

**ΑΡΙΣΤΟΤΕΛΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗΣ**  
**ΚΤΗΝΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ**  
ΤΟΜΕΑΣ ΖΩΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ, ΙΧΘΥΟΛΟΓΙΑΣ, ΟΙΚΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ  
ΠΡΟΣΤΑΣΙΑΣ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ

**ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΖΩΟΤΕΧΝΙΑΣ**

**ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΓΕΝΟΤΥΠΩΝ ΠΡΟΒΑΤΩΝ ΩΣ ΠΡΟΣ  
ΤΟ ΓΟΝΙΔΙΟ ΤΗΣ ΤΡΟΜΩΔΟΥΣ ΝΟΣΟΥ (SCRAPIE) ΜΕ ΒΑΣΗ  
ΤΟ DNA ΤΩΝ ΣΩΜΑΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΤΟΥ ΓΑΛΑΤΟΣ ΚΑΙ  
ΣΧΕΣΗ ΜΕΤΑΞΥ ΓΕΝΟΤΥΠΩΝ ΚΑΙ ΖΩΟΤΕΧΝΙΚΩΝ  
ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΩΝ**

**ΑΝΔΡΟΝΙΚΗ Α. ΨΗΦΙΔΗ**

**ΚΤΗΝΙΑΤΡΟΣ**

**ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**  
**ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗ 2010**

Στο σύζυγό μου  
Γεώργιο Στυλιάρη

Στους γονείς μου  
Τάσο και Μαρία Ψηφίδη

## **ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ**

Καθηγητής Γ. Μπάνος (επιβλέπων)

Αναπληρωτής καθηγητής Γ. Αρσένος (μέλος)

Επίκουρη καθηγήτρια Μ. Παπαναστασοπούλου (μέλος)

## **ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ**

Καθηγητής Γ. Μπάνος

Αναπληρωτής καθηγητής Γ. Αρσένος

Επίκουρη καθηγήτρια Κ. Αγγελοπούλου

Επίκουρη καθηγήτρια Μ. Παπαναστασοπούλου

Επίκουρος καθηγητής Π. Φορτομάρης

Λέκτορας Γ. Βαλεργάκης

Λέκτορας Χ. Δόβας

## ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Οι ιδιαίτερες κλιματολογικές και εδαφολογικές συνθήκες της χώρας μας, σε συνδυασμό με την παράδοση αιώνων που υπάρχει στην εκτροφή των προβάτων και την προτίμηση των Ελλήνων καταναλωτών στα προϊόντα τους, καθιστούν την προβατοτροφία το σημαντικότερο κλάδο της ζωικής παραγωγής για την Ελλάδα. Επιπλέον, η Ελλάδα είναι η χώρα με την μεγαλύτερη παραγωγή πρόβειου γάλατος στην Ευρωπαϊκή Ένωση (ΕΕ), μεγάλο μέρος του οποίου, με την μορφή παραδοσιακών προϊόντων, διοχετεύεται στη διεθνή αγορά. Προϋπόθεση για τη διατήρηση της ανταγωνιστικότητας των ελληνικών προϊόντων πρόβειου γάλατος είναι αυτά να θεωρούνται ασφαλή, προερχόμενα από υγιή ζώα.

Για την ΕΕ και τις Ηνωμένες Πολιτείες Αμερικής ένα από τα βασικότερα προβλήματα ασφάλειας τροφίμων είναι οι μεταδοτικές σπογγώδεις εγκεφαλοπάθειες (ΜΣΕ). Η τρομώδης νόσος (scrapie), που ανήκει στις ΜΣΕ, είναι μία θανατηφόρος νευροεκφυλιστική νόσος του ΚΝΣ που προσβάλλει πρόβατα και γίδια. Πρόκειται για νόσημα στο οποίο η γενετική ευαισθησία παίζει σπουδαίο ρόλο. Συγκεκριμένα, το γονίδιο της πρωτεΐνης-prion (*PRNP*) καθορίζει την ευαισθησία των προβάτων στο νόσημα. Με απόφαση της ΕΕ όλα τα κράτη-μέλη καλούνται να εφαρμόσουν προγράμματα γενετικής βελτίωσης για την ανάπτυξη ανθεκτικότητας στους εγχώριους πληθυσμούς προβάτων έναντι των ΜΣΕ. Τα προγράμματα αυτά έχουν ήδη δρομολογηθεί σε άλλες χώρες με ανεπτυγμένη προβατοτροφία, ενώ αναμένεται να ξεκινήσουν και στη χώρα μας.

Στην Ελλάδα, το πρώτο περιστατικό τρομώδους νόσου διαγνώστηκε το 1986. Έως το 2001 εφαρμόστηκε πρόγραμμα παθητικής επιτήρησης για την εκρίζωση της νόσου, ενώ από το 2002 η επιτήρηση έγινε ενεργητική. Στα πλαίσια της προσπάθειας εκρίζωσης του νοσήματος έχουν εξεταστεί, από το 2002 έως το 2007, 115.604 δείγματα μικρών μηρυκαστικών. Σε περίπτωση διαπίστωσης θετικού δείγματος ακολουθεί γενοτυπικός προσδιορισμός τόσο του ίδιου του ζώου όσο και των υπόλοιπων ζώων του ποιμνίου από το οποίο προήλθε. Ο γενοτυπικός προσδιορισμός πραγματοποιείται λαμβάνοντας ως δειματοληπτικό υλικό αίμα.

Για το σχεδιασμό του κατάλληλου προγράμματος γενετικής βελτίωσης για την ανάπτυξη ανθεκτικότητας στην τρομώδη νόσο προϋπόθεση είναι η γνώση της γενετικής σύστασης του πληθυσμού στον οποίο πρόκειται να εφαρμοστεί. Στην

Ελλάδα, ωστόσο, δεν έχουν διεξαχθεί τέτοιου είδους πληθυσμιακές μελέτες. Σημαντική είναι επίσης η διερεύνηση των πιθανών συνεπειών της εφαρμογής του προγράμματος στην παραγωγικότητα των προβάτων αλλά ούτε τέτοιες μελέτες έχουν διεξαχθεί στη χώρα μας. Επιπλέον, η ΕΕ αναζητά και χρηματοδοτεί την έρευνα για την ανάπτυξη νέων, πρακτικών μεθόδων που θα διευκολύνουν την μαζική εφαρμογή των προγραμμάτων αυτών στις χώρες-μέλη.

Στόχος της παρούσας διδακτορικής διατριβής ήταν η διερεύνηση των δυνατοτήτων επίλυσης του προβλήματος σε επίπεδο πληθυσμού. Συγκεκριμένα, προσδιορίστηκε η γενοτυπική σύνθεση των προβάτων φυλής Χίου και διερευνήθηκε η γενετική σχέση του γονιδίου *PRNP* με τη γαλακτοπαραγωγική και αναπαραγωγική ικανότητα των προβάτων αυτών. Επιπλέον, αναπτύξαμε μοριακές τεχνικές που προσδιορίζουν τους γενοτύπους του γονιδίου *PRNP* σε ομαδικό επίπεδο, ώστε με τη βοήθεια τους να κινηθούν γρήγορα τα προγράμματα γενετικής βελτίωσης.

Για την μελέτη αυτή επιλέχθηκε το πρόβατο φυλής Χίου επειδή σε αυτό διεξάγεται πρόγραμμα γενετικής βελτίωσης για την αύξηση της γαλακτοπαραγωγής και τη βελτίωση της αναπαραγωγικής ικανότητας των ζώων. Στα πλαίσια του προγράμματος αυτού καταγράφονταν στοιχεία αναγκαία για την μελέτη της σχέσης του γονιδίου *PRNP* με τα ζωοτεχνικά χαρακτηριστικά που μας ενδιέφεραν. Επιπλέον, το πρόβατο Χίου είναι πολύ παραγωγικό και με ιδιαίτερη σημασία για την ελληνική προβατοτροφία αφού οι μιγάδες-απόγονοι προβάτων Χίου αριθμούν περισσότερα από ένα εκατομμύριο ζώα.

Η διατριβή αυτή εκπονήθηκε στο εργαστήριο Ζωοτεχνίας της Κτηνιατρικής σχολής του ΑΠΘ, ενώ ο προσδιορισμός των γενοτύπων του *PRNP* πραγματοποιήθηκε σε συνεργασία με το εργαστήριο Μικροβιολογίας και Λοιμωδών Νοσημάτων της Κτηνιατρικής Σχολής του ΑΠΘ. Η χρηματοδότηση των μοριακών αναλύσεων έγινε στα πλαίσια του Ευρωπαϊκού προγράμματος RISKCRA, contract no. 030278, FPC-2004-SMW-COLL.

Στο σημείο αυτό θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον επιβλέποντα της διατριβής καθηγητή Γεώργιο Μπάνο, για τη γνώση, την έμπνευση, τον πολύτιμο χρόνο και την ουσιαστική στήριξη που μου πρόσφερε.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες οφείλω στον λέκτορα Χρυσόστομο Δόβα, στον αναπληρωτή καθηγητή Γεώργιο Αρσένο και στην επίκουρη καθηγήτρια Μαρία Παπαναστασοπούλου για την καθοδήγηση και τις πολύτιμες συμβουλές τους κατά τη διάρκεια της εκπόνησης της παρούσας διατριβής.

Ευχαριστίες οφείλω στη Dr Μπασδαγιάννη Ζωίτσα για τη σημαντική της βοήθεια κατά τη διάρκεια των δειγματοληψιών καθώς και κατά την επεξεργασία της βάσης δεδομένων, τα στοιχεία της οποίας χρησιμοποιήθηκαν για τη μελέτη της σχέσης του γονιδίου *PRNP* με τη γαλακτοπαραγωγική και αναπαραγωγική ικανότητα των προβάτων φυλής Χίου.

Ευχαριστώ, επίσης, το διοικητικό συμβούλιο του συνεταιρισμού προβατοτρόφων φυλής Χίου «Μακεδονία» για τη διάθεση των στοιχείων.

Ευχαριστώ, τους κ.κ. Ηλία Μπουζαλά, Ευαγγελία Χατζηνάσιου και Κώστα Ευθυμίου για την πρόθυμη και πολύτιμη βοήθειά τους.

Τέλος, ευχαριστώ το κληροδότημα Παναγιώτη Τριανταφυλλίδη και την Επιτροπή Ερευνών του ΑΠΘ των οποίων ήμουν υπότροφος.

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

<b>ΕΙΣΑΓΩΓΗ</b>	1
-----------------	---

### ΜΕΡΟΣ ΠΡΩΤΟ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΗ ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ

<b>1. Η ΠΡΟΒΑΤΟΤΡΟΦΙΑ ΣΤΗΝ ΕΛΛΑΔΑ</b>	5
1.1 Γενικά	5
1.2 Πρόβατο φυλής Χίου	7
<b>2. ΤΡΟΜΩΔΗΣ ΝΟΣΟΣ</b>	10
2.1 Γενικά	10
2.2 Αιτιολογία των Μεταδοτικών Σπογγωδών Εγκεφαλοπαθειών	12
2.3 Στελέχη του μολυσματικού παράγοντα	14
2.4 Άτυπες Μορφές της τρομώδους νόσου	15
2.5. Επιδημιολογία και μετάδοση	16
2.6. Παθογένεια και συμπτωματολογία	18
2.7. Διάγνωση και θεραπεία	19
2.8. Σχέση με τη δημόσια υγεία	21
<b>3. ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΒΑΣΗ ΤΗΣ ΤΡΟΜΩΔΟΥΣ ΝΟΣΟΥ</b>	23
3.1 Γενικά	23
3.2 Πολυμορφισμοί του γονιδίου <i>PRNP</i>	23
3.3 Γενότυποι του γονιδίου <i>PRNP</i>	24
3.4 Γενότυποι του γονιδίου <i>PRNP</i> και σχέση τους με την κλασική τρομώδη νόσο, 25 την άτυπη τρομώδη νόσο και τη ΣΕΒ	
3.5 Η κατάσταση στην Ελλάδα, η γενοτυπική εικόνα του γονιδίου <i>PRNP</i> των Ελληνικών φυλών προβάτων και η ελληνική νομοθεσία για την τρομώδη νόσο	30

<b>4. ΜΕΘΟΔΟΙ ΓΕΝΟΤΥΠΙΚΟΥ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΤΩΝ ΖΩΩΝ ΩΣ ΠΡΟΣ ΤΟ ΓΟΝΙΔΙΟ <i>PRNP</i></b>	34
4.1 Γενοτυπικός προσδιορισμός από αίμα ή εγκεφαλικό ιστό	34
4.2 Γενοτυπικός προσδιορισμός από το γάλα	36
<b>5. ΣΧΕΣΗ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ <i>PRNP</i> ΜΕ ΖΩΟΤΕΧΝΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΩΝ ΠΡΟΒΑΤΩΝ</b>	38
5.1 Γενικά	38
5.2 Επίδραση του γονιδίου <i>PRNP</i> στη γαλακτοπαραγωγική ικανότητα και στη διάπλαση του μαστού	41
5.3 Επίδραση του γονιδίου <i>PRNP</i> στην αναπαραγωγική ικανότητα	42

## ΜΕΡΟΣ ΔΕΥΤΕΡΟ

### Η ΔΙΚΗ ΜΑΣ ΕΡΕΥΝΑ

### ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

<b>1. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΓΕΝΟΤΥΠΩΝ ΜΕ ΒΑΣΗ ΤΟ ΓΑΛΑ ΣΕ ΑΤΟΜΙΚΟ ΕΠΙΠΕΔΟ</b>	47
<b>1.1 Δειγματοληψία</b>	47
1.1.1 Συλλογή ατομικών δειγμάτων γάλατος	47
1.1.2 Επεξεργασία δειγμάτων γάλατος	49
1.1.3 Συλλογή δειγμάτων αίματος	49
<b>1.2. Μέθοδοι απομόνωσης DNA</b>	49
1.2.1 Απομόνωση DNA από τα σωματικά κύτταρα του γάλατος	49
1.2.1.1 Εμπορικό σκεύασμα Nucleospin Blood® (Macherey- Nagel)	49
1.2.1.2 Τροποποιημένο Nucleospin Blood	50
1.2.2 Σύγκριση των δύο μεθόδων απομόνωσης DNA από το γάλα	51
1.2.2.1 Μετρήσεις με φασματοφωτόμετρο	52



1.2.2.2 Ηλεκτροφορητική ανάλυση DNA σε πηκτή αγαρόζης	52
1.2.2.3 Εκκινητές	53
1.2.2.4 Αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο (Real-time PCR)	54
1.2.2.4.1 Καμπύλη ποσοτικού προσδιορισμού	55
1.2.2.5 Στατιστική επεξεργασία αποτελεσμάτων σύγκρισης Nucleospin Blood <sup>®</sup> και τροποποιημένου Nucleospin Blood	56
1.2.3 Απομόνωση DNA από τα λευκοκύτταρα του αίματος	57
<b>1.3. Προσδιορισμός των γενοτύπων του <i>PRNP</i> γονιδίου 1.013 προβατινών από ατομικά δείγματα γάλατος</b>	<b>57</b>
1.3.1 Αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR)	57
1.3.2 Μέθοδος ανάλυσης πολυμορφισμού του μήκους περιοριστικών θραυσμάτων (RFLP)	59
1.3.3 Στατιστική επεξεργασία αποτελεσμάτων ατομικού γενοτυπικού προσδιορισμού	60
<b>1.4. Επαλήθευση των αποτελεσμάτων γενοτυπικού προσδιορισμού</b>	<b>61</b>
1.4.1 Επαλήθευση με τη μέθοδο προσδιορισμού της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας (DNA Sequencing)	61
1.4.2 Γενοτυπικός προσδιορισμός σε δείγματα αίματος	62
<b>2. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΓΕΝΟΤΥΠΩΝ ΜΕ ΒΑΣΗ ΤΟ ΓΑΛΑ ΣΕ ΟΜΑΔΙΚΟ ΕΠΙΠΕΔΟ</b>	<b>62</b>
<b>2.1 Δημιουργία προτύπων με ανάμιξη πλασμιδιακού DNA</b>	<b>63</b>
2.1.1 Δημιουργία πλασμιδιακών προτύπων	64
<b>2.2 Δημιουργία πειραματικών δειγμάτων με ανάμιξη ισομοριακών απομονώσεων DNA</b>	<b>64</b>
<b>2.3. Δημιουργία φυσικών πειραματικών δειγμάτων με ανάμιξη ατομικών δειγμάτων νωπού γάλατος</b>	<b>66</b>

<b>2.4 Προσδιορισμός πολυμορφισμών του <i>PRNP</i> γονιδίου σε ομαδικό επίπεδο</b>	71
2.4.1 Πρώτη ή μεγάλου μήκους PCR (Long-PCR)	71
2.4.2 Δεύτερη ή Ένθετη PCR	72
2.4.2. Μέθοδος Ανάλυσης πολυμορφισμού του μήκους περιοριστικών Θραυσμάτων (RFLP)	73
<b>3. ΣΧΕΣΗ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ <i>PRNP</i> ΜΕ ΤΗ ΓΑΛΑΚΤΟΠΑΡΑΓΩΓΙΚΗ     ΚΑΙ ΤΗΝ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΙΚΗ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑ ΤΩΝ ΖΩΩΝ</b>	74
<b>3.1 Ποίμνια που χρησιμοποιήθηκαν για τη διεξαγωγή της μελέτης</b>	74
<b>3.2 Στοιχεία που αναλύθηκαν</b>	75
<b>3.3 Προκαταρκτική επεξεργασία</b>	78
<b>3.4 Επίδραση του γονιδίου <i>PRNP</i> σε χαρακτηριστικά     της γαλακτοπαραγωγικής και αναπαραγωγικής ικανότητας</b>	78
<b>ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ</b>	
<b>4. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΓΕΝΟΤΥΠΩΝ ΜΕ ΒΑΣΗ ΤΟ ΓΑΛΑ     ΣΕ ΑΤΟΜΙΚΟ ΕΠΙΠΕΔΟ</b>	84
<b>4.1 Σύγκριση μεθόδων απομόνωσης DNA από τα σωματικά     κύτταρα του γάλατος</b>	84
4.1.1 Μετρήσεις με φασματοφωτόμετρο	84
4.1.2 Ηλεκτροφορητική ανάλυση DNA σε πηκτή αγαρόζης	85
4.1.3 Αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο (Real-time PCR)	87
<b>4.2 Αποτελέσματα ανάλυσης RFLP</b>	88
<b>4.3. Γενοτυπική εικόνα των προβάτων της φυλής Χίου</b>	88
4.3.1 Συχνότητα γενοτύπων, αλληλομόρφων και πολυμορφισμών του γονιδίου <i>PRNP</i> στα πρόβατα φυλής Χίου	88
4.3.2 Έλεγχος ισορροπίας Hardy-Weinberg	91

<b>4.4. Δοκιμές επαλήθευσης των αποτελεσμάτων γενοτυπικού προσδιορισμού</b>	91
4.4.1 Επαλήθευση με τη μέθοδο προσδιορισμού της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας (DNA-sequencing)	91
4.4.2 Επαλήθευση με τα δείγματα αίματος	92
<b>5. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΓΕΝΟΤΥΠΩΝ ΜΕ ΒΑΣΗ ΤΟ ΓΑΛΑ ΣΕ ΟΜΑΔΙΚΟ ΕΠΙΠΕΔΟ</b>	93
5.1 Πρότυπα που δημιουργήθηκαν με ανάμιξη πλασμιδιακού DNA	93
5.2 Πειραματικά δείγματα με ανάμιξη ισομοριακών απομονώσεων DNA	95
5.3 Πειραματικά δείγματα με ανάμιξη ατομικών δειγμάτων νωπού γάλατος	100
<b>6. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΜΕΛΕΤΗΣ ΤΗΣ ΣΧΕΣΗΣ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ PRNP ΜΕ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΗΣ ΓΑΛΑΚΤΟΠΑΡΑΓΩΓΙΚΗΣ ΚΑΙ ΤΗΣ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΙΚΗΣ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ</b>	108
6.1 Περιγραφή χαρακτηριστικών	108
6.2 Σχέση του γονιδίου <i>PRNP</i> με τη γαλακτοπαραγωγική ικανότητα	109
6.3 Σχέση του γονιδίου <i>PRNP</i> με την αναπαραγωγική ικανότητα	112
<b>ΣΥΖΗΤΗΣΗ</b>	
<b>ΓΕΝΟΤΥΠΙΚΕΣ ΣΥΧΝΟΤΗΤΕΣ ΣΤΟΝ ΠΛΗΘΥΣΜΟ ΠΡΟΒΑΤΩΝ ΤΗΣ ΦΥΛΗΣ ΧΙΟΥ</b>	120
<b>ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΓΕΝΟΤΥΠΩΝ ΜΕ ΒΑΣΗ ΤΟ ΓΑΛΑ ΣΕ ΟΜΑΔΙΚΟ ΕΠΙΠΕΔΟ</b>	124
<b>ΔΥΝΑΤΟΤΗΤΕΣ ΑΞΙΟΠΟΙΗΣΗΣ ΤΟΥ ΑΤΟΜΙΚΟΥ ΓΑΛΑΤΟΣ ΚΑΙ ΤΟΥ ΓΑΛΑΤΟΣ ΤΗΣ ΔΕΞΑΜΕΝΗΣ ΨΥΞΗΣ</b>	128

**ΣΧΕΣΗ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ *PRNP* ΜΕ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ  
ΤΗΣ ΓΑΛΑΚΤΟΠΑΡΑΓΩΓΙΚΗΣ ΚΑΙ ΤΗΣ  
ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΙΚΗΣ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ** 130

*Σχέση του γονιδίου PRNP με τη γαλακτοπαραγωγική ικανότητα* 130

*Σχέση του γονιδίου PRNP με την αναπαραγωγική ικανότητα* 132

*Εφαρμογή σε προγράμματα γενετικής επιλογής εναντίον  
της τρομώδους νόσου στην Ελλάδα* 134

**ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΠΡΟΤΑΣΕΙΣ**

**ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ** 136

**ΠΡΟΤΑΣΕΙΣ** 137

**ΠΕΡΙΛΗΨΗ** 139

**SUMMARY** 141

**ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ** 143

**ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ** 165

**ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι (Πρότυπα με ανάμιξη πλασμιδιακού DNA)** 167

**ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙ (Αποτελέσματα ανάλυσης RFLP)** 172

**ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙΙ (Πίνακες αποτελεσμάτων επίδρασης του γονιδίου *PRNP*  
στα ζωοτεχνικά χαρακτηριστικά κατά τη διάρκεια της πρώτης γαλακτικής  
περιόδου των προβάτων φυλής Χίου)** 176

## ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η προβατοτροφία αποτελεί πολύ σημαντικό κεφάλαιο για την ελληνική οικονομία. Στις μέρες μας, που ο διεθνής ανταγωνισμός στα πλαίσια της ενιαίας αγοράς είναι ιδιαίτερα έντονος, η ενίσχυση της ανταγωνιστικότητάς του κλάδου αυτού της ζωικής παραγωγής αποτελεί προτεραιότητα. Η προβατοτροφία ενισχύεται με την αύξηση των αποδόσεων των ζώων, τη βελτίωση της ποιότητας και τη διασφάλιση της υγιεινής των παραγόμενων προϊόντων.

Ένα καίριο πρόβλημα της ελληνικής προβατοτροφίας, που απειλεί τη μελλοντική βιωσιμότητα του κλάδου, είναι η τρομώδης νόσος. Σύμφωνα με τα στοιχεία του υπουργείου Αγροτικής Ανάπτυξης και Τροφίμων, μεταξύ των χωρών της ΕΕ, η Ελλάδα είναι η δεύτερη, μετά την Κύπρο, σε αριθμό θετικών κρουσμάτων. Με δεδομένο, δε, ότι δεν ελέγχονται όλα τα προβλεπόμενα δείγματα, υπάρχουν σοβαρές ενδείξεις ότι το πρόβλημα αυτό είναι ιδιαίτερα εκτεταμένο στη χώρα μας.

Η τρομώδης νόσος αποτελεί σημαντικό πρόβλημα επειδή είναι μεταδοτική νόσος, μειώνει σημαντικά τις αποδόσεις των ζώων και έχει πάντοτε θανατηφόρο κατάληξη. Επιπλέον, διαρκώς αυξάνεται η πίεση από την ΕΕ, μέσω της νομοθεσίας, για την αντιμετώπιση του προβλήματος αυτού. Συγκεκριμένα, σε μία προσπάθεια, να αποφευχθεί η είσοδος της μολυσματικής πρωτεΐνης-prion (PrP<sup>sc</sup>) στην τροφική αλυσίδα του ανθρώπου, δεν επιτρέπεται πλέον, πέρα από το κρέας, να δίνεται στην κατανάλωση το γάλα από εκτροφές στις οποίες βρέθηκαν ζώα με τρομώδη νόσο. Επίσης, το γάλα από τα ποίμνια με επιβεβαιωμένα κρούσματα απαγορεύεται να χρησιμοποιηθεί για τη διατροφή μηρυκαστικών, εκτός από τη διατροφή μηρυκαστικών εντός της εκμετάλλευσης, ενώ η διάθεση στην αγορά τέτοιων προϊόντων ως ζωοτροφών για μη μηρυκαστικά επιτρέπεται μόνο εντός της χώρας (Υ.Α. 261103/ 10. 04. 2009, ΦΕΚ 889/13. 05. 2009 ΤΕΥΧΟΣ Β').

Με δεδομένο ότι η τρομώδης νόσος αποτελεί ένα γενετικά ελεγχόμενο νόσημα, το οποίο έχει μελετηθεί σε βάθος στα πρόβατα, ως εναλλακτική λύση στην εκρίζωση του προβλήματος παγκόσμια, παρουσιάζεται ο σχεδιασμός και η εφαρμογή προγραμμάτων γενετικής επιλογής για την αύξηση των ανθεκτικών στην τρομώδη νόσο γενοτύπων.

Λαμβάνοντας υπόψην μας τα παραπάνω, αποφασίσαμε να ασχοληθούμε με το καίριο αυτό πρόβλημα της προβατοτροφίας, το προσεγγίσαμε σε επίπεδο ποιμνίου με το βλέμμα στον πληθυσμό. Στοχεύσαμε στην ανάπτυξη νέων μοριακών μεθόδων, που

χρησιμοποιήθηκαν τόσο σε επίπεδο ζώου, όσο και σε επίπεδο ποιμνίου. Συγκεκριμένα, αναπτύξαμε μία καινούργια, πρακτική και φιλική προς τα ζώα, μέθοδο γενοτυπικού προσδιορισμού του γονιδίου της πρωτεΐνης-prion (*PRNP*) χρησιμοποιώντας το γάλα. Η εφαρμογή της αναπτυχθείσας μεθόδου θα μπορούσε να διευκολύνει τις μαζικές δειγματοληψίες στα πλαίσια ενός προγράμματος γενετικής επιλογής για την τρομώδη νόσο. Επιπλέον, επιδιώχτηκε η ανάπτυξη μίας εναλλακτικής μεθόδου ομαδικού γενοτυπικού προσδιορισμού ως προς το *PRNP*, που θα αξιοποιεί το γεγονός ότι το συνολικό γάλα της δεξαμενής ψύξης του ποιμνίου, αποτελεί ουσιαστικά δεξαμενή DNA όλων των αρμεγόμενων ζώων. Οι τεχνικές αυτές στη συνέχεια εφαρμόστηκαν σε ένα μεγάλο δείγμα του πληθυσμού, ώστε να θεωρούνται αξιόπιστες και άμεσα εφαρμόσιμες. Με τη νέα μέθοδο ατομικού γενοτυπικού προσδιορισμού προσδιορίσαμε τις γενοτυπικές συχνότητες του πληθυσμού προβάτων φυλής Χίου τόσο για την κλασική μορφή της τρομώδους νόσου όσο και για την άτυπη μορφή της νόσου. Παράλληλα, διερευνήθηκε η γενετική σχέση του γονιδίου *PRNP* με τη γαλακτοπαραγωγική και αναπαραγωγική ικανότητα των προβάτων φυλής Χίου, προκειμένου να διαπιστωθεί αν η εφαρμογή ενός προγράμματος για την αύξηση της ανθεκτικότητας των ζώων στην τρομώδη νόσο θα επηρεάσει αρνητικά αυτά τα χαρακτηριστικά. Με την επίτευξη των παραπάνω στόχων θελήσαμε να στηρίξουμε τον απώτερο στόχο της ελληνικής προβατοτροφίας που αφορά την εκτροφή ανθεκτικών ως προς την τρομώδη νόσο προβάτων, με υψηλές αποδόσεις, καθώς και την παραγωγή ποιοτικών υγιεινών προϊόντων πρόβειου γάλατος.

Η παρούσα διατριβή αποτελείται από δύο μέρη. Στο πρώτο μέρος, παρατίθεται μία ευρεία βιβλιογραφική ανασκόπηση σε ό,τι αφορά στην ελληνική προβατοτροφία, στο πρόβατο φυλής Χίου, στην τρομώδη νόσο, στη γενετική βάση της νόσου και στη σχέση του γονιδίου *PRNP* με τη γαλακτοπαραγωγική και αναπαραγωγική ικανότητα. Στο δεύτερο μέρος, περιγράφεται η δική μας έρευνα και συγκεκριμένα τα υλικά και οι μέθοδοι που αναπτύχθηκαν και χρησιμοποιήθηκαν, καθώς και τα αποτελέσματα που προέκυψαν. Στη συνέχεια, παρατίθεται η συζήτηση των αποτελεσμάτων αυτών και τα συμπεράσματα που προκύπτουν από την έρευνα, ενώ διατυπώνονται παράλληλα και οι σχετικές προτάσεις. Η διατριβή ολοκληρώνεται με την απαραίτητη περίληψη και τη σχετική βιβλιογραφία.

Η πρωτοτυπία της παρούσας διατριβής συνίσταται στα εξής:

1. Για πρώτη φορά, διεθνώς, αναπτύχθηκε μέθοδος ατομικού γενοτυπικού προσδιορισμού του γονιδίου *PRNP* με βάση το DNA των σωματικών κυττάρων του πρόβειου γάλατος. Η μέθοδος αυτή είναι πιο φιλική για τα ζώα.
2. Επιπλέον, αναπτύχθηκε για πρώτη φορά νέα μέθοδος ομαδικού γενοτυπικού προσδιορισμού του γονιδίου *PRNP* με βάση το DNA των σωματικών κυττάρων του συνολικού γάλατος μίας ομάδας προβάτων. Οι δύο αυτές μέθοδοι αναμένεται να καταστήσουν εφικτό τον ταχύ και ευρείας εφαρμογής γενοτυπικό προσδιορισμό των προβάτων. Δηλαδή, ο προσδιορισμός του γονιδίου *PRNP* θα μπορεί να γίνεται σε επίπεδο ποιμνίου, χρησιμοποιώντας το συνολικό γάλα της δεξαμενής ψύξης. Αν στο δείγμα δε διαπιστωθούν ανεπιθύμητοι πολυμορφισμοί τότε το ποίμνιο θα μπορεί να θεωρείται ως απαλλαγμένο από αυτούς. Στην περίπτωση αυτή θα είναι εφικτή η γενετική βελτίωση για τη νόσο, εισάγοντας στο ποίμνιο κριούς με ανθεκτικό γενότυπο.
3. Ένα επιπλέον χρήσιμο αποτέλεσμα της διατριβής ήταν η εκτίμηση, με μεγάλη ακρίβεια, των γενοτυπικών συχνοτήτων των προβάτων φυλής Χίου αναφορικά με την κλασική μορφή της τρομώδους νόσου. Επίσης, στα πρόβατα της φυλής αυτής, προσδιορίστηκαν σε πληθυσμιακό επίπεδο οι πολυμορφισμοί στο κωδικόνιο 141 του γονιδίου *PRNP*, που σχετίζονται με την ευπάθεια στις άτυπες μορφές της τρομώδους νόσου.
4. Τέλος, για πρώτη φορά στην Ελλάδα διερευνήθηκε η επίδραση του γονιδίου *PRNP* στη γαλακτοπαραγωγική και αναπαραγωγική ικανότητα των προβάτων, και συγκεκριμένα των προβάτων φυλής Χίου. Η διερεύνηση αυτή αφορούσε τόσο στη μελέτη της επίδρασης των γενοτύπων, όσο και στη μελέτη της επίδρασης των αλληλομόρφων στα παραπάνω χαρακτηριστικά. Η επίδραση όλων των αλληλομόρφων διερευνήθηκε για πρώτη φορά διεθνώς.

Τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης μπορούν να αξιοποιηθούν σε προγράμματα γενετικής βελτίωσης με στόχο, τόσο την εκρίζωση της τρομώδους νόσου, όσο και την αναβάθμιση της παραγωγικότητας των προβάτων.

# **ΜΕΡΟΣ ΠΡΩΤΟ**



## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΗ ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ

### 1. Η ΠΡΟΒΑΤΟΤΡΟΦΙΑ ΣΤΗΝ ΕΛΛΑΔΑ

#### 1.1. Γενικά

Η εκτροφή προβάτων αποτελεί το σημαντικότερο κλάδο της ζωικής παραγωγής στην Ελλάδα. Η συμμετοχή της προβατοτροφίας στη διαμόρφωση του ακαθάριστου εθνικού κτηνοτροφικού προϊόντος και στη συνολική γεωργική παραγωγή ανέρχεται στο 36% και στο 12%, αντίστοιχα (Ζυγογιάννης, 2006). Επιπλέον, με τη δραστηριότητα αυτή ασχολούνται περίπου 130.000 ελληνικές οικογένειες.

Κύρια παραγωγική κατεύθυνση των ελληνικών φυλών προβάτων είναι η γαλακτοπαραγωγή και, δευτερευόντως, η κρεοπαραγωγή και η εριοπαραγωγή (Ζυγογιάννης, 2006, Zygoiannis και συν., 1997). Οι προβατίνες εκτρέφονται για την παραγωγή γάλατος, το οποίο απορροφάται κυρίως από τις βιομηχανίες παραγωγής τυριών, γιαουρτιού και άλλων παραδοσιακών προϊόντων. Η παραγωγή κρέατος βασίζεται, κατά κανόνα, σε ζώα που σφάζονται σε μικρή ηλικία (αμνός γάλακτος), έχουν μικρό βάρος και πωλούνται σε σχετικά υψηλές τιμές. Ο βαθμός αυτοεφοδιασμού της Ελλάδας σε πρόβειο κρέας είναι της τάξης του 85% (Ζυγογιάννης, 2006). Το παραγόμενο μαλλί από τα ελληνικά πρόβατα, λίγο και χονδρόινο, είναι ακατάλληλο για υφάσματα ποιότητας ή την καλτσοβιομηχανία (Ζυγογιάννης, 2006).

Στον Ελλαδικό χώρο εκτρέφονται περίπου 9 εκατομμύρια πρόβατα (8.904.000 σύμφωνα με το FAO, 2008). Με 6,3 εκατομμύρια προβατίνες γαλακτοπαραγωγικής κατεύθυνσης (Annon, 2008), η χώρα μας διαθέτει το δεύτερο μεγαλύτερο εθνικό ποίμνιο μεταξύ των χωρών της ΕΕ, αλλά η μέση ετήσια παραγωγή γάλατος ανά προβατίνα παραμένει σχετικά χαμηλή, περίπου 100 με 120 χλγ (συνήθως σε γαλακτική περίοδο 5 μηνών). Η χαμηλή γενετική αξία των ζώων, η ανεπαρκής διατροφή και η κακή διαχείριση της εκτροφής είναι οι κυριότερες αιτίες για τη μη ικανοποιητική απόδοση τους (Valergakis και συν., 2008).

Παραδοσιακά, τα πρόβατα στην Ελλάδα εκτρέφονται σε μικρά, κατά κανόνα, ποίμνια, ενώ η διατροφή τους εξασφαλίζεται από χαμηλής παραγωγικότητας φυσικούς λειμώνες. Το 78% του πληθυσμού διατηρούνται σε ορεινές και ημιορεινές περιοχές (Anon, 2008), όπου εκτρέφονται με ένα σύστημα που περιγράφεται ως ημιακτητικό (de Rancourt και συν., 2006, Ζυγογιάννης, 2006). Τα τελευταία χρόνια,

προοδευτικά αναπτύσσεται το ημιεντατικό σύστημα εκτροφής προβάτων τόσο σε πεδινές, όσο και σε ημιορεινές περιοχές. Για αυτό το είδος εκτροφής, χρησιμοποιούνται υψηλότερης παραγωγικότητας προβατίνες. Συγκεκριμένα, εκτρέφονται με αυτό τον τρόπο εγχώριες φυλές προβάτων, όπως οι Χίου, Καραγκούνικο και Φριζάρτα, αλλά και εισαγόμενες, όπως η Λακών (Lacaune), η Φρισλανδία (East Friesian) και, πρόσφατα, η Ασσάφ (Assaf), καθώς και διασταυρώσεις των φυλών αυτών.

Στην Ελλάδα η παραγωγή πρόβειου γάλατος αποτελεί μία σημαντικού μεγέθους βιομηχανία, που καλύπτει σχεδόν πλήρως τις ανάγκες της χώρας (Ζυγογιάννης, 2006). Η ετήσια παραγωγή γάλατος κυμαίνεται τα τελευταία χρόνια από 650.000 έως 700.000 τόνους (Eurostat, 2004, deRancourt και συν., 2006, Zygogiannis, 2006). Η παραγωγή πρόβειου γάλατος αντιπροσωπεύει το 35% της συνολικής παραγωγής γάλατος στη χώρα μας (1.9 εκατομμύρια τόνους), ενώ το αγελαδινό και το γίδινο αντιπροσωπεύουν το υπόλοιπο 42% και 23%, αντίστοιχα (Eurostat, 2004). Σύμφωνα με τα τελευταία στοιχεία, για το 2008 η ετήσια παραγωγή πρόβειου γάλατος και κρέατος στην Ελλάδα ήταν 785.000 και 90.500 τόνοι, αντίστοιχα (FAO, 2008). Η Ελλάδα ήταν η πρώτη χώρα σε παραγωγή πρόβειου γάλατος στην ΕΕ (FAO, 2008). Την Ελλάδα ακολουθούν η Ρουμανία με παραγωγή 656.833 τόνους, η Ιταλία με 564.550 τόνους και η Ισπανία με 441.400 τόνους πρόβειου γάλατος (FAO, 2008). Ένα μεγάλο ποσοστό των προϊόντων της ελληνικής προβατοτροφίας εξάγονται στις διεθνείς αγορές. Μάλιστα, η κατοχύρωση της φέτας ως Προϊόντος Ονομασίας Προέλευσης, μετά από απόφαση του Ευρωπαϊκού Δικαστηρίου τον Οκτώβριο του 2005, δημιούργησε ιδιαίτερα ελπιδοφόρες προοπτικές για τους έλληνες κτηνοτρόφους στον τομέα των εξαγωγών (Βαλεργάκης και Αρσένος, 2008). Με δεδομένη την έλλειψη ποσοτώσεων στην παραγωγή πρόβειου γάλατος, είναι εφικτή η περαιτέρω ανάπτυξη της ελληνικής προβατοτροφίας για την ενίσχυση αυτού του κλάδου παραγωγής. Εδώ, όμως, πρέπει να επισημανθεί το αυξανόμενο ενδιαφέρον στον κλάδο αυτό και άλλων ευρωπαϊκών χωρών, με ή χωρίς παράδοση στη γαλακτοπαραγωγό προβατοτροφία, καθώς και χωρών της Βορείου Αμερικής και της Ωκεανίας (Lindsay and Skerritt, 2003, Thomas, 2004).

Για την περαιτέρω ενίσχυση της ανταγωνιστικότητας της ελληνικής προβατοτροφίας, παράλληλα με την εντατικοποίηση της εκτροφής, πρέπει να εξασφαλιστούν οι κατάλληλες συνθήκες για την παραγωγή ασφαλών προϊόντων από υγιή ζώα. Ο έλεγχος και η πρόληψη της τρομώδους νόσου του προβάτου εντάσσεται

στις εν λόγω προσπάθειες. Είναι βασικής σημασίας, λοιπόν, για την ελληνική προβατοτροφία να εφαρμοστεί το κατάλληλο πρόγραμμα για την αύξηση της εγγενούς ανθεκτικότητας των εγχώριων προβάτων στην τρομώδη νόσο. Τέτοιου είδους προγράμματα εφαρμόζονται, με πολύ καλά αποτελέσματα, εδώ και χρόνια τόσο σε άλλες χώρες με ανεπτυγμένη γαλακτοπαραγωγό προβατοτροφία (π.χ. Ιταλία, Γαλλία, Ισπανία) όσο και σε χώρες με κρεοπαραγωγό προβατοτροφία (π.χ. Μεγάλη Βρετανία, Γερμανία).

## 1.2. Πρόβατο φυλής Χίου



**Εικόνα 1.** Πρόβατα φυλής Χίου.

Από τα εγχώρια ελληνικά πρόβατα ξεχωρίζουν εκείνα της φυλής Χίου (Εικόνα 1), τόσο σε εθνικό, όσο και σε διεθνές επίπεδο (Mason, 1980, Hatziminaoglou και συν., 1996). Μάλιστα, τα πρόβατα αυτά θεωρούνται τα πιο παραγωγικά από τα εγχώρια πρόβατα και αυτά που κυριαρχούν μεταξύ εκείνων που εκτρέφονται με το ημιεντατικό και εντατικό σύστημα (Μπασδαγιάννη, 2006). Το πρόβατο της φυλής Χίου είναι μεγαλόσωμο ζώο με ευθεία ή ελαφρώς κοίλη ραχιαία γραμμή και υψηλά άκρα. Το ύψος ακρωμίου κυμαίνεται μεταξύ 79-84 εκατοστά για τους κριούς και 70-76 εκατοστά για τις προβατίνες. Το σωματικό βάρος των κριών κυμαίνεται από 65-95 χιλ και των προβατινών από 50-70 χιλ (στοιχεία του Κέντρου Γενετικής Βελτίωσης Ζώων Νέας Μεσημβρίας και Αγροτικού Συνεταιρισμού Προβατοτρόφων φυλής Χίου

«Μακεδονία», 2007). Ο χρωματισμός είναι λευκός, το κεφάλι, τα άκρα, η κάτω κοιλιακή χώρα, το όσχεο και ο μαστός, όμως, είναι εξολοκλήρου μαύρα ή φέρουν μαύρες κηλίδες διαφορετικής έκτασης. Τα αυτιά σχετικά μεγάλα, κατευθύνονται προς τα πλάγια και κάμπτονται ελαφρά προς τα κάτω. Το επιρρίνιο είναι κυρτό. Τα κριάρια φέρουν ανεπτυγμένα, ελικοειδή, ισχυρά μαύρα κέρατα. Οι προβατίνες είναι ακέρατες ή παρουσιάζουν, σε ένα μικρό ποσοστό, υποτυπώδη κέρατα. Ο μαστός είναι, κατά γενικό κανόνα, πολύ αναπτυγμένος, συχνά όμως κρεμασμένος και με μικρές θηλές (Ζυγογιάννης, 2006). Πρόκειται για πλατύουρα πρόβατα, με ουρά που έχει σχήμα κωνικό, πλάτους 9-12 εκ στη βάση της και μήκους που φτάνει μέχρι το ακροτάρσιο. Η πλατιά ουρά αποτελεί μειονέκτημα, καθώς δυσκολεύει την οχεία και το άρμεγμα, ενώ αποτελεί ανεπιθύμητο τεμάχιο του σφαγίου. Εξαιτίας των παραπάνω λόγων οι προβατοτρόφοι συνήθως κόβουν τις ουρές των θηλυκών ζώων με ειδικά λαστιχένια δακτυλίδια την 3<sup>η</sup> -4<sup>η</sup> ημέρα από τη γέννηση τους. Το κεφάλι, τα άκρα, το κάτω τμήμα του τραχήλου και του κορμού είναι γυμνά και η ποιότητα του μαλλιού που καλύπτει το υπόλοιπο σώμα, ποικίλλει από το αδρύ ομοιόμαλλο μέχρι το αναμικόμαλλο. Υπάρχουν, όμως και ζώα με την κοιλιά ελαφρώς καλυμμένη. Παραλλακτικότητα παρουσιάζει, επίσης, η πυκνότητα του πόκου και το μήκος του πλοκάμου.

Τα πρόβατα αυτά χαρακτηρίζονται από υψηλή γαλακτοπαραγωγή, αναπαραγωγική πρωιμότητα και υψηλή πολυδυμία. Σύμφωνα με τα στοιχεία του Κέντρου Γενετικής Βελτίωσης Ζώων Νέας Μεσημβρίας και Αγροτικού Συνεταιρισμού Προβατοτρόφων φυλής Χίου «Μακεδονία» (2007), η καταγραφόμενη γαλακτοπαραγωγή των προβατινών κατά την πρώτη γαλακτική τους περίοδο κυμαίνεται από 180-250 χλγ, ενώ από τη δεύτερη και μετά από 220-450 χλγ. Η μέση διάρκεια της γαλακτικής τους περιόδου είναι 220 ημέρες. Ωστόσο, η μέση λιποπεριεκτικότητα του γάλατος είναι χαμηλή και κυμαίνεται γύρω στα 5,0-5,5% (Ζυγογιάννης, 2006). Η φυλή παρουσιάζει πρόωμη ενήβωση και χαρακτηρίζεται από μεγάλης διάρκειας αναπαραγωγική περίοδο (από το Μάιο έως το Φεβρουάριο). Τα θηλυκά ζώα εισέρχονται στην αναπαραγωγή στην ηλικία των 8-9 μηνών. Ο δείκτης πολυδυμίας φτάνει περίπου το 1,87. Από τους τοκετούς μόνο το 33% είναι μονόδυμοι, ενώ το 51% είναι δίδυμοι και το 16% τρίδυμοι και άνω (στοιχεία Κέντρου Γενετικής Βελτίωσης Ζώων Νέας Μεσημβρίας, Αγροτικού Συνεταιρισμού Προβατοτρόφων φυλής Χίου «Μακεδονία», 2007). Το μέσο σωματικό βάρος στη

γέννηση είναι 4,6, 3,9 και 3,5 χλγ αντίστοιχα για τα μονόδυμα, τα δίδυμα και τα τρίδυμα αρνιά (Gelasakis και συν., 2010).

Σε ό,τι αφορά στην κρεοπαραγωγική ικανότητα, η ποσότητα παραγόμενου κρέατος είναι σημαντική, αλλά τα αποδιδόμενα σφάγια εμφανίζουν μεγάλη εναπόθεση λίπους και κακή διάπλαση (Ζυγογιάννης, 2006).

Η φυλή Χίου πήρε το όνομα της από το ομώνυμο νησί, το οποίο θεωρείται τόπος καταγωγής της. Πιστεύεται ότι η φυλή προέκυψε από διασταυρώσεις εγχώριων ομοιόμαλλων λεπτόουρων προβάτων με μικρασιατικά αναμικτόμαλλα πλατύουρα πρόβατα (Δημητριάδης, 1957, Zervas και συν., 1988, Hatziminaoglou και συν., 1996, Ζυγογιάννης, 2006). Σήμερα στη Χίο εκτρέφονται λίγα (περίπου 900-1.000) πρόβατα της εν λόγω φυλής, ως οικόσιτα (Ζυγογιάννης, 2006). Ωστόσο, τα τελευταία τριάντα χρόνια η φυλή επεκτάθηκε σε άλλα μέρη της Ελλάδας, και κυρίως στην Κεντρική Μακεδονία όπου εκτρέφονται γύρω στα 20.000 καθαρόαιμα ζώα, με 14.000 από αυτά να ανήκουν στον Αγροτικό Συνεταιρισμό Προβατοτρόφων φυλής Χίου «Μακεδονία». Τα πρόβατα αυτά συνήθως εκτρέφονται εντατικά και δε βγαίνουν σε βοσκοτόπους. Τη δεκαετία του 1980 δημιουργήθηκε το γενεαλογικό βιβλίο της φυλής, όπου καταγράφονται, σήμερα, τα καθαρόαιμα άτομα της φυλής, στα οποία παράλληλα εφαρμόζεται και πρόγραμμα γενετικής βελτίωσης με στόχο την αύξηση των αποδόσεών τους. Συγκεκριμένα, το πρόγραμμα άρχισε να εφαρμόζεται το 1985 και αρχικά συμμετείχαν λίγες εκτροφές. Μετά την ίδρυση, το 1996, του συνεταιρισμού προβατοτρόφων φυλής Χίου «Μακεδονία», ο αριθμός των εκτροφών που συμμετέχουν στο πρόγραμμα αυξήθηκε. Τα μέλη του Συνεταιρισμού αποτελούν 66 προβατοτροφικές μονάδες (Gelasakis και συν., 2010).

Για την επίτευξη της γενετικής βελτίωσης της φυλής εφαρμόζεται έλεγχος των αποδόσεων των ζώων, επιλογή, σχεδιασμένες συζεύξεις και καταγραφή των ζώων στα γενεαλογικά βιβλία. Τα στοιχεία του ελέγχου των αποδόσεων των ζώων, που συλλέγονται στο πλαίσιο του προγράμματος γενετικής βελτίωσης, χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα διατριβή για τη μελέτη της επίδρασης του γονιδίου της πρωτεΐνης-rgrion, που, όπως θα συζητηθεί στο επόμενο κεφάλαιο, ελέγχει την ευπάθεια ή ανθεκτικότητα των ζώων στην τρομώδη νόσο, στη γαλακτοπαραγωγική και στην αναπαραγωγική ικανότητα των προβάτων. Είναι βασικό, η εν λόγω διερεύνηση να αποτελέσει τμήμα της εφαρμογής ενός διευρυμένου προγράμματος γενετικής βελτίωσης που θα στοχεύει, εκτός από την αύξηση των αποδόσεων, και στην αύξηση της εγγενούς ανθεκτικότητας των ζώων στην τρομώδη νόσο.

Το πρόβατο φυλής Χίου έχει αποτελέσει αντικείμενο εκτεταμένης έρευνας από το εργαστήριο Ζωοτεχνίας της Κτηνιατρικής Σχολής του ΑΠΘ. Συγκεκριμένα, αναπτύχθηκαν στατιστικά μοντέλα για τον υπολογισμό της ημερήσιας γαλακτοπαραγωγής και της συνολικής γαλακτοπαραγωγής της γαλακτικής περιόδου βασισμένα στους πρωινούς ή απογευματινούς ελέγχους (γαλακτομετρήσεις) (Basdagianni και συν., 2005). Επιπλέον, μελετήθηκε η επίδραση της ομαδοποίησης και της χρήσης κλειδών για τον καταρτισμό ορθολογικών σιτηρεσίων (Valergakis και συν., 2008) καθώς και το οικονομικό όφελος από την πρόοδο της γενετικής βελτίωσης που επιτυγχάνεται από την εφαρμογή τεχνητής σπερματέγχυσης στα πρόβατα φυλής Χίου (Valergakis και συν., 2010). Επίσης, καταγράφηκαν και περιγράφηκαν τα χαρακτηριστικά των εκτροφών και οι μέθοδοι παραγωγής που εφαρμόζονται σε εντατικά εκτροφόμενα πρόβατα φυλής Χίου (Gelasakis και συν., 2010).

## **2. ΤΡΟΜΩΔΗΣ ΝΟΣΟΣ**

### **2.1. Γενικά**

Η τρομώδης νόσος είναι μία θανατηφόρος, νευροεκφυλιστική νόσος του κεντρικού νευρικού συστήματος (ΚΝΣ), που προσβάλλει πρόβατα και γίδια. Η νόσος αυτή έχει γενετική βάση, αλλά ταυτόχρονα αποτελεί και μεταδοτικό νόσημα, αφού προϋπόθεση για να νοσήσει ένα ζώο είναι να έρθει σε επαφή με τον παθογόνο παράγοντα. Ανήκει σε μία ομάδα νοσημάτων, γνωστών ως νόσοι prion ή Μεταδοτικές Σπογγώδεις Εγκεφαλοπάθειες (ΜΣΕ). Οι ΜΣΕ χαρακτηρίζονται από: α) φυσική ή πειραματική (από την πεπτική οδό) μετάδοση, β) μακρά περίοδο επώασης και εμφάνιση συμπτωμάτων από το ΚΝΣ κατά τη διάρκεια των τελικών σταδίων του νοσήματος, γ) παρουσία χαρακτηριστικών ιστοπαθολογικών αλλοιώσεων (σπογγώδεις αλλοιώσεις) σε συγκεκριμένες περιοχές του εγκεφάλου κατά την κλινική φάση του νοσήματος, δ) συγκέντρωση μίας μη φυσιολογικής ισομορφής της πρωτεΐνης-prion στον εγκέφαλο αρχικά και αργότερα στο υπόλοιπο ΚΝΣ και στο λεμφικό ιστό, ε) απουσία ανοσολογικής αντίδρασης και στ) έλλειψη οποιουδήποτε προληπτικού ή θεραπευτικού σκευάσματος (Doherr, 2007). Στην κατηγορία των ΜΣΕ ανήκουν πολλά νοσήματα του ανθρώπου και των ζώων (Πίνακας 1). Η τρομώδης νόσος είναι το πρώτο νόσημα αυτής της κατηγορίας που μελετήθηκε και αποτελεί πρότυπο νόσημα για τη μελέτη των ΜΣΕ.

**Πίνακας 1.** Οι μεταδοτικές σπογγώδεις εγκεφαλοπάθειες του ανθρώπου και των ζώων με βάση τη χρονολογική περιγραφή τους.

<b>Νόσημα</b>	<b>Συντομογραφία</b>	<b>Έτος πρώτης αναφοράς</b>
Κλασική τρομώδης νόσος (πρόβατα και γίδια)	Scrapie, SR TSE	1732
Σποραδική Creutzfeldt-Jakob (άνθρωπος)	sCJD	1920/21
Σύνδρομο Gerstmann-Strauslerr-Scheiker (άνθρωπος)	GSS	1936
Kuru (άνθρωπος)	Kuru	1957
Μεταδοτική εγκεφαλοπάθεια των ικτίδων (εκτρεφόμενες ικτίδες)	TME	1965
Ιατρογενής Creutzfeldt-Jakob (άνθρωπος)	iCJD	1974
Χρόνια ατροφική νόσος των ελαφιών (ελάφια, τάρανδοι)	CWD	1980
Θανατηφόρος οικογενειακή αϋπνία (άνθρωπος)	FFI	1986
Σπογγώδης εγκεφαλοπάθεια των βοοειδών (βοοειδή)	BSE	1987
Σπογγώδεις εγκεφαλοπάθειες ζώων ζωολογικού κήπου	BSE	1988
Οικογενειακή Creutzfeldt-Jakob (άνθρωπος)	fCJD	1989
Σπογγώδης εγκεφαλοπάθεια της γάτας (κατοικίδες γάτες)	FSE	1990
Παραλλαγή (Variant) Creutzfeldt-Jakob (άνθρωπος)	vCJD	1996
Σποραδική θανατηφόρος οικογενειακή αϋπνία (άνθρωπος)	sFFI	1999
Άτυπη μορφή της τρομώδους νόσου (πρόβατα και γίδια)	Atypical Scrapie, Nor98	2003
BSE (γίδια)	SR TSE (BSE)	2005
Άτυπη μορφή BSE (βοοειδή)	Atypical BSE	2005

Πηγή: Hörnlimann και συν., 2001 και Doherr, 2007

## 2.2. Αιτιολογία των Μεταδοτικών Σπογγωδών Εγκεφαλοπαθειών

Η αποσαφήνιση της φύσης του παθογόνου παράγοντα που προκαλεί τις ΜΣΕ αποτέλεσε αντικείμενο έντονης αντιπαράθεσης. Οι σημαντικότερες θεωρίες που έχουν διατυπωθεί υποστηρίζουν ότι ο παθογόνος παράγοντας είναι μία πρωτεΐνη, κάποιο νουκλεϊνικό οξύ, ή ο συνδυασμός πρωτεΐνης και νουκλεϊνικού οξέος.

Πιο συγκεκριμένα, η «**θεωρία του virino**» (Dickinson και Outram, 1988) και η «**ενοποιημένη θεωρία-unified theory**» (Weissmann, 1991) υποστηρίζουν ότι ένας νουκλεοπρωτεϊνικός σχηματισμός είναι υπεύθυνος για τις ΜΣΕ. Εξωτερικά, ο μολυσματικός παράγοντας αποτελείται από την πρωτεΐνη PrP και εσωτερικά από ένα μικρό μη κωδικοποιό ρυθμιστικό νουκλεϊνικό οξύ. Ο σχηματισμός αυτός περιγράφεται ως απλούστερος των ιών.

Στη «**θεωρία του ιού**», ο αιτιολογικός παράγοντας είναι ένας ιός με ασυνήθιστα βιοχημικά και βιοφυσικά χαρακτηριστικά (Merz και συν., 1984, Manuelidis και συν., 1988). Σύμφωνα με τη θεωρία αυτή, η εμφάνιση διαφορετικών τύπων μολυσματικότητας, επώασης και συμπτωματολογίας της νόσου, μπορεί να αποδοθεί σε διαφορετικά στελέχη κάποιου ιού και ειδικότερα κάποιου RNA ιού.

Η επικρατέστερη ωστόσο θεωρία είναι αυτή της μολυσματικής πρωτεΐνης «**protein only hypothesis**». Η θεωρία αυτή διατυπώθηκε πρώτα από τον Griffith (1967) και θεμελιώθηκε από τον Prusiner (1982). Αν και έρχεται σε αντίθεση με το κεντρικό δόγμα της βιολογίας, αφού ισχυρίζεται ότι μία πρωτεϊνική δομή μπορεί να αλλάξει τη διαμόρφωση της χωρίς να μεσολαβήσει οποιαδήποτε αλλαγή στο νουκλεϊνικό οξύ από το οποίο κωδικοποιείται., τεκμηριώνεται επαρκώς από έναν αριθμό πειραματικών δεδομένων (Prusiner και συν., 1998).

Η μολυσματική αυτή πρωτεΐνη, ονομάστηκε από τον Prusiner, prion από τα αρχικά των λέξεων 'proteinaceous infectious particles' (πρωτεϊνικά λοιμογόνα σωματίδια). Τα prion αποτελούνται εξολοκλήρου από μία παθολογική ισομορφή PrP<sup>sc</sup> (Sc=Scrapie) της φυσιολογικής κυτταρικής πρωτεΐνης του ξενιστή PrP<sup>c</sup> (C=cellular). Η PrP<sup>c</sup> είναι μία γλυκοπρωτεΐνη της κυτταρικής μεμβράνης των νευρώνων και των κυττάρων άλλων ιστών, που διαθέτει δύο θέσεις γλυκοσυλίωσης. Μπορεί συνεπώς να βρίσκεται σε τρεις διαφορετικές μορφές: δι-γλυκοσυλιωμένη, μονο-γλυκοσυλιωμένη και μη-γλυκοσυλιωμένη. Ο ρόλος της δεν έχει αποσαφηνιστεί πλήρως (Stahl και συν., 1993). Τα μέχρι τώρα πειραματικά δεδομένα, ωστόσο, δείχνουν ότι η πρωτεΐνη αυτή σχετίζεται με την ομοιοστασία του χαλκού, τις αντιοξειδωτικές δραστηριότητες των νευρώνων, την προστασία των νευρώνων -και



ιδίως των κυττάρων του Purkinje- και το σχηματισμό των υποδοχέων για τη μεταφορά σημάτων στο εσωτερικό των κυττάρων, ενώ συμμετέχει και στη νευροδιαβίβαση στο ΚΝΣ (Caughey και συν., 1988, Collinge και συν., 1994, Hornshaw και συν., 1995, Pauly και Haggis, 1998, Waggoner και συν., 2000, Brown και συν., 2001). Διαγονιδιακά πειραματόζωα που στερούνται την PrP<sup>c</sup> μπορούν να επιβιώσουν, εντούτοις εμφανίζουν διαταραχές στον κερκάρδιο ρυθμό, συμπτώματα προοδευτικής αταξίας και σταδιακή απομυελίνωση των περιφερικών νεύρων (Tobler, 1996).

Μετά από μόλυνση του ξενιστή με prions, η παθολογική PrP<sup>sc</sup> είναι ικανή, παρά την απουσία νουκλεϊνικού οξέος, να προκαλέσει ταχύτατα τη μετατροπή της φυσιολογικής πρωτεΐνης PrP<sup>c</sup> σε παθολογική ισομορφή. Οι μολυσματικές πρωτεΐνες έχουν την ίδια πρωτοταγή δομή με τη φυσιολογική PrP<sup>c</sup>, διαφέρουν ωστόσο στην τριτοταγή τους δομή. Σύμφωνα με τη θεωρία σχηματισμού διμερών του Prusiner, η επαφή φυσιολογικών με παθολογικά μόρια prion οδηγεί στο σχηματισμό ετεροδιμερών PrP<sup>c</sup>- PrP<sup>sc</sup>, εντός των οποίων η φυσιολογική πρωτεΐνη αναδιπλώνεται και μετατρέπεται στην παθολογική ισομορφή. Μετά από την απομάκρυνση των μορίων, τα δύο νέα ομοδιμερή μόρια PrP<sup>sc</sup> μπορούν να ενωθούν ξανά με δύο φυσιολογικά μόρια PrP<sup>c</sup> και να τα τροποποιήσουν (Prusiner και συν., 1998).

Κατά τη διαδικασία μετατροπής, ένα μέρος των α-ελίκων της φυσιολογικής πρωτεΐνης ξεδιπλώνονται σε β-πτυχωτές επιφάνειες και αυτό έχει ως αποτέλεσμα σημαντικές αλλαγές στις φυσικοχημικές ιδιότητες της PrP (Pan και συν., 1993). Για παράδειγμα, ενώ η PrP<sup>c</sup> είναι διαλυτή στο νερό και στα ήπια απορρυπαντικά, η PrP<sup>sc</sup> δεν είναι. Η PrP<sup>c</sup> αποδομείται πλήρως από το ένζυμο πρωτεϊνάση K, ενώ η PrP<sup>sc</sup> αποδομείται μερικώς. Τα μόρια της PrP<sup>c</sup> είναι μονομερή, ενώ τα μόρια της PrP<sup>sc</sup> πολυμερίζονται και σχηματίζουν αμυλοειδείς πλάκες. Η δημιουργία αμυλοειδών πλακών είναι χαρακτηριστική ιδιότητα της PrP<sup>sc</sup> και χαρακτηριστικό εργαστηριακό εύρημα στις ΜΣΕ. Πιο συγκεκριμένα, τα μόρια της PrP<sup>sc</sup> διατάσσονται με συγκεκριμένη αρχιτεκτονική, σχηματίζοντας εξωκυτταρικά ινίδια αμυλοειδούς Scrapie-SAFs (*Scrapie Associated fibrils*).

Οι πρωτεΐνες prion είναι πολύ ανθεκτικές στην υπεριώδη και ιονίζουσα ακτινοβολία, στη ξηρή αποστείρωση και στα συνήθη απολυμαντικά μέσα (Alpen και συν., 1967, Asher και συν., 1986, Taylor και Dikrose, 1996, Taylor και συν., 1997). Θερμοκρασίες μεγαλύτερες των 600°C θεωρούνται ανεπαρκείς για να εξουδετερώσουν πλήρως τη μολυσματική πρωτεΐνη από ιστό εγκεφάλου (Brown και

συν., 1990). Πιο αποτελεσματική είναι η υγρή αποστείρωση, όπου η μολυσματική πρωτεΐνη καταστρέφεται στους 134°C ύστερα από 18 λεπτά ή στους 121°C σε 90 λεπτά (Prusiner και συν., 1984). Στο αυτόκαυστο, καταστρέφεται στους 138°C σε πίεση 3 bar σε 60 λεπτά. Οι μόνες χημικές ουσίες που είναι αποτελεσματικές κατά των prions είναι το υποχλωριώδες νάτριο, περιεκτικότητας 2% σε ελεύθερο χλώριο, και το υδροξείδιο του νατρίου, περιεκτικότητας 4%, για επίδραση μίας ώρας (Rutala και συν., 2001. Yao και συν., 2005).

### 2.3. Στελέχη του μολυσματικού παράγοντα

Υπάρχουν διαφορετικά στελέχη της παθολογικής PrP<sup>sc</sup> που διαφέρουν ως προς την τριτοταγή δομή της (Bessen και Marsh, 1994, Telling και συν., 1996, Prusiner, 1997).

Η εμφάνιση διαφορετικών στελεχών του μολυσματικού παράγοντα αποδίδεται σε πολυμορφισμούς του γονιδίου *PRNP*, το οποίο θα περιγραφεί αργότερα, που ευνοούν διαφορετικές στερεοχημικές διατάξεις του μορίου της PrP<sup>sc</sup>, σε συνδυασμό με το διαφορετικό βαθμό γλυκοσυλίωσης της πρωτεΐνης (Prusiner, 1982, Collinge και συν., 1996). Στην ύπαρξη διαφορετικών στελεχών του αιτιολογικού παράγοντα των ΜΣΕ αποδίδονται ο τροπισμός προς συγκεκριμένα είδη ξενιστών, αλλά και η διαφορετική αποτελεσματικότητα μετάδοσης της νόσου από ζώο σε ζώο και από είδος σε είδος (Bruce, 1993). Διερευνάται ακόμα και το ενδεχόμενο ορισμένα στελέχη να δείχνουν προτίμηση σε συγκεκριμένες φυλές προβάτων ή για συγκεκριμένους γενοτύπους του *PRNP* (Baylis και Goldmann, 2004). Τα διαφορετικά στελέχη σχετίζονται, επίσης, με διαφορετικό χρόνο επώασης, διαφορετική κλινική εικόνα της νόσου, διαφορετική κατανομή της PrP<sup>sc</sup> στο ΚΝΣ, καθώς και διαφορετικό είδος, κατανομή και ένταση ιστοπαθολογικών αλλοιώσεων (Hill και συν., 1997, Bruce και συν., 1997). Τα διαφορετικά στελέχη συνοδεύονται συνήθως και από μικρές βιοχημικές διαφορές, που σχετίζονται με την ανθεκτικότητά τους στη θερμοκρασία και την ευαισθησία τους στη χημική επεξεργασία (Kimberlin και συν., 1983).

Η κλασική μέθοδος διαφοροποίησης των στελεχών της τρομάδους νόσου μεταξύ τους, αλλά και από τα στελέχη της Σπογγώδους Εγκεφαλοπάθειας των Βοοειδών (ΣΕΒ) είναι η τυποποίηση τους (strain-typing) σε ποντίκια. Η μέθοδος αυτή συγκρίνει το χρόνο επώασης, τον τρόπο εναπόθεσης της PrP<sup>sc</sup> στον εγκέφαλο, καθώς και τις παθολογικές αλλοιώσεις που προκαλούνται μετά από ενοφθαλμισμό με υλικό

από μολυσμένους εγκεφάλους προβάτων (lesion profiling) σε γενετικά τροποποιημένα ποντίκια, στα οποία εκφράζεται το γονίδιο *PRNP* του προβάτου. Άλλο τρόπο χαρακτηρισμού του στελέχους αποτελεί η εφαρμογή της μεθόδου Western blot. Με την τεχνική αυτή, η παθολογική πρωτεΐνη αναλύεται μετά από κατεργασία με πρωτεΐνάση K σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου, ακολουθεί ανοσοαποτύπωση και ανίχνευση του ανθεκτικού τμήματος της παθολογικής πρωτεΐνης (PrP<sup>res</sup> = το τμήμα που δεν πέπτεται με πρωτεΐνάση K) με μονοκλωνικά αντισώματα. Τα διαφορετικά στελέχη PrP<sup>sc</sup> εμφανίζουν διαφορετική εικόνα της PrP<sup>res</sup> κατά την ηλεκτροφόρηση (Bessen και Marsh, 1994, Telling και συν., 1996). Μία άλλη τεχνική διαφοροποίησης είναι αυτή της ανοσοϊστοχημείας (Δοκιμή διάκρισης ή Discriminatory test), όπου χρησιμοποιούνται διαφορετικά μονοκλωνικά και πολυκλωνικά αντισώματα, που αναγνωρίζουν τα διάφορα στελέχη της PrP<sup>sc</sup> (Safar και συν., 1998). Σε φυσικά περιστατικά της τρομώδους νόσου είναι δυνατόν να συνυπάρχουν περισσότερα του ενός στελέχη στο ίδιο χρονικό διάστημα σε ένα ποίμνιο και, πιθανώς, στο ίδιο ζώο (Dickinson και Meikle, 1969, Bruce και συν., 1992). Μέχρι σήμερα, έχουν ταυτοποιηθεί περισσότερα από 20 διαφορετικά στελέχη της κλασικής τρομώδους νόσου.

#### **2.4 Άτυπες μορφές της τρομώδους νόσου**

Στο πλαίσιο εφαρμογής των προγραμμάτων αυξημένης επιτήρησης για τις ΜΣΕ των μικρών μηρυκαστικών, αναγνωρίστηκαν νέα ασυνήθιστα στελέχη υπεύθυνα για μία νέα μορφή της νόσου, που ονομάστηκε άτυπη τρομώδης νόσος ενώ η προηγούμενη μορφή ονομάστηκε κλασική τρομώδης νόσος. Ένα τέτοιο στέλεχος, το Nor98, εντοπίστηκε για πρώτη φορά στη Νορβηγία το 1998 (Moum και συν., 2005). Εν συνεχεία, συγγενή, με αυτό, στελέχη εντοπίστηκαν σε Γαλλία, Γερμανία και Μεγάλη Βρετανία (Buschmann και συν., 2004, Everest και συν., 2006). Τα άτυπα στελέχη εμφανίζουν μεγαλύτερη ομοιογένεια, σε σχέση με τα στελέχη της κλασικής μορφής, και διαφοροποιούνται από αυτά, αρχικά με τις ταχείες δοκιμές και εν συνεχεία με τη μέθοδο Western blot, στην οποία εμφανίζουν διαφορετικό προϊόν κατά την ηλεκτροφόρηση. Η άτυπη μορφή της νόσου μπορεί να εμφανίζει διαφορετική κλινική εικόνα από την κλασική μορφή, ενώ διαφορετική είναι και η γενετική της βάση. Χαρακτηριστικό των άτυπων μορφών είναι τα ιδιόμορφα παθολογοανατομικά ευρήματα, τόσο αναφορικά με την κατανομή των ιστοπαθολογικών αλλοιώσεων (κυρίως στην παρεγκεφαλίδα), όσο και στην κατανομή

και στις μορφές εναπόθεσης της PrP<sup>sc</sup> στο ΚΝΣ (Benestad και συν., 2003). Τα περισσότερα κρούσματα άτυπης τρομώδους νόσου έχουν καταγραφεί στη Γαλλία, στην Ισπανία και στη Μεγάλη Βρετανία (Fediaevsky και συν., 2008), ενώ ανάλογα κρούσματα έχουν καταγραφεί και στην Ελλάδα (Σοφιανίδης, 2006).

