

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

**ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ PRION
ΣΕ ΔΙΓΕΣ ΥΓΙΕΙΣ ΚΑΙ ΜΕ ΤΡΟΜΩΔΗ ΝΟΣΟ**

ΕΙΡΗΝΗ Γ. ΦΡΑΓΚΙΑΔΑΚΗ

ΚΤΗΝΙΑΤΡΟΣ - Μ.Τ.Σ. ΖΩΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ

ΥΠΟΤΡΟΦΟΣ Ι.Κ.Υ.

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΑΘΗΝΑ 2009

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

ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ PRION ΣΕ ΔΙΓΕΣ ΥΓΙΕΙΣ ΚΑΙ ΜΕ ΤΡΟΜΩΔΗ ΝΟΣΟ

ΕΙΡΗΝΗ Γ. ΦΡΑΓΚΙΑΔΑΚΗ
ΚΤΗΝΙΑΤΡΟΣ - Μ.Τ.Σ. ΖΩΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ
ΥΠΟΤΡΟΦΟΣ Ι.Κ.Υ.

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή:

Εμμ. Ρογδάκης, Επιβλέπων Καθηγητής
Λ. Αικατερινιάδου, Ερευνήτρια Β', ΕΘ.Ι.ΑΓ.Ε.
Α. Κομινάκης, Επίκουρος Καθηγητής

Επταμελής Εξεταστική Επιτροπή:

Εμμ. Ρογδάκης, Επιβλέπων Καθηγητής
Γ. Ζέρβας, Καθηγητής
Σ. Παπουτσόγλου, Καθηγητής
Ι. Μενεγάτος, Καθηγητής
Α. Κομινάκης, Επίκουρος Καθηγητής
Π. Κουτσούλη, Λέκτορας
Λ. Αικατερινιάδου, Ερευνήτρια Β', ΕΘ.Ι.ΑΓ.Ε.

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ	5
ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	8
ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	10
I. ΠΡΟΤΥΠΟ ΔΙΑΜΟΡΦΩΣΗΣ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ PRION (PRION MODEL)	10
I.1. ΟΡΙΣΜΟΣ ΚΑΙ ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΑΝΑΔΡΟΜΗ	10
I.2. Ο ΜΟΛΥΣΜΑΤΙΚΟΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ ΤΩΝ ΜΕΤΑΔΟΤΙΚΩΝ ΣΠΟΓΓΩΔΩΝ ΕΓΚΕΦΑΛΟΠΑΘΕΙΩΝ	12
I.3. ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΗ (PRP ^C) ΚΑΙ ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗ ΠΡΩΤΕΪΝΗ PRION (PRP ^{SC}).....	13
I.4. ΦΡΑΓΜΟΣ ΜΕΤΑΔΟΣΗΣ ΤΩΝ ΜΕΤΑΔΟΤΙΚΩΝ ΣΠΟΓΓΩΔΩΝ ΕΓΚΕΦΑΛΟΠΑΘΕΙΩΝ ΜΕΤΑΞΥ ΤΩΝ ΕΙΔΩΝ.....	16
I.5. ΣΤΕΛΕΧΟΣ PRION	17
II. ΜΕΤΑΔΟΤΙΚΕΣ ΣΠΟΓΓΩΔΕΙΣ ΕΓΚΕΦΑΛΟΠΑΘΕΙΕΣ	18
III. ΤΡΟΜΩΔΗΣ ΝΟΣΟΣ ΤΩΝ ΜΙΚΡΩΝ ΜΗΡΥΚΑΣΤΙΚΩΝ ΜΕ ΕΜΦΑΣΗ ΣΤΗΝ ΑΙΓΑ21	
III.1. ΟΡΙΣΜΟΣ, ΓΕΩΓΡΑΦΙΚΗ ΕΞΑΠΛΩΣΗ	21
III.2. ΕΠΙΖΩΟΤΙΟΛΟΓΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ	23
III.3. ΣΥΜΠΤΩΜΑΤΟΛΟΓΙΑ	25
III.4. ΤΡΟΠΟΣ ΜΕΤΑΔΟΣΗΣ	25
III.5. ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ	28
III.6. ΔΙΑΓΝΩΣΗ	29
III.7. ΠΡΟΛΗΨΗ –ΘΕΡΑΠΕΙΑ.....	30
III.8. ΣΧΕΣΗ ΜΕ ΤΗ ΔΗΜΟΣΙΑ ΥΓΕΙΑ.....	30
IV. ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΙ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ PRION ΣΤΑ ΠΡΟΒΑΤΑ ΚΑΙ ΣΤΙΣ ΑΙΓΕΣ.....	31
V. ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΙ ΤΗΣ PRP ΣΤΗΝ ΑΙΓΑ ΚΑΙ ΣΥΝΔΕΣΗ ΤΟΥΣ ΜΕ ΤΗΝ ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ/ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑ ΣΤΗΝ ΤΡΟΜΩΔΗ ΝΟΣΟ	36
VI. ΜΕΘΟΔΟΙ ΓΟΝΟΤΥΠΙΚΗΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΤΟΥ PRNP ΓΟΝΙΔΙΟΥ	38
VI.1. ΓΕΝΙΚΑ	38
VI.2. ΑΝΑΛΥΣΗ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ DNA (SEQUENCING) ΚΑΤΑ SANGER	40
VI.3. ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΠΗΚΤΗΣ ΜΕ ΔΙΑΒΑΘΜΙΣΜΕΝΗ ΑΠΟΔΙΑΤΑΚΤΙΚΗ ΣΥΣΤΑΣΗ (DENATURING GRADIENT GEL ELECTROPHORESIS-DGGE)	41
VII. ΑΝΟΣΟΒΙΟΧΗΜΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ PRP^{SC} ΜΕ ΑΝΟΣΟΚΑΘΗΛΩΣΗ.....	44
ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	47
I. ΣΚΟΠΟΣ	47
II. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	48
II.1. ΖΩΙΚΟ ΥΛΙΚΟ	48
II.2. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΓΟΝΙΔΙΩΜΑΤΙΚΟΥ DNA ΑΠΟ ΙΣΤΟΤΕΜΑΧΙΟ ΕΓΚΕΦΑΛΟΥ ΚΑΙ ΠΛΗΡΕΣ ΑΙΜΑ.....	52

Π.3. ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΤΗΣ ΠΟΣΟΤΗΤΑΣ ΚΑΙ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ DNA ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΟΡΙΖΟΝΤΙΑΣ ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗΣ	53
Π.4. ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (ΑΑΠ, PCR, POLYMERASE CHAIN REACTION) ΓΙΑ ΤΗΝ DGGE, ΤΗΝ ΑΝΑΛΥΣΗ RFLP ΚΑΙ ΤΗΝ ΑΛΛΗΛΟΥΧΗΣΗ.	54
Π.5. ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΠΗΚΤΗΣ ΜΕ ΔΙΑΒΑΘΜΙΣΜΕΝΗ ΑΠΟΔΙΑΤΑΚΤΙΚΗ ΣΥΣΤΑΣΗ (DENATURING GRADIENT GEL ELECTROPHORESIS- DGGE)	61
Π.6. ΑΝΟΣΟΚΑΘΗΛΩΣΗ (WESTERN BLOT)	64
Π.7. ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ.....	67
III. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	68
III.1. ΓΟΝΟΤΥΠΗΣΗ ΤΟΥ PRNP ΓΟΝΙΔΙΟΥ	68
III.1.1. ΓΕΝΙΚΑ	68
III.1.2. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΤΗΣ ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗΣ ΣΕ ΤΡΙΧΟΕΙΔΕΣ	69
III.1.3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΤΗΣ DGGE.....	69
III.2. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ	71
III.2.1. ΣΥΧΝΟΤΗΤΕΣ ΑΛΛΗΛΟΜΟΡΦΩΝ ΚΑΙ ΓΟΝΟΤΥΠΩΝ – ΑΠΟΚΛΕΙΣΤΙΚΑ ΑΛΛΗΛΟΜΟΡΦΑ	71
III.2.2. ΈΛΕΓΧΟΣ ΙΣΟΡΡΟΠΙΑΣ ΚΑΤΑ HARDY-WEINBERG	74
III.2.3. ΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΟΙ ΓΟΝΟΤΥΠΟΙ ΤΗΣ PRP	75
III.3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΑΝΟΣΟΚΑΘΗΛΩΣΗΣ.....	88
IV. ΣΧΟΛΙΑΣΜΟΣ.....	90
IV.1. ΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΚΟΙ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΙ ΤΟΥ PRNP ΓΟΝΙΔΙΟΥ ΣΤΙΣ ΥΠΟ ΜΕΛΕΤΗ ΥΓΙΕΙΣ ΚΑΙ ΜΕ ΤΡΟΜΩΔΗ ΝΟΣΟ ΑΙΓΕΣ.....	90
IV.2. ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΩΝ ΤΗΣ PRP ΜΕ ΤΗΝ ΚΛΑΣΙΚΗ ΤΡΟΜΩΔΗ ΝΟΣΟ ΣΤΙΣ ΥΠΟ ΜΕΛΕΤΗ ΑΙΓΕΣ	91
IV.3. ΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΚΟΙ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΙ ΤΟΥ PRNP ΓΟΝΙΔΙΟΥ ΣΤΙΣ ΥΠΟ ΜΕΛΕΤΗ ΕΛΛΗΝΙΚΕΣ ΦΥΛΕΣ ΑΙΓΩΝ	95
IV.4. ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ DGGE ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΕΥΡΕΣΗ ΤΩΝ ΣΗΜΑΝΤΙΚΟΤΕΡΩΝ ΜΕΜΟΝΩΜΕΝΩΝ ΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΚΩΝ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΩΝ ΤΟΥ PRNP ΓΟΝΙΔΙΟΥ ΣΤΙΣ ΑΙΓΕΣ.....	97
IV.5. ΑΝΟΣΟΒΙΟΧΗΜΙΚΗ ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΑΠΟΜΟΝΩΣΕΩΝ ΤΗΣ PRP ^{SC} ΑΠΟ ΑΙΓΕΣ ΠΟΥ ΕΚΤΡΕΦΟΝΤΑΙ ΣΤΗΝ ΕΛΛΑΔΑ ΜΕ ΑΝΤΙΣΤΟΙΧΕΣ ΤΗΣ ΙΤΑΛΙΑΣ.....	99
V. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	101
VI. ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	103
VII. SUMMARY.....	105
VIII. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	107
IX. ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ.....	129
X. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑΤΑ	130
XI. ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ	132

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Οι πρωτεΐνες prion θεωρείται ότι αποτελούν το βασικό αιτιολογικό παράγοντα μιας ομάδας θανατηφόρων νευροεκφυλιστικών νόσων του ανθρώπου και των ζώων, που ονομάζονται Μεταδοτικές Σπογγώδεις Εγκεφαλοπάθειες ή νοσήματα prion. Η Τρομώδης Νόσος (Scrapie) είναι το παλαιότερο από τα νοσήματα prion και χαρακτηρίζεται από την εναπόθεση της παθολογικής πρωτεΐνης prion (PrP^{Sc}) κυρίως στο κεντρικό νευρικό σύστημα των μικρών μηρυκαστικών.

Η συστηματική μελέτη της Τρομώδους Νόσου άρχισε τη δεκαετία του 1990, όταν συνδέθηκε αιτιολογικά με τη Σπογγώδη Εγκεφαλοπάθεια των Βοοειδών, η οποία με τη σειρά της ενοχοποιήθηκε για την εμφάνιση της παραλλαγμένης μορφής της νευροεκφυλιστικής νόσου Creutzfeldt-Jacob του ανθρώπου (variant Creutzfeldt-Jacob-vCJD). Η διατροφική κρίση που προκλήθηκε οδήγησε σε συστηματικούς και εκτεταμένους ελέγχους ιδιαίτερα στις χώρες της Ευρωπαϊκής Ένωσης, όπου και διαγνώστηκαν τα περισσότερα περιστατικά της νόσου vCJD. Ο αυξανόμενος αριθμός των εξεταζόμενων προβάτων και αιγών και η αυξημένη ευαισθησία των διαγνωστικών τεχνικών που χρησιμοποιήθηκαν τα τελευταία πέντε χρόνια επέτρεψαν επιπλέον την ανίχνευση των υποκλινικών περιστατικών και την αναγνώριση ενός νέου «άτυπου» στελέχους της Τρομώδους Νόσου. Το 2004 η εμφάνιση Σπογγώδους Εγκεφαλοπάθειας των Βοοειδών σε μια αίγα οδήγησε την Ευρωπαϊκή Ένωση στην υιοθέτηση περαιτέρω εντατικών μέτρων με στόχο τον «αποκλεισμό της εισόδου του αιτιολογικού παράγοντα της Σπογγώδους Εγκεφαλοπάθειας των Βοοειδών στη διατροφική αλυσίδα του ανθρώπου και των ζώων» (Ευρωπαϊκός Κανονισμός -ΕΚ 999/2001 και τροποποιήσεις του).

Τα σύγχρονα μέτρα πρόληψης για την Τρομώδη Νόσο του προβάτου, με βάση τον ΕΚ 999/2001, βασίζονται στη σύνδεση συγκεκριμένων πολυμορφισμών του γονιδίου της πρωτεΐνης prion με την εμφάνιση της νόσου. Η παραδοχή αυτή αποτελεί τη βάση για την εφαρμογή προγραμμάτων επιλογής σε εκτροφές προβάτων σε όλες τις χώρες της Ευρωπαϊκής Ένωσης. Οι αίγες εξαιρούνται από την παραπάνω στρατηγική καθώς δεν έχουν συνδεθεί ακόμη συγκεκριμένοι πολυμορφισμοί του γονιδίου της πρωτεΐνης prion με την εμφάνιση της Τρομώδους Νόσου σε αυτές.

Στην Ελλάδα, όπου εκτρέφονται 4,9 εκατομμύρια αιγών, σύμφωνα με στοιχεία του Εθνικού Εργαστηρίου Αναφοράς των Μεταδοτικών Σπογγωδών

Εγκεφαλοπαθειών, ο επιπολασμός της Τρομάδους Νόσου ανέρχεται σε 0,46% στις αίγες και σε 1,61% στα πρόβατα. Από το 2002 έως σήμερα, τα βιβλιογραφικά δεδομένα για την Τρομάδη Νόσο στις αίγες στον Ελλαδικό χώρο προέρχονται από την αλληλούχηση συνολικά 52 αιγών με Κλασική Τρομάδη Νόσο και 19 περιστατικών με άτυπη εντόπιση της PrP^{Sc}. Σημειώνεται ότι τα περιστατικά αυτά δεν προέρχονται από το Εθνικό Εργαστήριο Αναφοράς των Μεταδοτικών Σπογγωδών Εγκεφαλοπαθειών. Παρόμοιες διεθνείς μελέτες συσχέτισης πολυμορφισμών με την Τρομάδη Νόσο στις αίγες είναι περιορισμένες τόσο σε αριθμό όσο και σε στατιστική σπουδαιότητα εξαιτίας του μικρού αριθμού των προσβεβλημένων ζώων που περιέχονται σε αυτές.

Στην Ελλάδα, κατά το διάστημα 2002-2007, το Εθνικό Εργαστήριο Αναφοράς των Μεταδοτικών Σπογγωδών Εγκεφαλοπαθειών κατέγραψε 168 περιστατικά Τρομάδους Νόσου στις αίγες. Από αυτή τη συλλογή, μας παραχωρήθηκαν ιστοτεμάχια εγκεφάλου από 89 αίγες με Τρομάδη Νόσο, τα οποία αποτέλεσαν πολύτιμο ερευνητικό υλικό, ικανό να συνεισφέρει στην καλύτερη κατανόηση του νοσήματος.

Σκοπός της παρούσας έρευνας ήταν η μελέτη των επίσημα ταυτοποιημένων περιστατικών Τρομάδους Νόσου στις αίγες για την ανεύρεση πιθανών πολυμορφισμών της πρωτεΐνης prion που συσχετίζονται με την εμφάνιση ή μη της νόσου. Για το λόγο αυτό, μελετήθηκε το ανοιχτό αναγνωστικό πλαίσιο (Open Reading Frame-ORF) του γονιδίου της πρωτεΐνης prion σε αίγες υγιείς και με Τρομάδη Νόσο. Στόχος ήταν επίσης: α) η ανάλυση και περιγραφή των πολυμορφισμών της πρωτεΐνης prion σε αίγες των Ελληνικών φυλών, εγχώριας και Σκοπέλου, β) η πιθανή δημιουργία ενός αξιόπιστου και αποτελεσματικού διαγνωστικού πρωτοκόλλου για την ανεύρεση «ανθεκτικών» ατόμων και γ) η μοριακή ταυτοποίηση απομονώσεων της παθολογικής πρωτεΐνης prion από αίγες που εκτρέφονταν στην Ελλάδα και η σύγκριση τους με αντίστοιχες πρωτεϊνικές απομονώσεις από αίγες άλλων χωρών.

Στο γενικό μέρος της παρούσας διδακτορικής διατριβής γίνεται βιβλιογραφική ανασκόπηση του προτύπου διαμόρφωσης της πρωτεΐνης prion, της Τρομάδους Νόσου των μικρών μηρυκαστικών, των πολυμορφισμών της πρωτεΐνης prion και της σύνδεσής τους με την Τρομάδη Νόσο στις αίγες. Παραθέτονται στοιχεία για τις σημαντικότερες μεθόδους γονοτυπικής ανάλυσης και δίνεται έμφαση

στην ηλεκτροφόρηση σε τριχοειδές (capillary electrophoresis) και στην ηλεκτροφόρηση πηκτής με διαβαθμισμένη αποδιατακτική σύσταση (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis-DGGE), οι οποίες χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα έρευνα.

Στο ειδικό μέρος περιγράφεται ο σκοπός της έρευνας, τα υλικά και οι μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν, τα αποτελέσματα που προέκυψαν και ακολουθεί ο σχολιασμός των αποτελεσμάτων. Τέλος παρουσιάζονται τα συμπεράσματα στα οποία καταλήγει η παρούσα εργασία.

Η παρούσα διδακτορική διατριβή εκπονήθηκε στο Ινστιτούτο Κτηνιατρικών Ερευνών Θεσσαλονίκης (Ι.Κ.Ε.Θ.), του Εθνικού Ιδρύματος Αγροτικής Έρευνας (ΕΘ.Ι.ΑΓ.Ε.) σε συνεργασία με το Εργαστήριο Γενικής και Ειδικής Ζωοτεχνίας, του Τμήματος Επιστήμης Ζωικής Παραγωγής και Υδατοκαλλιεργειών, του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών (ΓΠΑ). Η εργαστηριακή έρευνα χρηματοδοτήθηκε από πόρους του ΕΘ.Ι.ΑΓ.Ε. και από το πρόγραμμα 05ΜΟΧΛΟΣ05 με τίτλο «Αναβάθμιση εξοπλισμού και παρεχόμενων υπηρεσιών στον αγροτικό τομέα-Βελτίωση και αναβάθμιση ερευνητικών μονάδων του ΕΘ.Ι.ΑΓ.Ε.». Η παραχώρηση των ιστοτεμαχίων εγκεφάλου από νοσούσες και υγιείς αίγες έγινε από το Εθνικό Εργαστήριο Αναφοράς Μεταδοτικών Σπογγωδών Εγκεφαλοπαθειών (ΕΕΑ-ΜΣΕ), του Κτηνιατρικού Εργαστηρίου Λάρισας του Υπουργείου Αγροτικής Ανάπτυξης και Τροφίμων. Η δοκιμή της ανοσοκαθήλωσης και η γονοτυπική ανάλυση με τη χρήση ηλεκτροφόρησης σε τριχοειδές έγινε στο Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Sicurezza Alimentare, Istituto Superiore di Sanità της Ρώμης. Ενώ, γενική εκπαίδευση πάνω στις τεχνικές ηλεκτροφόρησης πραγματοποιήθηκε στο Piattaforma Molecolare Diagnostica, του Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, στο Legnaro Ιταλίας στο πλαίσιο του προγράμματος SOCRATES/ERASMUS μεταξύ του ΓΠΑ και του Dipartimento di Scienze Animali, Università degli Studi di Padova, Ιταλίας.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Από τη θέση αυτή θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Καθηγητή του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών (ΓΠΑ) κ. Εμμ. Ρογδάκη που δέχτηκε να αναλάβει το καθήκον του επιβλέποντα καθηγητή για τη διενέργεια της παρούσας διδακτορικής έρευνας. Η παρότρυνση και η κατανόησή του καθόλη τη διάρκεια εκπόνησης της διατριβής στάθηκε καταλυτική για την ολοκλήρωσή της.

Ευχαριστώ θερμά την Ερευνήτρια Β' του Ιδρύματος Κτηνιατικών Ερευνών Θεσσαλονίκης (Ι.Κ.Ε.Θ.), Δρ. Λ. Αικατερινιάδου που ανέλαβε το σχεδιασμό, την επιστημονική στήριξη, την απρόσκοπτη συμπαράσταση και αμέριστη αρωγή σε όλη τη διάρκεια της εκπόνησης και συγγραφής της διατριβής.

Θερμές ευχαριστίες εκφράζω στον Επίκουρο Καθηγητή του ΓΠΑ κ. Α. Κομινάκη για την καταλυτική συμβολή του στην στατιστική και γενετική ανάλυση-ερμηνεία των αποτελεσμάτων και τη διόρθωση της διατριβής.

Ιδιαίτερη μνεΐα οφείλω στα υπόλοιπα μέλη της επταμελούς εξεταστικής επιτροπής, για την συνέπεια και την πολύτιμη συμβολή τους στη διόρθωση της παρούσας διδακτορικής διατριβής. Συγκεκριμένα, εκφράζω την ευγνωμοσύνη και τις ειλικρινές ευχαριστίες μου στον αξιότιμο Καθηγητή και Πρύτανη του ΓΠΑ κ. Γ. Ζέρβα, καθώς και στους αξιότιμους Καθηγητές κ. Σ. Παπουτσόγλου και κ. Ι. Μενεγάτο. Επίσης, θερμά ευχαριστώ τη Λέκτορα κα Π. Κουτσούλη για τις εύστοχες παρατηρήσεις της σε θέματα πολυμορφισμών και Πληθυσμιακής Γενετικής.

Ιδιαίτερα ευχαριστώ τη Δρ. Ε. Κουτσούκου-Χαρτώνα, Προϊσταμένη του Εθνικού Εργαστηρίου Αναφοράς των Μεταδοτικών Σπογγωδών Εγκεφαλοπαθειών (ΕΕΑ-ΜΣΕ), του Κτηνιατρικού Εργαστηρίου Λάρισας του Υπουργείου Αγροτικής Ανάπτυξης και Τροφίμων για την ευγενική παραχώρηση του πολύτιμου ζωικού υλικού και τη συνολική προσφορά της στη διενέργεια της έρευνας. Καθώς επίσης και τον υποψήφιο διδάκτορα, κτηνίατρο κ. Β. Ντάφη για τη συλλογή των δειγμάτων από τις βιολογικές εκτροφές αιγών.

Θερμές ευχαριστίες οφείλω στον Dr U. Agrimi, Προϊστάμενο Ερευνητή του Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Sicurezza Alimentare, Istituto Superiore di Sanità (ISS) της Ρώμης και τους ερευνητές Dr G. Vaccari, Dr R. Nonno και Dr M. Di Bari για τη συνεργασία τους και τη δυνατότητα που μου παρείχαν για τη διενέργεια εξειδικευμένων αναλύσεων. Ευχαριστώ επίσης τους κ.κ. M. Conte, S.

Marcon, B. Chiappini, Dr C. D'Agostino, E. Esposito, Dr GM. Cosseddu, P. Fazzi, L. Morelli, C. Parisi καθώς και τους υποψήφιους διδάκτορες κα C. Bucalossi και κα L. Pirisinu και τέλος τον κ. S. Migliore. Ευχαριστώ τον Dr F. Mutinelli και τη βιολόγο A. Granato (Istopatologia και Piattaforma Molecolare Diagnostica, Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Legnaro, Ιταλία) για την εκπαίδευση μου κατά τη διάρκεια του προγράμματος ERASMUS/SOCRATES και τον Dr P. Acutis και την ερευνήτρια S. Colussi (Centro Encefalopatie Animali, Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d' Aosta, Torino, Ιταλία) για την ευγενική παραχώρηση δείγματος-μάρτυρα που χρησιμοποίησα στην παρούσα έρευνα.

Θα ήταν μεγάλη παράλειψη να μην αναγνωρίσω την πολύτιμη επιστημονική βοήθεια της Δρ. Ρ. Παπή, του Τμήματος Χημείας του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης (ΑΠΘ) σε όλα τα φαινομενικά 'άλυτα' θέματα βιοχημείας που με απασχόλησαν, όπως και τη Δρ. Μ. Θεοδώρου, του ίδιου Τμήματος.

Επίσης ευχαριστώ θερμά τον Δρ Ν. Γιαδίνη, Επίκουρο καθηγητή της Παθολογίας μικρών μηρυκαστικών της Κτηνιατρικής Σχολής, του ΑΠΘ για την πολύτιμη βοήθειά του στην κλινική διάγνωση της Τρομώδους Νόσου στις αίγες και τη συμβολή του στην παρακολούθηση εκτροφών με κλινικά περιστατικά της νόσου. Ευχαριστίες οφείλω επίσης στον κτηνίατρο κ. Ε. Παπαγεωργίου, σε όλους τους κτηνοτρόφους που συνεργάστηκαν και ιδιαίτερα στον κ. Σ. Γαζέτη.

Επιπλέον ευχαριστώ τη Διευθύντρια του Ι.Κ.Ε.Θ. Δρ. Σ. Μπελιμπασάκη για τη χρηματοδότηση της παρούσας έρευνας αλλά και όλο το προσωπικό του ΙΚΕΘ, Θέρμης, Θεσσαλονίκης που διευκόλυνε την εργαστηριακή έρευνα μου.

Τέλος, ευχαριστώ θερμά το Ίδρυμα Κρατικών Υποτροφιών (Ι.Κ.Υ.), του οποίου υπήρξα υπότροφος.

Ευχαριστώ ολόψυχα όλους τους φίλους μου που με βοήθησαν ποικιλοτρόπως και διευκόλυναν την παραμονή μου στη Θεσσαλονίκη και ιδιαίτερα τους γονείς μου για την αγάπη, τη συμπαράσταση και την πίστη που δείχνουν τόσα χρόνια σε μένα.

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

I. Πρότυπο διαμόρφωσης της πρωτεΐνης prion (prion model)

I.1. Ορισμός και ιστορική αναδρομή

Οι πρωτεΐνες prion θεωρείται ότι αποτελούν το βασικό αιτιολογικό παράγοντα μιας ομάδας θανατηφόρων νευροεκφυλιστικών νόσων του ανθρώπου και των ζώων. Η ονομασία πρωτεΐνη prion, προτάθηκε το 1982 από τον βραβευθέντα με Nobel καθηγητή Stanley Prusiner και είναι συντομογραφία του όρου “**prote**inaceous **in**fectious **p**articles” δηλαδή “πρωτεϊνικά λοιμογόνα σωματίδια”. Ο ίδιος διατύπωσε την ‘πρωτεϊνική θεωρία’, αποδίδοντας μολυσματικές ιδιότητες σε πρωτεϊνικά μόρια. Στηρίχτηκε στο γεγονός ότι η Τρομάδης Νόσος (Scrapie) των μικρών μηρυκαστικών, που εμφάνιζε κοινά γνωρίσματα με τη νευροεκφυλιστική νόσο kuru του ανθρώπου (Hadlow, 1959; Gajdusek et al., 1966), ήταν δυνατόν να μεταδοθεί πειραματικά σε υγιή ζώα μετά από ενοφθαλμισμό μολυσμένου εγκεφαλικού ιστού (Cuillé and Chelle, 1936) και άρα αποτελούσε λοιμώδες νόσημα.

Αρχικά η εμφάνιση των νοσημάτων prion αποδόθηκε στην ύπαρξη ιών. Χρησιμοποιήθηκε μάλιστα ο όρος ‘αργός ιός’ (slow virus) για να ερμηνεύσει τις παρατηρούμενες μεγάλες περιόδους επώασης αυτών των νοσημάτων (Sigurdsson, 1954). Άλλοι ερευνητές δέχονται την ύπαρξη ενός ‘ασυνήθιστου ιού’ (‘unconventional virus’), που ονομάζουν ‘nemavirus’ (Carp et al., 1985; Narang et al., 1988; Czub et al., 1988; Manuelidis et al., 1988). Δομές που θεωρούνται σωματίδια του παραπάνω ιού έχουν παρατηρηθεί σε εγκεφάλους ασθενών της παραλλαγμένης μορφής της νόσου Creutzfeldt-Jacob (variant Creutzfeldt-Jacob ή vCJD), της Σπογγώδους Εγκεφαλοπάθειας των Βοοειδών και της Τρομάδης Νόσου των μικρών μηρυκαστικών (Narang, 1994). Σύμφωνα με τον τελευταίο ερευνητή, ο nemavirus αποτελείται από ένα εξωτερικό πρωτεϊνικό περίβλημα, μια ενδιάμεση στοιβάδα από μονόκλωνο DNA και μια εσωτερική στοιβάδα που περιλαμβάνει ινίδια της παθολογικής πρωτεΐνης prion (Narang, 1998). Ο ίδιος ερευνητής απομόνωσε μονόκλωνο DNA μεγέθους 490kDa από εγκεφάλους πειραματόζωων με Τρομάδη Νόσο (Narang, 1998).

Παράλληλα με τη θεωρία του αργού ιού, από άλλους ερευνητές αναπτύχθηκε η θεωρία του virino (Dickinson and Outram, 1979; Kimberlin, 1982; Manuelidis,

2006). Σύμφωνα με αυτήν, η πρωτεΐνη prion αποτελεί απλά το πρωτεϊνικό περίβλημα ενός μικρού, μη κωδικευμένου από τον ξενιστή, νουκλεϊνικού οξέος που συγκροτεί ένα virino, μεγέθους 25nm (Manuelidis, 2006).

Η ανθεκτικότητα που εμφάνισε ο μολυσματικός παράγοντας της Τρομάδους Νόσου στην επεξεργασία με φορμαλίνη και θέρμανση (διαδικασίες που χρησιμοποιούνταν για την παρασκευή εμβολίων), συνέβαλε στη διατύπωση υποθέσεων σχετικά με την απουσία νουκλεϊνικών οξέων σε αυτόν. Συγκεκριμένα η χρήση εμβολίου σε 18.000 πρόβατα ενάντια στη νόσο ‘Louping-ill’, το οποίο είχε παρασκευαστεί από επεξεργασμένους με φορμαλίνη εγκεφάλους προβάτων, οδήγησε στην εμφάνιση Τρομάδους Νόσου στο 7% των εμβολιασμένων προβάτων (Liberski and Jaskólski, 2002). Παλαιότερες μελέτες είχαν ήδη καταδείξει ότι ο αιτιολογικός παράγοντας παρουσίαζε αντοχή σε διάλυμα φορμαλίνης 0,35% για περισσότερους από τρεις μήνες (Gordon et al., 1939; Gordon, 1946) και επίσης ήταν ανθεκτικός στην ιονίζουσα και στην υπεριώδη ακτινοβολία (Alper et al., 1966; Alper, 1992).

Το 1967 υποστηρίχτηκε ότι μια πρωτεΐνη της κυτταρικής μεμβράνης πιθανά ευθύνεται για τη μετάδοση της Τρομάδους Νόσου (Griffith, 1967; Gibbons and Hunter, 1967) και η ‘πρωτεϊνική θεωρία’ άρχισε να ενισχύεται (Bolton et al., 1982).

Το 1985, η συνδυασμένη έρευνα τριών εργαστηρίων με ερευνητές τους S. Prusiner, C. Weissmann και L. Hood (Hörnlimann et al., 2006) αποκάλυψε την αλληλουχία αυτής της πρωτεΐνης που χαρακτηρίζεται ως **Prion Protein (PrP)** (Oesch et al., 1985) και κωδικεύεται από το γονίδιο του ξενιστή που καλείται **PRioN Protein** ή **PRNP** γονίδιο στον άνθρωπο και **Prion protein** ή **Prnp** γονίδιο στα ζώα. Στη συνέχεια, βρέθηκαν δύο ισομορφές της πρωτεΐνης prion με διαφορετικά φυσικοχημικά χαρακτηριστικά – η κυτταρική PrP ή PrP^c (cell PrP) και η παθολογική ισομορφή της PrP ή PrP^{Sc} (Scrapie PrP). Σχετικά πρόσφατα επιτεύχθηκε η τεχνητή σύνθεση της πρωτεΐνης prion (Legname et al., 2004) και η *in vitro* μετατροπή της PrP^c σε PrP^{Sc} (Saborio et al., 2001; Castilla et al., 2005) με την τεχνική της **Protein Misfolding Cyclic Amplification (PMCA)**, που έχει ως αποτέλεσμα τον απεριόριστο πολλαπλασιασμό της PrP^{Sc}.

Σήμερα, η πρωτεϊνική θεωρία ή ‘protein only hypothesis’ είναι ευρέως αποδεκτή και ερμηνεύει την αιτιολογία των Μεταδοτικών Σπογγωδών Εγκεφαλοπαθειών ή νόσων prion όπου η PrP^{Sc} αποτελεί τη βασική αλλά ίσως όχι και τη μοναδική φύση του μολυσματικού παράγοντά τους.

