πληθυσμιακού γενετικού πολυμορφισμού στο MHC σε πληθυσμούς λαγού (*Lepus europaeus*), αγριόχοιρου (*Sus scrofa scrofa*), οικόσιτου χοίρου (*Sus scrofa f. domestica*) και προβάτου (*Ovis aries*) επιλέγοντας για ανάλυση το δεύτερο εξώνιο των τόπων *DQA* και *DRB1*. Οι δύο αυτοί τόποι είναι από τους πιο πολυμορφικούς της τάξης II του MHC. Είναι γεγονός ότι η κατανόηση της γενετικής πληθυσμών αποτελεί πλέον απαραίτητη συνιστώσα στη διερεύνηση των εξελικτικών διαδικασιών. Για το λόγο αυτό, πραγματοποιήθηκε και για τα δύο γονίδια και για τα τρία είδη μια πλήρης πληθυσμιακή γενετική ανάλυση. Με τη μέθοδο PCR-SSCP προσδιορίστηκε ο αριθμός των αλληλομόρφων των γονιδίων *DRB1* και *DQA* σε κάθε είδος, στη συνέχεια ταυτοποιήθηκε η αλληλουχία τους και τέλος τα αποτελέσματα αυτά αναλύθηκαν *in silico* με μεθόδους βιοπληροφορικής. Σε κάθε περίπτωση το γονίδιο *DRB1* βρέθηκε να είναι πιο πολυμορφικό σε σχέση με το *DQA*. Οι δύο τόποι βρίσκονται υπό την επίδραση ισοζυγούσας επιλογής εφόσον υπάρχει μεγαλύτερος αριθμός μη συνώνυμων υποκαταστάσεων ($d_N/d_S > 1$) και τα δεδομένα συνηγορούν στην συχνο-εξαρτώμενη επιλογή ως κύριο μηχανισμό δράσης. Στο *L. europaeus* παρατηρείται αξιοσημείωτος γενετικός πολυμορφισμός στο MHC με την Ανατολή να διαθέτει τα μεγαλύτερα επίπεδα. Σύμφωνα με το πρότυπο της μεταπαγετωνικής εξάπλωσης των πληθυσμών

του λαγού, οι πληθυσμοί της βόρειας Ευρώπης θα πρέπει να διαθέτουν χαμηλότερα ποσοστά πολυμορφισμού σε σχέση με τα Νότια καταφύγια (Βαλκάνια, Ανατολία), όπως έδειξαν και οι αναλύσεις του μιτοχονδριακού DNA. Ωστόσο και οι ευρωπαϊκοί πληθυσμοί δείχνουν σταθερά επίπεδα υψηλού πολυμορφισμού στο MHC, γεγονός που αποδίδεται στην ισοζυγούσα επιλογή. Αντίθετα, στο *S. scrofa* παρατηρείται χαμηλός πολυμορφισμός, που εξηγείται μερικώς αφενός από φαινόμενα στενωπού στο παρελθόν του αγριόχοιρου και αφετέρου από την εξημέρωση στον οικόσιτο χοίρο. Παράλληλα θα πρέπει να ξεκαθαριστεί ο ρόλος των Βαλκανίων στην εξημέρωση και στη διαμόρφωση της ποικιλομορφίας του χοίρου. Τέλος, στο *O. aries* καταγράφηκαν υψηλά επίπεδα πολυμορφισμού και για τα δύο γονίδια και σε αυτή τη μελέτη και οι αιτίες πρέπει να αναζητηθούν σε παθογόνους παράγοντες, άλλους γεωγραφικούς ή κοινωνικούς παράγοντες και στην περιβαλλοντική ετερογένεια. Τα συνολικά δεδομένα δείχνουν ότι το MHC δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί στη μελέτη της φυλογεωγραφίας καθώς σε καμία περίπτωση τα αλληλομόρφα των γονιδίων δεν εμφάνισαν ισχυρό φυλογεωγραφικό σήμα. Η δια-ειδική εξέλιξη του MHC είναι διάχυτη σε όλα τα φυλογενετικά δέντρα. Οι θύλακες πρόσδεσης πιθανόν να ανταποκρίνονται σε επιλεκτικές πιέσεις με ένα τρόπο που να εξαρτάται από το ρόλο τους στην πρόσδεση πεπτιδίων ενώ και στα δύο γονίδια υπάρχουν υποκαταστάσεις αμινοξέων με αντικατάσταση φορτίου με κοινά κατάλοιπα και στα τρία είδη. Οι συσχετίσεις των διαφόρων αλληλομόρφων με ανθεκτικότητα ή ευαισθησία σε ασθένειες είναι μεγάλης πρακτικής σημασίας επειδή μπορεί να δώσει δείκτες για γενετική επιλογή ανθεκτικών ατόμων και φυλών, με σημαντικές εφαρμογές στην εκτροφή χοίρων και προβάτων.

ABSTRACT

The importance of adaptive genetic polymorphisms is a fundamental and unsolved issue in biology. Improved understanding of the relative contribution of evolutionary forces requires knowledge of interactions between genetic polymorphisms and adaptation. Major histocompatibility complex (MHC) genes are among the most polymorphic loci in nuclear genome of mammals, and their function is well studied at the molecular level. MHC is a multigene receptor family that binds and presents antigenic peptides to T-cells. Diversity in these genes indicates that they are selected. Hence their study helps in understanding the role of natural selection in the shaping of genetic polymorphisms and is considered as a possible model for testing the hypothesis for the reasons and consequences of selection. The study of natural populations of non-model species with cosmopolitan distribution could contribute in this direction. In this study intra- and inter-population genetic polymorphisms within the second exon of *DQA* and *DRBI* loci in MHC have been examined in hares (*Lepus europaeus*), wild boars (*Sus scrofa scrofa*), domestic pigs (*Sus scrofa* L. *domestica*) and sheeps (*Ovis aries*). These two loci are among the most polymorphic in MHC class II genes. For this reason, were performed a complete population genetic analysis of both genes in all three species. PCR-SSCP was used to define the *DRBI* and *DQA* alleles in each species, followed by identification of their sequences. Results were analyzed *in silico* with bioinformatics methods. In each species *DRBI* was more polymorphic than *DQA*. These two loci are under the influence of balancing selection, indicated by excess of non-synonymous substitutions ($d_N/d_S > 1$). The data suggest frequency-dependent selection as a major mechanism. In *L. europaeus* there is remarkable genetic polymorphism in MHC with Anatolia exhibiting the greatest levels. According to the post-glaciation distribution pattern of hare, North-European populations should hold lower numbers of polymorphisms compared to South refugia (Balkan, Anatolia) as has been shown by mitochondrial DNA analysis. However, European populations appeared to be highly polymorphic at MHC, attributed to balancing selection. Conversely, *S. scrofa* exhibits reduced polymorphisms and that is partly explained both from bottleneck effects in recent wild boar past and from pig domestication. In parallel, has to be disentangled the role of Balkan Peninsula in pig domestication and in shaping boar diversity. Finally, both genes exhibit increased polymorphism in *O. aries* and the reasons have to be attributed to pathogens,

geographic or social factors and environmental heterogeneity. The data indicate that MHC cannot be used in phylogeography studies as gene alleles show weak phylogeographic signal. Trans-species evolution of MHC is pervasive in all phylogenetic trees. Binding pockets are possible to respond to selection forces in a way that depends on their role in peptide binding whereas in both genes there are charged amino acid substitutions with common residues in all three species. The correlation of different alleles with disease resistance or susceptibility is of great practical importance because markers for genetic selection could be developed for individuals and races, with important applications in pig and sheep breeding.