## **2.5. Επιδημιολογία και μετάδοση**

Η κλασική τρομώδης νόσος είναι νόσημα με παγκόσμια εξάπλωση. Έχει διαγνωσθεί σε χώρες της Ευρώπης, της Βορείου και Νοτίου Αμερικής, της Αφρικής, καθώς και της Μέσης και της Άπω Ανατολής. Η εξάπλωση έγινε τον προηγούμενο αιώνα με την εισαγωγή ζώων από χώρες όπου η νόσος ήταν ενζωοτική. Σήμερα, οι μόνες χώρες που επισήμως θεωρούνται απαλλαγμένες είναι η Αυστραλία και η Νέα Ζηλανδία, που εκρίζωσαν το νόσημα μετά τις επιδημίες του 1952 και του 1954 και έκτοτε εφαρμόζουν αυστηρά μέτρα ελέγχου κατά την εισαγωγή ζώων (Hoinville, 1996, OIE, 2009).

Η άτυπη μορφή της νόσου έχει μέχρι στιγμής διαγνωστεί σε δεκατέσσερις Ευρωπαϊκές χώρες που εφαρμόζουν προγράμματα επιτήρησης για τις ΜΣΕ (Fediaevsky και συν., 2008). Η άτυπη μορφή εμφανίζεται σποραδικά, προσβάλλοντας μεμονωμένα ζώα σε αντίθεση με την κλασική μορφή που προσβάλλει πολύ μεγαλύτερο ποσοστό ζώων όταν εισέρχεται σε ένα ποίμνιο (νοσηρότητα 2-10%).

Αν και η συχνότητα εμφάνισης της τρομώδους νόσου είναι χαμηλή, το νόσημα είναι δύσκολο να εκρίζωθεί. Οι τρόποι μετάδοσης του νοσήματος, παρόλο που δεν έχουν αποσαφηνιστεί πλήρως, φαίνεται να συντελούν στο γεγονός αυτό. Νέες μελέτες καταρρίπτουν προηγούμενα συμπεράσματα ή εικασίες για τη μετάδοση του νοσήματος. Η πεπτική οδός αποτελεί τη φυσική οδό μόλυνσης. Άλλοι πιθανοί τρόποι μετάδοσης, σε φυσιολογικές συνθήκες, μπορεί να σχετίζονται με τη δημιουργία εκδορών ή από τον επιπεφυκότα, αφού πειραματικές δοκιμές έδειξαν τη δυνατότητα μόλυνσης στις παραπάνω περιπτώσεις (Detweiler και Baylis, 2003). Σύμφωνα με τα υπάρχοντα στοιχεία, ενδομήτρια μετάδοση ή μετάδοση μέσω της εμβρυϊκής κυκλοφορίας ή του αμνιακού υγρού δεν έχει διαπιστωθεί (Hadlow και συν., 1982, Ridley και συν., 1995). Επίσης, οι μολυσμένοι κριοί δεν απεκκρίνουν τη μολυσματική πρωτεΐνη με το σπέρμα (Hadlow και συν., 1982). Ο κυριότερος τρόπος μετάδοσης του νοσήματος είναι μέσω του μολυσμένου, από τους πλακούντες και τα εμβρυϊκά υγρά, περιβάλλοντος (βλάστηση, ζωοτροφές, στρωμνή). Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι ο γενότυπος του εμβρύου καθορίζει αν ο πλακούντας και τα

εμβρυικά υγρά θα αποτελέσουν θέση συγκέντρωσης της μολυσματικής πρωτεΐνης και συνεπώς πηγή μόλυνσης (Andreoletti και συν., 2002, Tuo και συν., 2002). Αν ο γενότυπος του εμβρύου είναι ανθεκτικός στη νόσο, τότε η PrP<sup>sc</sup> δεν πολλαπλασιάζεται στον πλακούντα. Όταν ο πλακούντας είναι μολυσμένος, τα νεογέννητα μολύνονται, είτε κατά τη διάρκεια του τοκετού, είτε αργότερα από το μολυσμένο περιβάλλον και τη στενή επαφή με τη μητέρα τους. Επιπλέον, είναι δυνατή η μόλυνση προβάτων άλλων ποιμνίων που βόσκουν στα ίδια βοσκοτόπια με τα μολυσμένα ζώα. Μάλιστα, ο παθογόνος παράγοντας επιβιώνει για πολλά χρόνια στο εξωτερικό περιβάλλον, ενώ είναι πολύ δύσκολη η αδρανοποίησή του στους χώρους αυτούς.

Πρόσφατες έρευνες έδειξαν ότι, τόσο το γάλα, όσο και το αίμα αποτελούν και αυτά μολυσματικά βιολογικά υλικά. Στη φάση της επώασης του νοσήματος, οι μολυσμένες προβατίνες εκκρίνουν σταθερά, τόσο στο πρωτόγαλα, όσο και στο γάλα, την PrP<sup>sc</sup> αρκετούς μήνες (20) πριν την εκδήλωση κλινικών συμπτωμάτων (Lacroux και συν., 2008, Maddison και συν., 2006). Συνεπώς το γάλα μπορεί να συμμετέχει στη μετάδοση του νοσήματος, τόσο με την άμεση κατανάλωσή του από τα αρνιά, όσο και έμμεσα με τη χρησιμοποίηση υλικών, προερχόμενων από το πρόβειο γάλα, στις ζωοτροφές. Η νόσος μπορεί επίσης να μεταδοθεί μετά από μετάγγιση αίματος από πρόβατα που νοσούν σε υγιή (Houston και συν., 2008). Στα ζώα που νόσησαν ο χρόνος επώασης ήταν μικρός, γεγονός που υποδεικνύει ότι η μετάγγιση είναι μία αποτελεσματική μέθοδος μετάδοσης.

Η παρουσία της PrP<sup>sc</sup> σε ούρα ποντικών, πειραματικά μολυσμένων με τρομώδη νόσο (Seeger και συν., 2005), αλλά και η εναπόθεση PrP<sup>sc</sup> σε νεφρούς φυσικά μολυσμένων προβάτων (Siso και συν., 2006), δείχνουν ότι και η απέκκριση της PrP<sup>sc</sup> με τα ούρα συντελεί στην οριζόντια μετάδοση της νόσου. Νέες έρευνες δείχνουν, επίσης, ότι η PrP<sup>sc</sup> μπορεί να απεκκρίνεται με τα κόπρανα και τα ρινικά εκκρίματα, και με αυτά είναι δυνατό να μολύνονται οι σταβλικές εγκαταστάσεις, άλλα και οι βοσκότοποι (Dejoia και συν., 2006, Maluquer de Motes και συν., 2008).

Έρευνες, που έχουν γίνει για να εξηγήσουν την επανεμφάνιση της τρομώδους νόσου σε ορισμένες περιοχές, έδειξαν ότι τα γαστρεντερικά παράσιτα μπορεί να προδιαθέτουν στη μόλυνση, επειδή οι προνύμφες τους δημιουργούν λύσεις συνέχειας στο βλεννογόνο του πεπτικού σωλήνα (Elsen και συν., 1999).

Τέλος, έχουν καταγραφεί δύο περιστατικά ιατρογενούς μετάδοσης του νοσήματος. Το πρώτο περιστατικό αφορούσε εμβολιασμό κατά της κρωτονογενούς

εγκεφαλίτιδας (Looping ill) του προβάτου (Gordon, 1946) και το δεύτερο εμβολιασμό έναντι του *Mycoplasma agalactiae* (Caramelli και συν., 2001).

## 2.6. Παθογένεια και συμπτωματολογία

Ο ακριβής μηχανισμός παθογένειας της τρομώδους νόσου δεν έχει αποσαφηνιστεί πλήρως. Πολλαπλές πειραματικές μελέτες προσπαθούν να προσδιορίσουν τους μηχανισμούς με τους οποίους η PrP<sup>sc</sup> καταλήγει στο ΚΝΣ και προκαλεί τις χαρακτηριστικές μικροσκοπικές αλλοιώσεις των νόσων-prion.

Πιστεύεται ότι ο μολυσματικός παράγοντας, μετά την είσοδο του στον πεπτικό σωλήνα, μεταφέρεται μέσω του επιθηλίου του εντέρου στις πλάκες του Peyer. Στη μεταφορά αυτή, σημαντικό ρόλο διαδραματίζουν τα επιθηλιακά κύτταρα του βλεννογόνου και τα Μ-κύτταρα, που με τις μικρολάχνες τους μεταφέρουν τις πρωτεΐνες από τον αυλό στα βλαστικά κέντρα των πλακών του Peyer (Jeffrey και συν., 2006). Εν συνεχεία, μεταφέρεται ταχέως στα επιχώρια λεμφογάγγλια, όπου αρχίζει να συναθροίζεται (Andreoletti και συν., 2000, Carlazi και συν., 2004). Κατά τη διάρκεια των πρώτων ενός ή δύο ετών παραμένει στο λεμφικό ιστό, όπου πολλαπλασιάζεται περιφερειακά. Σημαντικό ρόλο στον περιφερειακό πολλαπλασιασμό των prions φαίνεται να παίζουν τα Β-λεμφοκύτταρα, τα ώριμα δενδριτικά κύτταρα των θυλακίων (Follicular Dendritic Cells) και τα μακροφάγα (Frigg και συν., 1999, Kitamoto και συν., 1991, Beringue και συν., 2000, Maignien και συν., 2005). Στη συνέχεια, η PrP<sup>sc</sup> μεταναστεύει από την περιφέρεια στο ΚΝΣ, διαδικασία που ονομάζεται νευροδιείσδυση (neuroinvasion). Η διείσδυση του μολυσματικού παράγοντα στο ΚΝΣ φαίνεται ότι γίνεται μέσω των περιφερειακών νεύρων και όχι, αρχικά, μέσω του κυκλοφοριακού-λεμφικού συστήματος και στη συνέχεια μέσω των νεύρων (Groschup και συν., 1999). Η μεταφορά μπορεί να γίνεται χρησιμοποιώντας νευρικές ίνες του συμπαθητικού ή του παρασυμπαθητικού νευρικού συστήματος, και ιδίως τις παρασυμπαθητικές ίνες του πνευμονογαστρικού νεύρου (Kimberlin και Walker, 1982, Van Keulen και συν., 2002). Στο ΚΝΣ η PrP<sup>sc</sup> πολλαπλασιάζεται με πιο γρήγορους ρυθμούς και προκαλεί νευροεκφυλισμό. Λίγα στοιχεία είναι γνωστά για τον νευροεκφυλιστικό μηχανισμό, που μπορεί να οφείλεται στην ύπαρξη τοξικών μορφών της PrP<sup>sc</sup> και σε δομικές και βιοχημικές αλλαγές που προκαλούνται στα νευρικά κύτταρα (Manson και συν., 1994, Wong και συν., 2000, Jeffrey και συν., 2001, Rico, 2003). Οι μικροσκοπικές αλλοιώσεις της τρομώδους νόσου στο πρόβατο χαρακτηρίζονται από κενотоπίωση των νευρώνων, σπογγίωση

του νευροπληήματος, αστροκυττάρωση, απώλεια νευρώνων και εναπόθεση αμυλοειδούς (Leontidis και συν., 2000, Ersdal και συν., 2004).

Η εκφύλιση των νευρικών κυττάρων έχει ως αποτέλεσμα πρόβατα που μολύνονται να εμφανίζουν νευρικά συμπτώματα και αλλαγή στη συμπεριφορά. Συμπτώματα εμφανίζουν, συνήθως, ζώα ηλικίας δύο έως πέντε ετών. Σπανιότερα εμφανίζονται συμπτώματα σε πρόβατα μικρότερα των δεκαοχτώ μηνών, έχουν εντοπιστεί ωστόσο συμπτώματα σε ζώα ακόμα και έξι μηνών ή έντεκα ετών. Τα πρόβατα που νοσούν γίνονται, συνήθως, επιθετικά ή νευρικά, αντιδρούν έντονα στο θόρυβο ή στις κινήσεις (υπερευαισθησία) και εμφανίζουν τάσεις απομόνωσης από το υπόλοιπο ποίμνιο. Εμφανίζουν, επίσης, νευρικά συμπτώματα, όπως τρόμο της κεφαλής, κυρίως, και του τραχήλου, έντονη σιαλόρροια κατά τη μάσηση, έλλειψη συντονισμού των κινήσεων, ανωμαλίες στο βάδισμα (αναπηδήσεις όπως του λαγού), αστάθεια των πίσω άκρων, με αποτέλεσμα την εμφάνιση τάσης για ταλάντευση, και, μετά από κάποιο διάστημα, παράλυση. Χαρακτηριστικό σύμπτωμα της νόσου αποτελεί ο έντονος κνησμός, χωρίς την ύπαρξη δερματικών αλλοιώσεων, από τον οποίο το νόσημα πήρε και το αγγλικό όνομά του (scraping = κνησμός). Ο κνησμός αρχίζει, συνήθως, από το πίσω μέρος του σώματος και μπορεί να είναι πολύ έντονος και να προκαλεί τέτοια απώλεια του ερίου ώστε ορισμένες περιοχές του σώματος των ζώων να εμφανίζονται γυμνές. Τα πρόβατα οδηγούνται στο θάνατο, συνήθως, σε διάστημα ενός έως έξι μηνών, λόγω ασιτίας ή λειψυδρίας. Η εικόνα των ετοιμοθάνατων ζώων είναι εικόνα ζώων που πάσχουν από χρόνια καχεξιογόνο νόσημα.

Στην άτυπη μορφή του νοσήματος συνήθως δεν εμφανίζεται ο χαρακτηριστικός κνησμός. Στα περισσότερα κρούσματα, παρατηρείται μόνο αταξία, ενώ είναι δυνατόν τα ζώα που πάσχουν να μην εμφανίζουν κανένα κλινικό σύμπτωμα (Konold και συν., 2006).

## **2.7. Διάγνωση και θεραπεία**

Η αρχική διάγνωση της τρομάδους νόσου βασίζεται, τόσο στα συμπτώματα του νοσήματος, όσο και στη μη ανταπόκριση του ζώου στη συμπτωματική θεραπευτική αγωγή (Detweiler και συν., 1996).

Η τελική διάγνωση γίνεται μεταθανάτια, με την ταυτοποίηση των χαρακτηριστικών ιστοπαθολογικών αλλοιώσεων του ΚΝΣ ή με την ανίχνευση της παθολογικής πρωτεΐνης-prion. Οι εργαστηριακές εξετάσεις ξεκινούν με μία ταχεία

δοκιμή (screening test) ανίχνευσης της PrP<sup>sc</sup> στον προμήκη μυελό και στην παρεγκεφαλίδα ή με ιστοπαθολογική εξέταση. Οι περισσότερες από τις ταχείες δοκιμές βασίζονται στην ανοσοενζυμική δοκιμή ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) που ανιχνεύει την παθολογική πρωτεΐνη μετά από πέψη με πρωτεΐνάση K (Gavier-Widen και συν., 2005). Με την ιστοπαθολογική εξέταση ανιχνεύεται η κενотоπιώδης εκφύλιση των νευρώνων, η αντιδραστική αστροκυττάρωση και η αμυλοειδωση των αγγείων του ΚΝΣ. Η τεχνική αυτή δεν μπορεί να εφαρμοστεί σε ιστούς που έχουν παραμείνει στην κατάψυξη ή έχουν υποστεί αυτόλυση.

Σε περίπτωση θετικού αποτελέσματος στην ταχεία δοκιμή, οι ιστοί υποβάλλονται σε εξετάσεις επιβεβαίωσης (confirmatory tests). Στις επιβεβαιωτικές δοκιμές ανήκουν η ανοσοϊστοχημεία, η Western Blot, που είναι μία δοκιμή ανάλυσης πρωτεϊνών με βάση το μοριακό τους βάρος, και η ανίχνευση των ινιδίων αμυλοειδούς Scrapie-SAFs με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο. Με την ανοσοϊστοχημεία ανιχνεύεται η συσσωρευμένη PrP<sup>sc</sup> σε υλικά που έχουν μονιμοποιηθεί με φορμαλίνη (McBride και συν., 1988, van Keulen και συν., 2002). Τόσο η ανοσοϊστοχημεία όσο και η Western Blot μπορούν να εφαρμοστούν σε ιστούς που έχουν παραμείνει στην κατάψυξη ή έχουν υποστεί αυτόλυση.

Όλες οι παραπάνω τεχνικές, όπως προαναφέρθηκε, ανιχνεύουν την PrP<sup>sc</sup> μεταθανάτια. Τα τελευταία χρόνια υπάρχει μεγάλο ενδιαφέρον για την ανάπτυξη τεχνικών που θα μπορούν να ανιχνεύουν την PrP<sup>sc</sup> σε ζωντανά ζώα. Η συσσώρευση της PrP<sup>sc</sup> στον λεμφικό ιστό, πριν από την εκδήλωση των κλινικών συμπτωμάτων, προσφέρει τη δυνατότητα *in vivo* διάγνωσης μετά από εξέταση δειγμάτων που λαμβάνονται με βιοψία από τις αμυγδαλές (Schreuder και συν., 1998), το τρίτο βλέφαρο (O'Rourke και συν., 2002) και το απευθυσμένο (Gonzalez και συν., 2006). Ωστόσο, ο βαθμός της περιφερειακής συσσώρευσης της PrP<sup>sc</sup> ποικίλει από ζώο σε ζώο και φαίνεται να σχετίζεται με το γενότυπό του (Houston και συν., 2002, Ligios και συν., 2006). Συνεπώς, το θετικό αποτέλεσμα αυτών των μεθόδων είναι ενδεικτικό της παρουσίας του νοσήματος, ενώ το αρνητικό, δηλαδή η μη εντόπιση της PrP<sup>sc</sup> στον περιφερειακό λεμφικό ιστό, δε θεωρείται αξιόπιστο αποτέλεσμα.

Θεραπεία για την τρομώδη νόσο δεν υπάρχει. Η ανάπτυξη φαρμάκων για ΜΣΕ είναι πολύ δύσκολο να επιτευχθεί, αφού οι κλασικές αντιβακτηριδιακές και αντικές προσεγγίσεις δεν έχουν κανένα αποτέλεσμα σε αυτό το νόσημα, ούτε υπάρχει η δυνατότητα πρόληψης μέσω εμβολιασμού. Από τις μέχρι τώρα μελέτες



διαπιστώθηκε ότι η αμφοτερισίνη Β, που είναι ένα αντιμυκητιακό φάρμακο, μπορεί να επιβραδύνει την πορεία της τρομώδους νόσου, όχι, όμως, και να αναστείλει πλήρως την εξέλιξή της (Demaimay και συν., 1997).

## **2.8. Σχέση με τη δημόσια υγεία**

Η τρομώδης νόσος πιστεύεται ότι δε μεταδίδεται στον άνθρωπο. Αν και το νόσημα είναι γνωστό εδώ και σχεδόν 300 χρόνια δεν υπάρχει καμία επιδημιολογική μαρτυρία που να έχει συσχετίσει στελέχη της τρομώδους νόσου με σπογγώδεις εγκεφαλοπάθειες του ανθρώπου (Raymond και συν., 1997). Σε γενικές γραμμές, η μετάδοση των σπογγωδών εγκεφαλοπαθειών μεταξύ ατόμων του ίδιου είδους είναι εύκολη και συνοδεύεται από τα ίδια χαρακτηριστικά συμπτώματα, ενώ η μετάδοση μεταξύ ατόμων διαφορετικών ειδών είναι, συνήθως, μη αποτελεσματική (φραγμός του είδους, species barrier). Η μετάδοση μεταξύ διαφορετικών ειδών συνοδεύεται από χαμηλή μολυσματικότητα, μεγάλους χρόνους επώασης και την πιθανότητα εκδήλωσης του νοσήματος με διαφορετικά συμπτώματα (Pattison και συν., 1965, Prusiner και συν., 1990, Peretz και συν., 2002). Το γεγονός ότι, μέχρι στιγμής, η τρομώδης νόσος δεν μεταδίδεται στον άνθρωπο αποδίδεται στις μεγάλες διαφορές που έχει η πρωτοταγής δομή της πρωτεΐνης PrP του προβάτου και του ανθρώπου. Επιπλέον, έχουν διαπιστωθεί σημαντικές ομοιότητες της δευτεροταγούς δομής της PrP του ανθρώπου με εκείνης των προβάτων με ανθεκτικό στην τρομώδη νόσο γενότυπο (Concercion και συν., 2005).

Το μεγάλο ενδιαφέρον για τις σπογγώδεις εγκεφαλοπάθειες και η ανησυχία για τη δημόσια υγεία ξεκίνησαν με την εμφάνιση της Σπογγώδους Εγκεφαλοπάθειας των Βοοειδών, γνωστής ως «νόσος των τρελών αγελάδων», το 1986. Η ΣΕΒ εξελίχθηκε σε επιδημία, αφού πάνω από 200.000 βοοειδή νόσησαν, ενώ 2.500.000 θανατώθηκαν από το 1986 έως το 2005, στη Μεγάλη Βρετανία (Doherr, 2007). Αίτιο για την εμφάνιση αυτού του νοσήματος θεωρήθηκε η κατανάλωση από τα βοοειδή οστεαλεύρων και κρεαταλεύρων, προερχόμενων από πρόβατα και γίδια μολυσμένα από τρομώδη νόσο ή από βοοειδή που νοσούσαν από σποραδική σπογγώδη εγκεφαλοπάθεια (Wilesmith και συν., 1991). Το 1996, εμφανίστηκε μία νέα παραλλαγή της νόσου CJD του ανθρώπου, η vCJD, η οποία αποδόθηκε στην κατανάλωση μολυσμένου, με τον παθογόνο παράγοντα της ΣΕΒ, βόειου κρέατος (Bruce και συν., 1997, Hill και συν., 1997)..

Επιπλέον, υπάρχει η ανησυχία ότι ο αιτιολογικός παράγοντας της ΣΕΒ έχει μολύνει και τα μικρά μηρυκαστικά, διότι αφενός τα ίδια οστεάλευρα και κρεατάλευρα που δόθηκαν στα βοοειδή καταναλώθηκαν την ίδια περίοδο και από αυτά και αφετέρου η ΣΕΒ βρέθηκε ότι μεταδίδεται πειραματικά τόσο σε γίδια όσο και σε πρόβατα (Foster και συν., 1993, 1994). Πράγματι, το 2005 εντοπίστηκε στη Γαλλία μία γίδα φυσικά μολυσμένη από ΣΕΒ (Eloit και συν., 2005), όπως επίσης διαπιστώθηκαν και περιστατικά φυσικής μόλυνσης με ΣΕΒ σε ένα ποίμνιο στη Μεγάλη Βρετανία στο οποίο εισήλθαν πειραματικά μολυσμένα με ΣΕΒ πρόβατα (Bellworthy και συν., 2005). Δηλαδή, η μεταφορά παθολογικών prions είναι αμφίδρομη μεταξύ μικρών μηρυκαστικών και βοοειδών. Μάλιστα, η κλινική εκδήλωση της ΣΕΒ στα μικρά μηρυκαστικά δεν διαφέρει από εκείνη της τρομώδους νόσου. Βάσει των παραπάνω, πιθανολογείται ότι ο αιτιολογικός παράγοντας της ΣΕΒ θα μπορούσε να περάσει και από τα μικρά μηρυκαστικά, μέσω της τροφικής αλυσίδας, στον άνθρωπο. Για αυτό και είναι σημαντική η παραγωγή ποιοτικών προϊόντων από υγιή ζώα ανθεκτικών στην τρομώδη νόσο.

Επιπλέον, το γεγονός ότι ένα στέλεχος της τρομώδους νόσου έχει απομονωθεί σε συγγενικά με τον άνθρωπο είδη πρωτευόντων (Groschoup και συν., 2007), δείχνει ότι τα όρια μεταξύ των ειδών μπορούν, με τις κατάλληλες μεταλλάξεις, να παρακαμφθούν (Berlingue και συν., 2008). Συνεπώς, δεν υπάρχει βεβαιότητα για το τι θα μπορούσε μελλοντικά να συμβεί, αναφορικά με την υγεία του ανθρώπου και για το λόγο αυτό έχουν αναπτυχθεί μαθηματικά μοντέλα που μελετούν τον κίνδυνο μετάδοσης στελεχών τρομώδους νόσου στον άνθρωπο (EFSA, 2005).

Προς αποφυγή της εισόδου των prions στην τροφική αλυσίδα του ανθρώπου, η ΕΕ θέσπισε τα προγράμματα αυξημένης επιτήρησης για τις ΜΣΕ (συμπεριλαμβανομένης και της τρομώδους νόσου) και τα προγράμματα γενετικής επιλογής για την αύξηση της εγγενούς ανθεκτικότητας των προβάτων στις νόσους αυτές.

Επιπλέον, χρηματοδοτεί ερευνητικά προγράμματα που ενδυνάμει μπορούν να διευκολύνουν τον έλεγχο και την εξάλειψη του προβλήματος των μεταδοτικών σπογγωδών εγκεφαλοπαθειών. Από ένα τέτοιο ευρωπαϊκό πρόγραμμα χρηματοδοτήθηκε και η έρευνα που συντελέστηκε στα πλαίσια της παρούσας διατριβής.

### 3. ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΒΑΣΗ ΤΗΣ ΤΡΟΜΩΔΟΥΣ ΝΟΣΟΥ

#### 3.1. Γενικά

Από το 18<sup>ο</sup> αιώνα οι αναφορές στην τρομώδη νόσο επισήμαιναν ότι οι συγγενικές σχέσεις μεταξύ των προβάτων είχαν σημαντική επίδραση στην εμφάνιση του νοσήματος, γι' αυτό και τα μέτρα που λαμβάνονταν για να ελεγχθεί το νόσημα στηρίζονταν στο εν λόγω γεγονός (Parry, 1984). Εξαιτίας λοιπόν του συγγενικού χαρακτήρα εμφάνισης της νόσου (family link), η τρομώδης νόσος δεν θεωρήθηκε αρχικά μία μεταδοτική νόσος αλλά μία εξολοκλήρου γενετικής προέλευσης νόσος. Συγκεκριμένες φυλές προβάτων θεωρούνταν πιο ευπαθείς στο νόσημα σε σχέση με άλλες (Gordon και συν., 1966). Μετέπειτα, όμως, έρευνες έδειξαν ότι υπήρχε μεγάλου βαθμού παραλλακτικότητα στο βαθμό ευπάθειας μεταξύ διαφορετικών ζώων της ίδιας φυλής προβάτων (Dickinson, 1976). Τα πειράματα που ακολούθησαν, αρχικά σε πρόβατα και μετέπειτα σε διαγονιδιακά ποντίκια, έδειξαν ότι ένα μόνο γονίδιο, που υπάρχει σε δύο μορφές, καθορίζει την ευπάθεια ή την ανθεκτικότητα των προβάτων στο νόσημα. Το γονίδιο αυτό ονομάστηκε, αρχικά, *Sip* (Scapie incubation period). Από έρευνες της Hunter και συν. (1989), με τη βοήθεια μοριακών τεχνικών, διαπιστώθηκε ότι το γονίδιο *Sip* και το γονίδιο της πρωτεΐνης PrP (*PRNP*) είναι ταυτόσημα. Σύμφωνα με τον Prusiner (1991, 1993), ορισμένοι πολυμορφισμοί του γονιδίου *PRNP* καθορίζουν την ευπάθεια στο νόσημα, το χρόνο επώασης και τις ιστοπαθολογικές αλλοιώσεις. Σήμερα, είναι γνωστό ότι η τρομώδης νόσος αποτελεί μεταδοτικό νόσημα συνδεδεμένο με γενετική προδιάθεση. Συνεπώς, η εκδήλωση συμπτωμάτων είναι αποτέλεσμα της αλληλεπίδρασης του μολυσματικού παράγοντα (ο οποίος μπορεί να εμφανίζεται με τη μορφή ποικίλων στελεχών) και του γενετικού υπόβαθρου του ξενιστή (Hunter και συν., 1997, Bossers και συν., 1999).

#### 3.2. Πολυμορφισμοί του γονιδίου *PRNP*

Το γονίδιο *PRNP* εντοπίζεται στο 13<sup>ο</sup> χρωμόσωμα του προβάτου (Iannuzzi και συν., 1998). Το μήκος του γονιδίου είναι σχεδόν 21 χιλιάδες βάσεις (kb) και αποτελείται από τρία εξόνια και δύο ιντρόνια (Westaway και συν., 1994). Όλο το ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης του γονιδίου της PrP<sup>c</sup> εντοπίζεται στο εξόνιο III (4 kb) (Goldmann και συν., 1990). Η PrP<sup>c</sup> αποτελείται από 256 αμινοξέα. Σε ορισμένες θέσεις του γονιδίου *PRNP* έχουν παρατηρηθεί αλλαγές βάσεων (πολυμορφισμοί) σε σχέση με το λεγόμενο «αρχέγονο τύπο» (ARQ). Ο τύπος αυτός θεωρείται ως ο κοινός

πρόγονος όλων των άλλων αλληλομόρφων, σύμφωνα με την αρχή της μέγιστης φειδωλότητας (maximum parsimony) (Elsen και συν., 1999, Baylis και Goldmann, 2004).

Δύο ειδών είναι οι πολυμορφισμοί που έχουν βρεθεί. Το ένα είδος είναι μονο-νουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί (Single Nucleotide Polymorphisms - SNP) στο DNA, που συχνά προκαλούν αλλαγή ενός αμινοξέος. Τα SNP αποτελούν τη συντριπτική πλειονότητα όλων των πολυμορφισμών. Η δεύτερη κατηγορία πολυμορφισμών είναι προσθήκες ή απαλείψεις (insertions or deletions) συγκεκριμένων χαρακτηριστικών επαναλήψεων οχταπεπτιδίων του τύπου PHGGGWGQ στο N-τελικό άκρο της PrP<sup>c</sup> (Goldmann, 2008). Μέχρι σήμερα, στο πρόβατο έχουν περιγραφεί 43 διαφορετικά αλληλόμορφα του γονιδίου της PrP, προερχόμενα είτε από SNP είτε από εισαγωγές ή απαλείψεις οχταπεπτιδίων (βλέπε επόμενη ενότητα), ενώ 39 από τα 256 κωδικόνια (15%) είναι πολυμορφικά (Πίνακας 2 και Πίνακας 3). Αναμένεται ότι ο αριθμός αυτός πολύ σύντομα θα αυξηθεί, αφού νέοι πολυμορφισμοί και συνδυασμοί αλληλομόρφων ανακαλύπτονται συνεχώς (Hunter και συν., 2006).

### 3.3 Γενότυπος του γονιδίου *PRNP*

Μελέτες αρχικά σε πειραματικά μοντέλα και στη συνέχεια σε φυσικά περιστατικά τρομάδους νόσου, έδειξαν ότι στη φαινοτυπική εκδήλωση του νοσήματος καθοριστικό ρόλο παίζουν οι πολυμορφισμοί σε τρία κωδικόνια (136, 154, 171) του γονιδίου *PRNP* (Laplace και συν., 1993, Belt και συν., 1995). Με βάση τα παραπάνω, ο γενότυπος της PrP μπορεί να ορισθεί ως ο συνδυασμός των αλληλόμορφων του γονιδίου *PRNP* στα κωδικόνια 136, 154 και 171.

Οι πολυμορφισμοί που έχουν ανιχνευτεί στο κωδικόνιο 136 αντιστοιχούν στα αμινοξέα Αλανίνη (A)/ Βαλίνη (V)/ Θρεονίνη (T), στο κωδικόνιο 154 στα αμινοξέα Αργινίνη (R)/ Ιστιδίνη (H)/ Λευκίνη (L) και στο κωδικόνιο 171 στα αμινοξέα Γλουταμίνη (Q)/ Ιστιδίνη (H)/ Αργινίνη (R)/ Λυσίνη (K). Οι αντιστοιχίες αυτές παρατίθενται στον Πίνακα 2.

**Πίνακας 2.** Συνδυασμοί πολυμορφισμών που έχουν ανιχνευτεί στα τρία καθοριστικά κωδικόνια (136, 154, 171) του γονιδίου *PRNP* του προβάτου.

Αλληλόμορφα γονιδίου <i>PRNP</i>	Αμινοξέα
ARQ	Αλανίνη <sub>136</sub> , Αργινίνη <sub>154</sub> , Γλουταμίνη <sub>171</sub>
VRQ	Βαλίνη <sub>136</sub> , Αργινίνη <sub>154</sub> , Γλουταμίνη <sub>171</sub>
VRR	Βαλίνη <sub>136</sub> , Αργινίνη <sub>154</sub> , Αργινίνη <sub>171</sub>
VHQ	Βαλίνη <sub>136</sub> , Ιστιδίνη <sub>154</sub> , Γλουταμίνη <sub>171</sub>
TRQ	Θρεονίνη <sub>136</sub> , Αργινίνη <sub>154</sub> , Γλουταμίνη <sub>171</sub>
AHQ	Αλανίνη <sub>136</sub> , Ιστιδίνη <sub>154</sub> , Γλουταμίνη <sub>171</sub>
ALQ	Αλανίνη <sub>136</sub> , Λευκίνη <sub>154</sub> , Γλουταμίνη <sub>171</sub>
AHR	Αλανίνη <sub>136</sub> , Ιστιδίνη <sub>154</sub> , Αργινίνη <sub>171</sub>
ARH	Αλανίνη <sub>136</sub> , Αργινίνη <sub>154</sub> , Ιστιδίνη <sub>171</sub>
ARR	Αλανίνη <sub>136</sub> , Αργινίνη <sub>154</sub> , Αργινίνη <sub>171</sub>
ARK	Αλανίνη <sub>136</sub> , Αργινίνη <sub>154</sub> , Λυσίνη <sub>171</sub>

Τα αλληλόμορφα του *PRNP* συμβολίζονται ως π.χ. A<sub>136</sub>R<sub>154</sub>Q<sub>171</sub> (ARQ), V<sub>136</sub>R<sub>154</sub>Q<sub>171</sub> (VRQ) κτλ. Ο γενότυπος της PrP που προέρχεται από το ζεύγος ARQ και VRQ γράφεται ARQ/VRQ και αντίστοιχα ο γενότυπος που προέρχεται από το ζεύγος ARR και AHQ γράφεται ARR/AHQ (Dawson και συν., 1998).

### 3.4. Γενότυπος του γονιδίου *PRNP* και σχέση του με την κλασική τρομώδη νόσο, την άτυπη τρομώδη νόσο και τη ΣΕΒ

Παρά την εντατική έρευνα στον τομέα της συσχέτισης των αλληλομόρφων του γονιδίου *PRNP* με το βαθμό ευαισθησίας ή ανθεκτικότητας που προσδίδουν στα πρόβατα, ο μηχανισμός μέσω του οποίου τα διαφορετικά αλληλόμορφα επιδρούν δεν έχει ακόμα διευκρινιστεί πλήρως. Φαίνεται ότι οι γενότυποι μπορεί να επηρεάσουν την αποτελεσματικότητα τροποποίησης της φυσιολογικής PrP<sup>c</sup> σε παθολογική PrP<sup>sc</sup> (Glockshuber και συν., 1999).

**Πίνακας 3.** Πολυμορφισμοί που έχουν ανιχνευτεί στο γονίδιο *PRNP* του προβάτου, πέρα από τα τρία βασικά κωδικόνια. Τα τρία γράμματα χωρίς δείκτη αντιστοιχούν στα αμινοξέα που κωδικοποιούνται στις θέσεις 136, 154, 171 (ARQ-αρχέγονος τύπος). Ο δείκτης στο τέταρτο γράμμα (αμινοξύ που κωδικοποιείται) υποδεικνύει τη θέση που εντοπίστηκε ο πολυμορφισμός (αριστερή στήλη). Στη δεξιά στήλη αναφέρονται τα αμινοξέα που συνήθως απαντώνται στις θέσεις αυτές (Goldmann, 2008).

<b>Αλληλόμορφα</b>	<b>Αμινοξέα</b>
ARQ	Αρχέγονος τύπος (μη μεταλλαγμένος)
(Αργινίνη) R <sub>85</sub> -ARQ	(Γλυκίνη) G <sub>85</sub>
(Αργινίνη) R <sub>101</sub> -ARQ	(Γλουταμίνη) Q <sub>101</sub>
(Θρεονίνη) T <sub>112</sub> -ARQ	(Μεθειονίνη) M <sub>112</sub>
(Ισολευκίνη) I <sub>112</sub> -ARQ	(Μεθειονίνη) M <sub>112</sub>
(Προλίνη) P <sub>116</sub> -ARQ	(Αλανίνη) A <sub>116</sub>
(Αλανίνη) A <sub>127</sub> -ARQ	(Γλυκίνη) G <sub>127</sub>
(Βαλίνη) V <sub>127</sub> -ARQ	(Γλυκίνη) G <sub>127</sub>
(Σερίνη) S <sub>127</sub> -ARQ	(Γλυκίνη) G <sub>127</sub>
S <sub>127</sub> -ARQ- <sub>176</sub> D (Ασπαρτικό οξύ)	G <sub>127</sub> -N <sub>127</sub> (Ασπαραγίνη)
(Θρεονίνη) A-T <sub>137</sub> -RQ	(Μεθειονίνη) M <sub>137</sub>
(Αργινίνη) A-R <sub>127</sub> -RQ	(Σερίνη) S <sub>127</sub>
(Ασπαραγίνη) A-N <sub>138</sub> -RQ	(Σερίνη) S <sub>138</sub>
(Φαινυλαλανίνη) A-F <sub>141</sub> -RQ	(Λευκίνη) L <sub>141</sub>
(Λυσίνη) A-K <sub>142</sub> -RQ	(Ισολευκίνη) I <sub>142</sub>
(Αργινίνη) A-R <sub>143</sub> -RQ	(Ιστιδίνη) H <sub>143</sub>
(Σερίνη) A-S <sub>146</sub> -RQ	(Ασπαραγίνη) N <sub>146</sub>
(Γλυκίνη) A-G <sub>151</sub> -RQ	(Αργινίνη) R <sub>151</sub>
(Κυστεΐνη) A-C <sub>151</sub> -RQ	(Αργινίνη) R <sub>151</sub>
(Φαινυλαλανίνη) A-F <sub>152</sub> -RQ	(Τυροσίνη) Y <sub>152</sub>
(Σερίνη) AR-S <sub>167</sub> -Q	(Αργινίνη) R <sub>167</sub>
(Λευκίνη) AR-L <sub>168</sub> -Q	(Προλίνη) P <sub>168</sub>
(Ασπαρτικό οξύ) AR-D <sub>172</sub> -Q	(Τυροσίνη) Y <sub>172</sub>
ARQ-K <sub>176</sub> (Λυσίνη)	(Ασπαραγίνη) N <sub>176</sub>
ARQ-E <sub>175</sub> (Γλουταμινικό οξύ)	(Γλουταμίνη) Q <sub>175</sub>
ARQ-Y <sub>180</sub> (Τυροσίνη)	(Ιστιδίνη) H <sub>180</sub>
ARQ-R <sub>189</sub> (Αργινίνη)	(Γλουταμίνη) Q <sub>189</sub>
ARQ-L <sub>189</sub> (Λευκίνη)	(Γλουταμίνη) Q <sub>189</sub>
ARQ-S <sub>195</sub> (Σερίνη)	(Θρεονίνη) T <sub>195</sub>
ARQ-S <sub>196</sub> (Σερίνη)	(Θρεονίνη) T <sub>196</sub>
ARQ-Q <sub>211</sub> (Γλουταμίνη)	(Αργινίνη) R <sub>211</sub>
ARQ-S <sub>241</sub> (Σερίνη)	(Προλίνη) P <sub>241</sub>

Παρά τον αδιευκρίνιστο μηχανισμό, υπάρχουν συγκεκριμένοι κανόνες που συσχετίζουν το γενότυπο του *PRNP* με την ευαισθησία στην κλασική μορφή της τρομώδους νόσου και το χρόνο επώασης του νοσήματος. Τα δεδομένα αυτά αξιοποιούνται για την επιλογή των κατάλληλων ανθεκτικών γενοτύπων στα πλαίσια των προγραμμάτων γενετικής βελτίωσης για την ανάπτυξη ανθεκτικότητας έναντι της τρομώδους νόσου στο πληθυσμό των προβάτων. Πιο συγκεκριμένα, η παρουσία βαλίνης (V) στη θέση 136 και γλουταμίνης (Q) στη θέση 171 έχουν συσχετιστεί με

ευαισθησία στο νόσημα, ενώ η παρουσία αλανίνης (A) και αργινίνης (R) στις αντίστοιχες θέσεις με ανθεκτικότητα. Η χαμηλή συχνότητα εμφάνισης της θρεονίνης (T) στη θέση 136, της λευκίνης (L) στη θέση 154 και της λυσίνης (K) στη θέση 171 σε συνδυασμό με το γεγονός ότι είναι πολυμορφισμοί που έχουν ανιχνευτεί πρόσφατα, δεν έχουν επιτρέψει τη συσχέτισή τους με ευαισθησία ή ανθεκτικότητα στο νόσημα. Παρόλα αυτά, από τις πρώτες μελέτες, δε φαίνεται οι πολυμορφισμοί αυτοί να έχουν σημαντική επίδραση στον καθορισμό της ευαισθησίας στο νόσημα, τουλάχιστον όχι στις συγκεκριμένες φυλές που εντοπίστηκαν (Billinis και συν., 2004, De Silva και συν., 2003, Alvarez και συν., 2006α). Η παρουσία της ιστιδίνης (H) στη θέση 154 φαίνεται ότι σε άλλες φυλές προβάτων προσδίδει ευαισθησία και σε άλλες ανθεκτικότητα (Baylis και Goldman, 2004).

Μελέτες στη Μεγάλη Βρετανία οδήγησαν, στα πλαίσια του εθνικού προγράμματος καταπολέμησης της τρομάδους νόσου, στη δημιουργία ενός συστήματος ταξινόμησης των πιο συχνά ταυτοποιημένων γενοτύπων του *PRNP* σε πέντε ομάδες κινδύνου, ανάλογα με τη σχετική ευαισθησία ή ανθεκτικότητα που προσδίδουν στα πρόβατα έναντι της κλασικής μορφής του νοσήματος (Πίνακας 4) (DEFRA, 2003). Το σύστημα αυτό ταξινόμησης, αν και δημιουργήθηκε βάσει μελετών που αφορούσαν φυλές κρεοπαραγωγών προβάτων που εκτρέφονταν στη Μεγάλη Βρετανία, υιοθετήθηκε και από τις άλλες χώρες (Detweiler και Baylis, 2001).

Συγκεκριμένα, στην ομάδα 5 (Πίνακας 4) ταξινομούνται τα ζώα με τον υψηλότερο κίνδυνο εμφάνισης της νόσου, που φέρουν το γενότυπο VRQ/VRQ. Μελέτες σε Γαλλία, Ολλανδία, Ιρλανδία και Νορβηγία, που ακολούθησαν επιζωοτίες της τρομάδους νόσου, επιβεβαίωσαν τη διαπίστωση αυτή (Cloucard και συν., 1995, Belt και συν., 1995). Ζώα με γενότυπους VRQ/ARQ και VRQ/ARH εμφανίζουν παρόμοιο κίνδυνο με τα ομοζύγωτα VRQ ζώα, γι' αυτό ταξινομούνται επίσης στην ομάδα 5. Στην ίδια ομάδα ταξινομείται και ο γενότυπος VRQ/AHQ, εντούτοις, εμφανίζει μικρότερο κίνδυνο συγκριτικά με τους προηγούμενους αλλά μεγαλύτερο σε σχέση με τα VRQ/ARR ζώα. Το γεγονός αυτό αποδίδεται στην παρουσία του AHQ, που στις βρετανικές κρεοπαραγωγικές φυλές προβάτων, π.χ. Σέβιοτ (Cheviot) και Τέξελ (Texel), στις οποίες βασίστηκε η μελέτη για τη δημιουργία του συστήματος ταξινόμησης των γενοτύπων, θεωρείται ότι προσδίδει κάποιου βαθμού ανθεκτικότητα έναντι του νοσήματος (Hunter και συν., 1996). Στην ομάδα 4 ταξινομούνται τα ζώα με γενότυπο VRQ/ARR, στα οποία ο κίνδυνος εκδήλωσης τρομάδους νόσου είναι

μικρότερος, από ό,τι στην ομάδα 5, λόγω της παρουσίας του αλληλομόρφου ARR. Στην ομάδα 3 ανήκουν ζώα με χαμηλή ευαισθησία στη νόσο και το ίδιο ισχύει και για τους απογόνους τους που πάντα θα ανήκουν στην κατηγορία 3, καθώς οι εν λόγω γενότυποι εμπλέκουν αποκλειστικά τα αλληλόμορφα ARQ, ARH και AHQ. Ενδιαφέρον παρουσιάζουν τα πρόβατα ARQ/ARQ, τα οποία θεωρούνται χαμηλής ευαισθησίας για τα δεδομένα της Μεγάλης Βρετανίας, αλλά οι μελέτες που έγιναν κατά τις επιζωοτίες τρομώδους νόσου σε Γερμανία, Ισπανία και Ελλάδα έδειξαν ότι αυτά τα ζώα παρουσιάζουν αυξημένη ευπάθεια (Acin και συν., 2004, Bilinis και συν., 2004, Lühken και συν., 2007). Τα ζώα της κατηγορίας 2, ετεροζύγωτα ως προς το ARR, είναι αρκετά ανθεκτικά, αλλά σποραδικά μπορεί να νοσήσουν από την κλασική τρομώδη νόσο. Το γεγονός αυτό τα διαφοροποιεί από τα ζώα της κατηγορίας 1, τα ομοζύγωτα ARR, που θεωρούνται πολύ ανθεκτικά τόσο στη φυσική κλασική τρομώδη νόσο όσο και στην πειραματική ΣΕΒ (Houston και συν., 2003). Πρόσφατα, ωστόσο, στη Γερμανία και στη Γαλλία εντοπίστηκαν δύο περιστατικά ζώων ARR/ARR που ήταν υποκλινικοί φορείς στελεχών της κλασικής τρομώδους νόσου καθώς και ένα πρόβατο ARR/ARR που μολύνθηκε πειραματικά με ΣΕΒ (Groschup και συν., 2007).

Το ARQ αλληλόμορφο συνήθως (σε ποσοστό 25%) συνοδεύεται από πολυμορφισμούς και σε άλλα κωδικόνια (Πίνακας 3). Η συσχέτιση των πολυμορφισμών αυτών με την κλασική τρομώδη νόσο άρχισε να μελετάται πρόσφατα. Από τα πρώτα αποτελέσματα διαφαίνεται ότι, εκτός από το ARR και το AHQ (σε ορισμένες φυλές προβάτων), υπάρχουν και άλλα αλληλόμορφα που μπορεί να προσδίδουν ανθεκτικότητα στο νόσημα. Συγκεκριμένα, στην επιζωοτία της τρομώδους νόσου στην Ισλανδία, φορείς του αλληλομόρφου AC<sub>151</sub>RQ δε συγκαταλέγονταν μεταξύ των προσβεβλημένων ζώων (Thorgeirsdottir και συν., 1999). Επίσης, μετά από πειραματική μόλυνση προβάτων με στελέχη ΣΕΒ και κλασικής τρομώδους νόσου, μεταξύ των επιζώντων συγκαταλέγονταν οι φορείς των αλληλομόρφων AT<sub>137</sub>RQ, AK<sub>142</sub>RQ και ARQK<sub>176</sub> (Zhang και συν., 2004).



**Πίνακας 4.** Κατάταξη των προβάτων σε 5 κατηγορίες (R1-R5), ανθεκτικότητας ή ευαισθησίας στην κλασική τρομώδη νόσο, ανάλογα με το γενότυπο στο γονίδιο *PRNP*.

Γενότυπος	Ομάδα ευαισθησίας / ανθεκτικότητας
ARR /ARR	R1 (υψηλή ανθεκτικότητα)
ARR/AHQ	R2 (ανθεκτικότητα)
ARR/ARQ	R2 (ανθεκτικότητα)
ARR/ARH	R2 (ανθεκτικότητα)
AHQ/AHQ	R3 (χαμηλή ευαισθησία)
ARQ/AHQ	R3 (χαμηλή ευαισθησία)
AHQ/ARH	R3 (χαμηλή ευαισθησία)
ARH/ARH	R3 (χαμηλή ευαισθησία)
ARQ/ARH	R3 (χαμηλή ευαισθησία)
ARQ/ARQ	R3 (χαμηλή ευαισθησία)
VRQ /ARR	R4 (ευαισθησία)
VRQ/AHQ	R5 (υψηλή ευαισθησία)
VRQ/ARQ	R5 (υψηλή ευαισθησία)
VRQ/ARH	R5 (υψηλή ευαισθησία)
VRQ/VRQ	R5 (υψηλή ευαισθησία)

Νεότερες μελέτες δείχνουν ότι ενδεχομένως και άλλοι γονιδιακοί τόποι, εκτός από το γονίδιο *PRNP*, διαδραματίζουν κάποιο ρόλο στη γενετική του νοσήματος (Goldmann και συν., 2008). Είναι ωστόσο δύσκολο, προς το παρόν, να εντοπιστούν αυτά τα γονίδια. Η χρήση νέων τεχνολογιών και η συσχέτιση των δεδομένων πολλών μελετών ίσως αποκαλύψουν ποιοι είναι οι εν λόγω γονιδιακοί τόποι.

Η γενετική βάση της άτυπης μορφής της τρομώδους νόσου διαφέρει από εκείνη της κλασικής μορφής. Τα περισσότερα περιστατικά άτυπης μορφής έχουν βρεθεί σε πρόβατα που ανήκουν στις ομάδες κινδύνου 1-3 του Πίνακα 4, σε ζώα δηλαδή που εμφανίζουν πλήρη ή σχετική ανθεκτικότητα στην κλασική μορφή του νοσήματος. Μελέτες σε Νορβηγία, Γαλλία, Γερμανία και Μεγάλη Βρετανία συμπέραναν ότι η ευαισθησία στην άτυπη μορφή σχετίζεται κυρίως με πολυμορφισμούς στα κωδικόνια 141 και 154 (Lühken και συν., 2004, Moum και συν., 2005, Saunders και συν., 2006, Arzac και συν., 2007). Τα πρόβατα με γενότυπο AHQ/AHQ και AHQ/ARQ είναι ευαίσθητα στα στελέχη που προκαλούν την άτυπη μορφή. Ευαίσθητα είναι επίσης τα

πρόβατα που φέρουν το αμινοξύ φαινυλαλανίνη στη θέση 141 (AF<sub>141</sub>RQ), ενώ εκείνα που φέρουν το αμινοξύ λευκίνη στη θέση αυτή, τα AL<sub>141</sub>RQ, είναι ανθεκτικά. Μάλιστα, οι φορείς του AF<sub>141</sub>RQ φαίνεται να είναι πιο ευαίσθητοι στο νόσημα από ό,τι εκείνοι του AL<sub>141</sub>HQ. Επίσης, πρόβατα με ένα ή δύο αντίγραφα του ARR, θεωρούνται ευαίσθητα στη μορφή αυτή του νοσήματος. Συνεπώς, πιθανολογείται ότι τα προγράμματα γενετικής επιλογής για την αύξηση ανθεκτικότητας στην κλασική μορφή της τρομώδους νόσου, εμπεριέχουν τον κίνδυνο αύξησης της ευπάθειας των πληθυσμών προβάτων στα στελέχη της άτυπης μορφής του νοσήματος.

### **3.5. Η κατάσταση στην Ελλάδα, η γενοτυπική εικόνα του γονιδίου *PRNP* των ελληνικών φυλών προβάτων και η ελληνική νομοθεσία για την τρομώδη νόσο.**

Το πρώτο περιστατικό τρομώδους νόσου στην Ελλάδα διαγνώστηκε το 1986 σε ποίμνιο προβάτων της κεντρικής Μακεδονίας (Αργυρούδης και συν., 1987, Leontides και συν., 2000). Έντεκα χρόνια αργότερα, το 1997, διαγνώστηκε το δεύτερο περιστατικό σε μικτό ποίμνιο προβάτων-γιδιών (Λεοντίδης και συν., 1999). Σύμφωνα με τα στοιχεία του Υπουργείου Αγροτικής Ανάπτυξης και Τροφίμων, ως το 2001, που η επιτήρηση ήταν παθητική, σε εννιά εκτροφές είχαν βρεθεί 45 πρόβατα θετικά στη τρομώδη νόσο. Από το 2002 έως και το 2008, που η επιτήρηση αυξήθηκε και από παθητική έγινε ενεργητική, βρέθηκαν 1.911 θετικά πρόβατα και 235 γίδια σε 223 εκτροφές σε ολόκληρη τη χώρα. Το ποσοστό των θετικών δειγμάτων στο σύνολο των δειγμάτων που εξετάστηκαν ήταν 1,94% για τα πρόβατα και 0,53% για τα γίδια. Το ποσοστό αυτό είναι το δεύτερο υψηλότερο στην ΕΕ μετά την Κύπρο, όπου το ποσοστό των θετικών ζώων στο σύνολο των εξεταζόμενων ανήλθε στο 16,81%. Με εξαίρεση τη Σλοβενία, όπου το ποσοστό αυτό ήταν 1,64%, τα υπόλοιπα κράτη μέλη εμφανίζουν ποσοστά μικρότερα του 0,3%. Το υψηλό ποσοστό θετικών δειγμάτων, συγκριτικά με τις υπόλοιπες χώρες, σε συνδυασμό με τη διαπίστωση ότι ο αριθμός των δειγμάτων που εξετάζονται στην Ελλάδα είναι πολύ μικρότερος από αυτόν που καθιστά το δείγμα αντιπροσωπευτικό, αποτελούν σοβαρές ενδείξεις ότι το πρόβλημα της τρομώδους νόσου στη χώρα μας είναι εξαπλωμένο. Σύμφωνα με τις εκτιμήσεις του Υπουργείου Αγροτικής Ανάπτυξης και Τροφίμων το 1-1,5% των εκτροφών προβάτων στην Ελλάδα έχουν προσβληθεί από τη νόσο (Αικατερινιάδου και συν., 2006).

Στην εξάπλωση του νοσήματος φαίνεται να συντελούν σημαντικά οι διαχειριστικές τεχνικές που εφαρμόζουν οι έλληνες προβατοτρόφοι στα ποίμνια τους. Συγκεκριμένα, το νόσημα εισάγεται σε μία εκτροφή μαζί με ζώα φορείς που μεταφέρονται από ξένες εκτροφές, χωρίς προηγουμένως να έχει προσδιοριστεί ο γενότυπος τους ως προς την ανθεκτικότητα στο νόσημα. Στη συνέχεια, επειδή δεν διαμορφώνουν ξεχωριστά κελιά τοκετού, τα νεογέννητα αλλά και τα υπόλοιπα ζώα του ποιμνίου έρχονται σε επαφή με τους πλακούντες και τα εμβρυικά υγρά των ζώων φορέων, οπότε ο παθογόνος παράγοντας διασπείρεται εντός του ποιμνίου. Επίσης, στην εξάπλωση του νοσήματος συντελεί η μη εφαρμογή της τεχνητής γαλουχίας στα νεογέννητα καθώς και η χρήση κοινών με άλλα ποίμνια βοσκοτόπων.

Σχετικά με την άτυπη μορφή της νόσου, μόλις 26 πρόβατα έχουν ταυτοποιηθεί στη χώρα μας από τα επίσημα εθνικά εργαστήρια (Υπουργείο Αγροτικής Ανάπτυξης και Τροφίμων, 2009) καθώς και από το εργαστήριο Παθολογικής Ανατομικής της Κτηνιατρικής Σχολής του ΑΠΘ (Σοφιανίδης, 2006). Ο αριθμός ταυτοποιημένων κρουσμάτων άτυπης τρομώδους νόσου στη χώρα μας είναι πολύ χαμηλότερος συγκριτικά με τον αντίστοιχο στη Γαλλία (287), Ισπανία (258), Μεγάλη Βρετανία (155), Πορτογαλία (133) και Νορβηγία (53) (Υπουργείου Αγροτικής Ανάπτυξης και Τροφίμων, 2009). Από τα παραπάνω διαφαίνεται ότι στα ελληνικά ποίμνια δεν κυκλοφορούν, σε μεγάλη κλίμακα, άτυπα στελέχη της παθολογικής πρωτεΐνης-prion.

Αναφορικά με τη γενοτυπική εικόνα του ελληνικού πληθυσμού προβάτων και τη συσχέτισή της με το βαθμό ευαισθησίας ή ανθεκτικότητας στην τρομώδη νόσο, λίγα στοιχεία είναι γνωστά. Από μία μελέτη που αφορούσε 110 πρόβατα φυλής Χίου, που εκτρέφονταν σε 5 ποίμνια, και 100 πρόβατα φυλής Καραγκούνικο, που εκτρέφονταν επίσης σε 5 ποίμνια, προέκυψε ότι η συχνότητα εμφάνισης της βαλίνης στη θέση 136 είναι μηδενική, όπως χαμηλή είναι και η συχνότητα εμφάνισης της αργινίνης στη θέση 171 σε ομοζύγωτη μορφή (Bilinis και συν., 2004). Στα πρόβατα φυλής Καραγκούνικο σημαντικά υψηλότερη ήταν η συχνότητα εμφάνισης της αργινίνης στη θέση 171 σε ετεροζύγωτη μορφή σε σχέση με τα πρόβατα φυλής Χίου (57% έναντι 14,5%). Αξιοσημείωτο είναι πως στα Καραγκούνικα πρόβατα στο 12% των ετεροζύγων φορέων ARR ανιχνεύτηκε και ο ανεπιθύμητος για τις άτυπες μορφές της τρομώδους νόσου πολυμορφισμός φαινυλαλανίνη στη θέση 141 (Bilinis και συν., 2004). Την υψηλότερη συχνότητα εμφάνισης στις δύο παραπάνω φυλές παρουσίασε το αλληλόμορφο ARQ. Στα πρόβατα της φυλής Χίου ανευρέθηκε για πρώτη φορά ο γενότυπος ARQ/TRQ. Σύμφωνα με τις πρώτες μελέτες σε ζώα

προσβεβλημένα από τη νόσο, ο γενότυπος αυτός θεωρείται ουδέτερος σε ό,τι αφορά στην ευαισθησία των προβάτων (Bilinis και συν., 2004, Σοφιανίδης, 2006). Αντίστοιχα ήταν και τα αποτελέσματα έρευνας σε πρόβατα φυλής Χίου που εκτρέφονταν στην Κύπρο (Παπασάβα-Στυλιανού, 2003). Διαφορετικά ήταν ωστόσο τα αποτελέσματα των προσδιορισμών που πραγματοποιήθηκαν σε 65 πρόβατα φυλής Χίου που εκτρέφονταν στην ηπειρωτική Ελλάδα και σε 39 πρόβατα της ίδιας φυλής που εκτρέφονταν στη νησιωτική Ελλάδα, σε συνολικά δεκαπέντε ποίμνια, στα πλαίσια των γενοτυπικών αναλύσεων δεκατεσσάρων σπάνιων ελληνικών φυλών προβάτων (Ekateriniadou και συν., 2007α). Σύμφωνα με τη μελέτη αυτή, τα ποσοστά του ανθεκτικού ARR γενότυπου είναι αρκετά υψηλότερα, ιδίως στα πρόβατα που εκτρέφονται στη νησιωτική Ελλάδα. Οι αναλύσεις 294 δειγμάτων που προέρχονταν από τις υπόλοιπες 12 φυλές έδειξαν ότι και σε αυτές η συχνότητα εμφάνισης βαλίνης στη θέση 136 είναι πολύ μικρή, ενώ το ARQ αλληλόμορφο έχει την υψηλότερη συχνότητα εμφάνισης. Στις φυλές αυτές, ο γενότυπος ARQ/ARQ θεωρήθηκε ότι προσδίδει ευαισθησία στα πρόβατα. Ωστόσο, ο αριθμός των ζώων που γενοτυπήθηκαν ήταν περιορισμένος, χωρίς να γίνει σύγκριση αυτών με πρόβατα των αντίστοιχων φυλών που προσβλήθηκαν από τρομώδη νόσο, ώστε τα αποτελέσματα να θεωρούνται ασφαλή. Εξάλλου, ο γενότυπος ARQ/ARQ εμφανίζεται σε τόσο μεγάλη συχνότητα στον ελληνικό πληθυσμό προβάτων που είναι αναμενόμενο να νοσούν, κυρίως, πρόβατα με το γενότυπο αυτό. Σύμφωνα με την ίδια μελέτη η παρουσία του ανθεκτικού ARR αλληλομόρφου σε σχετικά υψηλά ποσοστά στις 14 φυλές προβάτων που εξετάστηκαν λειτουργεί αντισταθμιστικά ως προς τη γενετική ευαισθησία του πληθυσμού για την εμφάνιση τρομώδους νόσου (Ekateriniadou και συν., 2007α). Στη μελέτη των Bilinis και συν. (2004), εξετάστηκαν, επιπλέον, 216 πρόβατα, 121 με τρομώδη νόσο και 95 υγιείς μάρτυρες, που προέρχονταν από 16 ποίμνια στα οποία είχε εμφανιστεί τρομώδης νόσος. Ακολούθησε στατιστική επεξεργασία των γενοτυπικών αποτελεσμάτων και συσχέτισή τους με το νόσημα. Σύμφωνα λοιπόν, με τα συμπεράσματα της εργασίας αυτής, που δεν αφορά κάποια συγκεκριμένη ελληνική φυλή προβάτων, τα ζώα με γενότυπο ARQ/ARQ, ARQ/TRQ και VRQ/VRQ εμφανίζουν τις ίδιες πιθανότητες να μολυνθούν όταν έρθουν σε επαφή με τον παθογόνο παράγοντα της τρομώδους νόσου. Επιπλέον, διαπιστώθηκε ό,τι τα ζώα με γενότυπο VRQ/VRQ εμφανίζουν τη μεγαλύτερη πιθανότητα να εκδηλώσουν κλινικά το νόσημα. Τα πρόβατα με γενότυπο ARQ/AHQ σύμφωνα με τα αποτελέσματα της ίδιας εργασίας εμφανίζουν σαφώς μικρότερες πιθανότητες να

νοσήσουν. Αντίθετα, σε μία άλλη μελέτη που αφορούσε τα πρόβατα φυλής Χίου καθώς και μιγάδες-απογόνους προβάτων φυλής Χίου, προσβεβλημένους από τρομώδη νόσο, διαπιστώθηκε ότι το αλληλόμορφο AHQ προσδίδει ευπάθεια στην κλασική μορφή της τρομώδους νόσου στους φορείς του (Ekateriniadou και συν., 2007β).

Βάση των παραπάνω, θα μπορούσε να λεχθεί ότι ο ελληνικός πληθυσμός προβάτων, είναι αβελτίωτος ως προς το γονίδιο *PRNP*. Σε αυτόν κυριαρχεί ο «αρχέγονος τύπος» (ARQ), που δεν προσδίδει επαρκεί ανθεκτικότητα στο νόσημα. Ωστόσο, τα αποτελέσματα των παραπάνω μελετών είναι απλώς ενδεικτικά της γενοτυπικής εικόνας των ελληνικών προβάτων καθώς και της συσχέτισης των γενοτύπων με την ευπάθεια στο νόσημα επειδή στηρίχθηκαν σε περιορισμένους αριθμούς ζώων και δειγμάτων. Για καμία φυλή προβάτων δεν έχει διεξαχθεί μέχρι σήμερα μία πληθυσμιακή μελέτη που να θεωρείται αντιπροσωπευτική του πληθυσμού που εκτρέφεται στην Ελλάδα.

Η Ελλάδα, ως χώρα μέλος της ΕΕ, έχει εναρμονίσει τη νομοθεσία της με τον κανονισμό της ΕΕ αρ. 999/2001 για τη «θέσπιση κανόνων πρόληψης, καταπολέμησης και εξάλειψης ορισμένων Μεταδοτικών Σπογγωδών Εγκεφαλοπαθειών, συμπεριλαμβανομένης και της τρομώδους νόσου» και με τις τροποποιήσεις αυτού από τους τελευταίους κανονισμούς αρ. 727/2007, αρ. 722/2007, αρ. 1428/2007 και αρ. 21/2008. Στόχοι του προγράμματος αυξημένης επιτήρησης είναι:

1. Η συστηματική έρευνα και η διαφορική διάγνωση, με εφαρμογή κατάλληλων εργαστηριακών τεχνικών, των ΜΣΕ στα μικρά μηρυκαστικά μέσω της ενεργητικής και της παθητικής επιτήρησης.
2. Επί θετικού αποτελέσματος, είτε η εκρίζωση της διαπιστωθείσας εστίας τρομώδους νόσου (Κλασικής ή Άτυπης) ή ΣΕΒ, είτε ο έλεγχος και η αποτροπή διασποράς του αιτιολογικού παράγοντα.
3. Ο αποκλεισμός της εισόδου του αιτιολογικού παράγοντα της ΣΕΒ στη διατροφική αλυσίδα του ανθρώπου και των ζώων.

Για την επίτευξη των παραπάνω στόχων διενεργείται επιδημιολογική έρευνα για το γενοτυπικό προσδιορισμό των προβάτων σε εκτροφές με κρούσματα τρομώδους νόσου. Μετά από την έκδοση των αποτελεσμάτων του γενοτυπικού ελέγχου εφαρμόζονται τα ακόλουθα μέτρα:

1. Θανατώνονται και καταστρέφονται με αποτέφρωση όλα τα πρόβατα με γενοτύπους που έχουν συσχετιστεί με υψηλή ευαισθησία στο νόσημα.

2. Διατηρούνται τα πρόβατα με πολύ ανθεκτικό γενότυπο.
3. Τα υπόλοιπα πρόβατα, που ανήκουν σε ενδιάμεσες κατηγορίες ευαισθησίας, μπορούν να διατηρηθούν για αναπαραγωγή στην εκτροφή το μέγιστο για πέντε χρόνια ή σε περίπτωση που δίνεται γάλα για ανθρώπινη κατανάλωση το μέγιστο για δεκαοχτώ μήνες και μετά θανατώνονται και καταστρέφονται με αποτέφρωση.

#### **4. ΜΕΘΟΔΟΙ ΓΕΝΟΤΥΠΙΚΟΥ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΩΣ ΠΡΟΣ ΤΟ ΓΟΝΙΔΙΟ *PRNP***

##### **4.1. Γενοτυπικός προσδιορισμός από αίμα ή εγκεφαλικό ιστό**

Η απομόνωση DNA για τον προσδιορισμό του γενοτύπου του γονιδίου *PRNP* σε νεκρά πρόβατα γίνεται συνήθως από τεμάχια εγκεφαλικού ιστού κατεψυγμένου ή μονιμοποιημένου σε διάλυμα φορμαλδεΰδης 10% και εγκλεισμένου σε κύβους παραφίνης. Στα ζωντανά πρόβατα το δειγματοληπτικό υλικό είναι, συνήθως, το αίμα. Σπανιότερα χρησιμοποιείται για το σκοπό αυτό σπέρμα ή τεμάχιο ιστού μυός ή ωτός (Hunter και συν., 1997, Zhang και συν., 2004). Τελευταία, σε μία προσπάθεια απλούστευσης της δειγματοληπτικής διαδικασίας, απομονώθηκε DNA από έριο προβάτων (Fediaevsky και συν., 2009). Η ποσότητα, ωστόσο, του DNA που απομονώθηκε από το έριο ήταν μικρή. Η απομόνωση του DNA πραγματοποιείται, συνήθως, χρησιμοποιώντας κάποιο ειδικό για το σκοπό αυτό εμπορικό σκεύασμα.

Ακολουθεί πολλαπλασιασμός τμήματος ή ολόκληρου του ανοιχτού πλαισίου ανάγνωσης του γονιδίου *PRNP* με αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction - PCR). Η ανάλυση της δομής και της λειτουργίας ενός επιλεγμένου τμήματος του DNA απαιτεί μεγάλο αριθμό αντιγράφων του τμήματος αυτού. Η PCR επιτρέπει την παραγωγή τμήματος της αλληλουχίας του DNA σε πολλαπλά αντίγραφα. Το DNA που περιέχει την περιοχή-στόχο αποτελεί το εκμαγείο για την έναρξη της διαδικασίας. Η PCR είναι μία εργαστηριακά ελεγχόμενη, *in vitro* αντίδραση πολλαπλασιασμού του DNA, η οποία μιμείται, ως ένα βαθμό, τη φυσική διαδικασία του αναδιπλασιασμού του DNA. Για την αντίδραση είναι απαραίτητη η παρουσία του ενζύμου DNA πολυμεράση, ιόντων μαγνησίου ( $Mg^{+2}$ ), τριφωσφορικών δεοξυριβονουκλεοτιδίων (dNTPs) και δύο συνθετικών ολιγονουκλεοτιδίων, μεγέθους 15-30 βάσεων, που ονομάζονται εκκινητές. Οι εκκινητές, που έχουν δομή συμπληρωματική προς τις δύο αλυσίδες του DNA-στόχου εκατέρωθεν της περιοχής

που πρόκειται να πολλαπλασιαστεί, χρησιμεύουν ως αφετηρίες για την DNA πολυμεράση, η οποία προσθέτει νουκλεοτίδια στο 3'- άκρο του κάθε εκκινητή χρησιμοποιώντας ως πρότυπο την άλλη αλυσίδα. Η PCR περιλαμβάνει μία ακολουθία ταυτόσημων κύκλων (συνήθως 30-40) καθένας από τους οποίους αποτελείται από τρία στάδια: (i) το στάδιο της αποδιάταξης του εκμαγείου-DNA, (ii) το στάδιο της σύνδεσης του εκμαγείου με τους εκκινητές και (iii) το στάδιο της σύνθεσης του DNA. Η επανάληψη των παραπάνω τριών σταδίων έχει ως αποτέλεσμα την εκθετική αύξηση των αντιγράφων της επιθυμητής περιοχής του DNA.