I.2. Ο μολυσματικός παράγοντας των Μεταδοτικών Σπογγωδών Εγκεφαλοπαθειών

Το σημαντικότερο μειονέκτημα της πρωτεϊνικής θεωρίας συνίσταται στην αδυναμία συσχέτισης της μολυσματικότητας με την παρουσία της παθολογικής πρωτεΐνης prion, ως το μόνο και αποκλειστικό αίτιο της.

Είναι ευρύτερα αποδεκτό ότι σε μια μολυσματική μονάδα περιέχονται περίπου 10^5 - 10^6 μόρια PrP^{Sc}, ενώ απαιτούνται μόνο 5×10^2 - 5×10^3 μόρια PrP^{Sc} για τη πρόκληση λοίμωξης (Safar et al., 2005). Παράλληλα έχει παρατηρηθεί ότι ο ενοφθαλμισμός παθογόνου υλικού στο οποίο δεν ανιχνεύεται PrP^{Sc} μπορεί να προκαλέσει νόσημα prion και αντίστροφα η περίσσεια PrP^{Sc} σε υλικό ενοφθαλμισμού συνεπάγεται εξασθένηση ή και απουσία μολυσματικότητας (Lasmegas et al., 1997; Somerville et al., 1991; Soto and Castilla, 2004; May et al., 2004; Legname et al., 2004; Silveira et al., 2005). Μελέτες του παθογόνου υλικού από ασθενείς με νόσο CJD αναφέρουν ότι, μετά το διαχωρισμό των συστατικών του στοιχείων, η μολυσματικότητα του υλικού σχετίζονταν περισσότερο με τα συγκατακρημιζόμενα νουκλεϊνικά οξέα που υπήρχαν σε αυτό παρά με την PrP (Sklaviadis et al., 1989). Ωστόσο, στην ίδια μελέτη αναφέρεται ότι πιθανά αυτή η μικρή ποσότητα της PrP που κατακρημιζόταν στο μολυσματικό υλικό, να περιείχε το κλάσμα της κρίσιμης PrP^{Sc} που απαιτούνταν για τη λοιμογόνο του δράση.

Σήμερα η επικρατούσα άποψη είναι ότι ο παράγοντας prion αποτελείται κύρια από PrP^{Sc}, χωρίς όμως να ταυτίζεται αποκλειστικά η μολυσματική του ικανότητα με την πρωτεΐνη (Aguzzi et al., 2007). Συνεπώς ο μολυσματικός παράγοντας των νοσημάτων prion δυνητικά αποτελείται από τη PrP^{Sc}, από ενδιάμεσες μορφές της πρωτεΐνης prion (πιθανά με τη μορφή ολιγομερών) (Weissmann, 1991; Silveira et al., 2005), από άλλες πρωτεΐνες του ξενιστή (Telling et al., 1995) ή από μη πρωτεϊνικά μόρια όπως γλυκοζαμινογλυκάνες ή μικρά νουκλεϊνικά οξέα (Priola et al., 2003; Safar et al., 2003).

Το μόνο σίγουρο είναι ότι η παρουσία της φυσιολογικής PrP^c αποτελεί απαραίτητη και αναγκαία συνθήκη για τη δράση του παράγοντα prion. Αυτό αποδείχτηκε με την αδυναμία μετάδοσης νοσημάτων prion σε διαγονιδιακά ποντίκια, στα οποία είχε κατασταλεί το Prnp γονίδιο και άρα δεν συνέθεταν τη PrP^c (ποντίκια Prnp0/0) (Büeler et al., 1993). Για τον παραπάνω λόγο, η μελέτη της βιοχημικής

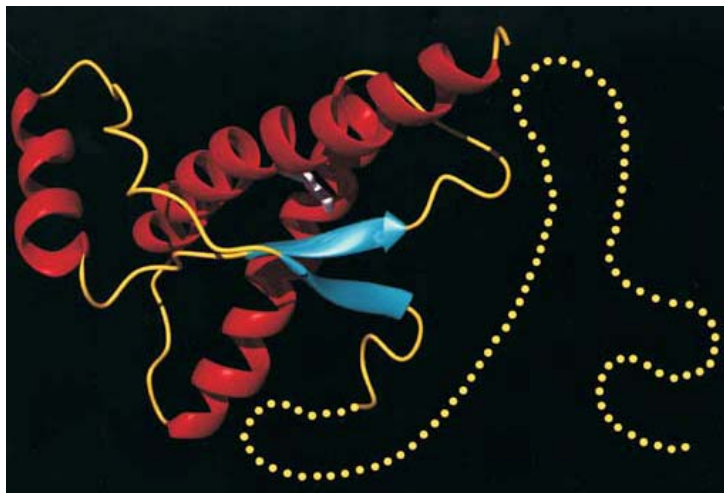
συμπεριφοράς και της βιολογικής δράσης της κυτταρικής PrP^c παραμένουν πάντα θεμελειώδεις και επίκαιρες.

I.3. Φυσιολογική (PrP^c) και παθολογική πρωτεΐνη prion (PrP^{Sc})

Η κυτταρική πρωτεΐνη prion (PrP^c) είναι μια γλυκοπρωτεΐνη μεγέθους 33-35kDa η οποία βρίσκεται στην εξωτερική επιφάνεια της κυτταρικής μεμβράνης. Σε αυτήν συνδέεται με τη βοήθεια της Γλυκοζυλ-Φωσφατιδυλ-Ινοσιτολικής (ΓΦΙ)-‘άγκυρας’ (Glycol-Phosphatidylinositol- anchor ή GPI-anchor) που φέρει στο καρβοξυλιωτικό άκρο της (Stahl et al., 1990). Η PrP^c είναι διαλυτή, ιδιαίτερα ευαίσθητη στη δράση των πρωτεασών και βρίσκεται στους ιστούς ως μονομερές μόριο. Αρχικά η PrP^c ή πρόιμη PrP^c αποτελείται από περίπου 250 αμινοξέα (ανάλογα με το είδος του οργανισμού) και προκειμένου να ασκήσει τη βιολογική της δράση ωριμάζει με την αποκοπή των πρώτων περίπου είκοσι αμινοξέων του αμινοτελικού και κάποιων του καρβοξυλιο-τελικό άκρο της. Η ώριμη PrP^c βρίσκεται κυρίως στο κεντρικό νευρικό σύστημα αλλά και στο αίμα, στα λεμφοκύτταρα, στα επιθηλιακά κύτταρα του στομάχου, στην καρδιά, στους νεφρούς και στους μύες (Pammer et al., 2000; Bendheim et al., 1992; Horiuchi et al., 1995; Fournier et al., 1998). Στον εγκέφαλο η PrP^c εντοπίζεται κυρίως στα αστροκύτταρα (Moser et al., 1995) και στις συναπτικές μεμβράνες των νευρώνων και ιδιαίτερα στη προσυναπτική επιφάνειά τους (Herms et al., 1999) όπου οργανώνεται σε δεσμάτια (Fournier et al., 2000). Όλες οι γνωστές PrP^c αλληλουχίες στα θηλαστικά παρουσιάζουν εξαιρετική ομοιότητα σε ποσοστό που αγγίζει το 90%, ενώ όλες έχουν την ίδια τριτοταγή δομή (υψηλός βαθμός συντήρησης).

Η PrP^c αποτελείται από δύο τμήματα: α) ένα σφαιρικό τμήμα που περιλαμβάνει τρεις α-έλικες και δυο μικρά αντιπαράλληλα β-ελάσματα και β) από μια μακριά και ευέλικτη ‘ουρά’ της οποίας η διαμόρφωση εξαρτάται από τις βιοχημικές παραμέτρους του περιβάλλοντος (εικόνα 1). Το σφαιρικό τμήμα βρίσκεται στο καρβοξυτελικό άκρο της πρωτεΐνης, ενώ η ‘ουρά’ αντιστοιχεί στο αμινοτελικό της άκρο (Riek et al., 1996). Το αμινοτελικό άκρο περιέχει ένα οκταπεπτιδικό επαναλαμβανόμενο τμήμα, ικανό να δεσμεύει ιόντα χαλκού (Brown et al., 1997), ενώ το καρβοξυτελικό άκρο της αναδιπλώνεται ελικοειδώς

λαμβάνοντας μια σφαιρική μορφή, που περιέχει μια δισουλφιδική γέφυρα, δύο θέσεις γλυκοσυλίωσης και τη ΓΦΙ-‘άγκυρα’. Η δεύτερη και η τρίτη α-έλικα ενώνονται μεταξύ τους και σταθεροποιούνται με ένα δισουλφικό δεσμό, αποκτώντας ειδική τριτοταγή δομή.



Εικόνα 1. Δομή της PrP^c όπως καθορίζεται φασματοσκοπικά μέσω του φαινομένου του πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (Nuclear Magnetic Resonance-NMR spectroscopy). Με κόκκινο χρώμα απεικονίζονται οι τρεις α-έλικες, με κυανό φαίνονται τα δύο β-ελάσματα και η ‘ουρά’ απεικονίζεται ως κομπολόγι με κίτρινες χάντρες. (Τροποποιημένη από Liberski and Jaskólski, 2002).

Ο βιολογικός ρόλος της PrP^c εξακολουθεί να παραμένει αδιευκρίνιστος. Σύμφωνα με τα πορίσματα του πρόσφατου ειδικού συνεδρίου PRION2008, η έκφραση και η αλληλεπίδραση της PrP^c με διάφορα μόρια εκτιμάται ότι ρυθμίζει αρκετές φυσιολογικές λειτουργίες που είναι ιδιαίτερα κρίσιμες για το νευρικό και το ανοσοποιητικό σύστημα όπως:

- (1) η μνήμη, η διασυναπτική μετάδοση σήματος, ο έλεγχος της διακυτταρικής μεταφοράς ιόντων χαλκού και οι αντιφλεγμονώδεις αντιδράσεις,
- (2) η κυτταρική προσκόλληση, η μετανάστευση, ο πολλαπλασιασμός, η κυτταρική διαφοροποίηση και η δημιουργία των νευρώνων,
- (3) η κυτταρική άμυνα έναντι οξειδωτικών και αποπτωτικών διεργασιών,
- (4) η δραστηριότητα ποικίλων μηχανισμών μεταγωγής σήματος
- (5) η διακυτταρική μεταφορά της ίδιας της PrP^c, τόσο μεταξύ τμημάτων της κυτταρικής μεμβράνης όσο και μέσω ενδοκυτταρικών διόδων για τη διατήρηση της διαρκούς και ταχείας ανακύκλωσής της (Bailly, 2008).

Η παθολογική PrP ή PrP^{Sc} έχει ακριβώς την ίδια αλληλουχία αμινοξέων, δύο θέσεις γλυκοσυλίωσης και τη ΓΦΙ-‘άγκυρα’ όπως η PrP^c αλλά έχει διαφορετική τριτοταγή δομή. Πρόκειται για ισομορφή της PrP^c όπου διατηρούνται η δεύτερη και η τρίτη α-έλικα και υπάρχουν τέσσερα β-ελάσματα. Ειδικό χαρακτηριστικό γνώρισμα της PrP^{Sc} είναι η μερική ανθεκτικότητά της στη δράση των πρωτεασών και ειδικά της πρωτεΐνάσης-K, ιδιότητα που χρησιμοποιείται ευρέως στις ταχείες μεθόδους διάγνωσης των Μεταδοτικών Σπογγωδών Εγκεφαλοπαθειών. Η πρωτεΐνάση-K αποκόπτει σε συγκεκριμένη θέση (θέση αποκοπής ή cleavage site) αμινοξέα κυρίως από το αμινοτελικό άκρο της PrP^{Sc} και μερικά από το καρβοξυτελικό άκρο της. Το τμήμα της PrP^{Sc} που προκύπτει έχει μοριακή μάζα 27-30 kDa, συμβολίζεται ως PrP27-30, είναι ανθεκτικό στη δράση της πρωτεΐνάσης-K και αποτελεί το απλούστερο αλλά και πληρέστερο μολυσματικό μόριο της PrP^{Sc} (Hörnlimann et al., 2006; Legname et al., 2004).

Η ικανότητα της PrP^{Sc} να παραμένει αδιάλυτη ακόμα και σε ήπια απορρυπαντικά και η έντονη τάση της να σχηματίζει ινίδια (Scrapie Associated Fibrils-SAF), ραβδόμορφους σχηματισμούς και μάλλον άμορφα συσσωματώματα (Govaerts et al., 2004) καθιστά αδύνατη τη μελέτη της PrP^{Sc} με τις κλασικές μεθόδους δομικού προσδιορισμού σε αντίθεση με τη PrP^c.

Έχουν διατυπωθεί διάφορα πρότυπα για το μηχανισμό μετατροπής της PrP^c σε PrP^{Sc} τα οποία όμως είναι όλα υποθετικά καθώς η μεταβολή της τριτοταγούς της δομής γίνεται ελεύθερα σε διάλυμα και όχι πάνω στην κυτταρική μεμβράνη, όπου εντοπίζεται η PrP^c (Hörnlimann et al., 2006). Τα κυριότερα από αυτά τα πρότυπα είναι: α) ο σχηματισμός ετεροδιμερούς και η μεσολάβηση της πρωτεΐνης X ή πρότυπο της αναδίπλωσης που κατευθύνεται από εκμαγείο (Cohen et al., 1994), β) το αλλοστερικό ή συνεργικό πρότυπο του Prusiner (Eigen, 1996) και γ) το πρότυπο της γραμμικής κρυσταλλοποίησης ή σχηματισμού πυρήνα (Come et al., 1993).

Η μελέτη της PrP^c σε διάφορα είδη οργανισμών (Lysek et al., 2005) και η σύγκριση των αμινοξέων στις διάφορες θέσεις της πολυπεπτιδικής αλυσίδας αποκάλυψε τη σημασία της κατανομής του ηλεκτρικού φορτίου στην επιφάνεια της πρωτεΐνης και το ρόλο του στο φραγμό του είδους για τη μετατροπή της σε PrP^{Sc} (Billeter et al., 1997). Συγκεκριμένα, ειδικές αντικαταστάσεις αμινοξέων, που αλλάζουν το φορτίο στη λειτουργική εύκαμπτη περιοχή μεταξύ του δεύτερου β-ελάσματος και της δεύτερης α-έλικας, όπου βρίσκεται θεωρητικά η θέση πρόσδεσης

της πρωτεΐνης X (Kaneko et al., 1997), φαίνεται ότι σχετίζονται με την εμφάνιση των νοσημάτων prion. Από την άλλη πλευρά, μια σημαντική παρατήρηση είναι ότι οι μεταλλάξεις της PrP^c που σχετίζονται με την παθογένεια των νοσημάτων prion, στην πλειοψηφία τους, βρίσκονται στο εσωτερικό της δομής της πρωτεΐνης και ελάχιστες βρίσκονται επιφανειακά. Επομένως, η αποσταθεροποίηση του σφαιρικού τμήματος της PrP^c δεν μπορεί να ερμηνευτεί μόνο από την παρουσία αυτών των μεταλλάξεων (Liemann et Glockshuber, 1999).

1.4. Φραγμός μετάδοσης των Μεταδοτικών Σπογγωδών Εγκεφαλοπαθειών μεταξύ των ειδών

Σήμερα είναι γνωστό ότι στις Μεταδοτικές Σπογγώδεις Εγκεφαλοπάθειες η αποτελεσματικότητα του φραγμού μετάδοσης μεταξύ των ειδών (species barrier) εξαρτάται, εν μέρει τουλάχιστον, από την αλληλεπίδραση μεταξύ της εισερχόμενης PrP^{Sc} και της PrP^c του προσβαλλόμενου είδους, δηλαδή από το βαθμό ομολογίας στην αλληλουχία του Prnp γονιδίου μεταξύ του δέκτη και του δότη (Prusiner et al., 1990). Όσο πιο κοινή είναι η αλληλουχία των αμινοξέων της PrP μεταξύ των δύο ειδών τόσο πιο εύκολο είναι η εισερχόμενη PrP^{Sc} να μετατρέψει την PrP^c του προσβαλλόμενου είδους στην παθολογική ισομορφή PrP^{Sc}. Το γεγονός αυτό διευκολύνει για παράδειγμα τη μετάδοση της νόσου prion από τα βοοειδή στον άνθρωπο ή στα μικρά μηρυκαστικά, με τα οποία έχουν 92-93% ομολογία στην αλληλουχία των αμινοξέων της PrP (Wopfner et al., 1999; Prusiner, 1997), σε αντίθεση με τα τρωκτικά, όπου παρατηρείται 85% ομολογία (Westaway et al., 1994). Συνεπώς, η φυλογενετική σχέση των ζωικών ειδών, ως προς την ομολογία του Prnp γονιδίου, πιθανά επηρεάζει τη μετάδοση των Μεταδοτικών Σπογγωδών Εγκεφαλοπαθειών μεταξύ των ειδών (Kraukauer et al., 1996).

Έως σήμερα παραμένει άγνωστο το ακριβές τμήμα της πολυπεπτιδικής αλληλουχίας της PrP που επιδρά στο φραγμό μετάδοσης μεταξύ των ειδών ενώ εκτιμάται ότι πιθανά εμπλέκονται και άλλοι άγνωστοι παράγοντες (Prusiner, 1995). Για παράδειγμα, όταν διαγονιδιακά ποντίκια που υπερέκφραζαν την ανθρώπινη PrP^c ενοφθαλμίστηκαν με παθογόνο υλικό της νόσου vCJD, εκδήλωσαν τη νόσο μόνο

όταν απουσίαζε η ενδογενής PrP^c του ξενιστή, δηλαδή η PrP^c του ποντικού (Scott et al., 1989; 1993). Βάσει αυτού, διατυπώθηκε ότι απαιτείται η λεγόμενη ‘πρωτεΐνη X’ ή ‘παράγοντας X’ που θα λειτουργεί ως μια συνοδευτική πρωτεΐνη (chaperone) για την καθατή μετατροπή της PrP (Kaneko et al., 1997). Συγκεκριμένα, σε διαγονιδιακά ποντίκια όπου θα συνεκφράζονται τόσο η PrP^c του ποντικού όσο και η ένθετη-διαγονιδιακή πρωτεΐνη (πχ η PrP^c του προβάτου), η πρωτεΐνη X υποθετικά συνδέεται εκλεκτικά με τη φυσική PrP^c του ποντικού και δεν θα είναι δυνατή η μετατροπή της στην ένθετη-διαγονιδιακή PrP^{Sc}.

1.5. Στέλεχος prion

Σημαντική αδυναμία της πρωτεϊνικής θεωρίας των νοσημάτων prion αποτελεί και η ανακάλυψη διαφορετικών στελεχών του μολυσματικού παράγοντα prion, τα οποία καλούνται στελέχη prion και είναι προσαρμοσμένα στο είδος του ξενιστή (Dickinson, 1976; Kimberlin et al., 1987; 1989).

Ως στελέχος prion χαρακτηρίζεται το σύνολο των απομονώσεων του μολυσματικού παράγοντα prion, που όταν ενοφθαλμιστεί σε γενετικά όμοιους ξενιστές, τότε προκαλεί νόσημα με όμοια και σταθερά φαινοτυπικά χαρακτηριστικά εκδήλωσης του. Τα χαρακτηριστικά αυτά αφορούν:

- την περίοδο επώασης,
- την κλινική εικόνα του νοσήματος,
- τις ιστοπαθολογικές αλλοιώσεις,
- την τοπογραφική εναπόθεση της PrP^{Sc} στον εγκέφαλο,
- την ευχέρεια μετάδοσης του μεταξύ των ζωικών ειδών και
- τις ιδιότητες της PrP^{Sc} όπως η ανθεκτικότητα στη θερμότητα, η χημική αδρανοποίησή της, η αντοχή της στην πρωτεΐνάση- K και η θέση αποκοπής (cleavage site) των αμινοξέων της από την πρωτεολυτική επίδραση, καθώς και η κατανομή των γλυκοζυλιωμένων τμημάτων της (γλυκοτύπος).

Μέχρι σήμερα έχουν ταυτοποιηθεί 24 διαφορετικά στελέχη prion μετά από διόδους τους σε ποντίκια (Bruce et al., 1991; Höhlimann et al., 2006). Σε περιπτώσεις φυσικής λοίμωξης, είναι δυνατόν να παρατηρηθούν περισσότερα από

ένα στελέχη prion στον ίδιο πληθυσμό ζώων, ή στην ίδια χώρα αλλά ακόμη και στο ίδιο ζώο (Fraser, 1993).

Καθώς η πολυπεπτιδική αλληλουχία της PrP^c σε κάθε είδος ξενιστή παραμένει σταθερή, η ύπαρξη στελεχών prion με πολύ διαφορετικά χαρακτηριστικά υποδηλώνει ότι ο παθογόνος παράγοντας αποτελείται και από άλλο συστατικό εκτός της PrP^{Sc}, γεγονός που δε συμβαδίζει με την ‘protein only hypothesis’. Σήμερα, οι θεωρίες για την εμφάνιση των στελεχών prion βασίζονται στην ύπαρξη διαφορετικών τριτοταγών δομών της PrP^{Sc}, οι οποίες είτε μετατρέπουν ταχύτερα την PrP^c στην παθολογική ισομορφή και προκαλούν νόσημα με βραχύτερο χρόνο επώασης, είτε εμφανίζουν τροπισμό σε διαφορετικές περιοχές του εγκεφάλου και άρα προσδίδουν διαφορετική ιστοπαθολογική κατανομή και συμπτωματολογία κατά την εκδήλωση του νοσήματος (Liberski and Jaskólski, 2002; Höرنlimann et al., 2006). Ωστόσο, μέχρι σήμερα δεν έχουν βρεθεί τριτοταγείς δομές της πρωτεΐνης τόσες ώστε να αντιστοιχούν στα γνωστά στελέχη prion και καμιά θεωρία δεν έχει αποδειχτεί (Aguzzi et al., 2007).

II. Μεταδοτικές Σπογγώδεις Εγκεφαλοπάθειες

Οι Μεταδοτικές Σπογγώδεις Εγκεφαλοπάθειες ή νόσοι prion είναι μια ομάδα θανατηφόρων λοιμωδών νοσημάτων με μακρά περίοδο επώασης που προσβάλλουν τόσο τον άνθρωπο όσο και τα ζώα (Πίνακας 1). Χαρακτηρίζονται από νευροεκφυλιστικές κενотоπιώδεις αλλοιώσεις του κεντρικού νευρικού συστήματος, οι οποίες αποδίδονται με τον όρο ‘σπογγώδεις’.

Η πρώτη αναφορά των Μεταδοτικών Σπογγωδών Εγκεφαλοπαθειών στον άνθρωπο έγινε για το σύνδρομο Gerstmann-Sträussler-Scheinker το 1913 και αντίστοιχα στα ζώα για την Τρομάδη Νόσο το 1732. Για πρώτη φορά το 1959, ο Hadlow παρατήρησε ομοιότητες μεταξύ της Τρομάδους Νόσου των μικρών μηρυκαστικών και της Kuru του ανθρώπου και η έρευνα των νοσημάτων prion στα ζώα και στον άνθρωπο ενοποιήθηκε. Το 1985-1986, στη Μεγάλη Βρετανία, διαπιστώθηκε η Σπογγώδης Εγκεφαλοπάθεια των Βοοειδών (Wells et al., 1987) και την άνοιξη του 1996 αναγνωρίστηκε η παραλλαγμένη μορφή της νόσου Creutzfeldt-

Jakob (vCJD), ενώ το 1997 υπήρξαν διάφορες πειραματικές ενδείξεις ότι η νόσος vCJD προκαλείται από παράγοντα prion της Σπογγώδους Εγκεφαλοπάθειας των Βοοειδών. Μέχρι το Μάιο του 2006, 161 περιστατικά της νόσου vCJD είχαν καταγραφεί στη Μεγάλη Βρετανία και μόνο 30 σε άλλες χώρες. Σε όλες τις περιπτώσεις είχε παρατηρηθεί ότι οι ασθενείς με νόσο vCJD έφεραν σε ομοζυγωτία το αλληλόμορφο της μεθειονίνης στο κωδικόνιο 129 του PRNP γονιδίου και υπήρχαν επιδημιολογικές ενδείξεις ότι είχαν εκτεθεί στο μολυσματικό παράγοντα prion της Σπογγώδους Εγκεφαλοπάθειας των Βοοειδών μέσω της πεπτικής οδού.

Η Σπογγώδης Εγκεφαλοπάθεια των Βοοειδών εκτιμάται ότι πιθανά μεταδόθηκε από τα πρόβατα με Τρομάδη Νόσο στα βοοειδή και από αυτά στον άνθρωπο, ξεπερνώντας το φραγμό μετάδοσης μεταξύ των ειδών (Dickinson, 1976). Οι παράγοντες επικινδυνότητας που σχετίστηκαν με τον κύκλο μετάδοσης των νοσημάτων prion μεταξύ προβάτων και βοοειδών ήταν α) η ενζωτική ύπαρξη της Τρομάδους Νόσου στον πληθυσμό των προβάτων (πηγή της μόλυνσης) και β) η χορήγηση οστεοκρεατάλευρων, που περιείχαν μολυσμένους ιστούς προβάτων, στα βοοειδή όλων των ηλικιών (μολυσματικό φορτίο). Επίσης, εκτιμάται ότι καθοριστικής σημασίας ήταν οι τροποποιήσεις στην τεχνική επεξεργασίας των παραπροϊόντων σφαγείου που προορίζονταν για την παρασκευή οστεοκρεαταλεύρων. Οι τροποποιήσεις αφορούσαν στη σημαντική μείωση της θερμοκρασίας επεξεργασίας και στην κατάργηση της χρήσης διαλυτών για την εκχύλιση του ζωικού λίπους από τα παραπροϊόντα σφαγείου και οδηγούσαν στην ελλιπή αδρανοποίηση του μολυσματικού παράγοντα prion (Hörnlimann et al., 2006).

Τελικά, η Σπογγώδης Εγκεφαλοπάθεια των Βοοειδών κρίθηκε επικίνδυνη για τη δημόσια υγεία και λήφθηκαν μέτρα για την εκρίζωσή της (Ευρωπαϊκός Κανονισμός αρ. 999/2001 και τροποποιήσεις του).

Πίνακας 1. Μεταδοτικές Σπογγώδεις Εγκεφαλοπάθειες των ζώων και του ανθρώπου (τροποποιημένος από Hörlmann et al., 2006).

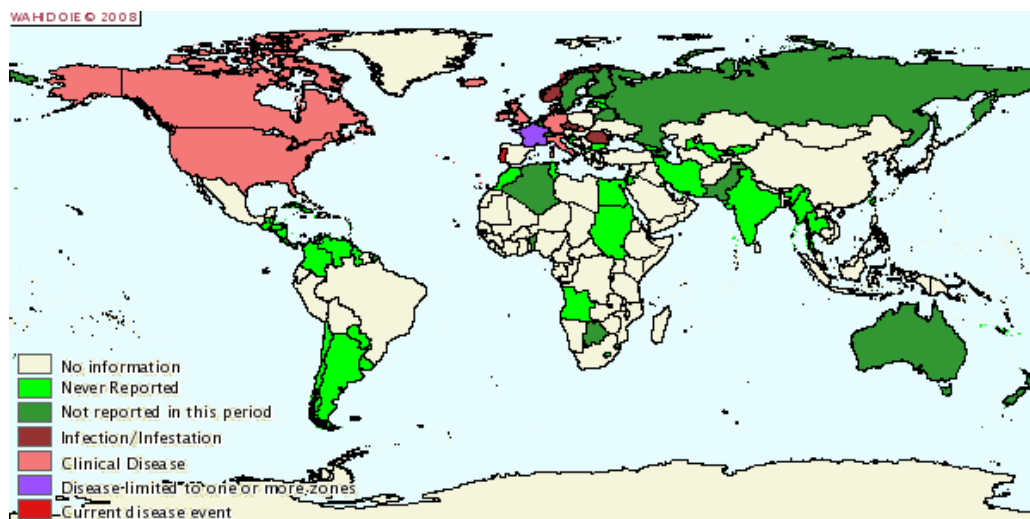
Ξενιστής	Νόσημα/παραλλαγή	Διεθνής συντομογραφία	Πρώτη περιγραφή (βιβλιογρ. αναφορά)
Ζώα	Κλασική Τρομώδης Νόσος του προβάτου και της αίγας	Scrapie (Sc)	1732 (McGowan, 1922)
	Άτυπη Τρομώδης Νόσος του προβάτου και της αίγας	Nor98	1998 (Benestad et al, 2003)
	Μεταδοτική Εγκεφαλοπάθεια των Μινκ (Transmissible Mink Encephalopathy)	TME	1965 (Hartsough; Burger, 1965)
	Χρόνια Καχεξιογόνος Νόσος των Ελαφοειδών (Chronic Wasting Disease)	CWD	1980 (Williams et Young, 1980)
	Σπογγώδης Εγκεφαλοπάθεια των Βοοειδών (Bovine Spongiform Encephalopathy)	BSE	1987 (Wells et al., 1987)
	Σπογγώδης Εγκεφαλοπάθεια των Βοοειδών στα είδη <i>Tragelaphus oryx</i> και <i>T. strepsiceros</i> (BSE of nyala and greater kudu)	TSE/BSE	1988 (Jeffrey and Wells, 1988)
	Σπογγώδης Εγκεφαλοπάθεια των Αιλουροειδών (Feline Spongiform Encephalopathy)	FSE	1990 (Wyat et al., 1990)
'Ανθρώπος	Σποραδική νόσος Creutzfeldt-Jakob (sporadic Creutzfeldt-Jakob)	sCJD	1920/21 (Creutzfeldt, 1920)
	Οικογενής νόσος Creutzfeldt-Jakob (familial Creutzfeldt-Jakob)	fCJD	1930 (Meggendorfer, 1930)
	Ιατρογενής νόσος Creutzfeldt-Jakob (iatrogenic Creutzfeldt-Jakob)	iCJD	1974 (Duffy et al., 1974)
	Παραλλαγμένη μορφή της νόσου Creutzfeldt-Jakob (variant Creutzfeldt-Jakob)	vCJD	1996 (Will et al., 1996)
	Σύνδρομο Gerstmann-Sträussler-Scheinker	GSS	1913/36 (Gerstmann et al., 1936)
	Kuru	Kuru	1957 (Zigas et Gajdusek, 1957)
	Θανατηφόρα Οικογενής Αϋπνία (Fatal Familial Insomnia)	FFI	1986 (Lugaresi et al., 1986)
Σποραδική Οικογενής Αϋπνία (Sporadic Familial Insomnia)	SFI	1999 (Parchi et al., 1999)	

III. Τρομώδης Νόσος των μικρών μηρυκαστικών με έμφαση στην αίγα

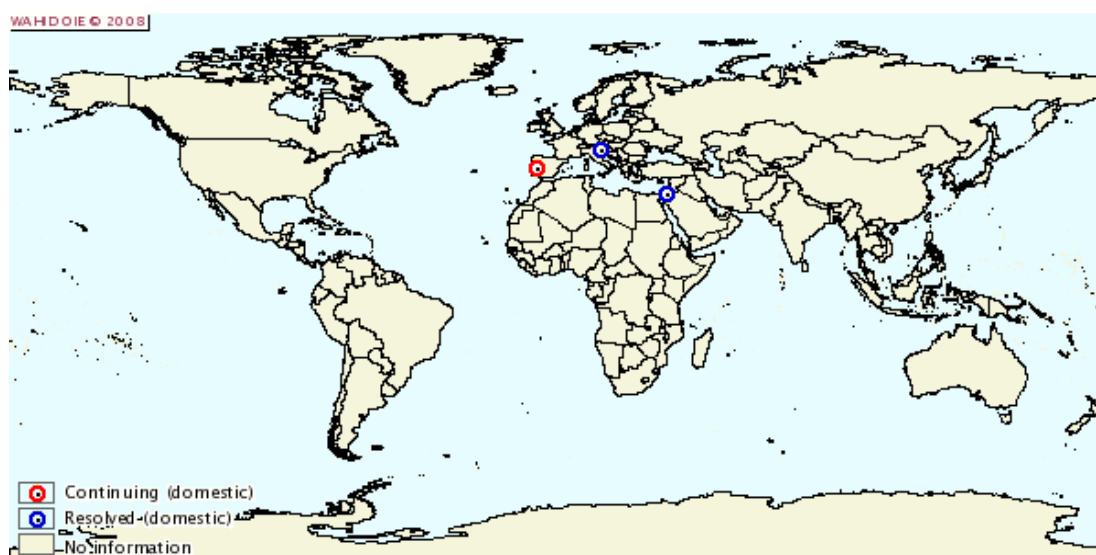
III.1. Ορισμός, γεωγραφική εξάπλωση

Η Τρομώδης Νόσος (Scrapie) προσβάλλει πρόβατα και αίγες και είναι γνωστή στην Ευρώπη ήδη από το δέκατο όγδοο αιώνα, με διάφορες ονομασίες (όπως ‘rubbers’, ‘rickets’, ‘goggles’, ‘trotting disease’, ‘le tremblante’ κ.ά. (Hörnlimann et al., 2006). Η πρώτη αναφορά για τη νόσο στα πρόβατα έγινε το 1732 (McGowan, 1922) στη Μεγάλη Βρετανία, ενώ στην Ελλάδα διαγνώστηκε πρώτη φορά το 1986 (Leontides et al. 2000).