Τα προϊόντα της PCR μπορούν στη συνέχεια να υποστούν επεξεργασία με διάφορες τεχνικές ανάλυσης του DNA. Οι τεχνικές που χρησιμοποιούνται, συνήθως, είναι η ανάλυση πολυμορφισμού του μήκους περιοριστικών θραυσμάτων (Restriction Fragment Length Polymorphisms - RFLP), η ηλεκτροφόρηση σε πηκτή με διαβαθμισμένη σύσταση αποδιατακτικού παράγοντα (Denaturation Gradient Gel Electrophoresis-DGGE), ο προσδιορισμός της αλληλουχίας του DNA (Sequencing) και η αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο (real-time PCR). Στη μέθοδο RFLP, που χρησιμοποιήθηκε στα πλαίσια της παρούσας διατριβής για το γενοτυπικό προσδιορισμό των προβάτων, λαμβάνει χώρα πέψη του DNA με ενδονουκλεάσες περιορισμού. Τα ένζυμα αυτά αναγνωρίζουν συγκεκριμένη αλληλουχία του DNA και κόβουν τη δίκλωνη αλυσίδα του DNA μέσα ή κοντά στη συγκεκριμένη αλληλουχία. Η ειδική αλληλουχία που αναγνωρίζει η κάθε ενδονουκλεάση περιορισμού αποτελείται από 4 –8 νουκλεοτίδια. Το αποτέλεσμα της πέψης είναι η λήψη 2 ή περισσότερων τμημάτων (αναλόγως με τον αριθμό των επαναλήψεων της αλληλουχίας που αναγνωρίζεται στο υπό εξέταση τμήμα του DNA), των οποίων το μήκος (αριθμός βάσεων) αθροιζόμενο είναι ίσο με εκείνο του αρχικού προϊόντος της PCR. Η ανάλυση RFLP χρησιμοποιείται για την ανίχνευση μονο-νουκλεοτιδικών πολυμορφισμών (SNP), όπου λαμβάνει χώρα αντικατάσταση μίας συγκεκριμένης βάσης από άλλη. Η παρουσία του πολυμορφισμού έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία ή την κατάργηση της θέσης αναγνώρισης του ενζύμου και, συνεπώς, την παραγωγή διαφορετικών προϊόντων πέψης συγκριτικά με εκείνα όταν ο πολυμορφισμός απουσιάζει. Με εξαίρεση τη real-time PCR, τα αποτελέσματα του γενοτυπικού προσδιορισμού με τις άλλες μεθόδους γίνονται ορατά μετά από ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης ή πολυακρυλαμιδίου. Όσον αφορά στη real-time PCR, η παρακολούθηση του πολλαπλασιασμού του DNA κατά τη διάρκεια της αντίδρασης γίνεται εφικτή με τη βοήθεια μίας φθορίζουσας χρωστικής, που

προσκολλάται στο δίκλωνο DNA, οπότε δε χρειάζονται επιπλέον χειρισμοί για τον γενοτυπικό προσδιορισμό. Με τη real-time PCR και την ανάλυση RFLP ταυτοποιούνται γνωστοί πολυμορφισμοί, ενώ με τη DGGE και το Sequencing ανιχνεύονται πολυμορφισμοί σε όλο το μήκος του DNA που αναλύεται. Στις περισσότερες μελέτες, ένα ποσοστό των δειγμάτων αναλύεται με περισσότερες από μία από τις παραπάνω τεχνικές, προκειμένου να επιβεβαιωθεί η ορθότητα των αποτελεσμάτων. Επίσης, σε περιπτώσεις ετεροζύγωτων γενοτύπων, χρησιμοποιείται η τεχνική της κλωνοποίησης του DNA προκειμένου να διευκρινιστεί ο συνδυασμός των πολυμορφισμών στα αλληλόμορφα.

Τα τελευταία χρόνια αναζητούνται νέες, αξιόπιστες, πρακτικές, οικονομικές και φιλικές προς το ζώο μέθοδοι προκειμένου να διευκολυνθούν οι γενοτυπικοί προσδιορισμοί ευρείας κλίμακας στα πλαίσια των προγραμμάτων γενετικής επιλογής για την αύξηση της ανθεκτικότητας στην τρομάδη νόσο. Για το σκοπό αυτό έχουν δημοσιευτεί πολλές νέες μέθοδοι γενοτυπικού προσδιορισμού της πρωτεΐνης PrP (για παράδειγμα οι primer extension assay, denaturing HPLC, dual fluorescence multiprobe assay, temperature gradient gel electrophoresis, PCR with melting curve analysis) (Vaccari και συν., 2003, Castro και συν., 2004, Van Poucke και συν., 2005, Jasik και Reichert, 2006, Schutz και συν., 2006). Μεταξύ αυτών ενδιαφέρον παρουσιάζει μία νέα ανοσοενζυμική δοκιμή ELISA που μπορεί να προσδιορίσει γρήγορα σε δείγματα ορού αίματος αν ο πολυμορφισμός στο κωδικόνιο 171 είναι ομοζύγωτο ή ετεροζύγωτο R ή αν δεν υπάρχει καθόλου ο πολυμορφισμός αυτός (Billhuede και συν., 2007). Βεβαία, η μέθοδος δεν προσδιορίζει τους πολυμορφισμούς στις άλλες σημαντικές θέσεις και δεν προσδιορίζει το ακριβές αμινοξύ αν αυτό δεν είναι R.

Μία άλλη εναλλακτική μέθοδος που πληροί τις προϋποθέσεις για εφαρμογή σε ευρεία κλίμακα και η οποία χρησιμοποιεί ως δειγματοληπτικό υλικό το γάλα, μελετήθηκε στα πλαίσια της παρούσας διατριβής και περιγράφεται αναλυτικά στη συνέχεια.

#### **4.2. Γενοτυπικός προσδιορισμός από το γάλα**

Σε ζωντανά ζώα για την απομόνωση του DNA, όπως αναφέρθηκε παραπάνω, χρησιμοποιείται κυρίως το αίμα. Ωστόσο, στα αρμεγόμενα ζώα θα μπορούσε για το σκοπό αυτό να χρησιμοποιηθεί αντί του αίματος το γάλα. Το γεγονός αυτό παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον, αφού η δειγματοληψία γάλατος είναι πιο εύκολη



και πιο φιλική για τα ζώα από ό,τι η αιμοληψία. Επιπλέον, τα τελευταία χρόνια παρουσιάζεται αυξανόμενο ενδιαφέρον για το γάλα της δεξαμενής ψύξης του ποιμνίου, στην οποία καταλήγει το γάλα από όλα τα αρμεγόμενα ζώα. Το γάλα αυτό μπορεί να αποτελέσει μία αντιπροσωπευτική «δεξαμενή DNA» (DNA pool) των ζώων του ποιμνίου.

Αναγνωρίζοντας τα παραπάνω πλεονεκτήματα, ήδη από την προηγούμενη δεκαετία αρκετοί ερευνητές προσπάθησαν να αναπτύξουν πρωτόκολλα απομόνωσης DNA από τα σωματικά κύτταρα του γάλατος (Lipkin και συν., 1993, Lindquist και συν., 1994). Από την ανασκόπηση της διεθνούς βιβλιογραφίας δεν προέκυψαν δημοσιευμένες σχετικές μελέτες για το πρόβειο γάλα, υπήρχαν ωστόσο αναφορές για απομόνωση DNA από αγελαδινό (Lipkin και συν., 1993) και γίδινο γάλα (D'Angelo και συν., 2007). Οι πρώτοι πειραματισμοί έδειξαν ότι είναι δυσκολότερο να εξαχθεί από το γάλα, σε σχέση με το αίμα, καλής ποιότητας DNA κατάλληλο για μοριακές δοκιμές (Amills και συν., 1997, Murphy και συν., 2002). Αυτό οφείλεται στους περισσότερους αναστολείς της PCR που περιέχει το γάλα σε σχέση με το αίμα (Murphy και συν., 2002). Το λίπος, οι πρωτεΐνες και η υψηλή συγκέντρωση ιόντων ασβεστίου θεωρούνται εν δυνάμει αναστολείς της PCR (Wilson, 1997). Το πρόβειο γάλα, περιέχει ακόμη υψηλότερες συγκεντρώσεις λίπους και άλλων στερεών, σε σύγκριση με το γάλα των άλλων ειδών (Ensminger, 1993, Μάντης, 2000). Το γεγονός αυτό, καθιστά το πρόβειο γάλα δύσκολο υλικό για την απομόνωση καλής ποιότητας DNA, κατάλληλου για μοριακές αναλύσεις.

Σύμφωνα με τη διεθνή βιβλιογραφία, στις αρχές της δεκαετίας του 1990, με τη χρήση κλασικών πρωτοκόλλων φαινόλης-χλωροφορμίου και μίας ρητίνης με το εμπορικό όνομα Chelex 100 (Biorad) κατάφεραν να εκχυλίσουν DNA από τα σωματικά κύτταρα του αγελαδινού και του γιδίνου γάλατος (ξενικών φυλών), αλλά η ποσότητα και η ποιότητα του DNA που εκχυλιζόταν δεν ήταν ικανοποιητικές και δεν μπορούσαν να εφαρμοστούν σε μεγάλη κλίμακα (Lipkin και συν., 1993, Amills και συν., 1997). Τα τελευταία χρόνια, νέες τεχνικές απομόνωσης προτάθηκαν, χωρίς ωστόσο να είναι σε θέση να αντικαταστήσουν την απομόνωση DNA από το αίμα. Αναλυτικότερα, έχει δημοσιευτεί μία γρήγορη και απλή μέθοδος απομόνωσης DNA από το γίδινο γάλα, που βασίζεται στην κατακρήμνιση πρωτεϊνών με υψηλής αλατότητας διαλύματα για τον καθαρισμό του DNA (D'Angelo και συν., 2007). Με τη μέθοδο αυτή, μόλις το 75% του DNA που απομονώθηκε ήταν κατάλληλο για γενοτυπικό προσδιορισμό με ανάλυση RFLP. Σε μία άλλη μελέτη χρησιμοποιήθηκε,

με καλύτερα αποτελέσματα, το εμπορικό σκεύασμα Wizard DNA clean up kit (Promega) (Lopez-Calleja και συν., 2004). Στην περίπτωση αυτή, ωστόσο, απαιτείται επώαση των δειγμάτων με το ένζυμο πρωτεϊνάση K για 24 ώρες. Επιπλέον, η απομόνωση αφορά μικρό όγκο γάλατος, που δεν επαρκεί για αναλύσεις σε επίπεδο συνολικού γάλατος του ποιμνίου. Συνεπώς, διαπιστώθηκε η έλλειψη ενός πρακτικού, κατάλληλου για μεγάλης κλίμακας μοριακές αναλύσεις πρωτοκόλλου απομόνωσης DNA από τα σωματικά κύτταρα του γάλατος.

Παρόλο αυτά, τα τελευταία χρόνια, έχουν χρησιμοποιηθεί δείγματα αγελαδινού γάλατος από τη δεξαμενή ψύξης ως πηγή DNA σε πειράματα ανίχνευσης γονιδιακών τόπων ποσοτικών χαρακτηριστικών (QTL), σε μελέτες για τη γενετική βελτίωση των αγελάδων και σε δοκιμές ανίχνευσης νοθειών γάλατος μικρών μηρυκαστικών με αγελαδινό γάλα (Buitkamp και Gotz, 2004, Lopez-Calleja και συν., 2004, Bagnato και συν., 2008).

Τα σωματικά κύτταρα του πρόβειου γάλατος θα μπορούσαν, επίσης, να χρησιμοποιηθούν ως υλικό απομόνωσης DNA για το γενοτυπικό προσδιορισμό του γονιδίου *PRNP*. Η χρησιμοποίηση του γάλατος θα διευκόλυνε πολύ τη συλλογή δειγμάτων, γιατί δεν απαιτεί ειδικά εκπαιδευμένο προσωπικό.

Επιπλέον, ενδιαφέρουσα είναι και η δυνατότητα ανάλυσης του γάλατος της δεξαμενής ψύξης. Η ανάλυση δειγμάτων από το συνολικό γάλα του ποιμνίου θα μπορούσε να χρησιμεύσει ως μία πρώτη δοκιμή ανίχνευσης (screening test) συγκεκριμένων πολυμορφισμών του γονιδίου *PRNP* στο ποίμνιο. Τη δυνατότητα αυτή, του γάλατος της δεξαμενής ψύξης, μελετά σε βάθος η παρούσα διατριβή.

## **5. ΣΧΕΣΗ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ *PRNP* ΜΕ ΖΩΟΤΕΧΝΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΩΝ ΠΡΟΒΑΤΩΝ**

### **5.1. Γενικά**

Η οικονομική επιβίωση και η κερδοφορία των προβατοτροφικών επιχειρήσεων βασίζεται τόσο στις υψηλές αποδόσεις, όσο και στην υγεία και στη σωστή αναπαραγωγή των ζώων. Επιπλέον, σημαντική για την κερδοφορία του κλάδου αυτού είναι η διασφάλιση της ποιότητας και της υγιεινής των παραγόμενων προϊόντων. Οι μεταδοτικές σπογγώδεις εγκεφαλοπάθειες, όπως προαναφέρθηκε, θεωρούνται απειλή για τη δημόσια υγεία, για αυτό και η αντιμετώπιση τους αποτελεί προτεραιότητα για την ΕΕ.

Με δεδομένο ότι η ΕΕ ζήτησε, με την απόφαση 100/2003, από κάθε χώρα-μέλος να εφαρμόσει ένα πρόγραμμα γενετικής επιλογής στα πρόβατα για την αύξηση της ανθεκτικότητάς τους στις ΜΣΕ (European Union, 2003), συμπεριλαμβανομένης της τρομώδους νόσου, κρίνεται αναγκαία η διερεύνηση των πιθανών επιπτώσεων της εφαρμογής τους στην υγεία και στην παραγωγικότητα των προβάτων. Στα πλαίσια των προγραμμάτων αυτών επιλέγονται ζώα με συγκεκριμένα αλληλόμορφα του γονιδίου *PRNP* (ARR), ενώ απομακρύνονται από την αναπαραγωγή οι φορείς ανεπιθύμητων, που προσδίδουν ευαισθησία στην τρομώδη νόσο, αλληλομόρφων όπως το VRQ.

Η εφαρμογή των προγραμμάτων αυτών, συνοδεύτηκε με αυξημένη ανησυχία για την πιθανή αρνητική επίδραση της επιλογής για την αύξηση του ανθεκτικού γενοτύπου του *PRNP* σε άλλα, οικονομικής σημασίας, παραγωγικά χαρακτηριστικά των προβάτων. Πιο συγκεκριμένα, θα μπορούσε να υπάρχει αρνητική συσχέτιση μεταξύ συγκεκριμένων γενοτύπων του *PRNP* και των αποδόσεων των ζώων. Επίσης, η επιλογή για την αύξηση της ανθεκτικότητας στις ΜΣΕ θα μπορούσε να ανακόψει το ρυθμό βελτίωσης των άλλων οικονομικού ενδιαφέροντος στόχων (Sweeney και Hanrahan, 2008). Επιπλέον, προβλήματα θα μπορούσαν να προκύψουν σε φυλές με χαμηλά ποσοστά ARR λόγω της αύξησης του δείκτη αιμομιξίας, καθώς και με τη γενετική παρέκκλιση (Dawson και συν., 2008).

Για τους παραπάνω λόγους, στις χώρες ιδίως που εφαρμόζονται προγράμματα επιλογής για την τρομώδη νόσο, μελετάται τα τελευταία χρόνια συστηματικά η επίδραση του γονιδίου *PRNP* στις αποδόσεις των προβάτων. Αξιοποιώντας στοιχεία συστηματικών μετρήσεων στα πλαίσια των εθνικών προγραμμάτων γενετικής βελτίωσης συγκεκριμένων φυλών προβάτων, διερευνάται η επίδραση των γενοτύπων του *PRNP* στα χαρακτηριστικά της γαλακτοπαραγωγικής (Barillet και συν., 2002, De Vries και συν., 2005, De Vries και συν., 2006, Alvarez και συν., 2006β, Salaris και συν., 2007), κρεοπαραγωγικής (Prokoroona και συν., 2002, De Vries και συν., 2004β, Isler και συν., 2006, Vitezica και συν., 2005) και εριοπαραγωγικής ικανότητας (De Vries και συν., 2004β, De Vries και συν., 2005, Vitezica και συν., 2007). Επίσης, μελετάται η επίδραση τους στην αναπαραγωγική ικανότητα (Brandsma και συν., 2004, De Vries και συν., 2004α, Vitezica και συν., 2005, Tongue και συν., 2006, Man και συν., 2006, Sawalha και συν., 2007). Τελευταία, ενδιαφέρον παρουσιάζει η διερεύνηση της πιθανής επίδρασης του *PRNP* σε δείκτες υγείας των ζώων και σε ασθένειες (Sweeney και Hanrahan, 2008). Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζεται για το

γεγονός ότι υπάρχει ένας αριθμός γονιδίων που εδράζουν στο 13<sup>ο</sup> χρωμόσωμα, σε μικρή απόσταση από το γονίδιο *PRNP*, τα οποία σχετίζονται με την ανοσολογική αντίδραση, τη φαγοκυττάρωση και την κυτταρική απόπτωση. Στο 13<sup>ο</sup> χρωμόσωμα του προβάτου κοντά στο *PRNP* βρίσκεται επίσης ένας γονιδιακός τόπος (QTL) που σχετίζεται με την ανθεκτικότητα στη μόλυνση με γαστρεντερικά νηματώδη παράσιτα και ένας QTL που σχετίζεται με την ανθεκτικότητα στη μόλυνση με *Salmonella* spp. (Yen και συν., 1994, Vitezica και συν., 2007). Η διερεύνηση της σχέσης του *PRNP* με τους παραπάνω γειτονικούς γονιδιακούς τόπους, που μπορούν να επηρεάσουν σημαντικά την υγεία των προβάτων, αποτελεί ένα ακόμα σημαντικό πεδίο μελέτης των επιπτώσεων της γενετικής βελτίωσης ως προς την τρομώδη νόσο.

Οι περισσότερες μελέτες που έχουν διεξαχθεί και συνεπώς τα συμπεράσματα που έχουν δημοσιευτεί, αφορούν κυρίως φυλές κρεοπαραγωγικών προβάτων. Σύμφωνα με τις περισσότερες έρευνες, δεν υπάρχει σαφής και άμεση επίδραση του γονιδίου *PRNP* στα παραγωγικά και αναπαραγωγικά χαρακτηριστικά των προβάτων. Βεβαίως, τα αποτελέσματα αυτά δεν επαληθεύονται σε όλες τις φυλές. Διαφέρουν, λοιπόν, από φυλή σε φυλή και από χώρα σε χώρα, ενώ εξαρτώνται σημαντικά από παραμέτρους της μελέτης, όπως το μέγεθος και η αντιπροσωπευτικότητα του δείγματος του πληθυσμού που μελετήθηκε, αλλά και το πρότυπο της στατιστικής επεξεργασίας που χρησιμοποιήθηκε (Salaris και συν., 2007). Συνεπώς, κρίνεται αναγκαία κάθε φορά η διεξαγωγή αντίστοιχων μελετών, όταν πρόκειται να εφαρμοστεί πρόγραμμα γενετικής επιλογής σε διαφορετική φυλή προβάτων.

Από το 2003 άρχισαν να εφαρμόζονται τέτοιου είδους προγράμματα για την αύξηση της ανθεκτικότητας των προβάτων στην τρομώδη νόσο, σε πολλές Ευρωπαϊκές χώρες (Μεγάλη Βρετανία, Γαλλία, Ιταλία, Ισπανία, Πορτογαλία, Γερμανία, Ολλανδία). Στην Ελλάδα, δεν έχει εφαρμοστεί, ακόμα, ανάλογο πρόγραμμα. Η παρούσα διδακτορική διατριβή αποσκοπεί στην παροχή πληροφορίας αναγκαίας για την ανάπτυξη και την εφαρμογή του κατάλληλου προγράμματος βελτίωσης για την τρομώδη νόσο με τη μελέτη της επίδρασης του *PRNP* στα παραγωγικά και αναπαραγωγικά χαρακτηριστικά των προβάτων φυλής Χίου, η βελτίωση των οποίων αποτελεί στόχο της γενετικής αναβάθμισης του συγκεκριμένου πληθυσμού.

## 5.2. Επίδραση του γονιδίου *PRNP* στη γαλακτοπαραγωγική ικανότητα και στη διάπλαση του μαστού

Πληθυσμιακές μελέτες για τη διερεύνηση της επίδρασης των γενοτύπων του *PRNP* στη γαλακτοπαραγωγική ικανότητα των προβάτων έχουν γίνει στην Ιταλία για τις φυλές Κομισάνα (Comisana) (Pinelli και συν., 2006), Βάλε ντελ Μπέλις (Valle del Belice) (Van Kaam και συν., 2006) και Σαρδηνίας (Sarda) (Salaris και συν., 2006), στη Γαλλία για τις Λακών (Lacaune) και Μάνεχ (Manech blond faced) (Barillet και συν., 2002), στην Ισπανία για τη Τσούρα (Churra) (Alvarez και συν., 2006β) και στη Γερμανία για τη φυλή Φρισλανδίας (East Friesian) (De Vries και συν., 2005). Αξιοσημείωτο είναι ότι μία μελέτη έχει πραγματοποιηθεί στην Κύπρο σε πρόβατα φυλής Χίου (Ioannides και συν., 2009). Η μελέτη αυτή όμως δεν αφορούσε τον πληθυσμό των προβάτων της φυλής που εκτρέφονται στην Κύπρο, αλλά ένα πειραματικό ποίμνιο που δημιουργήθηκε για να αποτελέσει πυρήνα ανθεκτικών ζώων. Στο ποίμνιο αυτό υπήρχαν μόνο πρόβατα με γενοτύπους ARQ/ARQ, ARQ/ARR και ARR/ARR. Επομένως, η εν λόγω μελέτη δεν μπορεί να χαρακτηριστεί ως πληθυσμιακή.

Επιπλέον, έχει διερευνηθεί η επίδραση των γενοτύπων του *PRNP* στη μορφολογία του μαστού προβάτων της φυλής Σαρδηνίας, στην οποία διενεργείται πρόγραμμα γενετικής βελτίωσης για το σκοπό αυτό (Salaris και συν., 2006).

Οι μέχρι τώρα μελέτες έδειξαν πως δεν υπάρχει επίδραση των γενοτύπων του *PRNP* στην ποσότητα του παραγόμενου γάλατος, στον αριθμό των σωματικών κυττάρων, στην περιεκτικότητα του γάλατος σε λίπος και πρωτεΐνες (De Vries και συν., 2005), καθώς και στη μορφολογία του μαστού (Salaris και συν., 2006). Μοναδική εξαίρεση αποτέλεσε η μελέτη που αφορούσε τη φυλή Βάλε ντελ Μπέλις, η οποία έδειξε πώς υπάρχει σημαντική επίδραση των γενοτύπων του *PRNP* στην ποσότητα του παραγόμενου γάλατος. Ο γενότυπος AHQ/AHQ (R3- χαμηλή ευαισθησία) θεωρήθηκε πιο παραγωγικός από τους υπόλοιπους για την εν λόγω φυλή (van Kaam και συν., 2006). Επιπλέον, σε μία μεταγενέστερη μελέτη με πρόβατα φυλής Φρισλανδίας, στην οποία είχαν συμπεριληφθεί και σωματομετρήσεις, διαπιστώθηκε ότι ο γενότυπος ARR/ARR συσχετίζεται με μικρότερου μεγέθους πρόβατα (De Vries και συν., 2006). Η διαπίστωση αυτή, σε συνδυασμό με μία άλλη μελέτη που δείχνει ότι τα μικρότερου μεγέθους ζώα της φυλής αυτής παράγουν λιγότερο γάλα και δεν έχουν τόσο καλή διάπλαση μαστού (Wessels, 2003), οδήγησε έμμεσα στο συμπέρασμα ότι η επιλογή για την αύξηση της εγγενούς ανθεκτικότητας

στην τρομώδη νόσο μπορεί να επιδράσει αρνητικά στη γαλακτοπαραγωγική ικανότητα και στη μορφολογία του μαστού.

Επίσης, ο Salaris και συν. (2007), σε μία δεύτερη μελέτη με πρόβατα Σαρδηνίας, στην οποία χρησιμοποίησε περισσότερα στοιχεία και διαφορετικό πρότυπο στατιστικής επεξεργασίας από εκείνο της προηγούμενης εργασίας του (Salaris και συν., 2006), διαπίστωσε ότι η χρησιμοποίηση κριών με γενότυπο ARR/ARR είχε σαφώς αρνητική επίδραση στη γαλακτοπαραγωγή σε σχέση με τα ετεροζύγωτα ARR κριάρια ή κριάρια με ευαίσθητους, στην τρομώδη νόσο, γενοτύπους. Το γεγονός αυτό το απέδωσε όχι στην άμεση επίδραση του ARR/ARR γενοτύπου στην γαλακτοπαραγωγική ικανότητα, αλλά στην επιλογή, για τις προγραμματισμένες συζεύξεις, αποκλειστικά κριών με το γενότυπο αυτό ανεξάρτητα από την εκτιμημένη γενετική τους αξία για τη γαλακτοπαραγωγή.

Τα αποτελέσματα, λοιπόν, των παραπάνω μελετών διαφοροποιούνται ανάλογα με τη φυλή, το μέγεθος του δείγματος και το πρότυπο στατιστικής επεξεργασίας που εφαρμόζεται. Συνεπώς, στις εγχώριες φυλές προβάτων χρειάζεται να διερευνηθεί η επίδραση του γονιδίου *PRNP* στη γαλακτοπαραγωγική ικανότητα, χρησιμοποιώντας ένα αντιπροσωπευτικό δείγμα του πληθυσμού που μελετάται και αναλύοντας τα στοιχεία που συλλέγονται με το κατάλληλο στατιστικό πρότυπο. Η εν λόγω διερεύνηση αποτελεί έναν από τους στόχους της παρούσας διατριβής.

### **5.3. Επίδραση του γονιδίου *PRNP* στην αναπαραγωγική ικανότητα**

Η επίδραση των γενοτύπων του γονιδίου *PRNP* στην αναπαραγωγική ικανότητα έχει, μέχρι στιγμής, διερευνηθεί σε δύο φυλές γαλακτοπαραγωγών προβάτων: στην Ισπανία, στη φυλή Ράσα Αραγονέσα (Rasa Aragonesa) (Ponz και συν., 2006) και στη Γερμανία, στη φυλή Φρισλανδίας (East Friesian) (De Vries και συν., 2005). Επίσης, στην Κύπρο, στο πειραματικό ποίμνιο που δημιουργήθηκε για να αποτελέσει πυρήνα ανθεκτικών προβάτων φυλής Χίου, διερευνήθηκε η σχέση των γενοτύπων ARQ/ARQ, ARQ/ARR και ARR/ARR με τον αριθμό και το βάρος των αρνιών κατά τη γέννηση και τον απογαλακτισμό (Ioannides και συν., 2009). Στα Ράσα Αραγονέσα (Rasa Aragonesa) διαπιστώθηκε ότι προβατίνες με γενότυπο VRQ/VRQ είχαν χαμηλότερη εκτιμημένη γενετική αξία για την πολυδυμία σε σχέση με τους άλλους γενοτύπους. Στα πρόβατα Φρισλανδίας δεν ανιχνεύτηκε κάποια επίδραση των γενοτύπων του *PRNP* στο δείκτη πολυδυμίας, στην ηλικία κατά τον πρώτο τοκετό και στα μεσοδιαστήματα τοκετών. Στο πειραματικό ποίμνιο φυλής Χίου στην Κύπρο

διαπιστώθηκε ότι οι προβατίνες με γενότυπο ARR/ARR είχαν μεγαλύτερο δείκτη πολυδυμίας σε σχέση με προβατίνες με γενότυπο ARQ/ARQ και μεγαλύτερο αριθμό απογαλακτισμένων αρνιών σε σχέση με το γενότυπο ARQ/ARR.

Στις κρεοπαραγωγές φυλές Μπεκλέαρ (Beclare) (Sweeney και συν., 2007), Σέβιοτ (Chase –Topping και συν., 2005), Κόμπουργκ Φόξ (Coburg Fox) (Lipsky και συν., 2006), Κολούμπια (Columbia) (Alexander και συν., 2005), Κομέρσιαλ Γουέστερν Γουάιτ Φέισντ (Commercial western white faced) (Alexander και συν., 2005), Γκάρυ Χόρντ Χιθ (Gary Horned Heath) (Lipsky και συν., 2006), Γερμανικά Μαυροκέφαλα Μουτόν (German Black-Headed Mutton) (De Vries και συν., 2004β), Χαμσάιρ (Hampshir) (Alexander και συν., 2005), INRA 401 (Vitezica και συν., 2006), Ραμπουγιέτ (Ramboillet) (Alexander και συν., 2005), Ροέν (Rhoen) (Lipsky και συν., 2006), Σροπσάιρ (Shropshire) (Lipsky και συν., 2006), Σάφολκ (Suffolk) (Alexander και συν., 2005), Τέξελ (Lipsky και συν., 2006), Τέξελ-Μπουρούλα (Texel-Booroola) (Brandsma και συν., 2004) έχουν διεξαχθεί μελέτες που εστιάζουν κυρίως στη διερεύνηση της επίδρασης των γενοτύπων του *PRNP* στο δείκτη πολυδυμίας και στα χαρακτηριστικά ανάπτυξης των αρνιών (βάρους κατά τη γέννηση, βάρους κατά τον απογαλακτισμό, ημερήσιος ρυθμός αύξησης) (Sweeney και Hanrahan, 2008). Επιπλέον, έχει δημοσιευτεί μία μόνο μελέτη διερεύνησης της επίδρασης των γενοτύπων του *PRNP* στο δείκτη ωοθηλακιορηξίας των προβατινών φυλής INRA 401 και στο ρυθμό σύλληψης των προβατινών της κρεοπαραγωγικής πορτογαλικής φυλής Ριπολέσα (Ripolessa). Και οι δύο αυτές εργασίες αφορούσαν πειραματικά ποίμνια. Σύμφωνα με τις περισσότερες από τις παραπάνω μελέτες, η γενετική επιλογή για την αύξηση της ανθεκτικότητας στην τρομώδη νόσο δεν θα επηρεάσει αρνητικά την αναπαραγωγική ικανότητα (Alexander και συν., 2005, De Vries και συν., 2005, Chase-Topping και συν., 2005, Moussaoui, 2005, Lipsky και συν., 2006, Vitezica και συν., 2006, Sweeney και συν., 2007).

Ωστόσο, σε ορισμένες φυλές προβάτων, οι μελέτες έδειξαν πως υπάρχει μία μικρή επίδραση του γονιδίου *PRNP* σε κάποια αναπαραγωγικά χαρακτηριστικά. Αναλυτικότερα, στις αγγλικές φυλές προβάτων Σέβιοτ, Ντόρσετ (Dorset) και Σάφολκ διαπιστώθηκε ότι το αλληλόμορφο ARR είχε θετική επίδραση στο βάρος των αρνιών κατά τη γέννηση (βαρύτερα κατά μέσο όρο 0,3 χιλ), ενώ η παρουσία του VRQ είχε αρνητική επίδραση (μείωση του βάρους αυτών κατά 0,6 χιλ) (Tongue και συν., 2006). Επιπλέον, σε μία μελέτη εννέα φυλών προβάτων στη Γερμανία, διαπιστώθηκε ότι σε δύο από αυτές, στη Σροπσάιρ και στη Μερινόλντ (Merinolnd), οι προβατίνες

φορείς του αλληλομόρφου ARR παρουσίαζαν αυξημένο αριθμό δυστοκιών και θανάτων αρνιών κατά τον τοκετό (Lipsky και συν., 2006). Αντίθετα, σε γερμανικά κριάρια Τέξελ διαπιστώθηκε ότι οι φορείς του αλληλομόρφου ARR είχαν σημαντικά υψηλότερη εκτιμημένη γενετική αξία ως προς το δείκτη πολυδυμίας από ό,τι οι φορείς ARQ (Brandma και συν., 2004). Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι, στην ίδια μελέτη, οι φορείς του VRQ αλληλομόρφου είχαν επίσης σημαντικά υψηλότερη εκτιμημένη γενετική αξία ως προς το δείκτη πολυδυμίας και τον αριθμό αρνιών στον απογαλακτισμό, σε σύγκριση με τους φορείς ARQ. Σε άλλη μελέτη, που αφορούσε πρόβατα της φυλής Σάφολκ και τα Γερμανικά Μαυροκέφαλα Μουτόν, διαπιστώθηκε ότι οι φορείς του αλληλομόρφου ARR στα μεν πρώτα εμφάνιζαν μεγαλύτερα μεσοδιαστήματα δεύτερου και τρίτου τοκετού, στα δε δεύτερα τα ομοζύγωτα ARR πρόβατα είχαν μικρότερο μεσοδιάστημα τοκετών από τα ετεροζύγωτα ARR (De Vries και συν., 2004)

Από τα παραπάνω γίνεται σαφές ότι οι μελέτες της επίδρασης του γονιδίου *PRNP* στην αναπαραγωγική ικανότητα των προβάτων περιορίζονται κυρίως στη διερεύνηση της επίδρασής του στην πολυδυμία και στα χαρακτηριστικά ανάπτυξης των αρνιών. Τα αποτελέσματα των παραπάνω εργασιών έδειξαν ότι η επίδραση του *PRNP* στα χαρακτηριστικά αυτά της αναπαραγωγικής ικανότητας εξαρτώνται κυρίως από τη φυλή των προβάτων που μελετάται. Επιπλέον, για την εγκυρότητα των αποτελεσμάτων αυτών, σημαντικό ρόλο φαίνεται να παίζει το δείγμα του πληθυσμού που αναλύεται. Σύμφωνα με τη διεθνή βιβλιογραφία υπάρχει έλλειψη από μελέτες διερεύνησης της επίδρασης του γονιδίου *PRNP* σε άλλα αναπαραγωγικά χαρακτηριστικά των προβατινών πέρα από το δείκτη πολυδυμίας, όχι μόνο στις φυλές γαλακτοπαραγωγών προβάτων αλλά και στις κρεοπαραγωγικές φυλές. Ένας από τους στόχους της παρούσας διατριβής, ήταν να μελετηθεί η σχέση του *PRNP* τόσο με τη πολυδυμία όσο και με άλλα σημαντικά αναπαραγωγικά χαρακτηριστικά του πληθυσμού προβάτων φυλής Χίου που εκτρέφεται στην Ελλάδα.



# **ΔΕΥΤΕΡΟ ΜΕΡΟΣ**

## Η ΔΙΚΗ ΜΑΣ ΕΡΕΥΝΑ

Αρχικός στόχος της δικής μας έρευνας ήταν ο προσδιορισμός των γενοτυπικών συχνοτήτων του πληθυσμού των προβάτων φυλής Χίου τόσο ως προς την ανθεκτικότητα τους στην κλασική μορφή της τρομώδους νόσου, όσο και ως προς τις άτυπες μορφές της. Κατά δεύτερο λόγο, στόχος της παρούσας έρευνας ήταν η ανάπτυξη μίας νέας, εναλλακτικής, πρακτικής και φιλικής προς τα ζώα μεθόδου γενοτυπικού προσδιορισμού του γονιδίου *PRNP*, που θα διευκόλυνε και θα επιτάχυνε την ευρεία εφαρμογή προγραμμάτων γενετικής βελτίωσης για την ανάπτυξη, στους ελληνικούς πληθυσμούς προβάτων, ανθεκτικότητας στην τρομώδη νόσο. Τρίτος στόχος της έρευνάς μας ήταν η διερεύνηση τυχόν αλλαγών στις αποδόσεις των προβάτων φυλής Χίου, που θα μπορούσαν να αναμένονταν από την εφαρμογή προγράμματος γενετικής επιλογής ανθεκτικών, για την τρομώδη νόσο, γενοτύπων.

Για την επίτευξη των παραπάνω στόχων η παρούσα διατριβή περιλαμβάνει τέσσερα μέρη:

1. Ανάπτυξη και εφαρμογή της κατάλληλης μεθοδολογίας για τον προσδιορισμό των γενοτύπων του γονιδίου *PRNP* των προβάτων με βάση το DNA των σωματικών κυττάρων του γάλατος.
2. Ανάπτυξη και εφαρμογή μίας μεθόδου για τον ταυτόχρονο προσδιορισμό όλων των αλληλομόρφων του *PRNP* που υπάρχουν σε μία ομάδα ζώων με βάση το συνολικό γάλα.
3. Προσδιορισμός των γενοτυπικών συχνοτήτων του γονιδίου *PRNP* των προβάτων φυλής Χίου.
4. Εκτίμηση της σχέσης του γονιδίου *PRNP* με τη γαλακτοπαραγωγική και αναπαραγωγική ικανότητα των προβάτων Χίου.

## ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

### 1. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΓΕΝΟΤΥΠΩΝ ΜΕ ΒΑΣΗ ΤΟ ΓΑΛΑ ΣΕ ΑΤΟΜΙΚΟ ΕΠΙΠΕΔΟ

#### 1.1. Δειγματοληψία

##### 1.1.1. Συλλογή ατομικών δειγμάτων γάλατος

Αρχικά, από 50 προβατίνες που εκτρέφονταν σε ένα από τα ποιμνία του Αγροτικού Συνεταιρισμού Προβατοτρόφων Φυλής Χίου «Μακεδονία» που χρησιμοποιήθηκαν για την παρούσα μελέτη, λήφθηκαν πολλαπλά δείγματα γάλατος που χρησίμευσαν για τους προκαταρκτικούς πειραματισμούς. Στη συνέχεια, ατομικά δείγματα γάλατος συλλέχθηκαν από 1.013 καθαρόαιμες προβατίνες της φυλής Χίου προκειμένου να προσδιοριστεί ο γενότυπός τους ως προς το γονίδιο *PRNP*. Οι προβατίνες αυτές εκτρέφονταν στη Βόρεια Ελλάδα, σε 23 ποιμνία του Αγροτικού Συνεταιρισμού Προβατοτρόφων Φυλής Χίου «Μακεδονία». Η επιλογή των 23 ποιμνίων ήταν τυχαία, όπως επίσης τυχαία ήταν και η επιλογή των 1.013 ζώων, με μοναδική προϋπόθεση να διαθέτουν πλήρη γενεαλογικά στοιχεία και να έχουν πραγματοποιήσει τουλάχιστον έναν τοκετό. Με τον τρόπο αυτό, εξασφαλίστηκε η αντιπροσωπευτικότητα του συνολικού καθαρόαιμου πληθυσμού στο εν λόγω δείγμα.

Η συλλογή των δειγμάτων γινόταν στο αρμεκτήριο, πριν από το πρωινό άρμεγμα και ενώ οι προβατίνες ήταν ακινητοποιημένες στις θέσεις παγίδευσης. Σε δύο από τα 23 ποιμνία που δε διέθεταν αρμεκτικό συγκρότημα η συλλογή δειγμάτων γινόταν στο χώρο του αρμέγματος. Αρχικά, όλος ο μαστός της κάθε προβατίνας καθαριζόταν εξωτερικά με διάλυμα χλωρεξιδίνης 0,5%. Στη συνέχεια, φορώντας πλαστικά γάντια μίας χρήσης, και αφού απορρίπτονταν οι πρώτες ακτίνες του γάλατος, συλλέγονταν από κάθε προβατίνα 50 ml γάλατος σε πλαστικούς κωνικούς περιέκτες (Falkon, Greiner). Τα δείγματα μεταφέρονταν αμέσως με συνθήκες ψύξης (φορητό ψυγείο) στο εργαστήριο Μικροβιολογίας και Λοιμωδών Νοσημάτων της Κτηνιατρικής Σχολής του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης (ΑΠΘ) και αποθηκεύονταν στους 4°C (Εικόνα 2), ώστε να αποφευχθεί η λύση των σωματικών κυττάρων του γάλατος. Στην περίπτωση αυτή δε θα λειτουργούσε η διαδικασία

συμπύκνωσης των σωματικών κυττάρων με φυγοκέντρωση, οπότε δε θα μπορούσε να προχωρήσει περαιτέρω η διαδικασία απομόνωσης του DNA. Τα δείγματα παρέμεναν στους 4°C το μέγιστο μία εβδομάδα. Στη διάρκεια της εβδομάδας απομονωνόταν το DNA, διαφορετικά παρατηρείτο μία σταδιακή υποβάθμιση της ποιότητάς του. Επιπλέον, η τοποθέτηση των δειγμάτων γάλατος στην κατάψυξη, έστω και για λίγες ημέρες, είχε ως αποτέλεσμα τη ρήξη της κυτταρικής μεμβράνης των σωματικών κυττάρων και συνεπώς τη λύση τους. Στην περίπτωση αυτή, δεν μπορούσε να προχωρήσει περαιτέρω η διαδικασία απομόνωσης του DNA.



**Εικόνα 2.** Μεταφορά των δειγμάτων γάλατος στο εργαστήριο με συνθήκες ψύξης.

### **1.1.2. Επεξεργασία δειγμάτων γάλατος**

Η επεξεργασία των δειγμάτων γάλατος άρχιζε με φυγοκέντρηση, σε ψυχόμενη φυγόκεντρο (Eppendorf centrifuge 5810R), σε 1.500 g για 10 λεπτά. Μετά από τη φυγοκέντρηση σχηματίζονταν 3 στιβάδες. Η πρώτη ήταν στερεή και αντιστοιχούσε στη στιβάδα λίπους του γάλατος. Το λίπος απομακρυνόταν με πλαστική σπάτουλα μίας χρήσης. Η δεύτερη ήταν υδατική και απομακρυνόταν με απόρριψη του υγρού. Η τρίτη αντιστοιχούσε στο ίζημα που σχημάτιζαν τα σωματικά κύτταρα του γάλατος.

Στην περίπτωση που δεν ήταν εφικτή η απομόνωση DNA εντός μίας εβδομάδας, εφαρμοζόταν συλλογή των σωματικών κυττάρων του γάλατος μετά τη φυγοκέντρηση (ίζημά) και στη συνέχεια κατάψυξη των κυττάρων αυτών στους -20°C ή στους -70°C. Η δυνατότητα αποθήκευσης των σωματικών κυττάρων στην κατάψυξη καθιστούσε ακόμα πιο πρακτικό το γενοτυπικό προσδιορισμό από το γάλα.

### **1.1.3. Συλλογή δειγμάτων αίματος**

Από 20 προβατίνες που εκτρέφονταν σε ένα ποίμνιο συλλέχθηκαν, παράλληλα με τα ατομικά δείγματα γάλατος, και δείγματα αίματος (4 ml). Οι αιμοληψίες έγιναν στο αρμεκτήριο σε φιαλίδια κενού (Vacutainer™, BD Vacutainer Systems, UK) που περιείχαν αντιπηκτικές ουσίες [Ca EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid)]. Τα δείγματα αίματος μεταφέρθηκαν με συνθήκες ψύξης (φορητό ψυγείο) στο εργαστήριο Μικροβιολογίας και Λοιμωδών Νοσημάτων της Κτηνιατρικής Σχολής του ΑΠΘ και αποθηκεύτηκαν στους -20°C.

## **1.2. Μέθοδοι απομόνωσης DNA**

### **1.2.1. Απομόνωση DNA από τα σωματικά κύτταρα του γάλατος**

Για την απομόνωση του DNA από τα σωματικά κύτταρα του γάλατος χρησιμοποιήθηκαν 2 μέθοδοι που περιγράφονται στη συνέχεια.

#### **1.2.1.1. Εμπορικό σκεύασμα Nucleospin Blood® (Macherey- Nagel)**

Για την απομόνωση του DNA από τα σωματικά κύτταρα του γάλατος, αρχικά στα δείγματα από τις 50 προβατίνες, χρησιμοποιήθηκε το εμπορικό σκεύασμα Nucleospin Blood® (Macherey Nagel, Duren, Γερμανία), που χρησιμοποιείται για την απομόνωση DNA από τα λευκοκύτταρα του αίματος. Για το σκοπό αυτό τα σωματικά

κύτταρα, που ήταν αποθηκευμένα με τη μορφή ιζήματος, επαναδιαλύονταν σε 200 µl διαλύματος PBS (pH=7,4, 137 mM NaCl, 2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O, 2,7 mM KCl) και ακολουθούσε η απομόνωση του DNA σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

### 1.2.1.2. Τροποποιημένο Nucleospin Blood

Όπως προαναφέρθηκε, το Nucleospin Blood<sup>®</sup> είναι ένα εμπορικό σκεύασμα κατάλληλο για την απομόνωση DNA από τα λευκοκύτταρα του αίματος. Ειδικό εμπορικό σκεύασμα για την απομόνωση DNA από τα σωματικά κύτταρα του γάλατος δεν υπάρχει. Το γάλα περιέχει ουσίες που είναι αναστολείς της PCR και οι οποίες δεν υπάρχουν στο αίμα (καζεΐνες, κ.α.) και για να προσαρμοστεί το Nucleospin Blood<sup>®</sup> στις ειδικές συνθήκες του γάλατος έγιναν οι παρακάτω τροποποιήσεις.

- Βήμα 1: το ίζημα των σωματικών κυττάρων αρχικά υφίστατο επεξεργασία με 200 µl TE [1 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl (pH=7,6)] και 300 µl 0,5 M EDTA (pH=8) προκειμένου να διαλυθούν οι καζεΐνες που περιέχονταν στο γάλα. Οι καζεΐνες είναι ένα ανεπιθύμητο υλικό για την απομόνωση DNA, διότι παρεμβαίνουν στη δράση της πρωτεΐνάσης K, με αποτέλεσμα να μην είναι ικανοποιητική η πέψη των πρωτεϊνών και των ενζύμων που είναι υπεύθυνα για την αποικοδόμηση του DNA (νουκλεάσες) (Murphy και συν., 2002). Οι καζεΐνες περιέχουν ασβέστιο, το οποίο δεσμευόταν από το EDTA. Με αυτό τον τρόπο, το ασβέστιο απομακρυνόταν από τις καζεΐνες, οι οποίες διαλύονταν. Για να διευκολυνθεί η διάλυση των καζεϊνών, οι πλαστικοί περιέκτες των 50 ml, που περιείχαν τα σωματικά κύτταρα και το διάλυμα TE-EDTA τοποθετούνταν σε αναδευτήρα (shaking incubator LabTech, Daihan Labtech Co. Ltd) σε 180-200 rpm για 45 λεπτά.
- Βήμα 2: το περιεχόμενο των πλαστικών περιεκτών των 50 ml μεταφερόταν σε πλαστικά σωληνάρια όγκου 2 ml (reaction tubes, Greiner Bio-One GmbH, Germany) και ακολουθούσε φυγοκέντρηση σε 3.000 g για 10 λεπτά σε ψυχόμενη φυγόκεντρο (Eppendorf centrifuge 5415R).
- Βήμα 3: το υπερκείμενο υγρό απομακρυνόταν και τα σωματικά κύτταρα επαναδιαλύονταν σε 200 µl PBS. Στη συνέχεια, προσθέτονταν 25 µl (0,5 mg) πρωτεϊνοκινάσης K και 200 µl διαλύματος λύσης των σωματικών κυττάρων (B3) που περιέχονταν στο εμπορικό σκεύασμα. Ακολουθούσε

ανακίνηση του μίγματος σε αναδευτήρα (MSI-Minishaker, IKA<sup>®</sup>, Germany) και επώαση για 15 λεπτά σε υδατόλουτρο στους 70°C.

- Βήμα 4: προσθέτονταν στο παραπάνω μίγμα 700 μl χλωροφορμίου, για την απομάκρυνση των λιπιδίων, και το μίγμα ανακινούνταν έντονα σε αναδευτήρα (MSI-Minishaker, IKA<sup>®</sup>, Germany) για 5 λεπτά. Ακολουθούσε φυγοκέντρηση σε 14.000 g για 10 λεπτά και η υδατική φάση που προέκυπτε μεταφερόταν σε ένα άλλο σωληνάριο των 2 ml που περιείχε 210 μl αιθανόλης. Το μίγμα που προέκυπτε μεταφερόταν σε στήλη που είχε την ιδιότητα να δεσμεύει DNA, η οποία υποβαλλόταν σε φυγοκέντρηση σε 11.000 g για 1 λεπτό. Κατά τη διάρκεια αυτής της φυγοκέντρησης το DNA δεσμευόταν στη στήλη που περιείχε μεμβράνη οξειδίου του πυριτίου (silica).
- Βήμα 5: η στήλη υποβαλλόταν σε διαδοχικές πλύσεις με 2 ρυθμιστικά διαλύματα (BW και B5) που περιέχονταν στο εμπορικό σκεύασμα. Αρχικά, στη στήλη προσθέτονταν 500 μl διαλύματος BW, που περιείχε γουανιδίνη, και ακολουθούσε φυγοκέντρηση σε 11.000 g για 1 λεπτό. Το στάδιο αυτό επαναλαμβανόταν για μία ακόμα φορά. Στη συνέχεια, στη στήλη προσθέτονταν 400 μl διαλύματος B5, που περιείχε αιθανόλη, και ακολουθούσε φυγοκέντρηση στις ίδιες όπως προηγουμένως συνθήκες. Η τελευταία έκπλυση του DNA με το διάλυμα B5 επαναλαμβανόταν για άλλη μία φορά. Σκοπός των διαδοχικών εκπλύσεων ήταν να απομακρυνθούν οι αναστολείς της PCR.
- Βήμα 6: η έκλυση του DNA γινόταν με 100 μl διαλύματος EB (Elution Buffer) που περιείχε το εμπορικό σκεύασμα.

### **1.2.2. Σύγκριση των δύο μεθόδων απομόνωσης DNA από το γάλα**

Για την αξιολόγηση των τροποποιήσεων που έγιναν για την αποδοτικότερη απομόνωση DNA από το γάλα, επαναλήφθηκε η συλλογή διπλών ατομικών δειγμάτων γάλατος σε 14 από τις 50 προβατίνες που χρησιμοποιήθηκαν για τους προκαταρκτικούς πειραματισμούς. Η συλλογή καθενός από τα δύο δείγματα γάλατος έγινε με τον ίδιο τρόπο, όπως περιγράφηκε στην ενότητα 1.1.1 (Συλλογή ατομικών δειγμάτων γάλατος). Στη συνέχεια, τα δύο δείγματα αναμίχθηκαν στο εργαστήριο, ώστε να αποκτήσουν την ίδια σύσταση σε όλο τον όγκο τους και μοιράστηκαν εκ

νέου σε δύο περιέκτες των 50 ml. Η απομόνωση του DNA σε καθένα από τα δείγματα αυτά πραγματοποιήθηκε τόσο με το Nucleospin Blood<sup>®</sup>, όσο και με τροποποιημένο Nucleospin Blood. Ακολούθησε σύγκριση των 2 μεθόδων απομόνωσης. Η αξιολόγηση της ποιότητας του DNA έγινε με φασματοφωτομετρικές μετρήσεις καθώς και με μετρήσεις αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο (real-time PCR). Η μέτρηση της ποσότητας του DNA έγινε με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης και με real-time PCR.

#### **1.2.2.1. Μετρήσεις με φασματοφωτόμετρο**

Για την εκτίμηση της καθαρότητας του απομονωμένου DNA υπολογίσθηκε σε όλα τα δείγματα, με τη βοήθεια φασματοφωτομέτρου (Eppendorf Biophotometer), η οπτική πυκνότητα (Optical Density, OD) σε τρία μήκη κύματος: 260 nm (απορρόφηση νουκλεϊνικών οξέων), 280 nm (απορρόφηση πρωτεϊνών) και 230 nm (απορρόφηση γουανιδίνης). Πιο συγκεκριμένα, από το πηλίκο OD260/OD280 προσδιορίστηκε η καθαρότητα του DNA από προσμίξεις πρωτεϊνών. Όταν το πηλίκο αυτό είναι χαμηλό υποδηλώνει δείγμα με παρουσία σημαντικών πρωτεϊνικών προσμίξεων. Τιμές του πηλίκου ανώτερες του 1,8 υποδηλώνουν δείγμα ικανοποιητικής καθαρότητας (Fahle και συν., 2000, Riemann και συν., 2007). Από το πηλίκο OD260/OD230 προσδιορίστηκε η καθαρότητα του DNA από προσμίξεις γουανιδίνης. Όταν το πηλίκο αυτό είναι χαμηλό υποδηλώνει δείγμα με παρουσία σημαντικών προσμίξεων γουανιδίνης. Τιμές του πηλίκου ανώτερες του 2,0 υποδηλώνουν δείγματα ικανοποιητικής καθαρότητας (Fahle και συν., 2000, Riemann και συν., 2007). Υψηλότερες τιμές και στις δύο φασματοφωτομετρικές μετρήσεις σχετίζονται με καλύτερης ποιότητας DNA. Οι εν λόγω μετρήσεις αφορούσαν 50 μl μη αραιωμένου DNA.

#### **1.2.2.2. Ηλεκτροφορητική ανάλυση DNA σε πηκτή αγαρόζης**

Η ποσότητα και η ακεραιότητα του DNA που απομονώθηκε από καθένα από τα 14 δείγματα εκτιμήθηκαν με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης. Πιο συγκεκριμένα, 5 μl από το DNA που απομονώθηκε από κάθε δείγμα αναλύθηκε σε 1,5% πηκτή αγαρόζης υψηλής καθαρότητας (Invitrogen, Paisley, U.K). Σε κάθε πηκτή τοποθετήθηκε και DNA-δείκτης γνωστού μοριακού βάρους [1.000 base pair (bp), λ DNA/Hind III, New England Biolabs, Inc., MA, USA]. Για την ανάλυση χρησιμοποιήθηκε συσκευή οριζόντιας ηλεκτροφόρησης (scie-plas, UK). Η



ηλεκτροφόρηση έγινε σε τάση 120 Volt για 120 λεπτά μέσα σε ρυθμιστικό διάλυμα 1 X TAE (40 mM Tris, 20 mM Acetic Acid και 1 mM EDTA, pH=8,3), σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολουθούσε εμφάνιση της πηκτής αгарόζης για περίπου 30 λεπτά σε διάλυμα βρωμιούχου αιθιδίου (250 ml νερό και 40 μl βρωμιούχο αιθίδιο). Η θέση, η ακεραιότητα και το πάχος της ζώνης του DNA έγιναν ορατά με τοποθέτηση της πηκτής πάνω από υπεριώδη ακτινοβολία σε τράπεζα φθορισμού (UVP white / UV transilluminator). Ακολούθησε φωτογράφιση με το σύστημα Kodak digital science (Electrophoresis and analysis system 120). Η ποσότητα του DNA προσδιορίστηκε με τη χρησιμοποίηση του Gel-Pro Analyzer software™, version 3.0 (Media Cybernetics®, Maryland, USA). Το λογισμικό αυτό υπολόγισε τη σχετική (%) ένταση φθορισμού της ζώνης κάθε απομονωμένου DNA. Η σχετική κλίμακα που χρησιμοποιήθηκε ήταν από το 0 έως το 100, όπου η τιμή 100 αφορούσε το δείγμα με τη μεγαλύτερη συγκέντρωση DNA. Η ένταση του φθορισμού που μετρήθηκε ήταν ανάλογη της ποσότητας του DNA που απομονώθηκε.

### 1.2.2.3. Εκκινητές

Όλοι οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για τις διάφορες μοριακές μεθόδους ανάλυσης που έλαβαν χώρα σε αυτή τη μελέτη παρουσιάζονται στον πίνακα 5. Οι εκκινητές M13R και M13f-20 συνόδευαν το TA cloning kit Dual promoter (Cat. K 461020, Lot 677005, Invitrogen, UK). Ο Do9 και ο Do10 ήταν δύο καθοδικοί εκκινητές, που προτάθηκαν από τους Lühken και συν. (2004). Οι υπόλοιποι εκκινητές συντέθηκαν για τις ανάγκες της παρούσας διατριβής. Ο σχεδιασμός των εκκινητών αυτών στηρίχθηκε στην εξεύρεση καλά συντηρημένης περιοχής στην αλληλουχία του γονιδίου *PRNP*. Για το σκοπό αυτό, εντοπίστηκαν και στοιχίστηκαν καταχωρημένες νουκλεοτιδικές αλληλουχίες από τη βάση δεδομένων του National Center for Biotechnology Information (NCBI), με τη χρήση του αλγόριθμου BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>). Η μέση θερμοκρασία τήξης ( $T_m$ ) των εκκινητών υπολογίστηκαν με τη βοήθεια του λογισμικού OligoAnalyzer 3.1 software (<http://eu.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/>), που αναπτύχθηκε από την εταιρεία IDT (Integrated DNA Technologies, Coralville, IA) και το οποίο είναι διαθέσιμο στο διαδίκτυο.

**Πίνακας 5.** Οι νουκλεοτιδικές αλληλουχίες των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για τη σύγκριση των μεθόδων απομόνωσης DNA, για το γενοτυπικό προσδιορισμό του γονιδίου *PRNP* σε ατομικό και ομαδικό επίπεδο και για τη δημιουργία των πλασμιδιακών προτύπων.

Εκκινητές	Νουκλεοτιδική αλληλουχία
Up8	5'-GTC AAG GTG GTA GCC ACA-3'
Do9	5'-TGC ACA AAG TTG TTC TGG TTA CTA TC-3'
Do10	5'-GCA CAA AGT TGT TCT GGT TAC TAT AT-3'
Up1	5'-GAT TCT TAC GTG GGC ATT TGA TGC T-3'
Do2	5'- ACC ACT ACA GGG CTG CAG GTA GAC-3'
Up7	5'-CAT GAA GCA TGT GGC AGG AGC TG-3'
Do2L	5'-CCC TTG GTG GTG GTG GTG ACT GTG TG-3'
LCPR2	5'-GTG GCT ACA TGC TGG GAA GTG-3'
CTDO2	5'-CAC AGT CAT CCA CAA AGT TGT TCT GG-3'
M13R	5'-CAG GAA ACA GCT ATG ACC -3'
M13f-20	5'-GTA AAA CGA CGG CCA G-3'

#### 1.2.2.4. Αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο (Real-time PCR)

Η ποσότητα και η καταλληλότητα για μοριακές αναλύσεις του DNA που απομονώθηκε από τα ατομικά δείγματα γάλατος, με τις δύο προαναφερθείσες μεθόδους, αξιολογήθηκε μέσω μίας δοκιμής real-time PCR.

Για την αντίδραση αυτή χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές LCPR2 και CTDO2 (Πίνακας 5), που πολλαπλασίαζαν ένα προϊόν 167 ζευγών βάσεων της αλληλουχίας του γονιδίου *PRNP*. Οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν σε θερμοκυκλοποιητή Mj Mini™ (Biorad, Milan, Italy). Στην αντίδραση real-time PCR, κάθε φιαλίδιο περιείχε 2 μl DNA σε συνολικό όγκο αντίδρασης 20 μl. Στο μίγμα της αντίδρασης περιλαμβάνονταν επίσης 0,3 mM εκκινητή LCPR2 και 0,1 mM εκκινητή CTDO2, 1X του ρυθμιστικού διαλύματος της PLATINUM *Taq* πολυμεράσης, 0,5 μονάδα της PLATINUM *Taq* πολυμεράσης, 200 μM από κάθε τριφωσφορικό δεοξυριβονουκλεοτίδιο (dNTPs), 2 mM MgCl<sub>2</sub> (όλα τα προηγούμενα αντιδραστήρια ήταν της Invitrogen, Breda, Netherland) και 1X της ειδικής για να συνδέεται με

δίκλωνο DNA φθορίζουσας χρωστικής Evagreen™ (Biotium, Hayward, CA, U.S.A.). Το πρωτόκολλο θερμοκυκλοποίησης περιελάμβανε αρχική αποδιάταξη του DNA με θέρμανση του διαλύματος στους 95°C για 3 λεπτά και στη συνέχεια 40 κύκλους στις εξής συνθήκες: 95°C για 30 δευτερόλεπτα, 64°C για 30 δευτερόλεπτα και 72°C για 15 δευτερόλεπτα. Οι μετρήσεις της φθορίζουσας χρωστικής πραγματοποιούνταν στο τέλος του κάθε κύκλου. Το πρωτόκολλο θερμοκυκλοποίησης ολοκληρωνόταν με μία καμπύλη θερμικής αποδιάταξης από τους 60°C έως τους 90°C. Κάθε DNA πολλαπλασιάστηκε με την παραπάνω αντίδραση real-time PCR τρεις φορές.

Η ποσότητα αλλά και η ποιότητα του DNA κάθε δείγματος αξιολογήθηκαν με βάση την τιμή *Ct*, που είναι ο κύκλος της αντίδρασης στον οποίο το δείγμα που εξετάζεται ξεπερνάει ένα προκαθορισμένο όριο ανίχνευσης. Μικρότερες τιμές *Ct* είναι επιθυμητές, καθώς αντιστοιχούν σε μεγαλύτερες ποσότητες DNA κατάλληλου για μοριακές αναλύσεις.

#### **1.2.2.4.1. Καμπύλη ποσοτικού προσδιορισμού**

Η γραμμικότητα και η απόδοση της δοκιμής real-time PCR προσδιορίστηκε με υποδεκαπλάσιες αραιώσεις ενός DNA-μάρτυρα. Ο μάρτυρας ήταν ένα προϊόν PCR 908 ζευγών βάσεων, που επίσης εντοπιζόταν στη περιοχή του γονιδίου *PRNP*. Για τον πολλαπλασιασμό του τμήματος αυτού του *PRNP* χρησιμοποιήθηκαν ο ανοδικός εκκινητής Up1 και ο καθοδικός Do2 (Πίνακας 5). Η αντίδραση PCR για τη δημιουργία του παραπάνω μάρτυρα πραγματοποιήθηκε σε θερμοκυκλοποιητή PCR Thermal Cycler DICE (TAKARA BIO INK, Japan). Το μίγμα της αντίδρασης αυτής περιείχε 6 μl DNA, ενώ ο συνολικός όγκος αντίδρασης ήταν 120 μl. Τη σύνθεση του μίγματος αποτελούσαν επίσης 0,2 mM εκκινητή Up1 και 0,2 mM εκκινητή Do2, 1X του ρυθμιστικού διαλύματος της PLATINUM *Taq* πολυμεράσης, 3 μονάδες της PLATINUM *Taq* πολυμεράσης, 200 μM από κάθε dNTPs και 2 mM MgCl<sub>2</sub> (όλα τα αντιδραστήρια ήταν της Invitrogen, Breda, Netherland). Το πρωτόκολλο θερμοκυκλοποίησης περιελάμβανε αρχική αποδιάταξη του DNA εκμαγείου με θέρμανση του διαλύματος στους 95°C για 3 λεπτά και στη συνέχεια 40 κύκλους με τις παρακάτω συνθήκες: 95°C για 30 δευτερόλεπτα, 61°C για 30 δευτερόλεπτα και 72°C για 1 λεπτό. Η αντίδραση ολοκληρωνόταν με επώαση στους 72°C για 5 λεπτά.

Το προϊόν PCR, που παράχθηκε με την παραπάνω αντίδραση, υποβλήθηκε σε καθαρισμό με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 1,5% (Invitrogen, Paisley, U.K.). Η ηλεκτροφόρηση έγινε σε τάση 120 Volt για 120 λεπτά. Για την απομόνωση και τον

καθαρισμό, από την πηκτή αγαρόζης, του προϊόντος των 908 ζευγών βάσεων, χρησιμοποιήθηκε αποστειρωμένη λεπίδα καθώς και το ειδικό, για το σκοπό αυτό, εμπορικό σκεύασμα Purelink™ Quick Gel Extraction Kit (Invitrogen, UK, Cat. No. K 2100-12). Ο καθαρισμός έγινε σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

Στη συνέχεια, προσδιορίστηκε η συγκέντρωση του DNA-μάρτυρα με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 1,2%. Ηλεκτροφορήθηκαν διαδοχικά 1 μl, 2 μl, 5 μl, 10 μl και 20 μl από το καθαρισμένο προϊόν PCR. Η συγκέντρωση του DNA (ng/μl) προσδιορίστηκε με βάση το πάχος των ζωνών ύστερα από σύγκριση με δείκτη μοριακών βαρών γνωστών συγκεντρώσεων (ng) (1 kb DNA Ladder, N3242S, New England Biolabs Inc., MA, USA).

Τον ποσοτικό προσδιορισμό ακολούθησε η δημιουργία υποδεκαπλάσιων αραιώσεων του εκμαγείου του μάρτυρα, από  $2 \times 10^8$  έως 2000 αντίγραφα DNA, που χρησίμευσαν για την κατασκευή της καμπύλης ποσοτικού προσδιορισμού της δοκιμής real-time PCR.

#### **1.2.2.5. Στατιστική επεξεργασία αποτελεσμάτων σύγκρισης Nucleospin Blood® και τροποποιημένου Nucleospin Blood**

Η στατιστική επεξεργασία των στοιχείων (φασματοφωτομετρικές, ηλεκτροφορητικές και real-time PCR μετρήσεις) που προέκυψαν από την αξιολόγηση των δύο πρωτοκόλλων απομόνωσης DNA, πραγματοποιήθηκε με το στατιστικό πρόγραμμα SPSS (Statistical Analysis for Social Sciences, version 16, SPSS inc, Illinois, USA).

Συγκεκριμένα, πραγματοποιήθηκε η δοκιμή σημαντικότητας Student's t-Test για καθένα από τα τρία κριτήρια αξιολόγησης που περιγράφηκαν παραπάνω. Με τις δοκιμές αυτές έγινε η σύγκριση των μέσων τιμών που μετρήθηκαν για κάθε κριτήριο. Το αποτέλεσμα αυτών των δοκιμασιών είναι η αποδοχή ή η απόρριψη της μηδενικής υπόθεσης ( $H_0$ ), σύμφωνα με την οποία οι παρατηρούμενες διαφορές μεταξύ των δύο πρωτοκόλλων απομόνωσης οφείλονται αποκλειστικά στη τύχη. Η εναλλακτική υπόθεση ( $H_a$ ) δηλώνει ότι υπάρχουν συστηματικές διαφορές μεταξύ των δύο πρωτοκόλλων. Το επίπεδο εμπιστοσύνης προκαθορίστηκε στο 95%. Συνεπώς, ως επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας για σφάλματα τύπου I ορίστηκε το 0,05.

### **1.2.3. Απομόνωση DNA από τα λευκοκύτταρα του αίματος**

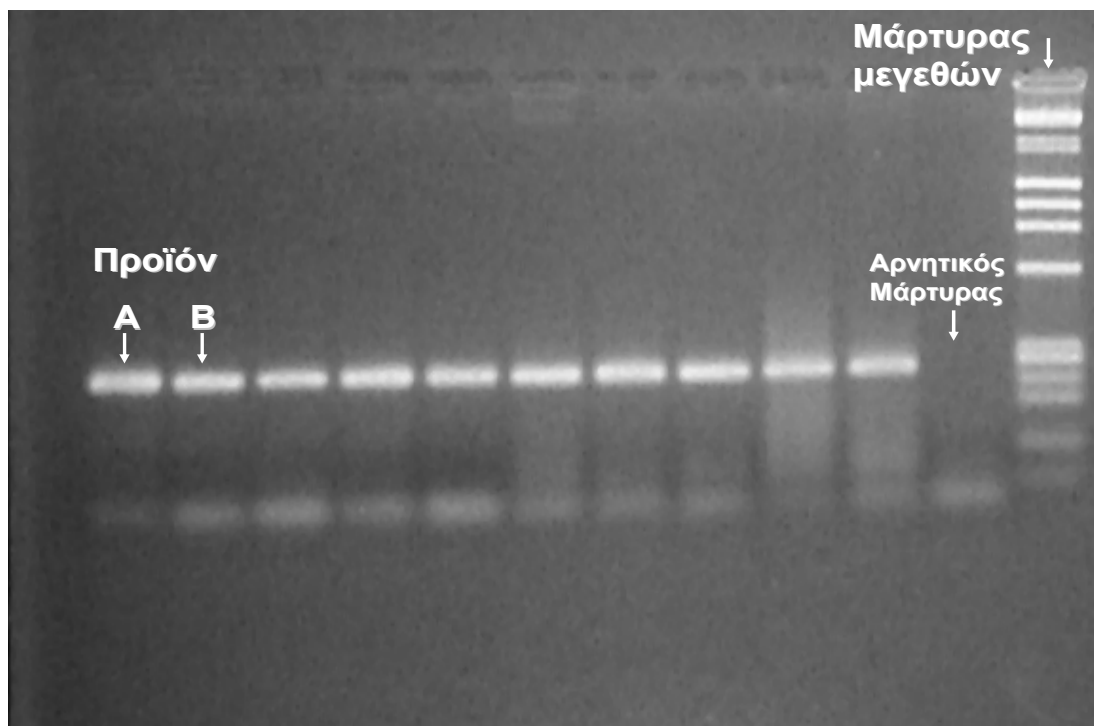
Η απομόνωση του DNA από τα 20 δείγματα αίματος, έγινε με τη χρήση του εμπορικού σκευάσματος Nucleospin Blood<sup>®</sup> (Macherey Nagel, Duren, Γερμανία) και σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

### **1.3. Προσδιορισμός των γενοτύπων του γονιδίου *PRNP* 1.013 προβατινών από ατομικά δείγματα γάλατος**

#### **1.3.1. Αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR)**

Για την ανίχνευση των πολυμορφισμών στις θέσεις 136, 141, 154 και 171 του γονιδίου *PRNP* με τη μέθοδο ανάλυσης πολυμορφισμού του μήκους των περιοριστικών θραυσμάτων (Restriction Fragment Length Polymorphism, RFLP), πολλαπλασιάστηκαν με την PCR δύο προϊόντα, ένα με μήκος 259 (προϊόν Α) και ένα με μήκος 258 (προϊόν Β) ζευγών βάσεων (Εικόνα 3). Για τον πολλαπλασιασμό των δύο προϊόντων χρησιμοποιήθηκε ο ίδιος ανοδικός εκκινητής *U<sub>p</sub>8*, ενώ για το προϊόν Α χρησιμοποιήθηκε ο καθοδικός εκκινητής *Do9* και για το προϊόν Β ο καθοδικός εκκινητής *Do10* (Πίνακας 5). Οι καθοδικοί εκκινητές ήταν κατάλληλα τροποποιημένοι ώστε να δημιουργούν θέσεις αναγνώρισης στο κωδικόνιο 171. Πιο συγκεκριμένα, ο *Do9* περιείχε τη βάση κυτοσίνη αντί για αδενίνη στο 3'- άκρο του, ώστε να δημιουργεί θέση αναγνώρισης στο κωδικόνιο 171 για το ένζυμο *BspHI* παρουσία του πολυμορφισμού της ιστιδίνης (*H<sub>171</sub>*). Ο *Do10* είχε τη βάση θυμίνη αντί για κυτοσίνη στο 3'- άκρο του, ώστε να δημιουργεί θέση αναγνώρισης στο κωδικόνιο 171 για το ένζυμο *BspDI* παρουσία του πολυμορφισμού της αργινίνης (*R<sub>171</sub>*).