Αναφορές στον Ευρωπαϊκό χώρο για την Τρομώδη Νόσο στις αίγες υπάρχουν από το 1941 (Chelle, 1942) ενώ η πρώτη σχετική αναφορά στην Ελλάδα έγινε το 1997 (Leontides et al, 1999). Οι περισσότερες πειραματικές μολύνσεις με σκοπό τη μελέτη του νοσήματος έχουν γίνει στα πρόβατα ενώ οι αίγες χρησιμοποιήθηκαν σε αντίστοιχες μελέτες από τη δεκαετία του 1950. Ενοφθαλμισμός των αιγών με εγκέφαλο προβάτου προσβεβλημένου από Τρομώδη Νόσο περιγράφηκε πρώτη φορά από την ομάδα του Pattison (Pattison et al., 1959) ενώ κλινικά περιστατικά φυσικής νόσησης έχουν καταγραφεί στην Ευρώπη και σε άλλες περιοχές της Γης (Hourrigan et al., 1969; Harcourt and Anderson, 1974; Stemshorn, 1975; Toumazos and Alley, 1989; Wood et al., 1992a; 1992b; Capucchio et al., 1998; Agrimi et al., 1999; Leontides et al., 2000; Onodera and Saeki, 2000; Seuberlich et al., 2007). Παρόλο που η Τρομώδης Νόσος του προβάτου έχει παρατηρηθεί στην Ινδία (Zlotnik and Katyar, 1961), στις αίγες των ασιατικών και αφρικανικών χωρών το νόσημα δεν έχει καταγραφεί (σχήμα 1, 2), όπως επίσης στην Αυστραλία και στη Νέα Ζηλανδία, οι οποίες είναι απαλλαγμένες από τη νόσο. Στη Βόρεια Αμερική ωστόσο, όπως στον Καναδά και στις Ηνωμένες Πολιτείες (ΗΠΑ) έχουν αναφερθεί μεμονωμένα περιστατικά Τρομώδους Νόσου σε αίγες από τότε που σημειώθηκαν τα πρώτα περιστατικά στα πρόβατα (Hourrigan et al., 1969; Stemshorn, 1975).



Σχήμα 1. Γεωγραφική κατανομή της εμφάνισης της Τρομάδους Νόσου των μικρών μηρυκαστικών κατά το 2008 (ΟΙΕ, WAHID, 2008). Κόκκινο: περιοχές με γενικευμένη παρουσία της νόσου, μπλε: περιοχές όπου το νόσημα περιορίζεται σε μία ή περισσότερες ζώνες, ροζ: περιοχές με κλινικά περιστατικά. καφέ: μολυσμένες περιοχές, σκούρο πράσινο: περιοχές όπου δεν υπάρχει σχετική αναφορά για το 2008, ανοιχτό πράσινο: περιοχές όπου ποτέ δεν έχει καταγραφεί περιστατικό της νόσου, γκρίζο: περιοχές για τις οποίες δεν υπάρχει καμία πληροφορία σχετικά με την Τρομάδη Νόσο των μικρών μηρυκαστικών.



Σχήμα 2. Γεωγραφικές εστίες εμφάνισης Τρομάδους Νόσου στις αίγες κατά το 2008 (ΟΙΕ, WAHID, 2008). Με κόκκινο σημαίνεται η εστία όπου τα κλινικά περιστατικά συνεχίζονται ενώ με μπλε χρώμα φαίνονται οι εστίες στις οποίες το νόσημα έχει περιοριστεί.

III.2. Επιζωοτιολογικά στοιχεία

Γενικά, η εμφάνιση της Τρομώδους Νόσου στις αίγες περιορίζεται σημαντικά σε σχέση με τα πρόβατα. Από το 2002, βάσει του Ευρωπαϊκού Κανονισμού αρ. 999/2001 για τη «θέσπιση κανόνων πρόληψης, καταπολέμησης και εξάλειψης ορισμένων Μεταδοτικών Σπογγωδών Εγκεφαλοπαθειών» και των τροποποιήσεων του από τους Ευρωπαϊκούς Κανονισμούς αρ. 727/2007, αρ. 722/2007, αρ. 1428/2007, αρ. 21/2008, αποφασίστηκε η εφαρμογή μονοετών ή πολυετών εθνικών προγραμμάτων αντιμετώπισης της Τρομώδους Νόσου. Στην Ελλάδα εφαρμόζονται μονοετή προγράμματα. Το ετήσιο 'Πρόγραμμα Επιτήρησης, Ελέγχου και Εξάλειψης των Μεταδοτικών Σπογγωδών Εγκεφαλοπαθειών (ΜΣΕ) στα μικρά μηρυκαστικά' του Υπουργείου Αγροτικής Ανάπτυξης και Τροφίμων (ΥΠΑΑΤ), για την περίοδο 2008-2009 επέβαλε, για ολόκληρη την ελληνική επικράτεια, τον εργαστηριακό έλεγχο 12.200 αιγών που προορίζονται για ανθρώπινη κατανάλωση και 10.000 αιγών που δεν προορίζονται για ανθρώπινη κατανάλωση (Ελληνική Δημοκρατία, ΥΠΑΑΤ, 2008).

Ο αυξανόμενος αριθμός των εξεταζόμενων αιγών και η αυξημένη ευαισθησία των διαγνωστικών τεχνικών που χρησιμοποιήθηκαν τα τελευταία πέντε χρόνια επέτρεψαν την ανίχνευση των υποκλινικών περιστατικών της Κλασικής Τρομώδους Νόσου. Επιπλέον οδήγησαν στην αναγνώριση της «άτυπης» PrP^{Sc} (στέλεχος Nor98) που είναι υπεύθυνη για τη νέα μορφή της νόσου που καλείται Άτυπη Τρομώδης Νόσος (Benestad et al., 2003). Το 2004 επιβεβαιώθηκε το πρώτο περιστατικό φυσικής Σπογγώδους Εγκεφαλοπάθειας των Βοοειδών (Eloit et al., 2005) σε μια αίγα στη Γαλλία. Ενώ στο Ηνωμένο Βασίλειο, μια αναδρομική εξέταση όλων των περιστατικών Μεταδοτικών Σπογγωδών Εγκεφαλοπαθειών χρησιμοποιώντας πιο ευαίσθητες διαγνωστικές τεχνικές, αποκάλυψε ένα δεύτερο πιθανό κρούσμα της νόσου σε αίγα (Jeffrey et al., 2006; CRL_STEG, 2008).

Σήμερα υπάρχουν τρεις μορφές των φυσικών νοσημάτων prion που προσβάλλουν τις αίγες. Πρόκειται για μορφές που διακρίνονται με βάση τα ανοσοβιοχημικά χαρακτηριστικά της PrP^{Sc} και αφορούν στην Κλασική Τρομώδη Νόσο, στην Άτυπη Τρομώδη Νόσο και στη Σπογγώδη Εγκεφαλοπάθεια των Βοοειδών που παρατηρείται στις αίγες (EFSA, 2005).

Κατά την περίοδο 2002-2007, συνολικά σε όλα τα κράτη-μέλη της Ευρωπαϊκής Ένωσης αναφέρθηκαν 3.228 περιπτώσεις Μεταδοτικών Σπογγωδών Εγκεφαλοπαθειών σε αίγες από περίπου ένα εκατομμύριο ελέγχους, συγκριτικά με 14.215 περιστατικά στα πρόβατα από συνολικά 3.411.199 ελέγχους (Ευρωπαϊκή Επιτροπή, 2008a; 2008b). Οι μισές περίπου αναλύσεις αφορούσαν σε αίγες που εκτρέφονταν στη Γαλλία ενώ πάνω από το 85% των περιστατικών προέρχονται από την Κύπρο (Gravenor et al., 2004; Ευρωπαϊκή Επιτροπή, 2008b), όπου η Κλασική Τρομάδης Νόσος ενζωτεί στις αίγες (Toumazos and Alley, 1989). Από τα 3.228 περιστατικά, 661 (ποσοστό 20%) αφορούν σε ζώα με υποκλινική νόσηση που ανιχνεύθηκαν στο σφαγείο και προορίζονταν για ανθρώπινη κατανάλωση (ενεργή επιτήρηση), ενώ σε 33 περιστατικά (ποσοστό 1% των ζώων) διαγνώστηκε η Άτυπη Τρομάδης Νόσος και προέρχονταν από την Ελβετία (Seuberlich et al., 2007), τη Γαλλία, την Ισπανία (Ευρωπαϊκή Επιτροπή, 2008b) και την Ιταλία (Colussi et al., 2008). Στις ΗΠΑ, όπου ο πληθυσμός των αιγών εκτιμάται στα 3 εκατομμύρια, από το 1990 μέχρι σήμερα έχουν διαγνωστεί 25 αίγες με Κλασική Τρομάδη Νόσο.

Στην Ελλάδα, σύμφωνα με στοιχεία του Εθνικού Εργαστηρίου Αναφοράς των Μεταδοτικών Σπογγωδών Εγκεφαλοπαθειών (ΕΕΑ-ΜΣΕ), από το 2002 έως το 2007 έχουν εξεταστεί εργαστηριακά συνολικά 35.926 αίγες και έχουν διαγνωστεί 168 περιστατικά Κλασικής Τρομάδους Νόσου, κανένα περιστατικό Άτυπης Τρομάδους Νόσου και κανένα περιστατικό Σπογγώδους Εγκεφαλοπάθειας των Βοοειδών σε αίγες (Κουτσούκου-Χαρτώνα, 2008; Κουτσούκου-Χαρτώνα et al., 2006). Ωστόσο, άλλες πηγές αναφέρουν την ιστοπαθολογική μελέτη 16 αιγών από ποίμνια του ελλαδικού χώρου με άτυπη εντόπιση της PrP^{Sc} (Sofianidis et al., 2008) και την επιβεβαίωση Άτυπης Τρομάδους Νόσου με χρήση ανοσοκαθήλωσης σε επιπλέον 3 αίγες ελληνικής εκτροφής (Bouzalas et al., 2008).

Σύμφωνα με το ΕΕΑ-ΜΣΕ για την περίοδο 2002-2007, ο επιπολασμός της Κλασικής Τρομάδους Νόσου στις αίγες είναι 0,46% και ο αντίστοιχος στα πρόβατα φτάνει το 1,61%, ενώ έχουν καταγραφεί και 3 περιστατικά Άτυπης Τρομάδους Νόσου σε πρόβατα.

III.3. Συμπτωματολογία

Η περίοδος επώασης της φυσικής Κλασικής Τρομάδους Νόσου στα μικρά μηρυκαστικά κυμαίνεται από 2 έως 5 χρόνια και η αγγλική ονομασία της ‘Scrapie’ οφείλεται στο χαρακτηριστικό έντονο κνησμό (scraping) που εμφανίζεται ως σύμπτωμα. Αναφέρεται ότι η εξέλιξη της κλινικής νόσου είναι ταχύτερη στις αίγες σε σύγκριση με τα πρόβατα (Andrews et al., 1992), ενώ η διάρκεια της κλινικής νόσησης ποικίλει από δύο έως 24 εβδομάδες, με μέσο όρο τις 8 εβδομάδες (Wood et al., 1992; Carucchio et al., 1998; Sofianidis et al., 2006).

Στα αρχικά στάδια της νόσου, οι αίγες των γαλακτοπαραγωγών φυλών αντιστέκονται κατά την άμελξη λυγίζοντας τα πίσω άκρα και λαμβάνοντας εδραία θέση (Carucchio et al., 1998; Sofianidis et al., 2006). Παρατηρείται σιαλόρροια και αναγωγή του περιεχομένου της μεγάλης κοιλίας. Με την εξέλιξη της νόσου, τα ζώα εκδηλώνουν υπερευαισθησία σε φυσιολογικά εξωτερικά ερεθίσματα, μυϊκό τρόμο, υπερμετρία κινήσεων, αταξία και νευρικότητα. Επίσης, μπορεί να παρατηρηθεί επιθετικότητα, απάθεια, αλλοτριοφαγία (Carrucchio et al., 1998), τριγμός των δοντιών, μειωμένη όρεξη, προοδευτική απώλεια βάρους, τρόμος κεφαλής, λιποθυμικά επεισόδια και ήπιος κνησμός στη βραχιόνια και αμφίπλευρα στην κοιλιακή χώρα λόγω της παραισθησίας, που έχει ως συνέπεια την εμφάνιση δερματικών αλλοιώσεων και αλωπεκίας (Harcourt, 1974; Wood et al., 1992; Sofianidis et al., 2006). Στο τελικό στάδιο της νόσου, τα ζώα είναι απισχνασμένα και βρίσκονται σε μόνιμη κατάκλιση.

III.4. Τρόπος μετάδοσης

Η κύρια οδός μόλυνσης είναι μέσω του στόματος (*per os*) με την κατάποση μολυσματικού υλικού. Σύμφωνα με πειραματικές μελέτες, άλλες πιθανές οδοί είναι μέσω των δερματικών αλλοιώσεων και των εκδορών (Stamp et al., 1959) ή μέσω του επιπεφυκότα. Η άμεση οριζόντια μετάδοση γίνεται κυρίως με την επαφή υγιών και ευπαθών ζώων με μολυσμένο βιολογικό υλικό. Στα πρόβατα έχει παρατηρηθεί

απέκκριση της PrP^{Sc} με τα ούρα (Gregori et al., 2008; Gonzalez-Romero et al., 2008), τα κόπρανα (Safar et al., 2008) και πιθανά με τη σίελο (Vascellari et al., 2007), αλλά η σημασία τους στην οριζόντια μετάδοση της Τρομώδους Νόσου μένει αδιευκρίνιστη. Ιδιαίτερα στις αίγες, έχει διαπιστωθεί ότι ο πλακούντας μολυσμένων ζώων αποτελεί βασικό μολυσματικό υλικό κατά τη διάρκεια του τοκετού (Hadlow et al., 1982; Onodera et al., 1993; Τουμάζος, 2000). Αντιθέτως, στα πρόβατα, κατά τη διάρκεια επόμενης κύησης, ο πλακούντας της ίδιας προβατίνας μπορεί να μην αποτελεί πηγή μόλυνσης. Αυτό συμβαίνει όταν ο κυοφορούμενος αμνός φέρει γονότυπο που συνδέεται με ανθεκτικότητα στην Τρομώδη Νόσο, οπότε σε αυτήν την περίπτωση ο πλακούντας και τα λόχεια δεν είναι μολυσματικά (Andréoletti et al., 2002). Κάτι ανάλογο δεν έχει επιβεβαιωθεί στις αίγες, καθώς δεν έχουν αποσαφηνιστεί πλήρως οι γονότυποι που συνδέονται με ανθεκτικότητα στη νόσο.

Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι αίγες, με γονότυπους όμοιους με εκείνους των προβάτων, εμφάνισαν ελαφρά μακρότερες περιόδους επώασης της πειραματικής Σπογγώδους Εγκεφαλοπάθειας των Βοοειδών (Foster et al., 1993). Τόσο στις αίγες όσο και στα πρόβατα, παρατηρήθηκε ότι οι Μεταδοτικές Σπογγώδεις Εγκεφαλοπάθειες δεν μεταδίδονται μέσω της μεταφοράς εμβρύων ή με την εφαρμογή τεχνητής σπερματέγχυσης (Foster et al., 1999; Wrathall et al., 2008). Αντιθέτως έχει παρατηρηθεί η ιατρογενής μετάδοση της Τρομώδους Νόσου μετά από την εφαρμογή εμβολιασμών (Gordon, 1946; Robinson, 1996; Caramelli et al., 2001; Zanusso et al., 2003).

Η εισαγωγή της Τρομώδους Νόσου σε μια περιοχή συνδέεται άμεσα με το εμπόριο ζωντανών μικρών μηρυκαστικών από περιοχές όπου το νόσημα ενζωτεί (Detwiler, 1992; Hadlow et al., 1982). Η έμμεση οριζόντια μετάδοση της Τρομώδους Νόσου μπορεί να γίνει μέσω του μολυσμένου ζωοτεχνικού εξοπλισμού, μέσω γεωργικών μηχανημάτων και οχημάτων και μέσω των μολυσμένων κοινών βοσκοτόπων. Στους μολυσμένους βοσκότοπους διατηρείται η μολυσματικότητα του παθογόνου παράγοντα για τουλάχιστον 15 χρόνια, ανάλογα και με τη χημική σύσταση του εδάφους (όπως το υψηλό pH και η αυξημένη συγκέντρωση ολικού οργανικού άνθρακα, η μειωμένη περιεκτικότητα σε ιώδιο και πιθανά η υψηλή συγκέντρωση σε χαλκό, ψευδάργυρο και μαγγάνιο) (Parry, 1983; Brown and Gajdusek, 1991; Johnson et al., 2006; Georgsson et al., 2006; Imrie et al., 2008). Ενώ η βιοδιαθεσιμότητα του παράγοντα prion ενισχύεται σημαντικά όταν αυτός

δεσμεύεται σε συστατικά του εδάφους οπότε μπορεί να μεταδώσει *per os* το νόσημα πιο αποτελεσματικά (Johnson et al., 2007). Τέλος, άλλες πηγές αναφέρουν ότι η μετάδοση του νοσήματος μπορεί να γίνει πειραματικά και μέσω σαρκοφάγων-αιματοφάγων, δερματικών και νηματωδών παρασίτων (Wisniewski 1996; Post et al., 1999; Gruner et al., 2004).

Ιδιαίτερης σημασίας είναι πρόσφατες μελέτες που αναδεικνύουν το γάλα και το πρωτόγαλα των μολυσμένων προβατίνων ως μέσο μετάδοσης της Κλασικής Τρομάδους Νόσου (Konold et al., 2008; Ligios et al., 2008). Σύμφωνα με τους Konold et al., 2008 το γάλα μολυσμένων προβατίνων μπορεί να μεταδώσει την Κλασική Τρομάδη Νόσο σε πολύ ευαίσθητα αρνιά του VRQ/VRQ γονοτύπου. Ενώ Γάλλοι ερευνητές επιβεβαίωσαν την παρουσία μολυσματικότητας στο γάλα προβατίνων που βρίσκονταν στο προκλινικό στάδιο της Κλασικής Τρομάδους Νόσου (Lacroux et al., 2008). Τα παραπάνω ευρήματα προβληματίζουν την επιστημονική κοινότητα για το αν θα πρέπει να ληφθούν ειδικά μέτρα στις μολυσμένες εκτροφές (EFSA, 22 Οκτωβρίου 2008). Η έρευνα συνεχίζεται στα πλαίσια δύο μεγάλων ερευνητικών προγραμμάτων ('Genetics and pathogenesis of Scrapie in goats'-INRA/AFSSA και 'Goat BSE' -FOOD-CT-2006-3635, βλέπε Παράρτημα, Πίνακας 2), τα αποτελέσματα της οποίας δεν αναμένονται νωρίτερα από το 2010 (EFSA, 22 Οκτωβρίου 2008).

Παρόλα αυτά, η Γενική Διεύθυνση Τροφίμων του αρμόδιου Υπουργείου Αγροτικής Ανάπτυξης και Τροφίμων της Γαλλίας (Direction Générale de l'Alimentation -DGAL), βασισμένη στα επιστημονικά δεδομένα και για προληπτικούς λόγους, εξέδωσε διάταγμα ώστε να τεθεί υπό απαγορευτικούς όρους η εμπορία γάλακτος και γαλακτοκομικών προϊόντων που προέρχονται από μολυσμένες με Τρομάδη Νόσο εκτροφές προβάτων και αιγών. Ταυτόχρονα η Γαλλική κυβέρνηση ασκεί πιέσεις στην Ευρωπαϊκή Ένωση (Ε.Ε.) για την απαγόρευση όλων των εισαγωγών γάλακτος από μολυσμένες εκτροφές τόσο από χώρες της Ε.Ε. όσο και εκτός αυτής (παρουσίαση ομάδας Γάλλων εμπειρογνομόνων στον Ελληνικό Οργανισμό Γάλακτος- ΕΛΟΓ, Θεσσαλονίκη, 1η Δεκεμβρίου 2008).

III.5. Παθογένεια

Η PrP^{Sc} ανιχνεύεται αρχικά στις πλάκες του Peyer και στο λεμφικό ιστό του γαστρεντερικού σωλήνα, για μεγάλο χρονικό διάστημα (έως χρόνια) πριν από την κλινική εκδήλωση της Τρομάδους Νόσου (Andréoletti et al., 2000; Heggebø et al., 2000). Η PrP^{Sc} παρατηρείται στο εσωτερικό των μακροφάγων και των δενδριτικών κυττάρων των λεμφοζιδίων και στη συνέχεια εκτιμάται ότι μέσω των εντερικών νευρικών γαγγλίων ή του πνευμονογαστρικού και των σπλαχνικών νεύρων μεταφέρεται στο κεντρικό νευρικό σύστημα (Mabbott and Bruce, 2001). Η εναπόθεση της PrP^{Sc} στο κεντρικό νευρικό σύστημα αποτελεί παθολογικό γνώρισμα των Μεταδοτικών Σπογγωδών Εγκεφαλοπαθειών, αλλά μπορεί να εντοπιστεί και στα λεμφικά όργανα, ανάλογα με τον τροπισμό του στελέχους prion.

Η σύγκριση των ιστοπαθολογικών αλλοιώσεων της Κλασικής Τρομάδους Νόσου τόσο στα πρόβατα όσο και στις αίγες δείχνει ομοιότητα μεταξύ των δύο ειδών (Zlotnik, 1961, 1962; Wood et al., 1992a; 1997). Η παρουσία της PrP^{Sc} στο νωτιαίο κινητικό πυρήνα του πνευμονογαστρικού νεύρου αποτελεί κριτήριο για την κατάταξη της Κλασικής Τρομάδους Νόσου στα δύο είδη μικρών μηρυκαστικών (EFSA, 2005). Οι αλλοιώσεις εντοπίζονται κύρια στο στέλεχος του εγκεφάλου, στην παρεγκεφαλίδα και στο θάλαμο. Περιλαμβάνουν κενοτοπίωση της φαιάς ουσίας του κεντρικού νευρικού συστήματος, γλοίωση, ατροφία των νευρώνων και εναπόθεση της PrP^{Sc} (Hadlow et al., 1980; Wood et al., 1992a; 1997; Valdez et al., 2003; Sofianidis et al., 2006; Dustan et al., 2008), ενώ η κατανομή των αλλοιώσεων επηρεάζεται από την ηλικία και το γονότυπο του ζώου (Sofianidis et al., 2006).

Η ιστοπαθολογική εικόνα της Σπογγώδους Εγκεφαλοπάθειας των Βοοειδών στα μικρά μηρυκαστικά άρχισε να μελετάται ενδελεχώς μετά την εμφάνισή της σε μια αίγα στη Γαλλία. Οι Foster et al., 2001a περιέγραψαν κενοτοπίωση και εκτεταμένες σπογγώδεις αλλοιώσεις στο μεσεγκέφαλο, στο θάλαμο και στα βασικά γάγγλια, αλλά όχι στα γάγγλια του φλοιού του εγκεφάλου των αιγών που ενοφθαλμίστηκαν ενδοκρανιακά με τον παράγοντα της Σπογγώδους Εγκεφαλοπάθειας των Βοοειδών.

Στην Άτυπη Τρομάδη Νόσο, η κενοτοπίωση και η εναπόθεση της PrP^{Sc} παρατηρείται στην παρεγκεφαλίδα και στο φλοιό των ημισφαιρίων των αιγών, σε αντίθεση με την Κλασική Τρομάδη Νόσο όπου οι αλλοιώσεις εντοπίζονται στο ύψος

του μοχλού πάνω από τον προμήκη μυελό (Seuberlich et al., 2007; Nentwig et al., 2007; Sofianidis et al., 2008; Bouzalas et al., 2008).

III.6. Διάγνωση

Ο εντοπισμός της PrP^{Sc} στο κεντρικό νευρικό σύστημα συνιστά την οριστική διάγνωση των Μεταδοτικών Σπογγωδών Εγκεφαλοπαθειών, ανεξάρτητα από την εμφάνιση κλινικών συμπτωμάτων στο ζώο (ΕΚ αρ. 999/2001 και τροποποιήσεις του). Για το λόγο αυτό, η διάγνωση της Τρομάδους Νόσου των μικρών μηρυκαστικών γίνεται μεταθανάτια μετά από εργαστηριακή εξέταση εγκεφαλικού ιστού από την περιοχή του μοχλού (obex). Οι διαγνωστικές μέθοδοι που χρησιμοποιούνται είναι η ιστοπαθολογική εξέταση, η παρατήρηση των χαρακτηριστικών ινιδίων (Scrapie Associated Fibrils –SAF) και η εντόπιση της PrP^{Sc}. Η τελευταία γίνεται με τη χρήση ανοσοϊστοχημείας, ανοσοκαθήλωσης (Western blot) ή ανοσοενζυμικής δοκιμής (ELISA) για την ανίχνευση της PrP²⁷⁻³⁰. Για την πρώτη ταχεία διάγνωση των Μεταδοτικών Σπογγωδών Εγκεφαλοπαθειών χρησιμοποιείται η ELISA και στη συνέχεια τα ύποπτα δείγματα επιβεβαιώνονται με μία από τις άλλες μεθόδους (Ελληνική Δημοκρατία, ΥΠΑΑΤ, 2008).

Η προθανάτια εξέταση βιοπτικού λεμφικού ιστού (π.χ από τις αμυγδαλές, το τρίτο βλέφαρο ή από το απευθυσμένο) δεν εφαρμόζεται εκτενώς στις αίγες, ενώ στα πρόβατα εφαρμόζεται κυρίως ερευνητικά για ορισμένους γονοτύπους (Gonzalez et al., 2008). Η ανίχνευση της PrP^{Sc} στο αίμα νοσούντων προβάτων έχει επιτευχθεί με τη βοήθεια ανοσοδοκιμασίας με ηλεκτροφόρηση σε τριχοειδές (Schmerr et al., 1999), ενώ έχει καταγραφεί και στο αίμα και στη σίελο νοσούντων ελαφιών με χρόνια καχεξιογόνο νόσο (Mathiason et al., 2008; Haley et al., 2009).

Οι Μεταδοτικές Σπογγώδεις Εγκεφαλοπάθειες δεν προκαλούν ανοσολογική απάντηση στον ξενιστή και για αυτό δεν υπάρχουν ανάλογες διαγνωστικές ορολογικές δοκιμές.

III.7. Πρόληψη –Θεραπεία

Η νόσος είναι πάντοτε θανατηφόρος και δεν υπάρχει θεραπεία ή πρόληψη μέσω εμβολιασμού. Η χορήγηση ουσιών όπως τα πολυανιοντικά σουλφίδια, τα πολυενικά αντιβιοτικά (όπως η αμφοτερικίνη Β) και βενζυλιδενικά παράγωγα της αμφοτερικίνης Β (MS-8209) φαίνεται να επιμηκύνει το χρόνο επιβίωσης πειραματοζώων ενοφθαλμισμένων με PrP^{Sc} (Soler et al., 2008). Όμως, η ισχυρή τοξικότητα και η αμφίβολη αντι-prion δράση τους δεν επιτρέπει την ευρεία εφαρμογή τους στα ζώα ή στον άνθρωπο.

Τα προληπτικά μέτρα περιγράφονται αναλυτικά για όλες τις χώρες-μέλη της Ευρωπαϊκής Ένωσης, συμπεριλαμβανομένης και της Ελλάδας, στον Ευρωπαϊκό Κανονισμό αρ. 999/2001 και στις τροποποιήσεις του. Το κυριότερο μέτρο πρόληψης βασίζεται στη γενετική προδιάθεση της Τρομάδους Νόσου του προβάτου και συνίσταται στην εφαρμογή προγραμμάτων επιλογής στις εκτροφές με βάση τα αλληλόμορφα στα κωδικόνια 136, 154 και 171 της PrP (Dawson et al., 2008). Στα πρόβατα οι παρακάτω συνδυασμένοι γονότυποι για τα κωδικόνια 136, 154 και 171 αντίστοιχα σχετίζονται με την Τρομάδη Νόσο ως εξής: ο ARR/ARR με υψηλή ανθεκτικότητα, ο VRQ/VRQ με υψηλή ευαισθησία, ενώ οι γονότυποι ARQ/ARQ, AHQ/ARQ, ARH/ARQ και οι συνδυασμοί τους σχετίζονται με μέτρια ανθεκτικότητα/ευαισθησία στην Κλασική Τρομάδη Νόσο. Τέλος, η αντικατάσταση της φαινυλαλανίνης (F) από λευκίνη (L) στο κωδικόνιο 141 εκτιμάται ότι προσδίδει αυξημένη προστασία έναντι της Άτυπης Τρομάδους Νόσου του προβάτου. Για αυτό το λόγο, πρόβατα ομοζυγωτά στη λευκίνη για το κωδικόνιο 141 (L141L) επιλέγονται για τη δημιουργία ανθεκτικών ποιμνίων. Οι αίγες εξαιρούνται από αυτή τη στρατηγική καθώς δεν έχουν αποσαφηνιστεί οι γονότυποι οι οποίοι συνδέονται με ανθεκτικότητα ή ευαισθησία στην Τρομάδη Νόσο.

III.8. Σχέση με τη δημόσια υγεία

Παρόλο που η Τρομάδης Νόσος είναι γνωστή για περισσότερο από 250 χρόνια, δεν υπάρχουν ενδείξεις μετάδοσής της στον άνθρωπο. Αντιθέτως, η ενδεχόμενη ανάμειξη της στον κύκλο μετάδοσης της Σπογγώδους Εγκεφαλοπάθειας

των Βοοειδών και η πρόσφατη εμφάνιση της τελευταίας σε αίγα προκάλεσαν ανησυχία στη διεθνή επιστημονική κοινότητα. Η Σπογγώδης Εγκεφαλοπάθεια των Βοοειδών συνιστά αποδεδειγμένα κίνδυνο για τον άνθρωπο, ενώ ο κίνδυνος της παρουσίας της στις αίγες αξιολογείται δύσκολα, καθώς η γνώση των Μεταδοτικών Σπογγωδών Εγκεφαλοπαθειών σε αυτό το ζωικό είδος είναι περιορισμένη.

IV. Πολυμορφισμοί της πρωτεΐνης prion στα πρόβατα και στις αίγες

Τα αποτελέσματα επιζωοτιολογικών μελετών στην Τρομάδη Νόσο των μικρών μηρυκαστικών κατέδειξαν διαφοροποιήσεις στην εμφάνιση της νόσου μεταξύ των φυλών προβάτων όπως και μεταξύ ομάδων συγγενών ατόμων (Hunter et al., 1989). Τα ευρήματα αυτά ενίσχυσαν την άποψη ότι η εκδήλωση της νόσου μπορεί να ελέγχεται και από γενετικούς παράγοντες. Το 1962, ο Parry υποστήριξε ότι η φυσική Τρομάδης Νόσος ελέγχεται από αυτοσωμικό υποτελές γονίδιο και μπορεί να μεταδίδεται και πειραματικά (Parry, 1962). Σήμερα εκτιμάται ότι η Τρομάδης Νόσος αποτελεί λοιμώδες νόσημα, το οποίο ελέγχεται από γενετικούς παράγοντες που προκαλούν προδιάθεση (Baylis and Goldmann, 2004; Goldmann, 2008; Agrimi et al., 2003) και η μελέτη του Prnp γονιδίου έχει προχωρήσει αρκετά.

Το Prnp γονίδιο, είναι ταυτόσημο με το γονίδιο Sip (Scrapie incubation period) και βρίσκεται στο 13^ο χρωμόσωμα του προβάτου και της αίγας. Στο 5' άκρο του βρίσκονται δύο εξόνια τα οποία ακολουθούνται από ένα ιντρόνιο (περίπου 10kbp) και από το τρίτο εξόνιο που εντοπίζεται στο 3' άκρο του γονιδίου. Το τρίτο εξόνιο περιέχει ολόκληρο το ανοιχτό αναγνωστικό πλαίσιο (Open Reading Frame ή ORF) που κωδικεύει την πρωτεΐνη prion. Η σύγκριση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας στην περιοχή του υποκινητή και των εξονίων της PrP τόσο στα πρόβατα όσο και στις αίγες, κατέδειξε ομολογία σε ποσοστό άνω του 99% (Goldmann et al., 1996).

Η πρώιμη PrP^c στις αίγες και στα πρόβατα αποτελείται από 256 αμινοξέα και φέρει δύο θέσεις γλυκοσυλίωσης στα κωδικόνια 189 και 200 (Goldmann et al., 1996), ενώ η ώριμη πρωτεΐνη αποτελείται από 210 αμινοξέα. Πέρα από τον υψηλό αυτό βαθμό ομολογίας των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών δεν φαίνεται να υπάρχουν

κοινοί γονότυποι ανάμεσα στα δύο είδη οι οποίοι σχετίζονται με την ανθεκτικότητα ή την ευαισθησία στην Τρομάδη Νόσο.

Στα πρόβατα, πολλοί πολυμορφισμοί της πρωτεΐνης prion έχουν συσχετιστεί με την περίοδο επώασης της νόσου, την παθογένεια και την ένταση των κλινικών συμπτωμάτων. Σημειακές μεταλλάξεις οδηγούν σε αντικατάσταση αμινοξέος με αποτέλεσμα να παρατηρούνται οι παρακάτω πρωτεϊνικοί διμορφισμοί στα κωδικόνια: ¹M112T, A136V, M137T, S138N, L141F, R151C, R154H, Q171H ή Q171R ή Q171K, N176K και R211Q (Thorgeirdottir et al., 1999; Bossers et al., 1996; Tranulis et al., 1999; Hunter et al., 1989, 1994; Laplanche et al., 1993; Westaway et al., 1994; Belt et al., 1995; Vaccari et al., 2001; Lühken et al., 2007; Foster et al., 2001b). Στο ίδιο είδος έχουν βρεθεί και σιωπηλές μεταλλάξεις που δεν συνεπάγονται αλλαγή αμινοξέος (Hunter and Bossers, 2006). Αρκετοί από τους παραπάνω πολυμορφισμούς έχουν βρεθεί και στις ελληνικές φυλές προβάτων (Ekateriniadou et al., 2007b), τόσο συμβατικών (Ekateriniadou et al., 2007a) όσο και βιολογικών εκτροφών (Αικατερινιάδου, 2005).

Παρόλο που το Prnp γονίδιο έχει μελετηθεί στις αίγες λιγότερο από ό,τι στα πρόβατα, τα τελευταία χρόνια έχουν βρεθεί αρκετοί πολυμορφισμοί και σε αυτό το είδος. Συγκεκριμένα, σε διάφορες Ευρωπαϊκές φυλές αιγών έχουν περιγραφεί σημειακές μεταλλάξεις που οδηγούν στις παρακάτω αντικαταστάσεις αμινοξέων: ²W18R, V21A, L23P, G37V, G49S, T110P, G127S, L133Q, M137I, I142M, I142T, H143R, N146S, N146D, R151H, R154H, P168Q, T194P, R211Q, T219I, Q220H, Q222K, G232W και S240P (πίνακας 2, σχήμα 3). Εκτός Ευρώπης και ΗΠΑ όπου έχουν βρεθεί παρόμοιοι πολυμορφισμοί (White et al., 2008), έχουν παρατηρηθεί και οι πολυμορφισμοί W102G, R211G, I218L στην Κίνα (Zhang et al., 2004; Zhou et al., 2008), στην Ιαπωνία (Kurosaki et al., 2005) και στο Πακιστάν (Babar et al., 2009). Επίσης, έχουν ανευρεθεί σιωπηλές μεταλλάξεις που δεν συνεπάγονται

¹ Τα αμινοξέα συμβολίζονται με το λατινικό αλφάβητο όπως αναφέρονται στον πίνακα 1, στα Παραρτήματα. Η γραφή π.χ. του πολυμορφισμού M112T συμβολίζει ότι στο κωδικόνιο 112 της PrP πρωτεΐνης το αμινοξύ M (μεθειονίνη) που παρατηρείται κανονικά στον άγριο τύπο (GenBank accession number M31313) έχει αντικατασταθεί από το αμινοξύ T (θρεονίνη). Ομοίως αναγράφονται και οι υπόλοιποι πολυμορφισμοί στα πρόβατα.

² Τα αμινοξέα συμβολίζονται με το λατινικό αλφάβητο όπως αναφέρονται στον πίνακα 1, στα Παραρτήματα. Η γραφή π.χ. του πολυμορφισμού W12R συμβολίζει ότι στο κωδικόνιο 12 της PrP πρωτεΐνης το αμινοξύ W (τρυπτοφάνη) που παρατηρείται κανονικά στον άγριο τύπο (GenBank accession number AJ000739) έχει αντικατασταθεί από το αμινοξύ R (αργινίνη). Ομοίως αναγράφονται και οι υπόλοιποι πολυμορφισμοί στις αίγες.

αντικατάσταση αμινοξέος στα κωδικόνια ³42 (ccg→cca) (Goldmann et al., 1996), 107 (aag→aaa) (Billinis et al., 2002), 125 (gta→gtg) (Zhou et al., 2008), 138 (agc→agt) (Goldmann et al., 1996), 179 (gtg→gtt) (Papasavva-Stylianou et al., 2007), 181 (gac→gat) (Papasavva-Stylianou et al., 2007), 202 (acc→act) (Acutis et al., 2006), 207 (aag→aaa) (Billinis et al., 2002), 219 (acc→act) (Vaccari et al., 2006), 231 (agg→cgg) (Zhou et al., 2008) και 232 (ggg→gga) (Vaccari et al., 2006).

Εκτός από τις σημειακές μεταλλάξεις, έχει παρατηρηθεί και μια άλλη παραλλαγή στο Prnp γονίδιο που αφορά σε μια οκταπεπτιδική επαναλαμβανόμενη αλληλουχία πλούσια σε γλυκίνες στο αμινοτελικό άκρο του γονιδίου από το κωδικόνιο 54 έως το 102. Πρόκειται για διαφοροποίηση που έχει παρατηρηθεί στον άνθρωπο, στα βοοειδή, στα πρόβατα και στις αίγες. Στις τελευταίες έχει περιγραφεί σε υγιή ζώα η παρουσία τριών οκταπεπτιδικών (PHGGGWGQ) επαναλήψεων, από το κωδικόνιο 63-78, σε συνδυασμό με τη γλυκίνη στο κωδικόνιο 102 και με δύο μη οκταπεπτιδικές (P[Q/H]GGGGWGQ) επαναλήψεις εκατέρωθέν τους (Goldmann et al., 1998). Η σημασία αυτής της οκταπεπτιδικής επαναλαμβανόμενης περιοχής στο Prnp γονίδιο δεν έχει αποσαφηνιστεί, αλλά φαίνεται ότι ρυθμίζει την ομοιότητα του χαλκού μετέχοντας στην ικανότητα δέσμευσης των ιόντων του από την πρωτεΐνη.

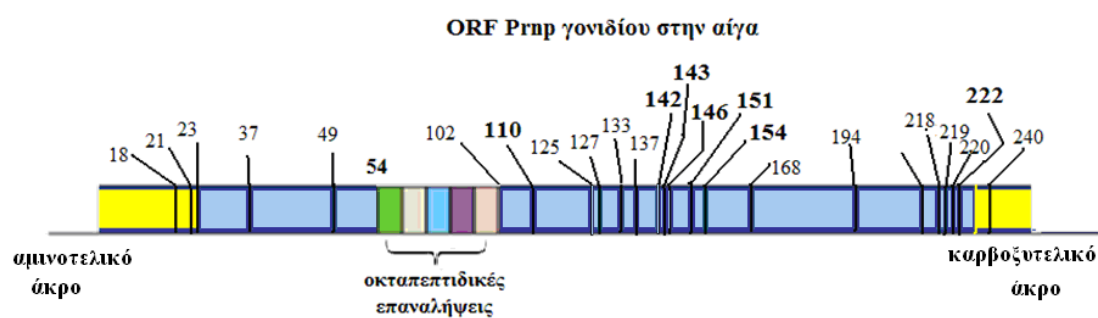
Οι κοινοί διμορφισμοί της PrP που παρατηρούνται μεταξύ των προβάτων και των αιγών παρατηρούνται στα ακόλουθα κωδικόνια: Q101R, G127S, H143R, N146S, R151H, R154H, R211Q, T219I και Q220H. Η εμφάνιση όμοιων πολυμορφισμών της PrP στα πρόβατα και στις αίγες είναι σημαντική και θα αναμενόταν η σύνδεσή τους με την ανθεκτικότητα/ευαισθησία στις Μεταδοτικές Σπογγώδεις Εγκεφαλοπάθειες να ήταν παρόμοια στα δύο είδη (Foster et al., 2001b), γεγονός που δεν επαληθεύεται.

³ Η γραφή των σιωπηλών μεταλλάξεων π.χ. του 42(ccg→cca) σημαίνει ότι στο κωδικόνιο 42 αντί για την αλληλουχία ccg που παρατηρείται κανονικά στον άγριο τύπο (GenBank accession number AJ000739) ανευρίσκεται η cca. Ομοίως αναγράφονται και οι υπόλοιπες σιωπηλές μεταλλάξεις.

Πίνακας 2. Πολυμορφισμοί της PrP σε διάφορους πληθυσμούς αγών παγκοσμίως.

Πολυμορφισμός ανά κωδικόνιο	Ευρώπη	Υπόλοιπος κόσμος	Πρώτη βιβλιογραφική αναφορά
R18	Ισπανία	-	Acin et al., 2004
A21	Ελλάδα	-	Billinis et al., 2002
P23	Ελλάδα	-	Billinis et al., 2002
V37	Ιταλία	-	Agrimi et al., 2003
S49	Ελλάδα	-	Billinis et al., 2002
G102	Μ. Βρετανία	Κίνα, Ιαπωνία	Goldmann et al., 1998
P110	Ιταλία	-	Agrimi et al., 2003
V125	-	Κίνα	Zhou et al., 2008
S127	Ιταλία, Μ. Βρετανία, Ισπανία	ΗΠΑ, Κίνα, Ιαπωνία	Zhang et al., 2004
Q133	Ιταλία	-	Acutis et al., 2006
I137	Ιταλία	-	Acutis et al., 2006
M142	Μ. Βρετανία, Γαλλία, Ισπανία	ΗΠΑ, Ιαπωνία	Goldmann et al., 1996
T142	Ιταλία	-	Acutis et al., 2008
R143	Μ. Βρετανία, Ιταλία, Ελλάδα	ΗΠΑ, Κίνα, Ιαπωνία	Goldmann et al., 1996
D146	Κύπρος	-	Papasavva-Stylianou et al., 2007
S146	Κύπρος	ΗΠΑ, Κίνα, Ιαπωνία	Kurosaki et al., 2005
H151	Κύπρος	-	Papasavva-Stylianou et al., 2007
H154	Ελλάδα, Ιταλία, Ισπανία, Κύπρος	ΗΠΑ, Κίνα	Billinis et al., 2002
Q168	Ιταλία, Ελλάδα, Κύπρος	-	Billinis et al., 2002
P194	Ιταλία	-	Acutis et al., 2008
Q211	Μ. Βρετανία, Γαλλία, Ισπανία	ΗΠΑ, Κίνα, Ιαπωνία	Wopfner et al., 1999
G211	-	Κίνα	Zhou et al., 2008
L218	-	Κίνα	Zhang et al., 2004
I219	Ισπανία	Κίνα	Zhou et al., 2008
H220	Ελλάδα, Γαλλία, Μ. Βρετανία, Κύπρος	-	Billinis et al., 2002

Πολυμορφισμός ανά κωδικόνιο	Ευρώπη	Υπόλοιπος κόσμος	Πρώτη βιβλιογραφική αναφορά
K222	Ιταλία, Γαλλία, Μ. Βρετανία, Ισπανία	ΗΠΑ, Κίνα	Agrimi et al., 2003
W232	Ισπανία	-	Acin et al., 2004
P240	Ιταλία, Γαλλία, Μ. Βρετανία, Ελλάδα, Ισπανία, Κύπρος	ΗΠΑ, Κίνα, Ιαπωνία, Πακιστάν	Goldmann et al., 1996



Σχήμα 3. Απεικόνιση των πολυμορφικών κωδικονίων του Prip γονιδίου στην αίγα και των πέντε οκταπεπτιδικών επαναλήψεων μεταξύ των κωδικονίων 54 και 102. Με κίτρινο χρώμα συμβολίζονται τα κωδικόνια του ανοιχτού αναγνωστικού πλαισίου που αποκόπτονται κατά την ωρίμαση της πρωτεΐνης prip.

V. Πολυμορφισμοί της PrP στην αίγα και σύνδεση τους με την ανθεκτικότητα/ευαισθησία στην Τρομώδη Νόσο

Τα στοιχεία για τη γενετική προδιάθεση της Τρομώδους Νόσου αντλούνται κυρίως από έρευνες στα πρόβατα. Συγκεκριμένα, ο ιδιαίτερα μεγάλος αριθμός δειγμάτων και φυλών προβάτων που έχουν αναλυθεί οδήγησαν στο συμπέρασμα ότι η εμφάνιση της Τρομώδους Νόσου στο πρόβατο συνδέεται με συγκεκριμένους γονοτύπους και οι φυλές εμφανίζουν διαφοροποιήσεις σε ότι αφορά στην κατανομή των γονοτύπων και το βαθμό ευαισθησίας τους. Η ευαισθησία/ανθεκτικότητα στην Τρομώδη Νόσο του προβάτου είναι απόλυτη μόνο σε δύο γονοτύπους, στον VV₁₃₆RR₁₅₄QQ₁₇₁ που συνδέεται αποκλειστικά με την ευαισθησία και στον AA₁₃₆RR₁₅₄RR₁₇₁ που συνδέεται αποκλειστικά με την ανθεκτικότητα. Οι υπόλοιποι γονοτύποι παρουσιάζουν διακύμανση στη συσχέτισή τους με την Τρομώδη Νόσο που ποικίλει από υψηλή ανθεκτικότητα έως υψηλή ευαισθησία, ενώ η πολυπληθέστερη ομάδα AA₁₃₆RR₁₅₄QQ₁₇₁ χαρακτηρίζεται ως ενδιάμεσης ανθεκτικότητας. Ο γονότυπος VV₁₃₆RR₁₅₄QQ₁₇₁, που συνδέεται αποκλειστικά με την ευαισθησία στη νόσο, σε πολλές φυλές προβάτων βρίσκεται σε πολύ μικρό ποσοστό ατόμων ή απουσιάζει τελείως. Στην περίπτωση αυτή η ευαισθησία στη νόσο συνδέεται με το γονότυπο AA₁₃₆RR₁₅₄QQ₁₇₁ του προβάτου, όπως για παράδειγμα στα πρόβατα της ελληνικής φυλή Χίου στα οποία το αλληλόμορφο της βαλίνης (V) στο κωδικόνιο 136 απουσιάζει και τα νοσούντα ζώα φέρουν κυρίως τον απλότυπο A₁₃₆R₁₅₄Q₁₇₁/- και A₁₃₆H₁₅₄Q₁₇₁/- (Hunter et al., 1994; Baylis and Goldmann, 2004; Ευρωπαϊκή Επιτροπή, 2008b).

Στις αίγες, οι μελέτες συσχέτισης γενετικών πολυμορφισμών με την Τρομώδη Νόσο είναι περιορισμένες τόσο σε αριθμό όσο και σε στατιστική σπουδαιότητα, κυρίως λόγω του μικρού αριθμού των νοσούντων ζώων (Billinis et al., 2002; Papasavva-Stylianou et al., 2007; Vaccari et al., 2006; Goldmann, 2008).

Παρόλα αυτά έχουν αναφερθεί κάποια αλληλόμορφα του Prnp γονιδίου της αίγας τα οποία σχετίζονται με αυξημένη ανθεκτικότητα στην Κλασική Τρομώδη Νόσο, ενώ σε κανένα ζώο δεν έχουν παρατηρηθεί οι τρεις οκταπεπτιδικές (PHGGGWGQ) επαναλήψεις που ανέφεραν οι Goldmann et al., 1998. Συγκεκριμένα, οι Acutis et al., 2006 σε 25 αίγες με Κλασική Τρομώδη Νόσο παρατήρησαν ότι η αντικατάσταση της γλουταμίνης (Q) από λυσίνη (K) στο

κωδικόνιο 222 προσδίδει ανθεκτικότητα στην Τρομάδη Νόσο στις φυλές αιγών Maltese, Camosciata και σε διασταυρώσεις αυτών. Οι Vaccari et al., 2006 σε αίγες της φυλής Ionica επιβεβαίωσαν την παραπάνω παρατήρηση σε 20 δείγματα αιγών με εναπόθεση PrP^{Sc} τόσο στο κεντρικό νευρικό σύστημα όσο και σε περιφερικά λεμφικά όργανα και σε 19 δείγματα αιγών με εντόπιση της PrP^{Sc} μόνο στα τελευταία. Οι Papasavva-Stylianou et al., 2007 μελετώντας 164 νοσούσες αίγες παρατήρησαν ότι η παρουσία της σερίνης (S) και του ασπαρτικού οξέος (D) στο κωδικόνιο 146 προσδίδει ανθεκτικότητα στην Τρομάδη Νόσο σε αίγες της φυλής Δαμασκίου και διασταυρώσεις αυτών με εγχώριες αίγες της Κύπρου. Επιπλέον, παρόλο που έχουν παρατηρηθεί νοσούσες αίγες με ιστιδίνη (H) στο κωδικόνιο 154, αυτός ο πολυμορφισμός έχει συσχετιστεί με μερική ανθεκτικότητα στην Κλασική Τρομάδη Νόσο (Billinis et al., 2002; Papasavva-Stylianou et al., 2007; Vaccari et al., 2006). Τέλος, μια από τις πρώτες μελέτες, αναφέρει τον προστατευτικό ρόλο της μεθειονίνης (M) έναντι της ισολευκίνης (I) στο κωδικόνιο 142 έναντι της φυσικής νόσου, καθώς σχετίζεται με την παράταση της περιόδου επώασης τόσο της πειραματικής Τρομάδους Νόσου όσο και της πειραματικής Σπογγώδους Εγκεφαλοπάθειας των Βοοειδών στις αίγες (Goldmann et al., 1996).

Στην περίπτωση της Άτυπης Τρομάδους Νόσου, στις αίγες δεν έχει επιβεβαιωθεί η σημασία του διμορφισμού L141F που βρέθηκε στα πρόβατα (Moum et al., 2005; Saunders et al., 2006; Moreno et al., 2007; Lühken et al., 2007; Benestad et al., 2008). Πρόσφατη ερευνητική εργασία σχετίζει την παρουσία της ιστιδίνης στο κωδικόνιο 154 με ευαισθησία στη Άτυπη Τρομάδη Νόσο των αιγών και συγκεκριμένα τον συνδυασμένο γονότυπο AHQ (ή A₁₃₆H₁₅₄Q₁₇₁), ανεξάρτητα από τους πολυμορφισμούς που μπορεί να υπάρχουν στα κωδικόνια 222 και 240 (Colussi et al., 2008).

Τα δεδομένα για την Τρομάδη Νόσο στις αίγες στον Ελλαδικό χώρο, αφορούν τη γονοτυπική ανάλυση συνολικά 52 αιγών με Κλασική Τρομάδη Νόσο (Billinis et al., 2002; Sofianidis et al., 2006; 2008) και 19 αιγών με άτυπη εντόπιση της PrP^{Sc} (Sofianidis et al., 2008; Bouzalas et al., 2008). Η πρώτη μελέτη των πολυμορφισμών του Prnp γονιδίου σε αίγες μιας μολυσμένης εκτροφής αποκάλυψε 13 διαφορετικούς γονότυπους της PrP^C, που κωδικεύουν τουλάχιστον 5 υποθετικά διαφορετικές ώριμες πρωτεΐνες prion (Billinis et al., 2002). Δύο μόνο αίγες με Τρομάδη Νόσο, από τις συνολικά 15, έφεραν τον άγριο-τύπου συνδυασμένο

γονότυπο HH₁₄₃-RR₁₅₄, ενώ η παρουσία των αλληλομόρφων R₁₄₃ και H₁₅₄ εκτιμήθηκε ότι προσδίδει μερική προστασία έναντι της Τρομάδους Νόσου στις αίγες της Εγχώριας Ελληνικής φυλής (Zygoiannis and Katsaounis, 1989) και σε διασταρώσεις αυτών. Στις ερευνητικές εργασίες της ομάδας των Sofianidis et al., 2006; 2008, η γονοτυπική ανάλυση συνολικά 37 νοσούσων αιγών με Κλασική Τρομάδη Νόσο ανέδειξε την παρουσία του συνδυασμένου γονότυπου HH₁₄₃-RR₁₅₄ σε 22 ζώα, ενώ σε 5 ζώα παρατηρήθηκε ο διμορφισμός H₁₄₃R.

Όσον αφορά την άτυπη κατανομή της PrP^{Sc} στις αίγες του Ελλαδικού χώρου, η ίδια ομάδα αναφέρει την εμφάνιση του συνδυασμένου γονότυπου HH₁₄₃-RR₁₅₄ σε 12 νοσούσες αίγες και του αντίστοιχου HR₁₄₃-RR₁₅₄ σε 4 αίγες (Sofianidis et al., 2008). Σε συμφωνία με Ιταλούς ερευνητές φαίνεται να είναι τα αποτελέσματα των Bouzalas et al., 2008, όπου σε 3 αίγες με Άτυπη Τρομάδη Νόσο βρέθηκε ο γονότυπος AA₁₃₆-HH₁₅₄-QQ₁₇₁ ενώ η παρουσία της λυσίνης στο κωδικόνιο 222 σχετίστηκε με ανθεκτικότητα τόσο για την Κλασική όσο και για την Άτυπη Τρομάδη Νόσο.

VI. Μέθοδοι γονοτυπικής ανάλυσης του Prnp γονιδίου

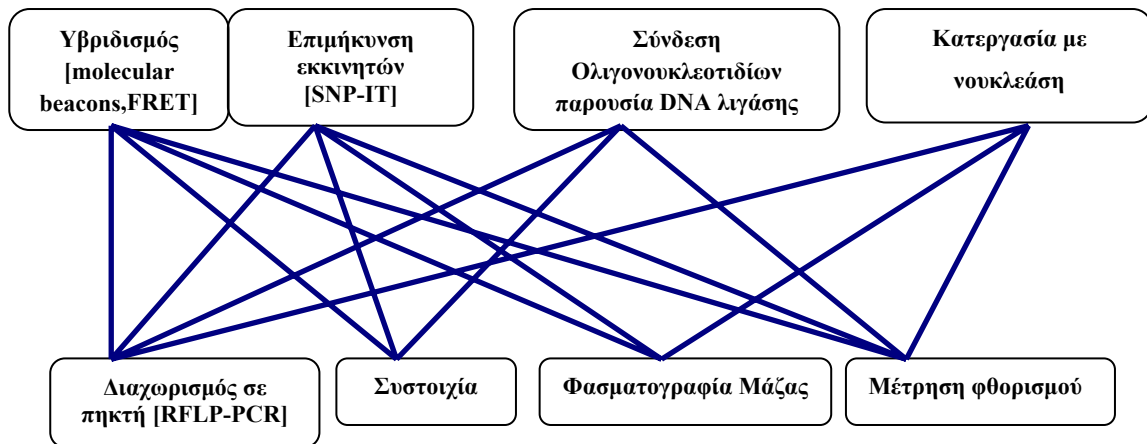
VI.1. Γενικά

Οι τεχνικές γονοτύπησης του Prnp γονιδίου στα πρόβατα διακρίνονται σε δύο κατηγορίες: (α) σε εκείνες που χρησιμοποιούνται για την ανάλυση μεμονωμένων νουκλεοτιδικών πολυμορφισμών (Single Nucleotide Polymorphisms- SNPs) στα τέσσερα κωδικόνια (136, 141, 154 και 171) και (β) στην ανάλυση αλληλουχίας όλων των νουκλεοτιδίων του Prnp γονιδίου. Τα βασικά βήματα και στις δύο κατηγορίες, είναι η απομόνωση του γονιδιωματικού DNA από ζωικό ιστό, η ενίσχυση ολόκληρου ή μέρους του ανοιχτού αναγνωστικού πλαισίου του Prnp με τη χρήση της Αλυσιδωτής Αντίδρασης της Πολυμεράσης (ΑΑΠ) (Polymerase Chain Reaction-PCR), η ανίχνευση των πολυμορφικών κωδικονίων και ο καθορισμός του γονοτύπου της PrP^c (Hunter and Bossers, 2006).

Οι μέθοδοι ανίχνευσης των SNPs περιλαμβάνουν δύο στάδια:

- 1) Τη διάκριση των αλληλομόρφων ενός νουκλεοτιδίου, με μια σειρά μοριακών, βιοχημικών και χημικών διαδικασιών, οι οποίες καταλήγουν στη δημιουργία ειδικών για κάθε αλληλόμορφο προϊόντων όπως οι τεχνικές της ΑΑΠ-Πολυμορφισμών μήκους τεμαχίων περιορισμού (Restriction Fragment Length Polymorphism-RFLP ή PCR-RFLP) και οι τεχνικές της Real Time PCR (TaqMan, SNIP-it, FRET, Ligase chain reaction) (Vaccari et al., 2004; Sbaiz et al., 2004; Acutis et al., 2006b; Ψηφίδη et al., 2008)
- 2) Την ανάλυση ή μέτρηση των προϊόντων αυτών (σχήμα 4) (Gut, 2001).

Στην κατηγορία ανάλυσης της αλληλουχίας όλου του Prnp γονιδίου περιλαμβάνονται οι διάφορες παραλλαγές της ενζυμικής μεθόδου αλληλούχησης του DNA κατά Sanger και ηλεκτροφορητικές τεχνικές έμμεσης αλληλούχησης του DNA, όπως είναι η ηλεκτροφόρηση πηκτής με διαβαθμισμένη αποδιατακτική σύσταση (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis-DGGE).



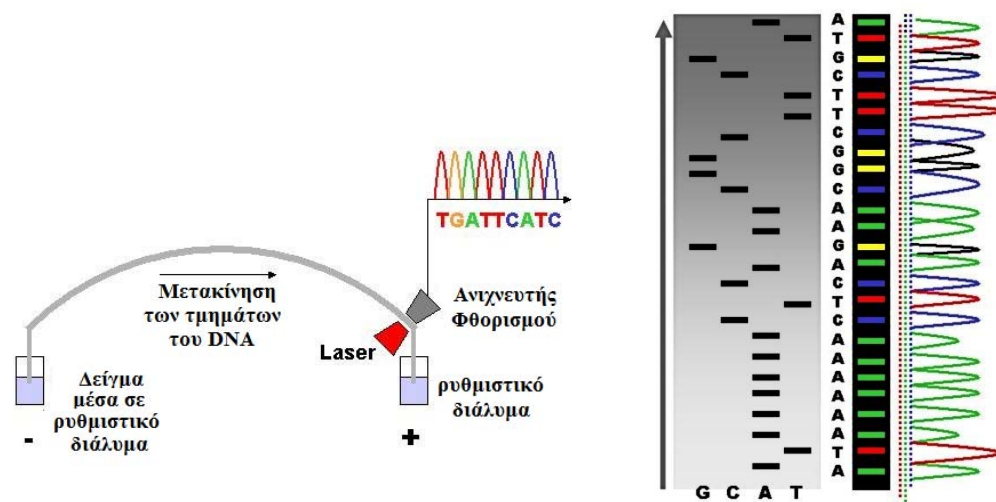
Σχήμα 4. Σχηματική παράσταση των κυριότερων μεθόδων γονοτύπισης των SNPs. Στην επάνω σειρά διακρίνονται οι μέθοδοι σύνθεσης του ειδικού για κάθε αλληλόμορφο προϊόντος και στην κάτω σειρά οι μέθοδοι ανάλυσης των προϊόντων τους. Οι περισσότερες μέθοδοι ανίχνευσης SNPs είναι αποτέλεσμα συνδυασμού μιας μεθόδου επεξεργασίας και μιας μεθόδου ανάλυσης των δειγμάτων (προσαρμοσμένο σχήμα από Gut, 2001).

VI.2. Ανάλυση αλληλουχίας DNA (sequencing) κατά Sanger

Η ανάλυση αλληλουχίας DNA (sequencing) κατά Sanger, χαρακτηρίζεται ενζυμική επειδή χρησιμοποιεί τη DNA πολυμεράση για την αλληλούχηση του DNA. Έχει επικρατήσει της χημικής μεθόδου Maxam και Gilbert (Maxam and Gilbert, 1977), καθώς χρησιμοποιούνται λιγότερα τοξικά αντιδραστήρια και ραδιενέργεια.

Η βασική της αρχή στηρίζεται στη δράση των τριφωσφορικών διδεοξυνουκλεοτιδίων (dideoxynucleotides triphosphates-ddNTPs). Τα αντίγραφα που παράγονται από τη δράση της DNA πολυμεράσης, εκκινούν όλα από την αρχή της αλληλουχίας-στόχου και καταλήγουν σε διαφορετικά σημεία κατά μήκος της αλυσίδας του DNA που αντιγράφεται. Για αυτό ευθύνονται τα ddNTPs τα οποία καθώς δεν φέρουν υδροξύλιο (-OH) στη 3' θέση της ριβόζης τους, εμποδίζουν τη DNA πολυμεράση να συνδέσει κάθε νεοεισερχόμενο δεοξυνουκλεοτίδιο (dNTP) στη συντιθέμενη αλυσίδα. Για αυτό το λόγο τα ddNTPs καλούνται και τερματιστές της αλυσίδας του DNA (DNA chain terminators). Τα αντίγραφα αυτά διαχωρίζονται με βάση το μήκος τους σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου και η αλληλουχία των νουκλεοτιδίων της αρχικής αλληλουχίας-στόχου καθορίζεται από τη σειρά των αντιγράφων στην πηκτή (Αγγελοπούλου, 2004).

Υπάρχουν διάφορες παραλλαγές της μεθόδου με ραδιοσημασμένα νουκλεοτίδια ή φθορίζοντες εκκινητές, σε κάθε περίπτωση όμως απαιτούνται τέσσερις αντιδράσεις, μια για κάθε ddNTP (ddATP, ddTTP, ddGTP, ddCTP). Βελτιωμένη παραλλαγή της παραπάνω μεθόδου αποτελεί η λεγόμενη Dye-chain terminator sequencing, η οποία χρησιμοποιεί σημασμένα ddNTPs που επιτρέπουν την αλληλούχηση του DNA σε μία μόνο αντίδραση. Η μέθοδος που εφαρμόστηκε στην παρούσα εργασία για την αλληλούχηση ολόκληρου του ORF του Prnp γονιδίου στις αίγες βασίζεται στο Dye-chain terminator sequencing. Τα ddNTPs σημαίνονται με φθορίζουσες χρωστικές και εκπέμπουν φως σε διαφορετικά μήκη κύματος (Σχήμα 4). Μετά την ενσωμάτωση τους στην αλληλουχία του DNA, ακολουθεί ηλεκτροφόρηση του προϊόντος σε τριχοειδές (capillary electrophoresis). Ο εκπεμπόμενος φθορισμός καταγράφεται από ανιχνευτή και προκύπτει ένα χρωματογράφημα, βάσει του οποίου καθορίζεται η εξεταζόμενη νουκλεοτιδική αλληλουχία (σχήμα 5).



Σχήμα 5. Σχηματική απεικόνιση του Dye-chain terminator sequencing με ηλεκτροφόρηση σε τριχοειδές (capillary electrophoresis) (αριστερά). Χρωματογράφημα της αναφερόμενης μεθόδου και συγκριτική αντιστοίχιση του ραδιογραφήματος σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου (δεξιά). (Τροποποιημένο από BIO-RAD Laboratories, <http://www.BIO-RAD.com/>).

VI.3. Ηλεκτροφόρηση πηκτής με διαβαθμισμένη αποδιατακτική σύσταση (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis-DGGE)

Η μέθοδος DGGE επινοήθηκε το 1979 από τους Fischer και Lerman και επιτρέπει την ανίχνευση μεμονωμένων αντικαταστάσεων νουκλεοτιδίων και μικρών ελλείψεων (deletions) ή προσθηκών (insertions) μήκους μερικών δεκάδων ζευγών βάσεων στο μόριο του DNA. Η μέθοδος στηρίχτηκε στην επίδραση που ασκεί το σημείο τήξεως του μορίου του DNA στην ικανότητα μετακίνησής του κατά την ηλεκτροφόρηση (Fischer and Lerman, 1983).

Το σημείο τήξεως (T_m) του μορίου του DNA εξαρτάται από τον αριθμό των νουκλεοτιδίων που περιέχουν αδενίνη (A) ή θυμίνη (T) και γουανίνη (G) ή κυτοσίνη (C). Δύο όμοια τμήματα DNA που διαφέρουν έστω και σε ένα μόνο νουκλεοτίδιο θα έχουν διαφορετικό σημείο τήξεως.

Όταν δίκλινα μόρια DNA κινούνται μέσα σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου, που αποτελείται από αυξανόμενα διαβαθμισμένο μετουσιωτή (όπως ουρία και φορμαμίδιο), υφίστανται μερική αποδιάταξη της έλικάς τους σε κάποιες περιοχές οι

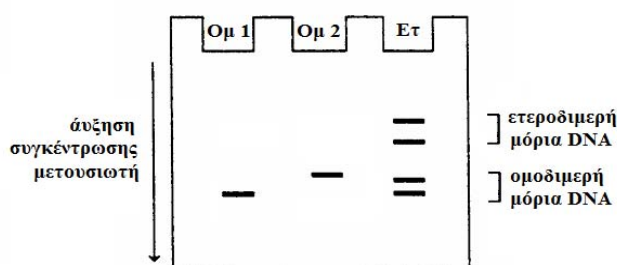
οποίες καλούνται περιοχές τήξεως (domains). Αυτά τα μερικώς αποδιαταγμένα μονόκλωνα μόρια εμφανίζουν μειωμένη ηλεκτροφορητική κινητικότητα στην πηκτή και σταματούν σε κάποιο σημείο της. Καθώς τα δίκλωνα μόρια του DNA συνεχίζουν να κινούνται αργά προς υψηλότερες συγκεντρώσεις μετουσιωτή μέσα στην πηκτή, και άλλα πεδία τήξεως υφίστανται αποδιάταξη της δίκλωνης έλικάς τους. Όταν το τελικό ή πιο σταθερό πεδίο του μορίου τηχθεί τότε το αρχικό μόριο του DNA έχει υποστεί πλήρη αποδιάταξη και η αναλυτική ικανότητα της πηκτής χάνεται (Myers et al., 1985b; Sheffield et al., 1989).