Οι αντιδράσεις PCR πραγματοποιήθηκαν σε θερμοκυκλοποιητή *My Cycler<sup>TM</sup>* (Biorad, Milan, Italy). Οι αντιδράσεις αυτές βελτιστοποιήθηκαν ως προς τη συγκέντρωση του *MgCl<sub>2</sub>*, των εκκινητών και του εκμαγείου DNA, δοκιμάζοντας διαφορετικές συγκεντρώσεις των αντιδραστηρίων αυτών. Επίσης, η βέλτιστη θερμοκρασία υβριδοποίησης των εκκινητών (annealing temperature, *T<sub>a</sub>*) προσδιορίστηκε πειραματικά με διαδοχικές δοκιμές στις οποίες αυτή μεταβαλλόταν κατά 2°C σε ένα συνολικό εύρος 4°C εκατέρωθεν της θερμοκρασίας υβριδισμού των εκκινητών. Τελικά, υιοθετήθηκαν για την παραγωγή τόσο του προϊόντος Α, όσο και του προϊόντος Β οι ίδιες συνθήκες αντίδρασης και το ίδιο πρωτόκολλο θερμοκυκλοποίησης.



**Εικόνα 3.** Πολλαπλασιασμός δύο τμημάτων του γονιδίου *PRNP* (προϊόν A και B) με PCR. Ο αρνητικός μάρτυρας είναι δείγμα που δεν περιέχει DNA. Ο δείκτης μοριακού βάρους είναι 50 bp DNA-ladder, New England Biolabs, Inc., MA, USA.

Συγκεκριμένα, και στις δύο αντιδράσεις PCR, κάθε φιαλίδιο περιείχε 1  $\mu$ l DNA σε συνολικό όγκο αντίδρασης 20  $\mu$ l. Το μίγμα της αντίδρασης αποτελούσαν επίσης 0,2 mM από τον ανοδικό (Up8) και 0,2 mM από τον καθοδικό εκκινητή (Do9 ή Do10), 1X του ρυθμιστικού διαλύματος της PLATINUM *Taq* πολυμεράσης, 0,5 μονάδα της PLATINUM *Taq* πολυμεράσης, 200  $\mu$ M από κάθε dNTPs, και 2 mM  $MgCl_2$  (όλα τα αντιδραστήρια ήταν της Invitrogen, Breda, Netherland). Ο επιθυμητός όγκος των μιγμάτων των αντιδράσεων συμπληρωνόταν με αποσταγμένο και αποστειρωμένο νερό.

Το πρωτόκολλο θερμοκυκλοποίησης περιελάμβανε αρχική αποδιάταξη του DNA εκμαγείου με θέρμανση του διαλύματος στους 95°C για 3 λεπτά και στη συνέχεια 40 κύκλους στις εξής συνθήκες: 94°C για 20 δευτερόλεπτα, 54°C για 30 δευτερόλεπτα και 72°C για 15 δευτερόλεπτα. Το πρωτόκολλο θερμοκυκλοποίησης ολοκληρωνόταν με επώαση στους 72°C για 5 λεπτά.

Όλες οι δοκιμές πραγματοποιήθηκαν σε θάλαμο κάθετης νηματικής ροής και κάτω από συνθήκες που ελαχιστοποιούσαν τον κίνδυνο επιμόλυνσης με εξωγενές DNA.

### **1.3.2. Μέθοδος ανάλυσης πολυμορφισμού του μήκους περιοριστικών θραυσμάτων (RFLP)**

Για την ανίχνευση των πολυμορφισμών στα κωδικόνια 136, 154 και 171 του γονιδίου *PRNP* που πραγματοποιήθηκε σε 1.013 προβατίνες, καθώς και για την ανίχνευση των πολυμορφισμών στο κωδικόνιο 141 που πραγματοποιήθηκε σε 305 από τις 1.013 προβατίνες, επιλέχθηκαν με τη βοήθεια του λογισμικού NEBcutter V2.0 (<http://tools.neb.com/nebcutter2>) τέσσερις ενδονουκλεάσες περιορισμού: η BspHI, η BspDI, η MnlI και η RsaI. Όλα τα ένζυμα ήταν της εταιρείας New England Biolabs Inc., MA, USA. Τα πρωτόκολλα πέψης βελτιστοποιήθηκαν ως προς τη συγκέντρωση του ενζύμου, την ποσότητα του DNA και το χρόνο επώασης.

Αναλυτικότερα, σε 2 πλαστικά φιαλίδια όγκου 0,5 ml (quali-PCR-tubes, G. Kisker GBR, Germany) τοποθετούνταν από 10 μl προϊόντος A. Στο ένα φιαλίδιο προσθέτονταν 2 μονάδες BspHI και 1X (1 μl) του συνοδευτικού του ρυθμιστικού διαλύματος B4 και στο άλλο φιαλίδιο προσθέτονταν 2 μονάδες RsaI και 1X (1 μl) του συνοδευτικού του ρυθμιστικού διαλύματος B1. Αντίστοιχα, σε 2 πλαστικά φιαλίδια όγκου 0,5 ml τοποθετούνταν από 10 μl προϊόντος B. Στο ένα φιαλίδιο προσθέτονταν 2 μονάδες από καθεμία από τις ενδονουκλεάσες περιορισμού BspHI και BspDI και 1X (1 μl) ρυθμιστικού διαλύματος B4. Στο άλλο φιαλίδιο προσθέτονταν 2 μονάδες MnlI και 1X (1 μl) ρυθμιστικού διαλύματος B2. Στη συνέχεια, όλα τα φιαλίδια αναδεύονταν και φυγοκεντρώνονταν για 30 δευτερόλεπτα σε 12.000 g και κατόπιν τοποθετούνταν, για 24 ώρες, σε επωαστικό κλίβανο, στους 37°C.

Την επόμενη ημέρα τα παραπάνω προϊόντα αναλύονταν με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης. Η πηκτή αгарόζης παρασκευάζονταν με τη διάλυση υψηλής καθαρότητας αгарόζης (Invitrogen, Paisley, U.K) σε ρυθμιστικό διάλυμα 1X TAE (40 mM Tris, 20 mM Acetic Acid και 1 mM EDTA, pH=8,3) σε αναλογία 3 % (w/v). Η αгарόζη ρευστοποιούταν σε φούρνο μικροκυμάτων και μετά την πήξη της τοποθετούταν σε ειδική συσκευή οριζόντιας ηλεκτροφόρησης (scie-plas, UK). Τα 10 μl του προϊόντος της PCR, που είχαν υποστεί πέψη με τις ενδονουκλεάσες περιορισμού, αναμιγνύονταν με 2 μl διαλύματος χρωστικής ουσίας, που περιείχε 0,3% (w/v) κυανού της βρωμοφαινόλης, 10 mM Tris-HCl (pH=7,5), 10 mM EDTA και 65% (w/v) σουκρόζη, και το μίγμα τοποθετούταν με μικροπιπέτα στα φρεάτια της πηκτής. Επιπλέον, σε κάθε πηκτή τοποθετούνταν ένας αρνητικός μάρτυρας, που περιείχε όλα τα υλικά της μεθόδου, εκτός από το DNA, για τον έλεγχο πιθανών

επιμολύνσεων των αντιδραστηρίων και 5 μl DNA-δείκτη γνωστού μοριακού βάρους (50bp ή 100bp DNA Ladder, New England Biolabs, Inc., MA, USA). Η ηλεκτροφόρηση γινόταν σε τάση 130 Volt για 60 λεπτά μέσα σε 1X TAE και σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολουθούσε εμβάπτιση της πηκτής αγαρόζης για περίπου 30 λεπτά σε διάλυμα βρωμιούχου αιθιδίου (250 ml νερό και 40 μl βρωμιούχο αιθίδιο).

Το αποτέλεσμα αξιολογούνταν με την τοποθέτηση της πηκτής πάνω από υπεριώδη ακτινοβολία σε τράπεζα φθορισμού (UV transilluminator) και με φωτογράφιση με το σύστημα Kodak ds. Η ταυτοποίηση του μεγέθους των προϊόντων γινόταν με σύγκρισή τους με τμήματα DNA γνωστών μοριακών βαρών (50bp ή 100bp DNA ladder, New England Biolabs Inc., MA, USA).

### **1.3.3. Στατιστική επεξεργασία αποτελεσμάτων ατομικού γενοτυπικού προσδιορισμού**

Αρχικά, χρησιμοποιώντας τα αποτελέσματα του γενοτυπικού προσδιορισμού των 1.013 προβατινών, υπολογίστηκε ο συνολικός αριθμός του κάθε αλληλομόρφου στο σύνολο των ζώων, με βάση το γεγονός ότι τα ομοζύγωτα συμβάλουν με 2 αντίγραφα και τα ετεροζύγωτα με ένα αντίγραφο του αλληλομόρφου. Στη συνέχεια, οι συχνότητες των αλληλομόρφων και των γενοτύπων του γονιδίου *PRNP* υπολογίστηκαν ως το αντίστοιχο ποσοστό επί του συνόλου των παρατηρήσεων.

Επιπλέον, ελέγχθηκε ο πληθυσμός των προβάτων φυλής Χίου, που μελετήθηκε στα πλαίσια της παρούσας διατριβής, για την ύπαρξη ή όχι ισορροπίας Hardy Weinberg στον γονιδιακό τόπο *PRNP* (Nicholas, 2003, Ayala, 1982). Οι συχνότητες των αλληλομόρφων χρησιμοποιήθηκαν για να εκτιμηθούν οι αναμενόμενες γενοτυπικές συχνότητες στον πληθυσμό, με βάση την παραδοχή ότι ο πληθυσμός αυτός βρίσκεται σε ισορροπία Hardy-Weinberg. Οι συχνότητες των γενοτύπων, στην περίπτωση αυτή, εκτιμώνται ως το τετράγωνο της συχνότητας των αλληλομόρφων για τα ομοζύγωτα άτομα και ως το διπλάσιο του γινομένου των συχνοτήτων των δύο αλληλομόρφων για τα ετεροζύγωτα άτομα. Από τις αναμενόμενες γενοτυπικές συχνότητες εκτιμήθηκε και ο αναμενόμενος αριθμός ατόμων ως προς κάθε γενότυπο στο σύνολο του πληθυσμού των 1.013 προβατινών.



Στη συνέχεια, ο αριθμός των αναμενόμενων γενοτύπων και εκείνος που παρατηρήθηκε στον πληθυσμό συγκρίθηκαν με τη δοκιμή  $\chi^2$ :

$$\chi^2 = \sum [ (Π-A)^2 / A ]$$

Όπου: Π= αριθμός των γενοτύπων που παρατηρήθηκαν στον πληθυσμό

A= αριθμός των αναμενόμενων γενοτύπων όταν ο πληθυσμός βρίσκεται σε ισορροπία Hardy-Weinberg

Σ= άθροισμα επί του συνόλου των γενοτύπων που παρατηρήθηκαν

#### **1.4. Επαλήθευση των αποτελεσμάτων γενοτυπικού προσδιορισμού**

Η μέθοδος προσδιορισμού των γενοτύπων των ζώων με βάση το γάλα, που περιγράφηκε προηγουμένως, συγκρίθηκε, για επαλήθευση, με τη μέθοδο προσδιορισμού της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας (DNA sequencing), καθώς και με γενοτυπικό προσδιορισμό με βάση δείγματα αίματος (κλασική μέθοδος).

##### **1.4.1. Επαλήθευση με τη μέθοδο προσδιορισμού της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας (DNA Sequencing)**

Σε 22 δείγματα, στα οποία προηγουμένως είχε προσδιοριστεί ο γενότυπος του γονιδίου *PRNP* με την ανάλυση RFLP, προσδιορίστηκε και η νουκλεοτιδική αλληλουχία του μεγαλύτερου μέρους του ανοιχτού πλαισίου ανάγνωσης του *PRNP*. Αξίζει να σημειωθεί ότι το DNA-sequencing θεωρείται η ακριβέστερη μέθοδος γενοτυπικού προσδιορισμού, η οποία χρησιμοποιείται για την επαλήθευση των αποτελεσμάτων άλλων τεχνικών, αλλά δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε ευρεία κλίμακα λόγω υψηλού κόστους (Taylor και συν., 2001).

Η νουκλεοτιδική αλληλουχία που προσδιορίστηκε ήταν μεγέθους 908 ζευγών βάσεων. Για τον πολλαπλασιασμό αυτού του τμήματος του γονιδίου *PRNP* χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές Up1 και Do2 (Πίνακας 5). Εφαρμόστηκαν τα ίδια πρωτόκολλα αντίδρασης PCR, θερμοκυκλοποίησης, καθαρισμού του προϊόντος και προσδιορισμού της συγκέντρωσης του DNA που παρουσιάστηκαν αναλυτικά πιο πάνω για τη δημιουργία του DNA-μάρτυρα, που χρησιμοποιήθηκε για το σχηματισμό της καμπύλης ποσοτικού προσδιορισμού της δοκιμή real-time PCR (κεφάλαιο 1.2.2.4.1.).

Ο προσδιορισμός της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο διδέοξυ-αναλόγων του Sanger (ρυθμιζόμενη διακοπή της αντιγραφής του DNA) κατά κύκλους (cycle-sequence dye-terminator), όπου κατά τα στάδια της

θερμοκυκλοποίησης ενσωματώνονταν φθορίζοντα διδέοξυ-ανάλογα τερματισμού της σύνθεσης της αλυσίδας (Sanger και συν., 1977). Η νουκλεοτιδική αλληλουχία του προϊόντος PCR, που προέκυψε, προσδιορίστηκε και προς τις δύο κατευθύνσεις, χρησιμοποιώντας τους εκκινητές Up1 και Do2.

Οι αλληλουχίες εξετάστηκαν για ομοιότητες με τις καταχωρημένες αλληλουχίες στη βάση δεδομένων του NCBI με εφαρμογή του αλγόριθμου BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>). Για τον προσδιορισμό των πολυμορφισμών του γονιδίου *PRNP* χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό MEGA, Έκδοση 3.1 (Saitou και Nei, 1987, Kumar και συν., 2004).

#### **1.4.2. Γενοτυπικός προσδιορισμός σε δείγματα αίματος**

Για το γενοτυπικό προσδιορισμό του γονιδίου *PRNP* των 20 προβατινών από τις οποίες συλλέχθηκαν δείγματα αίματος, εφαρμόστηκαν τα ίδια πρωτόκολλα αντιδράσεων PCR και ανάλυσης RFLP με αυτά που παρουσιάστηκαν στα κεφάλαια 1.3.1. και 1.3.2.

## **2. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΓΕΝΟΤΥΠΩΝ ΜΕ ΒΑΣΗ ΤΟ ΓΑΛΑ ΣΕ ΟΜΑΔΙΚΟ ΕΠΙΠΕΔΟ**

Ατομικά δείγματα γάλατος συλλέχθηκαν από 120 προβατίνες που εκτρέφονταν σε δύο ποιμνία του Συνεταιρισμού Προβατοτρόφων φυλής Χίου «Μακεδονία» και των οποίων ο γενότυπος του γονιδίου *PRNP* είχε προσδιοριστεί κατά τη διάρκεια των ατομικών γενοτυπήσεων. Τα ατομικά δείγματα συνδυάστηκαν ανα 20 για τη δημιουργία πειραματικών δειγμάτων πολλαπλών ζώων, με στόχο την προσομοίωση δειγμάτων ποιμνίου από τη δεξαμενή ψύξης. Τα δείγματα αυτά στη συνέχεια αξιολογήθηκαν ως προς τη δυνατότητα χρησιμοποίησής τους για ομαδικό γενοτυπικό προσδιορισμό του γονιδίου *PRNP*. Για τους ίδιους λόγους, αρχικά, συνδυάστηκαν πλασμιδιακά DNA και στη συνέχεια ισομοριακές (ίσων συγκεντρώσεων) απομονώσεις DNA ζώων γνωστού γενότυπου, με τον τρόπο που αναλυτικά περιγράφεται αμέσως πιο κάτω. Οι αναμίξεις αυτές επαναλήφθηκαν τρεις φορές.

## 2.1. Δημιουργία προτύπων με ανάμιξη πλασμιδιακού DNA

Κλωνοποιήθηκε περιοχή μήκους 270 ζευγών βάσεων του γονιδίου *PRNP* που περιείχε τα αλληλόμορφα VRQ και ARQ. Τα 2 αυτά αλληλόμορφα επιλέχθηκαν επειδή, σύμφωνα με τη διεθνή βιβλιογραφία, αποτελούν το μεν πρώτο το πλέον ευαίσθητο στην κλασική μορφή της τρομάδους νόσου αλληλόμορφο, το δε δεύτερο το συχνότερα παρατηρούμενο στους πληθυσμούς των προβάτων (Baylis και Goldmann, 2004). Με τη χρησιμοποίηση των κλώνων των 2 αλληλομόρφων δημιουργήθηκαν ισομοριακά (ίσων συγκεντρώσεων) δείγματα που περιείχαν τους 2 κλώνους σε συγκεκριμένες, κάθε φορά, αναλογίες. Η δημιουργία των δειγμάτων αυτών αποσκοπούσε στον προσδιορισμό με ακρίβεια του ορίου ανίχνευσης του VRQ με την ανάλυση RFLP.

Για την κλωνοποίηση χρησιμοποιήθηκε το TA cloning kit Dual promoter (Cat. K 461020, Lot 677005, Invitrogen, UK). Η διαδικασία στο φορέα κλωνοποίησης PCR II -TOPO<sup>®</sup> βασίστηκε στη συμπληρωματική αναγνώριση των αζωτούχων βάσεων θυμίνης (T) και αδενίνης (A). Οι βάσεις αδενίνης προστίθενται από την *Taq*-πολυμεράση στο 3'-άκρο της συντιθέμενης αλληλουχίας κατά το τελευταίο στάδιο της PCR, ενώ οι βάσεις θυμίνης προεξέχουν ως μονόκλωνα άκρα στον φορέα. Η απομόνωση των επιθυμητών νουκλεοτιδικών αλληλουχιών έγινε με δοκιμή PCR και τη χρησιμοποίηση των κατάλληλων εκκινητών: Up7 και Do2L (Πίνακας 5). Η εισαγωγή στο φορέα κλωνοποίησης PCR II -TOPO<sup>®</sup> του προϊόντος των 270 ζευγών βάσεων έγινε σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Ακολούθησε μετασχηματισμός των κατάλληλων Mach-1<sup>™</sup>-T1<sup>®</sup> *Echerichia coli* προκαρυωτικών κυττάρων με το πλασμίδιο. Για την ταυτοποίηση των κλώνων ARQ και VRQ, πολλαπλασιάστηκε προϊόν PCR 513 ζευγών βάσεων, που περιελάμβανε το τμήμα του γονιδίου *PRNP* που εισήχθει στο πλασμίδιο-φορέα και τμήμα του φορέα, χρησιμοποιώντας τον ανοδικό εκκινητή M13R και τον καθοδικό M13f-20 (Πίνακας 5). Ακολούθησε πέψη των προϊόντων PCR με την ενδονουκλεάση περιορισμού BspHI, για την ταυτοποίηση των VRQ και ARQ κλώνων. Για την απομόνωση του πλασμιδιακού DNA χρησιμοποιήθηκε το εμπορικό σκεύασμα Nucleospin Plasmid Purification kit (Cat.No 740.588.50, Macherey-Nagel, Düren, Germany). Στη συνέχεια, το πλασμιδιακό DNA ευθυγραμμίστηκε με τη βοήθεια του περιοριστικού ενζύμου NotI-HF<sup>™</sup> (New England Biolabs Inc., MA, USA). Ακολούθησε καθαρισμός του ευθειασμένου πλασμιδιακού DNA με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης 1,5%. Ο ποσοτικός προσδιορισμός των δύο κλώνων του πλασμιδιακού

DNA πραγματοποιήθηκε με μέτρηση της οπτικής πυκνότητας στα 260 nm (Sambrook και Russel, 2001). Στη συνέχεια, με τις κατάλληλες αραιώσεις, η συγκέντρωση αντιγράφων DNA του κάθε κλώνου ρυθμίστηκε στα  $10^{10}$  αντίγραφα. Επιλέχτηκε η συγκέντρωση αυτή επειδή αντιστοιχούσε στη συγκέντρωση των αντιγράφων του γονιδίου *PRNP* που περιείχαν συνήθως τα DNA που απομονώθηκαν από τα ζώα. Όλες οι λεπτομέρειες της διαδικασίας που ακολουθήθηκε για τη δημιουργία προτύπων με ανάμιξη πλασμιδιακού DNA παρουσιάζονται στο Παράρτημα I.

### **2.1.1. Δημιουργία πλασμιδιακών προτύπων**

Για τη δημιουργία των προτύπων, οι 2 κλώνοι (ARQ και VRQ) αναμίχθηκαν σε συγκεκριμένες αναλογίες. Με τις αναμίξεις αυτές δημιουργήθηκαν, στο εργαστήριο, δείγματα που περιείχαν το αλληλόμορφο VRQ σε αναλογία 100%, 50%, 32%, 16%, 8%, 4%, 2%, 1%, 0,5%, 0,25%, 0,125% και 0%.

Καθένα από τα παραπάνω δείγματα πολλαπλασιάστηκε με PCR τρεις φορές. Ακολούθησε ανάλυση RFLP και στις τρεις επαναλήψεις κάθε δείγματος προκειμένου να προσδιοριστούν τα όρια ανίχνευσης του πολυμορφισμού βαλίνη στη θέση 136 ( $V_{136}$ ). Ως όριο ανίχνευσης θεωρήθηκε η ελάχιστη συγκέντρωση στην οποία ο πολυμορφισμός ανιχνευόταν με ευκρίνεια και στις τρεις επαναλήψεις.

### **2.2. Δημιουργία πειραματικών δειγμάτων με ανάμιξη ισομοριακών απομονώσεων DNA**

Πειραματικά δείγματα δημιουργήθηκαν στο εργαστήριο με ανάμιξη ισομοριακών απομονώσεων DNA από 20 προβατίνες με γνωστό το γενότυπο του γονιδίου *PRNP*. Η δημιουργία αυτών των πειραματικών δειγμάτων αποσκοπούσε, επίσης, στον προσδιορισμό των ορίων ανίχνευσης των διαφόρων αλληλομόρφων του γονιδίου *PRNP* με την ανάλυση RFLP. Τα όρια ανίχνευσης προσδιορίστηκαν με τον ίδιο τρόπο που προσδιορίστηκαν και στα κλωνοποιημένα δείγματα. Τα πειραματικά δείγματα περιείχαν 2 διαφορετικά αλληλόμορφα, ένα από τα οποία αφορούσε ο προσδιορισμός του ορίου ανίχνευσης (Πίνακας 6).

**Πίνακας 6.** Πειραματικά δείγματα που δημιουργήθηκαν στο εργαστήριο με ανάμιξη ισομοριακών απομονώσεων DNA είκοσι προβατινών με προσδιορισμένο γενότυπο.

Γενότυποι που αναμιχθήκαν	ARQ/ARQ	ARQ/ARQ	ARQ/ARQ	ARQ/ARQ	ARQ/ARQ
	ARQ/ARR*	ARQ/ARH*	ARQ/TRQ*	ARQ/AHQ	ARQ/VRQ*
*					
Αναλογίες αλληλομόρφων	ARQ-ARR*	ARQ-ARH*	ARQ-TRQ*	ARQ-AHQ*	ARQ-VRQ*
	99,75%-0,25%*	99,75%-0,25%*	99,75%-0,25%*	99,75%-0,25%*	99,75%-0,25%*
	99,5%-0,5%*	99,5%-0,5%*	99,5%-0,5%*	99,5%-0,5%*	99,5%-0,5%*
	99%-1%*	99%-1%*	99%-1%*	99%-1%*	99%-1%*
	98%-2%*	98%-2%*	98%-2%*	98%-2%*	98%-2%*
	96%-4%*	96%-4%*	96%-4%*	96%-4%*	96%-4%*
	92%-8%*	92%-8%*	92%-8%*	92%-8%*	92%-8%*
	84%-16%*	84%-16%*	84%-16%*	84%-16%*	84%-16%*
	68%-32%*	68%-32%*	68%-32%*	68%-32%*	68%-32%*

\* με αστερίσκο σημειώνεται το αλληλόμορφο που συμμετείχε στο κάθε πειραματικό δείγμα με τη μικρότερη αναλογία και του οποίου το όριο ανίχνευσης προσδιορίστηκε με τις δοκιμές αυτές.

Δημιουργήθηκε και ένα πειραματικό δείγμα που περιείχε τα 4 αλληλόμορφα (ARQ, AHQ, TRQ και ARR) που συνήθως ανιχνεύονται σε ένα ποίμνιο (όπως διαπιστώθηκε κατά την προηγούμενη έρευνα σε ατομικό επίπεδο). Τα αλληλόμορφα AHQ, TRQ και ARR συμμετείχαν σε χαμηλή, σχετικά, συγκέντρωση (Πίνακας 7).

**Πίνακας 7.** Πειραματικό δείγμα που περιείχε τα τέσσερα αλληλόμορφα που συνήθως ανιχνεύονται στα ποίμνια προβάτων Χίου. Το δείγμα αυτό δημιουργήθηκε στο εργαστήριο με ανάμιξη ισομοριακών απομονώσεων DNA προβατινών με προσδιορισμένο γενότυπο.

Γενότυποι που αναμιχθήκαν	Αλληλόμορφα	Αναλογίες αλληλομόρφων
ARQ / ARQ	ARQ	85%
ARQ / AHQ	AHQ	4%
ARQ / ARR	ARR	5%
ARQ / TRQ	TRQ	6%

### **2.3. Δημιουργία φυσικών πειραματικών δειγμάτων με ανάμιξη ατομικών δειγμάτων νωπού γάλατος**

Πειραματικά δείγματα, που προσομοιάζαν δείγματα δεξαμενής ψύξης γάλατος, δημιουργήθηκαν στο εργαστήριο με ανάμιξη ατομικών δειγμάτων νωπού γάλατος. Τα ατομικά δείγματα γάλατος προέρχονταν από 20 προβατίνες με προσδιορισμένο γενότυπο του γονιδίου *PRNP*. Ο όγκος του γάλατος που προέκυπτε κάθε φορά από την ανάμιξη των ατομικών δειγμάτων (50ml x 20) ήταν 1 λίτρο. Ακολουθούσε καλή ανάδευση του συνολικού γάλατος και συλλογή από αυτό 3 δειγμάτων όγκου 50 ml σε πλαστικούς κωνικούς περιέκτες (Falcon, Greiner). Η απομόνωση του DNA γινόταν με το τροποποιημένο Nucleospin Blood (1.2.1.2.).

Με τα πειραματικά αυτά δείγματα ελέγχθηκαν οι δυνατότητες ανίχνευσης των αλληλομόρφων στις αναλογίες που παρουσιάζονται στους Πίνακες 8, 9, 10, 11 και 12. Για τη δημιουργία κάθε πειραματικού δείγματος αναμίχθηκε, σε συγκεκριμένες αναλογίες, γάλα από προβατίνες 2 ή 3 διαφορετικών γενοτύπων. Για παράδειγμα, τα πειραματικά δείγματα της πρώτης στήλης του Πίνακα 8 δημιουργήθηκαν με ανάμιξη γάλατος από ζώα με γενότυπο ARQ/ARQ, ARQ/AHQ και ARQ/ARR. Σε κάθε περίπτωση, δύο διαφορετικά πειραματικά δείγματα δημιουργήθηκαν, για τον προσδιορισμό των αλληλομόρφων ARR, VRQ, AHQ, ARH και TRQ, αντίστοιχα, με την ανάμιξη ατομικών δειγμάτων νωπού γάλατος διαφορετικών προβατινών.

**Πίνακας 8.** Πειραματικά δείγματα που δημιουργήθηκαν με ανάμιξη νοπού γάλατος είκοσι προβατινών με προσδιορισμένο γενότυπο του γονιδίου *PRNP* προκειμένου να προσδιοριστεί η ελάχιστη συγκέντρωση στην οποία ανιχνεύεται με την ανάλυση RFLP το αλληλόμορφο ARR.

Πειραματικό δείγμα 1		Πειραματικό δείγμα 2	
Γενότυποι που αναμίχθηκαν	Αλληλόμορφα	Γενότυποι που αναμίχθηκαν	Αλληλόμορφα
ARQ/ARQ	ARQ και AHQ -	ARQ/ARQ	ARQ - ARR*
ARQ/AHQ	ARR*	ARQ/ARR*	(αναλογίες)
ARQ/ARR*	(αναλογίες)	(ποσότητα	
(ποσότητα		γάλατος σε ml)	
γάλατος σε ml)			
995 -5*	99,75%-0,25%*	995 -5*	99,75%-0,25%*
990-10*	99,5%-0,5%*	990-10*	99,5%-0,5%*
980-20*	99%- 1%*	980-20*	99%- 1%*
960-40*	98%-2%*	960-40*	98%-2%*
920-80*	96%-4%*	920-80*	96%-4%*
840-160*	92%-8%*	840-160*	92%-8%*
680-320*	84%-16%*	680-320*	84%-16%*

\* με αστερίσκο σημειώνεται το αλληλόμορφο που συμμετείχε με τη μικρότερη αναλογία στα πειραματικά δείγματα και του οποίου προσδιορίστηκε η ελάχιστη συγκέντρωση ανίχνευσης.

**Πίνακας 9:** Πειραματικά δείγματα που δημιουργήθηκαν με ανάμιξη νοπού γάλατος είκοσι προβατινών με προσδιορισμένο γενότυπο του γονιδίου *PRNP* προκειμένου να προσδιοριστεί η ελάχιστη συγκέντρωση που ανιχνεύεται με την ανάλυση RFLP το αλληλόμορφο VRQ.

<b>Πειραματικό δείγμα 1</b>		<b>Πειραματικό δείγμα 2</b>	
Γενότυποι που αναμίχθηκαν		Γενότυποι που αναμίχθηκαν	
ARQ/ARQ ARQ/VRQ*	Αλληλόμορφα ARQ- VRQ* (αναλογίες)	ARQ/ARQ ARQ/VRQ*	Αλληλόμορφα ARQ - VRQ* (αναλογίες)
(ποσότητα γάλατος σε ml)		(ποσότητα γάλατος σε ml)	
995 -5*	99,75%-0,25%*		
990-10*	99,5%-0,5%*	990-10*	99,5%-0,5%*
980-20*	99%- 1%*	980-20*	99%- 1%*
960-40*	98%-2%*	960-40*	98%-2%*
920-80*	96%-4%*	920-80*	96%-4%*
840-160*	92%-8%*	840-160*	92%-8%*
680-320*	84%-16%*	680-320*	84%-16%*
360-640*	68%-32%*		

\* με αστερίσκο σημειώνεται το αλληλόμορφο που συμμετείχε με τη μικρότερη αναλογία στα πειραματικά δείγματα και του οποίου προσδιορίστηκε η ελάχιστη συγκέντρωση ανίχνευσης.



**Πίνακας 10:** Πειραματικά δείγματα που δημιουργήθηκαν με ανάμιξη νοπού γάλατος είκοσι προβατινών με προσδιορισμένο γενότυπο του γονιδίου *PRNP* προκειμένου να προσδιοριστεί η ελάχιστη συγκέντρωση που ανιχνεύεται με την ανάλυση RFLP το αλληλόμορφο ARH.

<b>Πειραματικό δείγμα 1</b>		<b>Πειραματικό δείγμα 2</b>	
Γενότυποι που αναμίχθηκαν		Γενότυποι που αναμίχθηκαν	
ARQ/ARQ	Αλληλόμορφα	ARQ/ARQ	Αλληλόμορφα
ARQ/ARH*	ARQ - ARH*	ARQ/ARH*	ARQ - ARH*
(ποσότητες	(αναλογίες)	(ποσότητες	(αναλογίες)
γάλατος σε ml)		γάλατος σε ml)	
995 -5*	99,75%-0,25%*	995 -5*	99,75%-0,25%*
990-10*	99,5%-0,5%*	990-10*	99,5%-0,5%*
980-20*	99%- 1%*	980-20*	99%- 1%*
960-40*	98%-2%*	960-40*	98%-2%*
920-80*	96%-4%*	920-80*	96%-4%*
840-160*	92%-8%*	840-160*	92%-8%*
680-320*	84%-16%*	680-320*	84%-16%*

\* με αστερίσκο σημειώνεται το αλληλόμορφο που συμμετείχε με τη μικρότερη αναλογία στα πειραματικά δείγματα και του οποίου προσδιορίστηκε η ελάχιστη συγκέντρωση ανίχνευσης.

**Πίνακας 11:** Πειραματικά δείγματα που δημιουργήθηκαν με ανάμιξη νοπού γάλατος είκοσι προβατινών με προσδιορισμένο γενότυπο του γονιδίου *PRNP* προκειμένου να προσδιοριστεί η ελάχιστη συγκέντρωση που ανιχνεύεται με την ανάλυση RFLP το αλληλόμορφο TRQ.

Πειραματικό δείγμα 1		Πειραματικό δείγμα 2	
Γενότυποι που αναμίχθηκαν	Αλληλόμορφα	Γενότυποι που αναμίχθηκαν	Αλληλόμορφα
ARQ/ARQ	ARQ - TRQ*	ARQ/ARQ	ARQ - TRQ*
ARQ/TRQ*	(αναλογίες)	ARQ/TRQ*	(αναλογίες)
(ποσότητες γάλατος σε ml)		(ποσότητες γάλατος σε ml)	
995 -5*	99,75%-0,25%*	995 -5*	99,75%-0,25%*
990-10*	99,5%-0,5%*	990-10*	99,5%-0,5%*
980-20*	99%- 1%*	980-20*	99%- 1%*
960-40*	98%-2%*	960-40*	98%-2%*
920-80*	96%-4%*	920-80*	96%-4%*
840-160*	92%-8%*	840-160*	92%-8%*
680-320*	84%-16%*	680-320*	84%-16%*

\* με αστερίσκο σημειώνεται το αλληλόμορφο που συμμετείχε με τη μικρότερη αναλογία στα πειραματικά δείγματα και του οποίου προσδιορίστηκε η ελάχιστη συγκέντρωση ανίχνευσης.

**Πίνακας 12:** Πειραματικά δείγματα που δημιουργήθηκαν με ανάμιξη νοπού γάλατος είκοσι προβατινών με προσδιορισμένο γενότυπο του γονιδίου *PRNP* προκειμένου να προσδιοριστεί η ελάχιστη συγκέντρωση που ανιχνεύεται με την ανάλυση RFLP το αλληλόμορφο AHQ.

Πειραματικό δείγμα 1		Πειραματικό δείγμα 2	
Γενότυποι που αναμίχθηκαν		Γενότυποι που αναμίχθηκαν	
ARQ/ARQ	Αλληλόμορφα	ARQ/ARQ	Αλληλόμορφα
AHQ/AHQ*	ARQ -AHQ*	ARQ/AHQ*	ARQ - AHQ*
(ποσότητες	(αναλογίες)\	(ποσότητες	(αναλογίες)
γάλατος σε ml)		γάλατος σε ml)	
995 -2,5*	99,75%-0,25%*	995 -5*	99,75%-0,25%*
990-5*	99,5%-0,5%*	990-10*	99,5%-0,5%*
980-10*	99%- 1%*	980-20*	99%- 1%*
960-20*	98%-2%*	960-40*	98%-2%*
920-40*	96%-4%*	920-80*	96%-4%*
840-80*	92%-8%*	840-160*	92%-8%*
680-160*	84%-16%*	680-320*	84%-16%*

\* με αστερίσκο σημειώνεται το αλληλόμορφο που συμμετείχε με τη μικρότερη αναλογία στα πειραματικά δείγματα και του οποίου προσδιορίστηκε η ελάχιστη συγκέντρωση ανίχνευσης.

## 2.4. Προσδιορισμός πολυμορφισμών του γονιδίου *PRNP* σε ομαδικό επίπεδο

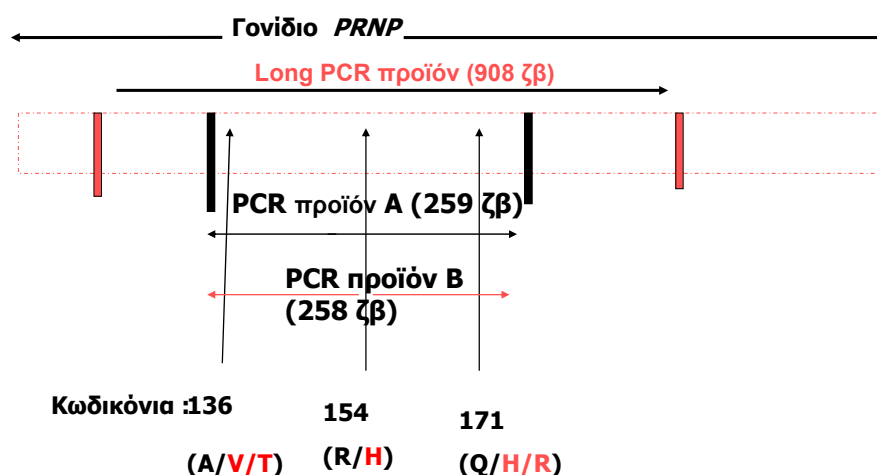
### 2.4.1 Πρώτη ή μεγάλου μήκους PCR (Long-PCR)

Με τη μεγάλη μήκους PCR (Long-PCR) πολλαπλασιαζόταν το ίδιο τμήμα 908 ζευγών βάσεων του γονιδίου *PRNP* το οποίο αποτέλεσε το DNA-μάρτυρα, που χρησιμοποιήθηκε για το σχηματισμό της καμπύλης ποσοτικού προσδιορισμού της δοκιμής real-time PCR για τη σύγκριση των δύο μεθόδων απομόνωσης DNA από το γάλα (κεφάλαιο 1.2.2.4.1). Για τη δοκιμή αυτή χρησιμοποιήθηκαν οι ίδιοι εκκινητές (Up1 και Do2) και εφαρμόστηκαν οι ίδιες συνθήκες αντίδρασης και το ίδιο πρωτόκολλο θερμοκυκλοποίησης με εκείνα που παρουσιάστηκαν αναλυτικά στο κεφάλαιο 1.2.2.4.1., με μόνες διαφορές το ότι ο συνολικός όγκος αντίδρασης

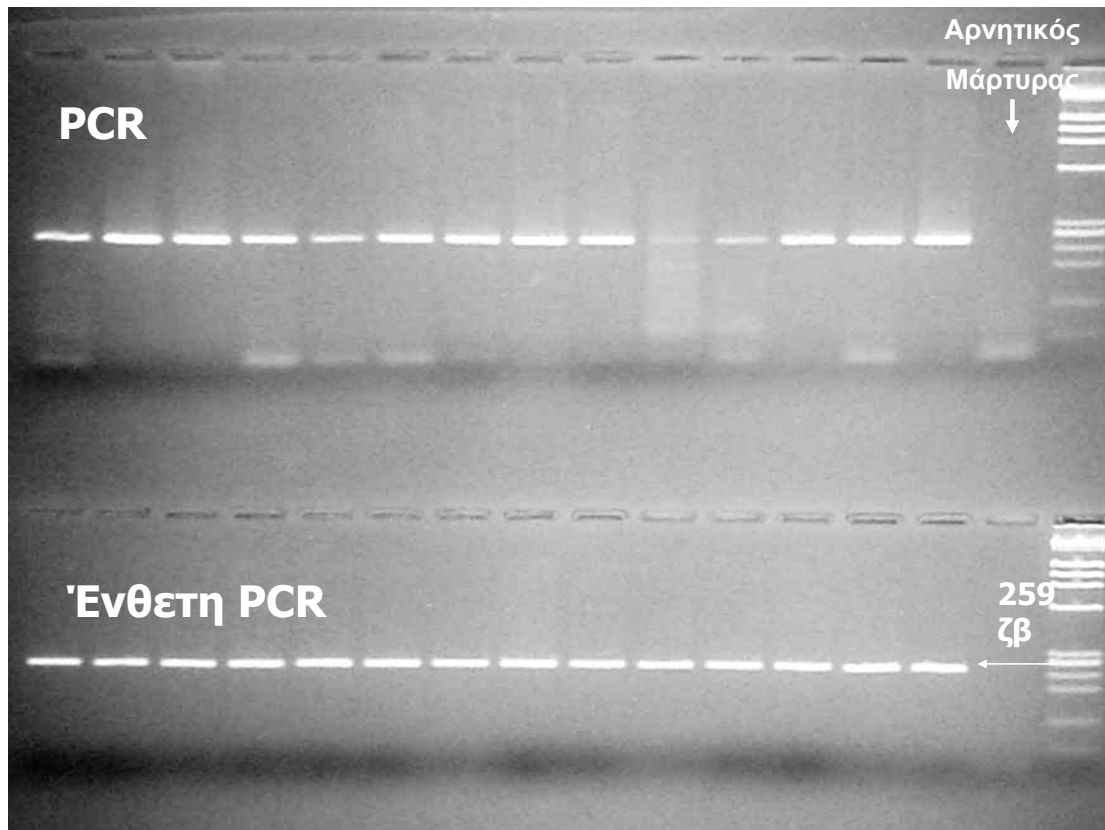
ανερχόταν στα 20 μl αντί 120 μl και ότι η αντίδραση περιείχε 1 μl DNA αντί 6 μl.

#### 2.4.2. Δεύτερη ή Ένθετη PCR

Στην τεχνική της ένθετης PCR, το ζεύγος εκκινητών συνδέεται εσωτερικά του προϊόντος της πρώτης PCR και συνεπώς, το προϊόν που προκύπτει από τη δεύτερη PCR είναι μικρότερο σε μέγεθος από εκείνο της πρώτης. Με αυτή την τεχνική αυξάνει, τόσο η ευαισθησία, όσο και η ειδικότητα της μεθόδου (Εικόνα 4) (Gundersen και συν., 1996). Οι δύο αντιδράσεις ένθετης PCR (A και B), που ακολουθούσαν την μεγάλη μήκους PCR, πραγματοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας τους ίδιους εκκινητές, τις ίδιες συνθήκες αντίδρασης και το ίδιο πρωτόκολλο θερμοκυκλοποίησης με αυτά που περιγράφηκαν αναλυτικά για τα ατομικά δείγματα γάλατος (κεφάλαιο 1.3.1), με τη διαφορά ότι, αντί για 1 μl DNA του ζώου, χρησιμοποιήθηκε ως εκμαγείο 1 μl αραιωμένου χίλιες φορές, σε αποστειρωμένο και αποσταγμένο νερό, προϊόντος της προηγούμενης μεγάλης μήκους PCR. Κάθε δείγμα πολλαπλασιαζόταν δύο φορές για την παραγωγή του προϊόντος A και μία φορά για την παραγωγή του προϊόντος B. Στο Σχήμα 1 παρουσιάζεται αναλυτικά η διαδικασία που ακολουθήθηκε για το γενοτυπικό προσδιορισμό σε ομαδικό επίπεδο.



**Σχήμα 1.** Σχηματική απεικόνιση της ένθετης PCR που εφαρμόστηκε για τον προσδιορισμό των πολυμορφισμών του γονιδίου *PRNP* σε ομαδικό επίπεδο.



**Εικόνα 4.** Πολλαπλασιασμός τμήματος του γονιδίου *PRNP* 259ζβ (προϊόν Α) με απλή PCR και με ένθετη PCR. Ο αρνητικός μάρτυρας είναι δείγμα που δεν περιέχει DNA. Με την ένθετη PCR αυξάνει τόσο η ευαισθησία όσο και η ειδικότητα της αντίδρασης. Ο δείκτης μοριακού βάρους είναι 50 bp DNA-ladder, New England Biolabs, Inc., MA, USA.

#### **2.4.3. Μέθοδος ανάλυσης πολυμορφισμού του μήκους περιοριστικών θραυσμάτων (RFLP)**

Για τον προσδιορισμό των πολυμορφισμών του γονιδίου *PRNP* στα δείγματα των πειραματικών αναμίξεων χρησιμοποιήθηκε το πρωτόκολλο ανάλυσης RFLP που εφαρμόστηκε για τους ατομικούς γενοτυπικούς προσδιορισμούς (κεφάλαιο 1.3.2), με ορισμένες, ωστόσο, τροποποιήσεις. Συγκεκριμένα, οι αντιδράσεις πέψης βελτιστοποιήθηκαν ως προς τη συγκέντρωση των ενδονουκλεασών περιορισμού, την ποσότητα του DNA εκμαγείου, την προσθήκη ή όχι της BSA, το συνολικό όγκο αντίδρασης και το χρόνο επώασης στους 37°C.

Το τελικό πρωτόκολλο περιελάμβανε πέψη διπλάσιου όγκου προϊόντος PCR (20 αντί για 10 μl) με πενταπλάσιες ποσότητες ενδονουκλεασών περιορισμού (10 μονάδες αντί για 2) σε σχέση με το πρωτόκολλο που εφαρμόστηκε για τους

ατομικούς γενετυπικούς προσδιορισμούς. Μετά την επώαση για 24 ώρες στους 37°C ακολουθούσε η ανάλυση των προϊόντων πέψης με ηλεκτροφόρηση σε πηκτική αγαρόζη. Οι μόνες διαφορές σε σχέση με αυτά που εφαρμόστηκαν για τα ατομικά δείγματα γάλατος ήταν η χρησιμοποίηση χαμηλότερης συγκέντρωσης πηκτικής αγαρόζης (2% αντί για 3%) και η αύξηση του χρόνου της ηλεκτροφόρησης από 60 σε 90 λεπτά.

### **3. ΣΧΕΣΗ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ *PRNP* ΜΕ ΤΗ ΓΑΛΑΚΤΟΠΑΡΑΓΩΓΙΚΗ ΚΑΙ ΤΗΝ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΙΚΗ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑ ΤΩΝ ΖΩΩΝ**

#### **3.1. Ποίμνια που χρησιμοποιήθηκαν για τη διεξαγωγή της μελέτης**

Η μελέτη της επίδρασης του γονιδίου *PRNP* στη γαλακτοπαραγωγική και στην αναπαραγωγική ικανότητα των προβάτων φυλής Χίου, στηρίχθηκε σε στοιχεία που συλλέχθηκαν από το Συνεταιρισμό προβατοτρόφων φυλής Χίου «Μακεδονία». Τα 23 ποίμνια της παρούσας μελέτης συμπεριλαμβάνονται στον εν λόγω συνεταιρισμό, τα μέλη του οποίου εκτρέφουν αποκλειστικά καθαρόαιμα πρόβατα της φυλής. Το σύστημα εκτροφής που εφαρμόζεται είναι ημιεντατικό ή εντατικό με σύγχρονες σταβλικές εγκαταστάσεις, όπου παραμένουν τα ζώα το μεγαλύτερο μέρος της ημέρας. Ωστόσο, σχεδόν όλες οι επιχειρήσεις διαθέτουν χώρο προαυλισμού. Η διατροφή των ζώων αποτελείται κατά 55% από χονδροειδείς ζωοτροφές και 45% από συμπυκνωμένες. Στα περισσότερα ποίμνια χορηγούνται ιδιοπαραγόμενες ζωοτροφές, ενώ περίπου στα μισά, για τη βόσκηση των προβάτων, χρησιμοποιούνται τεχνητοί λειμώνες. Η συντριπτική πλειονότητα εφαρμόζει άρμεγμα με μηχανές. Συγκεκριμένα, από τα 23 ποίμνια που χρησιμοποιήθηκαν για τη μελέτη αυτή, μόνο δύο δε διέθεταν αρμεκτικό συγκρότημα. Σε όλα τα ποίμνια οι προβατίνες αρμέγονται τρεις φορές την ημέρα στην αρχή της γαλακτικής περιόδου, στη συνέχεια δύο φορές και στο τέλος μία. Στα ποίμνια ακολουθείται πρόγραμμα αποπαρασίτωσης και εμβολιασμού κατά της εντεροτοξιναιμίας.

Στα πλαίσια του προγράμματος γενετικής βελτίωσης που εφαρμόζεται στα ποίμνια αυτά, γίνεται έλεγχος των αποδόσεων των ζώων, με μηνιαίους ατομικούς ελέγχους γαλακτοπαραγωγής σύμφωνα με τους κανονισμούς της διεθνούς επιτροπής ελέγχου των αποδόσεων των ζώων (ICAR, 2008). Τα δεδομένα των μετρήσεων αυτών καταγράφονται συστηματικά στα αρχεία του συνεταιρισμού και, μετά από την κατάλληλη επεξεργασία, χρησιμοποιούνται για τον προσδιορισμό και την επιλογή

των μελλοντικών γεννητόρων. Εφαρμόζονται, επίσης, προγραμματισμένες συζεύξεις που έχουν σαν στόχο τη βελτιστοποίηση των αποτελεσμάτων επιλογής των ζώων, την αποφυγή της αιμομιξίας και την αύξηση της γενετικής προόδου (Στοιχεία του Κέντρου Γενετικής Βελτίωσης Ζώων Νέας Μεσημβρίας και Αγροτικού Συνεταιρισμού Προβατοτρόφων φυλής Χίου «Μακεδονία», 2007).

Στην περίπτωση των ατομικών συζεύξεων, τα θηλυκά που βρίσκονται σε οίστρο μεταφέρονται σε ατομικά κελιά, όπου γίνονται οι συζεύξεις με επιλεγμένα κριάρια. Κάθε θηλυκό, κατά τη διάρκεια του οίστρου, οχεύεται το λιγότερο 2 φορές ανά 12 ώρες από το ίδιο αρσενικό. Αν οι συζεύξεις, για διάφορους διαχειριστικούς λόγους, δεν μπορούν να γίνουν ατομικά, αυτό δηλώνεται στο Συνεταιρισμό, ο οποίος στη συνέχεια εκπονεί, για την ενδιαφερόμενη εκτροφή, κατάλληλο πρόγραμμα συζεύξεων των θηλυκών σε ομάδες. Όλα τα δεδομένα που αφορούν την αναπαραγωγή του ποιμνίου καταγράφονται συστηματικά στα αρχεία του ποιμνίου και, στη συνέχεια, στα αρχεία του συνεταιρισμού (Στοιχεία του Κέντρου Γενετικής Βελτίωσης Ζώων Νέας Μεσημβρίας και Αγροτικού Συνεταιρισμού Προβατοτρόφων φυλής Χίου «Μακεδονία», 2007).

Τα αρχεία που αφορούσαν τη γαλακτοπαραγωγή και την αναπαραγωγή των 1.013 προβατινών από τα 23 ποίμνια που προαναφέρθηκαν, αποτέλεσαν τα στοιχεία που χρησιμοποιήθηκαν στα πλαίσια της παρούσας διατριβής, σε συνδυασμό με τα αποτελέσματα του γενοτυπικού προσδιορισμού, για τη μελέτη της σχέσης του γονιδίου *PRNP* με τη γαλακτοπαραγωγική και αναπαραγωγική ικανότητα των προβάτων φυλής Χίου. Στόχος της στατιστικής επεξεργασίας των δεδομένων αυτών, που πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια μικτών γραμμικών προτύπων, ήταν η διερεύνηση της επίδρασης της εφαρμογής ενός προγράμματος επιλογής για την αύξηση της ανθεκτικότητας στη τρομώδη νόσο στην παραγωγικότητα του πληθυσμού των προβάτων φυλής Χίου. Τα προγράμματα αυτά παρουσιάζονται ως την εναλλακτική λύση στο πρόβλημα της εκρίζωσης της τρομώδους νόσου από τους πληθυσμούς προβάτων. Ωστόσο, για την ανάπτυξη του κατάλληλου προγράμματος σημαντική είναι η προηγούμενη γνώση των επιπτώσεων του στην κερδοφορία των προβατοτροφικών επιχειρήσεων.

### **3.2. Στοιχεία που αναλύθηκαν**

Από το συνεταιρισμό «Μακεδονία» διατέθηκε μία βάση δεδομένων που περιείχε τα επίσημα αρχεία των 1.013 προβατινών με προσδιορισμένο γενότυπο του

γονιδίου *PRNP*. Στα αρχεία αυτά, για κάθε προβατίνα, υπήρχαν τα παρακάτω στοιχεία:

1. Κωδικός ζώου
2. Ημερομηνία γέννησης
3. Κωδικός πατέρα του ζώου
4. Κωδικός μητέρας του ζώου
5. Κωδικός ποιμνίου εκτροφής

Όσον αφορά στην ημερήσια γαλακτοπαραγωγή του επίσημου μηνιαίου ελέγχου, η βάση δεδομένων διαθέτει στοιχεία για:

1. τον αριθμό της γαλακτικής περιόδου
2. την ημερομηνία τοκετού
3. τον αριθμό του μηνιαίου ελέγχου
4. την ημερομηνία του μηνιαίου ελέγχου
5. την ημερήσια γαλακτοπαραγωγή του μηνιαίου ελέγχου

Από τα παραπάνω υπολογίστηκαν, από το συνεταιρισμό, η συνολική γαλακτοπαραγωγή και η διάρκεια της γαλακτικής περιόδου σύμφωνα με την επίσημη μέθοδο A4, της ICAR (ICAR, 2008).

Όσον αφορά στην αναπαραγωγή των ζώων, η βάση δεδομένων διαθέτει στοιχεία για:

1. την ημερομηνία οχείας της κάθε προβατίνας
2. τον κριό σύζευξης
3. τον τύπο της οχείας (ατομική ή κατά ομάδες)
4. την ημερομηνία του τοκετού που προέκυψε από τη γόνιμη οχεία
5. το δείκτη πολυδυμίας
6. τον αριθμό του τοκετού

Από τα στοιχεία αυτά υπολογίστηκαν η ηλικία του ζώου στον πρώτο τοκετό και το εάν η πρώτη οχεία ήταν γόνιμη ή όχι. Αυτό το τελευταίο χαρακτηριστικό ορίστηκε ως ο ρυθμός σύλληψης στην πρώτη οχεία.



Τα χαρακτηριστικά του κάθε ζώου με ζωοτεχνικό ενδιαφέρον που προέκυψαν από τα παραπάνω στοιχεία και αποτέλεσαν στόχο μελέτης στην παρούσα διατριβή ήταν τα εξής:

A) Γαλακτοπαραγωγή:

1. η ημερήσια γαλακτοπαραγωγή του μηνιαίου ελέγχου για την κάθε προβατίνα
2. η συνολική γαλακτοπαραγωγή της γαλακτικής περιόδου για την κάθε προβατίνα

B) Αναπαραγωγή:

1. ο δείκτης πολυδυμίας του ζώου
2. ο ρυθμός σύλληψης με την πρώτη οχεία
3. η ηλικία του ζώου κατά τον πρώτο τοκετό

Τα παραπάνω στοιχεία αφορούσαν στα έτη 2006-2009. Τα εν λόγω ζωοτεχνικά χαρακτηριστικά, αποτελούν τους καθοριστικούς παράγοντες για την κερδοφορία και την επιβίωση των προβατοτροφικών μονάδων.

Για τον ποιοτικό έλεγχο των στοιχείων ορίστηκαν συγκεκριμένες τιμές αποδεκτών ορίων για το κάθε χαρακτηριστικό (Πίνακας 13). Στη συνέχεια, όλα τα αρχεία της βάσης δεδομένων ελέγχθηκαν για το αν οι τιμές των χαρακτηριστικών βρίσκονταν εντός των ορίων αυτών. Αρχεία αποδόσεων που δεν πληρούσαν τις παραπάνω προϋποθέσεις απομακρύνθηκαν από τη μελέτη.

**Πίνακας 13.** Αποδεκτά όρια μετρήσεων που αφορούσαν στην ημερήσια γαλακτοπαραγωγή του μηνιαίου ελέγχου και στη συνολική γαλακτοπαραγωγή της γαλακτικής περιόδου, στη διάρκεια της γαλακτικής περιόδου και στην ηλικία κατά τον 1<sup>ο</sup>, 2<sup>ο</sup> και 3<sup>ο</sup> ή περαιτέρω τοκετό, όπως αυτά προσδιορίστηκαν στα πλαίσια της παρούσας μελέτης.

<b>Χαρακτηριστικό</b>	<b>Αποδεκτά Όρια</b>
Ημερήσια Γαλακτοπαραγωγή μηνιαίου ελέγχου	0,15– 5 χλγ
Συνολική Γαλακτοπαραγωγή γαλακτικής περιόδου	20 – 750 χλγ
Διάρκεια Γαλακτικής Περιόδου	60 – 270 ημέρες
Ηλικία στον 1 <sup>ο</sup> Τοκετό	Ελάχιστο 13 μήνες
Ηλικία στον 2 <sup>ο</sup> Τοκετό	Ελάχιστο 20 μήνες
Ηλικία στον 3 <sup>ο</sup> ή περαιτέρω Τοκετό	Ελάχιστο 27 μήνες

### **3.3. Προκαταρκτική επεξεργασία**

Από την επίσημη βάση δεδομένων του Συνεταιρισμού «Μακεδονία» προσδιορίστηκαν οι παράγοντες ποίμνιο, έτος και μήνας οχείας, ηλικία κατά την οχεία, έτος και μήνας τοκετού, ηλικία κατά τον τοκετό, έτος και μήνας του κάθε μηνιαίου ελέγχου της γαλακτοπαραγωγής, και αριθμός και στάδιο της γαλακτικής περιόδου ως πιθανοί παράγοντες συστηματικής επίδρασης στα χαρακτηριστικά που μελετήθηκαν. Στη συνέχεια, με τη βοήθεια του στατιστικού προγράμματος SPSS και με τη χρήση προτύπων σταθερών παραγόντων, διερευνήθηκε ποιοι από τους παραπάνω παράγοντες και ποιες αλληλεπιδράσεις μεταξύ αυτών των παραγόντων είχαν στατιστικά σημαντική επίδραση ( $P < 0,05$ ) στα χαρακτηριστικά της γαλακτοπαραγωγικής και της αναπαραγωγικής ικανότητας. Επιπλέον, με τη βοήθεια του SPSS περιγράφηκαν στατιστικά τα χαρακτηριστικά που μελετήθηκαν.

### **3.4. Επίδραση του γονιδίου *PRNP* σε χαρακτηριστικά της γαλακτοπαραγωγικής και αναπαραγωγικής ικανότητας**

Η επίδραση του γονιδίου *PRNP* στη γαλακτοπαραγωγική και στην αναπαραγωγική ικανότητα των προβάτων φυλής Χίου εκτιμήθηκε με τη βοήθεια μικτών γραμμικών προτύπων. Στα πρότυπα αυτά συμπεριλήφθηκαν το γονίδιο *PRNP*, ο παράγοντας ατομικότητας του κάθε ζώου και οι παράγοντες που, σύμφωνα με τις προκαταρκτικές αναλύσεις, είχαν στατιστικά σημαντική επίδραση ( $P < 0,05$ ) στα

χαρακτηριστικά που μελετήθηκαν. Με τον τρόπο αυτό, εκτιμήθηκε η επίδραση του *PRNP* διορθωμένη ως προς όλους τους άλλους παράγοντες που επηρεάζουν, συστηματικά, τη γαλακτοπαραγωγική και την αναπαραγωγική ικανότητα.

Συγκεκριμένα, για τη μελέτη της επίδρασης του γονιδίου *PRNP* στην ημερήσια γαλακτοπαραγωγή του μηνιαίου ελέγχου χρησιμοποιήθηκε το πρότυπο (1):

$$Y_{ijklmnopq} = \mu + F_i + Y_j B_z + L_1 A + P + T_m C_n + L_1 D + L_1 D a_o + L_1 D p e_o + e_{ijklmnop} \quad (1)$$

όπου:

$Y_{ijklmnopq}$	=	η ημερήσια γαλακτοπαραγωγή του μηνιαίου ελέγχου της προβατίνας q,
$\mu$	=	μέσος όρος πληθυσμού,
$F_i$	=	σταθερή επίδραση του ποιμνίου (i= 1-23),
$Y_j B_z$	=	σταθερή επίδραση της αλληλεπίδρασης έτους (j=1-4) και μήνα ( z=1-5 για την περίοδο Νοέμβριος-Μάρτιος) που πραγματοποιήθηκε ο τοκετός,
$L_1 A$	=	σταθερή επίδραση της αλληλεπίδρασης του αριθμού τοκετού (1 = 1-3 για τον 1 <sup>ο</sup> , 2 <sup>ο</sup> και 3 <sup>ο</sup> ή περαιτέρω τοκετό) και της ηλικίας της προβατίνας κατά τον τοκετό (A μήνες),
$P$	=	σταθερή επίδραση του γονιδίου <i>PRNP</i> , όπως ορίζεται παρακάτω,
$T_m C_n$	=	σταθερή επίδραση της αλληλεπίδρασης τους έτους (m=1-4) και του μήνα (n=1-9 για την περίοδο του αρμέγματος) που πραγματοποιήθηκε ο μηνιαίος έλεγχος,
$L_1 D$	=	σταθερή επίδραση της αλληλεπίδρασης του αριθμού γαλακτικής περιόδου (l=1-3 για την 1 <sup>η</sup> , 2 <sup>η</sup> και 3 <sup>η</sup> ή περαιτέρω γαλακτική περίοδο) και του σταδίου της γαλακτικής περιόδου (D ημέρες από τον τοκετό),
$L_1 D a_o$	=	τυχαία επίδραση της αλληλεπίδρασης του αριθμού και του σταδίου της γαλακτικής περιόδου και της προβατίνας (o=1-13.473 συμπεριλαμβανομένων όλων των συγγενών των προβατινών),

$L_1Dpe_q =$  τυχαία επίδραση της αλληλεπίδρασης του αριθμού και του σταδίου της γαλακτικής περιόδου και του μόνιμου περιβάλλοντος σχετιζόμενου με την προβατίνα ( $q=1-1.013$ ),

$e_{ijklmnop} =$  τυχαία επίδραση του στατιστικού σφάλματος.

Η επίδραση του γονιδίου *PRNP* (P στο πρότυπο 1) στην ημερήσια γαλακτοπαραγωγή του μηνιαίου ελέγχου διερευνήθηκε με δύο τρόπους: (i) ως επίδραση του παράγοντα «γενότυπος» με 15 επίπεδα (όσα και οι γενότυποι που ανιχνεύτηκαν π.χ. ARQ/ARQ, VRQ/ARQ κλπ.) και (ii) ως επίδραση του αλληλομόρφου. Στη δεύτερη περίπτωση, ο παράγοντας ορίστηκε ως 0, 1 ή 2, ανάλογα με τον αριθμό των αντιγράφων του αλληλομόρφου που έφερε η κάθε προβατίνα στον γενότυπό της. Για παράδειγμα, για το αλληλομόρφο VRQ, ο παράγοντας P στο πρότυπο (1) έπαιρνε τιμές 0, 1 ή 2 όταν η προβατίνα δεν έφερε το VRQ (πχ. γενότυπος ARQ/ARQ), το έφερε σε ετεροζύγωτη μορφή (πχ. γενότυπος VRQ/ARQ) ή σε ομοζύγωτη μορφή (γενότυπος VRQ/VRQ), αντίστοιχα.

Στο πρότυπο (1) το στάδιο της γαλακτικής περιόδου (δηλαδή ο αριθμός ημερών από τον τοκετό) αποδόθηκε με ένα πολυώνυμο δευτέρου βαθμού, ώστε να περιγραφεί η καμπύλη της γαλακτοπαραγωγής. Η επιλογή του βαθμού πολυωνύμου που χρησιμοποιήθηκε στην ανάλυση για την περιγραφή του σταδίου της γαλακτικής περιόδου έγινε με τη χρήση της δοκιμής του λογαρίθμου της πιθανοφάνειας (log-likelihood). Δοκιμάστηκε χρήση διαφόρων βαθμών μέχρι να διαπιστωθεί ότι η περαιτέρω αύξηση του βαθμού πολυωνύμου δεν έχει στατιστικά σημαντική επίδραση στα αποτελέσματα.

Για τη μελέτη της επίδρασης του γονιδίου *PRNP* στη συνολική γαλακτοπαραγωγή χρησιμοποιήθηκε το πρότυπο (2):

$$Y_{ijklmnq} = \mu + F_i + Y_j B_z + L_l A + P + pe_q + a_o + C + H_n + e_{ijlnoqz} \quad (2)$$

όπου:

$Y_{ijklmnq} =$  συνολική γαλακτοπαραγωγή της γαλακτικής περιόδου της προβατίνας q,

$H_n =$  σταθερή επίδραση του δείκτη πολυδυμίας ( $n= 1-6$ , για τη γέννηση ενός έως έξι αρνιών, αντίστοιχα),  
 $C =$  σταθερή επίδραση της διάρκειας της γαλακτικής περιόδου ( $C$  ημέρες),  
 $\mu, F_i, Y_j B_z, L_1 A, P, pe_q, a_o, e =$  όπως στο πρότυπο (1).

Για τη μελέτη της επίδρασης του γονιδίου *PRNP* στην ηλικία κατά τον πρώτο τοκετό χρησιμοποιήθηκε το πρότυπο (3):

$$Y_{ijklmq} = \mu + F_i + Y_j B_z + P + a_o + e_{ijoz} \quad (3)$$

όπου:

$Y_{ijklmq} =$  η ηλικία της προβατίνας  $q$  κατά τον πρώτο τοκετό (μήνες),  
 $\mu, F_i, Y_j B_z, P, a_o, e =$  όπως στο πρότυπο (1).

Για τη μελέτη της επίδρασης του γονιδίου *PRNP* στον ρυθμό σύλληψης με την πρώτη οχεία χρησιμοποιήθηκε το πρότυπο (4):

$$Y_{ijklmnoq} = \mu + F_i + P + Y_j M_k + pe_q + Q_n + a_o + s_o + V_1 A + e_{ijklnoq} \quad (4)$$

όπου:

$Y_{ijklmnoqrst} =$  ρυθμός σύλληψης με την πρώτη οχεία (0/1) της προβατίνας  $q$ ,  
 $Y_j M_k =$  σταθερή επίδραση της αλληλεπίδρασης του έτους ( $j=1-4$ ) και του μήνα ( $k=1-5$ , για την περίοδο Μάιο-Σεπτέμβριο) που πραγματοποιήθηκε η σύζευξη,  
 $s_o =$  τυχαία επίδραση του κριού με τον οποίο έγινε η σύζευξη,  
 $Q_n =$  σταθερή επίδραση του τύπου της σύζευξης (ατομική ή κατά ομάδες),  
 $K_o A =$  σταθερή επίδραση της αλληλεπίδρασης του αριθμού γαλακτικής περιόδου και της ηλικίας της προβατίνας κατά τη σύζευξη (σε μήνες),

$V_l A =$  σταθερή επίδραση της αλληλεπίδρασης της περιόδου της σύζευξης ( $l=1$  για την περίοδο σύζευξης πριν τον πρώτο τοκετό,  $l=2-3$ , για προβατίνες στην πρώτη και δεύτερη ή περαιτέρω γαλακτική περίοδο) με την ηλικία της προβατίνας κατά τη σύζευξη (σε μήνες),  
 $\mu, F_i, P, a_o, re_q, e =$  όπως στο πρότυπο (1).

Το χαρακτηριστικό ρυθμός σύλληψης με την πρώτη οχεία είναι δυαδικής φύσης (0 αν η οχεία δεν ήταν γόνιμη και 1 αν ήταν). Για το λόγο αυτό, η πιο πάνω ανάλυση πραγματοποιήθηκε τόσο με ένα γραμμικό πρότυπο (όπως και οι προηγούμενες), όσο και με ένα μη γραμμικό στατιστικό πρότυπο βασισμένο στη συνάρτηση logit (Gilmour και συν., 2002), που περιελάμβανε ακριβώς τους ίδιους παράγοντες με το πρότυπο (4).

Για τη μελέτη της επίδρασης του γονιδίου *PRNP* στο δείκτη πολυδυμίας χρησιμοποιήθηκε το πρότυπο (5):

$$Y_{ijklmq} = \mu + F_i + Y_j B_z + L_l A + P + re_q + a_o + e_{ijloqz} \quad (5)$$

όπου:

$Y_{ijklm} =$  ο δείκτης πολυδυμίας της προβατίνας  $q$ ,  
 $\mu, F_i, Y_j B_z, L_l A, P, re_q, a_o, e,$  όπως στο πρότυπο (1)

Η στατιστική επεξεργασία για τα χαρακτηριστικά της ημερήσιας γαλακτοπαραγωγής του μηνιαίου ελέγχου, της συνολικής γαλακτοπαραγωγής της γαλακτικής περιόδου, του δείκτη πολυδυμίας και του ρυθμού σύλληψης με την πρώτη οχεία επαναλήφθηκε χρησιμοποιώντας μόνο τα στοιχεία που αφορούσαν την πρώτη γαλακτική περίοδο.

Στις αναλύσεις που έγιναν σύμφωνα με τα παραπάνω πρότυπα για τα αλληλόμορφα του *PRNP*, η μηδενική υπόθεση ( $H_0$ ) ήταν ότι το κάθε ένα αλληλόμορφο δεν είχε επίδραση στο χαρακτηριστικό που μελετήθηκε. Με τον τρόπο αυτό προέκυψαν πολλαπλές υποθέσεις, για τις οποίες εφαρμόστηκε διόρθωση των αποτελεσμάτων με τη μέθοδο Bonferroni (Holm, 1979). Με τη μέθοδο αυτή, το όριο στατιστικής σημαντικότητας προσδιορίζεται εκ νέου, για κάθε μία υπόθεση, σε ένα χαμηλότερο επίπεδο. Με αυτό τον τρόπο διασφαλίζεται η ορθότητα των

συμπερασμάτων, καθώς αποφεύγεται η επίτευξη ενός τυχαία στατιστικά σημαντικού αποτελέσματος. Συγκεκριμένα, το νέο όριο στατιστικής σημαντικότητας προσδιορίστηκε από το πηλίκο του επιλεγμένου ορίου στατιστικής σημαντικότητας (P) προς τον αριθμό των ανεξάρτητων δοκιμών που πραγματοποιήθηκαν ( $\kappa$ ). Όταν μία από τις δοκιμές αυτές εμφάνιζε στατιστικά σημαντική επίδραση, το όριο στατιστικής σημαντικότητας για τις υπόλοιπες δοκιμές προσδιοριζόταν εκ νέου από το λόγο (P) προς ( $\kappa-1$ ), και ούτω κάθ' εξής. Στην παρούσα μελέτη, το όριο στατιστικής σημαντικότητας ορίστηκε αρχικά ως  $P=0,05$  και έγινε μία δοκιμή για κάθε αλληλόμορφο, συνολικά δηλαδή 6 ανεξάρτητες δοκιμές. Άρα το νέο όριο τέθηκε αρχικά στο  $P=0,008$  και αντίστοιχα διαμορφωνόταν για κάθε δοκιμή που εμφάνιζε στατιστική σημαντικότητα.

Σε όλες τις περιπτώσεις, η στατιστική επεξεργασία έγινε με τη χρήση του λογισμικού ASREML (Gilmour και συν., 2002).

## ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

### 4. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΓΕΝΟΤΥΠΩΝ ΜΕ ΒΑΣΗ ΤΟ ΓΑΛΑ ΣΕ ΑΤΟΜΙΚΟ ΕΠΙΠΕΔΟ

#### 4.1. Σύγκριση μεθόδων απομόνωσης DNA απο τα σωματικά κύτταρα του γάλατος

Η ανωτερότητα του τροποποιημένου Nucleospin Blood, σε σχέση με το συμβατικό Nucleospin Blood<sup>®</sup>, επιβεβαιώθηκε και με τα τρία κριτήρια (φασματοφωτομετρικές μετρήσεις, ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης, real-time PCR), που χρησιμοποιήθηκαν για τη σύγκριση των δύο πρωτοκόλλων. Τα αποτελέσματα της σύγκρισης των δύο πρωτοκόλλων παρουσιάζονται αναλυτικότερα αμέσως πιο κάτω.

##### 4.1.1. Μετρήσεις με φασματοφωτόμετρο

Η καθαρότητα του απομονωμένου DNA αξιολογήθηκε με φασματοφωτομετρικές μετρήσεις. Ο μέσος όρος των μετρήσεων του πηλίκου OD260/OD280 και του πηλίκου OD260/OD230 για το Nucleospin Blood<sup>®</sup> και για το τροποποιημένο Nucleospin Blood, καθώς και τα αποτελέσματα της μεταξύ τους σύγκρισης παρουσιάζονται στον Πίνακα 14.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα αυτά, το DNA που απομονώθηκε με το τροποποιημένο Nucleospin Blood εμφάνισε υψηλότερες τιμές, κατά μέσο όρο, τόσο για το πηλίκο OD260/OD280 όσο και για το πηλίκο OD260/OD230, σε σχέση με το Nucleospin Blood<sup>®</sup>. Για να θεωρηθεί ένα DNA πολύ καθαρό, πρέπει το πηλίκο 260/280 να έχει τιμή τουλάχιστον 1,8 και το πηλίκο 260/230 τιμή τουλάχιστον 2,0 (Fahle και συν., 2000, Riemann και συν., 2007). Τα κριτήρια αυτά μόνο το τροποποιημένο Nucleospin Blood εξασφάλισε (OD260/280=1,8 και OD260/230=2,1). Ωστόσο, η στατιστική επεξεργασία έδειξε ότι οι διαφορές μεταξύ των δύο πρωτοκόλλων ως προς τα δύο αυτά κριτήρια δεν ήταν στατιστικά σημαντικές ( $P > 0,05$ ).



**Πίνακας 14.** Αποτελέσματα σύγκρισης (μέσοι όροι και τυπικό σφάλμα) των δύο πρωτοκόλλων απομόνωσης DNA, Nucleospin Blood<sup>®</sup> και τροποποιημένο Nucleospin Blood. Η σύγκριση έγινε με μετρήσεις σε φασματοφωτόμετρο (OD260/OD280 και OD260/OD230), με ηλεκτροφόρηση σε πηκτική αγαρόζη και με real-time PCR.

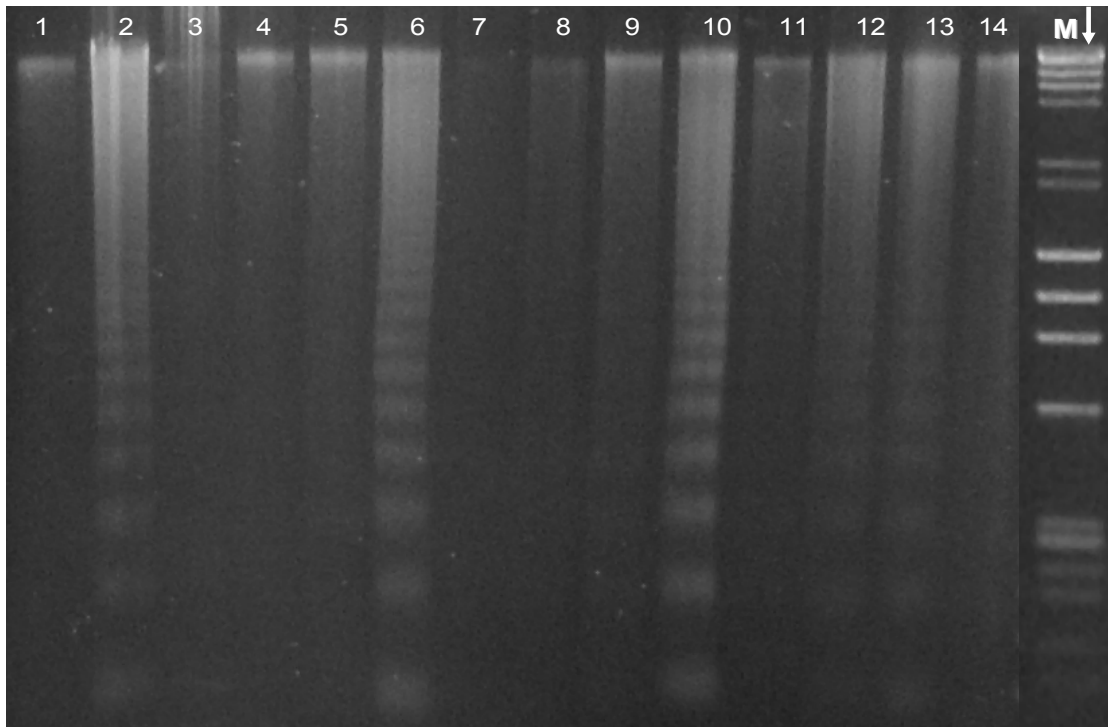
<b>Μέθοδοι Απομόνωσης</b>	<b>OD 260/280<sup>1</sup></b>	<b>OD 260/ 230<sup>1</sup></b>	<b>Ηλεκτροφόρηση (%)<sup>1</sup></b>	<b>Τιμή-Ct<sup>2</sup></b>
<b>Nucleospin Blood<sup>®</sup></b>	1,73 (0,03) <sup>a</sup>	1,67 (0,14) <sup>a</sup>	45,0 (10,1) <sup>β</sup>	24,3(0,40) <sup>a</sup>
<b>Τροποποιημένο Nucleospin Blood</b>	1,80 (0,03) <sup>a</sup>	2,10 (0,14) <sup>a</sup>	89,1 (10,0) <sup>a</sup>	22,8 (0,46) <sup>a</sup>

Με τον ίδιο εκθέτη (<sup>a</sup>) εμφανίζονται οι μετρήσεις που κατά τη μεταξύ τους σύγκριση η διαφορά τους δεν είναι στατιστικά σημαντική ( $P > 0,05$ ). Με διαφορετικό εκθέτη (<sup>a</sup> ή <sup>β</sup>) παρουσιάζονται οι μετρήσεις που η διαφορά τους είναι στατιστικά σημαντική ( $P \leq 0,05$ ). Με τον εκθέτη (<sup>1</sup>) εμφανίζονται τα κριτήρια για τα οποία οι επιθυμητές τιμές είναι οι υψηλές, ενώ με τον εκθέτη (<sup>2</sup>) τα κριτήρια για τα οποία οι επιθυμητές τιμές είναι οι χαμηλές.

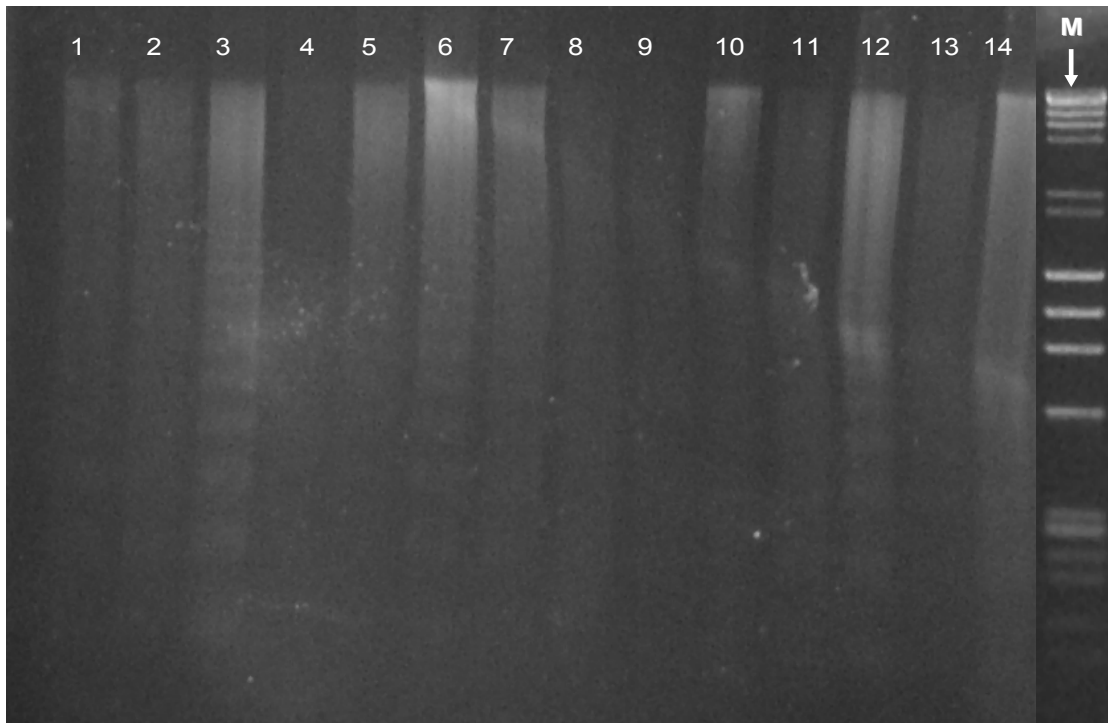
#### 4.1.2 Ηλεκτροφορητική ανάλυση DNA σε πηκτική αγαρόζη

Η ποσότητα και η ακεραιότητα του DNA, που απομονώθηκε με το τροποποιημένο Nucleospin Blood και το Nucleospin Blood<sup>®</sup>, αξιολογήθηκαν με ηλεκτροφορητική ανάλυση σε πηκτική αγαρόζη (Εικόνες 5 και 6).

Ο μέσος όρος και το τυπικό σφάλμα των μετρήσεων, που πραγματοποιήθηκαν με το λογισμικό Gel Pro Analyser<sup>™</sup>, καθώς και το αποτέλεσμα της μεταξύ τους σύγκρισης παρουσιάζονται στον Πίνακα 14. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα αυτά, με το τροποποιημένο Nucleospin Blood απομονώθηκε μεγαλύτερη ποσότητα (σχεδόν διπλάσια) ακέραιου DNA σε σχέση με το Nucleospin Blood<sup>®</sup>. Η στατιστική ανάλυση έδειξε ότι η διαφορά μεταξύ των δύο πρωτοκόλλων για το κριτήριο αυτό ήταν στατιστικά σημαντική ( $P = 0,046$ ).



**Εικόνα 5.** Ηλεκτροφόρηση DNA που απομονώθηκε με το τροποποιημένο Nucleospin Blood από 14 ατομικά δείγματα γάλατος. Ο δείκτης μοριακού βάρους ήταν 1 kb DNA Ladder, New England Biolabs Inc., MA, USA.

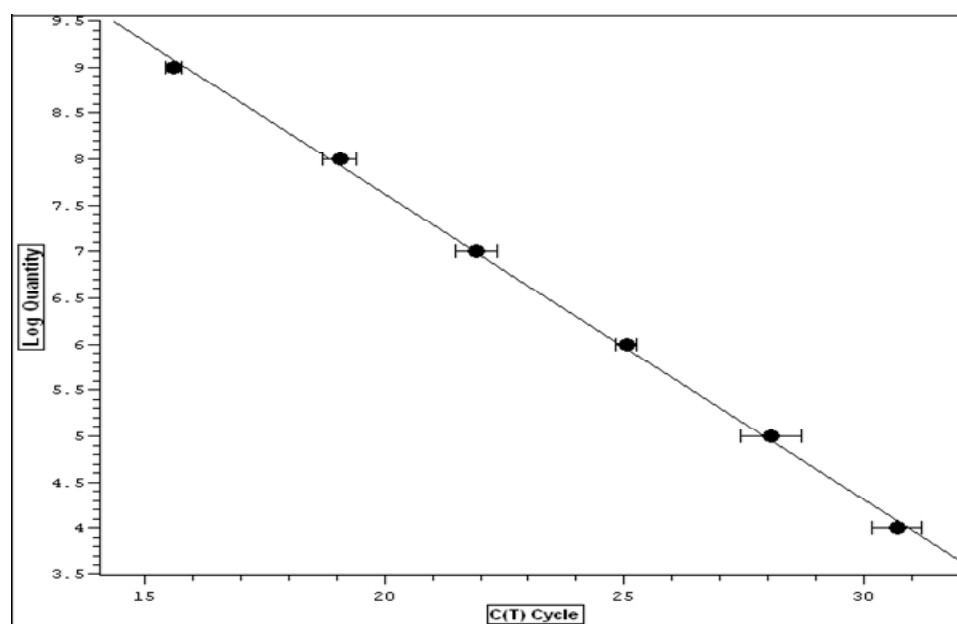


**Εικόνα 6.** Ηλεκτροφόρηση DNA που απομονώθηκε με το Nucleospin Blood<sup>®</sup> από 14 ατομικά δείγματα γάλατος. Ο δείκτης μοριακού βάρους ήταν 1 kb DNA Ladder, New England Biolabs Inc., MA, USA.

#### 4.1.3. Αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο (Real-time PCR)

Η καταλληλότητα του DNA που απομονώθηκε από τα σωματικά κύτταρα του γάλατος, για μοριακές αναλύσεις, διερευνήθηκε μέσω της δοκιμής real-time PCR. Από την καμπύλη ποσοτικού προσδιορισμού που κατασκευάστηκε υπολογίστηκε ότι η απόδοση της δοκιμής αυτής ήταν 108% (Σχήμα 2). Απόδοση της δοκιμής 100% συνεπάγεται διπλασιασμό της ποσότητας του DNA κάθε δείγματος σε κάθε κύκλο real-time PCR.

Ο μέσος όρος και το τυπικό σφάλμα των τιμών  $C_t$  που μετρήθηκαν για κάθε πρωτόκολλο απομόνωσης, καθώς και το αποτέλεσμα της μεταξύ τους σύγκρισης παρουσιάζονται στον Πίνακα 14. Μικρότερες τιμές  $C_t$  συσχετίζονται με μεγαλύτερη ποσότητα DNA ικανού για μοριακές αναλύσεις ενώ αυξημένες τιμές  $C_t$  συνεπάγονται είτε χαμηλή ποσότητα αρχικού εκμαγείου (DNA), είτε ύπαρξη αναστολέων, που είναι, φυσικά, ανεπιθύμητη. Ωστόσο, η στατιστική επεξεργασία έδειξε ότι η εν λόγω διαφορά μεταξύ των δύο πρωτοκόλλων δεν ήταν στατιστικά σημαντική ( $P > 0,05$ ).



**Σχήμα 2.** Καμπύλη ποσοτικού προσδιορισμού του DNA. Για τη δημιουργία της καμπύλης αυτής χρησιμοποιήθηκαν υποδεκαπλάσιες διαδοχικές αραιώσεις του DNA μάρτυρα (από  $2 \times 10^8$  έως 2.000 αντίγραφα DNA ανά αντίδραση). Στον άξονα X τοποθετήθηκαν οι τιμές  $C_t$  ενώ στον άξονα Y τα αντίγραφα του DNA. Η εξίσωση της αντίδρασης είναι  $y = - 3,14x + 43,63$ , ο συντελεστής συσχέτισης =  $- 0,999$  και η απόδοση = 108%.

## **4.2. Αποτελέσματα ανάλυσης RFLP**

Το μέγεθος των προϊόντων που προέκυπταν μετά από την πέψη με τις ενδονουκλεάσες περιορισμού BspHI, BspDI, RsaI και MnlI των υπό εξέταση προϊόντων της PCR, A και B, περιγράφεται αναλυτικά στο Παράρτημα II. Επιπλέον, η ηλεκτροφορητική εικόνα των διαφόρων γενοτύπων του γονιδίου *PRNP* όπως προσδιορίστηκε με το πρωτόκολλο ανάλυσης RFLP που εφαρμόστηκε στην παρούσα μελέτη παρουσιάζεται στις φωτογραφίες Π2, Π3, Π4 και Π5 του Παραρτήματος II.

## **4.3. Γενοτυπική εικόνα των προβάτων της φυλής Χίου**

### **4.3.1. Συχνότητα γενοτύπων, αλληλομόρφων και πολυμορφισμών του γονιδίου *PRNP* στα πρόβατα φυλής Χίου**

Τα αποτελέσματα του γενοτυπικού προσδιορισμού ως προς το γονίδιο *PRNP*, που πραγματοποιήθηκε σε 1.013 προβατίνες φυλής Χίου, παρουσιάζονται στον Πίνακα 15. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα αυτά, ταυτοποιήθηκαν 15 γενότυποι του γονιδίου *PRNP*. Ο συχνότερος γενότυπος ήταν ο ARQ/ARQ, με συχνότητα εμφάνισης 55,97%. Ο δεύτερος σε συχνότητα εμφάνισης γενότυπος ήταν ο ARQ/AHQ με συχνότητα 15%. Ακολουθούσαν οι ARQ/TRQ και ARQ/ARR με συχνότητες 11,94% και 11,35% αντίστοιχα. Οι υπόλοιποι γενότυποι ταυτοποιήθηκαν σε χαμηλότερες συχνότητες (Πίνακας 15). Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι ο πολύ ανθεκτικός γενότυπος για την κλασική μορφή της τρομάδους νόσου ARR/ARR ανιχνεύτηκε μόλις σε ποσοστό 0,39%. Σε πολύ χαμηλές (0,8%) συχνότητες ανιχνεύτηκαν, επίσης, οι ανεπιθύμητοι γενότυποι ARQ/VRQ, AHQ/VRQ και TRQ/VRQ (Πίνακας 15).

Στο κωδικόνιο 141 ανιχνεύτηκε μόνο το ανθεκτικό, για την άτυπη μορφή της νόσου, αλληλόμορφο που σχετίζεται με το αμινοξύ λευκίνη (L<sub>141</sub>), σε όλα τα ζώα που διερευνήθηκαν ως προς τη θέση αυτή (Πίνακας 16).

Οι συχνότητες των αλληλομόρφων του γονιδίου *PRNP*, που προέκυψαν από τις πιο πάνω γενοτυπικές συχνότητες του πληθυσμού των προβάτων φυλής Χίου, παρουσιάζονται στον Πίνακα 17, ενώ οι πολυμορφισμοί που ταυτοποιήθηκαν ανά κωδικόνιο παρουσιάζονται στον Πίνακα 18.

**Πίνακας 15.** Γενοτυπική εικόνα του μελετηθέντος πληθυσμού προβάτων φυλής Χίου.

Γενότυπος του γονιδίου <i>PRNP</i>	Αριθμός ζώων	Συχνότητα %
ARQ / ARQ	567	55,97
ARQ / AHQ	152	15,00
ARQ / TRQ	121	11,94
ARQ / ARR	115	11,35
ARQ / ARH	14	1,38
TRQ / ARR	11	1,09
TRQ / TRQ	9	0,88
AHQ / ARR	5	0,50
ARQ / VRQ	5	0,50
AHQ / TRQ	5	0,50
ARR / ARR	4	0,39
AHQ / VRQ	2	0,20
AHQ / AHQ	1	0,10
TRQ / VRQ	1	0,10
AHQ / ARH	1	0,10
Σύνολο	1013	100,00

**Πίνακας 16.** Πολυμορφισμοί που ανευρέθηκαν στο κωδικόνιο 141 του γονιδίου *PRNP*.

Πολυμορφισμοί	Αριθμός ζώων	Συχνότητα %
L <sub>141</sub>	305	100,00
F <sub>141</sub>	0	0,00
Σύνολο	305	100,00

**Πίνακας 17.** Συχνότητες αλληλομόρφων του γονιδίου *PRNP* που ανιχνεύτηκαν στο μελετηθέντα πληθυσμό προβάτων φυλής Χίου.

Αλληλόμορφα	Συχνότητα (%)
ARQ	76,10
AHQ	8,20
TRQ	7,70
ARR	6,90
ARH	0,70
VRQ	0,40
Σύνολο	100,00

**Πίνακας 18.** Συχνότητα πολυμορφισμών του γονιδίου *PRNP* ανά κωδικόνιο (136, 154 και 171) στο μελετηθέντα πληθυσμό προβάτων φυλής Χίου.

Πολυμορφισμοί ανά κωδικόνιο	Συχνότητες (%)
A <sub>136</sub>	91,9
T <sub>136</sub>	7,7
V <sub>136</sub>	0,4
R <sub>154</sub>	91,8
H <sub>154</sub>	8,2
Q <sub>171</sub>	92,4
R <sub>171</sub>	6,9
H <sub>171</sub>	0,7
Σύνολο	100,0

Στο κωδικόνιο 136, η εμφάνιση πολυμορφισμού ήταν μικρή. Ταυτοποιήθηκαν στη θέση αυτή τρία αλληλόμορφα, η αλανίνη (A<sub>136</sub>), η θρεονίνη (T<sub>136</sub>) και η βαλίνη (V<sub>136</sub>). Το αλληλόμορφο A<sub>136</sub> ήταν το συχνότερο αλληλόμορφο στη θέση αυτή του γονιδίου *PRNP*. Το 84,8% των προβάτων που μελετήθηκαν ήταν ομοζύγωτα ως προς το αλληλόμορφο αυτό, ενώ το 7,1% ετεροζύγωτα. Το δεύτερο σε συχνότητα αλληλόμορφο στη θέση αυτή ήταν η θρεονίνη (T<sub>136</sub>). Η χρησιμοποίηση της ενδονουκλεάσης περιορισμού BspHI στα δείγματα που έφεραν τον πολυμορφισμό αυτό έδινε την ίδια εικόνα με εκείνη του αλληλομόρφου A<sub>136</sub>. Η εικόνα των δυο αλληλομόρφων διαφοροποιούνται μετά από πέψη με το RsaI. Η επιβεβαίωση της ύπαρξης του T<sub>136</sub> στα πρόβατα φυλής Χίου έγινε δειγματοληπτικά με την εφαρμογή του προσδιορισμού νουκλεοτιδικών αλληλουχιών. Ο πολυμορφισμός αυτός αφορούσε την αντικατάσταση της βάσης γουανίνης (G) στο νουκλεοτίδιο 407 από τη βάση αδενίνη (A) προκαλώντας αλλαγή του αμινοξέος από αλανίνη (GCC) σε θρεονίνη (ACC). Το αλληλόμορφο T<sub>136</sub> βρέθηκε σε ποσοστό μόλις 0,45% σε ομοζύγωτη μορφή, ενώ σε ποσοστό 7,25% σε ετεροζύγωτη. Το αλληλόμορφο V<sub>136</sub> ανιχνεύτηκε μόλις σε ποσοστό 0,4% και πάντα σε ετεροζύγωτη μορφή.

Όπως στο κωδικόνιο 136, έτσι και στο 154 η εμφάνιση πολυμορφισμού ήταν σχετικά μικρή. Στη θέση αυτή ταυτοποιήθηκαν δύο πολυμορφισμοί, η αργινίνη (R<sub>154</sub>) και η ιστιδίνη (H<sub>154</sub>). Ο πολυμορφισμός με τη μεγαλύτερη συχνότητα ήταν η

αργινίνη, η οποία ανιχνεύτηκε σε ομοζύγωτη μορφή σε ποσοστό 83,7%, ενώ σε ετεροζύγωτη μορφή σε ποσοστό 8,1%. Ο πολυμορφισμός H<sub>154</sub> βρέθηκε σε ποσοστό 8,2% και, σχεδόν αποκλειστικά, σε ετεροζύγωτη μορφή. Μόνο ένα στα 1.013 πρόβατα έφερε το αλληλόμορφο αυτό σε ομοζύγωτη μορφή.

Στο κωδικόνιο 171 εμφανίστηκαν, επίσης, σχετικά λίγοι πολυμορφισμοί. Στη θέση αυτή του γονιδίου ταυτοποιήθηκαν τρεις πολυμορφισμοί, η γλουταμίνη (Q<sub>171</sub>), η αργινίνη (R<sub>171</sub>) και η ιστιδίνη (H<sub>171</sub>), σε διαφορετικά ποσοστά. Το Q<sub>171</sub> ήταν το συχνότερο. Σε ομοζύγωτη μορφή βρέθηκε σε ποσοστό 85,2%, ενώ σε ετεροζύγωτη σε ποσοστό 7,2%. Το επιθυμητό, αναφορικά με την ανθεκτικότητα των προβάτων στην κλασική μορφή της τρομάδους νόσου, R<sub>171</sub> ήταν το δεύτερο σε συχνότητα αλληλόμορφο στη θέση αυτή. Ανιχνεύτηκε σε ετεροζύγωτη μορφή σε ποσοστό 6,5%, ενώ σε ομοζύγωτη μόλις σε ποσοστό 0,4%. Το H<sub>171</sub> ανιχνεύτηκε σε ποσοστό μόλις 0,7% και μόνο σε ετεροζύγωτη μορφή.

#### **4.3.2. Έλεγχος ισορροπίας Hardy-Weinberg**

Το  $\chi^2$  που υπολογίστηκε για τον πληθυσμό που μελετήθηκε ήταν 30,03. Η τιμή αυτή συγκρίθηκε με το θεωρητικό  $\chi^2$  που υπαγορεύουν οι 15 βαθμοί ελευθερίας [21(αριθμός πιθανών γενοτύπων)- 6(αριθμός αλληλομόρφων)=15] και η πιθανότητα τυχαίου σφάλματος 1%. Η θεωρητική αυτή τιμή ήταν 30,58 που είναι, έστω και οριακά, μεγαλύτερη από το υπολογισμένο  $\chi^2$  (30,03). Συνεπώς ο πληθυσμός προβάτων φυλής Χίου που μελετήθηκε βρίσκεται σε ισορροπία Hardy-Weinberg ως προς τον γονιδιακό τόπο *PRNP*.

#### **4.4. Δοκιμές επαλήθευσης των αποτελεσμάτων γενοτυπικού προσδιορισμού**

Τα αποτελέσματα προσδιορισμού των γενοτύπων των ζώων με βάση το γάλα επαληθεύτηκαν με τη βοήθεια συμβατικών και ευρέως αποδεκτών μεθόδων, όπως περιγράφεται παρακάτω.

##### **4.4.1. Επαλήθευση με τη μέθοδο προσδιορισμού της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας (DNA-sequencing)**

Τα αποτελέσματα του προσδιορισμού της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας του γονιδίου *PRNP* ταυτίστηκαν, και στα 22 δείγματα που αναλύθηκαν, με τα αποτελέσματα της ανάλυσης RFLP που είχε προηγηθεί (Σχήμα 3).

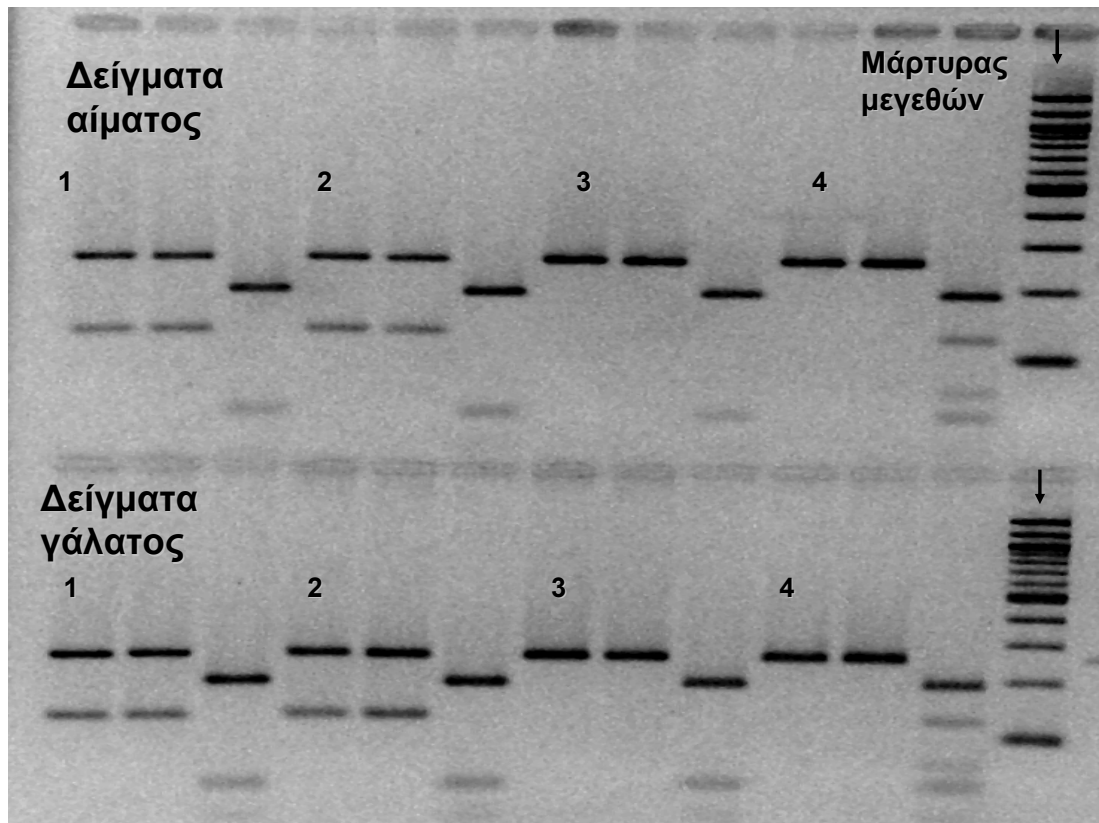
ATGGTGAAAAGCCACATAGGCAGTTGGATCCTGGTTCTCTTTGTGGCCATG  
TGGAGTGACGTGGGCCTCTGCAAGAAGCGACCAAACCTGGCGGAGGAT  
GGAACACTGGGGGGAGCCGATACCCGGGACAGGGCAGTCCTGGAGGCAA  
CCGCTATCCACCTCAGGGAGGGGGTGGCTGGGGTCAGCCCCATGGAGGTG  
GCTGGGGCCAACCTCATGGAGGTGGCTGGGGTCAGCCCCATGGTGGTGGC  
TGGGGACAGCCACATGGTGGTGGAGGCTGGGGTCAAGGTGGTAGCCACA  
GTCAGTGGAACAAGCCCAGTAAGCCAAAAACCAACAYGAAGCATGTGGC  
AGGAGCTGCTGCAGCTGGAGCAGTGGTAGGGGGCCTTGGTGGCTACATGC  
TGGGAAGTGYCATGAGCAGGCCTCTTATACATTTTGGCAATGACTATGAG  
GACCGTTACTATCGTGAAAACATGTACCGTTACCCCAACCAAGTGTACTA  
CAGACCAGTGGATCAGTATAGTAACCAGAACAACCTTTGTGCATGACTGTG  
TCAACATCACAGTCAAGCAACACACAGTCACCACCACCAAGGGGGA  
GAACTTCACCGAAACTGACATCAAGATAATGGAGCGAGTGGTGGAGCAA  
ATGTGCATCACCCAGTACCAGAGAGAATCCCAGGCTTATTACCAAAGGGG  
GGCAAGTGTGATCCTCTTTTCTTCCCCTCCTGTGATCCTCCTCATCTCTTC  
CTCATTTTTCTCATAGTAGGATAG-771

**Σχήμα 3.** Ενδεικτική εξακρίβωση αλληλουχίας τμήματος 771 νουκλεοτιδίων του γονιδίου *PRNP* προβατίνας με γενότυπο ARQ/VRQ. Το δείγμα αυτό εμφανίζει στο κωδικόνιο 136 (νουκλεοτίδιο 408), αντί για τη βάση C (κυτοσίνη), τον πολυμορφισμό Y (επισημαίνεται με έντονη και πλάγια γραμματοσειρά), που υποδηλώνει την παρουσία στη θέση αυτή τόσο της βάσης C όσο και της βάσης T (θυμίνη). Το αμινοξύ αλανίνη αντιστοιχεί στην τριπλέτα GCC, ενώ η βαλίνη στην GTC. Συνεπώς, το συγκεκριμένο δείγμα αντιστοιχεί σε ετεροζύγωτο (A/V) για τη θέση 136 ζώο.

#### 4.4.2 Επαλήθευση με τα δείγματα αίματος

Για τις 20 προβατίνες από τις οποίες συλλέχθηκαν αρχικά, τόσο δείγματα αίματος, όσο και ατομικά δείγματα γάλατος, τα αποτελέσματα του γενοτυπικού προσδιορισμού ως προς το γονίδιο *PRNP* και από τα δύο υλικά ήταν ταυτόσημα (Εικόνα 7).





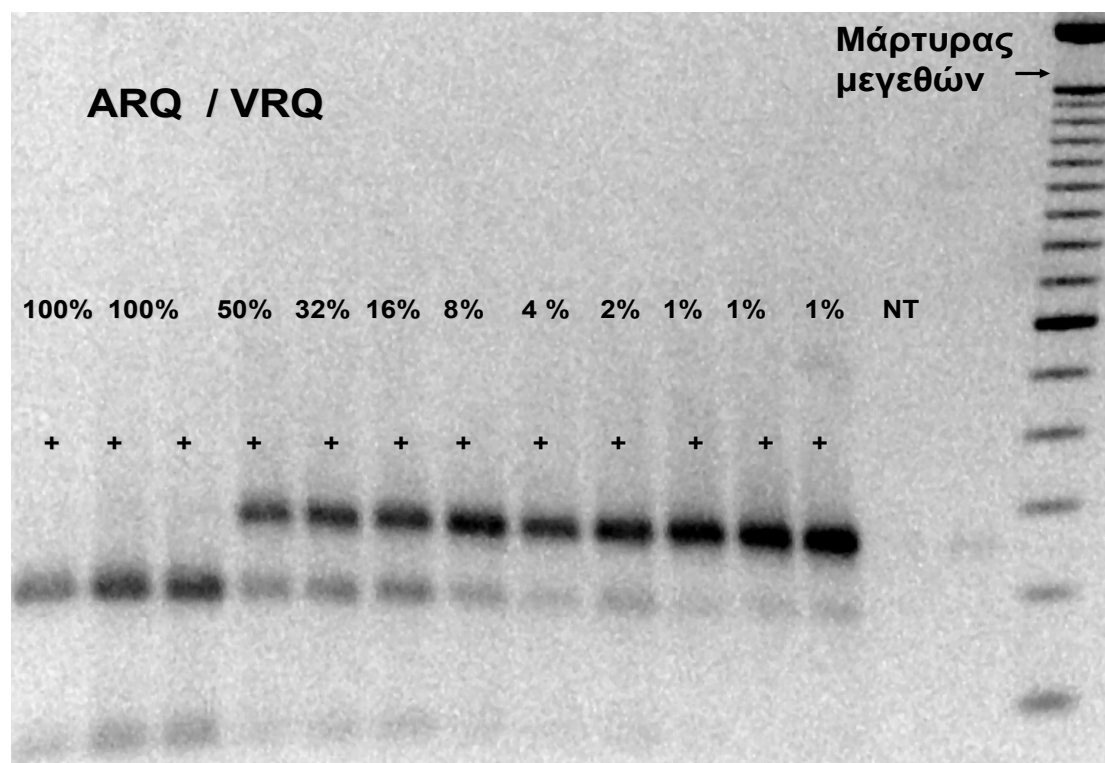
**Εικόνα 7.** Ηλεκτροφόρηση προϊόντων ανάλυσης RFLP, που προέκυψαν μετά από πέψη με τις ενδονουκλεάσες περιορισμού BspHI, BspDI και RsaI, τεσσάρων δειγμάτων αίματος (πάνω φρεάτια) και γάλατος (κάτω φρεάτια) τα οποία συλλέχθηκαν από τις ίδιες προβατίνες. Τα δείγματα 1 και 2 φέρουν το γενότυπο ARQ/VRQ, το δείγμα 3 το γενότυπο ARQ/ARQ και το δείγμα 4 το γενότυπο ARQ/TRQ. Ο δείκτης μοριακού βάρους είναι 100 bp DNA-ladder, New England Biolabs, Inc., MA, USA.

## 5. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΓΕΝΟΤΥΠΩΝ ΜΕ ΒΑΣΗ ΤΟ ΓΑΛΑ ΣΕ ΟΜΑΔΙΚΟ ΕΠΙΠΕΔΟ

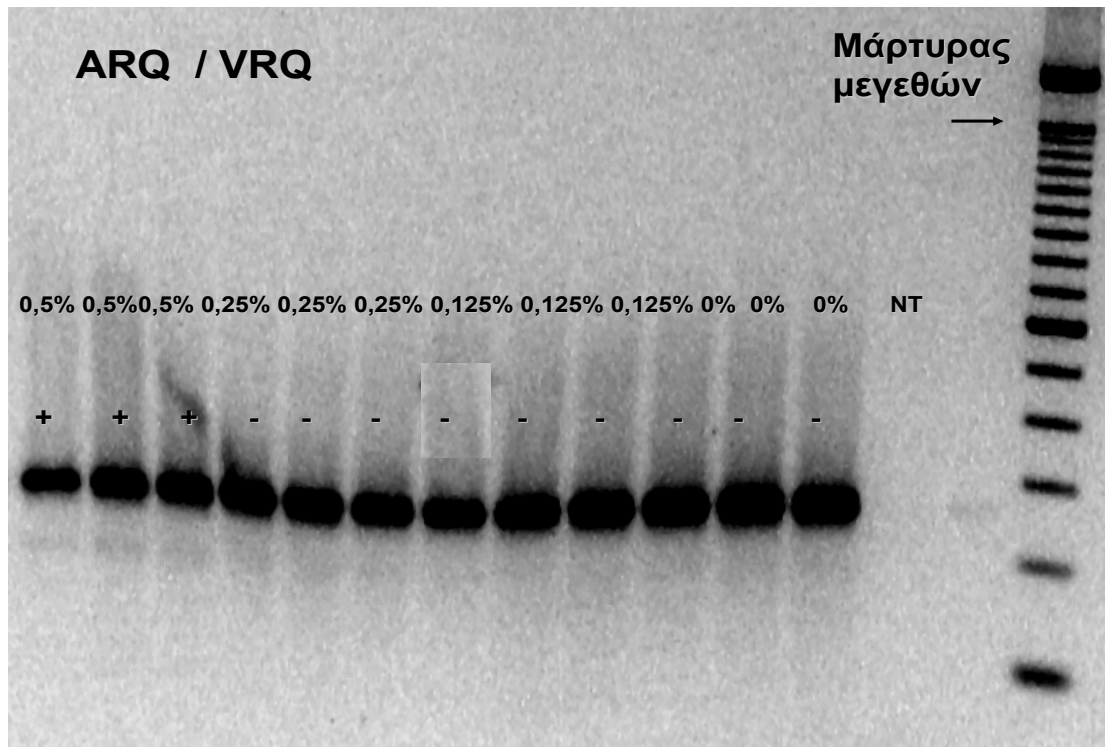
### 5.1. Πρότυπα που δημιουργήθηκαν με ανάμιξη πλασμιδιακού DNA

Η ανάλυση RFLP με την ενδονουκλεάση περιορισμού BspHI των προτύπων που δημιουργήθηκαν με ανάμιξη σε συγκεκριμένες αναλογίες ισομοριακών κλώνων των VRQ και ARQ αλληλομόρφων, ανέδειξε ως όριο ανίχνευσης για το VRQ τη συγκέντρωση 0,5%. Στις εικόνες 8 και 9 διακρίνονται τα τμήματα του DNA που προέκυψαν από την πέψη με το BspHI εξαιτίας της παρουσίας του VRQ, ως τη

συγκέντρωση 0,5%. Στις αναμίξεις που περιείχαν το VRQ σε χαμηλότερη συγκέντρωση, για παράδειγμα στο 0,25% (Εικόνα 9), τα τμήματα του DNA που προέκυψαν από την πέψη με το BspHI παρουσία βαλίνης στη θέση 136 δεν ήταν διακριτά σε όλες τις επαναλήψεις.



**Εικόνα 8.** Ανίχνευση VRQ αλληλομόρφου με ανάλυση RFLP (BspHI) σε πειραματικά δείγματα που δημιουργήθηκαν με ανάμιξη ισομοριακών κλώνων VRQ και ARQ αλληλομόρφων. Η συγκέντρωση του αλληλομόρφου VRQ στα πειραματικά δείγματα σημειώνεται πάνω από τα προϊόντα. Η παρουσία των τμημάτων DNA που προκύπτουν από την πέψη με το BspHI παρουσία του VRQ συμβολίζεται με ένα σταυρό. NT είναι τα δείγματα που δεν περιέχουν DNA. Ο δείκτης μοριακού βάρους είναι 100 bp DNA-ladder, New England Biolabs, Inc., MA, USA.



**Εικόνα 9.** Προσδιορισμός του ορίου ανίχνευσης του αλληλομόρφου VRQ με ανάλυση RFLP (BspHI). Η ελάχιστη συγκέντρωση στην οποία ανιχνεύτηκε το VRQ και στις τρεις επαναλήψεις ήταν το 0,5%. Ο δείκτης μοριακού βάρους είναι 100 bp DNA-ladder, New England Biolabs, Inc., MA, USA.

### **5.2. Πειραματικά δείγματα με ανάμιξη ισομοριακών απομονώσεων DNA**

Τα αποτελέσματα της ανάλυσης RFLP των πειραματικών δειγμάτων, που δημιουργήθηκαν με την ανάμιξη ισομοριακών απομονώσεων DNA προβατινών με προσδιορισμένο γενότυπο, παρουσιάζονται αναλυτικά στους Πίνακες 19, 20 και 21.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα αυτά, τα όρια ανίχνευσης δεν ήταν ίδια για όλα τα αλληλόμορφα. Το μέγεθος (ζεύγη βάσεων) των προϊόντων που προέκυπταν από την πέψη με τις ενδονουκλεάσες περιορισμού, επηρέαζε την ευαισθησία της ανάλυσης RFLP. Συγκεκριμένα, τα προϊόντα πέψης που είχαν μικρό μέγεθος, όπως στην περίπτωση του TRQ (Πίνακας 21), ήταν περισσότερο δυσδιάκριτα σε σύγκριση με τα προϊόντα που είχαν μεγάλο μέγεθος. Επιπλέον, όταν οι ζώνες κοπής ήταν κοντά η μία στην άλλη, όπως για παράδειγμα στη περίπτωση του ARR, η ταυτοποίηση των αλληλομόρφων ήταν δυσκολότερη.

**Πίνακας 19.** Όρια ανίχνευσης των αλληλομόρφων VRQ και AHQ, όπως προσδιορίστηκαν σε πειραματικά δείγματα που δημιουργήθηκαν στο εργαστήριο με ανάμιξη ισομοριακών απομονώσεων DNA είκοσι προβατινών με προσδιορισμένο ατομικό γενότυπο.

<b>Γενότυποι που αναμίχθηκαν</b>	<b>ARQ/ARQ</b>	<b>ARQ/ARQ</b>	<b>ARQ/VRQ</b>	<b>ARQ/AHQ</b>
<b>Αναλογίες αλληλομόρφων</b>	<b>ARQ – VRQ*</b>	<b>Ανίχνευση VRQ</b>	<b>ARQ-AHQ*</b>	<b>Ανίχνευση AHQ</b>
	99,75%-0,25%*	OXI	99,75%-0,25%*	OXI
	99,5%- <b><u>0,5%</u></b> *	<b><u>NAI</u></b>	99,5%- <b><u>0,5%</u></b> *	<b><u>NAI</u></b>
	99%-1%*	NAI	99%-1%*	NAI
	98%-2%*	NAI	98%-2%*	NAI
	96%-4%*	NAI	96%-4%*	NAI
	92%-8%*	NAI	92%-8%*	NAI
	84%-16%*	NAI	84%-16%*	NAI
	68%-32%*	NAI	68%-32%*	NAI

\*με αστερίσκο σημειώνεται η συγκέντρωση των αλληλομόρφων VRQ και AHQ σε κάθε πειραματικό δείγμα. Η μικρότερη συγκέντρωση του αλληλομόρφου που ανιχνεύτηκε σε τρεις διαφορετικές επαναλήψεις του ίδιου δείγματος και η οποία θεωρείται το όριο ανίχνευσής του επισημαίνεται με υπογράμμιση.

Τα όρια ανίχνευσης του αλληλομόρφου VRQ και του αλληλομόρφου AHQ (Εικόνες 10 και 11) ήταν 0,5%. Πρακτικά, αυτό σημαίνει ότι με την ανάλυση RFLP μπορεί να ανιχνευτεί η παρουσία του VRQ ή του AHQ στο γάλα της δεξαμενής ψύξης, όταν στις 200 αρμεγόμενες προβατίνες τουλάχιστον μία φέρει τα αλληλόμορφα αυτά σε ομοζύγωτη μορφή ή δύο τα φέρουν σε ετεροζύγωτη μορφή. Τα όρια ανίχνευσης του ARH και του ARR (Εικόνα 12) ήταν 4%. Για να ανιχνευτούν δηλαδή τα αλληλόμορφα ARR και ARH σε ένα ποίμνιο, χρειάζεται τουλάχιστον τέσσερα στα εκατό αρμεγόμενα ζώα να είναι φορείς τους σε ομοζύγωτη μορφή ή οχτώ να είναι φορείς τους σε ετεροζύγωτη μορφή. Για το αλληλόμορφο TRQ, το όριο ανίχνευσης ήταν 8%. Για να ανιχνευτεί λοιπόν το TRQ πρέπει να το φέρουν τουλάχιστον 8 στα 100 αρμεγόμενα ζώα σε ομοζύγωτη μορφή ή 16 σε ετεροζύγωτη.

**Πίνακας 20.** Όρια ανίχνευσης των αλληλομόρφων ARR και ARH σε πειραματικά δείγματα που δημιουργήθηκαν στο εργαστήριο με ανάμιξη ισομοριακών απομονώσεων DNA είκοσι προβατινών με προσδιορισμένο ατομικό γενότυπο.

Γενότυποι που αναμίχθηκαν		ARR/ARR	ARR/ARR	ARR/ARR
Αναλογία		ARR	ARR/ARR	ARR/ARR
αλληλομόρφων	ARR-ARR*	<b>ARR</b>	ARR-ARR*	<b>ARR</b>
	99,75%-0,25%*	OXI	99,75%-0,25%*	OXI
	99,5%- 0,5%*	OXI	99,5%- 0,5%*	OXI
	99%-1%*	OXI	99%-1%*	OXI
	98%-2%*	OXI	98%-2%*	OXI
	96%- <b>4%</b> *	<b><u>NAI</u></b>	96%- <b>4%</b> *	<b><u>NAI</u></b>
	92%-8%*	NAI	92%-8%*	NAI
	84%-16%*	NAI	84%-16%*	NAI
	68%-32%*	NAI	68%-32%*	NAI

\* με αστερίσκο σημειώνεται η συγκέντρωση των αλληλομόρφων ARR και ARH σε κάθε πειραματικό δείγμα. Η μικρότερη συγκέντρωση του αλληλομόρφου που ανιχνεύτηκε σε τρεις διαφορετικές επαναλήψεις του ίδιου δείγματος και η οποία θεωρείται το όριο ανίχνευσής του επισημαίνεται με υπογράμμιση.

Εξετάστηκε, επιπλέον, ένα πειραματικό δείγμα που περιείχε και τους τέσσερεις γενοτύπους που συνήθως εντοπίζονται σε ένα ποίμνιο (Πίνακας 22). Τα αλληλόμορφα ARR και ARH ανιχνεύτηκαν σε συγκεντρώσεις 5% και 4% αντίστοιχα, που είναι μεγαλύτερες από τα προσδιορισμένα όρια ανίχνευσης τους, αλλά μικρότερες από αυτές που κατά μέσο όρο ανιχνεύτηκαν στον πληθυσμό προβάτων φυλής Χίου. Το αλληλόμορφο TRQ δεν ανιχνεύτηκε στη συγκέντρωση 6%, που ήταν χαμηλότερη από το όριο ανίχνευσης του (8%) αλλά και από τη συχνότητα που κατά μέσο όρο εντοπίζεται στα πρόβατα φυλής Χίου (7,7%), με βάση τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης.

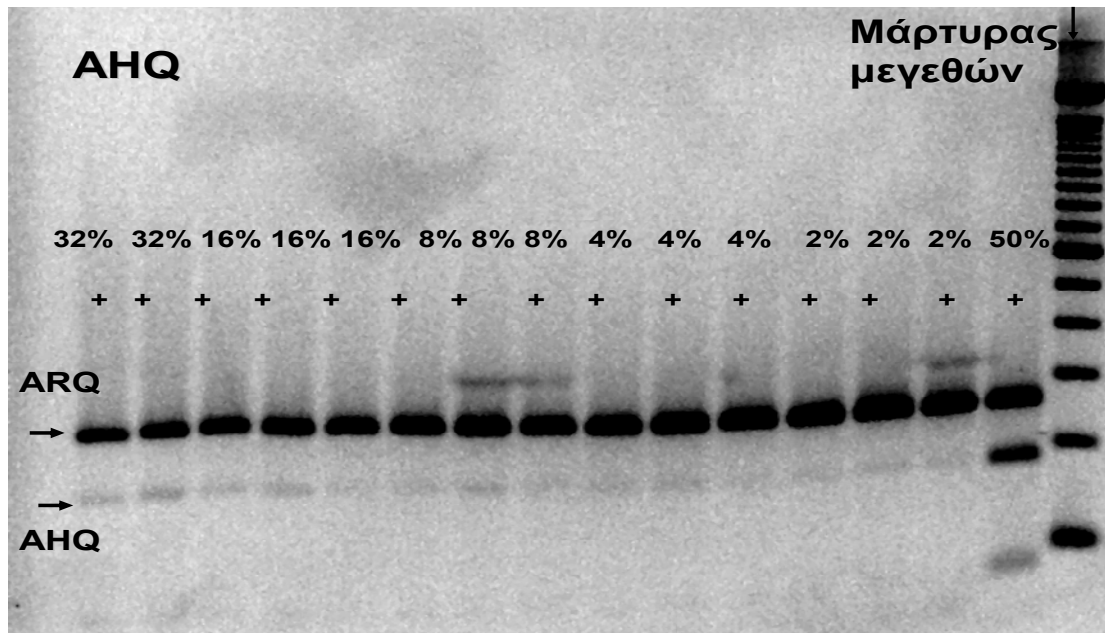
**Πίνακας 21.** Όρια ανίχνευσης του αλληλομόρφου TRQ σε πειραματικά δείγματα που δημιουργήθηκαν στο εργαστήριο με ανάμιξη ισομοριακών απομονώσεων DNA είκοσι προβατινών με προσδιορισμένο ατομικό γενότυπο.

Γενότυποι που αναμίχθηκαν	ARQ/ARQ ARQ/TRQ*	Ανίχνευση
<b>Αναλογίες αλληλομόρφων</b>	<b>ARQ-TRQ*</b>	<b>TRQ</b>
	99,75%-0,25%*	OXI
	99,5%- 0,5%*	OXI
	99%-1%*	OXI
	98%-2%*	OXI
	96%-4%*	OXI
	92%- <b>8%*</b>	<b>NAI</b>
	84%-16%*	NAI
	68%-32%*	NAI

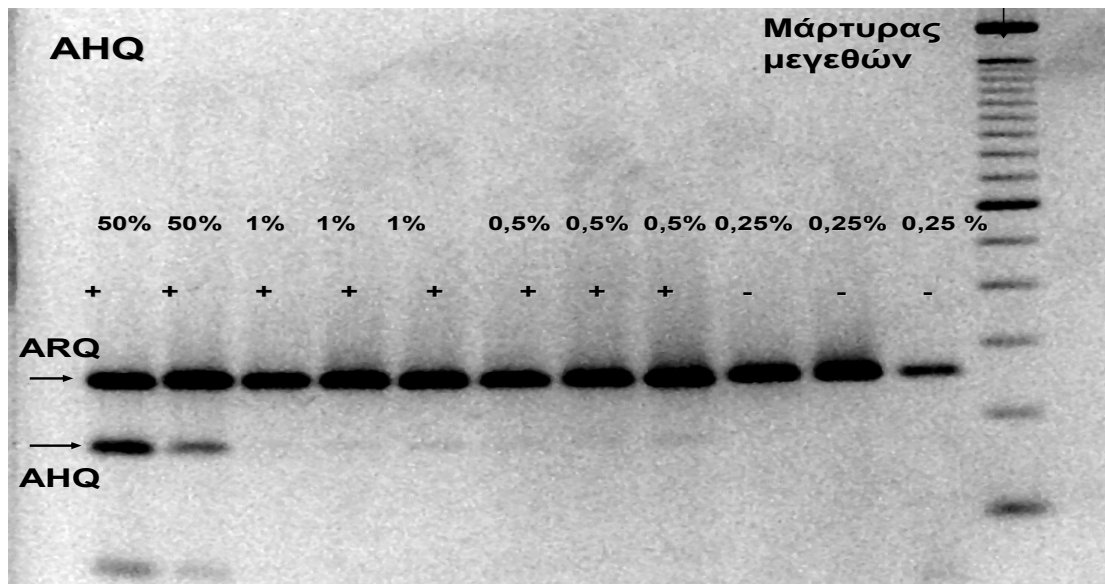
\* με αστερίσκο σημειώνεται η συγκέντρωση των αλληλομόρφων TRQ σε κάθε πειραματικό δείγμα. Η μικρότερη συγκέντρωση του αλληλομόρφου που ανιχνεύτηκε με την ανάλυση RFLP σε τρεις διαφορετικές επαναλήψεις του ίδιου δείγματος και η οποία θεωρείται το όριο ανίχνευσής του επισημαίνεται με υπογράμμιση.

**Πίνακας 22.** Πειραματικό δείγμα που περιείχε ισομοριακές απομονώσεις από τους τέσσερεις γενοτύπους ARQ/ARQ, ARQ/TRQ, ARQ/AHQ και ARQ/ARR που συνήθως ανιχνεύονται σε ένα ποίμνιο προβάτων. Ανιχνεύτηκαν τα αλληλόμορφα ARQ, ARR και AHQ, ενώ δεν ανιχνεύτηκε το αλληλόμορφο TRQ.

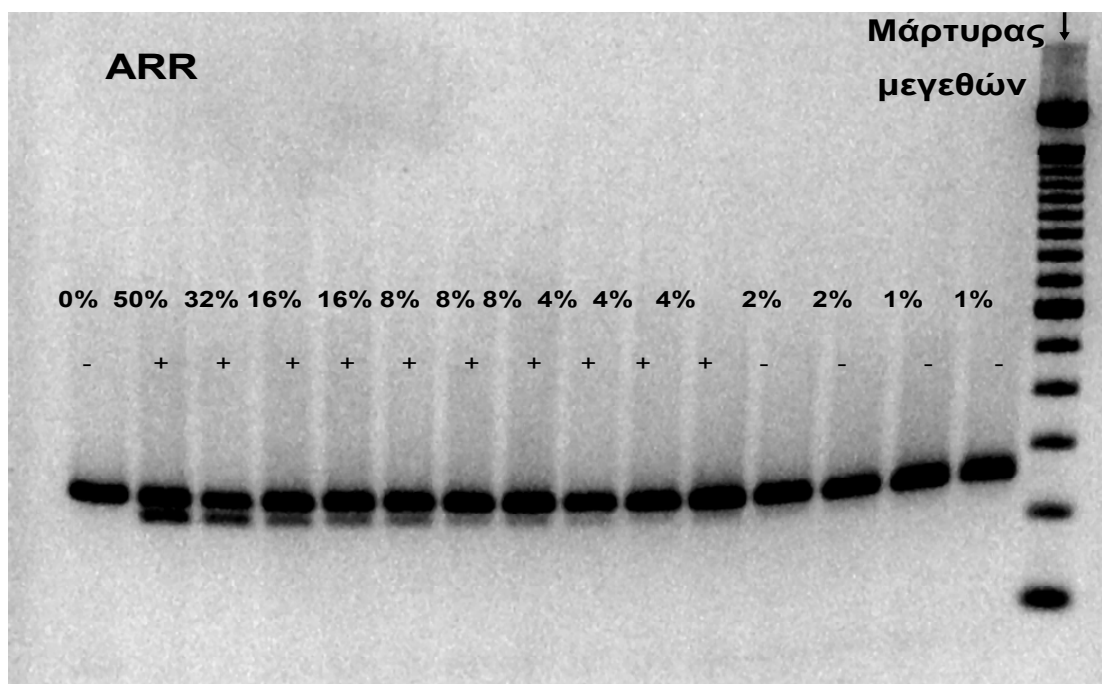
Γενότυποι που αναμίχθηκαν	ARQ/ARQ ARQ/TRQ ARQ/AHQ ARQ/ARR	Ανίχνευση αλληλομόρφων
<b>Αναλογίες αλληλομόρφων</b>	ARQ 85%	NAI
	ARR 5%	NAI
	AHQ 4%	NAI
	TRQ 6%	OXI



**Εικόνα 10.** Ανίχνευση του AHQ αλληλομόρφου με ανάλυση RFLP (BspHI) σε πειραματικά δείγματα από ισομοριακές απομονώσεις ARQ/ARQ και ARQ/AHQ. Η συγκέντρωση του αλληλομόρφου AHQ στα πειραματικά δείγματα σημειώνεται πάνω από τα προϊόντα. Η παρουσία των τμημάτων DNA που προκύπτουν από την πέψη με το BspHI παρουσία του AHQ συμβολίζεται με ένα σταυρό. Ο δείκτης μοριακού βάρους είναι 100 bp DNA-ladder, New England Biolabs, Inc., MA, USA.



**Εικόνα 11.** Προσδιορισμός ορίου ανίχνευσης του AHQ αλληλομόρφου με ανάλυση RFLP (BspHI) σε πειραματικά δείγματα από ισομοριακά εκχυλίσματα ARQ/ARQ και ARQ/AHQ. Η ελάχιστη συγκέντρωση στην οποία ανιχνεύτηκε το AHQ και στις τρεις επαναλήψεις ήταν το 0,5%.



**Εικόνα 12.** Ανίχνευση του ARR αλληλομόρφου με ανάλυση RFLP (BspDI) σε πειραματικά δείγματα από ισομοριακές απομονώσεις ARQ/ARQ και ARQ/ARR. Η συγκέντρωση του αλληλομόρφου ARR στα πειραματικά δείγματα σημειώνεται πάνω από τα προϊόντα. Η παρουσία των τμημάτων DNA που προκύπτουν από την πέψη με το BspDI παρουσία του ARR συμβολίζεται με ένα σταυρό. Ο δείκτης μοριακού βάρους είναι 100 bp DNA-ladder, New England Biolabs, Inc., MA, USA.

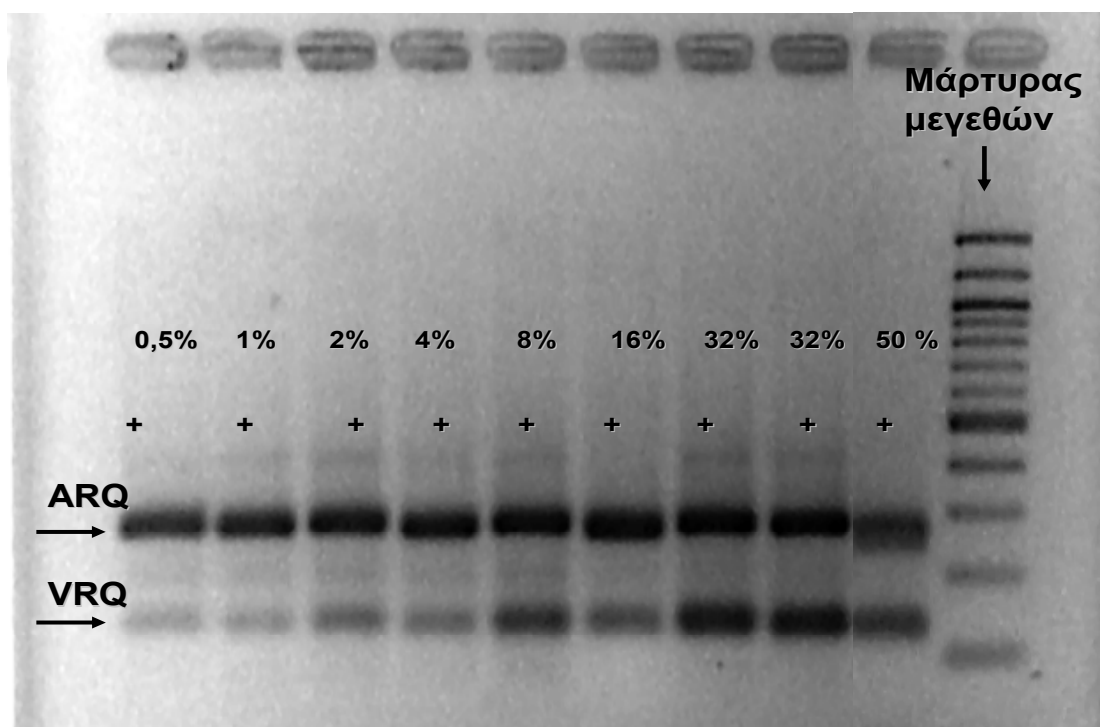
### 5.3. Πειραματικά δείγματα με ανάμιξη ατομικών δειγμάτων νοπού γάλατος

Τα αποτελέσματα της ανάλυσης RFLP των πειραματικών δειγμάτων, που δημιουργήθηκαν στο εργαστήριο με την ανάμιξη ατομικών δειγμάτων νοπού γάλατος προβατινών με προσδιορισμένο γενότυπο, παρουσιάζονται αναλυτικά στους Πίνακες 23, 24, 25, 26 και 27.

Τα αποτελέσματα των πειραματισμών αυτών έδειξαν ότι τα αλληλόμορφα σε αυτά τα δείγματα ανιχνεύτηκαν σε συγκεντρώσεις ίδιες ή παραπλήσιες με τα όρια ανίχνευσης που προσδιορίστηκαν με ισομοριακά δείγματα. Για παράδειγμα, το αλληλόμορφο ARR ανιχνεύτηκε στο ένα δείγμα στο 4%, όσο και το όριο ανίχνευσής του με ισομοριακά δείγματα, και στο άλλο στο 8% (Πίνακας 23). Η ελάχιστη συγκέντρωση που ανιχνεύτηκε το αλληλόμορφο VRQ στο ένα πειραματικό δείγμα που εξετάστηκε ήταν 0,5%, όσο δηλαδή και το προσδιορισμένο όριο ανίχνευσης με



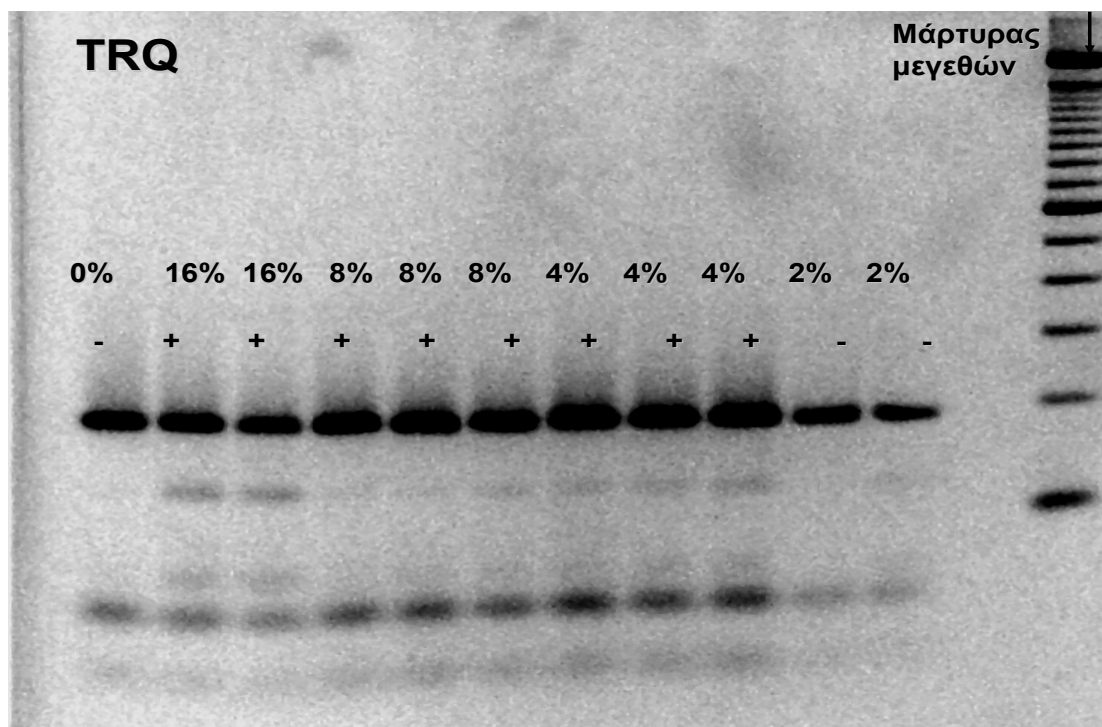
τα ισομοριακά και τα κλωνοποιημένα δείγματα (Εικόνα 13, Πίνακας 24). Ωστόσο, στο δεύτερο πειραματικό δείγμα, που δημιουργήθηκε με ανάμιξη δειγμάτων γάλατος άλλων προβατινών, η ελάχιστη συγκέντρωση που ανιχνεύτηκε το VRQ ήταν 2% (Πίνακας 24).



**Εικόνα 13.** Ανίχνευση του VRQ αλληλομόρφου με ανάλυση RFLP (BspHI) στο πειραματικό δείγμα 1, που δημιουργήθηκε με ανάμιξη ατομικών δειγμάτων νοπού γάλατος. Η συγκέντρωση του αλληλομόρφου VRQ στα πειραματικά δείγματα σημειώνεται πάνω από τα προϊόντα. Η παρουσία των τμημάτων DNA που προκύπτουν από την πέψη με το BspHI παρουσία του VRQ συμβολίζεται με ένα σταυρό. Ο δείκτης μοριακού βάρους είναι 100 bp DNA-ladder, New England Biolabs, Inc., MA, USA.

Το ARH ανιχνεύτηκε, τόσο σε συγκέντρωση ίδια με το όριο ανίχνευσής του (4%), όσο και στην αμέσως μεγαλύτερη συγκέντρωση (8%) (Πίνακας 25). Αναφορικά με το αλληλόμορφο TRQ, στο ένα πειραματικό δείγμα ανιχνεύτηκε σε συγκέντρωση ανάλογη με το προσδιορισμένο, με ισομοριακά δείγματα, όριο ανίχνευσης, δηλαδή στο 8%, ενώ στο δεύτερο ανιχνεύτηκε στην αμέσως χαμηλότερη συγκέντρωση, στο 4 %. (Εικόνα 14, Πίνακας 26). Το AHQ ανιχνεύτηκε στις αμέσως

μεγαλύτερες συγκεντρώσεις σε σχέση με το δικό του προκαθορισμένο όριο ανίχνευσης (1% και 2%, αντίστοιχα, Πίνακας 27).



**Εικόνα 14.** Ανίχνευση του TRQ αλληλομόρφου με ανάλυση RFLP (*RsaI*) σε πειραματικά δείγματα που προέκυψαν από ανάμιξη ατομικών δειγμάτων νοπού γάλατος. Η συγκέντρωση του αλληλομόρφου TRQ στα πειραματικά δείγματα σημειώνεται πάνω από τα προϊόντα. Η παρουσία των τμημάτων DNA που προκύπτουν από την πέψη με το *RsaI* παρουσία του TRQ συμβολίζονται με ένα σταυρό. Ο δείκτης μοριακού βάρους είναι 100 bp DNA-ladder, New England Biolabs, Inc., MA, USA.

**Πίνακας 23.** Ανίχνευση του αλληλομόρφου ARR σε δύο πειραματικά δείγματα του ενός λίτρου το καθένα που δημιουργήθηκαν με ανάμιξη ατομικών δειγμάτων νοπού γάλατος από διαφορετικές προβατίνες. Το πειραματικό δείγμα 1 και το πειραματικό δείγμα 2 περιείχαν γάλα από προβατίνες με τρεις (ARQ/ARQ, ARQ/AHQ, ARQ/ARR) και με δύο (ARQ/ARQ, ARQ/ARR) διαφορετικούς γενοτύπους, αντίστοιχα. Το όριο ανίχνευσης του ARR προσδιορίστηκε με τα ισομοριακά δείγματα στο 4%.

Γενοτύποι που αναμίχθηκαν ARQ/ARQ, ARQ/AHQ, ARQ/ARR* (ποσότητες γάλατος σε ml)	Αλληλόμορφα ARQ + AHQ-ARR* (αναλογίες)	Ανίχνευση ARR
<b>Πειραματικό δείγμα 1</b>		
995 -5*	99,75%-0,25%*	OXI
990-10*	99,5%-0,5%*	OXI
980-20*	99%- 1%*	OXI
960-40*	98%-2%*	OXI
920-80*	96%- <u>4%</u> *	<b><u>NAI</u></b>
840-160*	92%-8%*	NAI
680-320*	84%-16%*	NAI
Γενοτύποι που αναμίχθηκαν ARQ/ARQ, ARQ/ARR* (ποσότητες γάλατος σε ml)	Αλληλόμορφα ARQ - ARR* (αναλογίες)	Ανίχνευση ARR
<b>Πειραματικό δείγμα 2</b>		
995 -5*	99,75%-0,25%*	OXI
990-10*	99,5%-0,5%*	OXI
980-20*	99%- 1%*	OXI
960-40*	98%-2%*	OXI
920-80*	96%-4%*	OXI
840-160*	92%- <u>8%</u> *	<b><u>NAI</u></b>
680-320*	84%-16%*	NAI

\* με αστερίσκο επισημαίνεται η συγκέντρωση του αλληλομόρφου ARR σε κάθε πειραματικό δείγμα . Η μικρότερη συγκέντρωση του αλληλομόρφου που ανιχνεύτηκε με την ανάλυση RFLP επισημαίνεται με έντονη γραφή και υπογράμμιση.

**Πίνακας 24.** Ανίχνευση του αλληλομόρφου VRQ σε δύο πειραματικά δείγματα του ενός λίτρου το καθένα που δημιουργήθηκαν με ανάμιξη ατομικών δειγμάτων γάλατος από διαφορετικές προβατίνες με γενοτύπους ARQ/ARQ και ARQ/VRQ. Το όριο ανίχνευσης του VRQ προσδιορίστηκε με τα ισομοριακά δείγματα στο 0,5%.