Η μείωση της ηλεκτροφορητικής κινητικότητας του μορίου του DNA όσο η δίκλωνη έλικα του 'ξεδιπλώνεται' παρέχει ενδείξεις για τη σύσταση του. Η θέση του μορίου DNA στην πηκτή με διαβαθμισμένο μετουσιωτή καθορίζεται από το λιγότερο σταθερό τμήμα του μορίου (πεδίο με χαμηλότερη θερμοκρασία τήξεως ή πρώτο πεδίο ή first domain), ενώ είναι σχετικά μη ειδική ή απύσαστα στα υπόλοιπα τμήματα της αλληλουχίας ή στο υπόλοιπο μήκος του μορίου (Fischer and Lerman, 1983). Το πεδίο με χαμηλότερη θερμοκρασία τήξεως είναι ουσιαστικά το τμήμα του DNA που αναλύεται. Τεμάχια DNA με το ίδιο μέγεθος, αλλά με διαφορετική νουκλεοτιδική αλληλουχία διαχωρίζονται με αυτή τη μέθοδο στην πηκτή με διαβαθμισμένη αποδιατακτική σύσταση. Τόσο αντιμεταθέσεις όσο και διπλές αντικαταστάσεις βάσεων -οι οποίες αφήνουν αναλλοίωτη την πραγματική σύνθεση του μορίου- δίνουν σημαντικές μεταβολές στην τελική θέση του μορίου στην ειδική αυτή πηκτή. Με αυτόν τον τρόπο προκύπτουν θέσεις και πρότυπα τα οποία μεταβάλλονται ελάχιστα κατά μήκος της πηκτής, όταν το ηλεκτρικό πεδίο είναι συνεχές. Αντικαταστάσεις νουκλεοτιδίων στα πεδία με υψηλές θερμοκρασίες τήξεως του μορίου DNA δεν μπορούν να ανιχνευθούν με την DGGE (Myers et al., 1985b).

Το πρόβλημα αυτό αντιμετωπίζεται με την προσθήκη μιας αλληλουχίας πλούσιας σε G-C (περιεκτικότητας 80%) που καλείται G-C clamp και αυξάνει το σημείο τήξεως της υπό ανάλυση ακολουθίας. Με αυτόν τον τρόπο, προκύπτουν μόρια DNA με μια κατανομή δίκλωνων και αποδιαταγμένων περιοχών που επιτρέπει τμήμα του μορίου να παραμένει δίκλωνο μέσα στην ειδική πηκτή έως ότου η αλληλουχία-στόχος τηχθεί και δώσει ανάλογο πρότυπο. Η προσθήκη του GC-clamp σε μια αλληλουχία-στόχο επιτρέπει τη διάκριση αντικαταστάσεων ακόμη και ενός νουκλεοτιδίου, όταν αυτές εντοπίζονται ακόμα και σε όλα τα πεδία τήξεως του μορίου DNA (Myers et al., 1985a).

Στην DGGE αναλύονται προϊόντα της Αλυσιδωτής Αντίδρασης της Πολυμεράσης. Κατά την Αλυσιδωτή Αντίδραση της Πολυμεράσης (ΑΑΠ) τα δίκλινα μόρια του DNA αποχωρίζονται και στη συνέχεια αναδιατάσσονται κατά τη διάρκεια των κύκλων της αντίδρασης, επιτρέποντας τη σύνθεση δίκλωνων μορίων από όμοια (ομοδιμερή) αλλά και από διαφορετικά αλληλόμορφα (ετεροδιμερή) (Mullis, 1987; Sheffield et al., 1989). Τα ετεροδιμερή έχουν πάντα χαμηλότερο σημείο τήξεως από οποιοδήποτε ομοδιμερές, επειδή έχουν μεγαλύτερη χημική αστάθεια.

Συνεπώς μετά τον πολλαπλασιασμό του αρχικού μορίου DNA με την ΑΑΠ, τα πρότυπα της DGGE που προκύπτουν σε περίπτωση ομοζυγωτίας είναι δύο είδη ομοδιμερών, τα οποία απεικονίζονται ως μια ζώνη ανά διαδρομή της ειδικής πηκτής. Όταν το ομοζυγωτό δείγμα περιέχει γουανίνη ή κυτοσίνη (Ομ1-σχήμα 6) τότε παρατηρείται μια ζώνη χαμηλότερα από εκείνη που αντιστοιχεί σε ομοζυγωτό δείγμα που περιέχει αδερίνη ή θυμίνη (Ομ2-σχήμα 6). Ενώ σε περίπτωση ετεροζυγωτίας, προκύπτουν τέσσερις ζώνες ανά διαδρομή της ειδικής πηκτής που αντιστοιχούν στα ανασχηματισμένα ετεροδιμερή και στα δύο ομοδιμερή μόρια που παράγονται κατά την ΑΑΠ (σχήμα 6).



Σχήμα 6. Απεικόνιση των σχετικών θέσεων των προϊόντων ΑΑΠ ενός μορίου DNA. Σε ομοζύγωτη κατάσταση προκύπτουν οι θέσεις Ομ1 (ομοδιμερές με νουκλεοτίδια G-C) ή Ομ 2 (ομοδιμερές με νουκλεοτίδια A-T). Σε ετεροζυγωτία προκύπτει η Ετ εικόνα (συνύπαρξη των Ομ1 και Ομ 2 και δύο ετεροδιμερών μορίων).

Η μέθοδος DGGE εφαρμόζεται ευρέως σε φυλογενετικές μελέτες μικροοργανισμών (Diez et al., 2001; Regensbogenova et al., 2004; Zijngel et al., 2006) και γενικότερα για τον ακριβή διαχωρισμό πολυμορφισμών ιδιαίτερα σε

τμήματα DNA μεγέθους μέχρι 500bp. Πρόκειται για την κύρια τεχνική που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα έρευνα και αποσκοπούσε στη βελτιστοποίησή της (Muyzer et al., 1985a;1985b; Hayes et al., 1999) για την ανίχνευση σημειακών μεταλλάξεων στο Prnp γονίδιο στις αίγες.

Η DGGE χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά το 1991 στην έρευνα των νοσημάτων prion του ανθρώπου για την ανίχνευση μεταλλάξεων στο πολυμορφικό κωδικόνιο 178 του PRNP γονιδίου και τη συσχέτιση του με την Οικογενή νόσο CJD (Fink et al., 1991). Αργότερα, οι ίδιοι ερευνητές βελτίωσαν την τεχνική και η μελέτη των μεταλλάξεων επεκτάθηκε σε όλο το γονίδιο της πρωτεΐνης prion, με κατάλληλο σχεδιασμό εκκινητών, ενώ ταυτόχρονα η ομάδα του Laplanche et al.,1993 χρησιμοποίησε την DGGE για τη μελέτη του Prnp γονιδίου στα πρόβατα. Από τότε, η DGGE έχει χρησιμοποιηθεί για τη μελέτη των μεμονωμένων νουκλεοτιδικών πολυμορφισμών του Prnp κυρίως στα πρόβατα (Laplanche et al., 1993; Belt et al., 1995; Thorgeirsdottir et al., 1999; Παπασάββα-Στυλιανού, 2003), ενώ υπάρχει μόνο μια δημοσίευση για την εφαρμογή της στις αίγες (Papasanna-Stylianou et al., 2007). Πρόκειται για μέθοδο με ελάχιστο οικονομικό κόστος η οποία επιτρέπει την εύκολη ανίχνευση μεταλλάξεων στα κωδικόνια του Prnp υπό τη μορφή πρότυπων ζωνών (patterns) στην πηκτή του πολυακρυλαμιδίου. Στη συνέχεια τα ειδικά αυτά πρότυπα ζωνών προσδιορίζονται με μια μέθοδο ανάλυσης αλληλουχιών DNA ακριβείας συνδέοντας το πρότυπο με συγκεκριμένους πολυμορφισμούς. Ως προκαταρκτική μέθοδος, η DGGE βοηθά τον ερευνητή στην επιλογή από το πλήθος των δειγμάτων, μόνο εκείνων με ειδική απεικόνιση, δηλωτική παρουσίας μεταλλάξεων, για περαιτέρω λεπτομερή ανάλυση της αλληλουχίας τους.

VII. Ανοσοβιοχημική ανάλυση της PrP^{Sc} με ανοσοκαθήλωση (Western blot)

Όπως αναφέρθηκε, η μέθοδος εκλογής για τη διάγνωση των Μεταδοτικών Σπογγωδών Εγκεφαλοπαθειών είναι η ανίχνευση της PrP^{Sc} στους ιστούς. Η προκαταρκτική εξέταση για την ανίχνευση της μπορεί να γίνει με διάφορες ταχείες ανοσοενζυμικές μεθόδους χημειοφωταύγειας. Όμως η επιβεβαίωση και ο διαχωρισμός μεταξύ των τριών μορφών των Μεταδοτικών Σπογγωδών

Εγκεφαλοπαθειών στα μικρά μηρυκαστικά (Κλασική και Άτυπη Τρομώδης Νόσος και Σπογγώδης Εγκεφαλοπάθεια των Βοοειδών) γίνεται μόνο με χρήση της τεχνικής της ανοσοκαθήλωσης ή ανοσοαποτύπωσης ή Western blot (ΕΚ 991/2001 και τροποποίηση 36/2005; EFSA, 2007).

Η δοκιμή της ανοσοκαθήλωσης περιλαμβάνει αρχικά την ομογενοποίηση του δείγματος και την επεξεργασία του με διάφορες αποδιατακτικές-απορρυπαντικές ουσίες ώστε να λυθούν τα κύτταρα και να απελευθερωθεί η πρωτεΐνη (σχήμα 7, στάδιο 1). Σε αυτήν τη φάση, γίνεται επώαση του ύποπτου ιστού με πρωτεΐνωση-K, ώστε να εκδηλωθεί η βιοχημική διακριτική ιδιότητα της Pr^{Sc} σε σύγκριση με την PrP^c.

Ακολουθεί κάθετη ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου, μετά από φυγοκέντρηση του υλικού ώστε να απομακρυνθούν τυχόν κυτταρικά υπολείμματα (σχήμα 7, στάδιο 2).

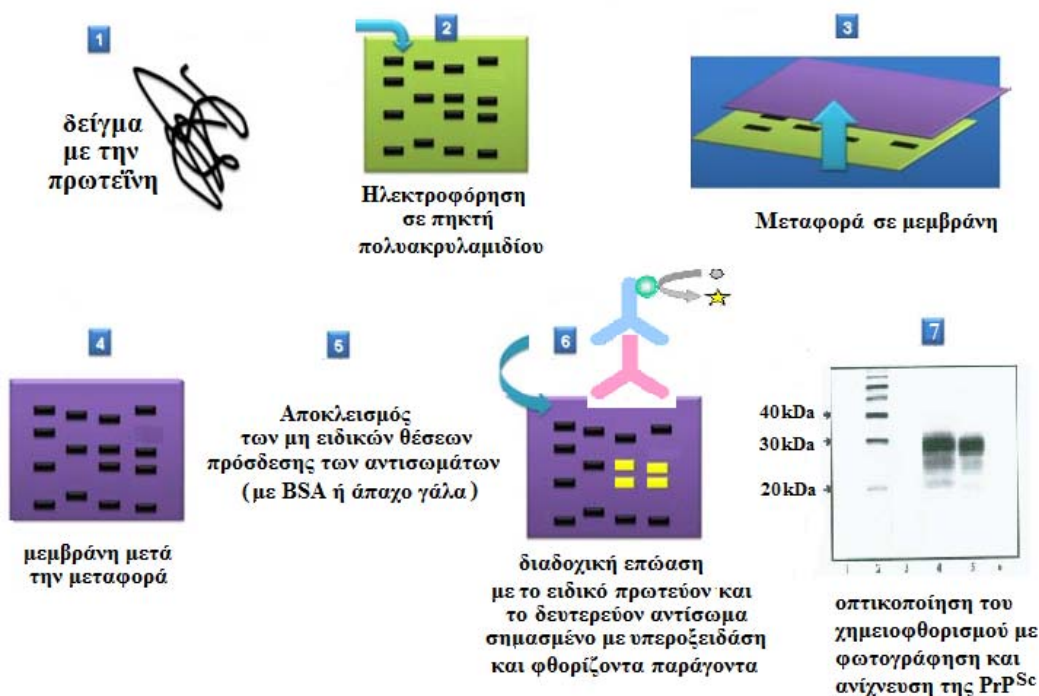
Στη συνέχεια οι πρωτεΐνες για να γίνουν ευκολότερα προσβάσιμες στα ειδικά αντισώματα, μεταφέρονται από την πηκτή πολυακρυλαμιδίου σε ειδική μεμβράνη (νιτροκυτταρίνης ή PVDF) που τις δεσμεύει π.χ. με την επίδραση ηλεκτρικού ρεύματος (σχήμα 7, στάδιο 3-4).

Σε επόμενο στάδιο γίνεται επώαση της μεμβράνης σε άπαχο γάλα ή σε βόεια αλβουμίνη (bovine serum albumin-BSA) ώστε να αποκλειστούν οι μη ειδικές θέσεις της μεμβράνης, όπου θα μπορούσαν να συνδεθούν τα αντισώματα έναντι των ειδικών επιτόπων της υπό ανίχνευσης πρωτεΐνης (σχήμα 7, στάδιο 5).

Μετά το στάδιο του 'αποκλεισμού', ακολουθεί επώαση της μεμβράνης με το ειδικό πρωτεύον αντίσωμα, το οποίο συνδέεται με τον ειδικό επίτοπο της υπό ανίχνευση πρωτεΐνης. Στην περίπτωση της PrP υπάρχουν πολλά μονοκλωνικά αντισώματα που έχουν παραχθεί έναντι διαφόρων επιτόπων της (πίνακας 3). Η μεμβράνη ξεπλένεται και ακολουθεί επώαση με το δευτερεύον αντίσωμα που προσδέεται πάνω στο πρωτεύον. Το δευτερεύον αντίσωμα φέρει έναν υποδοχέα φθοροφόρου παράγοντα όπως βιοτίνη ή υπεροξειδάση (σχήμα 7, στάδιο 6).

Όταν ο παράγοντας αυτός διασπάται παράγεται φθορισμός, που ανιχνεύεται π.χ. με φωτογράφιση. Έτσι στην περίπτωση της Κλασικής Τρομώδους Νόσου των μικρών μηρυκαστικών, λαμβάνεται η εικόνα του σταδίου 7, όπου απεικονίζονται στις διαδρομές 4 και 5, η μη γλυκοσυλιωμένη και οι δύο ειδικές γλυκοσυλιωμένες

ζώνες μοριακού βάρους περίπου 27 και 30 kDa, από όπου πήρε το όνομα της η παθολογική PrP²⁷⁻³⁰.



Σχήμα 7. Απεικόνιση των σταδίων της ανοσοκαθήλωσης (Western blot).

Πίνακας 3. Τα πιο διαδεδομένα μονοκλωνικά αντισώματα έναντι επιτόπων της PrP που χρησιμοποιούνται στην ανοσοκαθήλωση.

Όνομασία μονοκλωνικού αντισώματος	Επίτοπος (κωδικόνια PrP του προβάτου)	Αλληλουχία αμινοξέων του επιτόπου	Είδη ζώων στα οποία έχει ειδική σύνδεση με την PrP
F99	220-225	QYQRES	Πρόβατο, αίγα
SAF84	163-173	QVYYRPVDQYS	Πρόβατο, αίγα, βοοειδή, τρωκτικά
2G11	153-158	YRENNY	Πρόβατα, αίγα
L42	145-163	GNDYEDRYRENMYRYPNQ	Πρόβατο, αίγα, βοοειδή, τρωκτικά, άνθρωπο
6H4	147-155	DYEDRYRE	Πρόβατο, αίγα, βοοειδή, τρωκτικά, άνθρωπο
P4	89-104	GGGGWGQGGSHSQWNK	Πρόβατο, αίγα
12B2	93-97	WGQGG	Όλα τα είδη

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Ι. ΣΚΟΠΟΣ

Σκοπός της παρούσας έρευνας ήταν η μελέτη των επίσημα ταυτοποιημένων περιστατικών Τρομάδους Νόσου στις αίγες για την ανεύρεση πιθανών πολυμορφισμών της πρωτεΐνης prion και η σύνδεσή τους με την εμφάνιση ή μη της νόσου. Για το λόγο αυτό μελετήθηκε το ανοιχτό αναγνωστικό πλαίσιο (ORF) του γονιδίου της πρωτεΐνης prion (PrP) σε υγιείς αίγες και σε αίγες με Τρομάδη Νόσο.

Η παρούσα έρευνα είχε ως στόχους επίσης:

- Την ανάλυση και περιγραφή των πολυμορφισμών της πρωτεΐνης prion (Prnp) σε αίγες των Ελληνικών φυλών, εγχώριας και Σκοπέλου,
- Την πιθανή δημιουργία ενός αξιόπιστου και αποτελεσματικού διαγνωστικού πρωτοκόλλου, βασισμένου στην ηλεκτροφόρηση πηκτής με διαβαθμισμένη αποδιατακτική σύσταση (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis-DGGE), για την ανεύρεση των σημαντικότερων μεμονωμένων νουκλεοτιδικών πολυμορφισμών που χαρακτηρίζουν τα «ανθεκτικά» άτομα και τέλος
- Τη μοριακή ταυτοποίηση των απομονώσεων της παθολογικής πρωτεΐνης prion από αίγες που εκτρέφονταν στην Ελλάδα και η σύγκριση τους με αντίστοιχες πρωτεϊνικές απομονώσεις από αίγες της Ιταλίας.

II. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

II.1. Ζωικό υλικό

Στην παρούσα έρευνα υπήρξε η δυνατότητα μελέτης των 89 διαθέσιμων δειγμάτων αιγών με Τρομώδη Νόσο από τα 168 περιστατικά που έχουν καταγραφεί από το 2002 έως το 2007 σε ολόκληρη την ελληνική επικράτεια από το ΕΕΑ-ΜΣΕ (Κουτσούκου-Χαρτώνα, Θεσσαλονίκη 2008). Το ζωικό υλικό που ευγενικά μας παραχωρήθηκε από το ΕΕΑ-ΜΣΕ είχε εξεταστεί όπως ορίζει το πρόγραμμα του ΥΠΑΑΤ και είχε χαρακτηριστεί «θετικό ή αρνητικό στην Τρομώδη Νόσο» (Ελληνική Δημοκρατία, ΥΠΑΑΤ, 2008). Οι υγιείς αίγες και οι αίγες με Τρομώδη Νόσο που μελετήθηκαν εκτιμάται ότι ανήκαν κυρίως στην εγχώρια φυλή και σε διασταυρώσεις της με εισαγόμενες βελτιωμένες γαλακτοπαραγωγές φυλές (Saanen, Alpine). Όμως καθώς δεν υπήρχαν επαρκείς διαθέσιμες πληροφορίες για τη φυλή του ζώου από το ΕΕΑ-ΜΣΕ, η παράμετρος αυτή δεν λήφθηκε υπόψη κατά τη στατιστική ανάλυση των δεδομένων.

Στην Ελλάδα εκτρέφονται περίπου 4,9 εκατομμύρια αίγες (Εθνική Στατιστική Υπηρεσία; Eurostat; 2008), από τις οποίες το 70% ανήκει στην εγχώρια ελληνική φυλή, το 10% στη φυλή Σκοπέλου, 0,1% σε εισαγόμενες γαλακτοπαραγωγές φυλές και το υπόλοιπο σε διασταυρώσεις αυτών (Ζυγογιάννης και Κατσαούνης, 1992; Γκουργκούλης, 1999). Για τη μελέτη της επίδρασης της φυλής στο γονότυπο της αίγας συλλέχθηκαν δείγματα ολικού αίματος από άτομα των δύο ελληνικών φυλών εγχώριας και Σκοπέλου. Η διάκριση των δύο φυλών έγινε με βάση τα διακριτικά μορφολογικά χαρακτηριστικά τους, σε σύγκριση με εκείνα των εισαγόμενων φυλών αιγών (Ζυγογιάννης και Κατσαούνης, 1992). Στην περίπτωση της εγχώριας φυλής, επιλέχτηκε η συλλογή δειγμάτων αίματος από 3 βιολογικές εκτροφές (Κανονισμός ΕΟΚ αριθ. 2092/91) αιγών της Πελοποννήσου, όπου διατηρούνται αμιγείς πληθυσμοί της φυλής σε κλειστές εκτροφές, στις οποίες σημειώνεται ότι δεν είχε καταγραφεί ποτέ κρούσμα της Τρομώδους Νόσου.

Για την παρούσα έρευνα χρησιμοποιήθηκαν ιστοτεμάχια εγκεφάλου από 124 αίγες και πλήρες αίμα από 228 αίγες. Το Εθνικό Κέντρο Αναφοράς για τις Μεταδοτικές Σπογγώδεις Εγκεφαλοπάθειες (ΕΕΑ-ΜΣΕ), Λάρισα παραχώρησε συνολικά 121 ιστοτεμάχια εγκεφάλου από αίγες που είχαν εξεταστεί για την Τρομώδη Νόσο με ταχεία μέθοδο διάγνωσης (ELISA-BSE Platelia, BIO-RAD) και

σε κάποιες η νόσος είχε επιβεβαιωθεί και ιστοπαθολογικά. Από τα δείγματα αυτά, 89 ανήκαν σε αίγες με Κλασική Τρομώδη Νόσο και 32 σε υγιείς αίγες (πίνακας 4).

Οι νοσούσες αίγες προέρχονταν από 30 μικτές εκτροφές προβάτων και αιγών που εδράζον σε 13 νομούς κυρίως της Βόρειας Ελλάδας. Οι περισσότερες εκτροφές είχαν άπαξ 1 με 2 θετικές αίγες, ενώ από τους νομούς Λάρισας, Σερρών και Κοζάνης όπου η νόσος ενζωτεί, ο ρυθμός των προσκομιζόμενων δειγμάτων ήταν συνεχής από το 2004 έως σήμερα (πίνακας 4, σχήμα 8). Από τις 89 αίγες με Τρομώδη Νόσο μόνο οι 4 εκδήλωναν κλινικά συμπτώματα, ενώ σε ποσοστό 95,5% η διάγνωση της Τρομώδους Νόσου στις αίγες ήταν συνέπεια της ενεργούς επιτήρησης που γίνεται σε όλα τα μικρά μηρυκαστικά ηλικίας άνω των 18 μηνών, που προορίζονται για ανθρώπινη κατανάλωση. Η ηλικία των θετικών αιγών κυμαινόταν μεταξύ 12 και 86 μηνών, με μέσο όρο τους 38 μήνες (τυπική απόκλιση \pm 8 μήνες), τόσο για την ομάδα των υποκλινικών όσο και για τα 4 κλινικά περιστατικά που μελετήθηκαν.

Οι 32 υγιείς αίγες, που παραχωρήθηκαν από το ΕΕΑ-ΜΣΕ, προέρχονταν από μεμονωμένες εκτροφές του νομού Λάρισας, Έβρου και Ιωαννίνων και από 3 εκτροφές της Κοζάνης.

Επίσης σε συνεργασία με τη Διεύθυνση Κτηνιατρικής της Νομαρχιακής Αυτοδιοίκησης Λάρισας είχαν εξασφαλιστεί αναδρομικά 95 δείγματα ολικού αίματος από υγιείς αίγες. Τα δείγματα προέρχονταν από 2 μικτές εκτροφές του νομού Λάρισας, στις οποίες είχαν επιβληθεί περιοριστικά μέτρα εξυγίανσης από την Τρομώδη Νόσο κατά το έτος 2004.

Στο σύνολο των 121 ιστοτεμαχίων προστέθηκαν 3 δείγματα εγκεφάλου από αίγες με κλινικά συμπτώματα, που προέρχονταν από δύο μικτές εκτροφές, του νομού Περίας (1 ζώο) και του νομού Λάρισας (2 ζώα) και σε αυτά η διάγνωση της Τρομώδους Νόσου έγινε με ανοσοκαθήλωση. Επίσης, έγιναν 133 αιματοληψίες που αφορούσαν 33 κλινικά υγιείς αίγες της φυλής Σκοπέλου και 100 βιολογικά εκτρεφόμενες εγχώριες αίγες από την περιοχή της Πελοποννήσου.

Από τα ιστοτεμάχια εγκεφάλου όσο και από το πλήρες αίμα έγινε απομόνωση του γονιδιωματικού DNA, ενώ 15 ιστοτεμάχια εγκεφάλου υποβλήθηκαν στη δοκιμή της ανοσοκαθήλωσης για τη μελέτη της PrP^{Sc} (πίνακας 5, σχήμα 8).

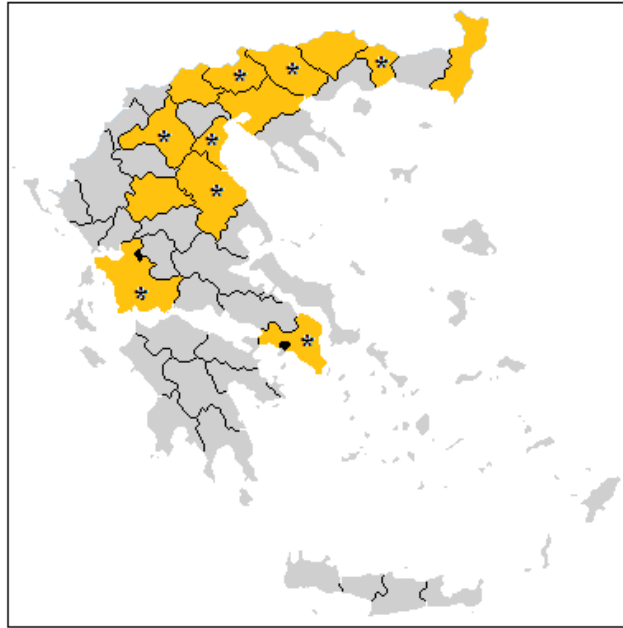
Πίνακας 4. Συγκεντρωτικός πίνακας του ζωικού υλικού που παραχωρήθηκε από το ΕΕΑ-ΜΣΕ.

Γεωγρ. Νομός	Έτος προσκόμισης δειγμάτων	Αριθμός δειγμάτων				
		Κλινικά περιστατικά	Υποκλινικά περιστατικά	Αριθμός μολυσμένων εκτροφών	Υγιείς αίγες	Αριθμός υγιών εκτροφών
ΔΡΑΜΑΣ	2007	0	1	1	-	-
ΠΕΛΛΑΣ	2005	0	1	1	-	-
ΕΒΡΟΥ	2006	2	1	2	1	1
ΑΤΤΙΚΗΣ	2007	0	1	1	-	-
ΑΙΤΩΛ/ΝΙΑΣ	2007	0	1	1	-	-
ΞΑΝΘΗΣ	2007	0	1	1	-	-
ΛΑΡΙΣΙΑΣ	2004-2007	2	40	11	96	3
ΚΙΛΚΙΣ	2007	0	1	1	-	-
ΣΕΡΡΩΝ	2004, 2007	0	11	3	-	-
ΚΟΖΑΝΗΣ	2003, 2004, 2007	0	19	5	29	3
ΘΕΣΣ/ΝΙΚΗΣ	2004, 2006	0	7	2	-	-
ΤΡΙΚΑΛΩΝ	2004	0	1	1	-	-
ΙΩΑΝ/ΝΩΝ	2005	0	0	0	1	1
	Σύνολο	4	85	30	127	8

Πίνακας 5. Αναλυτικός πίνακας προέλευσης των δειγμάτων-απομονώσεων των αιγών, που υποβλήθηκαν σε μοριακή ταυτοποίηση της PrP^{Sc}. Εκτός από τις αίγες που συμβολίζονται με αστερίσκο, όλες οι υπόλοιπες παραχωρήθηκαν από το ΕΕΑ-ΜΣΕ.

Αριθμός ιστοτεμαχίων προς ανοσοκαθίλωση

Γεωγρ. Νομός	Κλινικά περιστατικά	Υποκλινικά περιστατικά	Αριθμός μολυσμένων εκτροφών
ΛΑΡΙΣΙΑΣ	2*	6	3
ΑΤΤΙΚΗΣ	0	1	1
ΑΙΤΩΛ/ΝΙΑΣ	0	1	1
ΣΕΡΡΩΝ	0	1	1
ΚΟΖΑΝΗΣ	0	1	1
ΞΑΝΘΗΣ	0	1	1
ΚΙΛΚΙΣ	0	1	1
ΠΙΕΡΙΑΣ	1*	0	1
Σύνολο	3	12	10



Σχήμα 8. Απεικόνιση των 13 γεωγραφικών νομών προέλευσης των αιγών με Τρομάδη Νόσο (πορτοκαλόχρωμες περιοχές). Με αστερίσκο συμβολίζονται οι 8 νομοί προέλευσης των δειγμάτων-απομονώσεων που υποβλήθηκαν σε μοριακή ταυτοποίηση της PrP^{Sc}.

Π.2. Απομόνωση γονιδιωματικού DNA από ιστοτεμάχιο εγκεφάλου και πλήρες αίμα

Υλικά

- Ιστοτεμάχιο εγκεφάλου

Για την απομόνωση του γονιδιωματικού DNA του ζώου χρησιμοποιήθηκαν 8-10mg ιστοτεμαχίου εγκεφάλου, μετά από απόψυξη και ομογενοποίηση του, σύμφωνα με τυποποιημένη συσκευασία αντιδραστηρίων (PUREGENE™, DNA Purification system, Cell & Tissue Kit, D-5500A, GENTRA systems). Όλα τα ιστοτεμάχια εγκεφάλου συντηρούνταν στους -80°C και είχαν σημειωθεί με τρόπο που προσδιόριζε τον αύξοντα αριθμό του δείγματος, τον αριθμό ενωτίου του ζώου, το γεωγραφικό νομό όπου έδραζε η εκτροφή, τον τόπο και την ημερομηνία δειγματοληψίας από τους εξουσιοδοτημένους κτηνιάτρους των τοπικών Αγροτικών Κτηνιατρείων, την παρουσία ή όχι κλινικών συμπτωμάτων και την ηλικία του ζώου.

- Πλήρες αίμα

Για την απομόνωση του γονιδιωματικού DNA του ζώου απαιτούνταν 200μl πλήρους αίματος/ζώο που λαμβάνονταν μετά από τη συλλογή 2-3ml πλήρους αίματος σε φιαλίδια κενού (τύπου vacutainer) των 3ml επαλειμμένα με το αντιπηκτικό K₃-EDTA. Η αιματοληψία γινόταν με παρακέντηση της σφαγίτιδας φλέβας με αποστειρωμένη ατομική βελόνα. Μετά την αιματοληψία, τα φιαλίδια τοποθετούνταν μέσα σε ισοθερμικά κιβώτια με κατεψυγμένες παγοκύστες, ώστε να βρίσκονται σε άμεση επαφή με αυτές. Τα υλικά παρέμεναν στα κιβώτια το πολύ για 6 ώρες, μέχρι να προσκομιστούν στο εργαστήριο και να συντηρηθούν στους +4 °C για 18 ώρες. Στη συνέχεια ακολουθούσε απομόνωση του γονιδιωματικού DNA με χρήση τυποποιημένης συσκευασίας αντιδραστηρίων (NucleoSpin® Blood Quick-Pure, Macherey- Nagel) και τα δείγματα του DNA αποθηκεύονταν στους -20 °C.

Π.3. Εκτίμηση της ποσότητας και ποιότητας δείγματος DNA με χρήση οριζόντιας ηλεκτροφόρησης

Παρασκευή πηκτής αγαρόζης

Υλικά

- 10X TBE (Tris-Boric EDTA) [BIO-RAD], 1X TBE διάλυμα ηλεκτροφόρησης
- Διάλυμα φόρτωσης (10X BlueJuice™ Gel Loading Buffer, Invitrogen)
- Βρωμιούχο αιθίδιο (10 mg/ml, Invitrogen)
- Αγαρόζη (Agarose electrophoresis grade, Invitrogen)
- Τμήματα DNA γνωστού μοριακού βάρους (1 Kbp ladder, Invitrogen)

Μεθοδολογία

Η ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 1% χρησιμοποιήθηκε ως μέσο εκτίμησης της ποιότητας και της ποσότητας όλων των δειγμάτων DNA. Ποσότητα 9μl από κάθε δείγμα DNA αναμίχθηκε με 1μl διαλύματος φόρτωσης και εμβυθίστηκε στις ειδικές θέσεις (πηγάδια) της πηκτής αγαρόζης. Εφαρμόστηκε τάση 100Volt για 60 λεπτά, ώστε το DNA να διατρέξει σε αρκετό μήκος την πηκτή της αγαρόζης.

Ο προσδιορισμός του DNA έγινε κατά εκτίμηση και συγκριτικά με τη συγκέντρωση των τμημάτων DNA γνωστού μοριακού βάρους. Η εκτίμηση της ποιότητας του DNA έγινε με οπτική παρατήρηση της πηκτής αγαρόζης για την αναζήτηση επιπλέον ζωνών μικρότερης μοριακής μάζας οι οποίες υποδήλωναν ότι το DNA του εξεταζόμενου δείγματος ήταν κατακερματισμένο (Sambrook et al., 1989). Δείγματα DNA, των οποίων η ηλεκτροφόρηση υποδήλωνε κατακερματισμό, απορρίφθηκαν και η απομόνωση του DNA επαναλήφθηκε από το αρχικό υλικό.

Π.4. Αλυσιδωτή Αντίδραση της Πολυμεράσης (ΑΑΠ ή PCR, Polymerase Chain Reaction) για την DGGE, την ανάλυση RFLP και την αλληλούχηση.

Υλικά

Η τυπική αντίδραση ΑΑΠ για ανάλυση με DGGE και με RFLP (όγκος αντίδρασης=50μl)

1. 10x PCR buffer, χωρίς Mg^{+2} : 200mM Tris-HCl (pH 8,4), 500mM KCl.
2. 50mM $MgCl_2$
3. 10pmol/μl από κάθε ολιγονουκλεοτίδιο- εκκινητή
4. 2,5mM από κάθε δεοξυνουκλεοτίδιο –dNTPs (dATP, dTTP, dCTP, dGTP- Invitrogen).
5. 1,5U *Taq* DNA Polymerase, recombinant (Invitrogen).
6. 3μl (περίπου 100ng) γονιδιωματικού DNA.
7. Νερό υγρής χρωματογραφίας (HPLC) ή αντίστοιχης ποιότητας.

Η τυπική αντίδραση ΑΑΠ για την αλληλούχηση (όγκος αντίδρασης=100μl)

1. 10mM Tris/HCl (pH 8,3), 50 mM KCl,
2. 25mM $MgCl_2$
3. 200mM dNTPs
4. 0,5mM από κάθε εκκινητή
5. 5U AmpliTaq Gold (Applied Biosystems)
6. 10μl (περίπου 300ng) γονιδιωματικού DNA
7. Νερό υγρής χρωματογραφίας (HPLC) ή αντίστοιχης ποιότητας.
8. BigDye Primer Cycle Sequencing kit

Μεθοδολογία

Γενικά

Η διαδικασία προετοιμασίας διαλύματος αντίδρασης ΑΑΠ (master mix) έγινε σε ειδικό θάλαμο κάθετης νηματικής ροής που χρησιμοποιείται αποκλειστικά για την προετοιμασία των αντιδράσεων της ΑΑΠ. Τα αναλώσιμα και οι πιπέττες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν επίσης αποκλειστικής χρήσης για ΑΑΠ. Η ΑΑΠ για την DGGE και για την αλληλούχηση έγινε σε DNA Engine[®], Peltier Thermal Cycler (MJ

Research) και σε DNA Thermal Cyclor 9700 (Applied Biosystems) αντίστοιχα. Για τις αντιδράσεις της αλληλούχησης χρησιμοποιήθηκε το BigDye Primer Cycle Sequencing kit και η ανίχνευσή τους έγινε σε συσκευή ABI Prism 310.

Επιλογή εκκινητών

Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν αποσκοπούσαν στη μελέτη ολόκληρου του ανοιχτού αναγνωστικού πλαισίου του Prrp γονιδίου. Χρησιμοποιήθηκαν εκκινητές που σχεδιάστηκαν στο εργαστήριο και άλλοι που αντλήθηκαν από τη βιβλιογραφία (Ikeda et al., 1993; Gombojav et al., 2003; Billinis et al., 2002; και Acutis et al., 2006) με στόχο την καλύτερη απόδοση του παραγόμενου ΑΑΠ προϊόντος. Το κακής ποιότητας DNA που λήφθηκε από τους αυτολυμένους εγκεφάλους των αιγών δεν επέτρεψε την αποτελεσματική ανάλυση του συνόλου των δειγμάτων που παραχωρήθηκαν από το ΕΕΑ-ΜΣΕ. Αντίστοιχο πρόβλημα δεν υπήρξε με τα δείγματα του ολικού αίματος, με εξαίρεση κάποια στα οποία η ύπαρξη αναστολέων της ΑΑΠ δεν επέτρεψε τη γονοτυπική ανάλυσή τους. Σε κάποια δείγματα, παρόλο που το παραγόμενο προϊόν της ΑΑΠ κρίθηκε κατάλληλο, η ανάλυση αλληλουχίας από δύο ανεξάρτητες εταιρείες δεν εμφάνισε ομοιότητα με τη νουκλεοτιδική αλληλουχία του Prrp γονιδίου, γεγονός το οποίο αποδόθηκε στη μη ειδική ενίσχυση της DNA αλληλουχίας-στόχου.

Στηριζόμενη στις παραπάνω εμπειρίες, δόθηκε προσοχή στην απομόνωση και τον καθαρισμό του DNA από νευρικό ιστό, στις αντιδράσεις της ΑΑΠ, στον καθαρισμό των προϊόντων της και στην περαιτέρω ανάλυση των αλληλουχιών τους, ώστε να αποφευχθούν στο μέγιστο βαθμό πιθανά λάθη στη γονοτύπηση.

Χρησιμοποιήθηκαν διαφορετικοί εκκινητές για την DGGE, την ανάλυση RFLP και την αλληλούχηση του DNA (sequencing) (πίνακας 6).

i) Για την DGGE, επιλέχθηκαν εκκινητές για τον πολλαπλασιασμό δύο αλληλοκαλυπτόμενων τμημάτων του Prrp γονιδίου, του α και του β, όπως παριστάνονται στο παρακάτω σχεδιάγραμμα.

ORF Pmp γονιδίου



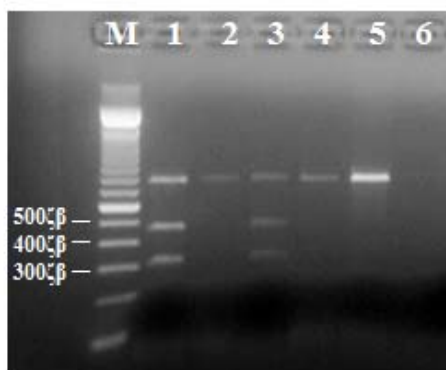
Για τη βελτιστοποίηση της ανάλυσης των προϊόντων της ΑΑΠ στην DGGE χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό MELT94 των Lerman-Sauer-Dresselhaus, 1993 (<http://web.mit.edu/osp/www/melt.html>). Βάσει αυτού μελετήθηκε η θερμοκρασία τήξεως κατά μήκος της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας (Melting map) ολόκληρου του ORF του Pmp γονιδίου και των τμημάτων α και β (σχήμα 10, Α). Για την ηλεκτροφορητική ανάλυση του β προϊόντος ΑΑΠ κρίθηκε αναγκαία η προσθήκη ενός τμήματος 40 bp πλούσιων σε γουανίνες και κυτοσίνες ή αλλιώς GC-clamp στο 5' άκρο του forward εκκινητή, προκειμένου να ενισχυθεί το πεδίο ανάλυσης του ή η περιοχή με το χαμηλότερο σημείο τήξεως (first domain) (σχήμα 10, Β και Γ).

ii) Η RFLP ανάλυση χρησιμοποιήθηκε για την επιβεβαίωση του H154R σε ορισμένες περιπτώσεις. Για το λόγο αυτό χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές G1 και G2 για την ενίσχυση ολόκληρου του ORF (πίνακας 6). Ποσότητα 4μl από το G1-G2 προϊόν αναμιγνυόταν με 10U της *Bsp*HI (New England BioLabs, Inc.) ενδονουκλεάσης περιορισμού και 2μl NEB4 buffer 10X σε τελικό όγκο αντίδρασης 20μl και ακολουθούσε επώαση του προϊόντος της ΑΑΠ στους 37°C για 4 ώρες. Κατά την παρουσία του R154H, σε πηκτή αγαρόζης 1% φαινόταν εκτός από το ειδικό προϊόν των 771bp και δύο προϊόντα μεγέθους 308bp και 459bp, συνέπεια της δράσης της *Bsp*HI στο μόριο του DNA (σχήμα 9).

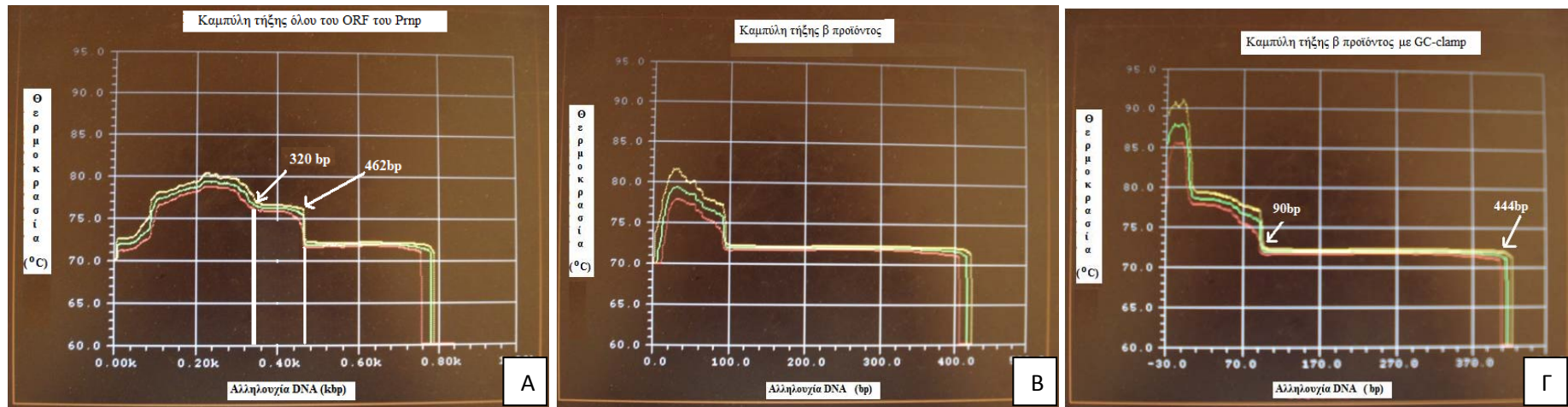
iii) Για την αλληλούχηση του DNA χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές Ter1, Ter3 και Ter2, Ter4 (πίνακας 6) σε δύο ανεξάρτητες ΑΑΠ για την ανάλυση κάθε δείγματος, σύμφωνα με ειδικό πρωτόκολλο. Τα προϊόντα Ter1-Ter3 και Ter2-Ter4 μετά τον καθαρισμό τους, ελέγχονταν σε πηκτή αγαρόζης 1% με οριζόντια ηλεκτροφόρηση. Τα προϊόντα που κρίνονταν κατάλληλα αποτελούσαν το εκμαγείο της ΑΑΠ για την ανάλυση των ακολουθιών του DNA με χρήση του BigDye Primer Cycle Sequencing kit. Κάθε προϊόν Ter1-Ter3 αποτελούσε το εκμαγείο δύο χωριστών αντιδράσεων με τον εκκινητή Ter1 και τον εκκινητή Ter3 αντίστοιχα. Ανάλογα αναλυόταν το προϊόν

Ter3-Ter4. Ακολουθούσε καθαρισμός των προϊόντων της νέας ΑΑΠ και ανάλυση τους στη συσκευή ABI Prism 310, που χρησιμοποιεί την ηλεκτροφόρηση σε τριχοειδές για την ανάλυση των ακολουθιών του DNA. Η επιλογή της διαμέτρου του τριχοειδούς και της σύστασης του πολυμερούς γινόταν σύμφωνα με τις υποδείξεις του κατασκευαστή (Applied Biosystems). Σε περιπτώσεις δυσανάγνωστων αλληλουχιών, οι παραπάνω παράμετροι μεταβάλλονταν για τη βελτιστοποίηση της ανάλυσης.

Τελικά οι τέσσερις αναλύσεις αλληλουχίας που προέκυπταν για κάθε δείγμα ενσωματώνονταν σε μία, με τη βοήθεια λογισμικού της συσκευής και ακολουθούσε η ανάγνωσή τους.



Σχήμα 9. Ηλεκτροφορητική απεικόνιση προϊόντων G1-G2 μετά από επώαση τους με το περιοριστικό ένζυμο *Bsp*HI. M: μάρτυρας μοριακού βάρους, διαδρομές 1, 3: προϊόντα G1-G2 όπου υπάρχει ο πολυμορφισμός R154H, διαδρομές 2,4,5: προϊόντα G1-G2 με R151R, διαδρομή 6: αρνητικός μάρτυρας ΑΑΠ.



Σχήμα 10. Καμπύλη τήξεως του DNA (melting map) βάσει του λογισμικού MELT94.

A) Απεικόνιση της θερμοκρασίας τήξεως κατά μήκος της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας ολόκληρου του ORF του Prip γονιδίου. Τα δύο λευκά βέλη αφορίζουν το πεδίο ανάλυσης (first domain) του α τμήματος.

B) Καμπύλη τήξεως του τεμαχίου β του Prip γονιδίου.

Γ) Καμπύλη τήξεως του τεμαχίου β του Prip γονιδίου μετά από την προσθήκη του GC-clamp στο 5'-άκρο του forward εκκινητή. Τα δύο λευκά βέλη αφορίζουν το πεδίο ανάλυσης (first domain) του β τμήματος.

Πίνακας 6. Εκκινητές και συνθήκες ΑΑΠ που χρησιμοποιήθηκαν για την DGGE, τη RFLP και την ανάλυση αλληλουχιών DNA. *Ο εκκινητής M13F σχεδιάστηκε στο

ΠΡΟΙΟΝ ΑΑΠ	ΠΕΡΙΟΧΗ ΣΤΟΧΟΣ στο ORF	ΕΚΚΙΝΗΤΕΣ (5'→3')	ΜΕΓΕΘΟΣ ΠΡΟΪΟΝΤΟΣ (bp)	ΒΙΒΛΙΟΓΡ. ΑΝΑΦΟΡΑ	ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΣΤΟΝ ΚΥΚΛΟΠΟΙΗΤΗ	ΘΕΣΗ ΣΤΟ ORF (νουκλεοτίδιο)
<i>a</i>	<i>1-154</i> κωδικόνιο	M13F: 5'-tgt aaa acg acg gcc agt ccc tet tta ttt tgc aga gaa gtc-3' P60R: 5'- gatagtaacggctcctcatagtc-3'	462	M13F: ΕΚΕΤΑ/ΙΚΕΘ* P60R: Acutis et al., 2006	94°C/5' -94°C/1'x30 55°C/1'x30-72°C/2,5'x30-72°C / 10'	M13F:-24 έως 1 P60R: 460 έως 441
<i>b</i>	<i>148-256</i> κωδικόνιο	5'P61: 5'-gcccgccgtccggcccgac ccccgcgctccggcgcccgaaccaacatgaagcatgtgg- 3' G2: 5'-cta tcc tac tat gag aaa aat gag-3'	484	P61: Acutis et al., 2006 G2: Billinis et al., 2002	94°C/5'-94°C/1'x30 58°C/1'x30-72°C/2,5'x30-72°C / 10'	P61: 327 έως 346 G2: 749 έως 771
<i>G1-G2</i>	<i>1-256</i> κωδικόνιο	G1: 5'- atg gtg aaa a gccac ata gg c agt-3' G2: 5'-cta tcc tac tat gag aaa aat gag-3'	771	G1: Billinis et al., 2002 G2: Billinis et al., 2002	94°C/4' -94°C/1'x39 59°C/1'x39-72°C/1'x39-72°C/5'	G1: 1 έως 24 G2: 749 έως 771
<i>Ter1-Ter3</i>	<i>1-150</i> κωδικόνιο	Ter1: 5'-ggctcctatagtcattgcc-3' Ter3: 5'-tttacgtggcatttgatgc-3'	504	Ter1, Ter3: ISS [#]	96°C/10' -96°C/30''x30 - 57°C/15''x30-72°C/ 45''x30-72°C/4'	Ter1: 433 έως 451 Ter3: -52 έως -32
<i>Ter2-Ter4</i>	<i>128-256</i> κωδικόνιο	Ter2: 5'-tggtggctacatgctggg-3' Ter4: 5'-ggctgcaggtagacactcc-3'	458	Ter2, Ter4: ISS [#]	96°C/10' -96°C/30''x30 - 57°C/15''x30-72°C/ 45''x30-72°C/4'	Ter2: 384 έως 401 Ter4: 53 έως 71 (έξω από το ORF)

εργαστήριο στα πλαίσια συνεργασίας μεταξύ των ιδρυμάτων INA-EKETA και ΙΚΕΘ, ΕΘΙΑΓΕ. #ISS: Istituto Superiore di Sanità.

Π.5. Ηλεκτροφόρηση πηκτής με διαβαθμισμένη αποδιατακτική σύσταση (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis- DGGE)

Υλικά

1. Διάλυμα 20% (v/v) μετουσιωτή (denaturant)
 - Ουρία (Invitrogen) 16gr
 - Formamide (HCONH₄) (Invitrogen) 16ml
 - 40% Acrylamide/Bis 37.5:1 (BIO-RAD) 30ml
 - 50X TAE (Tris-Acetate-EDTA buffer) (BIO-RAD) 4ml
 - Αποσταγμένο νερό μέχρι τα 200ml

2. Διάλυμα 80% (v/v) μετουσιωτή (denaturant)
 - Ουρία (Invitrogen) 67,2gr
 - Formamide (HCONH₄) (Invitrogen) 64ml
 - 40% Acrylamide/Bis 37.5:1 (BIO-RAD) 30ml
 - 50X TAE (Tris-Acetate-EDTA buffer) (BIO-RAD) 4ml
 - Αποσταγμένο νερό μέχρι τα 200ml

3. Διάλυμα Ammonium persulphate (APS) 10%
 - Ammonium persulphate (SIGMA) 1gr
 - Αποσταγμένο νερό 10ml

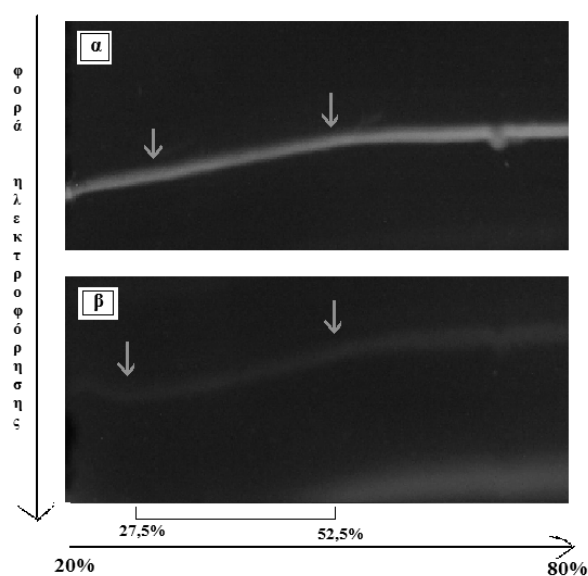
4. Παρασκευή πηκτής με διαβαθμισμένη αποδιατακτική σύσταση
Πυκνό διάλυμα στη μια υποδοχή της συσκευής gradient
 - 80% δ/τος μετουσιωτή 30ml
 - APS 10% φρέσκο 300μl
 - TEMED (Invitrogen) 30μl
Αραιό διάλυμα στην άλλη υποδοχή της συσκευής gradient
 - 20% δ/τος μετουσιωτή 30ml
 - APS 10% φρέσκο 300μl
 - TEMED (Invitrogen) 30μl

5. Βρωμιούχο αιθίδιο (10 mg/ml, Invitrogen)
6. Διάλυμα φόρτωσης (10X BlueJuice™ Gel Loading Buffer, Invitrogen)
7. Τμήματα DNA γνωστού μοριακού βάρους (100bp ladder, Invitrogen)

Μεθοδολογία

Καθορισμός του βέλτιστου εύρους συγκέντρωσης των διαλυμάτων μετουσιωτή

Ο καθορισμός του βέλτιστου εύρους συγκέντρωσης των διαλυμάτων μετουσιωτή (ουρίας και φορμαμίδιου) για την ανάλυση των προϊόντων α και β αντίστοιχα του Prip γονιδίου, έγινε με κάθετη ηλεκτροφόρησή τους σε πηκτή με γραμμικά αυξανόμενη συγκέντρωση μετουσιωτή, στα 100 volts για 160 λεπτά (σχήμα 11). Τα δύο ΑΑΠ προϊόντα έδειξαν παρόμοια συμπεριφορά, ενώ εμφάνισαν την περιοχή με το χαμηλότερο σημείο τήξεως, όπου το μόριο είναι μονόκλωνο, σε συγκεντρώσεις διαλυμάτων μετουσιωτή που κυμάνθηκε μεταξύ 27,5% και 52,5%.



Σχήμα 11. Κάθετη ηλεκτροφόρηση των προϊόντων α (πηκτή α) και β (πηκτή β) της DGGE σε πηκτή με γραμμικά αυξανόμενη συγκέντρωση μετουσιωτή (από 20% στα αριστερά έως το 80% στα δεξιά) για τον καθορισμό του βέλτιστου εύρους συγκέντρωσης των διαλυμάτων μετουσιωτή. Τα βέλη αφορίζουν το τμήμα της καμπύλης που αντιστοιχεί στο μονόκλωνο μόριο (first domain) του α και β προϊόντος αντίστοιχα, που αναλύεται καλύτερα σε εύρος διαλυμάτων μετουσιωτή που κυμαίνεται μεταξύ 27,5 και 52,5%.

Τελικά στη συσκευή gradient, χρησιμοποιήθηκαν συγκεντρώσεις 20% και 80% των διαλυμάτων μετουσιωτή και κατά τη μεταφορά της πηκτής προς χρώση, το τμήμα που αντιστοιχούσε στις συγκεντρώσεις 65%-80%, αποκόπτονταν και απορρίπτονταν. Η τακτική αυτή διευκόλυνε το χειρισμό της ευμεγέθους πηκτής χωρίς να χαθούν τμήματά της που έφεραν ζώνες ανάλυσης και επέτρεπε την ηλεκτροφόρηση για 19 ώρες, εξασφαλίζοντας την καλύτερη ανάλυση των μορίων.

Συνολικά με τη μέθοδο DGGE αναλύθηκαν 207 DNA δείγματα αιγών. Η δυνατότητα κλωνοποίησης γνωστών απλοτύπων και η συνδυασμένη χρήση τους, που θα έδινε όλους τους πιθανούς γονότυπους (Belt et al., 1995; Fink et al., 1994; Fischer and Lerman, 1983) δεν υπήρξε. Για αυτό το λόγο χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες δείγματα που είχαν αναλυθεί με ηλεκτροφόρηση σε τριχοειδές και που ήταν γνωστής αλληλουχίας για όλο το ORF του Prip γονιδίου. Επίσης, χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες DNA από 10 πρόβατα διαφόρων γονοτύπων (Veterinary Laboratory Agencies, Weybridge, UK) και από μια αίγα γνωστού γονοτύπου (Centro Encefalopatie Animali, Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d' Aosta, Torino, Italy).

Ηλεκτροφόρηση και παρατήρηση των ειδικών πηκτών

Αρχικά, όλα τα προϊόντα ΑΑΠ ελέγχονταν με οριζόντια ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης 1% και μόνο όσα έδιναν το ειδικό ΑΑΠ προϊόν αναλύονταν στη συνέχεια με την DGGE.

15μl του προϊόντος της ΑΑΠ, με την προσθήκη 3μl 10X BlueJuice™ Gel Loading Buffer, αναλύονταν με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου 6,5%, το οποίο είχε γραμμικά αυξανόμενη διαβάθμιση μετουσιωτή από 20% σε 80% (v/v). Σε κάθε πηκτή φορτώνονταν προϊόντα ΑΑΠ με το ίδιο ζεύγος εκκινητών, μαζί με τα δείγματα-μάρτυρες και στην πρώτη και τελευταία θέση της πηκτής τοποθετούνταν 15μl 100bp DNA ladder, που χρησιμοποιούνταν ως οδηγοί για τη μετέπειτα ανάλυση της πηκτής. Η ηλεκτροφόρηση γινόταν σε ρυθμιστικό διάλυμα 0,5X TAE, στους 60°C, στα 84 volts για 19 ώρες. Στην ειδική συσκευή κάθετης ηλεκτροφόρησης (INGENYphorU-2X2, INGENY), τοποθετούνταν δύο πηκτές πολυακρυλαμιδίου, διαστάσεων 20εκ. X 25εκ..

Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης, κάθε πηκτή μεταφερόταν σε πλαστικό περιέκτη με 500ml 0,5X TAE και 80ml βρωμιούχου αιθιδίου για 10 λεπτά. Ακολουθούσε εμβάπτιση της πηκτής σε απεσταγμένο νερό για 5 λεπτά και στη συνέχεια μεταφορά της σε οριζόντια τράπεζα υπεριώδους ακτινοβολίας, παρατήρηση και φωτογράφιση τους.

II.6. Ανοσοκαθήλωση (Western blot)

Υλικά

1. Ιστοτεμάχια εγκεφάλου από 15 αίγες με Τρομάδη Νόσο από 8 νομούς της χώρας
2. Tris-HCl, pH 7.4.
3. 2% Sarcosyl (SIGMA)
4. Πρωτεΐνωση - K (50 mg/ml) (SIGMA)
5. Phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) (SIGMA)
6. Ρυθμιστικό διάλυμα αποδιάταξης 2x (Invitrogen)
7. Έτοιμες (precast) 12% bis-Tris polyacrylamide πηκτές (Invitrogen)
8. Μembrάνες polyvinylidene difluoride (PVD) (Millipore)
9. 1X PBS με 0,05% Tween20 και 0,5% άπαχο γάλα σε σκόνη
10. Μονοκλωνικά αντισώματα: SAF84 (με επίτοπο στα αμινοξέα 163-173 της PrP) και P4 (με επίτοπο στα αμινοξέα 89-104 της PrP)
11. Horseradish peroxidase-conjugated anti-mouse immunoglobulin (1:80.000)
12. Χημειοφθορίζουσα μέθοδος (SuperSignal Femto, Pierce).

Μεθοδολογία

Η επιλογή των δειγμάτων για το μοριακό χαρακτηρισμό των απομονώσεων της παθολογικής πρωτεΐνης p_g10n από αίγες που εκτρέφονταν στην Ελλάδα έγινε με βάση:

- την επαρκή ποσότητα του διαθέσιμου ιστοτεμαχίου και
- τη γεωγραφική προέλευση του δείγματος (σχήμα 8). Επιλέχθηκαν περιοχές όπου η νόσος ενζωτεί (νομός Λάρισας), περιοχές με μέτρια εμφάνιση της νόσου (Πιερία, Σέρρες) και τέλος περιοχές όπου εμφανίστηκαν μεμονωμένα περιστατικά της Τρομάδου Νόσου σε αίγες (όλες οι υπόλοιπες) (πίνακας 4 και 5).

Η δοκιμή της ανοσοκαθήλωσης περιλάμβανε τα εξής δύο στάδια:

– Ομογενοποίηση δείγματος

Η ομογενοποίηση του εγκεφαλικού ιστού (20% w/v) γινόταν με τη βοήθεια Tris-HCl, pH 7.4. Στη συνέχεια ποσότητα του ομογενοποιημένου δείγματος επωαζόταν με Tris-HCl (pH 7,4) και 2% Sarcosyl για 20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και ακολουθούσε φυγοκέντρηση. Στο υπερκείμενο διάλυμα γινόταν προσθήκη της πρωτεΐνης- K και επώαση στους 37°C για 1 ώρα με ήπια ανακίνηση. Η δράση της πρωτεΐνης-K τερματιζόταν με τη χρήση PMSF. Ακολουθούσε προσθήκη ρυθμιστικού διαλύματος αποδιάταξης 2x και θέρμανση στους 90°C για 10 λεπτά και η ηλεκτροφόρηση του δείγματος.

– Western Blot

10μl από κάθε δείγμα τοποθετούνταν στις ειδικές θέσεις έτοιμων (precast) πηκτών πολυακρυλαμίδιου. Κάθε δείγμα φορτωνόταν σε δύο πηκτές, ώστε η καθεμία να επωαστεί με διαφορετικό μονοκλωνικό αντίσωμα (το SAF84 ή το P4) αλλά υπό τις ίδιες συνθήκες. Η ηλεκτροφόρηση γινόταν στα 200 V για 60 λεπτά και για τη μεταφορά χρησιμοποιούνταν PVD μεμβράνες. Οι μεμβράνες τοποθετούνταν σε PBS με 0,05% Tween20 και 0,5% άπαχο γάλα σε σκόνη για 1 ώρα. Η επώαση των μεμβρανών με τα πρωτεύοντα μονοκλωνικά αντισώματα διαρκούσε 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολουθούσε επώαση 1 ώρας με το δευτερεύον αντίσωμα

(Horseradish peroxidase-conjugated anti-mouse immunoglobulin). Οι μεμβράνες εμφανίζονταν χρησιμοποιώντας μια μέθοδο χημειοφθορισμού (SuperSignal Femto, Pierce). Ο φθορισμός ανιχνευόταν με το σύστημα απεικόνισης VersaDoc imaging system (BIO-RAD). Όλες οι μετρήσεις γίνονταν με τη βοήθεια του λογισμικού QuantityOne (BIO-RAD).

Λόγος SAF84/P4

Ο λόγος SAF84/P4 ορίζει το λόγο του φθορίζοντος σήματος που εκπέμπεται όταν ένα δείγμα αναλύεται χωριστά με τα μονοκλωνικά αντισώματα SAF84 και P4. Αυτός ο λόγος ουσιαστικά προσδιορίζεται από τον υπολογισμό του μοριακού βάρους, καθώς και οι δύο αυτές παράμετροι στηρίζονται στη θέση αποκοπής (cleavage site) της PrP^{Sc} από την πρωτεΐνωση –K. Θα πρέπει να επισημανθεί ότι μόρια PrP27-30 με φαινομενικά χαμηλό μοριακό βάρος μπορεί να παραχθούν και μέσα από άλλους μηχανισμούς (πχ πιθανή αποκοπή στο καρβοξυτελικό άκρο και /ή ποικιλομορφία στη ΓΦΙ-‘άγκυρα’) σε αυτή την περίπτωση όμως το μοριακό βάρος και ο γλυκοτύπος είναι σε ασυμφωνία. Επιπλέον, καθώς, η διάκριση πρωτεϊνών με διαφορά μοριακού βάρους μικρότερη του 1 kDa είναι τεχνικά δύσκολη, ο λόγος αυτός παρέχει άλλο ένα μέτρο διάκρισης μεταξύ των διαφόρων μορφών της PrP27-30. Σύμφωνα με το πρωτόκολλο του Istituto Superiore di Sanita που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία, δείγμα PrP27-30 με **λόγο SAF84/P4 μεγαλύτερο του 2** χαρακτηρίζεται ύποπτο για τη Σπογγώδη Εγκεφαλοπάθεια των Βοοειδών και αναφέρεται στο Ευρωπαϊκό Εργαστήριο Αναφοράς για τις Μεταδοτικές Σπογγώδεις Εγκεφαλοπάθειες (VLA, Weybridge, Ηνωμένο Βασίλειο).

Παρομοίως, δείγμα με **μοριακό βάρος χαμηλότερο** από εκείνο του μάρτυρα της **Τρομώδους Νόσου** και με διαφορά **πάνω από 0,5 kDa** χαρακτηρίζεται επίσης ύποπτο για τη Σπογγώδη Εγκεφαλοπάθεια των Βοοειδών και αναφέρεται στο Ευρωπαϊκό Εργαστήριο Αναφοράς για τις Μεταδοτικές Σπογγώδεις Εγκεφαλοπάθειες (VLA, Weybridge, Ηνωμένο Βασίλειο).

Π.7. Στατιστική ανάλυση

Αρχικά εκτιμήθηκαν οι συχνότητες των αλληλομόρφων για τον πληθυσμό των υγιών και νοσούσων αιγών, ανά μέθοδο γονοτύπησης (ηλεκτροφόρηση σε τριχοειδές, DGGE) και για τις δύο φυλές αιγών. Ακολούθησε η δοκιμασία απόκλισης από τη γενετική ισορροπία (Hardy-Weinberg equilibrium) εξετάζοντας την υπόθεση ελλείμματος ετεροζυγωτών με εφαρμογή του score ή U test (Raymond and Rousset, 1995). Επιπλέον, πραγματοποιήθηκε έλεγχος στατιστικών διαφορών στις γονοτυπικές και αλληλομορφικές συχνότητες με εφαρμογή της δοκιμασίας του λόγου πιθανοφάνειας (G test) κατά την ανάλυση των πινάκων συνάφειας (Goudet et al., 1996). Η εκτίμηση των αλληλομορφικών συχνοτήτων, η δοκιμασία γενετικής ισορροπίας και η ανάλυση πινάκων συνάφειας έγινε με το πρόγραμμα Genepop v.4.0 (Raymond and Rousset, 1995; Rousset, 2007).

Η εκτίμηση του αριθμού των αποκλειστικών αλληλομόρφων (private alleles), της παραμέτρου F_{IS} του Wright ($F_{IS} = H_e - H_o / H_e = 1 - H_o / H_e$), της αναμενόμενης (H_e) και παρατηρούμενης (H_o) ετεροζυγωτίας διενεργήθηκε με το πρόγραμμα Genetic Data Analysis (Lewis and Zaykin, 2002). Αρνητικές και θετικές τιμές για την παράμετρο F_{IS} υποδηλώνουν αντίστοιχα έλλειμμα και περίσσεια ετεροζυγωτών γονοτύπων. Κατά τη διαδικασία εκτίμησης της παραμέτρου F_{IS} ήταν δυνατή η εκτίμηση διαστημάτων εμπιστοσύνης (99%) με εφαρμογή της τεχνικής της επαναδειγματοληψίας (bootstrapping) επιτρέποντας το στατιστικό έλεγχο για μηδενική ή μη τιμή.

III. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

III.1. Γονοτύπηση του Prnp γονιδίου

III.1.1. Γενικά

Η ανάλυση αλληλουχίας DNA (sequencing) με τη μέθοδο της ηλεκτροφόρησης σε τριχοειδές έγινε σε ολόκληρο το ανοιχτό αναγνωστικό πλαίσιο του Prnp γονιδίου για το σύνολο των υγιών αιγών και των αιγών με Τρομάδη Νόσο. Τριάντα τρεις (33) από τις 92 αίγες με Τρομάδη Νόσο και 77 από τις 127 υγιείς αίγες αναλύθηκαν πλήρως με αυτήν τη μέθοδο (πίνακας 7).

Τα υπόλοιπα δείγματα DNA ήταν ακατάλληλα και έγινε προσπάθεια να αναλυθούν με την αδρή μέθοδο DGGE, ενώ τα πλήρως αναλυμένα δείγματα χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες για το σχεδιασμό του πρωτοκόλλου της DGGE. Με το πρωτόκολλο αυτό αναλύθηκαν στη συνέχεια οι βιολογικά εκτρεφόμενες αίγες της εγχώριας φυλής και της φυλής Σκοπέλου.

Συνολικά 24 ιστοτεμάχια αιγών με Τρομάδη Νόσο ήταν έντονα αυτολυμένα και ήταν αδύνατον να γονοτυπηθούν με κάποια από τις δύο μεθόδους αλληλούχησης.

Πίνακας 7. Καταγραφή των δειγμάτων αιγών ανά μέθοδο αλληλούχησης του Prnp γονιδίου.

Πληθυσμοί αιγών	Μέθοδοι αλληλούχησης του Prnp γονιδίου		Δείγματα ακατάλληλα	Σύνολο αναλυμένων δειγμάτων
	Ηλεκτροφόρηση σε τριχοειδές	DGGE		
Με Τρομάδη Νόσο	33	35	24	68
Υγιείς	77	49	1	126
Εγχώριας φυλής	-	90	10	90
Φυλής Σκοπέλου	-	33	0	33

III.1.2. Ηλεκτροφόρηση σε τριχοειδές

Η αλληλούχηση με χρήση της ηλεκτροφόρησης σε τριχοειδές επέτρεψε την ανίχνευση σημειακών μεταλλάξεων σε 19 κωδικόνια. Στα 16 από αυτά παρατηρήθηκε αντικατάσταση αμινοξέος ενώ στα υπόλοιπα 3 κωδικόνια βρέθηκαν σιωπηλές μεταλλάξεις, χωρίς αντικατάσταση αμινοξέος. Στις 106 από τις 110 αίγες που αναλύθηκαν ανιχνεύθηκε η παρουσία των πέντε οκταπεπτιδικών επαναλήψεων μεταξύ των κωδικονίων 54 έως 102. Ενώ σε μια υγιή και τρεις αίγες με Τρομώδη Νόσο παρατηρήθηκε έλλειψη (deletion) νουκλεοτιδίων μεταξύ των κωδικονίων 70-77. Πρόκειται για την ύπαρξη τεσσάρων οκταπεπτιδικών επαναλήψεων, αντί των πέντε ή τριών που έχουν καταγραφεί έως σήμερα (Goldmann et al., 1998).

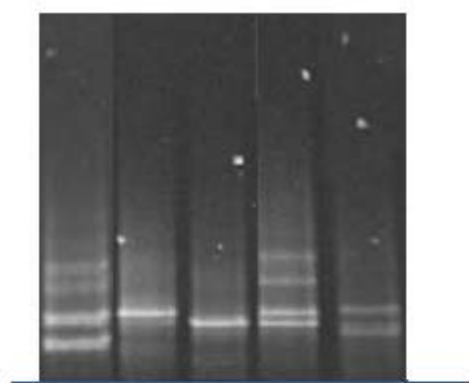
III.1.3. DGGE

Η διακριτική ικανότητα της DGGE, όπως προαναφέρθηκε, είναι μικρότερη από αυτή της αλληλούχησης και βασίζεται στα ευδιάκριτα πρότυπα ζωνών (patterns) ανά σημειακή μετάλλαξη εάν και εφόσον υπάρχουν. Ωστόσο η αξιοπιστία και η επαναληψιμότητα στην ταυτοποίηση γνωστών ευδιάκριτων πρότυπων ζωνών είναι υψηλή. Στην παρούσα μελέτη, αναζητήθηκαν τέτοια ευδιάκριτα πρότυπα, προκειμένου να προταθούν ως αξιόπιστοι «δείκτες» των πολυμορφισμών στα σημαντικότερα κωδικόνια της πρωτεΐνης p10n στις αίγες. Τα πρότυπα των ζωνών που προέκυψαν απεικονίζονται παρακάτω και βάσει αυτών έγινε η γονοτύπηση για το σύνολο των 207 δειγμάτων.

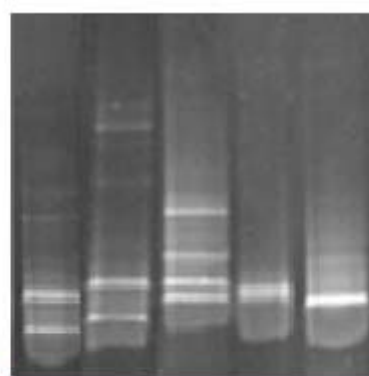
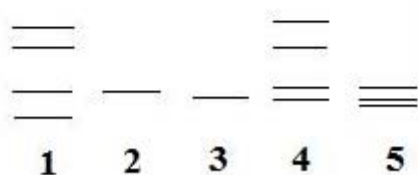
Συγκεκριμένα, στην καμπύλη τήξεως του α προϊόντος φαίνεται ότι η περιοχή ανάλυσης των ακολουθιών εκτείνεται μεταξύ 320 και 462bp, δηλαδή μεταξύ των κωδικονίων 106 έως 154 (σχήμα 10, A). Συνεπώς η διακριτική ικανότητα της DGGE για το α ΑΑΠ προϊόν περιορίζεται μεταξύ του 106 και 154 κωδικονίου, ενώ πριν από το 106 κωδικόνιο δεν λαμβάνεται πληροφορία. Από την DGGE ανάλυση του α προϊόντος προέκυψε ότι:

1. Οι μεταλλάξεις στα κωδικόνια 127 και 143 δεν ανιχνεύονταν, ενώ

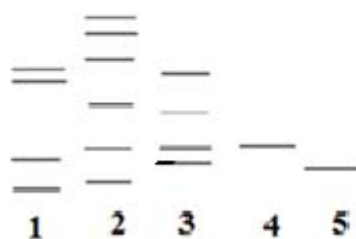
2. Η σιωπηλή μετάλλαξη στο κωδικόνιο 138 έδινε το πρότυπο 2 (cc), 3 (tt) ή 4 (ct). Πολλές φορές στο πρότυπο 4, οι δύο κατώτερες ζώνες διακρίνονταν έντονα στην πηκτή ενώ οι υψηλότερες μόλις που διακρίνονταν.



α DGGE pattern



β DGGE pattern



α DGGE απεικόνιση

πρότυπο 1: t138t, I142M

πρότυπο 2: A136A, R154R, t138t

πρότυπο 3: A136A, R154R, c138c

πρότυπο 4: A136A, c138t, R151H ή R154H

πρότυπο 5: A136A, R154R, N146S

β DGGE απεικόνιση

πρότυπο 1: P240S

πρότυπο 2: Q222K, R211Q

πρότυπο 3: Q222K, P240P

πρότυπο 4: S240S

πρότυπο 5: P240P

3. Οι σημειακές μεταλλάξεις στο κωδικόνιο 151 και 154 δεν έδωσαν χαρακτηριστική απεικόνιση στην ειδική πηκτή, καθώς συνέπιπταν με το πρότυπο 4, που σχετίζεται σαφέστατα με τη σιωπηλή μετάλλαξη (ct) στο 138 κωδικόνιο. Για τα δείγματα αυτά, έγινε ΑΑΠ με τους εκκινητές G1-G2 (πίνακας 6) και χρησιμοποιήθηκε το περιοριστικό ενζύμο *BspHI* για τη διάκριση τους με τη μέθοδο RFLP (σχήμα 9).

Στην καμπύλη τήξεως του β προϊόντος φαίνεται ότι το πεδίο ανάλυσης εκτείνεται μεταξύ 90 και 444bp, δηλαδή από το 178 έως το 256 κωδικόνιο (σχήμα 10, Γ). Συνεπώς η διακριτική ικανότητα της DGGE για το β ΑΑΠ προϊόν δεν δίνει στοιχεία από το 148 έως το 178 κωδικόνιο στην ειδική πηκτή, σε αντίθεση με τα κωδικόνια 211, 222, 240 όπου αντλείται πληροφορία. Αντιθέτως η σιωπηλή μετάλλαξη στο κωδικόνιο 238 δεν ανιχνεύθηκε στην ειδική πηκτή.

Συμπερασματικά με τον παρόντα σχεδιασμό της DGGE έγινε δυνατή η διάκριση σημειακών μεταλλάξεων που συνεπάγονται αντικατάσταση αμινοξέος στα κωδικόνια 142, 146, 151, 154, 211, 240 και της σιωπηλής μετάλλαξης στο κωδικόνιο 138.

III.2. Γενετική ανάλυση

III.2.1. Συχνότητες αλληλομόρφων και γονοτύπων – αποκλειστικά αλληλόμορφα

Οι συχνότητες των αλληλομόρφων και των γονοτύπων του *Prrp* γονιδίου για την ομάδα των υγιών και των προσβεβλημένων αιγών εκτιμήθηκαν χωριστά για τα δείγματα που γονοτυπήθηκαν με ηλεκτροφόρηση σε τριχοειδές και με DGGE. Στον πίνακα 8 παραθέτονται οι γονότυποι και οι σχετικές συχνότητες των αλληλομόρφων και των 19 πολυμορφικών κωδικονίων του *Prrp* γονιδίου που ανιχνεύθηκαν με ηλεκτροφόρηση σε τριχοειδές στις δύο ομάδες των αιγών. Στον πίνακα 10 παρουσιάζεται η κατανομή των γονοτύπων και των αλληλομόρφων των 5 πολυμορφικών κωδικονίων του *Prrp* γονιδίου που ανιχνεύθηκαν με DGGE στις υγιείς και στις νοσούσες αίγες. Στον πίνακα 12, παραθέτονται οι γονότυποι και οι

συχνότητες των αλληλομόρφων για τα 5 πολυμορφικά κωδικόνια του Prrp γονιδίου στην εγχώρια φυλή αίγας και στη φυλή Σκοπέλου. Τέλος, στον πίνακα 14 περιγράφονται τα αποκλειστικά αλληλόμορφα που παρατηρήθηκαν στις υγιείς και στις νοσούσες αίγες καθώς και στην εγχώρια ελληνική φυλή αίγας.

Σύμφωνα με τα στοιχεία του πίνακα 8, μεταξύ των δύο ομάδων αιγών δεν παρατηρήθηκαν στατιστικώς σημαντικές διαφορές των αλληλομορφικών συχνοτήτων τους, παρά μόνο για το κωδικόνιο 240 ($p=0,020$). Ενώ, μια τάση για γενετική διαφοροποίηση παρατηρήθηκε για τα κωδικόνια 8, 110 και 146 ($p<0,10$). Επίσης, στατιστικώς σημαντικές ήταν οι διαφορές των αλληλομορφικών συχνοτήτων για τις σιωπηλές μεταλλάξεις στα κωδικόνια 42 ($p=0,028$) και 138 ($p=0,011$). Για το σύνολο των 19 κωδικονίων που αναλύθηκαν με την ηλεκτροφόρηση σε τριχοειδές και στις δύο ομάδες αιγών, δεν παρατηρήθηκε διαφορά στις συχνότητες των αλληλομόρφων ($p=0,078$).

Στον πίνακα 10, όσον αφορά τη γονοτύπηση με DGGE, δεν παρουσιάζεται στατιστικώς σημαντική διαφορά των αλληλομορφικών συχνοτήτων τόσο για μεμονωμένα κωδικόνια, όσο και για το σύνολο των 5 κωδικονίων και για τις δύο ομάδες αιγών ($p=0,607$).

Στατιστικώς σημαντική διαφορά των αλληλομορφικών συχνοτήτων τόσο σε μεμονωμένα κωδικόνια, όσο και στο σύνολο των 5 κωδικονίων δεν υπήρξε και μεταξύ των δύο φυλών αιγών ($p=0,511$), όπως φαίνεται στον πίνακα 12.

Οι γονοτυπικές συχνότητες συνέπιπταν με τις αντίστοιχες αλληλομορφικές στις υγιείς αίγες και στις αίγες με Τρομώδη Νόσο, οι οποίες γονοτυπήθηκαν με ηλεκτροφόρηση σε τριχοειδές (πίνακας 8). Σημαντικές διαφορές παρατηρήθηκαν στις γονοτυπικές συχνότητες για το κωδικόνιο 240 ($p=0,016$) και για τις σιωπηλές μεταλλάξεις στα κωδικόνια 42 ($p=0,022$) και 138 ($p=0,009$). Για το σύνολο των 19 πολυμορφικών κωδικονίων και στις δύο ομάδες αιγών, δεν παρατηρήθηκαν γονοτυπικές διαφορές ($p=0,085$) στο όριο του $p<0,05$.

Στον πίνακα 10, για τις ομάδες των αιγών που αλληλουχήθηκαν με DGGE, δεν παρατηρήθηκαν στατιστικώς σημαντικές διαφορές στις γονοτυπικές συχνότητες. Ομοίως και για το σύνολο των 5 πολυμορφικών κωδικονίων και στις δύο ομάδες αιγών, δεν παρατηρήθηκαν γονοτυπικές διαφορές ($p=0,615$).

Στον πίνακα 12, στις γονοτυπικές συχνότητες, στατιστικώς σημαντικές διαφορές δεν παρατηρήθηκαν μεταξύ των δύο φυλών αιγών, σε κανένα από τα 5

κωδικόνια, εκτός από μια τάση για διαφοροποίηση στο κωδικόνιο 222 ($p < 0,10$). Για το σύνολο των 5 πολυμορφικών κωδικονίων και στις δύο ελληνικές φυλές αιγών, επίσης δεν παρατηρήθηκαν γονοτυπικές διαφορές ($p = 0,543$).

Στον πίνακα 14, οι αλληλομορφικές συχνότητες δεν διαφοροποιήθηκαν στατιστικώς σημαντικά μεταξύ των δύο ομάδων αιγών, όμως παρατηρήθηκαν αποκλειστικά αλληλόμορφα σε κάθε ομάδα. Τα αποκλειστικά αλληλόμορφα (private alleles) του Prnp γονιδίου που παρατηρήθηκαν στην ομάδα των 33 αιγών με Τρομάδη Νόσο που γονοτυπήθηκαν με ηλεκτροφόρηση σε τριχοειδές είναι:

- η αργινίνη (R) στο κωδικόνιο 8 (2 αίγες S8R ή με συχνότητα 3%)
- η ιστιδίνη (H) στο κωδικόνιο 151 (1 αίγα R151H ή με συχνότητα 1,5%) και
- η γλουταμίνη (Q) στο κωδικόνιο 211 (1 αίγα R211Q ή με συχνότητα 1,5%).

Αντίστοιχα, αποκλειστικά αλληλόμορφα που παρατηρήθηκαν στην ομάδα των 77 υγιών αιγών που αναλύθηκαν με ηλεκτροφόρηση σε τριχοειδές είναι:

- η μεθειονίνη (M) στο κωδικόνιο 11 (1 αίγα L11M ή με συχνότητα 0,6%)
- η βαλίνη (V) στο κωδικόνιο 37 (4 αίγες G37V ή με συχνότητα 2,6%)
- η προλίνη (P) στο κωδικόνιο 110 (7 αίγες T110P ή με συχνότητα 4,5%)
- η αργινίνη (R) στο κωδικόνιο 143 (3 αίγες H143R ή με συχνότητα 2%)
- η σερίνη (S) στο κωδικόνιο 146 (5 αίγες N146S και 1 αίγα S146S ή με συχνότητα 4,5%)
- η ασπαραγίνη (N) στο κωδικόνιο 173 (2 αίγες S173N ή με συχνότητα 1,3%)
- η φαινυλαλανίνη (F) στο κωδικόνιο 239 (1 αίγα F239F ή με συχνότητα 1,3%)
- η κυτοσίνη (c) αντί της θυμίνης (t) στο κωδικόνιο 238 [1 αίγα με 171 ($ttt \rightarrow ttc$) ή με συχνότητα 0,6%] (πίνακας 14).

Στις 49 υγιείς αίγες που αναλύθηκαν με DGGE, αποκλειστικά αλληλόμορφα παρατηρήθηκαν μόνο για:

- τη μεθειονίνη (M) στο κωδικόνιο 142 (2 αίγες I142M ή με συχνότητα 2%)
- τη σερίνη (S) στο κωδικόνιο 146 (3 αίγες N146S ή με συχνότητα 3,1%) και
- τη λυσίνη (K) στο κωδικόνιο 222 (3 αίγες P222K ή με συχνότητα 3,1%)

Τέλος για τις δύο ελληνικές φυλές αιγών, αποκλειστικά αλληλόμορφα παρατηρήθηκαν μόνο στις αίγες της εγχώριας ελληνικής φυλής για:

- τη μεθειονίνη (M) στο κωδικόνιο 142 (1 αίγα I142M ή με συχνότητα 0,5%) και τη γλουταμίνη (Q) στο κωδικόνιο 211 (3 αίγες R211Q ή με συχνότητα 1,6%).

III.2.2. Έλεγχος ισορροπίας κατά Hardy-Weinberg

Η δοκιμασία απόκλισης από τη γενετική ισορροπία (Hardy-Weinberg equilibrium) έγινε για κάθε κωδικόνιο του Prnp γονιδίου σε κάθε ομάδα και φυλή αιγών και αντίστοιχα για το σύνολο των κωδικονίων του Prnp γονιδίου. Για το λόγο αυτό, εξετάστηκε η υπόθεση του ελλείμματος ετεροζυγωτών ατόμων με τον υπολογισμό του βαθμού ετεροζυγωτίας και της παραμέτρου F_{IS} του Wright. Στον πίνακα 9 δίδεται ο βαθμός αναμενόμενης (H_e) και παρατηρούμενης (H_o) ετεροζυγωτίας, ο συντελεστής F_{IS} του Wright και γίνεται έλεγχος ισορροπίας κατά Hardy-Weinberg για τον πληθυσμό των υγιών και νοσούσων αιγών που γονοτυπήθηκαν με ηλεκτροφόρηση σε τριχοειδές. Ομοίως, στον πίνακα 11, υπολογίζονται οι ίδιες παράμετροι για τον πληθυσμό των υγιών και προσβεβλημένων αιγών που γονοτυπήθηκαν με DGGE. Τέλος η απόκλιση από τη γενετική ισορροπία εκτιμήθηκε για τις δύο ελληνικές φυλές αιγών και παραθέεται στον πίνακα 13.

Στον πίνακα 9 φαίνεται ότι στις δύο ομάδες αιγών και για όλα σχεδόν τα κωδικόνια, ο παρατηρούμενος (H_o) βαθμός ετεροζυγωτίας δεν διέφερε από τον αναμενόμενο (H_e), ο οποίος εκτιμάται με βάση τις συχνότητες των αλληλομόρφων υπό καθεστώς γενετικής ισορροπίας. Ως εκ τούτου, ο πληθυσμός των αιγών με Τρομάδη Νόσο ($p=0,3768$) και των υγιών αιγών ($p=0,1994$) βρέθηκε σε γενετική ισορροπία. Ενώ, κατά την ενδελεχή ανάλυση εντός εκάστου των 19 κωδικονίων παρατηρήθηκε ότι:

- α) στον πληθυσμό των αιγών με Τρομάδη Νόσο παρατηρήθηκε έλλειμμα ετεροζυγωτών ατόμων για το κωδικόνιο 240 και για τις σιωπηλές μεταλλάξεις στα κωδικόνια 42 και 138. Σε αντίθεση με τον πληθυσμό των υγιών αιγών που για τους ίδιους νουκλεοτιδικούς πολυμορφισμούς υπήρξε περίσσεια ετεροζυγωτών ατόμων.
- β) Για το κωδικόνιο 239, ο πληθυσμός των υγιών αιγών βρέθηκε σε γενετική ανισορροπία ($p=0,0065$) λόγω της απουσίας ετεροζυγωτών ατόμων, ενώ

γ) αντιθέτως για το κωδικόνιο 168, ο πληθυσμός των αιγών με Τρομώδη Νόσο βρέθηκε σε γενετική ανισορροπία ($p=0,0153$) λόγω της απουσίας ετεροζυγωτών ατόμων.

Σύμφωνα με τα στοιχεία του πίνακα 11, ο πληθυσμός των υγιών αιγών βρισκόταν σε γενετική ισορροπία ($p=0,0696$), ενώ εκείνος των αιγών με Τρομώδη Νόσο ήταν σε ανισορροπία κατά Hardy-Weinberg ($p=0,0009$). Έλλειμμα ετεροζυγωτών ατόμων παρατηρήθηκε για το κωδικόνιο 240 τόσο στην ομάδα των υγιών ($p=0,0014$) όσο και των αιγών με Τρομώδη Νόσο ($p=0,0003$).

Τέλος, ο πίνακας 13 δείχνει ότι οι πληθυσμοί και των δύο φυλών αιγών ήταν σε γενετική ανισορροπία ($p<0,001$). Στατιστικώς σημαντικό έλλειμμα ετεροζυγωτών γονοτύπων παρατηρήθηκε για το κωδικόνιο 240 και το 138 ($p<0,001$) και στις δύο φυλές αιγών.

III.2.3. Συνδυασμένοι γονότυποι της PrP

Οι συνδυασμένοι γονότυποι της πρώιμης PrP που ταυτοποιήθηκαν στις υπό μελέτη υγείες και με Τρομώδη Νόσο αίγες παραθέτονται στους πίνακες 15 και 17 για κάθε μέθοδο γονοτύπησης. Στους πίνακες 16 και 18, παραθέτονται οι συνδυασμένοι γονότυποι της PrP που κωδικεύουν τις ώριμες πρωτεΐνες prion βάση του υποθετικού μοντέλου ωρίμανσης ή αλλιώς τις ‘ώριμες’ πρωτεΐνες prion (μετά από την αποκοπή ολιγοπεπτιδίων πριν το κωδικόνιο 23 και μετά το κωδικόνιο 232), οι οποίες υπάρχουν στην κυτταρική μεμβράνη και σχετίζονται με την παθογένεια της Τρομώδους Νόσου.

Στον πίνακα 15 παραθέτονται οι 32 συνδυασμένοι γονότυποι της πρώιμης PrP βάσει της ηλεκτροφόρησης σε τριχοειδές και αφορούν σε 33 αίγες με Τρομώδη Νόσο και 77 υγείες αίγες. Στη συνέχεια, στον πίνακα 16 φαίνονται οι 22 συνδυασμένοι γονότυποι που κωδικεύουν ‘ώριμες’ πρωτεΐνες prion, οι οποίοι προκύπτουν από την απαλοιφή των πολυμορφικών κωδικονίων 8, 11, 239 και 240.

Αντίστοιχα, στον πίνακα 17 βάσει της DGGE δίνονται οι 8 συνδυασμένοι γονότυποι της πρώιμης PrP, οι οποίοι αφορούν σε 35 αίγες με Τρομώδη Νόσο και σε

49 υγιείς αίγες. Στον πίνακα 18, μετά από την εξαίρεση του κωδικονίου 240, αυτοί οι 8 συνδυασμένοι γονότυποι εκτιμάται ότι αντιστοιχούν σε 4 ‘ώριμες’ πρωτεΐνες prion.

Ο πιο συχνός συνδυασμένος γονότυπος στις δύο ομάδες των αιγών ήταν ο γονότυπος 1 του πίνακα 16 και του πίνακα 18 που αντιστοιχεί στον ‘άγριο τύπο’. Συνδυασμένοι γονότυποι, που να διαφοροποιούνται στατιστικώς σημαντικά, δεν αναδείχτηκαν στις υγιείς ή στις νοσούσες αίγες, παρά μόνο αποκλειστικά αλληλόμορφα που παρατηρήθηκαν στη μία ή στην άλλη ομάδα αιγών.

Πίνακας 8 (Α, Β). Κατανομή αλληλομόρφων (σχετικές συχνότητες σε παρένθεση) και γονοτύπων των πολυμορφικών κωδικονίων του Prrp γονιδίου σε νοσούσες και υγιείς αίγες (τιμές *p*: επίπεδο σημαντικότητας διαφορών αλληλομορφικών/γονοτυπικών συχνοτήτων) (**ηλεκτροφόρηση σε τριχοειδές**).

A		κωδικόνιο 8			κωδικόνιο 11			κωδικόνιο 37			κωδικόνιο 110		
		Αλληλόμορφα	S	R	<i>p</i>	L	M	<i>p</i>	G	V	<i>p</i>	T	P
Ομάδα αιγών	Νοσούσες	64 (97%)	2 (3%)	0,088	66 (100%)	0	1	66 (100%)	0	0,319	66 (100%)	0	0,105
	Υγιείς	154 (100%)	0		153 (99,3%)	1 (0,7%)		150 (97,4%)	4 (2,6%)		147 (95,4%)	7 (4,6%)	
		SS	SR	<i>p</i>	LL	LM	<i>p</i>	GG	GV	<i>p</i>	TT	TP	<i>p</i>
Ομάδα αιγών	Νοσούσες	31	2	0,088	33	0	1	33	0	0,314	33	0	0,100
	Υγιείς	77	0		76	1		73	4		70	7	
		κωδικόνιο 127			κωδικόνιο 142			κωδικόνιο 143			κωδικόνιο 151		
		Αλληλόμορφα	G	S	<i>p</i>	I	M	<i>p</i>	H	R	<i>p</i>	R	H
Ομάδα αιγών	Νοσούσες	64 (97%)	2 (3%)	1	65 (98,5%)	1 (1,5%)	1	66 (100%)	0	0,367	65 (98,5%)	1 (1,5%)	0,300
	Υγιείς	149 (96,7%)	5 (3,3%)		153 (99,3%)	1 (0,7%)		151 (98%)	3 (2%)		154 (100%)	0	
		GG	GS	<i>p</i>	II	IM	<i>p</i>	HH	HR	<i>p</i>	RR	RH	<i>P</i>
Ομάδα αιγών	Νοσούσες	31	2	1	32	1	1	33	0	0,3639	32	1	0,299
	Υγιείς	72	5		76	1		74	3		77	0	
		κωδικόνιο 154			κωδικόνιο 173			κωδικόνιο 211			κωδικόνιο 222		
		Αλληλόμορφα	R	H	<i>p</i>	S	N	<i>p</i>	R	Q	<i>p</i>	Q	K
Ομάδα αιγών	Νοσούσες	62 (94%)	4 (6%)	0,727	66 (100%)	0	0,577	65 (98,5%)	1 (1,5%)	0,300	65 (98,5%)	1 (1,5%)	1
	Υγιείς	140 (95,9%)	6 (4,1%)		152 (98,7%)	2 (1,3%)		154 (100%)	0		151 (98%)	3 (2%)	
		RR	RH	<i>p</i>	SS	SN	<i>p</i>	RR	RQ	<i>p</i>	QQ	QK	<i>P</i>
Ομάδα αιγών	Νοσούσες	29	4	0,721	33	0	0,576	32	1	0,300	32	1 (;)	1
	Υγιείς	67	6		75	2		77	0		74	3	

B⁴		κωδικόνιο 146			κωδικόνιο 168			κωδικόνιο 239			κωδικόνιο 240						
Αλληλόμορφα		N	S	<i>p</i>	P	Q	<i>p</i>	S	F	<i>p</i>	S	P	<i>p</i>				
Ομάδα αιγών	Νοσούσες	66 (100%)	0	0,106	64 (97%)	2 (3%)	0,511	66 (100%)	0	0,578	15 (22,7%)	51 (77,3%)	0,02				
	Υγιείς	147 (95,4%)	7 (4,6%)		145 (94,2%)	9 (5,8%)		152 (98,7%)	2 (1,3%)		60 (39%)	94 (61%)					
Γονότυποι		NN	NS	SS	<i>p</i>	PP	PQ	QQ	<i>p</i>	SS	SF	FF	<i>p</i>	SS	PS	PP	<i>p</i>
Ομάδα αιγών	Νοσούσες	33	0	0	0,157	32	0	1	0,5	33	0	0	1	3	9	21	0
	Υγιείς	71	5	1		68	9	0		76	0	1		8	44	25	
Αλληλόμορφα		κωδικόνιο 42 ^a			κωδικόνιο 138 ^a			κωδικόνιο 238 ^a			για το σύνολο των 19 κωδικονίων και για τις δύο ομάδες αιγών						
Ομάδα αιγών	Νοσούσες	g	a	<i>p</i>	c	t	<i>p</i>	t	c	<i>p</i>	Αλληλόμορφα		Γονότυποι				
	Υγιείς	51 (77,3%)	15 (22,7%)	0,028	15 (19,7%)	51 (80,3%)	0,011	66 (100%)	0	1							
Γονότυποι	gg	ga	aa		<i>p</i>	cc		ct	tt		<i>p</i>	tt	tc	cc	<i>p</i>	<i>p</i>	0,078
Ομάδα αιγών	Νοσούσες	21	9	3	0,022	3	7	23	0	33	0	0	1				
	Υγιείς	24	42	7		7	42	26		76	1	0					

α: σιωπηλή μετάλλαξη

⁴ Στον υποπίνακα Β, καταγράφονται τα κωδικόνια που εμφάνισαν και τους 3 γονότυπους (αντί των 2 γονοτύπων όπως απεικονίζονται στον υποπίνακα Α) που προκύπτουν από τον συνδυασμό των 2 αλληλομόρφων τους καθώς και οι σιωπηλές μεταλλάξεις που παρατηρήθηκαν σε 3 κωδικόνια του Ρηηγ γονιδίου. Στον πίνακα Α, με (:) σημειώνεται η αίγα που βρέθηκε θετική στην ταχεία μέθοδο και αρνητική στην ανοσοκαθίλωση για την Τρομόδη Νόσο.

Πίνακας 9. Αναμενόμενος (He), παρατηρούμενος (Ho) βαθμός ετεροζυγωτίας, συντελεστής F_{IS} του Wright και επίπεδο σημαντικότητας [HWE (p)] δοκιμασίας απόκλισης από τη γενετική ισορροπία ανά κωδικόνιο και ομάδα αιγών (ηλεκτροφόρηση σε τριχοειδές).

Ομάδα αιγών	κωδικόνιο	He	Ho	F_{IS}	HWE (p)	Ομάδα αιγών	κωδικόνιο	He	Ho	F_{IS}	HWE (p)
	8	0	0	0	-		8	0,059	0,060	-0,016	1
	11	0,013	0,013	0	-		11	0	0	0	-
	37	0,051	0,052	-0,020	1		37	0	0	0	-
	110	0,087	0,091	-0,041	1		110	0	0	0	-
	127	0,063	0,065	-0,021	1		127	0,059	0,060	-0,016	1
	142	0,013	0,013	0	-		142	0,030	0,030	0	-
	143	0,038	0,039	-0,013	1		143	0	0	0	-
	146	0,087	0,065	0,258	0,132		146	0	0	0	-
Υγιείς	151	0	0	0	-	Νοσούσες	151	0,030	0,030	0	-
	154	0,079	0,082	-0,036	1		154	0,115	0,121	-0,049	1
	168	0,111	0,117	-0,055	1		168	0,059	0	1	0,015
	173	0,026	0,027	-0,006	1		173	0	0	0	-
	211	0	0	0	-		211	0,030	0,030	0	-
	222	0,038	0,038	-0,013	1		222	0,030	0,030	0	-
	239	0,025	0	1	0,006		239	0	0	0	-
	240	0,478	0,571	-0,195	0,098		240	0,356	0,272	0,238	0,309
	42 ^α	0,476	0,575	-0,210	0,086		42 ^α	0,356	0,272	0,238	0,308
	138 ^α	0,471	0,56	-0,190	0,137		138 ^α	0,321	0,212	0,343	0,077
238 ^α	0,013	0,013	0	-	238 ^α	0	0	0	-		
μ.ο.	0,109	0,122	-0,121 [-0,179, +0,107] ^β	0,376	μ.ο.	0,076	0,059	0,229 [-0,021, +0,399] ^β	0,199		

α: σιωπηλή μετάλλαξη, β: διάστημα εμπιστοσύνης (99%)

Πίνακας 10. Κατανομή αλληλομόρφων (σχετικές συχνότητες σε παρένθεση) και γονοτύπων και των 5 πολυμορφικών κωδικονίων του Prrp γονιδίου σε νοσούσες και υγιείς αίγες (τιμές *p*: επίπεδο σημαντικότητας διαφορών αλληλομορφικών/γονοτυπικών συχνοτήτων) (**DGGE**).