<b>Γενότυποι που αναμείχθηκαν</b> <b>ARQ/ARQ, ARQ/VRQ</b> <b>(ποσότητες γάλατος σε ml)</b>	<b>Αλληλόμορφα</b> <b>ARQ - VRQ*</b> <b>(αναλογίες)</b>	<b>Ανίχνευση VRQ</b>
<b>Πειραματικό δείγμα 1</b>		
995 -5*	99,75%-0,25%*	OXI
990-10*	99,5%- <b><u>0,5%</u></b> *	<b><u>NAI</u></b>
980-20*	99%- 1%*	NAI
960-40*	98%-2%*	NAI
920-80*	96%-4%*	NAI
840-160*	92%-8%*	NAI
680-320*	84%-16%*	NAI
360-640*	64% -32%*	NAI
<b>Πειραματικό δείγμα 2</b>		
990-10*	99,5%-0,5%	OXI
980-20*	99%-1%	OXI
960-40*	98%- <b><u>2%</u></b>	<b><u>NAI</u></b>
920-80*	96%-4%	NAI
840-160*	92%-8%	NAI
680-320*	84%-16%	NAI

\* με αστερίσκο επισημαίνεται η συγκέντρωση του αλληλομόρφου VRQ σε κάθε πειραματικό δείγμα. Η μικρότερη συγκέντρωση του αλληλομόρφου που ανιχνεύτηκε με την ανάλυση RFLP στα δείγματα αυτά επισημαίνεται με έντονη γραμματοσειρά και υπογράμμιση.

**Πίνακας 25.** Ανίχνευση του αλληλομόρφου ARH σε πειραματικά δείγματα του ενός λίτρου που δημιουργήθηκαν με ανάμιξη ατομικών δειγμάτων νωπού γάλατος από προβατίνες με γενοτύπους ARQ/ARQ και ARQ/ARH. Το όριο ανίχνευσης του ARH προσδιορίστηκε με τα ισομοριακά δείγματα στο 4%.

Γενότυποι που αναμίχθηκαν ARQ/ARQ,ARQ/ARH* (ποσότητες γάλατος σε ml)	Αλληλόμορφα ARQ - ARH* (αναλογίες)	Ανίχνευση ARH
<b>Πειραματικό δείγμα 1</b>		
995 -5*	99,75%-0,25%*	OXI
990-10*	99,5%-0,5%*	OXI
980-20*	99%- 1%*	OXI
960-40*	98%-2%*	OXI
920-80*	96%- <u>4%</u> *	<b><u>NAI</u></b>
840-160*	92%-8%*	NAI
680-320*	84%-16%*	NAI
<b>Πειραματικό δείγμα 2</b>		
995 -5*	99,75%-0,25%*	OXI
990-10*	99,5%-0,5%*	OXI
980-20*	99%- 1%*	OXI
960-40*	98%-2%*	OXI
920-80*	96%-4%*	OXI
840-160*	92%- <u>8%</u> *	<b><u>NAI</u></b>
680-320*	84%-16%*	NAI

\* με αστερίσκο επισημαίνεται η συγκέντρωση του αλληλομόρφου ARH σε κάθε πειραματικό δείγμα. Η μικρότερη συγκέντρωση του αλληλομόρφου ARH που ανιχνεύτηκε σε αυτά τα πειραματικά δείγματα με την ανάλυση RFLP επισημαίνεται με έντονη γραφή και υπογράμμιση.

**Πίνακας 26.** Ανίχνευση του αλληλομόρφου TRQ σε δύο πειραματικά δείγματα του ενός λίτρου το καθένα που δημιουργήθηκαν με ανάμιξη ατομικών δειγμάτων νωπού γάλατος, από διαφορετικές προβατίνες με γενοτύπους ARQ/ARQ και ARQ/TRQ. Το όριο ανίχνευσης του TRQ προσδιορίστηκε με τα ισομοριακά δείγματα στο 8%.

Γενότυποι που αναμίχθηκαν ARQ/ARQ, ARQ/TRQ* (ποσότητες γάλατος σε ml)	Αλληλόμορφα ARQ - TRQ* (αναλογίες)	Ανίχνευση TRQ
<b>Πειραματικό δείγμα 1</b>		
995 -5*	99,75%-0,25%*	OXI
990-10*	99,5%-0,5%*	OXI
980-20*	99%- 1%*	OXI
960-40*	98%-2%*	OXI
920-80*	96%- <b>4%</b> *	<b><u>NAI</u></b>
840-160*	92%-8%*	NAI
680-320*	84%-16%*	NAI
<b>Πειραματικό δείγμα 2</b>		
995 -5*	99,75%-0,25%*	OXI
990-10*	99,5%-0,5%*	OXI
980-20*	99%- 1%*	OXI
960-40*	98%-2%*	OXI
920-80*	96%-4%*	OXI
840-160*	92%- <b>8%</b> *	<b><u>NAI</u></b>
680-320*	84%-16%*	NAI

\* με αστερίσκο επισημαίνεται η συγκέντρωση του αλληλομόρφου TRQ σε κάθε πειραματικό δείγμα. Η μικρότερη συγκέντρωση του αλληλομόρφου TRQ που ανιχνεύτηκε με την ανάλυση RFLP επισημαίνεται με έντονη γραφή και υπογράμμιση.

**Πίνακας 27.** Ανίχνευση του αλληλομόρφου ΑΗQ σε δύο πειραματικά δείγματα του ενός λίτρου το καθένα που δημιουργήθηκαν με ανάμιξη ατομικών δειγμάτων νοπού γάλατος από διαφορετικές προβατίνες με γενοτύπους ARQ/ARQ και ARQ/ΑΗQ για το πρώτο δείγμα και ARQ/ARQ και ΑΗQ/ΑΗQ για το δεύτερο. Το όριο ανίχνευσης του ARH προσδιορίστηκε με τα ισομοριακά δείγματα στο 0,5%.

<b>Γενότυποι που αναμίχθηκαν ARQ/ARQ, ARQ/ΑΗQ* (ποσότητες γάλατος σε ml)</b>	<b>Αλληλόμορφα ARQ - ΑΗQ* (αναλογίες)</b>	<b>Ανίχνευση ΑΗQ</b>
<b>Πειραματικό δείγμα 1</b>		
995 -5*	99,75%-0,25%*	OXI
990-10*	99,5%-0,5%*	OXI
980-20*	99%- <b><u>1%</u></b> *	<b><u>NAI</u></b>
960-40*	98%-2%*	NAI
920-80*	96%-4%*	NAI
840-160*	92%-8%*	NAI
680-320*	84%-16%*	NAI
<b>Γενότυποι που αναμίχθηκαν ARQ/ARQ, ΑΗQ/ΑΗQ* (ποσότητες γάλατος σε ml)</b>	<b>Αλληλόμορφα ARQ - ΑΗQ* (αναλογίες)</b>	<b>Ανίχνευση ΑΗQ</b>
<b>Πειραματικό δείγμα 2</b>		
995 - 2,5*	99,75%-0,25%*	OXI
990-5*	99,5%-0,5%*	OXI
980-10*	99%- 1%*	OXI
960-20*	98%- <b><u>2%</u></b> *	<b><u>NAI</u></b>
920-40*	96%-4%*	NAI
840-80*	92%-8%*	NAI
680-160*	84%-16%*	NAI

\* με αστερίσκο επισημαίνεται η συγκέντρωση του αλληλομόρφου ΑΗQ σε κάθε πειραματικό δείγμα. Η μικρότερη συγκέντρωση του αλληλομόρφου ΑΗQ που ανιχνεύτηκε με την ανάλυση RFLP σε αυτά τα δείγματα επισημαίνεται με έντονη γραφή και υπογράμμιση.

## 6. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΜΕΛΕΤΗΣ ΤΗΣ ΣΧΕΣΗΣ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ *PRNP* ΜΕ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΗΣ ΓΑΛΑΚΤΟΠΑΡΑΓΩΓΙΚΗΣ ΚΑΙ ΤΗΣ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΙΚΗΣ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ

### 6.1. Περιγραφή χαρακτηριστικών

Η στατιστική περιγραφή των χαρακτηριστικών της γαλακτοπαραγωγικής και αναπαραγωγικής ικανότητας των προβάτων φυλής Χίου, βάσει των στοιχείων που αναλύθηκαν στην παρούσα μελέτη, παρουσιάζονται στον Πίνακα 28.

**Πίνακας 28.** Χαρακτηριστικά της γαλακτοπαραγωγικής και αναπαραγωγικής ικανότητας των προβάτων φυλής Χίου.

Χαρακτηριστικό (μονάδα μέτρησης)	Αριθμός Αρχείων	Μέσος Όρος	Τυπική Απόκλιση
Συνολική γαλακτοπαραγωγή της γαλακτικής περιόδου (χλγ) <sup>α</sup>	1839	217,2	106,9
Ημερήσια γαλακτοπαραγωγή του μηνιαίου ελέγχου (χλγ)	8235	1,40	0,77
Δείκτης πολυδυμίας (αριθμός αρνιών)	2027	1,81	1,35
Ρυθμός σύλληψης με την πρώτη οχεία (0/1) <sup>β</sup>	2226	0,83	0,37
Ηλικία στον πρώτο τοκετό (μήνες)	838	15,3	3,4

<sup>α</sup> Η μέση διάρκεια της γαλακτικής περιόδου ήταν 197,3 ημέρες.

<sup>β</sup> 1 αν η οχεία ήταν γόνιμη, 0 αν δεν ήταν.



## 6.2. Σχέση γονιδίου *PRNP* με τη γαλακτοπαραγωγική ικανότητα

Στα πλαίσια της παρούσας μελέτης διερευνήθηκε η σχέση του γονιδίου *PRNP* με την ημερήσια γαλακτοπαραγωγή του μηνιαίου ελέγχου και τη συνολική γαλακτοπαραγωγή της γαλακτικής περιόδου των προβάτων της φυλής Χίου. Η στατιστική επεξεργασία έγινε με τη βοήθεια μικτών γραμμικών προτύπων, στα οποία τα αποτελέσματα διορθώθηκαν ως προς όλους τους άλλους παράγοντες που επηρεάζουν το κάθε χαρακτηριστικό.

Η σχέση του *PRNP* με τα χαρακτηριστικά που μελετήθηκαν διερευνήθηκε, τόσο ως επίδραση των αλληλομόρφων, όσο και ως επίδραση των γενοτύπων. Στον Πίνακα 29 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της επίδρασης των αλληλομόρφων του *PRNP* στα χαρακτηριστικά της γαλακτοπαραγωγής, μετά τη στατιστική επεξεργασία των στοιχείων όλων των γαλακτικών περιόδων. Πρόκειται για την εκτίμηση της επίδρασης της παρουσίας ενός αλληλομόρφου στο γενότυπο, σε σχέση με το μέσο όρο των άλλων αλληλομόρφων. Για παράδειγμα, η αντικατάσταση του μέσου όρου των άλλων αλληλομόρφων από ένα αντίγραφο του ARQ είχε σαν αποτέλεσμα τη μείωση της συνολικής γαλακτοπαραγωγής κατά 5,92 χλγ. Αντίστοιχα, η ίδια αντικατάσταση είχε ως αποτέλεσμα τη μείωση της ημερήσιας γαλακτοπαραγωγής κατά 0,0395 χλγ. Ωστόσο, οι παραπάνω επιδράσεις του ARQ αλληλομόρφου δεν ήταν στατιστικά σημαντικές ( $P < 0,10$  και  $> 0,05$ ,  $P=0,065$  και  $P=0,086$ , αντίστοιχα). Βεβαίως, η χαμηλή τιμή  $P$  είναι ενδεικτική μίας πιθανής αρνητικής συσχέτισης του ARQ αλληλομόρφου με τη γαλακτοπαραγωγή, η οποία δεν υποστηρίζεται στατιστικά από την παρούσα μελέτη.

Η μόνη στατιστικά σημαντική επίδραση αλληλομόρφου που παρατηρήθηκε ήταν εκείνη του TRQ στην ημερήσια γαλακτοπαραγωγή του μηνιαίου ελέγχου. Συγκεκριμένα, η παρουσία ενός αντιγράφου TRQ στο γενότυπο των ζώων συνοδευόταν με μέση αύξηση της ημερήσιας παραγωγής κατά 0,0822 χλγ, ενώ στη περίπτωση παρουσίας δύο αντιγράφων η αύξηση αυτή διπλασιαζόταν (Πίνακας 29). Το αποτέλεσμα αυτό ήταν, καταρχήν, στατιστικά σημαντικό ( $P=0,027$ ), αλλά ύστερα από τη διόρθωση με τη μέθοδο Bonferroni η επίδραση του αλληλομόρφου αυτού στην ημερήσια γαλακτοπαραγωγή έπαψε να είναι στατιστικά σημαντική.

**Πίνακας 29.** Αποτελέσματα επίδρασης των αλληλομόρφων του γονιδίου *PRNP* στη συνολική γαλακτοπαραγωγή της γαλακτικής περιόδου και στην ημερήσια γαλακτοπαραγωγή του μηνιαίου ελέγχου των προβάτων φυλής Χίου, μετά την επεξεργασία των στοιχείων όλων των γαλακτικών περιόδων. Πρόκειται για την εκτίμηση της επίδρασης της παρουσίας ενός αλληλομόρφου στο γενότυπο, σε σχέση με το μέσο όρο των άλλων αλληλομόρφων.

Συνολική γαλακτοπαραγωγή της γαλακτικής περιόδου			
Αλληλόμορφα	Εκτιμώμενη επίδραση (χλγ)	Τυπικό σφάλμα	P
ARQ	-5,92	3,21	0,065
AHQ	0,94	4,88	0,847
VRQ	9,34	21,68	0,667
TRQ	6,92	5,19	0,183
ARR	6,86	5,01	0,172
ARH	-3,40	15,22	0,823
Ημερήσια γαλακτοπαραγωγή του μηνιαίου ελέγχου			
ARQ	-0,0395	0,0230	0,086
AHQ	-0,0300	0,0347	0,388
VRQ	0,0324	0,1633	0,843
<b>TRQ</b>	<b>0,0822</b>	<b>0,0370</b>	<b>0,027*</b>
ARR	0,0501	0,0368	0,174
ARH	0,0124	0,1025	0,904

Ευνοϊκή ήταν η επίδραση του TRQ και στη συνολική γαλακτοπαραγωγή της γαλακτικής περιόδου, όπου η αντικατάσταση του μέσου όρου των άλλων αλληλομόρφων από ένα αντίγραφο του TRQ ήταν συνυφασμένη με μέση αύξηση κατά 6,92 χλγ (Πίνακας 29), χωρίς όμως το αποτέλεσμα αυτό να είναι στατιστικά σημαντικό (P=0,183).

Αναφορικά με τους γενοτύπους του γονιδίου *PRNP*, η στατιστική επεξεργασία έδειξε πως σε κανένα από τα γαλακτοπαραγωγικά χαρακτηριστικά που διερευνήθηκαν δεν υπήρχε στατιστικά σημαντική επίδραση τους (Πίνακες 30 και 31).

**Πίνακας 30.** Αποτελέσματα επίδρασης των γενοτύπων του γονιδίου *PRNP* στην ημερήσια γαλακτοπαραγωγή του μηνιαίου ελέγχου των προβάτων φυλής Χίου, μετά την επεξεργασία των στοιχείων όλων των γαλακτικών περιόδων. Η εκτιμώμενη επίδραση είναι η προβλεπόμενη μέση τιμή διορθωμένη ως προς όλους τους άλλους παράγοντες του στατιστικού προτύπου.

<b>Ημερησία γαλακτοπαραγωγή μηνιαίου ελέγχου</b>		
<b>Γενότυποι</b>	<b>Εκτιμώμενη επίδραση (χλγ)</b>	<b>Τυπικό σφάλμα</b>
TRQ/ARR	1,505	0,111
VRQ/AHQ	1,497	0,355
TRQ/TRQ	1,495	0,138
ARQ/ARH	1,447	0,106
TRQ/AHQ	1,431	0,143
ARR/AHQ	1,377	0,205
ARQ/TRQ	1,370	0,056
ARQ/VRQ	1,368	0,182
ARQ/ARR	1,337	0,053
ARR/ARR	1,329	0,192
ARQ/ARQ	1,297	0,043
ARQ/AHQ	1,292	0,051
AHQ/AHQ	1,185	0,165
VRQ/TRQ	0,886	0,371
ARH/AHQ	0,809	0,258

**Πίνακας 31.** Αποτελέσματα επίδρασης των γενοτύπων του γονιδίου *PRNP* στη συνολική γαλακτοπαραγωγή της γαλακτικής περιόδου των προβάτων φυλής Χίου, μετά την επεξεργασία των στοιχείων όλων των γαλακτικών περιόδων. Η εκτιμώμενη επίδραση είναι η προβλεπόμενη μέση τιμή διορθωμένη ως προς όλους τους άλλους παράγοντες του στατιστικού προτύπου.

<b>Συνολική γαλακτοπαραγωγή γαλακτικής περιόδου</b>		
<b>Εκτιμώμενη επίδραση</b>		
<b>Γενότυποι</b>	<b>(χλγ)</b>	<b>Τυπικό σφάλμα</b>
VRQ/AHQ	260,7	54,1
TRQ/ARR	246,0	17,7
ARQ/VRQ	222,2	26,9
TRQ/AHQ	218,2	21,8
ARQ/TRQ	209,5	8,9
ARQ/ARR	209,0	8,5
ARQ/ARH	207,4	17,5
ARQ/AHQ	205,2	8,0
TRQ/TRQ	204,7	21,5
ARR/AHQ	204,6	30,9
ARR/ARR	202,6	26,0
ARQ/ARQ	202,1	6,9
AHQ/AHQ	193,5	27,9
ARH/AHQ	158,0	42,4
VRQ/TRQ	146,9	54,2

Τέλος, τα αποτελέσματα της επεξεργασίας, που πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας μόνο τα στοιχεία που αφορούσαν την πρώτη γαλακτική περίοδο, δεν αποκάλυψαν κάποια σημαντική επίδραση, ούτε των αλληλομόρφων ούτε των γενοτύπων του γονιδίου *PRNP*, στα χαρακτηριστικά της γαλακτοπαραγωγής (Πίνακες Π1, Π3 και Π4 του Παραρτήματος ΙΙΙ).

## **6.2. Σχέση του γονιδίου *PRNP* με την αναπαραγωγική ικανότητα**

Στα πλαίσια της παρούσας μελέτης διερευνήθηκε η σχέση του γονιδίου *PRNP* με την ηλικία κατά τον πρώτο τοκετό, το ρυθμό σύλληψης με την πρώτη οχεία και το δείκτη πολυδυμίας των προβάτων της φυλής Χίου.

Οι εν λόγω σχέσεις, όπως και στην περίπτωση των γαλακτοπαραγωγικών χαρακτηριστικών, διερευνήθηκαν, τόσο ως επίδραση των γενοτύπων, όσο και ως επίδραση των αλληλομόρφων στα παραπάνω χαρακτηριστικά.

Αναφορικά με τα αλληλόμορφα του *PRNP*, τα αποτελέσματα της στατιστικής επεξεργασίας παρουσιάζονται αναλυτικά στον Πίνακα 32. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι οι μέσες τιμές που παρουσιάζονται στον πίνακα αυτό είναι διορθωμένες ως προς όλους τους άλλους παράγοντες του στατιστικού προτύπου.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα αυτά, το TRQ αλληλόμορφο εμφάνισε στατιστικά σημαντική αρνητική επίδραση στην ηλικία κατά τον πρώτο τοκετό ( $P=0,003$ ). Παρουσία ενός αντιγράφου TRQ οι προβατίνες πραγματοποιούσαν τον πρώτο τους τοκετό  $0,60\pm 0,20$  μήνες αργότερα (4% από το μέσο όρο) και, αντίστοιχα, παρουσία δύο αντιγράφων 1,2 μήνες αργότερα σε σχέση με το μέσο όρο των άλλων αλληλομόρφων (Πίνακας 32). Η επίδραση αυτή παρέμεινε στατιστικά σημαντική και μετά τη διόρθωση Bonferroni. Αντιθέτως, το αλληλόμορφο ARQ εμφάνισε αρχικά στατιστικά σημαντική θετική επίδραση στην ηλικία κατά τον πρώτο τοκετό ( $P=0,034$ ). Τα πρόβατα με ένα αντίγραφο ARQ πραγματοποιούσαν τον πρώτο τους τοκετό  $0,3\pm 0,14$  μήνες νωρίτερα (2% από το μέσο όρο) και, αντίστοιχα, παρουσία δύο αντιγράφων 0,6 μήνες νωρίτερα σε σχέση με το μέσο όρο. Η επίδραση αυτή μετά τη διόρθωση Bonferroni δεν παρέμεινε στατιστικά σημαντική, καταγράφεται όμως ως πιθανή τάση.

Αναφορικά με το ρυθμό σύλληψης με την πρώτη οχεία, το αλληλόμορφο ARQ εμφάνισε, αρχικά, στατιστικά σημαντική θετική επίδραση ( $P=0,017$ ). Τα πρόβατα με ένα αντίγραφο ARQ εμφάνιζαν αυξημένο ρυθμό σύλληψης κατά 3% σε σχέση με το μέσο όρο ( $0,03\pm 0,01$ ) και κατά 6% παρουσία δύο αντιγράφων αυτού του αλληλομόρφου. Η στατιστική σημαντικότητα δε διατηρήθηκε μετά τη διόρθωση των αποτελεσμάτων με τη μέθοδο Bonferroni, καταγράφεται όμως επίσης ως πιθανή τάση.

Κανένα από τα αλληλόμορφα του γονιδίου *PRNP* δεν εμφάνισαν στατιστικά σημαντική επίδραση στο χαρακτηριστικό δείκτης πολυδυμίας. Συγκεκριμένα, η τιμή *P* για όλα τα αλληλόμορφα υπερέβαινε κατά πολύ την τιμή 0,1, γεγονός που αποκλείει οποιαδήποτε συσχέτιση τους με το χαρακτηριστικό αυτό.

**Πίνακας 32.** Αποτελέσματα επίδρασης των αλληλομόρφων του *PRNP* στην ηλικία του ζώου κατά τον πρώτο τοκετό, στο ρυθμό σύλληψης με την πρώτη οχεία και στο δείκτη πολυδυμίας των προβάτων φυλής Χίου, μετά την επεξεργασία των στοιχείων όλων των γαλακτικών περιόδων. Πρόκειται για την επίδραση της παρουσίας ενός αλληλομόρφου στο γενότυπο, σε σχέση με το μέσο όρο των άλλων αλληλομόρφων.

Ηλικία ζώου στον πρώτο τοκετό			
Αλληλόμορφα	Εκτιμώμενη επίδραση (μήνες)	Τυπικό σφάλμα	P
<b>ARQ</b>	<b>-0,30</b>	<b>0,14</b>	<b>0,034*</b>
AHQ	0,04	0,22	0,856
VRQ	-0,63	0,86	0,464
<b>TRQ</b>	<b>0,60</b>	<b>0,20</b>	<b>0,003*</b>
ARR	0,17	0,23	0,460
ARH	0,28	0,65	0,667

Ρυθμός σύλληψης με την πρώτη οχεία			
Αλληλόμορφα	Εκτιμώμενη επίδραση (ρυθμός σύλληψης)	Τυπικό σφάλμα	P
<b>ARQ</b>	<b>0,03</b>	<b>0,01</b>	<b>0,017*</b>
AHQ	-0,03	0,02	0,091
VRQ	-0,01	0,10	0,902
TRQ	-0,01	0,02	0,537
ARR	-0,03	0,02	0,175
ARH	0,00	0,06	0,939

Δείκτης πολυδυμίας			
Αλληλόμορφα	Εκτιμώμενη επίδραση (αριθ. αρνιών)	Τυπικό σφάλμα	P
ARQ	0,03	0,03	0,323
AHQ	-0,04	0,04	0,390
VRQ	-0,13	0,20	0,520
TRQ	-0,03	0,05	0,583
ARR	-0,01	0,05	0,797
ARH	0,11	0,14	0,431

\* με αστερίσκο και έντονη γραφή επισημαίνονται οι επιδράσεις των αλληλομόρφων με στατιστική σημαντικότητα. Επιπλέον, με υπογράμμιση επισημαίνονται οι επιδράσεις των αλληλομόρφων που μετά τη διόρθωση Bonferroni παρέμειναν στατιστικά σημαντικές.

Επιπλέον, η στατιστική επεξεργασία, με τα μικτά γραμμικά πρότυπα, έδειξε ότι σε κανένα από τα αναπαραγωγικά χαρακτηριστικά που διερευνήθηκαν δεν υπήρχε στατιστικά σημαντική επίδραση των γενοτύπων του *PRNP* (Πίνακες 33, 34 και 35). Στο ίδιο αποτέλεσμα κατέληξε και η στατιστική επεξεργασία με το δυαδικό στατιστικό πρότυπο των στοιχείων για το χαρακτηριστικό ρυθμός σύλληψης με την πρώτη οχεία.

**Πίνακας 33.** Αποτελέσματα επίδρασης των γενοτύπων του γονιδίου *PRNP* στο δείκτη πολυδυμίας των προβάτων φυλής Χίου, μετά την επεξεργασία των στοιχείων όλων των γαλακτικών περιόδων. Η εκτιμώμενη επίδραση είναι η προβλεπόμενη μέση τιμή διορθωμένη ως προς όλους τους άλλους παράγοντες του στατιστικού προτύπου.

Γενότυποι	Δείκτης πολυδυμίας	
	Εκτιμώμενη επίδραση (αριθ. αρνιών)	Τυπικό σφάλμα
ARH/AHQ	2,44	0,42
TRQ/AHQ	1,81	0,20
ARQ/ARH	1,80	0,15
ARQ/ARR	1,79	0,05
ARQ/ARQ	1,78	0,03
ARR/AHQ	1,77	0,25
ARQ/TRQ	1,76	0,06
ARQ/AHQ	1,75	0,05
TRQ/TRQ	1,73	0,20
VRQ/AHQ	1,73	0,42
ARQ/VRQ	1,71	0,25
TRQ/ARR	1,63	0,16
ARR/ARR	1,55	0,23
AHQ/AHQ	1,29	0,26
VRQ/TRQ	1,19	0,52

**Πίνακας 34.** Αποτελέσματα επίδρασης των γενοτύπων του γονιδίου *PRNP* στην ηλικία των προβάτων φυλής Χίου κατά τον πρώτο τοκετό, μετά την επεξεργασία των στοιχείων όλων των γαλακτικών περιόδων. Η εκτιμώμενη επίδραση είναι η προβλεπόμενη μέση τιμή διορθωμένη ως προς όλους τους άλλους παράγοντες του στατιστικού προτύπου.

<b>Ηλικία ζώου στον πρώτο τοκετό</b>		
<b>Εκτιμώμενη επίδραση</b>		
<b>Γενότυποι</b>	<b>(μήνες)</b>	<b>Τυπικό σφάλμα</b>
ARR/ARR	17,03	1,33
VRQ/TRQ	16,96	2,10
TRQ/ARR	16,68	0,64
ARQ/TRQ	15,95	0,32
TRQ/AHQ	15,91	0,88
ARQ/ARH	15,84	0,64
TRQ/TRQ	15,70	1,00
ARQ/AHQ	15,53	0,34
ARQ/ARR	15,40	0,36
ARQ/ARQ	15,27	0,30
ARR/AHQ	14,76	1,34
ARQ/VRQ	14,56	1,00
VRQ/AHQ	14,46	1,56
AHQ/AHQ	13,90	1,19
ARH/AHQ	12,92	2,02

Τέλος, τα αποτελέσματα της στατιστικής επεξεργασίας, που πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας μόνο τα στοιχεία που αφορούσαν την πρώτη γαλακτική περίοδο, δεν αποκάλυψαν κάποια σημαντική επίδραση, ούτε των αλληλομόρφων, ούτε των γενοτύπων του *PRNP*, στα χαρακτηριστικά της αναπαραγωγής που μελετήθηκαν (Παράρτημα ΙΙΙ).



**Πίνακας 35.** Αποτελέσματα επίδρασης των γενότυπων του γονιδίου *PRNP* στο ρυθμό σύλληψης με την πρώτη οχεία των προβάτων φυλής Χίου, μετά την επεξεργασία των στοιχείων όλων των γαλακτικών περιόδων. Η εκτιμώμενη επίδραση είναι η προβλεπόμενη μέση τιμή διορθωμένη ως προς όλους τους άλλους παράγοντες του στατιστικού προτύπου.

<b>Ρυθμός σύλληψης με την πρώτη οχεία</b>		
<b>Γενότυποι</b>	<b>Εκτιμώμενη επίδραση (ρυθμός σύλληψης)</b>	<b>Τυπικό σφάλμα</b>
VRQ/AHQ	1,14	0,18
ARR/AHQ	1,03	0,11
AHQ/AHQ	0,97	0,12
ARH/AHQ	0,91	0,18
ARQ/ARH	0,86	0,07
ARQ/ARQ	0,86	0,02
ARQ/TRQ	0,85	0,03
ARQ/VRQ	0,85	0,12
TRQ/ARR	0,84	0,08
ARQ/ARR	0,82	0,03
ARQ/AHQ	0,79	0,02
TRQ/TRQ	0,79	0,09
TRQ/AHQ	0,77	0,10
ARR/ARR	0,77	0,11
VRQ/TRQ	0,02	0,25

## ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στόχοι της παρούσας διατριβής ήταν: 1) η αξιολόγηση της γενοτυπικής σύνθεσης του πληθυσμού των προβάτων φυλής Χίου ως προς το γονίδιο *PRNP* που καθορίζει την ανθεκτικότητά τους, τόσο στην κλασική, όσο και στην άτυπη μορφή της τρομώδους νόσου, 2) η ανάπτυξη μίας αξιόπιστης πρακτική μεθοδολογίας για την αξιολόγηση με βάση το γάλα της δεξαμενής ψύξης της ανθεκτικότητας του ποιμνίου ως προς την τρομώδη νόσο και 3) η διερεύνηση των πιθανών επιπτώσεων στη γαλακτοπαραγωγική και αναπαραγωγική ικανότητα των προβάτων φυλής Χίου της εφαρμογής προγράμματος γενετικής επιλογής για την εξάλειψη του προβλήματος της τρομώδους νόσου.

Η καινοτομία της παρούσας διατριβής έγκειται: 1) στη χρήση γάλατος αντί του αίματος ως πηγή DNA για γενοτυπικό προσδιορισμό προβάτων, 2) στον ταυτόχρονο γενοτυπικό προσδιορισμό ζώων σε επίπεδο ποιμνίου αντί για ατομικό, 3) στον προσδιορισμό της γενοτυπικής σύνθεσης των προβάτων φυλής Χίου σε πληθυσμιακό επίπεδο και 4) στη συσχέτιση των παραγωγικών και αναπαραγωγικών χαρακτηριστικών των προβάτων αυτών με το γονίδιο *PRNP*.

Σύμφωνα με τη διαθέσιμη διεθνή βιβλιογραφία, δεν έχει αναπτυχθεί, μέχρι τώρα, άλλη μεθοδολογία για το γενοτυπικό προσδιορισμό του γονιδίου *PRNP* από τα σωματικά κύτταρα του πρόβειου γάλατος, ούτε έχει διερευνηθεί η δυνατότητα χρησιμοποίησης του γάλατος της δεξαμενής ψύξης για τον προσδιορισμό συγκεκριμένων πολυμορφισμών του *PRNP* σε επίπεδο ποιμνίου. Η δειγματοληψία γάλατος είναι ευκολότερη σε σύγκριση με την αιμοληψία, δεν απαιτεί ειδικευμένο προσωπικό και είναι φιλικότερη προς τα ζώα διαδικασία. Συνεπώς, η αντικατάσταση της συλλογής δειγμάτων αίματος από δείγματα γάλατος θα μπορούσε να διευκολύνει και να επισπεύσει τη διαδικασία των ατομικών γενοτυπικών ελέγχων, ιδίως όταν αυτοί γίνονται μαζικά στα πλαίσια της εφαρμογής ενός εκτεταμένου προγράμματος γενετικής βελτίωσης. Επιπλέον, η αξιοποίηση του ομαδικού γενοτυπικού προσδιορισμού θα μπορούσε να μειώσει σημαντικά τον αριθμό των αναγκαίων ατομικών γενοτυπικών ελέγχων, περιορίζοντας τους στους κριούς και σε ένα μικρό ποσοστό προβατινών με ιδιαίτερη γενετική αξία.

Μελέτες προσδιορισμού των γενοτύπων της φυλής Χίου έχουν διεξαχθεί, τόσο στην Ελλάδα (Billinis και συν., 2004, Ekateriniadou και συν., 2007α ), όσο και στην Κύπρο (Παπασάββα-Στυλιανού, 2003) στο παρελθόν. Ωστόσο, οι έρευνες αυτές δεν ήταν πληθυσμιακές, ήταν μικρότερου μεγέθους (π.χ. 50-150 ζώα) και εύρους σε σχέση με την παρούσα διατριβή. Μελέτες συσχέτισης του γονιδίου *PRNP* με τα παραγωγικά χαρακτηριστικά των προβάτων δεν έχουν πραγματοποιηθεί στην Ελλάδα. Η παρούσα μελέτη είναι η πρώτη που διεξάγεται στη χώρα μας και είναι πολύ σημαντική για την ελληνική προβατοτροφία, αφού βάση της βιβλιογραφίας τα αποτελέσματα της συσχέτισης εξαρτώνται κυρίως από τη φυλή των προβάτων, οπότε δεν μπορούμε να βασιστούμε σε μελέτες που έχουν διεξαχθεί στο εξωτερικό. Πράγματι, στις χώρες με αναπτυγμένη γαλακτοπαραγωγό προβατοτροφία, όπως Ιταλία (Pinelli και συν., 2006), Γαλλία (Barillet και συν., 2002), Ισπανία (Alvarez και συν., 2006β) και Πορτογαλία (Casellas και συν., 2007) έχει διερευνηθεί εκτενώς για τις σημαντικές εγχώριες φυλές προβάτων τόσο η επίδραση του γονιδίου *PRNP* στη γαλακτοπαραγωγική όσο και στην αναπαραγωγική ικανότητα τους.

Θεωρήσαμε ότι η επίτευξη των παραπάνω στόχων ήταν αναγκαία για την ενίσχυση της ανταγωνιστικότητας της ελληνικής προβατοτροφίας, μέσω της παραγωγής νέας γνώσης αναφορικά με το γονίδιο *PRNP* στα πρόβατα φυλής Χίου καθώς και με τη χρησιμοποίηση των αποτελεσμάτων αυτών σε προγράμματα γενετικής βελτίωσης που θα προάγουν το επίπεδο υγείας των ποιμνίων και θα διασφαλίσουν την υψηλή ποιότητα και την υγιεινή των πρόβειων γαλακτοκομικών προϊόντων. Επιπλέον, οι νέες μέθοδοι που προέκυψαν, μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως σημαντικά διαχειριστικά εργαλεία σε επίπεδο εκτροφής, αλλά και πληθυσμού. Επίσης, θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν σε επίπεδο γαλακτοβιομηχανίας, για τη διασφάλιση της υγιεινής και της ποιότητας των προϊόντων πρόβειου γάλατος. Τα αποτελέσματα της διατριβής αυτής, αναφορικά με τις μοριακές μεθόδους και τα πρότυπα στατιστικής επεξεργασίας για τη συσχέτιση του γονιδίου *PRNP* με ζωοτεχνικά χαρακτηριστικά που αναπτύχθηκαν, δεν περιορίζονται στα πρόβατα φυλής Χίου αλλά μπορούν να εφαρμοστούν και σε άλλες εγχώριες φυλές προβάτων.

## ΓΕΝΟΤΥΠΙΚΕΣ ΣΥΧΝΟΤΗΤΕΣ ΣΤΟΝ ΠΛΗΘΥΣΜΟ ΠΡΟΒΑΤΩΝ ΤΗΣ ΦΥΛΗΣ ΧΙΟΥ

Στα πλαίσια της παρούσας μελέτης, διεξήχθη μία μεγάλη εύρους (23 ποίμνια) και μεγέθους (1.013 πρόβατα) δειγματοληψία, προκειμένου να προσδιοριστεί με ακρίβεια η γενοτυπική εικόνα ως προς το γονίδιο *PRNP* της φυλής Χίου. Ο αριθμός των ποιμνίων που εξετάστηκαν αντιστοιχεί περίπου στο ένα τρίτο του συνολικού αριθμού ποιμνίων, όπου εκτρέφονται καθαρόαιμα πρόβατα της φυλής και είναι καταγεγραμμένα στο εθνικό γενεαλογικό βιβλίο (στοιχεία Κέντρου Γενετικής Βελτίωσης Ζώων Νέας Μεσημβρίας, Αγροτικού Συνεταιρισμού Προβατοτρόφων φυλής Χίου «Μακεδονία», 2007). Η ορθότητα των γενοτυπικών αναλύσεων επιβεβαιώθηκε δειγματοληπτικά, με τον προσδιορισμό της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας σε 22 δείγματα. Ο εν λόγω προσδιορισμός αποτελεί την απόλυτη μέθοδο γενοτυπικού προσδιορισμού, αλλά η ευρείας κλίμακας εφαρμογή της είναι αδύνατη λόγω του πολύ υψηλού κόστους. Επιπλέον, η ορθότητα των αναλύσεων επιβεβαιώθηκε με τον ταυτόχρονο προσδιορισμό των γενοτύπων 20 προβατίνων τόσο από δείγματα αίματος όσο και από ατομικά δείγματα γάλατος.

Από την ανασκόπηση της διεθνούς βιβλιογραφίας διαπιστώθηκε ότι οι γενοτυπικές συχνότητες του γονιδίου *PRNP* της φυλής Χίου είχαν προσδιοριστεί στα πλαίσια και άλλων μελετών στην Ελλάδα (Billinis και συν., 2004, Ekateriniadou και συν., 2007α) και στην Κύπρο (Παπασάββα-Στυλιανού, 2003). Πιο συγκεκριμένα, οι δύο μελέτες που διεξήχθησαν στην Ελλάδα αφορούσαν στην πρώτη περίπτωση το γενοτυπικό προσδιορισμό 110 προβάτων από πέντε ποίμνια (Billinis και συν., 2004), και στη δεύτερη περίπτωση τον προσδιορισμό 65 προβάτων που εκτρέφονταν στην ηπειρωτική Ελλάδα και 37 προβάτων που εκτρέφονταν στη νησιωτική Ελλάδα σε συνολικά δεκαπέντε ποίμνια (Ekateriniadou και συν., 2007α). Η μελέτη που εκπονήθηκε στην Κύπρο αναφερόταν σε 145 πρόβατα από 6 ποίμνια. Όλες οι παραπάνω μελέτες χρησιμοποίησαν ως δειγματοληπτικό υλικό το αίμα.

Στην παρούσα μελέτη, το μεγαλύτερο μέγεθος της δειγματοληψίας επέτρεψε την ανίχνευση αλληλομόρφων του γονιδίου *PRNP* που δεν είχαν εντοπιστεί στο παρελθόν, καθώς και μία ακριβέστερη εκτίμηση των γενοτυπικών συχνοτήτων. Αναλυτικότερα, διαπιστώθηκε ότι ο συχνότερος γενότυπος του γονιδίου *PRNP* στη φυλή Χίου είναι ο ARQ/ARQ, με ποσοστό 56% (55,97%). Στις δύο προγενέστερες μελέτες που διεξήχθησαν στην Ελλάδα, ο ARQ/ARQ γενότυπος ανιχνεύτηκε σε

ποσοστό 50,8% (Billinis και συν., 2004) και 76,1% για τα πρόβατα Χίου που εκτρέφονται στην ηπειρωτική Ελλάδα και 28,2% για αυτά που εκτρέφονται στη νησιωτική Ελλάδα (Ekateriniadou και συν., 2007α), ενώ στην Κύπρο ανιχνεύτηκε σε ποσοστό 66,69%. Ο γενότυπος ARQ/ARQ φαίνεται ότι επικρατεί και σε ξενικές φυλές, όπως στην Ισπανική φυλή προβάτων γαλακτοπαραγωγικής κατεύθυνσης Ράσα Αραγονέσα με ποσοστό 57,67% (Alvarez και συν., 2006), ενώ σε άλλες φυλές η συχνότητα του είναι μικρότερη, όπως για παράδειγμα στη γερμανική φυλή Φριςλανδίας, όπου ανιχνεύτηκε σε ποσοστό 30% (Junghans και συν., 1998).

Στα πλαίσια της παρούσας μελέτης, ανιχνεύτηκε, στο κωδικόνιο 136, ο ανεπιθύμητος πολυμορφισμός  $V_{136}$ , σε ποσοστό 0,4% και πάντα σε ετεροζύγωτη μορφή. Ο πολυμορφισμός αυτός δεν είχε ανιχνευτεί σε καμία από τις προηγούμενες μελέτες με πρόβατα της φυλής Χίου, πιθανότατα λόγω του μικρού μεγέθους των μελετών αυτών. Βάση των παραπάνω αποτελεσμάτων, θα μπορούσε να λεχθεί ότι η φυλή προβάτων Χίου ανήκει στις επονομαζόμενες φυλές «Αλανίνης», που χαρακτηρίζονται από αυξημένες συχνότητες του αλληλομόρφου ARQ και από πολύ χαμηλές συχνότητες του VRQ (Baylis και Goldmann, 2004). Αντίθετα, σε άλλες φυλές προβάτων ο πολυμορφισμός VRQ έχει ανιχνευτεί σε υψηλότερες συχνότητες και έχει συνδεθεί με την εμφάνιση της τρομώδους νόσου. Για παράδειγμα, το  $V_{136}$  βρέθηκε στα θετικά για την τρομώδη νόσο πρόβατα της φυλής Ιλ ντε Φρανς (Ill de France) (Laplace και συν., 1993) και Λακών (Cloucard και συν., 1995) σε ποσοστά 60% και 13,8%, αντίστοιχα.

Στο κωδικόνιο 136, ο πολυμορφισμός  $T_{136}$  ανιχνεύτηκε σε ποσοστό 7,7% και κυρίως σε ετεροζύγωτη μορφή. Το  $T_{136}$  είναι ένας καινούργιος πολυμορφισμός, που ανιχνεύτηκε για πρώτη φορά στην Ελλάδα το 2004, στα πρόβατα φυλής Χίου (Billinis και συν., 2004) σε ποσοστό 5% και αποκλειστικά σε ετεροζύγωτη μορφή. Στην Κύπρο ανιχνεύτηκε σε ποσοστό 2,7% σε ετεροζύγωτη μορφή και 0,7% σε ομοζύγωτη μορφή (Παπασάββα-Στυλιανού, 2003). Σε μία πρόσφατη μελέτη των γενοτύπων του *PRNP* αυτοχθόνων φυλών προβάτων στην Τουρκία, διαπιστώθηκε και στα πρόβατα αυτά η παρουσία του πολυμορφισμού  $T_{136}$  (Ün και συν., 2008). Στην παρούσα μελέτη το  $T_{136}$  ανιχνεύτηκε για πρώτη φορά με ανάλυση RFLP. Οι προηγούμενες δημοσιευμένες μελέτες είχαν ανιχνεύσει τον πολυμορφισμό αυτό με τη μέθοδο DGGE και με τη μέθοδο προσδιορισμού της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας του γονιδίου.

Στο κωδικόνιο 154, ο πολυμορφισμός  $H_{154}$  βρέθηκε σε ποσοστό 8,2%. Το 16,2% των προβατινών ήταν ετεροζύγωτες AHQ, ενώ μόλις 0,1% ήταν ομοζύγωτες. Οι Billinis και συν. (2004) και Ekateriniadou και συν. (2007α) ανίχνευσαν μόνο ετεροζύγωτα ζώα σε ποσοστό 15,5% ο πρώτος και 3,75% η δεύτερη για τα πρόβατα που εκτρέφονταν στην ηπειρωτική Ελλάδα ενώ δεν ανιχνεύτηκαν πρόβατα με τον πολυμορφισμό αυτό μεταξύ των προβάτων που εκτρέφονταν στην νησιωτική Ελλάδα. Στην Κύπρο, το  $H_{154}$  ανιχνεύτηκε σε πολύ χαμηλότερο ποσοστό (1,4%, Παπασάββα-Στυλιανού, 2003). Σε ορισμένες φυλές, ο συγκεκριμένος πολυμορφισμός έχει ανιχνευτεί σε ποσοστά ανάλογα με αυτά που ταυτοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη, ενώ σε άλλες φυλές έχει ανιχνευτεί σε πολύ υψηλότερα ποσοστά. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η φυλή Φρισλανδίας, στην οποία το  $H_{154}$  εντοπίστηκε σε ποσοστό 49% σε ετεροζύγωτη μορφή και 15% σε ομοζύγωτη μορφή (Junghans και συν., 1998). Σύμφωνα με μία μελέτη που αφορούσε ελληνικά πρόβατα, τα ζώα με γενότυπο ARQ/ARQ, TRQ/ARQ, VRQ/VRQ εμφανίζουν 3,75, 3,5, 2,7 φορές αντίστοιχα, μεγαλύτερες πιθανότητες να νοσήσουν από τρομώδη νόσο σε σύγκριση με τα ARQ/AHQ πρόβατα (Billinis και συν., 2004). Αντιθέτως, μία μεταγενέστερη μελέτη, που αφορούσε πρόβατα φυλής Χίου και μιγάδες-απογόνους προβάτων φυλής Χίου, έδειξε ότι για τη φυλή αυτή το αλληλόμορφο AHQ συσχετίζεται με αυξημένη ευαισθησία στην κλασική μορφή της τρομώδους νόσου (Ekateriniadou και συν., 2007β). Συγκεκριμένα, διαπιστώθηκε ότι τα πρόβατα μιγάδες-απόγονοι Χίου εμφανίζουν δέκα φορές μεγαλύτερη πιθανότητα να νοσήσουν όταν είναι φορείς του αλληλομόρφου AHQ. Το αλληλόμορφο AHQ σε ορισμένες φυλές προβάτων, όπως για παράδειγμα στα ιταλικά Μασές (Massese) έχει συσχετιστεί με αυξημένη ευαισθησία στην κλασική τρομώδη νόσο (Vascellari και συν., 2005), ενώ σε άλλες φυλές, όπως στα Σέβιοι, στα Τέξελ και στα Μερινός με αυξημένη ανθεκτικότητα και με μεγάλες περιόδους επώασης (Hunter και συν., 1996, Belt και συν., 1995, Molina και συν., 2006).

Στο κωδικόνιο 171 ο επιθυμητός πολυμορφισμός  $R_{171}$  ταυτοποιήθηκε σε ποσοστό 6,9% στην παρούσα μελέτη. Μόνο το 0,39% των προβατινών (4 στις 1.013) ήταν ARR/ARR, ενώ το 12,9% ήταν ετεροζύγωτοι φορείς του αλληλομόρφου αυτού. Οι Billinis και συν. (2004) ανίχνευσαν, σε ποσοστό 14,5%, ετεροζύγωτους φορείς του ARR και κανέναν ομοζύγωτο. Οι Ekateriniadou και συν. (2007α) ανίχνευσαν 10,8% ομοζύγωτα ζώα ARR/ARR και 26,2% ετεροζύγωτους φορείς του ARR στα πρόβατα που εκτρέφονταν στην ηπειρωτική χώρα, ενώ στη νησιωτική τα ποσοστά που

ανιχνεύτηκαν ήταν αντίστοιχα 5,15% και 61,5%. Η Παπασάββα-Στυλιανού (2003) στην Κύπρο ανίχνευσε το R<sub>171</sub> σε ποσοστό 16,5%. Συνεπώς, οι δύο τελευταίες μελέτες, λόγω του περιορισμένου μεγέθους και εύρους της δειγματοληψίας τους, φαίνεται ότι είχαν υπερεκτιμήσει την παρουσία του ανθεκτικού ARR αλληλομόρφου στη φυλή αυτή. Το επιθυμητό αυτό αλληλόμορφο στα πρόβατα Φριςλανδίας ανιχνεύτηκε, πριν ξεκινήσουν τα προγράμματα γενετικής βελτίωσης για την αύξηση της ανθεκτικότητας στην τρομώδη νόσο, σε ποσοστό ανάλογο με εκείνο της παρούσας μελέτης (6% και μόνο σε ετεροζύγωτη μορφή). Σε άλλες φυλές αυτό το αλληλόμορφο έχει εντοπιστεί σε υψηλότερες συχνότητες. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η γαλλική φυλή Λακών, όπου, πριν ξεκινήσει το πρόγραμμα γενετικής βελτίωσης, το R<sub>171</sub> ανιχνεύτηκε σε ποσοστό 24,8% (Cloucard και συν., 1995).

Στο κωδικόνιο 171 εντοπίστηκε, στα πλαίσια της παρούσας έρευνας, ο πολυμορφισμός H<sub>171</sub> σε ένα μικρό ποσοστό (0,7%) και μόνο σε ετεροζύγωτη μορφή. Στην Κύπρο δεν ανιχνεύτηκε το H<sub>171</sub>. Στην Ελλάδα ανιχνεύτηκε μόνο στη μελέτη των Ekateriniadou και συν. (2007<sub>a</sub>) σε ποσοστό 1,5% και 11,5% για τα πρόβατα που εκτρέφονταν στην ηπειρωτική και νησιωτική Ελλάδα, αντίστοιχα. Στα ζώα της φυλής Λακών ο πολυμορφισμός αυτός εντοπίστηκε σε ποσοστό 5,6% (Cloucard και συν., 1995), ενώ σε άλλες φυλές, όπως είναι στα Τέξελ, σε πολύ υψηλότερο ποσοστό (40%, Drögemüller και συν., 2001).

Σχετικά με το κωδικόνιο 171, αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι στη φυλή Χίου έχει ανιχνευτεί, στη θέση αυτή, και ο πολυμορφισμός λυσίνη (K<sub>171</sub>). Πιο συγκεκριμένα, ο πολυμορφισμός αυτός ανιχνεύτηκε σε μεγάλο ποσοστό (12,4%) στην Κύπρο (Παπασάββα-Στυλιανού, 2003), ενώ στις προηγούμενες μελέτες στην Ελλάδα, το K<sub>171</sub> δεν είχε ανιχνευτεί. Με το πρωτόκολλο της ανάλυσης RFLP που εφαρμόστηκε στα πλαίσια της παρούσας μελέτης δεν ήταν εφικτός ο προσδιορισμός αυτού του πολυμορφισμού. Συνεπώς, το K<sub>171</sub> ενδεχομένως να υπάρχει σε ένα μικρό ποσοστό στον πληθυσμό των προβάτων φυλής Χίου που εκτρέφεται στην Ελλάδα και με το πρωτόκολλο που εφαρμόστηκε να ερμηνεύτηκε ως Q<sub>171</sub>. Πάντως, στα 22 δείγματα που έγινε επαλήθευση με τον προσδιορισμό της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας δεν ανιχνεύτηκε ο εν λόγω πολυμορφισμός.

Αναφορικά με το κωδικόνιο 141, μόνο ο πολυμορφισμός λευκίνη (L<sub>141</sub>), που έχει συσχετιστεί με ανθεκτικότητα στην άτυπη μορφή της τρομώδους νόσου, ταυτοποιήθηκε στη θέση αυτή. Σύμφωνα, λοιπόν, με τα αποτελέσματα της παρούσας

έρευνας θα μπορούσε να λεχθεί ότι η φυλή Χίου δεν παρουσιάζει ευπάθεια στην άτυπη μορφή της νόσου. Στις μέχρι τώρα δημοσιευμένες μελέτες για τα πρόβατα φυλής Χίου δεν αναφέρονται πληροφορίες σχετικά με τους πολυμορφισμούς στο κωδικόνιο αυτό. Στην πραγματικότητα, υπάρχουν λίγες πληροφορίες στη διεθνή βιβλιογραφία σχετικά με τους πολυμορφισμούς στο κωδικόνιο 141 και στις άλλες φυλές προβάτων. Υπάρχει μόνο μία πρόσφατη δημοσιευμένη μελέτη πέντε Ιταλικών φυλών προβάτων, που πληροφορεί σχετικά με την ευαισθησία των φυλών αυτών στην άτυπη μορφή της τρομώδους νόσου (Pongolini και συν., 2009). Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της έρευνας αυτής, ο πολυμορφισμός φαινυλαλανίνη (F<sub>141</sub>) ανιχνεύτηκε σε ποσοστό 2,53% στη φυλή γαλακτοπαραγωγών προβάτων Σαρδηνίας, ενώ απουσίαζε από τη φυλή Κομισάνα. Στις φυλές κρεοπαραγωγών προβάτων Μπεργκαμάσκα (Bergamasca), Απενίνικα (Appenninica) και Μασές η συχνότητα του F<sub>141</sub> κυμαινόταν από 0,34% έως 10,70%. Ο γενοτυπικός προσδιορισμός στη θέση 141 από τους Pongolini και συν. (2009) πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας μία μέθοδο που ονομάζεται multiplex primer extension assay, ενώ στην παρούσα διατριβή χρησιμοποιήθηκε ανάλυση RFLP.

## **ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΓΕΝΟΤΥΠΩΝ ΜΕ ΒΑΣΗ ΤΟ ΓΑΛΑ ΣΕ ΟΜΑΔΙΚΟ ΕΠΙΠΕΔΟ**

Η δυνατότητα ανίχνευσης ανεπιθύμητων αλληλομόρφων του γονιδίου *PRNP* σε επίπεδο ποιμνίου, θα μπορούσε να αποτελέσει χρήσιμο εργαλείο στα πλαίσια της εφαρμογής ενός προγράμματος γενετικής επιλογής για την αύξηση της ανθεκτικότητας των ζώων στην τρομώδη νόσο. Η μέθοδος που αναπτύχθηκε στα πλαίσια της παρούσας διατριβής θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί για τη διενέργεια μαζικών ελέγχων σε ποίμνια προβάτων για τον εντοπισμό ζώων-φορέων ανεπιθύμητων αλληλομόρφων, όπως για παράδειγμα του VRQ και του AHQ (αναφορικά με τα πρόβατα φυλής Χίου). Τα ζώα αυτά πρέπει να εντοπίζονται και να απομακρύνονται (Palhière και συν., 2006). Στα ποίμνια που είναι απαλλαγμένα από ανεπιθύμητα αλληλόμορφα αρκεί η εισαγωγή σε αυτά ανθεκτικών κριών (ARR/ARR) (Palhière και συν., 2006), έτσι ώστε, με προγραμματισμένες συζεύξεις, να επέλθει η επιθυμητή βελτίωση.



Αξιοποιώντας, δηλαδή, τις δυνατότητες που μας δίνει ο γενοτυπικός προσδιορισμός του ποιμνίου με βάση το γάλα της δεξαμενής ψύξης, εξοικονομούνται χρόνος και χρήματα και μειώνεται ο φόρτος εργασίας που συνεπάγονται οι ατομικοί γενοτυπικοί προσδιορισμοί για τον εντοπισμό των ανεπιθύμητων ζώων.

Επιπλέον, με την παρούσα μεθοδολογία είναι δυνατή η πιστοποίηση του πρόβειου γάλατος και των προϊόντων του ως προερχόμενα από ποίμνια απαλλαγμένα από ζώα-φορείς αλληλομόρφων ευαίσθητων στις μεταδοτικές σπογγώδεις εγκεφαλοπάθειες, όπως για παράδειγμα του VRQ. Στα πλαίσια της στρατηγικής για την αναβάθμιση της ανταγωνιστικότητας των ευρωπαϊκών προϊόντων διεθνώς, η Ευρωπαϊκή Επιτροπή συμπεριέλαβε το θέμα αυτό στον κατάλογο των ερευνητικών προτεραιοτήτων της (FP6 project Riskscrea, <http://www.riskscrea.eu/>). Με το πρωτόκολλο που περιγράφηκε στην παρούσα διατριβή, είναι δυνατή η άμεση ταυτοποίηση των ποιμνίων, που είναι απαλλαγμένα από το ανεπιθύμητο αλληλόμορφο VRQ και συνεπώς είναι εφικτή η αντίστοιχη πιστοποίηση του γάλατος και των παραγώγων που προέρχονται από αυτά. Σε μία χώρα όπως η Ελλάδα, όπου πολλά από τα Προϊόντα Ονομασίας Προέλευσης έχουν ως βάση το πρόβειο γάλα, θα μπορούσε να αξιοποιηθεί η μέθοδος αυτή, για την προώθηση των ελληνικών προϊόντων, τόσο στην εγχώρια, όσο και στη διεθνή αγορά.

Αναφορικά με τη προτεινόμενη μέθοδο, αυτή απαρτίζεται από ένα πρωτόκολλο ένθετης PCR, το οποίο ακολουθεί ανάλυση RFLP με αυξημένες συγκεντρώσεις ενδονουκλεασών περιορισμού. Τα πρωτόκολλα αυτά αναπτύχθηκαν στα πλαίσια της προσπάθειας προσαρμογής της ανάλυσης RFLP για την επιτυχή ανίχνευση πολυμορφισμών που περιέχονται ακόμα και σε χαμηλές συγκεντρώσεις σε ένα ποίμνιο. Για το σκοπό αυτό, δημιουργήθηκαν πειραματικά δείγματα με αναμίξεις ατομικών δειγμάτων γάλατος και DNA προβατινών με γνωστό γενότυπο.

Υιοθετήθηκε η ένθετη PCR προκειμένου να παραχθούν ζώνες προϊόντων υψηλής έντασης και να αποφευχθεί ο πολλαπλασιασμός παραπροϊόντων, παράγοντες που επηρεάζουν τα όρια ανίχνευσης της μεθόδου. Πράγματι, η ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης των προϊόντων της ένθετης PCR επιβεβαίωσε την παραγωγή ομοιόμορφων, πολύ καθαρών και ευδιάκριτων ζωνών DNA, ιδανικών για ανάλυση RFLP.

Στα δείγματα των πειραματικών αναμίξεων εφαρμόστηκε, αρχικά, ανάλυση με ενδονουκλεάσες περιορισμού με τον τρόπο που προτείνεται από τις κατασκευάστριες

εταιρείες. Με το πρωτόκολλο αυτό, τα όρια ανίχνευσης των αλληλομόρφων του γονιδίου *PRNP* ήταν πολύ υψηλά και καθιστούσαν τη μέθοδο μη αξιόπιστη. Η διακριτική ικανότητα της μεθόδου αυξήθηκε όταν υποβλήθηκε σε πέψη μεγαλύτερη ποσότητα προϊόντος PCR, με παράλληλη αύξηση της συγκέντρωσης των ενδονουκλεασών περιορισμού. Τα παραπάνω, είχαν ως αποτέλεσμα την αύξηση της συγκέντρωσης των προϊόντων πέψης, ώστε αυτά να είναι ορατά ύστερα από ηλεκτροφόρηση. Επίσης, τα προϊόντα της πέψης ήταν περισσότερο ορατά όταν χρησιμοποιήθηκε πηκτή αγαρόζης με μικρότερο πάχος και συγκέντρωση 2%. Το ίδιο ευνοϊκό αποτέλεσμα είχε και η αύξηση του χρόνου διεξαγωγής της ηλεκτροφόρησης.

Αναφορικά με τα όρια ανίχνευσης της μεθόδου που αναπτύχθηκε, αυτά προσδιορίστηκαν με ακρίβεια κατόπιν πειραματισμών με δείγματα που δημιουργήθηκαν στο εργαστήριο με ανάμιξη ισομοριακών πλασμιδιακών DNA και ισομοριακών απομονώσεων DNA των προβατινών. Αρχικά, προσδιορίστηκαν τα όρια ανίχνευσης για το αλληλόμορφο VRQ με τα ακριβή πρότυπα πλασμιδιακού DNA. Ακολούθησε ο προσδιορισμός του ορίου ανίχνευσης του ίδιου αλληλομόρφου με τα δείγματα ισομοριακών απομονώσεων προκειμένου να συγκριθούν τα αποτελέσματα των δύο πειραματισμών. Διαπιστώθηκε ταύτιση των αποτελεσμάτων, οπότε ακολούθησε ο προσδιορισμός του ορίου ανίχνευσης και για τα υπόλοιπα αλληλόμορφα, με τη βοήθεια δειγμάτων ισομοριακών απομονώσεων. Οι πειραματισμοί έδειξαν ότι, για κάθε πολυμορφισμό, υπήρχαν συγκεκριμένα όρια ανίχνευσης. Για το VRQ και το AHQ τα όρια αυτά ήταν 0,5%, για το ARR και το ARH 4%, ενώ για το TRQ 8%. Για το VRQ τα όρια αυτά μεταφράζονται ως 1 ομοζύγωτο ζώο στα 200 αρμεγόμενα ή 1 ετεροζύγωτο VRQ ζώο στα 100 αρμεγόμενα.

Συγκρίνοντας τις συχνότητες των αλληλομόρφων του γονιδίου *PRNP* που προσδιορίστηκαν στον πληθυσμό προβάτων φυλής Χίου με τα όρια ανίχνευσης των αλληλομόρφων αυτών σε επίπεδο ποιμνίου διαπιστώθηκε ότι για τα AHQ και ARR τα όρια που προσδιορίστηκαν ήταν πολύ χαμηλότερα από τη συχνότητα εμφάνισης τους. Για το αλληλόμορφο TRQ, το όριο ανίχνευσης με τη συχνότητα εμφάνισης σχεδόν ταυτίζονται (8% και 7,7%, αντίστοιχα). Η συχνότητα του VRQ στον πληθυσμό ήταν οριακά χαμηλότερη σε σχέση με το προσδιορισμένο όριο ανίχνευσης (0,4% έναντι 0,5%). Ωστόσο, αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι μόλις σε τρία από τα 23 ποιμνία που γενοτυπήθηκαν για το γονίδιο *PRNP* ανιχνεύτηκαν φορείς του VRQ. Στα ποιμνία αυτά η συχνότητα εμφάνισης του VRQ ήταν πολύ μεγαλύτερη από τη

συχνότητα εμφάνισης του στον πληθυσμό. Συνεπώς, με την εφαρμογή της προτεινόμενης μεθόδου στα τρία ποίμνια θα μπορούσε να ανιχνευτεί χωρίς προβλήματα η παρουσία του VRQ σε αυτά. Μόνο για το αλληλόμορφο ARH τα όρια ανίχνευσης που προσδιορίστηκαν (4%) ήταν υψηλότερα από τη συχνότητα του αλληλομόρφου αυτού στον πληθυσμό (0,7%). Ωστόσο, το αλληλόμορφο αυτό δεν συσχετίζεται με αυξημένη ευαισθησία ή ανθεκτικότητα των προβάτων σε καμία από τις δύο μορφές της τρομώδους νόσου, και συνεπώς ο εντοπισμός του στο ποίμνιο δεν συνοδεύεται από πρακτικό ενδιαφέρον.

Οι πειραματισμοί που έγιναν, στη συνέχεια, με δείγματα γάλατος πολλαπλών ζώων, τα οποία δημιουργήθηκαν ύστερα από ανάμιξη ατομικών δειγμάτων νοπού γάλατος προβατινών με γνωστό γενότυπο, με στόχο την προσομοίωση δειγμάτων ποιμνίου από μία δεξαμενή ψύξης, έδειξαν ότι ισχύουν τα ίδια όρια ανίχνευσης με τα ισομοριακά δείγματα. Βεβαίως, όταν στο συνολικό γάλα οι πολυμορφισμοί βρίσκονταν σε μεγάλη συγκέντρωση, η πέψη από τις ενδονουκλεάσες περιορισμού ήταν δυνατή και πάντα ορατή. Όταν, όμως, η συγκέντρωσή τους ήταν χαμηλή, παρατηρήθηκε μία μικρή παραλλακτικότητα αναφορικά με τη δυνατότητα ανίχνευσης των πολυμορφισμών. Μία πιθανή ερμηνεία των αποτελεσμάτων αυτών είναι ότι η συγκέντρωση των προς ανίχνευση πολυμορφισμών μπορεί να πέσει κάτω από το όριο ανίχνευσης, στην περίπτωση που ζώα τα οποία φέρουν άλλους πολυμορφισμούς συμμετέχουν στο συνολικό γάλα με μεγαλύτερο αριθμό σωματικών κυττάρων. Ο αριθμός των σωματικών κυττάρων του γάλατος διαφέρει από προβατίνα σε προβατίνα (Bergonier και συν., 2003). Επιπλέον, στην ίδια προβατίνα παρατηρείται μία φυσιολογική διακύμανση του αριθμού αυτού ανάλογα με το στάδιο και τον αριθμό της γαλακτικής περιόδου, την εποχή, την παρουσία οίστρου και τις συνθήκες καταπόνησης του ζώου (Bergonier και συν., 2003). Η παρουσία υποκλινικής μαστίτιδας θα μπορούσε, επίσης, να επηρεάσει τον αριθμό των σωματικών κυττάρων του γάλατος (Bergonier και συν., 2003). Για παράδειγμα, το VRQ στα δείγματα από τις τεχνητές προσμίξεις γάλατος διαφορετικών προβατινών ανιχνεύτηκε σε ελάχιστη συγκέντρωση 0,5%, αλλά και 2%. Με βάση τα παραπάνω, για τη σίγουρη ανίχνευση του VRQ σε ένα ποίμνιο προτείνεται η συλλογή δειγμάτων από συνολικό γάλα έως και 25 ζώων, αντί για το θεωρητικό 100. Πρακτικά, αυτό σημαίνει ότι, αν ένα ποίμνιο έχει αρμεκτικό σύστημα 24 θέσεων, ανά βάρδια θα πρέπει να λαμβάνονται δύο δείγματα (50 ml) από το συνολικό γάλα. Η λήψη και η ανάλυση δύο δειγμάτων από τη δεξαμενή ψύξης εξασφαλίζουν την

αντιπροσωπευτικότητα της δειγματοληψίας. Στην περίπτωση που σε κάποιο δείγμα εντοπιστεί η παρουσία του αλληλομόρφου, πρέπει να ακολουθήσει ατομικός γενοτυπικός προσδιορισμός στα συγκεκριμένα 24 ζώα, προκειμένου να εντοπιστεί ο φορέας του VRQ. Επιπλέον, επειδή σε κάποια δειγματοληψία μπορεί είτε ορισμένα ζώα-φορείς συγκεκριμένων γενοτύπων, να έχουν αυξημένο αριθμό σωματικών κυττάρων σε σχέση με το μέσο όρο, είτε κάποιες προβατίνες να μην αρμεχτούν την ημέρα της δειγματοληψίας, συνίσταται η επανάληψη της διαδικασίας μετά από ορισμένο διάστημα. Με τον τρόπο αυτό, αφενός ελέγχονται όλα τα αρμεγόμενα ζώα και αφετέρου επιβεβαιώνονται τα αποτελέσματα της αρχικής ανάλυσης.

## **ΔΥΝΑΤΟΤΗΤΕΣ ΑΞΙΟΠΟΙΗΣΗΣ ΤΟΥ ΑΤΟΜΙΚΟΥ ΓΑΛΑΤΟΣ ΚΑΙ ΤΟΥ ΓΑΛΑΤΟΣ ΤΗΣ ΔΕΞΑΜΕΝΗΣ ΨΥΞΗΣ ΤΗΣ ΕΚΤΡΟΦΗΣ**

Το τροποποιημένο Nucleosprin Blood θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί για την επιτυχή απομόνωση DNA από τα σωματικά κύτταρα τόσο του αγελαδινού όσο και του γίδινου γάλατος. Η δυνατότητα αυτή προκύπτει από το γεγονός ότι το γάλα αυτών των ζώων εμπεριέχει λιγότερα συνολικά στερεά, λιγότερο λίπος και πρωτεΐνες σε σχέση με το πρόβειο γάλα (Μάντης, 2000).

Συνεπώς, η προτεινόμενη μέθοδος γενοτυπικού προσδιορισμού από τα ατομικά δείγματα γάλατος μπορεί να έχει και πολλές άλλες εφαρμογές στα αρμεγόμενα μηρυκαστικά, πέρα από την ανίχνευση πολυμορφισμών που σχετίζονται με την ευπάθεια ή την ανθεκτικότητα στην τρομώδη νόσο. Θα μπορούσε, για παράδειγμα, να χρησιμοποιηθεί για τη διερεύνηση της γενετικής προδιάθεσης που εμφανίζουν τα πρόβατα, τα γίδια ή οι αγελάδες σε άλλα νοσήματα ή για την εξάλειψη γενετικών ασθενειών, όπως είναι η προσκολλητική λευκοπενία στις αγελάδες (BLAD-Bovine leukocyte adhesion deficiency).

Επιπλέον, η αξιοποίηση του συνολικού γάλατος των εκτροφών δεν εξαντλείται στον έλεγχο της τρομώδους νόσου. Πράγματι, από την ανασκόπηση της διεθνούς βιβλιογραφίας διαπιστώθηκε ότι υπάρχει έντονο ερευνητικό ενδιαφέρον για το γάλα αυτό. Η δυνατότητα γενοτυπικών προσδιορισμών από τα σωματικά κύτταρα του συνολικού γάλατος ανοίγει νέους ορίζοντες στις μελέτες γενετικής βελτίωσης.

Ήδη έχει δημοσιευτεί μία εργασία, στην οποία μελετήθηκαν οι γονιδιακοί τόποι που σχετίζονται με την παραγωγή γάλατος και την περιεκτικότητα αυτού σε

πρωτεΐνες σε αγελάδες φυλής Brown Swiss, χρησιμοποιώντας ως πηγή DNA δείγματα συνολικού γάλατος από τεχνητές δεξαμενές ψύξης (Bagnato και συν., 2008). Κάθε μία από αυτές τις τεχνητές δεξαμενές περιείχε γάλα είτε από τα 200 πιο παραγωγικά είτε από τα 200 λιγότερο παραγωγικά ζώα. Με τη δημιουργία αυτών των δεξαμενών έγινε εφικτή η μελέτη πολύ μεγαλύτερου αριθμού αγελάδων από ό,τι θα ήταν εφικτή με την εφαρμογή πρωτοκόλλων ατομικού γενοτυπικού προσδιορισμού. Με ανάλογο τρόπο μπορούν να διερευνηθούν οικονομικού ενδιαφέροντος χαρακτηριστικά σε πληθυσμούς αγελάδων, προβάτων ή γιδιών.

Το συνολικό γάλα ενός ποιμνίου θα μπορούσε να αξιοποιηθεί και για τη διάγνωση λοιμωδών νοσημάτων σε αρμεγόμενα μηρυκαστικά. Η μέθοδος απομόνωσης DNA, που αναπτύχθηκε στα πλαίσια της παρούσας διατριβής, θα μπορούσε να αξιοποιηθεί και για την ανίχνευση, στο συνολικό γάλα της δεξαμενής ψύξης, παθογόνων μικροοργανισμών των οποίων το νουκλεϊνικό οξύ (DNA ή RNA) εντοπίζεται εντός των κυττάρων του γάλατος. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί ο ιός της προϊούσας πνευμονίας του προβάτου (ρετροϊός), στον οποίο ο DNA-προϊός ενσωματώνεται στο γονιδίωμα των μονοκυττάρων. Στην περίπτωση λοιπόν, μολυσμένων προβάτων, κατά την απομόνωση του DNA του ζώου απομονώνεται από τα μονοκύτταρα του γάλατος και το ενσωματωμένο DNA του παθογόνου ιού, το οποίο στη συνέχεια μπορεί να ανιχνευτεί με μοριακές αναλύσεις (PCR) (Extramiana και συν., 2002). Ένα άλλο παράδειγμα είναι ο ιός της ιογενούς διάρροιας (BVDV) των βοοειδών, που είναι ένας RNA ιός του οποίου το γενετικό υλικό εντοπίζεται εντός των σωματικών κυττάρων του γάλατος. Το πρωτόκολλο απομόνωσης DNA που αναπτύχθηκε στην παρούσα μελέτη θα μπορούσε να τροποποιηθεί κατάλληλα ώστε να εκχυλίζει το RNA του ιού. Ήδη υπάρχει η δυνατότητα μοριακού ελέγχου για τον ιό αυτό σε δείγματα συνολικού γάλατος (Renshaw και συν., 2000). Συγκεκριμένα, με δείγμα γάλατος 200 ml από τη δεξαμενή ψύξης μπορούν να ελεγχθούν ταυτόχρονα μέχρι και 600 αγελάδες (OIE, 2008). Η διάγνωση του νοσήματος αυτού σε επίπεδο εκτροφής προσανατολίζει στην υιοθέτηση του σωστού εμβολιακού προγράμματος.

Μία, ακόμα, πιθανή αξιοποίηση της μεθόδου απομόνωσης DNA από το συνολικό γάλα της δεξαμενής ψύξης είναι για την ανίχνευση νοθειών που γίνονται στο πρόβειο γάλα από το αγελαδινό ή το γίδινο με τη βοήθεια μοριακών τεχνικών.

## ΣΧΕΣΗ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ *PRNP* ΜΕ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΗΣ ΓΑΛΑΚΤΟΠΑΡΑΓΩΓΙΚΗΣ ΚΑΙ ΤΗΣ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΙΚΗΣ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ

### Σχέση του γονιδίου *PRNP* με τη γαλακτοπαραγωγική ικανότητα

Η εν λόγω σχέση μελετήθηκε στα πρόβατα φυλής Χίου, ως η επίδραση του γονιδίου *PRNP* στην ημερήσια γαλακτοπαραγωγή του μηνιαίου ελέγχου και στη συνολική γαλακτοπαραγωγή της γαλακτικής περιόδου. Για το σκοπό αυτό αναπτύχθηκαν δύο μικτά γραμμικά στατιστικά πρότυπα. Στα πρότυπα αυτά διορθώθηκε η επίδραση του γονιδίου *PRNP* ως προς όλους τους άλλους παράγοντες που επηρεάζουν, συστηματικά, τα χαρακτηριστικά που μελετήθηκαν, ώστε να διασφαλιστεί η εγκυρότητα των αποτελεσμάτων. Επίσης, το όριο στατιστικής σημαντικότητας για κάθε επεξεργασία διορθώθηκε με τη μέθοδο Bonferroni, προκειμένου να ελαχιστοποιηθεί η πιθανότητα τυχαίου σφάλματος. Επιπλέον, διερευνήθηκε η επίδραση του γονιδίου τόσο με τη μορφή γενοτύπου, όσο και με τη μορφή αλληλομόρφου.

Αναλυτικότερα, στην παρούσα έρευνα, δεν παρατηρήθηκε καμία στατιστικά σημαντική επίδραση των γενοτύπων του *PRNP* στη συνολική γαλακτοπαραγωγή της γαλακτικής περιόδου. Τα αποτελέσματα αυτά συμφωνούν με τα αποτελέσματα όλων σχεδόν των άλλων μελετών που έχουν πραγματοποιηθεί σε διάφορες φυλές προβάτων γαλακτοπαραγωγικής κατεύθυνσης (Λακών, Μάνεχ, Φριςλανδίας, Σαρδηνίας, Κομισάνα, Τσούρα). Μόνο σε μία ιταλική φυλή, τη Βάλε ντελ Μπέλις, η σχετική διερεύνηση έδειξε ότι υπάρχει επίδραση του γενοτύπου του *PRNP* στη συνολική γαλακτοπαραγωγή (van Kaam και συν., 2006). Ωστόσο, στην περίπτωση αυτή, οι ίδιοι οι ερευνητές αμφισβητούν τα αποτελέσματα της ανάλυσής τους, επειδή ο αριθμός των προβάτων με γενοτύπους που θεωρήθηκαν πιο παραγωγικοί ήταν περιορισμένος. Επίσης, αν και η μελέτη της φυλής Βάλε ντελ Μπέλις διαπίστωσε σημαντικές επιδράσεις των γενοτύπων στη γαλακτοπαραγωγή, κατέληξε στο ίδιο συμπέρασμα με όλες τις άλλες έρευνες, ότι δηλαδή η εφαρμογή ενός προγράμματος με στόχο την αύξηση του πληθυσμού των ARR/ARR προβάτων δε θα επηρεάσει αρνητικά τη γαλακτοπαραγωγή.

Η επίδραση όλων των αλληλομόρφων του *PRNP* στη γαλακτοπαραγωγή μελετήθηκε για πρώτη φορά διεθνώς στα πλαίσια της παρούσας διατριβής. Οι μελέτες που έχουν διεξαχθεί στο εξωτερικό αφορούν στην επίδραση των γενοτύπων στα χαρακτηριστικά της γαλακτοπαραγωγής. Με τη διερεύνηση της επίδρασης του

αλληλομόρφου, λαμβάνεται υπόψην μόνο η προσθετική δράση μεταξύ των τριών κωδικονίων, ενώ με το γενότυπο, εκτός από την επίδραση αυτή, υπολογίζονται και οι σχέσεις κυριαρχίας καθώς και οι σχέσεις επίστασης που ενδεχομένως να αναπτύσσονται μεταξύ των τριών κωδικονίων. Μόνο οι Pinelli και συν. (2006) εξέτασαν στα πρόβατα της φυλής Κομισάνα την επίδραση δύο αλληλομόρφων (ARQ και VRQ) στη γαλακτοπαραγωγή, χρησιμοποιώντας ανάλογη μεθοδολογία με την παρούσα. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα εκείνης της μελέτης, τα δύο αλληλόμορφα που εξετάστηκαν είχαν αρνητική επίδραση στη γαλακτοπαραγωγή, αλλά η επίδραση αυτή δεν ήταν στατιστικά σημαντική (Pinelli και συν., 2006). Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης αποκάλυψαν επίσης μία αρνητική, αλλά όχι στατιστικά σημαντική, επίδραση του ARQ αλληλομόρφου στην ημερήσια γαλακτοπαραγωγή του μηνιαίου ελέγχου και στη συνολική γαλακτοπαραγωγή της γαλακτικής περιόδου ( $P=0,086$  και  $0,065$ , αντίστοιχα). Η χαμηλή τιμή- $P$  είναι ενδεικτική μίας πιθανής αρνητικής σχέσης μεταξύ του ARQ αλληλομόρφου και της γαλακτοπαραγωγής, η οποία δεν υποστηρίζεται στατιστικά από την παρούσα μελέτη αλλά ενδεχομένως να εμφάνιζε στατιστική σημαντικότητα στα πλαίσια μίας άλλης μελέτης. Το αποτέλεσμα αυτό εμφανίζει ενδιαφέρον με δεδομένο ότι τόσο στα πρόβατα φυλής Χίου, όσο και σε όλες τις ελληνικές φυλές προβάτων, για τις οποίες υπάρχουν πληροφορίες για τη γενοτυπική τους εικόνα, το αλληλόμορφο ARQ εμφανίζει την υψηλότερη συχνότητα. Συνεπώς, στα πλαίσια ενός προγράμματος γενετικής επιλογής, κυρίως τα ζώα φορείς του ARQ θα αντικατασταθούν από ζώα φορείς του ARR.

Η παρούσα στατιστική επεξεργασία έδειξε ότι μόνο το αλληλόμορφο TRQ είχε στατιστικά σημαντική θετική επίδραση στην ημερήσια γαλακτοπαραγωγή του μηνιαίου ελέγχου. Ωστόσο, η σημαντικότητα του αποτελέσματος αυτού δε διατηρήθηκε μετά τη διόρθωση με τη μέθοδο Bonferroni. Παρόλα αυτά, θα μπορούσε να γίνει λόγος για μία τάση των ζώων που φέρουν TRQ να παράγουν περισσότερο γάλα, γεγονός που ενισχύεται και από την αυξημένη, κατά απόλυτη τιμή, συνολική γαλακτοπαραγωγή της γαλακτικής περιόδου των ζώων αυτών.

Η μελέτη της επίδρασης του γονιδίου *PRNP* στα γαλακτοπαραγωγικά χαρακτηριστικά επαναλήφθηκε χρησιμοποιώντας μόνο τα στοιχεία της βάσης δεδομένων που αφορούσαν την πρώτη γαλακτική περίοδο. Αυτό έγινε προκειμένου να διερευνηθεί αν το γονίδιο *PRNP* επηρεάζει την παραγωγικότητα των ζώων που εξακολουθούν να βρίσκονται στην περίοδο ανάπτυξης. Τα αποτελέσματα της στατιστικής επεξεργασίας έδειξαν ότι δεν υπήρχαν ουσιαστικές διαφορές, όσον

αφορά στην επίδραση του *PRNP*, μεταξύ πρώτης και επόμενων γαλακτικών περιόδων. Το γεγονός αυτό συνάδει με την ιδιαίτερη πρωιμότητα των προβάτων φυλής Χίου (Hatziminaoglou και συν., 1996).

Από τα παραπάνω γίνεται φανερό ότι δεν προέκυψαν σημαντικές επιδράσεις του γονιδίου *PRNP* στη γαλακτοπαραγωγική ικανότητα των προβάτων της φυλής Χίου. Συνεπώς, ένα πρόγραμμα επιλογής και εκτεταμένης χρήσης γεννητόρων-φορέων του ARR, δεν αναμένεται να επηρεάσει δυσμενώς το πρόγραμμα γενετικής βελτίωσης της φυλής για την αναβάθμιση της γαλακτοπαραγωγικής ικανότητας.

### **Σχέση του γονιδίου *PRNP* με την αναπαραγωγική ικανότητα**

Η σχέση του γονιδίου *PRNP* με την αναπαραγωγική ικανότητα μελετήθηκε τόσο ως η επίδραση των γενοτύπων όσο και των αλληλομόρφων του *PRNP* στο δείκτη πολυδυμίας, στην ηλικία κατά τον πρώτο τοκετό και στο ρυθμό σύλληψης με την πρώτη οχεία των προβατινών φυλής Χίου. Η στατιστική επεξεργασία πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια τριών μικτών γραμμικών στατιστικών προτύπων. Ο ρυθμός σύλληψης με την πρώτη οχεία λόγω του δυαδικού του χαρακτήρα επεξεργάστηκε και με ένα μη γραμμικό πρότυπο με τη χρήση της συνάρτησης logit. Στα πρότυπα αυτά, όπως και στην περίπτωση της μελέτης των χαρακτηριστικών της γαλακτοπαραγωγής, η επίδραση του γονιδίου *PRNP* διορθώθηκε ως προς όλους τους άλλους παράγοντες που τα επηρεάζουν, ώστε να διασφαλιστεί η εγκυρότητα των αποτελεσμάτων.

Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης έδειξαν πως δεν υπάρχει κάποια στατιστικά σημαντική επίδραση του γονιδίου *PRNP* στο δείκτη πολυδυμίας των προβάτων της φυλής Χίου. Τα αποτελέσματα αυτά συμφωνούν με τις αντίστοιχες μελέτες που έχουν διεξαχθεί στη φυλή γαλακτοπαραγωγών προβάτων Φριςλανδίας (De Vries και συν., 2005, Lipsky και συν., 2006) και σε πολλές φυλές προβάτων κρεοπαραγωγικής κατεύθυνσης, όπως στις Μπεκλέαρ (Sweeney και συν., 2007), Κολούμπια (Alexander και συν., 2005), Χαμσάρ (Alexander και συν., 2005), Σάφοκ (De Vries και συν., 2004α, Lipsky και συν., 2006) και Τέξελ (De Vries και συν., 2004α). Ωστόσο, τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης δεν επιβεβαίωσαν τα αποτελέσματα μίας πρόσφατα δημοσιευμένης έρευνας, που διεξήχθη στην Κύπρο σε πρόβατα φυλής Χίου, σύμφωνα με την οποία υπάρχει θετική επίδραση του γενοτύπου ARR/ARR στην πολυδυμία (Ioannides και συν., 2009). Πρέπει να σημειωθεί όμως ότι, ενώ η παρούσα είναι μία πληθυσμιακή μελέτη των προβάτων της



φυλής Χίου που εκτρέφονται στην Ελλάδα, η μελέτη των Ioannides και συν. (2009) αφορούσε ένα πειραματικό ποίμνιο 725 ζώων, όπου είχαν προεπιλεγεί συγκεκριμένοι γενότυποι προκειμένου να δημιουργηθεί ένα ποίμνιο-πυρήνας ανθεκτικών ζώων. Επιπλέον, για τη στατιστική επεξεργασία των δεδομένων στην Κύπρο χρησιμοποιήθηκε ένα απλούστερο πρότυπο, που δε λάμβανε υπόψη την επίδραση των άλλων παραγόντων στο εν λόγω χαρακτηριστικό. Οι παραπάνω διαφορές επαρκούν για να εξηγήσουν τη μη ταύτιση των αποτελεσμάτων των δύο ερευνών.

Από την ανασκόπηση της διεθνούς βιβλιογραφίας διαπιστώθηκε ότι η σχέση του γονιδίου *PRNP* με την ηλικία κατά τον πρώτο τοκετό δεν έχει μελετηθεί ευρέως. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της στατιστικής επεξεργασίας της παρούσας έρευνας, δε διαπιστώθηκε κάποια επίδραση των γενοτύπων του *PRNP* στο χαρακτηριστικό αυτό. Τα αποτελέσματα αυτά συμφωνούν με τις προηγούμενες μελέτες που έχουν διεξαχθεί στη φυλή προβάτων γαλακτοπαραγωγικής κατεύθυνσης Φρισλανδίας (De Vries και συν., 2005) και στις φυλές κρεοπαραγωγικής κατεύθυνσης Σάφοκ και Τέξελ (De Vries και συν., 2004α). Ωστόσο, από την παρούσα έρευνα στην οποία μελετήθηκε επιπλέον η επίδραση των αλληλομόρφων, διαπιστώθηκε ότι το αλληλόμορφο TRQ έχει αρνητική επίδραση στην ηλικία που έχουν τα πρόβατα κατά τον πρώτο τοκετό. Το αποτέλεσμα αυτό επιβεβαιώθηκε και μετά τη διόρθωση με τη μέθοδο Bonferroni. Έτσι, ζώα-φορείς του TRQ αναμένεται να γεννήσουν για πρώτη φορά αργότερα από ζώα-φορείς των άλλων αλληλομόρφων. Αντιθέτως, το αλληλόμορφο ARQ φάνηκε να έχει στατιστικά σημαντική θετική επίδραση στο χαρακτηριστικό αυτό, με τα ζώα-φορείς του να γεννούν νωρίτερα από το μέσο όρο. Αν και η διόρθωση Bonferroni δε στήριξε τη σημαντικότητα αυτή, εν τούτοις το αποτέλεσμα καταγράφεται ως τάση. Επιπλέον, η υψηλή συχνότητα εμφάνισης του αλληλομόρφου ARQ στον πληθυσμό συνάδει με την αναπαραγωγική πρωιμότητα που εμφανίζουν τα πρόβατα φυλής Χίου (Hatziminaoglou και συν., 1996). Τα υπόλοιπα αλληλόμορφα δεν εμφάνισαν κάποια επίδραση στην ηλικία κατά τον πρώτο τοκετό.

Το αλληλόμορφο ARQ φάνηκε αρχικά να έχει στατιστικά σημαντική θετική επίδραση στο ρυθμό σύλληψης με την πρώτη οχεία. Ωστόσο, όταν τα αποτελέσματα διορθώθηκαν με τη μέθοδο Bonferroni, έπαψε η επίδραση αυτή να είναι στατιστικά σημαντική. Βεβαίως, το ενδεχόμενο να υπάρχει θετική τάση του ARQ στην αναπαραγωγή θα μπορούσε να ερμηνεύσει την υψηλή συχνότητα εμφάνισης του αλληλομόρφου αυτού στα πρόβατα της φυλής Χίου, με δεδομένο ότι η

αναπαραγωγική ικανότητα αποτελεί κριτήριο επιλογής των ζώων. Διεθνώς, υπάρχει μόνο μία μελέτη διερεύνησης της επίδρασης του γονιδίου *PRNP* στο ρυθμό σύλληψης. Μάλιστα, δεν πρόκειται για πληθυσμιακή έρευνα, αλλά αφορά ένα πειραματικό ποίμνιο στην Πορτογαλία της αυτόχθονης φυλής προβάτων κρεοπαραγωγικής κατεύθυνσης Ριπολέσα (Casellas και συν., 2007). Στη μελέτη αυτή δεν παρατηρήθηκε κάποια σημαντική επίδραση του γονιδίου στο ρυθμό σύλληψης.

Η διερεύνηση της επίδρασης του γονιδίου *PRNP* στα αναπαραγωγικά χαρακτηριστικά επαναλήφθηκε χρησιμοποιώντας μόνο τα στοιχεία της βάσης δεδομένων που αφορούσαν την πρώτη γαλακτική περίοδο. Τα αποτελέσματα της στατιστικής επεξεργασίας έδειξαν πως δεν υπήρχαν ουσιαστικές διαφορές, όσον αφορά την επίδραση του *PRNP* μεταξύ πρώτης και επόμενων γαλακτικών περιόδων.

#### **Εφαρμογή σε προγράμματα γενετικής επιλογής εναντίον της τρομώδους νόσου στην Ελλάδα**

Από τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης, είναι εμφανές ότι το αλληλόμορφο ARR, που συνδέεται με αυξημένη ανθεκτικότητα στην κλασική μορφή της τρομώδους νόσου, δεν έχει κάποια επίδραση στα παραγωγικά και αναπαραγωγικά χαρακτηριστικά που μελετήθηκαν. Τα αποτελέσματα αυτά ταυτίζονται με τα αποτελέσματα των μελετών που διεξήχθησαν σε άλλες φυλές προβάτων γαλακτοπαραγωγικής κατεύθυνσης, σύμφωνα με τις οποίες το ARR δεν έχει κάποια ουσιαστική επίδραση στη γαλακτοπαραγωγή (Barillet και συν., 2002, De Vries και συν., 2005, Pinelli και συν., 2006, Van Kaam και συν., 2006, Salaris και συν., 2006, Alvarez και συν., 2006β) Επιπλέον, σε μία μελέτη που έγινε σε ένα πειραματικό ποίμνιο προβάτων, το INRA 401, που προήλθε από τη διασταύρωση των φυλών κρεοπαραγωγικής κατεύθυνσης Ρομανώφ (Romanov) με Μπερισόν ντύ Σερ (Berrichon du Cher), δεν παρατηρήθηκε κάποια επίδραση του αλληλομόρφου ARR στο δείκτη ωθηλακιορρηξίας των προβατινών (Vitezica και συν., 2006). Επιπροσθέτως, δε διαπιστώθηκε επίδραση του αλληλομόρφου ARR στην ηλικία κατά τον πρώτο τοκετό σε καμία από τις φυλές που μελετήθηκαν (De Vries και συν., 2004α). Ωστόσο, παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική θετική επίδραση του ARR στα μεσοδιαστήματα πρώτου και δεύτερου τοκετού στη φυλή προβάτων κρεοπαραγωγικής κατεύθυνσης Γερμανικά Μαυροκέφαλα Μουτόν (De Vries και συν., 2004α). Αντίστοιχα, δεν παρατηρήθηκε επίδραση του ARR αλληλομόρφου στο δείκτη πολυδυμίας σε περισσότερες από 30 μελέτες που μέχρι στιγμής έχουν

πραγματοποιηθεί (Sweeney και Hanrahan, 2008). Μοναδικές εξαιρέσεις αποτελούν η θετική επίδραση του εν λόγω αλληλομόρφου στη φυλή προβάτων Τέξελ, που αναφέρουν οι Brandsma και συν. (2004), και η αρνητική επίδρασή του στη φυλή Σάφολκ, που αναφέρουν οι Alexander και συν. (2005). Ωστόσο, οι προαναφερθείσες διαπιστώσεις δεν επιβεβαιώθηκαν από μεταγενέστερες μελέτες σε αυτές τις φυλές προβάτων (Sweeney και Hanrahan, 2008).

Βάσει όλων των παραπάνω, θα μπορούσε να εφαρμοστεί στην Ελλάδα ένα πρόγραμμα γενετικής επιλογής για την αύξηση της ανθεκτικότητας των προβάτων στην τρομώδη νόσο με επιλογή ζώων-φορέων του ARR και ταυτόχρονη απομάκρυνση φορέων του VRQ, χωρίς να επηρεαστεί η παραγωγικότητα των εγχώριων πληθυσμών.

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον θα είχε η εφαρμογή ενός τέτοιου προγράμματος στους πληθυσμούς προβάτων που ήδη βρίσκονται στη διαδικασία βελτίωσης για την αύξηση της παραγωγικότητάς τους (όπως της φυλής Χίου). Από τα ζώα αυτά, εξάλλου, θα προκύψουν και τα πρόβατα βελτιωτές του ευρύτερου ελληνικού πληθυσμού. Για παράδειγμα, θα μπορούσε στους ήδη υπάρχοντες βελτιωτικούς στόχους της φυλής Χίου, να συμπεριληφθεί η εκρίζωση του ανεπιθύμητου VRQ και η αύξηση του ανθεκτικού ARR αλληλομόρφου. Τα τελευταία πέντε χρόνια, όπως έχει ήδη αναφερθεί, ο συνεταιρισμός προβατοτρόφων φυλής Χίου «Μακεδονία», καταγράφει συστηματικά τα στοιχεία των αποδόσεων όλων των ζώων ως προς τη γαλακτοπαραγωγή και αναπαραγωγή, ενώ έχει αρχίσει η αξιοποίηση των στοιχείων αυτών για τη γενετική αξιολόγηση των κριών και των προβατινών, ώστε να γίνεται η σωστή επιλογή των ζώων-βελτιωτών. Εφόσον λοιπόν, στην παρούσα έρευνα δε διαπιστώθηκαν σημαντικές επιδράσεις του γονιδίου *PRNP* στα ζωοτεχνικά χαρακτηριστικά, καταλήγουμε στο συμπέρασμα ότι το πρόγραμμα γενετικής βελτίωσης της φυλής, για την αναβάθμιση των παραγωγικών και αναπαραγωγικών χαρακτηριστικών των ζώων, δεν αναμένεται να επηρεαστεί δυσμενώς από ένα παράλληλο πρόγραμμα επιλογής ανθεκτικών στην τρομώδη νόσο γενοτύπων.

## ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΠΡΟΤΑΣΕΙΣ

### ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Από την παρούσα έρευνα, που αφορά στον προσδιορισμό των γενοτύπων προβάτων ως προς το γονίδιο *PRNP* που σχετίζεται με ευπάθεια ή ανθεκτικότητα στην τρομώδη νόσο (scrapie) με βάση το DNA των σωματικών κυττάρων του γάλατος και στη σχέση μεταξύ γενοτύπων και ζωοτεχνικών χαρακτηριστικών, προκύπτουν τα παρακάτω συμπεράσματα:

- 1) Είναι εφικτός ο γενοτυπικός προσδιορισμός των προβάτων ως προς το γονίδιο *PRNP*, χρησιμοποιώντας ως δειγματοληπτικό υλικό το γάλα. Για την απομόνωση καλής ποιότητας DNA από το πρόβειο γάλα χρειάζονται, ωστόσο, ειδικές τροποποιήσεις στη διαδικασία απομόνωσης, ώστε να δεσμευτούν οι αναστολείς της PCR που περιέχονται στο υλικό αυτό. Στα πλαίσια της παρούσας διατριβής αναπτύχθηκε και εφαρμόστηκε συγκεκριμένη διαδικασία δειγματοληψίας, επεξεργασίας, αποθήκευσης και απομόνωσης DNA από το πρόβειο γάλα. Με την προτεινόμενη μέθοδο, επιτεύχθηκε 100% ακρίβεια στο γενοτυπικό προσδιορισμό των ζώων ως προς το γονίδιο *PRNP*.
- 2) Είναι εφικτός ο ταυτόχρονος προσδιορισμός των αλληλομόρφων του γονιδίου *PRNP* στα πρόβατα ενός ποιμνίου, με βάση το συνολικό γάλα που συλλέγεται στη δεξαμενή ψύξης. Με το πρωτόκολλο της ανάλυσης που αναπτύχθηκε στα πλαίσια της παρούσας διατριβής ανιχνεύτηκαν τα αλληλόμορφα του γονιδίου *PRNP* ακόμα και όταν βρίσκονταν σε χαμηλές συγκεντρώσεις (έως και 0,5%) στα δείγματα που αναλύθηκαν.
- 3) Δε διαπιστώθηκαν σημαντικές επιδράσεις των γενοτύπων και των αλληλομόρφων του γονιδίου *PRNP* στα γαλακτοπαραγωγικά και στα αναπαραγωγικά χαρακτηριστικά των προβάτων της φυλής Χίου, με μοναδική εξαίρεση την επίδραση του αλληλομόρφου TRQ στη γενετήσια ωριμότητα των προβατινών. Το αλληλόμορφο αυτό, όμως, δεν εμπλέκεται στην ανθεκτικότητα των ζώων στη νόσο. Αντίθετα, το επιθυμητό (ARR) και τα ανεπιθύμητα (VRQ, AHQ για τα πρόβατα φυλής Χίου) αλληλόμορφα δεν επηρεάζουν τα ζωοτεχνικά χαρακτηριστικά που μελετήθηκαν. Συνεπώς, είναι σαφής η δυνατότητα εφαρμογής ενός προγράμματος γενετικής επιλογής για την αύξηση της ανθεκτικότητας των προβάτων της φυλής Χίου στην τρομώδη

νόσο, χωρίς να επηρεαστούν τα παραγωγικά και αναπαραγωγικά τους χαρακτηριστικά.

## ΠΡΟΤΑΣΕΙΣ

Με βάση τα αποτελέσματα της παρούσας έρευνας και τα συμπεράσματα που προέκυψαν μπορούν να διατυπωθούν οι παρακάτω προτάσεις:

- 1) Στα ποίμνια των προβάτων, όπου εφαρμόζονται προγράμματα γενετικής βελτίωσης για την αύξηση της παραγωγικότητας, θα μπορούσε παράλληλα να ξεκινήσει η διαδικασία επιλογής ανθεκτικών γενοτύπων ως προς την τρομώδη νόσο. Συγκεκριμένα, προτείνουμε αρχικά την αξιοποίηση της δυνατότητας ανίχνευσης ανεπιθύμητων αλληλομόρφων του γονιδίου *PRNP* σε επίπεδο ποιμνίου μέσω του γάλατος της δεξαμενής ψύξης, με βάση τη μεθοδολογία που αναπτύχθηκε. Με τον τρόπο αυτό θα μπορούν να ανιχνεύονται ποίμνια με ζώα-φορείς των ανεπιθύμητων αλληλομόρφων (VRQ, AHQ για τα πρόβατα φυλής Χίου). Στη συνέχεια, στα ποίμνια όπου ανιχνεύθηκαν ανεπιθύμητα αλληλόμορφα μπορεί να γίνει ατομικός γενοτυπικός έλεγχος των προβατινών, με στόχο τον προσδιορισμό και αποκλεισμό των ζώων-φορέων από την αναπαραγωγή. Δυνητικά, μία τέτοια εφαρμογή θα μπορούσε να ολοκληρωθεί σε διάστημα δύο ετών σε μία φυλή που παρακολουθείται συστηματικά στα πλαίσια ενός προγράμματος γενετικής βελτίωσης. Είναι σημαντικό, τα ποίμνια από τα οποία προμηθεύεται ο υπόλοιπος πληθυσμός ζώα-βελτιωτές να μην περιέχουν ζώα με ανεπιθύμητα αλληλόμορφα (π.χ. VRQ).
- 2) Ο ατομικός γενοτυπικός προσδιορισμός των προβατινών θα μπορούσε να πραγματοποιείται από ατομικά δείγματα γάλατος, με βάση τη μέθοδο που αναπτύχθηκε στα πλαίσια της παρούσας μελέτης. Ο τρόπος αυτός δειγματοληψίας είναι σαφώς πιο εύκολος και φιλικότερος στο ζώο από ό,τι η αιμοληψία. Επιπλέον, δεν απαιτείται ειδικευμένο προσωπικό για τη δειγματοληψία γάλατος.
- 3) Παράλληλα, πρέπει να διενεργείται ατομικός γενοτυπικός προσδιορισμός των κριών με τη συμβατική μέθοδο. Αυτό αφορά ιδιαίτερα τους κριούς υψηλής γενετικής αξίας, ως προς τα παραγωγικά χαρακτηριστικά, οι οποίοι μπορούν να αποκτήσουν πολλούς απογόνους. Γεννήτορες κριοί-φορείς του ανθεκτικού

ARR αλληλομόρφου, μπορούν να συντελέσουν σημαντικά στη αύξηση της ανθεκτικότητας του ελληνικού πληθυσμού προβάτων στην τρομώδη νόσο.

- 4) Αναφορικά με τα πρόβατα φυλής Χίου, η εφαρμογή προγράμματος επιλογής για την αύξηση της ανθεκτικότητας του πληθυσμού στην τρομώδη νόσο, δεν αναμένεται να επηρεάσει αρνητικά το πρόγραμμα γενετικής βελτίωσης για την αύξηση της παραγωγικότητας της φυλής, αφού το ARR αλληλόμορφο δεν έχει δυσμενή επίδραση ούτε στη γαλακτοπαραγωγική, ούτε στην αναπαραγωγική ικανότητα των προβάτων αυτών.

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Από 1.013 προβατίνες φυλής Χίου, που εκτρέφονταν σε 23 ποιμνία του συνεταιρισμού προβατοτρόφων φυλής Χίου «Μακεδονία», συλλέχθηκαν ατομικά δείγματα γάλατος. Από τα σωματικά κύτταρα του γάλατος απομονώθηκε DNA για κάθε μία από τις προβατίνες αυτές. Η απομόνωση πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια ενός εμπορικά διαθέσιμου σκευάσματος, το οποίο τροποποιήθηκε κατάλληλα για τις ειδικές συνθήκες του πρόβειου γάλατος. Στη συνέχεια, έγινε γενοτυπικός προσδιορισμός των προβατινών για το γονίδιο της πρωτεΐνης-prion (*PRNP*). Ο προσδιορισμός των πολυμορφισμών στα κωδικόνια 136, 154 και 171 του γονιδίου *PRNP*, που σχετίζονται με την ευπάθεια στην κλασική μορφή της τρομάδους νόσου, και ο προσδιορισμός των πολυμορφισμών στο κωδικόνιο 141, που σχετίζεται με την άτυπη μορφή της νόσου, έγινε με τη χρήση της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης και της ανάλυσης πολυμορφισμού του μήκους περιοριστικών θραυσμάτων (PCR-RFLP). Ανιχνεύτηκαν 6 αλληλόμορφα (ARQ, AHQ, TRQ, ARR, ARH, VRQ) και, από το συνδυασμό τους, ταυτοποιήθηκαν 15 διαφορετικοί γενότυποι του *PRNP*. Οι συχνότητες των αλληλομόρφων υπολογίστηκαν ως 76,1%, 8,2%, 7,7%, 6,9%, 0,7% και 0,4% για τα ARQ, AHQ, TRQ, ARR, ARH και VRQ, αντίστοιχα. Επιπλέον, όλες οι προβατίνες έφεραν στο κωδικόνιο 141 τον ανθεκτικό, για την άτυπη μορφή της νόσου, πολυμορφισμό λευκίνη.

Απομόνωση DNA και προσδιορισμός γενότυπων πραγματοποιήθηκαν με αντίστοιχες μεθόδους και σε ομαδικό επίπεδο, σε πειραματικά δείγματα που προσομοίαζαν με δείγματα γάλατος της δεξαμενής ψύξης του ποιμνίου. Τα δείγματα αυτά δημιουργήθηκαν στο εργαστήριο με ανάμιξη ατομικών δειγμάτων νωπού γάλατος σε συγκεκριμένες, κάθε φορά, αναλογίες. Σε κάθε περίπτωση, τα δείγματα αυτά προέρχονταν από 20 διαφορετικές προβατίνες, στις οποίες προηγουμένως είχε προσδιοριστεί ο γενότυπος. Για τον προσδιορισμό της ευαισθησίας της μεθόδου PCR-RFLP σε ομαδικό επίπεδο, δημιουργήθηκαν πρότυπα με ανάμιξη πλασμιδιακού DNA, καθώς και πειραματικά δείγματα με ανάμιξη ισομοριακών απομονώσεων DNA των ζώων. Τα όρια ανίχνευσης του αλληλομόρφου AHQ και του αλληλομόρφου VRQ στα ομαδικά δείγματα ήταν 0,5%, του ARH και του ARR 4%, ενώ του TRQ 8%. Ακολούθησε η μελέτη της επίδρασης του γονιδίου *PRNP* στη γαλακτοπαραγωγική και στην αναπαραγωγική ικανότητα των προβάτων φυλής Χίου. Για τη μελέτη αυτή χρησιμοποιήθηκαν τα αποτελέσματα του γενοτυπικού προσδιορισμού των 1.013 προβατινών και μία βάση δεδομένων που δημιουργήθηκε,

για αυτά τα ζώα, με επίσημα στοιχεία που είχαν καταγραφεί από το συνεταιρισμό προβατοτρόφων φυλής Χίου «Μακεδονία». Για την εκτίμηση της επίδρασης τόσο των γενοτύπων του *PRNP*, όσο και των αλληλομόρφων του *PRNP* στην ημερήσια γαλακτοπαραγωγή του μηνιαίου ελέγχου, στη συνολική γαλακτοπαραγωγή της γαλακτικής περιόδου, στο δείκτη πολυδυμίας, στο ρυθμό σύλληψης με την πρώτη οχεία, και στην ηλικία του ζώου στον πρώτο τοκετό χρησιμοποιήθηκαν μικτά γραμμικά πρότυπα.

Το αλληλόμορφο ARQ, που είναι το πλέον συχνό στον πληθυσμό, βρέθηκε να έχει αρχικά ευνοϊκή γενετική σχέση με την αναπαραγωγική ικανότητα ( $P < 0,05$ ). Πιο συγκεκριμένα, βρέθηκε να σχετίζεται θετικά με το ρυθμό σύλληψης με την πρώτη οχεία και με την ηλικία του ζώου στον πρώτο τοκετό. Ωστόσο, τα αποτελέσματα αυτά δεν επιβεβαιώθηκαν μετά τη διόρθωση που έγινε για τις πολλαπλές δοκιμές που πραγματοποιήθηκαν με τη μέθοδο Bonferroni. Το αλληλόμορφο TRQ βρέθηκε, αρχικά, να σχετίζεται θετικά με την ημερήσια γαλακτοπαραγωγή του μηνιαίου ελέγχου και αρνητικά με την ηλικία του ζώου στον πρώτο τοκετό. Μετά τη διόρθωση Bonferroni, όμως, μόνο η επίδραση του TRQ στην ηλικία του ζώου στον πρώτο τοκετό παρέμεινε στατιστικά σημαντική. Το αλληλόμορφο ARR, που έχει συσχετιστεί με αυξημένη ανθεκτικότητα στην κλασική μορφή της τρομώδους νόσου, δε βρέθηκε να έχει κάποια σημαντική επίδραση σε κανένα από τα χαρακτηριστικά που μελετήθηκαν. Επιπλέον, κανένας από τους γενοτύπους του γονιδίου *PRNP* δεν εμφάνισε κάποια στατιστικά σημαντική επίδραση στα χαρακτηριστικά της γαλακτοπαραγωγής και της αναπαραγωγής που μελετήθηκαν. Τα εν λόγω αποτελέσματα υποδεικνύουν ότι η εφαρμογή ενός προγράμματος γενετικής επιλογής για την ανάπτυξη ανθεκτικότητας στην τρομώδη νόσο δε θα επηρεάσει αρνητικά τη γαλακτοπαραγωγική και αναπαραγωγική ικανότητα των προβάτων φυλής Χίου. Επιπλέον, η μέθοδος PCR-RFLP, που αναπτύχθηκε για το γενοτυπικό προσδιορισμό σε ομαδικό επίπεδο, επιτρέπει τον εύκολο και γρήγορο εντοπισμό ποιμνίων με ζώα-φορείς ανεπιθύμητων αλληλομόρφων, για παράδειγμα του αλληλομόρφου VRQ ή AHQ (για τα πρόβατα φυλής Χίου). Στα ποίμνια αυτά μπορεί να ακολουθήσει ατομικός γενοτυπικός προσδιορισμός για τον εντοπισμό και την απομάκρυνση των ανεπιθύμητων ζώων. Η λήψη δειγμάτων γάλατος είναι πιο εύκολη, πιο γρήγορη και πιο φιλική μέθοδος δειγματοληψίας συγκριτικά με την αιμοληψία. Θα μπορούσε, λοιπόν, να χρησιμοποιηθεί για να διευκολυνθεί η συλλογή δειγμάτων στα πλαίσια ενός εκτεταμένου προγράμματος γενετικής επιλογής για την τρομώδη νόσο.



ARISTOTLE UNIVERSITY OF THESSALONIKI  
**FACULTY OF VETERINARY MEDICINE**  
DEPARTMENT OF ANIMAL PRODUCTION, ICHTHYOLOGY, ECOLOGY  
AND ENVIRONMENTAL PROTECTION  
**LABORATORY OF ANIMAL HUSBANDRY**

***PRNP* GENOTYPING OF SHEEP USING MILK SOMATIC CELLS AND  
ASSOCIATION OF *PRNP* GENOTYPES WITH ANIMAL TRAITS**

DOCTORAL THESIS  
BY  
ANDRONIKI A. PSIFIDI

**SUMMARY**

One thousand thirteen individual ovine milk samples were collected from as many purebred Chios ewes raised in 23 flocks-members of the national Chios Sheep Breeder's Cooperative. Genomic DNA was extracted from milk somatic cells using a modified commercially available extraction kit, optimised for ovine milk. Genotyping at codons 136, 154, and 171 (classical scrapie) and 141 (atypical scrapie) was performed using a PCR- RFLP analysis protocol. A total of 15 genotypes and 6 alleles (ARQ, AHQ, TRQ, ARR, ARH, VRQ) linked to codons 136, 154 and 171 were detected. Allelic frequencies were 76.1%, 8.2%, 7.7%, 6.9%, 0.7% and 0.4% for ARQ, AHQ, TRQ, ARR, ARH and VRQ, respectively. All animals were homozygous for the leucine allele at codon 141.

Artificial bulk milk samples were created in the lab by mixing individual milk samples from ewes with known genotypes. Genomic DNA was extracted from these samples using the Modified blood kit. *PRNP* genotyping was performed in the artificial bulk milk samples using a similar PCR-RFLP analysis protocol. In addition, standard samples were constructed by plasmid DNA and equimolar DNA extracts in order to determine the detection limit (LOD) of each *PRNP* allele with RFLP analysis.

Results showed that LOD of VRQ and AHQ is 0.5%, ARR and ARH is 4% and TRQ is 8%.

Furthermore, the impact of the *PRNP* gene locus on milk production (test-day and total lactation yield) and reproduction (age at first lambing, conception rate at first service and prolificacy) of Chios sheep was assessed using mixed linear models. The association studies were based on records obtained from the official dataset of Chios Sheep Breeder's Cooperative «Macedonia». The ARQ allele was found to have a favourable effect on conception rate at first service and age at first lambing. The TRQ allele, whose association with such traits was assessed for the first time, had a positive effect on test-day milk yield and an adverse effect on age at first lambing. Nevertheless, only the effect of TRQ on age at first lambing remained statistical significant after the correction with Bonferroni test. The ARR allele, which is associated with increased resistance to classical scrapie, had no significant effect on any of the traits studied. No significant associations of the *PRNP* genotypes with production and reproduction traits were observed. Selection for scrapie-resistant sheep is not expected to affect milk yield and reproduction of the Chios breed.

Moreover, the proposed PCR-RFLP method, using bulk milk, can provide a useful test for fast screening of flocks for the presence of undesirable alleles such as VRQ or AHQ. In case, for example, that VRQ-carriers are detected in a flock, individual animal genotyping could then be performed to exclude these undesirable animals from flocks. In addition, milk somatic cells are a practical, animal friendly source of genomic DNA which could be used in order to facilitate the sampling for individual *PRNP* genotyping in a large scale application.

## BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

### ΞΕΝΟΓΛΩΣΣΗ

- Acin C., Martin-Burriel I., Goldmann W., Lyahyai J., Monzon M., Bolea R. (2004) Prion protein gene polymorphisms in healthy and scrapie affected Spanish sheep. *Journal of General Virology* 85, 2103-2110.
- Alexander B.M., Stobart R.H., Russell W.C., O'Rourke K.I., Lewis G.S., Logan J.R. (2005) The incidence of genotypes at codon 171 of the prion protein gene (PRNP) in five breeds of sheep and production traits of ewes associated with those genotypes. *Journal of Animal Science* 83, 455-459.
- Alpen T., Cramp W.A., Haig D.A., Clarke M.C. (1967) Does the agent of scrapie replicate without nucleic acid? *Nature* 214, 764-766.
- Álvarez L., Arranz J.J., San Primitivo F. (2006α) Identification of a new leucine haplotype (ALQ) at codon 154 in the ovine protein gene in Spanish sheep. *Journal of Animal Science* 84, 259-263.
- Álvarez L., Gutiérrez-Gil B., San Primitivo F., De la Fuente L.F., Arranz J.J. (2006β) Influence of prion protein genotypes on milk production traits in Spanish Churra sheep. *Journal of Dairy Science* 89, 1784-1791.
- Amills M., Francino O., Jansa M., Sanchez A. (1997) Isolation of genomic DNA from milk samples by using Chelex resin. *Journal of Dairy Science* 64, 231-238.
- Andreoletti O., Berthon P., Mark D., Sarradin P., Grosclaude J., van Keulen L., Schelcher F., Elsen J.M., Lantier F. (2000) Early accumulation of PrP<sup>sc</sup> in gut-associated lymphoid and nervous tissues of susceptible sheep from a Romanov flock with natural scrapie. *Journal of General Virology* 81, 3115-3126.
- Andreoletti O., Lacroux C., Chabert A., Monnereau L., Tabouret G., Lantier F., Berthon P., Eyche F., Lafond-Benestad S., Elsen J.M., Schelcher F. (2002) PrP<sup>sc</sup> accumulation in placentas of ewes exposed to natural scrapie: influence of fetal PrP genotype and effect on ewe-to-lamb transmission. *Journal of General Virology* 83, 2607-2616.
- Anon (2008) Les fillières ovines dans l'UE. Des moutons bien mal gardés. Redaction: Département Economie (GBE). Novembre 2008, no 383, Institut de l'élevage, Paris, France.
- Arsac J.N., Andréoletti O., Bilheude J.M., Lacroux C., Benestad S.L., Baron T. (2007) Similar biochemical signatures and prion protein genotypes in atypical

- scrapie and Nor 98 cases, France and Norway. *Emerging Infection Diseases* 1, 58-68.
- Asher D.M., Pomeroy K.L., Murphy L., Rohwer R.G., Gibbs C.J., Gadjusek D.C. (1986) Practical inactivation of scrapie agent on surfaces. Abstracts of the IXth International Congress of Infectious and Parasitic Diseases, Munich, 20-26 July.
- Ayala F.J. (1982) *Population and Evolutionary Genetics, A primer*. Chapter 3, The Hardy-Weiberg Law. The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc, California, Inc.
- Bagnato A., Schiavini F., Rossoni A., Maltecca C., Dolezal M., Medugorac I. Solkner J., Russo V., Fontanessi L., Friendmann A., Soller M., and Lipkin E. (2008) Quantitative trait loci affecting milk yield and protein percentage in a three-country Brown Swiss population. *Journal of Dairy Science* 91, 767-783.
- Barrillet F., Andreoletti O., Palhière I., Aguerre X., Arranz J.M., Minery S., Soulas C., Belloc J.P., Briois M., Frégeat G., Teinturier P., Amigues Y., Astruc J.M., Boscher M.Y., Schelcher F. (2002) Breeding for scrapie resistance using PrP genotyping in the French dairy sheep breeds. *Proceedings of the 7<sup>th</sup> World Congress on genetics Applied to Livestock production*, Montpellier, France, August 19 to 23, vol. 31, 683-686.
- Basdamianni Z., Banos G., Abas Z., Arsenos G., Valergakis G.E., Zygiogiannis D. (2005) Estimation of daily and total lactation milk yield of Chios ewes from single morning or evening records. *Livestock Production Science* 92, 59-68.
- Baylis M. and Goldmann W. (2004) The genetics of scrapie in sheep and goats. *Current Molecular Medicine* 4, 385-396.
- Bellworthy S.J., Dexter G., Stack M., Chaplin M., Hawkins S.A., Simmons M.M., Jeffrey M., Martin S., Gonzalez L., Hill P. (2005) Natural transmission of BSE between sheep within an experimental flock. *Veterinary Records* 157, 206.
- Belt P.B., Muileman I.H., Schreuder B.E.C., Ruijter J.B., Gielkens A.L., Smits M.A. (1995) Identification of five allelic variants of the sheep PrP gene and their association with natural scrapie. *Journal of General Virology* 76, 509-517.
- Benestad S.L., Sarradin P., Thu B., Schönheit J., Tranulis M.A., Bratberg B. (2003) Cases of scrapie with unusual features in Norway and designation of a new type, Nor98. *Veterinary Record* 153, 202-208.
- Bergonier D., De Crémoux R., Rupp R., Lagriffoul G., Berthelot X. (2003) Mastitis of dairy small ruminants. *Veterinary Records* 34, 689-716.

- Béringue V., Villotte J.L., Laude H. (2008) Prion agent diversity and species barrier. *Veterinary Research* 39, 47.
- Béringue V., Demoy M., Lasmezas C.I., Gouritin B., Weigarten C., Deslys J.P., Andreux J.P., Couvreur P., Dormont D. (2000) Role of spleen macrophages in the clearance of scrapie agent early in pathogenesis. *Journal of Pathology* 190, 495-502.
- Bessen, R. A. and Marsh, R. F. (1994) Distinct PrP properties suggest the molecular basis for strain variation in transmissible mink encephalopathy. *Journal of Virology* 68, 7859-7868.
- Bilheude J.M., Brun A., Morel N., Díaz San Segudo F., Lecroix S., Espinosa J.C., González L., Steele P., Grassi J., Andréoletti O., Torres J.M. (2007) Discrimination of sheep susceptible and resistant to transmissible spongiform encephalopathies by an haplotype specific monoclonal antibody. *Journal of Virological Methods* 145, 169-172.
- Billinis C., Psychas V., Leontides L., Spyrou V., Argyroudis S., Vlemmas I., Leontides S., Sklaviadis T., Papadopoulos O. (2004) Prion protein gene polymorphisms in healthy and scrapie affected sheep in Greece. *Journal of General Virology* 85, 547-554.
- Bossers A., Harders F.L., Smits M.A. (1999) PrP genotype frequencies of the most dominant sheep breed in a country free from scrapie. *Archives of Virology* 144, 829-834.
- Brandsma J.H., Janss L.L.G., Visscher A.H. (2004) Association between PrP genotypes and litter size and 135 days weight in Texel sheep. *Livestock Production Science* (2004) 85, 59-64.
- Brandsma J.H., Janss L.L.G., Visscher A.H. (2005) Association between PrP genotypes and performance traits in an experimental Dutch Texel herd. *Livestock Production Science* 95, 89-94.
- Brown P., Liberski P.P., Wolff A., Gadjusek D.C. (1990) Resistance of scrapie infectivity to steam autoclaving after formaldehyde fixation and limited survival after ashing at 360°C: practical and theoretical implications. *Journal of Infectious Diseases* 161(3), 467-472.
- Brown D.R., Clive C., Haswell S.J. (2001) Antioxidant activity related to copper binding of native prion protein. *Journal of Neurochemistry* 76, 69-76.

- Bruce M.E. (1993) Scrapie strain variation and mutation. *British Medical Bulletin* 49, 822-838.
- Bruce M.E., Fraser H., McBride P. A., Scot J. R., Dickinson A. G. (1992) In: *Prions Diseases of Humans and Animals* (Ed. Prusiner S. B., Collinge J., Powell J., Anderton B.), Ellis Horwood, New York, London, pp 497-508.
- Bruce M.E., Will R. G., Ironside J. W., McConell I., Drummond D., Suttle A., McCardle L., Chree A., Hope J., Birkett C., Cousens S., Fraser H., Bostock C.J. (1997) Transmissions to mice indicate that 'new variant' CJD is caused by the BSE agent. *Nature* 389, 488-501.
- Buschmann A., Biacabe A-GZiU, Bencsik A. (2004) Atypical scrapie cases in Germany and France are identified by discrepant reaction patterns in BSE rapid tests. *Journal of Virology Methods* 117, 27-36.
- Buitkamp J, Gotz K. (2004) Use of milk samples from a milk evaluation programme for the genotyping of cows. *Arch Tierz Dummerstorf* 47, 15-26.
- Caplazi P., O'Rourke K., Wolf C., Shaw D., Basszler T.V. (2004) Biology of PrP<sup>sc</sup> accumulation in two natural scrapie-infected sheep flocks. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 16, 489-496.
- Caramelli M., Ru G., Casalone C., Bozetta E., Acutis P.L., Calella A., Forloni G. (2001) Evidence for the transmission of scrapie to sheep and goats from a vaccine against *Mycoplasma agalactiae*. *Veterinary Record* 148, 531-536.
- Casellas J., Caja G., Bach R., Francino O., Piedrafita J. (2007) Association analyses between the prion protein locus and reproductive and lamb weight traits in Ripollesa sheep. *Journal of Animal Science* 85, 592-597.
- Castro R.M., Landemberger M.C., Walz R., Carlotti C.G., Huang N., Cunha D.R., Moura R., Caballero O.L., Sakamoto A.C., Nitrini R., Brentani R.R., Martins V.R. (2004) High capacity and low cost detection of prion protein gene variant alleles by denaturing HPLC. *Journal of Neuroscience Methods* 139, 263-269.
- Caughey B., Race R.E., Chesebro B. (1988) Detection of prion protein mRNA in normal and scrapie-infected tissues and cell lines. *Journal of General Virology* 69, 711-716.
- Chase-Topping M.E., Kruuk L.E.B., Lajous D., Hunter N., Elsen J.M., Woolhouse M.E.J. (2005) Genotype level variation in lifetime breeding success, litter size and survival of sheep in scrapie-affected flocks. *Journal of General Virology* 86, 1229-1238.

- Cloucard C., Beaudry P., Elsen J.M., Milan D., Dussaucy M., Bounneau C., Schelcher F., Chatelain J., Launay J.M., Laplace J.L. (1995) Different allelic effects of the codon 136 and 171 of the prion protein gene in sheep with natural scrapie. *Journal of General Virology* 76, 2097-2101.
- Collinge, J., Whittington, M. A., Sidle, K.C., Smith, C. J., Palmer, M. S., Clarke, A. R., Jefferys J. G. (1994) Prion Protein is necessary for normal synaptic function. *Nature* 370, 295-297.
- Collinge, J., Sidle, K.C., Meads, J., Ironside, J., Hill, A. F. (1996) Molecular analysis of prion strain variation and the aetiology of 'new variant' CJD. *Nature* 383, 685-690.
- Conception G.P., David M.P., Padlan E.A. (2005) Why don't humans get scrapie? A possible explanation based on secondary structure predictions. *Medical Hypothesis* 64(5), 919-924.
- D'Angelo F., Santillo A., Sevi A., Albenzio M. (2007) Technical Note: A simple salting-out method for DNA extraction from milk somatic cells: investigation into the goat *CSN1S1* Gene. *Journal of Dairy Science* 90, 3550-3552.
- Dawson M., Hoinville L., Hosie B., Hunter N. (1998) Guidance on the use of PrP genotyping as an aid to the control of clinical scrapie. *Veterinary Record* 142, 623-625.
- Dawson M., Moore R.C., Bishop S.C. (2008) Progress and limits of PrP gene selection policy. *Veterinary Research* 39, 25.
- Demaimay R., Adjou K.T., Beringue V., Demart S., Lasmezas C.I., Deslys J.P., Seman M., Dormont D. (1997) Late treatment with polyene antibiotics can prolong the survival time of scrapie infected animals. *Journal of Virology* 71(12), 9685-9689.
- DeJoia C., Moreaux B., O'Connell K., Bessen R.A. (2006) Prion infection of oral and nasal mucosa. *Journal of Virology*, 80(9), 4546-4556.
- DEFRA (2003) Information General Statistics-GB HM Government U.K. Online-Department of Environment Food and Rural Affairs. <http://www.defra.gov.uk/animalh/bse/othertses/scrapie/nsp/pdf/genotypes.pdf>.
- DeRancourt M., Fois N., Lavin M.P., Tchakerian E., Vallerand F. (2006) Mediterranean sheep and goat production: an uncertain future. *Small Ruminant Research* 62, 167-179.

- De Silva U., Guo X., Kupfer D.M., Fernando S.C., Pillai A.T., Najar F.Z. (2003) Allelic variants of ovine protein gene (*PRNP*) in Oklahoma sheep. *Cytogenetics Genome Research* 102, 89-94.
- Detweiler L.A., Baylis M. (2001) The epidemiology of scrapie. *Review Office International Des Epizooties* 22, 121-143.
- Detweiler L.A., Jenny A.L., Rubenstein R., Wineland N.E. (1996) Scrapie: A review. *Sheep and Goat Research Journal* 12, 485-503.
- Detweiler L.A., Baylis M. (2003) The epidemiology of scrapie. *Review Scientific et Technique Office International Des Epizooties* 22, 121-143.
- De Vries F., Hamann H., Drögemüller C., Ganter M., Distl O. (2004 $\alpha$ ) Analysis of associations between the prion protein genotype and reproduction traits in meat sheep breeds. *Animal Science* 79, 397-404.
- De Vries F., Borchers N., Hamann H., Drögemüller C., Reinecke S., Lüpping W. (2004 $\beta$ ) Associations between the prion protein genotype and performance traits of meat breeds of sheep. *Veterinary Record* 155, 140-143.
- De Vries F., Hamann H., Drögemüller C., Ganter M., Distl O. (2005) Analysis of associations between the prion protein genotypes and production traits in East Friesian milk sheep. *Journal of Dairy Science* 88, 392-398.
- De Vries F., Hamann H., Drögemüller C., Ganter M., Distl O. (2006) Associations between the prion protein genotype and type traits in East Friesian milk sheep. *Veterinary Record* 158, 849-852.
- Dickinson A.G. and Outram G.W. (1988) Genetic aspects of unconventional virus infections: the basis of the virino hypothesis. *Ciba Foundation Symposium* 135, 63-83.
- Dickinson A.G. and Meikle V.M. (1969) A comparison of some biological characteristics of the mouse-passaged scrapie agents. *Genetics Research* 13, 213-225.
- Dickinson A.G. (1976) Scrapie in sheep and goats, in: *Slow Virus Diseases of Animals and Man* (Ed. R. Kimberlin), North Holland, Amsterdam, pp 209-241.
- Doherr M.G. (2007) Brief review on the epidemiology of transmissible spongiform encephalopathies (TSE). *Vaccine* 25, 5619-5624.
- Drögemüller C., Leeb T., Distl O. (2001) PrP genotype frequencies in German breeding sheep and the potential to breed for resistance to scrapie. *Veterinary Record* 149, 349-352.



- EFSA (European Food Safety Authority) (2005)  
[http://www.efsa.eu.int/science/biohaz\\_opinions/990\\_en.html](http://www.efsa.eu.int/science/biohaz_opinions/990_en.html)
- Ekateriniadou L.V., Panagiotidis C.H., Terzis A., Plumi K., Triantafyllidis A., Deligiannidis P., Triantaphyllidis C., Sklaviadis T. (2007 $\alpha$ ) Genotyping for PrP gene polymorphisms in rare Greek breeds of sheep. *Veterinary Records* 160, 194-195.
- Ekateriniadou L.V., Kanata E., Panagiotidis C.H., Nikolaou A., Koutsoukou E., Lymberopoulos A.G., Sklaviadis T. (2007 $\beta$ ) PrP genotypes in scrapie affected sheep in Greece-The contribution of the AHQ allele polymorphism. *Small Ruminant Research* 73, 142-149.
- Eloit M., Adjou K., Couplier M., Fontaine J.J., Hamel R., Lilin T., Messiaen S., Andreoletti O., Baron T., Bencsik A., Biacabe A.G., Beringue V., Laude H., Le Dur A., Vilotte J.L., Comoy E., Deslys J.P., Grassi J., Simon S., Lantier F., Sarradin P. (2005) BSE agent signatures in a goat. *Veterinary Record* 156, 523-524.
- Elsen J.M., Amigues Y., Schelcher F., Ducrocq V., Andreoletti O., Eychenne F., Khang J.V.T., Poivey J.P., Lantier F., Laplace L. (1999) Genetic susceptibility and transmission factors in scrapie: detailed analysis of an epidemic in a closed flock of Romanov. *Archives of Virology* 144, 431-445.
- Ensminger M.E. (1993) In: *Dairy Cattle Science* (third Edition), Interstate Publishers Inc.
- Ersdal C., Simmons M. M., González L., Goodsir C.M., Martin S., Jeffrey M. (2004) Relationships between ultrastructural scrapie pathology and patterns of abnormal prion protein accumulation. *Acta Neuropathologica* 107, 428-438.
- European Union (2003) European Commission Decision No 100/2003 of 13 February 2003 laying down minimum requirements for the establishment of breeding programmes for resistance to transmissible spongiform encephalopathies in sheep (notified under document number C (2003) 498). *Official of Journal L* 041, 41-45.
- Eurostat (2004) *Agricultural Statistics, Quarterly Bulletin 1/2004*. Office for Official Publications of the European Communities, Luxembourg.
- Everest S.J., Thorne L., Barnicle D.A. (2006) Atypical prion protein in sheep brain collected during the British scrapie-surveillance programme. *Journal of General Virology* 87, 471-477.

- Extramiana B., González L., Cortabarría N., Garcá M., Juste R. (2002) Evaluation of a PCR technique for the detection of maedi-visna proviral DNA in blood, milk and tissue samples of naturally infected sheep. *Small Ruminant Research* 44, 109–117.
- Fediaevsky A., Tongue S.C., Nöremark M., Calav D., Ru G., Hopp P. (2008) A descriptive study of the prevalence of atypical and classical scrapie in sheep in 20 European countries. *BMC Veterinary Research* 4, 19.
- Fediaevsky A., Morignat E., Ducrot C., Calavas D. (2009) A case- control study on the origin of atypical scrapie in sheep, France. *Emerging infectious diseases* 15, 5.
- Fahle G.A., Fischer S.H. (2000) Comparison of six commercial extraction kits for recovery of Cytomegalovirus DNA from spiked human specimens. *Journal of Clinical Microbiology* Oct., p.3860-3863.
- FAO (2008) Food and Agriculture Organization of the United Nation. [www.fao.org](http://www.fao.org)
- Foster J.D., Hope J., Fraser H. (1993) Transmission of bovine spongiform encephalopathy to sheep and goats. *Veterinary Record* 133, 339-341.
- Foster J.D., Hope J., McConnell I., Bruce M., Fraser H. (1994) Transmission of bovine spongiform encephalopathy to sheep, goats and mice. *Annals of the New York Academy of Science* 724, 300-303.
- Frigg R., Klein M.A., Hegyi I., Zinkernagel R.M., Aguzzi A. (1999) Scrapie pathogenesis in subclinically infected B-cell deficient mice. *Journal of Virology* 73, 9584-9588.
- Gavier-Widen D., Stack M.J., Baron T., Balachandran A., Simmons M. (2005) Diagnosis of transmissible spongiform encephalopathies in animals: a review. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 17(6), 509-527.
- Gelasakis A.I., Valergakis G.E., Fortomaris P., Arsenos G. (2010) Farm conditions and production methods in Chios sheep flocks. *Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society* 61 (2): 111-119.
- Gilmour A.R., Gogel B.L., Cullis B.R., Welham S.J., Thompson R. (2002) ASREML User Guide Release 1.0. VSN International Ltd., Hemel, Hempstead, UK.
- Glockshuber R., Hornemann S., Reik R., Billeter M., Wider G., Liemann S., Zahn R., Wuthrich K. (1999) Folding and three- dimensional NMR structure of the recombinant cellular prion protein from the mouse. In: *Prions: Molecular and*

- Cellular Biology (Ed. D.A. Harris), Horizan Scientific Press, Wymondham, UK, pp 1-25.
- Goldmann W., Hunter N., Foster J.D., Salbaum J.M., Beyreuther K., Hope J.(1990) Two alleles of a neural protein gene linked to scrapie in sheep. *Proceedings of National Academy Science USA* 87, 2476-2480.
- Goldmann W. (2008) PrP genetics in ruminant transmissible spongiform encephalopathies. *Veterinary Research* 39, 30.
- González L., Dagleish M.P., Bellworthy S.J., Siso S., Stack M.J., Chaplin M.J., Davis L.A., Hawkins S.A., Hughes J., Jeffrey M. (2006) Postmortem diagnosis of preclinical and clinical scrapie in sheep by the detection of the disease associated PrP in their rectal mucosa. *Veterinary Record* 158, 325.
- Gordon W.S. (1946) Advances in veterinary research: louping ill, tick borne fever and scrapie. *Veterinary Record* 58, 516-525.
- Gordon W. S. (1966) Variation in susceptibility of sheep to scrapie and genetic implications. Report of Scrapie Seminar, 1964, ARS 91-53, US Department of Agriculture, pp 53-67.
- Griffith J.S. (1967) Self replication and scrapie. *Nature* 215, 1043-1044.
- Groschup M.H., Lacroux C., Buschmann A., Lühken G., Mathey J., Eiden M., Lukan S., Hoffmann C.H., Espinosa J.C., Baron T., Torres J.M., Erhardt G., Andreoletti O. (2007) Classic scrapie in sheep with ARR/ARR prion genotype in Germany and France. *Emerging Infectious Diseases* 13, 1201-1207.
- Groschup M.H., Beekes M., McBride P.A., Hardt M., Hainfellner J.A., Budka H. (1999) Deposition of disease-associated prion protein involves the peripheral nervous system in experimental scrapie. *Acta Neuropathologica* 98, 453-457.
- Gurdesen D.E., Lee I.M., Schaff D.A., Harrison N.A., Chang C.J., Davis R.E., Kingsbury D.T. (1996) Genomic diversity and differentiation among phytoplasma strains in 16S rRNA groups I (aster yellows and related phytoplasmas) and III (X-disease and related phytoplasmas). *International Journal of Systematic Bacteriology* 46, 64-75.
- Hadlow W.J., Kennedy R.C., Race R.E. (1982) Natural infection of Suffolk sheep with scrapie virus. *Journal of Infectious Diseases* 146, 657-664.
- Hatziminaoglou I., Georgoudis A., Zervas N., Boyazoglou J. (1996) In: Prolific sheep (Ed. M. H. Fahmy), Prolific breeds of Greece, CAB International, University Press, Cambridge, Chap 3.3, vol. 8, pp. 542.

- Hill A. F., Desbruslais M., Joiner S., Sidle K.C., Gowland I., Collinge J., Doey L.G., Lantos P. (1997) The same prion strain causes vCJD and BSE. *Nature* 389, 448-450.
- Hoinville L.J. (1996) A review of the epidemiology of scrapie in sheep. *Review Scientific et Technique Office International Des Epizooties* 15(3), 827-852.
- Holm S. (1979) A simple sequentially rejective multiple test procedure. *Scandinavian Journal of Statistics* 6, 65-70.
- Hörnlimman B., Riesner D., Kretzschmar H. (2001) In: *Prionen und Prionkrankheiten*, De Gruyter-Verlag, Berlin/New York, Chapter 1, pp 7, Chapters 13-23, pp 141-199.
- Hornshaw M.P., Mc Dermott J.R., Candy J.M. (1995) Copper binding to the N-terminal tandem repeat regions of mammalian and avian prion protein. *Biochemical and Biophysical Research Communication* 207, 621-629.
- Houston F., Mc Cutcheon S., Goldmann W., Chong A., Foster J. Sisó S. González L., Jeffrey M., Hunter N. (2008) Prion diseases are efficiently transmitted by blood transfusion in sheep. *Blood* 112 (12), 4739-4745.
- Houston E.F., Haliday S., Jeffrey M., Goldmann W., Hunter N. (2002) New Zealand sheep with scrapie susceptible PrP genotypes succumb to experimental challenge with a sheep-passaged scrapie isolate (SSBP/1). *Journal of General Virology* 83, 1247-1250.
- Houston F., Goldmann W., Chong A., Jeffrey M., González L., Foster J. (2003) Prion diseases: BSE in sheep bred for resistance to infection. *Nature* 423, 498.
- Hunter N., Foster J.D., Dickinson A.G., Hope J. (1989) Linkage of the gene for the scrapie-associated fibril protein (PrP) to the Sip gene in Cheviot sheep. *Veterinary Record* 124, 363-366.
- Hunter N., Foster J.D., Goldmann W., Stear M.J., Hope J., Bostock C. (1996) Natural scrapie in a closed flock of Cheviot sheep occurs only in specific PrP genotypes. *Archives of Virology* 141, 809-824.
- Hunter N., Cairns D., Foster J., Smith G., Goldmann W., Donelli K. (1997) Is scrapie a genetic disease? Evidence from scrapie-free countries. *Nature* 386, 137.
- Hunter N. and Bossers A. (2006) The PrP genotype as a marker for scrapie susceptibility in sheep, In: *Prions in humans and animals* (Eds Hörnlimann B., Riesner D., Kretzschmar H.), de Gruyter, Berlin, Germany, pp 640-647.

- Iannuzzi L., Palomba R., DiMeo G.P., Perucatti A., Ferrara L. (1998) Comparative FISH-mapping of the prion protein gene (PRNP) on cattle, river buffalo, sheep and goat chromosome. *Cytogenetic and Cell Genetics* 81, 202-204.
- ICAR (2008) Guidelines approved by the General Assembly held in Niagara falls, USA, 18 June 2008, Session 2.2, 57-67
- Ioannides I.M., Mavrogenis A.P., Papachristoforou C. (2009) Analysis of PrP genotypes in relation to reproductive and production traits in Chios sheep. *Livestock science* 122, 296-301.
- Isler B.J., Freking R.M., Thallman R.M., Heaton M.P., Leymaster K.A. (2006) Evaluation of associations between prion haplotypes and growth, carcass, and meat quality traits in a Dorset x Romanov sheep population. *Journal of Animal Science* 84, 783-788.
- Jasik A. and Reichert M. (2006) Application of temperature gradient gel electrophoresis for detection of prion protein gene polymorphisms in Polish Swiniarka sheep. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 18, 270-274.
- Jeffrey M., Martin S., González L., Foster J., Langeveld J.P., van Zijderveld F.G., Grassi J., Hunter N. (2006) Immunoistochemical features of PrP (d) accumulation in natural and experimental goat transmissible spongiform encephalopathies. *Journal of Comparative Pathology* 78, 301-311.
- Jeffrey M., Martin S., Thomson J.R., Dingwall W.S., Begara-McGorum I., González L. (2001) Onset and distribution of tissue PrP accumulation in scrapie- affected Suffolk sheep as demonstrated by sequential necropsies and tonsillar biopsies. *Journal of Comparative Pathology* 125, 48-57.
- Junghans F., Teufel B., Buschmann A., Steng G., Groschup M.H. (1998) Genotyping of German sheep with respect to scrapie susceptibility. *Veterinary Record* 143, 340-341.
- Kimberlin R.H. and Walker C.A. (1982) Pathogenesis of mouse scrapie: patterns of agent replication in different parts of the CNS following intraperitoneal infection. *Journal of Royal Society Medicine* 75, 618-624.
- Kimberlin R.H., Millson G.C., Taylor D.M., Robertson D.A., Tomlinson A.H., Dickinson A.G. (1983) Disinfection studies with two strains of mouse-passaged scrapie agent. *Journal of Neurological Science* 59, 355-369.

- Kitamoto T., Muramoto T., Mohri S., Doh-Ura K., Tateishi J. (1991) Abnormal isoform of prion protein accumulates in follicular dendritic cells in mice with Creutzfeldt-Jacob disease. *Journal of Virology* 65, 6292-6295.
- Konold T., Davis A., Bone G.E., Simmons M.M., Kahn j., Blake-Dyke M.C., Bracegirdle J., Shimwell C.J. (2006) Atypical scrapie cases in the UK. *Veterinary Record*, 158, 280.
- Kumar S., Tamura K., Nei M. (2004) MEGA3: Integrated software for molecular evolutionary genetic analysis and sequence alignment. *Briefing in Bioinformatics* 5, 150-163.
- Lacroux C., Simon S., Benestad S.L, Maillet S., Mathey J., Lugan S., Garbiere F., Gassard H., Costes P., Bergonier D., Weisbecker J.L., Moldal T., Simmons H., Lantier F., Feraudet-Tarisse C., Morel N., Schelcher F., Grassi J., Andréoletti O. (2008) Prions in milk from ewes incubating natural scrapie. *PLOS Pathogenesis* 4,e1000238.
- Laplace J.L., Chatelain J., Westaway D., Thomas S., Dussaucy M., Brugere-Picoux J., Launay J.M. (1993) PrP polymorphism associated with natural scrapie discovered by denaturing gradient gel electrophoresis. *Genomics* 15, 30-37.
- Leontides S., Psychas V., Argyroudis S., Giannati-Stefanou A., Paschaleri-Papadopoulou E., Manousis T., Sklaviadis T. (2000) A survey of more than 11 years of neurologic diseases of ruminants with special reference to transmissible spongiform encephalopathies (TSEs) in Greece. *Journal of Veterinary Medicine* B47, 303-309.
- Ligios C., Cancedda M.G., Madau L., Santucci C., Maestrale C., Agrimi U., DiGuardo G. (2006) PrP<sup>Sc</sup> deposition in nervous tissues without lymphoid tissue involvement is frequently found in ARQ/ARQ Sarda breed sheep preclinically affected with natural scrapie. *Archives of Virology* 151, 1007-1020.
- Lindquist S., Hanson L., Hernell O., Lonneral B., Normack J., Stromqvist M., Bergstrom S. (1994) Isolation of mRNA and genomic DNA from epithelial cells in human milk and amplified by PCR. *Biotechniques* 17, 692.
- Lindsay D and Skerritt J. (2003) Improved breeding in dairy goats and milking sheep, publication no. 02/150, pp. 27-39. Rural Industries Research and Development Corporation, Kingston ACT, Australia.

- Lipkin E., Shalom A., Khatib H., Soller M., Friendmann A. (1993) Milk as a source of Deoxyribonucleic Acid and as a substrate for the Polymerase Chain Reaction. *Journal of Dairy Science* 76, 2025-2032.
- Lipsky S., Brandt H., Lünken G., Erhardt G. (2006) Analysis of prion protein genotypes in relation to reproduction traits in local and cosmopolitan German sheep breeds. *Animal Reproduction Science* 103, 69-77.
- Lopez- Calleja I., Gonzalez I., Fajardo V., Rotriquez M.A., Hernandez P.E., Garcia T., Martin R. (2004) Rapid detection of cows' milk in sheep's and goats' milk by a species-specific Polymerase Chain Reaction technique. *Journal of Dairy Science* 87, 2839-2845.
- Lühken G., Buschmann A., Groschup M.H., Erhardt G. (2004) Prion protein allele A<sub>136</sub>H<sub>154</sub>Q<sub>171</sub> is associated with high susceptibility to scrapie in purebred and crossbred German Merinoland sheep. *Archives of Virology* 149, 1571-1580.
- Lühken G., Buschmann A., Brandt H., Eiden M., Groschup M.H., Erhardt G. (2007) Epidemiological and genetical differences between classical and atypical scrapie cases. *Veterinary Research* 38, 65-80.
- Maddison B.C., Baker C.A., Rees H.C., Terry L.A., Thorne L., Bellworthy S.J., Whitelam G.C., Gough K.C. (2009) Prions are secreted in milk from clinically normal scrapie exposed sheep. *Journal of Virology* 83(16), 8293-8296.
- Maluquer de Motes C., Grassi J., Simon S., Herva M.E., Torres J.M., Pumarola M. (2008) Excretion of BSE and scrapie prions in stools from murine models. *Veterinary Microbiology* 131, 205-211.
- Maignien T., Shakweh M., Calvo P., Marcé D., Salés N., Fattal E., Deslys J.P., Couvreur P., Lasmezas C.I. (2005) Role of gut macrophages in mice orally contaminated with scrapie and BSE. *International Journal of Pharmacology* 298, 293-304.
- Man W.Y.N., Brotherstone S., Merrel B.G., Murray W.A., Villanueva B. (2006) Associations of PrP genotypes with live weight and slaughter traits in an experimental flock of Swaeldale sheep in Great Britain. *Animal Science* 82, 607-614.
- Manson J.C., Clarke A.R., Hooper M.L. Aitchison L., McConnell I., Hope J. (1994) 129/Ola mice carrying a null mutation in PrP that abolishes mRNA production is developmentally normal. *Molecular Neurobiology* 8, 121-127.

- Manuelides L., Murdoch G., Manuelides E.E. (1988) Potential involvement of retroviral elements in human dementias. Ciba Foundation Symposium 135, 117-129.
- Martin S.M., Frosoni D.J., Martinez A.M.B., De Felice F.G., Ferreira S.T.
- Mason I.L. (1980) Prolific Tropical Sheep. In: Animal Production and Health, FAO, Rome, Paper 17, pp 124.
- McBride P.A., Bruce M.E., Fraser H. (1988) Immunostaining of scrapie cerebral amyloid plaques with antisera raised to scrapie-associated fibrils (SAF). *Neuropathology and Applied Neurobiology* 14, 325-336.
- Merz P.A., Rohwer R.G., Kasczak R., Wisniewski H.M., Somerville R.A., Gibbs C.J., Gajdusek D.C. (1984) Infection-specific particle from the unconventional slow virus diseases. *Science* 225, 437-440.
- Molina A., Juarez M., Rodero A. (2006) Merino sheep breed's genetic resistance to Scrapie: Genetic structure and comparison of five eradication strategies. *Preventive Veterinary Medicine* 75, 239-250.
- Moum T., Olsaker I., Hopp P., Moldal T., Valheim M., Moum T., Benestad S.L. (2005) Polymorphisms at codons 141 and 154 in the ovine prion protein gene are associated with scrapie Nor 98 cases. *Journal of General Virology* 86, 231-235.
- Moussaoui Y., Caja G., Casellas J., Such X., Francino O. (2005) Asociaiones entre genotipo PrP y caracteres productivos en ovino lechero de raza Manchega y Lacune: Primeros resultados en prolificidad y peso nacimiento. *Congressos/AIDA*, p.3.
- Murphy M.A., Shariflu M.R., Moran C. (2002) High quality genomic DNA extraction from large milk samples. *Journal of Dairy Research* 69, 645-649.
- Nicholas F.W. (2003) Introduction to veterinary genetics. Chapter 5, The Hardy-Weinberg Law. Blackwell Publishing, Oxford, UK.
- Office International Des Epizooties (OIE) (2008) Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. Bovine Viral Diarrhoea, Chapter 2.4.8.
- Office International Des Epizooties (OIE) (2009<sub>a</sub>) Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. Scrapie, Chapter 14.9.
- Office International Des Epizooties (OIE) (2009<sub>β</sub>) Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. Part 1, Chapter 1.1.



- O' Rourke K.I., Duncan J.V., Logan J.R., Anderson A.K., Norden D.K., Williams E.S., Combs B.A., Stobart R.H., Moss G.E., Sutton D.L. (2002) Active surveillance for scrapie by third eyelid biopsy and genetic susceptibility testing of flocks of sheep in Wyoming. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* 9(5), 966-971.
- Palhière I., Brochard M., Verrier E., Moazami-Goudarzi K., Amigues Y., Barrillet F., Bed'Hom B., Bibé B., Bouix J., François D., Leymarie C., Pantano T. (2006) Did the selection for scrapie resistance impact the genetic variability? Preliminary results on four french sheep breeds. Proceedings of the 8<sup>th</sup> World Congress on Genetics Applied to Livestock Production. Belo Horizonte, MG, Brasil. August 13 to 18, 2006.
- Pan K.M., Baldwin M., Nguyen J., Gasset M., Serban A., Groth D., Mehlhorn I., Huang Z., Fletterick R.J., Cohen F.E., Prusiner S.B. (1993) Conversion of  $\alpha$ -helices into  $\beta$ -sheets features in the formation of the scrapie prion proteins. *Proceedings of National Academy Science, USA* 90, 10962-10966.
- Parry H. (1984) *Scrapie*, Academic Press, London, U.K.
- Pattison I.H. (1965) Scrapie in the Welsh mountain breed of sheep and its experimental transmission to goats. *Veterinary Records* 77, 1388-1390.
- Pauly P.C. and Harris D.A. (1998) Copper stimulates endocytosis of the prion protein. *Journal of Biological Chemistry* 273, 33107-33110.
- Peretz D., Williamson R.A., Legname G., Matsunaga Y., Vergana J., Burton V.R., DeArmond S.J., Prusiner S.B., Scott M.R. (2002) A change in the conformation of prions accompanies the emergence of a new prion strain. *Neuron* 34, 921-932.
- Pinelli F., Scimonelli M., Oltenacu P.A., Vitale F., Vitale M., D'Amico A., Caracappa S., Carlussi A. (2006) Associations between PrP and milk performance in Comisana sheep breed. Proceedings of the 8<sup>th</sup> World Congress on Genetics Applied to Livestock Production. Belo Horizonte, MG, Brasil. August 13 to 18, 2006.
- Pongolini S., Bergamini F., Iori A., Migliore S., Corradi A., Bassi S. (2009) Prion protein genotypes of Italian sheep breeds with lysine-171 and phenylalanine-141 detection. *Veterinary Microbiology* 137, 18-23.

- Ponz R., Tejedor M.T., Monteagudo L.V., Arruga M.V. (2006) Scrapie resistance alleles are not associated with lower prolificacy in Rasa Aragonesa sheep. *Research in Veterinary Science* 81, 37-39.
- Prokopová L., Lewis R.M., Dingwall W.S., Simm G. (2002) Scrapie genotype: a correlation with lean growth rate? *Proceedings of the 7<sup>th</sup> World Congress on Genetics Applied to Livestock Production*, Montpellier, France, August 19 to 23, vol. 31, pp 683-686.
- Prusiner S.B (1982) Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. *Science* 216, 136-144.
- Prusiner S.B, Mckinley M.P., Bolton D.C., Bowman K.A., Groth D.F., Cochran S.P., Hennessey E.M., Braunfeld M.B. (1984) Prions: methods for assay, purification, and characterization. In: *Methods in Virology* (Eds. K. Maramorosch and H. Koprowski), Academic Press, New York, Vol.VIII, pp 293-345.
- Prusiner S.B., Scott M., Foster D., Pan K.M., Groth D., Mirinda C., Torchia M., Yang S.L., Serban D., Carlson G.A. (1990) Transgenic studies implicate interactions between homologous PrP isoforms in scrapie prion replication. *Cell* 63, 673-686.
- Prusiner S.B. (1991) Molecular biology of prion disease. *Science* 252, 1515-1522.
- Prusiner S.B. (1993) Genetic and Infectious Prion's Diseases. *Archives of Neurology* 50, 1129-1153.
- Prusiner S.B. (1997) Prion diseases and the BSE crisis. *Science* 278, 245-251.
- Prusiner S.B. (1998) Prions. *Proc.Natl. Academy Science USA*, 95, 13363-13383.
- Prusiner S.B., Scott M., DeArmond J., Cohen F.E. (1998) Prion Protein Biology. *Cell* 93, 337-348.
- Raymond G.J., Hope J., Kocisko D.A., Priola S.A., Caughey B. (1997) Molecularr assessment of the potential transmissibilities of BSE and scrapie to humans. *Nature* 388, 285-288.
- Renshaw R.W., Ray R., Duboni E.J. (2000) Comparison of virus isolation and reverse transcription polymerase chain reaction assay for detection of bovine viral diarrhea virus in bulk milk tank samples. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 12 (2), 184-186.
- Rico A. (2003) Prion: toxic or infectious agent? *Medical Hypothesis* 60(2), 209-214.
- Ridley R.M., Baker H.F. (1995) The myth of maternal transmission of spongiform encephalopathy. *Biochemistry and Molecular Genetics* 311, 1071-1075.

- Riemann K., Adamzik M., Frauenrath S., Egensperger R., Schmid K.W., Brockmeyer N.H., Siffert W. (2007) Comparison of manual and automated nucleic acid extraction from whole-blood samples. *Journal of Clinical laboratory Analysis* 21, 244-248.
- Rutala W.A., Weber D.J. (2001) Creutzfeldt-Jacob disease: recommendations for disinfection and sterilization. *Clinical Infectious Disease* 32, 1348-1356.
- Safar J., Wille H., Itri V., Groth D., Serban H., Torchia M., Cohen F.E., Prusiner S. B. (1998) Eight prion strains have PrP (Sc) molecules with different conformation. *Protein Nature Medicine* 4, 1157-1165.
- Saitou N. and Nei M. (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* 4, 406-425.
- Salaris S., Casu S., Carta A. (2006) Relationship between the prion protein locus and milk yield and udder morphology traits in Sardinian sheep. Communication No. 02-11 in Proc. 8<sup>th</sup> World Congress of Applied Livestock Production. Belo Horizonte, MG, Brazil.
- Salaris S., Casu S., Carta A. (2007) Investigating the relationship between the prion protein locus and milk yield and udder morphology traits in Sardinian sheep. *Journal of Anim Science* 85, 2840-2845.
- Sanger F., Nicklen S., Coulson A.R. (1977) DNA sequencing with chain terminator inhibitors. *Proceedings of National Academy Science USA* 74, 5463-5467.
- Sambrook and Russell (2001) *Molecular Cloning, a Laboratory Manual* (Third Edition), Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, USA.
- Saunders G.C., Cawthraw S., Mountjoy S.J., Hope J., Windl O. (2006) PrP genotypes of atypical scrapie in Great Britain. *Journal of General Virology* 87, 3141-3149.
- Sawalha R.M., Brotherstone S., Man W.Y.Z., Conington J., Bunger L., Simm G., Villanueva B. (2007) Associations of polymorphisms of the ovine prion protein gene with growth, carcass and computerized tomography traits in Scottish Blackface lambs. *Journal of Animal Science* 85, 632-640.
- Schreuder B.E., van Keulen L.J., Vromans M.E., Langeveld J.P., Smits M.A. (1998) Tonsillar biopsy and PrP<sup>Sc</sup> detection in the preclinical diagnosis of scrapie. *Veterinary Record* 142, 564-568.
- Schütz E., Scharfenstein M., Brenig B. (2006) Genotyping of ovine prion protein gene (PRNP) variants by PCR with melting curve analysis. *Clinical Chemistry* 52 (7), 1426-1429.

- Seeger H., Heikenwalder M., Zeller N., Kranich J., Schwarz P., Gaspert A., Seifert B., Miele G., Aguzzi A. (2005) Coincident scrapie infection and nephritis lead to urinary prion excretion. *Science* 130, 324-326.
- Siso S., González L., Jeffrey M., Martin S., Chianini F., Steele P. (2006) Prion protein in kidneys of scrapie infected sheep. *Veterinary Record* 159, 327-328.
- Stahl N., Baldwin M.A., Teblow B.D., Hood L., Gibson B.W., Burlingame A., Prusiner S.B. (1993) Structural studies of the scrapie prion protein using mass spectrometry and amino acid sequencing. *Biochemistry* 32, 1991-2002.
- Sweeney T. and Hanrahan J.P. (2008) The evidence of associations between prion protein genotype and production, reproduction and health traits in sheep. *Veterinary Record* 39, 28.
- Sweeney T., Hanrahan J.P., O'Doherty E. (2007) Is there a relationship between prion protein genotype and ovaluation rate and litter size in sheep? *Animal Reproduction Science* 101, 153-157.
- Taylor D.M. and Diprose M.F. (1996) The response of the 22A strain of scrapie agent to microwave irradiation compared with boiling. *Neuropathology and Applied Neurobiology* 22, 256-258.
- Taylor D.M., Fernie K., McConnell I. (1997) Inactivation of the 22A strain of scrapie agent by autoclaving in sodium hydroxide. *Veterinary Microbiology* 58, 87-91.
- Taylor E., Cogdell D., Coombes K., Hu L., Ramdas L., Tabor A., Hamilton S., Zhang W. (2001) Sequence verification as quality-control step for production of cDNA microarrays. *Biotechniques* 31, 62-65.
- Telling G.C., Parchi P., DeArmond S. J., Cortelli P., Montagna P., Gabizon R., Mastrianni J., Lugaresi E., Gambetti P., Prusiner S. B. (1996) Evidence for the conformation of the pathologic isoform of the prion protein enciphering and propagating prion diversity. *Science* 274, 2079-2082.
- Thorgeirsdottir S., Sigurdarson S., Thorisson H.M., Georgsson G., Palsdottir A. (1999) PrP gene polymorphism and natural scrapie in Icelandic sheep. *Journal of General Virology* 80, 2527-2534.
- Tobler I., Gaus S.E., Deboer T., Achermann P., Fischer M., Rulicke T., Moser M., Oesch B., McBride P.A., Manson J.C. (1996) Altered circadian activity rhythms and sleep in mice devoid of prion protein. *Nature* 380, 639-642.

- Thomas D.L. (2004) Overview of the dairy sheep sector in Canada and the United States. Proceedings of the 10<sup>th</sup> Great Lakes Dairy Sheep Symposium, November 4-6, pp. 166-177, Hudson, WI, USA.
- Tongue S.C., Pfeiffer D.U., Heasman L., Simmons H., Ryder S.J. (2006) PrP genotype and lamb birth weight in a scrapie-free environment: is there an association? *Livestock Science* 105, 120-128.
- Tuo W., O'Rourke K.I., Zhuang D., Cheevers W.P., Spraker T.R., Knowels D.P. (2002) Pregnancy status and fetal prion genetics determine PrP<sup>sc</sup> accumulation in placentomes of scrapie-infected sheep. *Proceedings of National Academy Science, USA* 99, 6310-6315.
- Ün C., Oztabak K., Ozdemir N., Akis I., Mengi A. (2008) Genotyping of PrP gene in native Turkish sheep breeds. *Small Ruminant Research* 74, 260-264.
- Vaccari G., Conte M., Morelli L., Di Guardo G., Petraroli R., Agrimi U. (2003) Primer extension assay for prion protein genotype determination in sheep. *Molecular and Cellular Probes* 18, 33-37.
- Valergakis G.E., Arsenos G., Bazdagianni Z., Banos G. (2008) Grouping strategies and lead factors for ration formulation in milking ewes of the Chios breed. *Livestock Science* 115, 211-218.
- Valergakis G.E., Gelasakis A.I., Oikonomou G., Arsenos G., Fortomaris P. and Banos G. (2010) Profitability of a dairy sheep genetic improvement program using artificial insemination. *Animal* (υπο δημοσίευση).
- Van Kaam J.B.C.H.M., Finocchiaro R., Maizon D.O., Vitale M., Vitale F., Caracappa S., Portolano B. (2006) Effect of the *PRP* gene on milk production in Valle del Belice. Proceedings of the 8<sup>th</sup> World Congress on genetics Applied to Livestock production. Belo Horizonte, MG, Brasil, August 13 to 18, 2006.
- Van Keulen L.J., Vromas M.E., van de Zijderveld F.G. (2002) Early and late pathogenesis of natural scrapie infection in sheep. *Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica* 110, 23-32.
- Van Poucke M., Vandesompele J., Mattheeuws M., Van Zeveren A., Peelman L.J. (2005) A dual fluorescent multiprobe assay for prion protein genotyping in sheep. *BMC Infectious Diseases* 5, 13.

- Vascellari M., Aufiero G.M., Nonno R., Agrimi U., Vaccari G., Basilicata L., Falcaro C., Mancin M., Marcon S., Mutinelli F. (2005) Archives of Virology 150 (10), 1959-1976.
- Vitezica Z.G., Moreno C.R., Bouix J., Barillet F., Perret G., Elsen J.M. (2005) A study on associations between PrP genotypes and meat traits in French sheep breeds. Animal Science 81, 325-330.
- Vitezica Z.G., Moreno C.R., Bodin L., François D., Barillet F., Brunel J.C., Elsen J.M. (2006) No associations between PrP genotypes and reproduction traits in INRA 401 sheep. Journal of Animal Science 84, 1317-1322.
- Vitezica Z.G., Moreno C.R., Lantier F., Lantier I., Schibler L., Roig A. (2007) Quantitative trait loci linked to PRNP gene controlling health and production traits in INRA 401 sheep. Genetic Selection Evolution 39, 421-430.
- Waggoner D.J., Drisaldi B., Bartnikas T.B., Casanero R.L.B., Prohaska J.R., Gitlin J.D., Harris D.A. (2000) Brain copper content and cuproenzyme activity do not vary with prion protein expression level. Journal of Biological Chemistry 275, 7455-7458.
- Weissmann C. (1991) A 'unified theory' of prion propagation. Nature 352, 379-383.
- Wessels G. (2003) Genetic analysis of fertility, milk performance and linear type traits in East Friesian milk sheep. DrMedVet dissertation, Tierärztliche Hochschule Hannover, Germany.
- Westaway D., Zuliani V., Cooper C.M., DaCosta M., Neuman S., Jenny A.L., Detwiler L., Prusiner S.B. (1994) Homozygosity for prion protein alleles encoding glutamine-171 renders sheep susceptible to natural scrapie. Genes & Development 8, 959-969.
- Wilesmith J.W., Ryan J.B.M., Atkinson M.J. (1991) Bovine spongiform encephalopathy-epidemiologic studies on the origin. Veterinary Record 128, 199-203.
- Wilson IG. (1997) Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. Applied Environmental Microbiology 63, 3741-3751.
- Wong B.S., Pan T., Liu T., Li R., Petersen R.B., Jones I.M., Gambetti P., Brown D.R., Sy M.S. (2000) Prion diseases: a loss of antioxidant function? Biochemical and Biophysical Research Communications 275, 249-252.
- Yao H.L., Han J.M., Gao J.M., Zhang J., Zhang B.Y., Guo Y., Nie K., Gao C., Wang X.F., Dong X.P. (2005) Comparative study of the effects of several chemical

- and physical treatments on the activity of protease resistance and infectivity of scrapie strain 263K. *Journal of Veterinary Medicine* B52, 437-443.
- Yen T.T., Gill A.M., Frigeri L.G., Barsh G.S., Wolff G.L. (1994) Obesity, diabetes and neoplasia in yellow A (vy)/mice: ectopic expression of the agouti gene. *FASEB Journal* 8, 479-488.
- Zervas N., Xatziminaoglou J., Georgoudis A., Boyazoglou J. (1988) Characteristics and experiences of Chios breed. *Journal of Agricultural Science in Finland* 60, 576-584.
- Zhang L., Li N., Fan B., Fang M., Xu W. (2004) PRNP polymorphisms in Chinese ovine, caprine and bovine breeds. *Animal Genetics* 35, 457-461.
- Zygiogiannis D., Kyriazakis I., Stamataris C., Friggens N.C., Katsaounis N. (1997) The growth and development of nine European sheep breeds. 2. Greek breed: Butsko, Serres and Karagouniko. *Animal Science* 65, 427-440.
- Zygiogiannis D. (2006) Sheep production in the world and in Greece. *Small Ruminant Research* 62, 143-147.

## **ΕΛΛΗΝΙΚΗ**

- Αικατερινιάδου Λ., Μπελιμπασάκη Σ., Λυμπερόπουλος Α. (2006) Δημιουργία κτηνοτροφικών μονάδων ανθεκτικών στην τρομώδη νόσο. Τριμηνιαία έκδοση του Εθνικού Ιδρύματος Αγροτικής Έρευνας 24, σελ. 22-27.
- Αργυρούδης Σ., Ψύχας Β., Χριστόπουλος Χ., Λεοντίδης Σ., Παπαστεριάδης Α. (1987) Πρώτα κρούσματα τρομώδους νόσου (scrapie) σε ποίμνιο προβάτων στην Ελλάδα. 4<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Κτηνιατρικό Συνέδριο, σελ. 141-142.
- Βαλεργάκης Γ., Αρσένος Γ. (2008) Η χάραξη εθνικής πολιτικής για τα ελληνικά τυροκομικά προϊόντα είναι απαραίτητη για την ανάπτυξη και τον εκσυγχρονισμό της ελληνικής γιδοπροβατοτροφίας. 1<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Συνέδριο Κτηνιατρικής Παραγωγικών Ζώων, Υγιεινής –Ασφάλειας Τροφίμων Ζωικής Προέλευσης και Προστασίας του Καταναλωτή, σελ. 262-263, Αθήνα, 14-16 Μαρτίου.
- Δημητριάδης Ι. (1957) Μαθήματα προβατοτροφίας και αιγοτροφίας. Εκδόσεις Γαρταγάνη, Θεσσαλονίκη, σελ. 137.
- Ζυγογιάννης Δ. (2006) Εκτροφή μηρυκαστικών (Τεύχος Α'), Προβατοτροφία. Εκδόσεις Σύγχρονη Παιδεία, Θεσσαλονίκη.

- Κέντρο Γενετικής Βελτίωσης Ζώων Νέας Μεσημβρίας-Αγροτικός Συνεταιρισμός Προβατοτρόφων φυλής Χίου 'Μακεδονία' (2007) Το πρόβατο της φυλής Χίου, Ετήσιο φυλλάδιο, Αγροτικός Συνεταιρισμός Προβατοτρόφων φυλής Χίου 'Μακεδονία', Θεσσαλονίκη, Ελλάδα. [www.geocities.com/chios\\_breed](http://www.geocities.com/chios_breed)
- Λεοντίδης Σ., Ψύχας Β., Μπιλλίνης Χ., Αργυρούδης Σ., Παπαδόπουλος Ο. (1999) Πρώτα κρούσματα τρομώδους νόσου στις αίγες στην Ελλάδα. 8<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Κτηνιατρικό Συνέδριο, σελ. 200.
- Μάντης Α.Ι. (2000) Υγιεινή και Τεχνολογία του Γάλατος και των Προϊόντων του. Γ' Έκδοση, Εκδοτικός Οίκος Αδελφών Κυριακίδη Α.Ε.
- Μπασδαγιάννη Ζ. (2006) Συμβολή στην προώθηση της γενετικής βελτίωσης του προβάτου στην Ελλάδα: Αξιοποίηση του ελέγχου γαλακτοπαραγωγής προβατινών της φυλής Χίου. Διδακτορική διατριβή, Τμήμα Κτηνιατρικής, ΑΠΘ, Θεσσαλονίκη.
- Παπασάββα-Στυλιανού Π. (2003) Ο γονότυπος της πρωτεΐνης-rp10p των προβάτων της Κύπρου και η σχέση τους με την τρομώδη νόσο (scrapie). Διδακτορική διατριβή, Τμήμα Κτηνιατρικής, ΑΠΘ, Θεσσαλονίκη.
- Σοφιανίδης Γ.Α. (2006) Τοπογραφική και συγκριτική μελέτη των ιστοπαθολογικών αλλοιώσεων της τρομώδους νόσου και της παρουσίας της PrP<sup>sc</sup> στο κεντρικό νευρικό σύστημα προβάτων και αιγών. Διδακτορική διατριβή, Τμήμα Κτηνιατρικής Α.Π.Θ., Θεσσαλονίκη.
- Υπουργείο Αγροτικής Ανάπτυξης και Τροφίμων (2010) Πρόγραμμα επιτήρησης ελέγχου, και εξάλειψης των Μεταδοτικών Σπογγωδών Εγκεφαλοπαθειών (ΜΣΕ) στα μικρά μηρυκαστικά. [http:// www.minagric.gr/greek/ data/tse2010final.coc](http://www.minagric.gr/greek/data/tse2010final.coc)
- Χατζημηνάογλου Ι. (2001) Πρόβατα και αίγες στην Ελλάδα και τον κόσμο (Τόμος Α'). Εκδόσεις Γιαχούδη-Γιαπούλη, Θεσσαλονίκη, σελ. 240.



## ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

A	Alanine, αμινοξύ αλανίνη
bp	Base pair, ζεύγη βάσεων
Ct-τιμή	Κύκλος αντίδρασης real-time PCR πέρα από τον οποίο ένα δείγμα περνάει ένα προκαθορισμένο κατώφλι φθορισμού
DGGE	Denaturing gradient gel electrophoresis, Μετουσιωτική διαβαθμισμένη ηλεκτροφορητική ανάλυση
EE	Ευρωπαϊκή Ένωση
H	Histidine, αμινοξύ Ιστιδίνη
ΚΝΣ	Κεντρικό Νευρικό Σύστημα
K	Lysine, αμινοξύ λυσίνη
L	Leucine, αμινοξύ λευκίνη
ΜΣΕ	Μεταδοτικές Σπογγώδεις Εγκεφαλοπάθειες
P-τιμή	Όριο στατιστικής σημαντικότητας
PCR	Polymerase Chain Reaction, αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης
<i>PRNP</i>	Prion-protein gene, γονίδιο της πρωτεΐνης-prion
PrP <sup>c</sup>	Cellular prion-protein, φυσιολογική πρωτεΐνη-prion
PrP <sup>res</sup>	Resistant prion protein, τμήμα της πρωτεΐνης-prion που δεν πέπτεται με πρωτεΐνάση K.
PrP <sup>sc</sup>	Scrapie prion-protein, παθολογική ισομορφή της πρωτεΐνης-prion
Q	Glutamin, αμινοξύ Γλουταμίνη
QTL	Quantitative trait loci, γονιδιακοί τόποι ποσοτικών χαρακτηριστικών
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphisms, πολυμορφισμός του μήκους περιοριστικών θραυσμάτων
R	Arginine, αμινοξύ αργινίνη
ΣΕΒ	Σπογγώδης Εγκεφαλοπάθεια των Βοοειδών
SAFs	Scrapie Associated Fibrils, ειδικά της scrapie εξωκυτταρικά ινίδια αμυλοειδούς.
SNPs	Single Nucleotide Polymorphisms, απλοί νουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί
Sip	Scrapie Incubation Period gene, γονίδιο που καθορίζει την ευαισθησία των προβάτων στη τρομώδη νόσο
T	Threonine, αμινοξύ Θρεονίνη

νCJD	Variant Creutzfeld-Jakob
V	Valine, αμινοξύ βαλίνη
χλγ	Χιλιόγραμμα
ζβ	Ζεύγη βάσεων

## ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι

### Πρότυπα με ανάμιξη πλασμιδιακού DNA

#### 1. Αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR)

Η απομόνωση των επιθυμητών νουκλεοτιδικών αλληλουχιών έγινε με δοκιμή PCR και τη χρησιμοποίηση των κατάλληλων εκκινητών: Up7 και Do2L (Πίνακας 5). Ως εκμαγείο για την PCR χρησιμοποιήθηκε το DNA ενός ζώου με προσδιορισμένο ετεροζύγωτο γενότυπο ARQ/VRQ.

Το φιαλίδιο της PCR περιείχε 6 μl DNA σε συνολικό όγκο αντίδρασης 120 μl. Στο μίγμα της αντίδρασης περιλαμβάνονταν επίσης 0,2 mM εκκινητή Up7 και 0,2 mM εκκινητή Do2L, 1X του ρυθμιστικού διαλύματος της PLATINUM Taq πολυμεράσης, 3 μονάδες της PLATINUM Taq πολυμεράσης, 200 μM από κάθε dNTPs και 2 mM MgCl<sub>2</sub> (όλα τα αντιδραστήρια ήταν της Invitrogen, Breda, Netherland). Ο επιθυμητός όγκος του μίγματος της αντίδρασης συμπληρώθηκε με αποσταγμένο και αποστειρωμένο νερό.

Το πρωτόκολλο θερμοκυκλοποίησης περιελάμβανε, αρχικά, την αποδιάταξη του DNA με θέρμανση του διαλύματος στους 95°C για 3 λεπτά και στη συνέχεια 40 κύκλους στις εξής συνθήκες: 95°C για 30 δευτερόλεπτα, 63°C για 30 δευτερόλεπτα και 72°C για 20 δευτερόλεπτα. Η αντίδραση ολοκληρώθηκε με επώαση στους 72°C για 15 λεπτά.

Ακολούθησε καθαρισμός του προϊόντος της PCR με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 1,5% (Invitrogen, Paisley, UK). Η ηλεκτροφόρηση έγινε σε τάση 120 Volt για 80 λεπτά. Για την απομόνωση του προϊόντος από την πηκτή και τον καθαρισμό του χρησιμοποιήθηκε αποστειρωμένη λεπίδα καθώς και το ειδικό, για το σκοπό αυτό, εμπορικό σκεύασμα Purelink™ Quick Gel Extraction Kit (Cat. No. K 2100-12, Invitrogen, UK). Ο καθαρισμός του προϊόντος της PCR έγινε σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

Η δοκιμή της PCR πραγματοποιήθηκε σε θάλαμο κάθετης νηματικής ροής και κάτω από συνθήκες που ελαχιστοποιούσαν τον κίνδυνο επιμόλυνσης με εξωγενές DNA. Για τα διάφορα στάδια (απομόνωση, PCR, ηλεκτροφόρηση) χρησιμοποιήθηκαν ξεχωριστοί χώροι, διαφορετικές πιπέτες και ρύγχη πιπετών με φίλτρο.

## **2. Εισαγωγή νουκλεοτιδικής αλληλουχίας του γονιδίου *PRNP* σε πλασμιδιο-φορέα και μετασηματισμός-μεταμόρφωση προκαρυωτικών κυττάρων**

Η εισαγωγή στο φορέα κλωνοποίησης PCR II -TOPO<sup>®</sup> του προϊόντος των 270 ζευγών βάσεων έγινε σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή και μετά από επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 30 λεπτά. Ακολούθησε μετασηματισμός των κατάλληλων Mach-1<sup>™</sup>-T1<sup>®</sup> *Echerichia coli* προκαρυωτικών κυττάρων με το πλασμίδιο. Το πρωτόκολλο μετασηματισμού ήταν το εξής: σε 50 μl προκαρυωτικών κυττάρων προστέθηκαν 2 μl πλασμιδίου-φορέα που περιείχε τη νουκλεοτιδική αλληλουχία και ακολούθησε επώαση σε πάγο για 20 λεπτά. Στη συνέχεια, τα προκαρυωτικά κύτταρα υπέστησαν θερμικό σοκ στους 42°C για 30 δευτερόλεπτα και επανατοποθετήθηκαν στον πάγο για 2 λεπτά. Ακολούθησε προσθήκη 250 μl θρεπτικού υποστρώματος SOC medium [2% τρυπτόνη (Tryptone), 0,5% εκχύλισμα ζύμης (yeast extract), 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM MgSO<sub>4</sub>, 20 mM γλυκόζης] και έντονη ανακίνηση σε αναδευτήρα (shaking incubator LabTech, Daihan Labtech Co. Ltd) στα 180-200 rpm στους 37°C για 1 ώρα. Με το πέρας της ανακίνησης ακολούθησε σπορά των μετασηματισμένων κυττάρων σε τριβλία άγαρ που περιείχαν το αντιβιοτικό καναμυκίνη σε συγκέντρωση 50 μg/ml. Ο πλασμιδιακός φορέας περιείχε μία νουκλεοτιδική αλληλουχία 1000 περίπου βάσεων που αποτελούσε το ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης ενός γονιδίου που προσέδιδε στο φορέα ανθεκτικότητα στην καναμυκίνη. Με τον τρόπο αυτό αποφεύγετο η ανάπτυξη μη ειδικών βακτηριακών αποικιών. Στη συνέχεια, τα τριβλία επώαστηκαν στους 37°C για 24 ώρες. Βακτηριακές αποικίες χρώματος λευκού περιείχαν το ανασυνδυασμένο με την επιθυμητή αλληλουχία πλασμίδιο, ενώ οι αποικίες χρώματος μπλέ περιείχαν το πλασμίδιο αλλά αυτό δεν είχε ενσωματωμένη την αλληλουχία. Την επόμενη ημέρα επιλέχθηκαν 20 ευδιάκριτες βακτηριακές αποικίες χρώματος λευκού, οι οποίες ενοφθαλμίστηκαν σε υγρές καλλιέργειες LB (1% τρυπτόνη, 0,5% εκχύλισμα ζύμης, 1% NaCl) που περιείχαν, επίσης, το αντιβιοτικό καναμυκίνη (συγκέντρωση 50 μg/ml). Οι καλλιέργειες τοποθετήθηκαν στον οριζόντιο αναδευτήρα (180-200 rpm) στους 37°C για 24 ώρες.

## **3. PCR και ανάλυση RFLP για ταυτοποίηση κλώνων ARQ και VRQ**

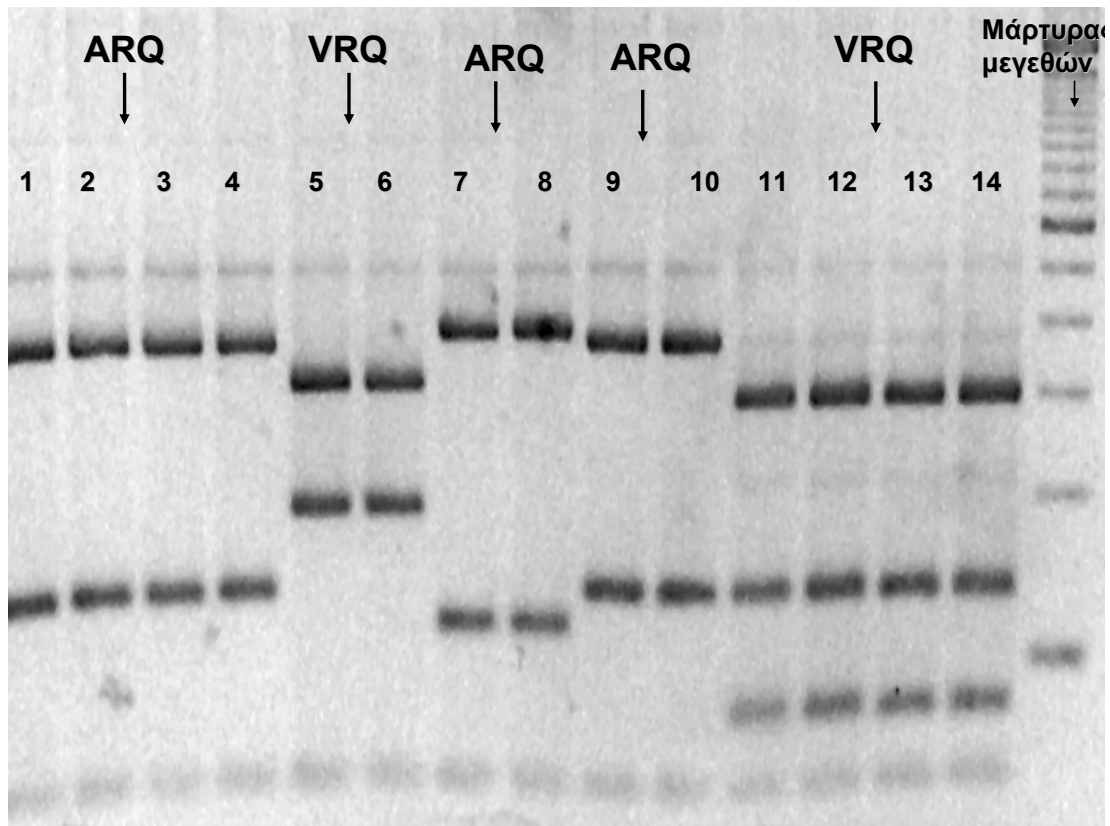
Για την ταυτοποίηση των κλώνων ARQ και VRQ, πολλαπλασιάστηκε προϊόν PCR 513 ζεύγη βάσεων, που περιελάμβανε το τμήμα του γονιδίου *PRNP* που

εισήχθη στο πλασμίδιο-φορέα και τμήμα του φορέα, χρησιμοποιώντας τον ανοδικό εκκινητή M13R και τον καθοδικό M13f-20 (Πίνακας 5).

Οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν σε θερμοκυκλοποιητή PCR thermal cycler DICE (TAKARA BIO INK, Japan). Το μίγμα της αντίδρασης PCR περιείχε 2 μl υγρής καλλιέργειας σε συνολικό όγκο αντίδρασης 20 μl και επιπλέον 0,2 mM εκκινητή “M13R” και 0,2 mM εκκινητή “M13f-20”, 1X του ρυθμιστικού διαλύματος της PLATINUM *Taq* πολυμεράσης, 0,5 μονάδα της PLATINUM *Taq* πολυμεράσης, 200 μM από κάθε dNTPs και 2 mM MgCl<sub>2</sub> (όλα τα αντιδραστήρια ήταν της Invitrogen, Breda, Netherland). Το πρωτόκολλο θερμοκυκλοποίησης περιελάμβανε αρχική αποδιάταξη του DNA-εκμαγείου με θέρμανση του διαλύματος στους 95°C για 3 λεπτά και στη συνέχεια 40 κύκλους στις εξής συνθήκες: 95°C για 30 δευτερόλεπτα, 47°C για 30 δευτερόλεπτα και 72°C για 40 δευτερόλεπτα. Η αντίδραση ολοκληρώθηκε με επώαση στους 72°C για 5 λεπτά.

Ακολούθησε πέψη των 20 προϊόντων PCR που απομονώθηκαν από τις αντίστοιχες υγρές καλλιέργειες, με 2 μονάδες ενδονουκλεάσης περιορισμού BspHI και 1X του ρυθμιστικού διαλύματος B4. Η επώαση διήρκησε 24 ώρες στους 37°C και μετά ακολούθησε ηλεκτροφορητική ανάλυση των προϊόντων σε πηκτή αγαρόζης 3%. Η ηλεκτροφόρηση έγινε σε τάση 130 Volt για 60 λεπτά.

Μία θέση αναγνώρισης για το BspHI σχηματίστηκε στο σημείο ένωσης του φορέα κλωνοποίησης με τη νουκλεοτιδική αλληλουχία του γονιδίου *PRNP*. Συνεπώς, όταν ο φορέας περιείχε το αλληλόμορφο ARQ, το ένζυμο έκοβε το υπό εξέταση PCR προϊόν σε δύο μικρότερα τμήματα (380 και 133 ζεύγη βάσεων) (Εικόνα Π1). Επίσης, η παρουσία της βαλίνης στη θέση 136 δημιουργούσε θέση αναγνώρισης για το BspHI. Συνεπώς, όταν ο κλώνος περιείχε το αλληλόμορφο VRQ, το ένζυμο έκοβε το υπό εξέταση προϊόν PCR σε δύο θέσεις, οπότε προέκυπταν 3 μικρότερα τμήματα (303, 133 και 77 ζεύγη βάσεων). Όταν η νουκλεοτιδική αλληλουχία του γονιδίου *PRNP* ήταν τοποθετημένη με αντίθετη φορά στο πλασμίδιο-φορέα δεν σχηματιζόταν στο σημείο ένωσης τους περιοριστική θέση. Στην περίπτωση αυτή, παρουσία της βαλίνης στη θέση 136 το BspHI τεμάχιζε το PCR προϊόν σε 2 μικρότερα τμήματα (303 και 210 ζεύγη βάσεων) (Εικόνα Π1).



**Εικόνα Π1.** Ηλεκτροφόρηση προϊόντων ανάλυσης RFLP που προέκυψαν μετά από πέψη, με την ενδονουκλεάση περιορισμού BspHI, των προϊόντων PCR υγρών καλλιιεργειών ενοφθαλμισμένων με μετασχηματισμένα πρωκαρυωτικά κύτταρα. Τα δείγματα 1, 2, 3, 4, 9 και 10 φέρουν το αλληλόμορφο ARQ. Τα δείγματα 7 και 8 φέρουν το αλληλόμορφο ARQ, αλλά έχει τοποθετηθεί η νουκλεοτιδική αλληλουχία αντίστροφα στα πλασμιδιακά κύτταρα. Τα δείγματα 5, 6, 11, 12, 13 και 14 φέρουν το αλληλόμορφο VRQ. Ο δείκτης μοριακού βάρους είναι 100 bp DNA-ladder, New England Biolabs, Inc., MA, USA.

#### **4. Απομόνωση και καθαρισμός του πλασμιδιακού DNA**

Για την απομόνωση του πλασμιδιακού DNA χρησιμοποιήθηκε το εμπορικό σκεύασμα Nucleospin Plasmid Purification kit (Cat.No 740.588.50, Macherey-Nagel, Düren, Germany). Κάθε απομόνωση έγινε από 10 ml υγρής καλλιέργειας στην οποία είχε ενοφθαλμιστεί μία βακτηριακή αποικία. Η απομόνωση έγινε σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

Στη συνέχεια, το πλασμιδιακό DNA ευθυγραμμίστηκε με τη βοήθεια του περιοριστικού ενζύμου NotI-HF™ (New England Biolabs Inc., MA, USA). Συγκεκριμένα, η ενζυμική πέψη έγινε με 20 μονάδες NotI-HF™. Η αντίδραση πέψης,

που αφορούσε 10 μl πλασμιδιακού DNA περιείχε, εκτός από το ένζυμο, 1X του ρυθμιστικού διαλύματος B4, 1 μl BSA και αποστειρωμένο και αποσταγμένο νερό ώστε να συμπληρωθεί ο όγκος της αντίδρασης ως τα 100 μl. Η επώαση στους 37°C διήρκησε 24 ώρες.

Ακολούθησε καθαρισμός του ευθειαςμένου πλασμιδιακού DNA με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης 1,5%. Η ηλεκτροφόρηση έγινε σε τάση 120 Volt για 120 λεπτά. Για τον καθαρισμό του πλασμιδιακού DNA χρησιμοποιήθηκε το ειδικό για το σκοπό αυτό εμπορικό σκεύασμα PCR clean up Gel extraction Nucleotrap® (Mackerey-Nagel, Düren, Germany). Ο καθαρισμός έγινε σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

### **5. Ποσοτικός προσδιορισμός πλασμιδιακού DNA**

Ο ποσοτικός προσδιορισμός των δύο κλώνων του πλασμιδιακού DNA πραγματοποιήθηκε με μέτρηση της οπτικής πυκνότητας στα 260 nm. Δεκαπέντε μl πλασμιδιακού DNA ρυθμίστηκαν σε τελικό όγκο 50 μl και ακολούθησε φασματοφωτομέτρηση. Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης κάθε κλώνου βασίστηκε στην παραδοχή ότι για  $OD_{260} = 1$  η συγκέντρωση του δίκλωνου DNA είναι 50 μg/ml (Sambrook και Russell, 2001).

Τα αντίγραφα του πλασμιδιακού DNA των δύο κλώνων προσδιορίστηκαν χρησιμοποιώντας τον τύπο του Αβοκάντρο (Sambrook και Russell, 2001):

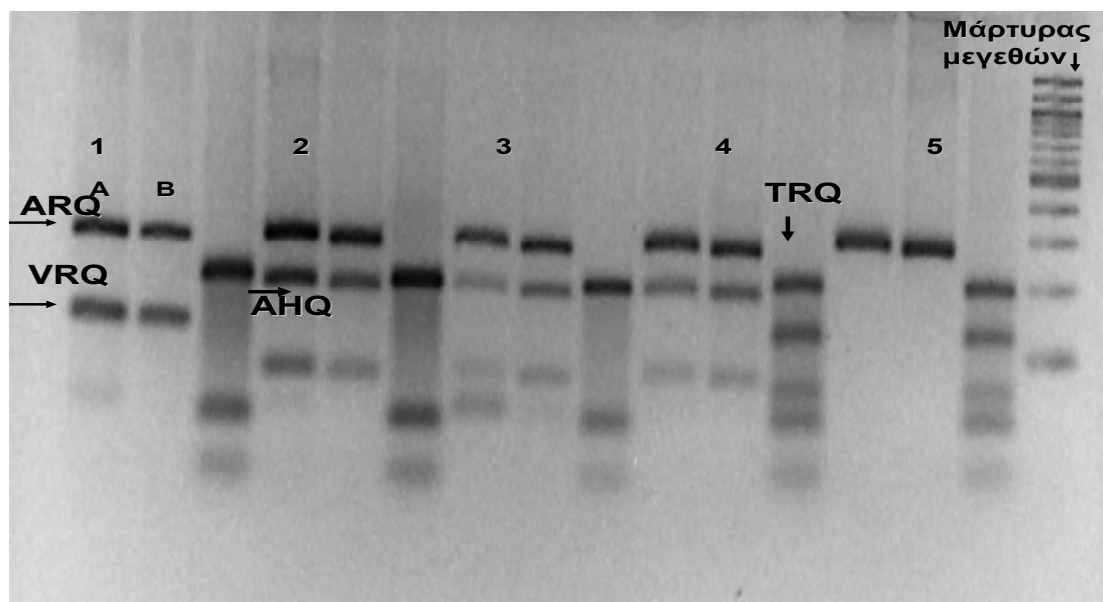
$$\frac{\text{(μάζα σε γραμμάρια)} \times \text{(αριθμός του Αβοκάντρο)}}{\text{(660 γρ/μόριο/βάση)} \times \text{(αριθμός ζευγών βάσεων)}}$$

Στη συνέχεια, με τις κατάλληλες αραιώσεις, η συγκέντρωση αντιγράφων DNA του κάθε κλώνου ρυθμίστηκε στα  $10^{10}$  αντίγραφα. Επιλέχτηκε η συγκέντρωση αυτή επειδή αντιστοιχούσε στη συγκέντρωση των αντιγράφων του γονιδίου *PRNP* που περιείχαν τα DNA που απομονώθηκαν από τα ζώα.

## ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙ

### Αποτελέσματα ανάλυσης RFLP

Η παρουσία της βαλίνης στη θέση 136 ( $V_{136}$ ) δημιουργούσε θέση αναγνώρισης για το BspHI και το ένζυμο έκοβε τα υπό εξέταση προϊόντα PCR, A και B, σε δύο μικρότερα τμήματα. Για το προϊόν A (259 ζεύγη βάσεων) το ένα τμήμα ήταν 127 και το άλλο 132 ζεύγη βάσεων, ενώ για το προϊόν B (258 ζεύγη βάσεων) 127 και 131 ζεύγη βάσεων αντίστοιχα (Εικόνα Π2).

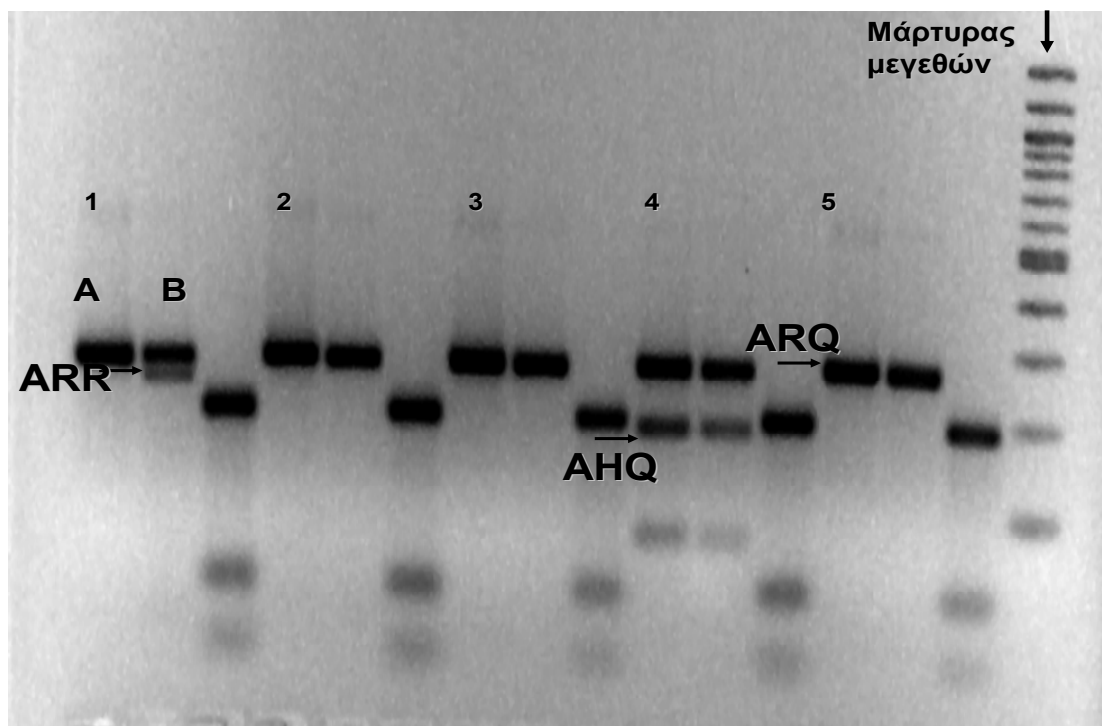


**Εικόνα Π2.** Ηλεκτροφόρηση προϊόντων ανάλυσης RFLP που προέκυψαν από πέψη με τις ενδονουκλεάσες περιορισμού BspHI, BspDI και RsaI. Σε κάθε δείγμα το προϊόν A υφίστατο πέψη με το BspHI, το προϊόν B με το BspHI και το BspDI. Επιπλέον, το προϊόν A υφίστατο πέψη με το RsaI. Το δείγμα 1 φέρει το γενότυπο ARQ/VRQ, τα δείγματα 2, 3 φέρουν το γενότυπο ARQ/AHQ, το δείγμα 4 το γενότυπο TRQ/AHQ και το δείγμα 5 το γενότυπο TRQ/ARQ. Ο δείκτης μοριακού βάρους είναι 100 bp DNA-ladder, New England Biolabs, Inc., MA, USA.

Στο κωδικόνιο 136, κανένας άλλος από τους παρατηρούμενους πολυμορφισμούς ( $A_{136}$  ή  $T_{136}$ ) δε δημιουργούσε περιοριστική θέση για το BspHI. Η παρουσία της ιστιδίνης στη θέση 154 ( $H_{154}$ ) δημιουργούσε επίσης περιοριστική θέση



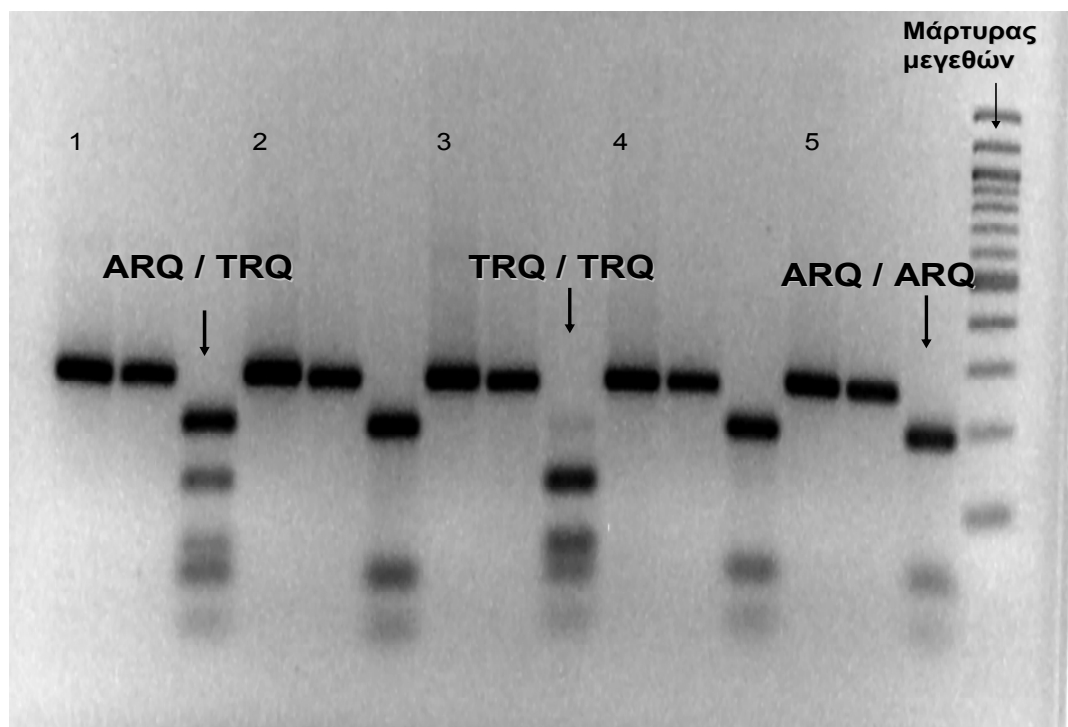
για το BspHI και το ένζυμο έκοβε τα προϊόντα A και B, σε δύο μικρότερα τμήματα (179 και 80 ή 79 ζεύγη βάσεων, αντίστοιχα) (Εικόνες Π2 και Π3).



**Εικόνα Π3.** Ηλεκτροφόρηση προϊόντων ανάλυσης RFLP που προέκυψαν από πέψη με τις ενδονουκλεάσες περιορισμού BspHI, BspDI και RsaI. Σε κάθε δείγμα το προϊόν A υφίστατο πέψη με το BspHI, το προϊόν B με το BspHI και το BspDI. Επιπλέον, το προϊόν A υφίστατο πέψη με το RsaI. Το δείγμα 1 φέρει το γενότυπο ARQ/ARR, τα δείγματα 2, 3, 5 φέρουν το γενότυπο ARQ/ARQ, το δείγμα 4 το γενότυπο ARQ/AHQ. Ο δείκτης μοριακού βάρους είναι 100 bp DNA-ladder, New England Biolabs, Inc., MA, USA.

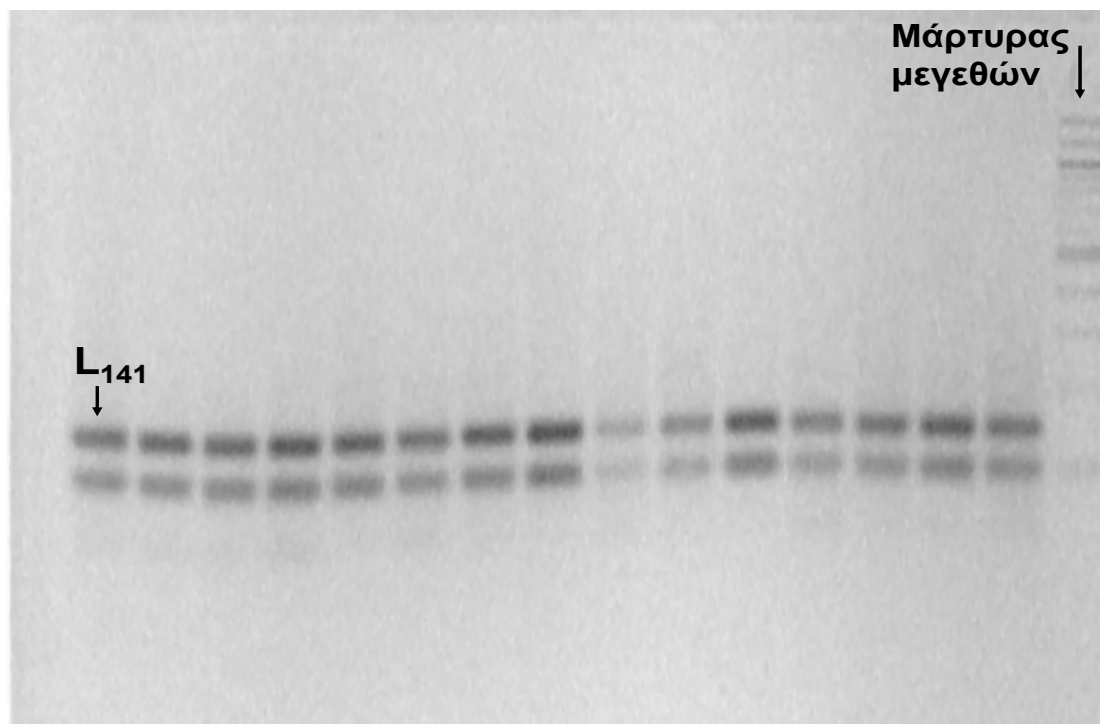
Στο κωδικόνιο 154 η παρουσία της αργινίνης (R<sub>154</sub>) δε δημιουργούσε περιοριστική θέση για το BspHI (Εικόνα Π4). Η παρουσία της ιστιδίνης στη θέση 171 (H<sub>171</sub>) δημιουργούσε περιοριστική θέση για το BspHI μόνο στο προϊόν A. Συνεπώς, το ένζυμο αυτό έκοβε το υπό εξέταση προϊόν A σε 2 μικρότερα τμήματα (230 και 29 ζεύγη βάσεων), ενώ το προϊόν B παρέμενε άθικτο. Αντιθέτως, η παρουσία της αργινίνης στη θέση 171 (R<sub>171</sub>) δημιουργούσε περιοριστική θέση για το BspDI που υπήρχε μόνο στο προϊόν B. Συνεπώς, το ένζυμο αυτό έκοβε το υπό εξέταση προϊόν B σε δύο μικρότερα τμήματα (230 και 28 ζεύγη βάσεων), ενώ το προϊόν A παρέμενε άθικτο (Εικόνα Π3). Παρουσία θρεονίνης στη θέση 136 (T<sub>136</sub>), το RsaI έκοβε το

προϊόν Α σε 4 τμήματα (125, 67, 45 και 20 ζεύγη βάσεων). Επειδή ωστόσο η ίδια θέση αναγνώρισης για το RsaI εντοπιζόταν πέρα από το κωδικόνιο 136 και σε άλλα 2 σημεία του προϊόντος Α, όταν δεν υπήρχε ο πολυμορφισμός T<sub>136</sub>, το ένζυμο έκοβε το προϊόν Α σε 3 τμήματα (192, 45 και 20 ζεύγη βάσεων) (Εικόνα Π4).



**Εικόνα Π4.** Ηλεκτροφόρηση προϊόντων ανάλυσης RFLP που προέκυψαν από πέψη με τις ενδονουκλεάσες περιορισμού BspHI, BspDI και RsaI. Σε κάθε δείγμα το προϊόν Α υφίστατο πέψη με το BspHI, το προϊόν Β με το BspHI και το BspDI. Επιπλέον, το προϊόν Α υφίστατο πέψη με το RsaI. Το δείγμα 1 φέρει το γενότυπο ARQ/TRQ, τα δείγματα 2, 4, 5 φέρουν το γενότυπο ARQ/ARQ, το δείγμα 3 το γενότυπο TRQ/TRQ. Ο δείκτης μοριακού βάρους είναι 100 bp DNA-ladder, New England Biolabs, Inc., MA, USA.

Παρουσία λευκίνης στη θέση 141 (L<sub>141</sub>), το MnlI έκοβε το προϊόν Β σε 2 τμήματα (113 και 145 ζεύγη βάσεων), ενώ παρουσία φαινυλαλανίνης (F<sub>141</sub>) το προϊόν Β παρέμενε άθικτο (Εικόνα Π5).



**Εικόνα Π5.** Ηλεκτροφόρηση προϊόντων ανάλυσης RFLP που προέκυψαν από πέψη του προϊόντος Β με την ενδονουκλεάση περιορισμού MnlI. Όλα τα δείγματα φέρουν τον πολυμορφισμό L<sub>141</sub>. Ο δείκτης μοριακού βάρους είναι 100 bp DNA-ladder, New England Biolabs, Inc., MA, USA

### ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙΙ

**Πίνακες αποτελεσμάτων επίδρασης του γονιδίου *PRNP* στα ζωοτεχνικά χαρακτηριστικά που μελετήθηκαν κατά τη διάρκεια της πρώτης γαλακτικής περιόδου των προβάτων φυλής Χίου**

**Πίνακας ΙΙΙ.** Αποτελέσματα επίδρασης των αλληλομόρφων του γονιδίου *PRNP* στη συνολική γαλακτοπαραγωγή της γαλακτικής περιόδου, στην ημερήσια γαλακτοπαραγωγή του μηνιαίου ελέγχου, στον ρυθμό σύλληψης με την πρώτη οχεία και στο δείκτη πολυδυμίας, κατά τη διάρκεια της πρώτης γαλακτικής περιόδου των προβάτων φυλής Χίου. Πρόκειται για την επίδραση της παρουσίας ενός αλληλομόρφου στο γενότυπο, σε σχέση με το μέσο όρο των άλλων αλληλομόρφων.

<b>Συνολική γαλακτοπαραγωγή της πρώτης γαλακτικής περιόδου</b>			
<b>Εκτιμώμενη επίδραση</b>			
<b>Αλληλόμορφα</b>	<b>(χλγ)</b>	<b>Τυπικό σφάλμα</b>	<b>P</b>
ARQ	-5,73	3,56	0,108
AHQ	0,69	5,45	0,899
VRQ	10,22	21,97	0,642
TRQ	4,47	5,80	0,441
ARR	6,23	5,65	0,271
ARH	20,85	15,96	0,192

<b>Ημερήσια γαλακτοπαραγωγή του μηνιαίου ελέγχου κατά την πρώτη γαλακτική περίοδο</b>			
ARQ	-0,0428	0,0252	0,090
AHQ	-0,0177	0,0386	0,647
VRQ	0,0856	0,1579	0,588
TRQ	0,0560	0,0416	0,179
ARR	0,0496	0,0413	0,230
ARH	0,1798	0,1125	0,110

**Πίνακας Π2.** Αποτελέσματα επίδρασης των αλληλομόρφων του γονιδίου *PRNP* στο δείκτη πολυδυμίας και στο ρυθμό σύλληψης με την πρώτη οχεία, κατά τη διάρκεια της πρώτης γαλακτικής περιόδου των προβάτων φυλής Χίου. Πρόκειται για την επίδραση της παρουσίας ενός αλληλόμορφου στο γενότυπο, σε σχέση με το μέσο όρο των άλλων αλληλομόρφων.

<b>Δείκτης πολυδυμίας κατά τη διάρκεια της πρώτης γαλακτικής περιόδου</b>			
<b>Αλληλόμορφα</b>	<b>Εκτιμώμενη επίδραση (αρ. αρνιών)</b>	<b>Τυπικό σφάλμα</b>	<b>P</b>
ARQ	0,05	0,04	0,197
AHQ	0,06	0,06	0,311
VRQ	-0,04	0,24	0,875
TRQ	-0,11	0,06	0,088
ARR	-0,10	0,06	0,106
ARH	0,11	0,18	0,553

<b>Ρυθμός σύλληψης με την πρώτη οχεία</b>			
<b>Αλληλόμορφα</b>	<b>Εκτιμώμενη επίδραση (ρυθμός σύλληψης)</b>	<b>Τυπικό σφάλμα</b>	<b>P</b>
ARQ	0,03	0,02	0,166
AHQ	-0,03	0,03	0,231
VRQ	-0,17	0,15	0,267
TRQ	-0,02	0,03	0,528
ARR	-0,01	0,03	0,656
ARH	0,08	0,09	0,342

**Πίνακας Π3.** Αποτελέσματα επίδρασης των γενοτύπων του γονιδίου *PRNP* στην ημερήσια γαλακτοπαραγωγή του μηνιαίου ελέγχου κατά τη διάρκεια της πρώτης γαλακτικής περιόδου των προβάτων φυλής Χίου. Η εκτιμώμενη επίδραση είναι η προβλεπόμενη μέση τιμή διορθωμένη ως προς όλους τους άλλους παράγοντες του στατιστικού προτύπου.

**Ημερήσια γαλακτοπαραγωγή του μηνιαίου ελέγχου**

<b>Γενότυποι</b>	<b>Εκτιμώμενη επίδραση (χλγ)</b>	<b>Τυπικό σφάλμα</b>
TRQ/ARR	1,709	0,140
ARQ/ARH	1,671	0,141
ARQ/VRQ	1,657	0,204
ARR/AHQ	1,596	0,286
TRQ/AHQ	1,546	0,180
ARR/ARR	1,527	0,262
VRQ/AHQ	1,517	0,373
ARQ/TRQ	1,450	0,094
ARQ/ARR	1,446	0,087
TRQ/TRQ	1,418	0,188
ARQ/ARQ	1,413	0,079
AHQ/AHQ	1,406	0,220
ARQ/AHQ	1,404	0,086
VRQ/TRQ	1,206	0,401
ARH/AHQ	0,851	0,361

**Πίνακας Π4.** Αποτελέσματα επίδρασης των γενοτύπων του γονιδίου *PRNP* στη συνολική γαλακτοπαραγωγή της γαλακτικής περιόδου κατά τη διάρκεια της πρώτης γαλακτικής περιόδου των προβάτων φυλής Χίου. Η εκτιμώμενη επίδραση είναι η προβλεπόμενη μέση τιμή διορθωμένη ως προς όλους τους άλλους παράγοντες του στατιστικού προτύπου.

<b>Συνολική γαλακτοπαραγωγή της πρώτης γαλακτικής περιόδου</b>		
<b>Γενότυποι</b>	<b>Εκτιμώμενη επίδραση (χλγ)</b>	<b>Τυπικό σφάλμα</b>
TRQ/ARR	258,6	18,4
VRQ/AHQ	242,6	54,4
ARQ/ARH	240,4	19,0
ARQ/VRQ	231,7	26,2
ARR/AHQ	229,8	39,6
TRQ/AHQ	223,3	24,2
ARQ/TRQ	214,7	11,7
ARQ/ARR	212,0	10,6
ARR/ARR	211,9	33,4
ARQ/AHQ	210,8	10,4
AHQ/AHQ	209,7	32,3
ARQ/ARQ	208,6	9,4
TRQ/TRQ	180,1	25,9
VRQ/TRQ	176,4	54,5
ARH/AHQ	117,6	54,3

**Πίνακας Π5.** Αποτελέσματα επίδρασης των γενοτύπων του γονιδίου *PRNP* στο δείκτη πολυδυμίας, κατά τη διάρκεια της πρώτης γαλακτικής περιόδου των προβάτων φυλής Χίου. Η εκτιμώμενη επίδραση είναι η προβλεπόμενη μέση τιμή διορθωμένη ως προς όλους τους άλλους παράγοντες του στατιστικού προτύπου

<b>Δείκτης πολυδυμίας</b>		
<b>Εκτιμώμενη επίδραση</b>		
<b>Γενότυποι</b>	<b>(αριθ. αρνιών)</b>	<b>Τυπικό σφάλμα</b>
ARR/AHQ	2,66	0,63
ARR/AHQ	2,23	0,39
VRQ/AHQ	2,03	0,45
ARQ/AHQ	1,65	0,11
ARQ/ARQ	1,63	0,10
TRQ/AHQ	1,62	0,28
ARQ/ARR	1,59	0,21
TRQ/ARR	1,56	0,21
TRQ/TRQ	1,54	0,30
ARQ/ARR	1,47	0,11
ARQ/TRQ	1,45	0,12
ARR/ARR	1,44	0,38
ARQ/VRQ	1,41	0,30
VRQ/TRQ	1,12	0,63
AHQ/AHQ	1,03	0,37



**Πίνακας Π6.** Αποτελέσματα επίδρασης των γενοτύπων του γονιδίου *PRNP* στο ρυθμό σύλληψης με την πρώτη οχεία κατά τη διάρκεια της πρώτης γαλακτικής περιόδου των προβάτων φυλής Χίου. Η εκτιμώμενη επίδραση είναι η προβλεπόμενη μέση τιμή διορθωμένη ως προς όλους τους άλλους παράγοντες του στατιστικού προτύπου.

<b>Ρυθμός σύλληψης με την πρώτη οχεία</b>		
<b>Γενότυποι</b>	<b>Εκτιμώμενη επίδραση (ρυθμός σύλληψης)</b>	<b>Τυπικό σφάλμα</b>
VRQ/AHQ	1,00	0,24
ARQ/ARH	0,96	0,13
TRQ/ARR	0,93	0,14
ARR/AHQ	0,90	0,19
AHQ/AHQ	0,89	0,18
ARR/ARR	0,89	0,20
ARQ/ARQ	0,87	0,09
ARQ/TRQ	0,86	0,10
ARQ/ARR	0,85	0,10
ARH/AHQ	0,85	0,32
TRQ/AHQ	0,85	0,16
ARQ/AHQ	0,84	0,09
ARQ/VRQ	0,79	0,31
TRQ/TRQ	0,62	0,18
VRQ/TRQ	-0,10	0,32