		κωδικόνιο 142			κωδικόνιο 146			κωδικόνιο 222			κωδικόνιο 240			
Αλληλόμορφα		I	M	<i>p</i>	N	S	<i>p</i>	Q	K	<i>p</i>	S	P	<i>p</i>	
Ομάδα αιγών	Νοσούσες	70 (100%)	0	0,511	70 (100%)	0	0,267	70 (100%)	0	0,266	19 (27%)	51 (73%)	0,718	
	Υγιείς	96 (97,9%)	2 (2,1%)		95 (96,9%)	3 (3,1%)		95 (96,9%)	3 (3,1%)		23 (76,5%)	75 (23,5%)		
	Γονότυποι	II	IM	<i>p</i>	NN	NS	<i>p</i>	QQ	QK	<i>p</i>	SS	PS	PP	<i>p</i>
Ομάδα αιγών	Νοσούσες	35	0	0,507	35	0	0,216	35	0	0,262	7	5	23	0,774
	Υγιείς	47	2		46	3		46	3		7	9	33	
		κωδικόνιο 138 ^α			για το σύνολο των 5 κωδικονίων και για τις δύο ομάδες αιγών									
Αλληλόμορφα		c	t	<i>p</i>	Αλληλομορφα		Γονότυποι							
Ομάδα αιγών	Νοσούσες	24 (34,3%)	46 (65,7%)	0,628	<i>p</i>		0,607		0,615					
	Υγιείς	38 (38,7%)	60 (61,2%)											
	Γονότυποι	cc	ct	tt	<i>p</i>									
Ομάδα αιγών	Νοσούσες	2	20	13	1									
	Υγιείς	10	18	21										

α: σιωπηλή μετάλλαξη

Πίνακας 11. Αναμενόμενος (He), παρατηρούμενος (Ho) βαθμός ετεροζυγωτίας, συντελεστής F_{IS} του Wright και επίπεδο σημαντικότητας [HWE (p)] δοκιμασίας απόκλισης από τη γενετική ισορροπία ανά κωδικόνιο και ομάδα αιγών (**DGGE**).

Ομάδα αιγών	κωδικόνιο	He	Ho	F_{IS}	HWE (p)	Ομάδα αιγών	κωδικόνιο	He	Ho	F_{IS}	HWE (p)
	142	0,040	0,040	-0,010	1		142	0	0	0	-
	146	0,059	0,061	-0,021	1		146	0	0	0	-
Υγιείς	222	0,059	0,061	-0,021	1	Νοσούσες	222	0	0	0	-
	240	0,363	0,183	0,496	0,001		240	0,401	0,142	0,647	0,0003
	138 ^α	0,479	0,367	0,236	0,133		138 ^α	0,457	0,571	-0,254	0,255
μ.ο.		0,200	0,142	0,289 [-0,021, +0,476] ^β	0,069	μ.ο.		0,171	0,143	0,169 [-0,254, +0,647] ^β	0,0009

α: σιωπηλή μετάλλαξη, β: διάστημα εμπιστοσύνης (99%)

Πίνακας 12. Κατανομή αλληλομόρφων (σχετικές συχνότητες σε παρένθεση) και γονοτύπων των πολυμορφικών κωδικονίων του Rprp γονιδίου ανά φυλή αιγών (τιμές *p*: επίπεδο σημαντικότητας διαφορών αλληλομορφικών/γονοτυπικών συχνοτήτων).

		κωδικόνιο 142			κωδικόνιο 211			κωδικόνιο 222			κωδικόνιο 240			
Αλληλόμορφα		I	M	<i>p</i>	R	Q	<i>p</i>	Q	K	<i>p</i>	S	P	<i>p</i>	
Φυλή αίγας	Σκοπέλου	66 (100%)	0	1	66 (100%)	0	0,566	64 (97%)	2 (3%)	0,075	17 (25,8%)	49 (74,2%)	0,35	
	Εγχώρια	179 (99,4%)	1 (0,6%)		177 (98,3%)	3 (1,7%)		162 (90%)	18 (10%)		59 (32,8%)	121 (67,2%)		
Γονότυποι		II	IM	<i>p</i>	RR	RQ	<i>p</i>	QQ	QK	<i>p</i>	SS	PS	PP	<i>p</i>
Φυλή αίγας	Σκοπέλου	33	0	1	33	0	0,563	31	2	0,064	7	3	23	0,471
	Εγχώρια	89	1		87	3		72	18		22	15	53	
		κωδικόνιο 138 ^a			για το σύνολο των 5 κωδικονίων και για τις δύο φυλές αιγών									
Αλληλόμορφα		c	t	<i>p</i>				Αλληλόμορφα		Γονότυποι				
Φυλή αίγας	Σκοπέλου	27 (37,8%)	39 (62,2%)	0,661										
	Εγχώρια	68 (37,8%)	112 (62,2%)											
Γονότυποι		cc	ct	tt	<i>p</i>	0,511	0,543							
Φυλή αίγας	Σκοπέλου	8	11	14	0,69									
	Εγχώρια	17	34	39										

a: σιωπηλή μετάλλαξη

Πίνακας 13. Αναμενόμενος (He), παρατηρούμενος (Ho) βαθμός ετεροζυγωτίας, συντελεστής F_{IS} του Wright και επίπεδο σημαντικότητας [HWE (p)] δοκιμασίας απόκλισης από τη γενετική ισορροπία ανά κωδικόνιο και φυλή αιγών.

Φυλή αίγας	κωδικόνιο	He	Ho	F_{IS}	HWE (p)	Φυλή αίγας	κωδικόνιο	He	Ho	F_{IS}	HWE (p)
	142	0,011	0,011	0	-		142	0	0	0	-
	211	0,032	0,033	-0,01	1		211	0	0	0	-
Εγγώρια	222	0,181	0,200	-0,105	1	Σκοπέλου	222	0,059	0,060	-0,083	1
	240	0,443	0,166	0,625	<0,001		240	0,388	0,090	0,768	<0,001
	138^α	0,472	0,377	0,201	0,072		138^α	0,490	0,333	0,324	0,0792
μ.ο.		0,228	0,157	0,309 [-0,092, 0,588] ^β	<0,001	μ.ο.		0,187	0,096	0,487 [-0,015, 0,768] ^β	0,0002

α: σιωπηλή μετάλλαξη, β: διάστημα εμπιστοσύνης (99%)

Πίνακας 14. Περιγραφή και συχνότητα αποκλειστικών αλληλομόρφων (private alleles) ανά μέθοδο ανάλυσης και ανά ομάδα αιγών.

Μέθοδος ανάλυσης αλληλουχίας DNA	Κωδικόνιο	Αλληλόμορφο	Συχνότητα	Ομάδα αιγών
DGGE	142	M	0,020	Υγιείς
	146	S	0,031	Υγιείς
	222	K	0,031	Υγιείς
Ηλεκτροφόρηση σε τριχοειδές	*8	R	0,030	Νοσούσες
	151	H	0,015	Νοσούσες
	211	Q	0,015	Νοσούσες (:)
	*11	M	0,006	Υγιείς
	37	V	0,026	Υγιείς
	110	P	0,045	Υγιείς
	143	R	0,020	Υγιείς
	146	S	0,045	Υγιείς
	*173	N	0,013	Υγιείς
	*239	F	0,013	Υγιείς
*238 ^a	c	0,006	Υγιείς	
DGGE	142	M	0,005	Εγχώριας φυλής
	211	Q	0,016	Εγχώριας φυλής

α: σιωπηλή μετάλλαξη, (:): αίγα που βρέθηκε θετική στην ταχεία δοκιμή και αρνητική στην ανοσοκαθήλωση για την Τρομάδη Νόσο

*: πολυμορφισμοί της PrP που αναφέρονται πρώτη φορά στις αίγες.

Πίνακας 15. Κατανομή των συνδυασμένων γονοτύπων της PrP στις νοσούσες και υγιείς αίγες (ηλεκτροφόρηση σε τριχοειδές).

Γονότυπος	Κωδικόνια																Αριθμός αιγών ανά γονότυπο	
	8	11	37	110	127	142	143	146	151	154	168	173	211	222	239	240	Νοσούσες	Υγιείς
1	SR	LL	GG	TT	GG	II	HH	NN	RR	RR	PP	SS	RR	QQ	SS	PP	2	0
2	SS	LL	GG	TP	GG	II	HH	NN	RR	RR	PP	SS	RR	QK	SS	PP	0	1
3	SS	LL	GG	TP	GG	II	HH	NN	RR	RR	PP	SS	RR	QQ	SS	PS	0	5
4	SS	LL	GG	TP	GG	II	HH	NN	RR	RR	PQ	SS	RR	QQ	SS	PS	0	1
5	SS	LL	GG	TT	GG	II	HH	NN	RH	RR	PP	SS	RR	QQ	SS	PS	1	0
6	SS	LL	GG	TT	GG	II	HH	NN	RR	RH	PP	SS	RR	QQ	SS	PS	2	3
7	SS	LL	GG	TT	GG	II	HH	NN	RR	RH	PP	SS	RR	QQ	SS	SS	1	2
8	SS	LL	GG	TT	GG	II	HH	NN	RR	RR	PP	SN	RR	QQ	SS	PP	0	1
9	SS	LL	GG	TT	GG	II	HH	NN	RR	RR	PP	SS	RQ	QK	SS	SS	1 (;	0
10	SS	LL	GG	TT	GG	II	HH	NN	RR	RR	PP	SS	RR	QK	SS	PS	0	2
11	SS	LL	GG	TT	GG	II	HH	NN	RR	RR	PP	SS	RR	QQ	FF	SS	0	1
12	SS	LL	GG	TT	GG	II	HH	NN	RR	RR	PP	SS	RR	QQ	SS	PP	17	12
13	SS	LL	GG	TT	GG	II	HH	NN	RR	RR	PP	SS	RR	QQ	SS	PS	5	24
14	SS	LL	GG	TT	GG	II	HH	NN	RR	RR	PP	SS	RR	QQ	SS	SS	1	3
15	SS	LL	GG	TT	GG	II	HH	NN	RR	RR	PQ	SN	RR	QQ	SS	PP	0	1
16	SS	LL	GG	TT	GG	II	HH	NN	RR	RR	PQ	SS	RR	QQ	SS	PP	0	2
17	SS	LL	GG	TT	GG	II	HH	NN	RR	RR	PQ	SS	RR	QQ	SS	PS	0	3
18	SS	LL	GG	TT	GG	II	HH	NN	RR	RR	QQ	SS	RR	QQ	SS	PP	1	0
19	SS	LL	GG	TT	GG	II	HH	NS	RR	RR	PP	SS	RR	QQ	SS	PP	0	2
20	SS	LL	GG	TT	GG	II	HH	NS	RR	RR	PP	SS	RR	QQ	SS	PS	0	2
21	SS	LL	GG	TT	GG	II	HH	NS	RR	RR	PQ	SS	RR	QQ	SS	PP	0	1
22	SS	LL	GG	TT	GG	II	HH	SS	RR	RR	PP	SS	RR	QQ	SS	PP	0	1
23	SS	LL	GG	TT	GG	II	HR	NN	RR	RH	PP	SS	RR	QQ	SS	PS	0	1
24	SS	LL	GG	TT	GG	II	HR	NN	RR	RR	PP	SS	RR	QQ	SS	PP	0	1
25	SS	LL	GG	TT	GG	II	HR	NN	RR	RR	PP	SS	RR	QQ	SS	PS	0	1
26	SS	LL	GG	TT	GS	II	HH	NN	RR	RH	PP	SS	RR	QQ	SS	PS	1	0
27	SS	LL	GG	TT	GS	II	HH	NN	RR	RR	PP	SS	RR	QQ	SS	PP	0	2
28	SS	LL	GG	TT	GS	IM	HH	NN	RR	RR	PP	SS	RR	QQ	SS	PP	1	1
29	SS	LL	GV	TT	GG	II	HH	NN	RR	RR	PP	SS	RR	QQ	SS	SS	0	1
30	SS	LL	GV	TT	GS	II	HH	NN	RR	RR	PP	SS	RR	QQ	SS	PS	0	1
31	SS	LL	GV	TT	GS	II	HH	NN	RR	RR	PP	SS	RR	QQ	SS	SS	0	1
32	SS	ML	GV	TT	GG	II	HH	NN	RR	RR	PP	SS	RR	QQ	SS	PS	0	1
Σύνολο (n)																	33	77

(;): η αίγα που βρέθηκε θετική στην ταχεία μέθοδο και αρνητική στην ανοσοκαθίλωση για την Τρομάδη Νόσο.

Πίνακας 16. Κατανομή των συνδυασμένων γονοτύπων της PrP στις νοσούσες και υγιείς αίγες (ηλεκτροφόρηση σε τριχοειδές) που κωδικεύουν διαφορετικές ‘ώριμες’ πρωτεΐνες prion.

Γονότυπος	Κωδικόνια												Αριθμός αιγών ανά γονότυπο		
	37	110	127	142	143	146	151	154	168	173	211	222	Νοσούσες	Υγιείς	
1	GG	TT	GG	II	HH	NN	RR	RR	PP	SS	RR	QQ	25	40	
2	GG	TP	GG	II	HH	NN	RR	RR	PP	SS	RR	QK	0	1	
3	GG	TP	GG	II	HH	NN	RR	RR	PP	SS	RR	QQ	0	5	
4	GG	TP	GG	II	HH	NN	RR	RR	PQ	SS	RR	QQ	0	1	
5	GG	TT	GG	II	HH	NN	RH	RR	PP	SS	RR	QQ	1	0	
6	GG	TT	GG	II	HH	NN	RR	RH	PP	SS	RR	QQ	3	5	
7	GG	TT	GG	II	HH	NN	RR	RR	PP	SN	RR	QQ	0	1	
8	GG	TT	GG	II	HH	NN	RR	RR	PP	SS	RQ	QK	1 (;	0	
9	GG	TT	GG	II	HH	NN	RR	RR	PP	SS	RR	QK	0	2	
10	GG	TT	GG	II	HH	NN	RR	RR	PQ	SN	RR	QQ	0	1	
11	GG	TT	GG	II	HH	NN	RR	RR	PQ	SS	RR	QQ	0	5	
12	GG	TT	GG	II	HH	NN	RR	RR	<u>QQ</u>	SS	RR	QQ	<u>I</u>	0	
13	GG	TT	GG	II	HH	NS	RR	RR	PP	SS	RR	QQ	0	4	
14	GG	TT	GG	II	HH	NS	RR	RR	PQ	SS	RR	QQ	0	1	
15	GG	TT	GG	II	HH	SS	RR	RR	PP	SS	RR	QQ	0	1	
16	GG	TT	GG	II	HR	NN	RR	RH	PP	SS	RR	QQ	0	1	
17	GG	TT	GG	II	HR	NN	RR	RR	PP	SS	RR	QQ	0	2	
18	GG	TT	GS	II	HH	NN	RR	RH	PP	SS	RR	QQ	1	0	
19	GG	TT	GS	II	HH	NN	RR	RR	PP	SS	RR	QQ	0	2	
20	GG	TT	GS	IM	HH	NN	RR	RR	PP	SS	RR	QQ	1	1	
21	GV	TT	GS	II	HH	NN	RR	RR	PP	SS	RR	QQ	0	2	
22	GV	TT	GG	II	HH	NN	RR	RR	PP	SS	RR	QQ	0	2	
													Σύνολο (n)	33	77

(;): η αίγα που βρέθηκε θετική στην ταχεία μέθοδο και αρνητική στην ανοσοκαθήλωση για την Τρομάδη Νόσο.

Πίνακας 17. Κατανομή των συνδυασμένων γονοτύπων της PrP στις νοσούσες και υγιείς αίγες (**DGGE**).

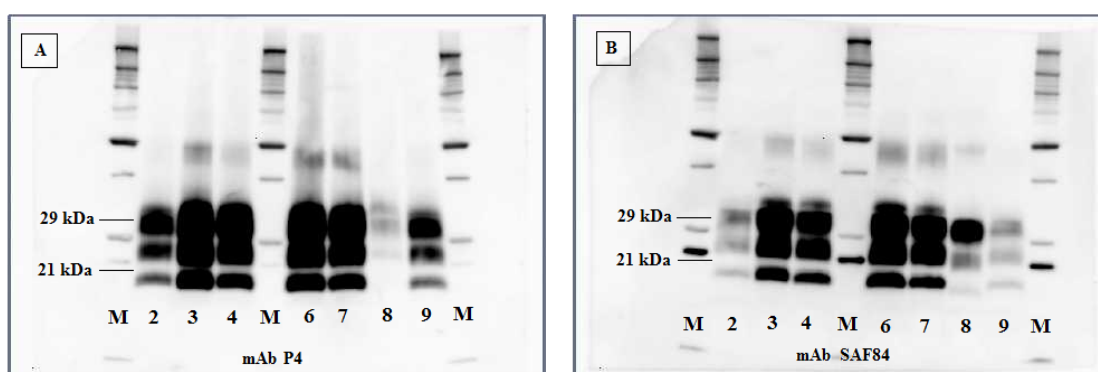
Γονότυπος	Κωδικόνια							Αριθμός αιγών ανά γονότυπο	
	142	146	151	154	211	222	240	Νοσούσες	Υγιείς
1	II	NN	RR	RR	RR	QK	PP	0	3
2	II	NN	RR	RR	RR	QQ	PP	23	29
3	II	NN	RR	RR	RR	QQ	PS	5	7
4	II	NN	RR	RR	RR	QQ	SS	7	5
5	II	NS	RR	RR	RR	QQ	PS	0	2
6	II	NS	RR	RR	RR	QQ	SS	0	1
7	IM	NN	RR	RR	RR	QQ	PP	0	1
8	IM	NN	RR	RR	RR	QQ	SS	0	1
Σύνολο (n)								35	49

Πίνακας 18. Κατανομή των συνδυασμένων γονοτύπων της PrP^c στις νοσούσες και υγιείς αίγες (**DGGE**) που κωδικεύουν διαφορετικές ‘ώριμες’ πρωτεΐνες prion.

Γονότυπος	Κωδικόνια							Αριθμός αιγών ανά γονότυπο	
	142	146	151	154	211	222	Νοσούσες	Υγιείς	
1	II	NN	RR	RR	RR	QQ	35	41	
2	II	NN	RR	RR	RR	QK	0	3	
3	II	NS	RR	RR	RR	QQ	0	3	
4	IM	NN	RR	RR	RR	QQ	0	2	
Σύνολο (n)								35	49

III.3. Ανοσοκαθήλωση

Όλα τα ομογενοποιημένα δείγματα μετά από την επώαση τους με πρωτεΐνάση-K έδωσαν το χαρακτηριστικό πρότυπο των τριών ζωνών της PrP^{Sc} (γλυκοτύπος), που αντιστοιχούν από πάνω προς κάτω στο διγλυκοσυλιωμένο –μονογλυκοσυλιωμένο και μη γλυκοσυλιωμένο κλάσμα της (σχήμα 13).



Σχήμα 13 (A, B). Western blot της PrP^{Sc} αιγών με Κλασική Τρομάδη Νόσο με τη χρήση των μονοκλωνικών αντισωμάτων P4 (A) και SAF84 (B). Σε κάθε μεμβράνη αναλύονται, με τη βοήθεια δείκτη μοριακών βαρών (M), απομονώσεις από αίγες εκτρεφόμενες στην Ελλάδα (2, 3, 4), εκτρεφόμενες στην Ιταλία (6, 7, 9) και ένα περιστατικό πειραματικής Σπογγώδους Εγκεφαλοπάθειας των Βοοειδών σε πρόβατο (8).

Οι απομονώσεις-δείγματα της PrP^{Sc} έδειξαν μεγαλύτερη συνάφεια με το μονοκλωνικό αντίσωμα P4 σε σύγκριση με το SAF84 και έδωσαν εντονότερο φθορισμό (σχήμα 13A-B, διαδρομή 2,3,4). Η πρωτεΐνη της πειραματικής Σπογγώδους Εγκεφαλοπάθειας των Βοοειδών σε πρόβατο ανιχνεύθηκε ασθενώς με το P4, σε σύγκριση με το SAF84 (σχήμα 13A-B, διαδρομή 8), σε αντίθεση με τη φυσική Σπογγώδη Εγκεφαλοπάθεια των Βοοειδών, όπου το αντίσωμα P4 δεν εμφανίζει συνάφεια με την PrP^{BSE} (Nonno et al., 2003). Σε δύο δείγματα, η επώαση με το αντίσωμα SAF84 έδωσε ασθενές σήμα φθορισμού. Σε αυτή την περίπτωση προηγήθηκε ένα στάδιο κατακρήμνισης της πρωτεΐνης και συμπύκνωση της PrP^{Sc} και η δοκιμή επαναλήφθηκε. Έτσι, το χαρακτηριστικό πρότυπο της PrP^{Sc} της Κλασικής Τρομάδους Νόσου επιβεβαιώθηκε και στα 15 δείγματα με τη χρήση και των δύο μονοκλωνικών αντισωμάτων.

Οι μοριακές μάζες των ζωνών μετρήθηκαν με βάση τις κεντρικές θέσεις τού μη γλυκοσυλιωμένου κλάσματος και του δείκτη των μοριακών μαζών. Όπως φαίνεται και στις φωτογραφίες, από πάνω προς τα κάτω, οι ζώνες της πρωτεΐνης αντιστοιχούν σε

περίπου 30, 27 και 18-19kDa για τα δείγματα της Κλασικής Τρομώδους Νόσου με τη χρήση και των δύο μονοκλωνικών αντισωμάτων. Αντιθέτως, με τη χρήση του SAF84, το μη γλυκοσυλιωμένο κλάσμα της PrP27-30 στο μάρτυρα της Σπογγώδους Εγκεφαλοπάθειας των Βοοειδών σε πρόβατο ήταν περίπου 1kDa χαμηλότερα από το αντίστοιχο της Τρομώδους Νόσου (σχήμα 13B, διαδρομή 8) και κυμάνθηκε μεταξύ 17-18kDa.

Η ένταση του φθορισμού μεταξύ των δειγμάτων διέφερε, αλλά σε όλες τις περιπτώσεις ήταν χαρακτηριστική εκείνης των τριών μαρτύρων, που προερχόταν από αίγες με Κλασική Τρομώδη Νόσο που εκτρέφονταν στην Ιταλία (σχήμα 13A-B, διαδρομή 6,7,9). Ο λόγος της έντασης φθορισμού στις μεμβράνες με κάθε αντίσωμα ή αλλιώς ο λόγος SAF84/P4 στα δείγματα των αιγών με Κλασική Τρομώδη Νόσο κυμάνθηκε σταθερά περί τη μονάδα (1), ενώ στην πειραματική Σπογγώδη Εγκεφαλοπάθεια των Βοοειδών σε πρόβατο ήταν 5,8 (τυπική απόκλιση $\pm 0,86$).

Ο γλυκοτύπος καθορίστηκε από τις σχετικές εντάσεις του διγλυκοσυλιωμένου, μονογλυκοσυλιωμένου και μη γλυκοσυλιωμένου κλάσματος της PrP27-30, όπως αποκαλύπτονται με το SAF84. Αυτός αναλύθηκε με την ψηφιακή καταγραφή του χημειοφθορισμού και μετρήθηκε μετά από ανάλυση όγκου με το λογισμικό QuantityOne (BIO-RAD). Η αναλογία του διγλυκοσυλιωμένου και μονογλυκοσυλιωμένου κλάσματος της PrP27-30 για τα ελληνικά και ιταλικά δείγματα-απομονώσεις της Κλασικής Τρομώδους Νόσου κυμάνθηκε στα ίδια επίπεδα και συγκεκριμένα μεταξύ 57:30 και 62:29, ενώ για την πειραματική Σπογγώδη Εγκεφαλοπάθεια των Βοοειδών σε πρόβατο ήταν 81:15.

Η αποκοπή της PrP^{Sc} μετά από την επώαση της με πρωτεΐνωση-K, τα μοριακά βάρη της PrP27-30, ο λόγος SAF84/P4 και ο καθορισμός του γλυκοτύπου επέτρεψαν τον πρόδρομο ανοσοβιοχημικό χαρακτηρισμό των ελληνικών απομονώσεων της παθολογικής πρωτεΐνης prion από αίγες με Κλασική Τρομώδη Νόσο και τη σύγκριση τους με αντίστοιχες ιταλικές απομονώσεις.

IV. ΣΧΟΛΙΑΣΜΟΣ

IV.1. Νουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί του Prrp γονιδίου στις υπό μελέτη υγιείς και με Τρομώδη Νόσο αίγες

Η γενετική ανάλυση των υπό μελέτη αιγών ανέδειξε τη μεγάλη παραλλακτικότητα του γονιδίου της πρωτεΐνης prp10n σε αυτές. Παρατηρήθηκαν πολυμορφισμοί οι οποίοι καταγράφονται και από άλλους ερευνητές στα κωδικόνια 37, 110, 127, 142, 146, 151, 154, 168, 211, 222, 240 καθώς και σιωπηλές μεταλλάξεις στα κωδικόνια 42 και 138 (πίνακας 2). Αντιθέτως, πολυμορφισμοί στα κωδικόνια 21, 23, 49 και 220 που έχουν καταγραφεί σε αίγες της ελληνικής εγχώριας φυλής δεν παρατηρήθηκαν (Billinis et al., 2002).

Από την παρούσα έρευνα αναδείχτηκαν νέοι πολυμορφισμοί που οδήγησαν σε αντικατάσταση αμινοξέος στα κωδικόνια 8 (S8R), 11 (L11M) και 173 (S173N) του Prrp γονιδίου της αίγας. Πρώτη φορά καταγράφηκαν άτομα που έφεραν σε ομοζυγωτία το αλληλόμορφο της γλουταμίνης στο κωδικόνιο 168 (Q18Q) και της φαινυλαλανίνης στο κωδικόνιο 239 (F239F). Επίσης, πρώτη φορά βρέθηκε η σιωπηλή μετάλλαξη στο κωδικόνιο 238 (ttc αντί tt). Πρόκειται για σπάνια αλληλόμορφα που παρατηρήθηκαν σε μεμονωμένα ζώα και η παρουσία τους επαληθεύτηκε με την επανεξέταση των δειγμάτων, για την αποφυγή σφαλμάτων κατά τη γονοτύπηση. Τέλος, πρώτη φορά στις αίγες καταγράφηκε η παρουσία μιας έλλειψης 24bp μεταξύ των κωδικονίων 70 και 77 του Prrp γονιδίου, που αντιστοιχεί στην εμφάνιση τεσσάρων οκταπεπτιδικών επαναλήψεων αντί των τριών (Goldmann et al., 1998) ή των πέντε που έχουν καταγραφεί μεταξύ των κωδικονίων 54 έως 102.

Η αντικατάσταση της ισολευκίνης (I) από θρεονίνη (T) στο κωδικόνιο 142 (Acutis et al., 2008), της ασπαραγίνης (N) από ασπαρτικό οξύ (D) στο κωδικόνιο 146 (Papasavva et al., 2007) και της γλουταμίνης (Q) από γλυκίνη (G) στο κωδικόνιο 211 (Zhou et al., 2008) δεν παρατηρήθηκαν στις αίγες της παρούσας μελέτης. Ιδιαίτερη έμφαση δόθηκε στα κωδικόνια 142, 146, 151, 154, 211 και 222, στα οποία η παρουσία πολυμορφισμών έχει συσχετιστεί έντονα με την ευαισθησία στην Τρομώδη Νόσο των αιγών (Goldmann et al., 1996; Papasavva-Stylianou et al., 2007; Billinis et al., 2002; Acutis et al., 2006;

Vaccari et al., 2006; Colussi et al., 2008) και που ταυτοποιήθηκαν με το πρωτόκολλο της DGGE που αναπτύχθηκε.

IV.2. Συσχέτιση πολυμορφισμών της PrP με την Κλασική Τρομώδη Νόσο στις υπό μελέτη αίγες

Στην παρούσα μελέτη, αποκλειστικά αλληλόμορφα του Prnp γονιδίου βρέθηκαν στις αίγες με Τρομώδη Νόσο στα κωδικόνια 8, 151 και 211.

Από αυτά, η συχνότητα του ‘ευαίσθητου’ γονοτύπου R151H ήταν 0,030 στις υπό μελέτη αίγες με Τρομώδη Νόσο, ενώ στις αντίστοιχες νοσούσες Κυπριακές αίγες κυμάνθηκε στο 0,049 (Papasanva-Stylianou et al., 2007). Εκτιμάται λοιπόν ότι το πολυμορφικό κωδικόνιο 151 της PrP πιθανά να σχετίζεται με την ευαισθησία στην Τρομώδη Νόσο.

Αντιθέτως, η σημασία των αποκλειστικών αλληλομόρφων R8 και Q211 φαίνεται να είναι περιορισμένη. Αφενός γιατί το κωδικόνιο 8 αποκόπτεται από την πολυπεπτιδική αλυσίδα της πρωτεΐνης prion κατά την ωρίμαση της και άρα απουσιάζει από την παθολογική πρωτεΐνη prion. Αφετέρου γιατί ο γονότυπος R211Q καταγράφηκε στην παρούσα μελέτη- μαζί με τον Q222K- σε μόνο μία αίγα για την οποία η τελική διάγνωση της Τρομώδους Νόσου ήταν αμφίβολη. Η αίγα αυτή βρέθηκε θετική στην ταχεία δοκιμή και αρνητική στην ανοσοκαθίλωση για την Τρομώδη Νόσο. Μεσολάβησε ένα στάδιο κατακρήμνισης της πρωτεΐνης για τη βελτιστοποίηση της ανοσοκαθίλωσης και στην επανεξέταση το δείγμα χαρακτηρίστηκε πάλι ως αρνητικό. Πρόκειται για δείγμα εγκεφάλου από την περιοχή του προμήκους μυελού που ανήκει σε αίγα ηλικίας 36 μηνών, χωρίς κλινική νόσηση. Το δείγμα σκοπίμως περιγράφεται στην παρούσα έρευνα ως ‘θετικό’ στην Τρομώδη Νόσο (συμβολίζεται με ένα ;) στους πίνακες) και ο τελικός χαρακτηρισμός του εξαρτάται από τα πορίσματα της βιολογικής δοκιμής (bioassay), καθώς έχει ενοφθαλμιστεί σε διαγονιδιακά Tg338 ποντίκια και μένει να εκτιμηθεί η παρουσία ή όχι του μολυσματικού παράγοντα prion.

Στη γονοτύπηση με ηλεκτροφόρηση σε τριχοειδές, τα αποκλειστικά αλληλόμορφα του πληθυσμού των υγιών αιγών αφορούσαν τα κωδικόνια 11, 37, 110, 143, 146, 173, 239 και το κωδικόνιο 238. Τα πολυμορφικά κωδικόνια 11 και 239 δύσκολα σχετίζονται με την

ανθεκτικότητα στην Τρομώδη Νόσο, καθώς αποκóπτονται κατά την ωρίμαση της PrP^C, όπως συμβαίνει και για τα κωδικόνια 8 και 240. Επίσης, ασύνδετη με το νόσημα είναι η σιωπηλή μετάλλαξη στο κωδικόνιο 238, που βρέθηκε σε μία αίγα.

Η συχνότητα του αλληλομόρφου της βαλίνης (V) στο κωδικόνιο 37 ήταν 0,026 στις υγιείς αίγες της παρούσας μελέτης. Αντιθέτως, οι Vaccari et al. 2006 και Acutis et al., 2006, αναφέρουν συχνότητες του 0,056 τόσο σε υγιείς όσο και σε νοσούσες αίγες.

Οι γονοτυπικές συχνότητες του T110P μεταξύ των δύο ομάδων αιγών εμφάνισαν μια τάση γενετικής διαφοροποίησης ($p=0,1058$) στην παρούσα μελέτη και η συχνότητα του T110P ήταν 0,090 στις υγιείς αίγες. Ο διμορφισμός T110P καταγράφηκε πρώτη φορά στις αίγες της φυλής Ionica από τους Agrimi et al., 2003 και από τότε έχει ταυτοποιηθεί μόνο σε υγιή ζώα σε συχνότητες της τάξης του 0,028 (Acutis et al., 2006) και 0,065 (Vaccari et al., 2006). Ωστόσο, πρόκειται για μικρές γονοτυπικές συχνότητες που δεν διαφοροποιούνται στατιστικώς σημαντικά μεταξύ των δύο ομάδων αιγών και δεν μπορεί να εκτιμηθεί η σχέση τους στην εμφάνιση της Τρομώδους Νόσου.

Το αλληλόμορφο της αργινίνης (R) στο κωδικόνιο 143 εμφανίστηκε σε συχνότητα 0,020 στον παρόντα υγιή πληθυσμό των αιγών, όπως αναφέρουν και οι Billinis et al., 2002. Αντιθέτως, οι Acutis et al., 2006, αναφέρουν συχνότητες του 0,076 τόσο σε υγιείς όσο και σε νοσούσες αίγες.

Επίσης ο διμορφισμός N146S βρέθηκε μόνο στις υγιείς αίγες σε ποσοστό 6,5% και 6,1%, βάσει της ανάλυσης με ηλεκτροφόρηση σε τριχοειδές και με DGGE αντίστοιχα. Η συχνότητα του N146S ήταν σημαντικά υψηλότερη στις Κυπριακές αίγες που υπολογίστηκε στο 15,6% των υγιών αιγών (Papasavva-Stylianou et al., 2007). Η εμφάνιση της σερίνης (S) στο κωδικόνιο 146, που οι Papasavva-Stylianou et al., 2007 εκτιμούν ότι επιδρά θετικά στην ανθεκτικότητα έναντι της Τρομώδους Νόσου στην αίγα, παρατηρήθηκε σε ετεροζυγωτία σε συνολικά 8 υγιείς και σε ομοζυγωτία σε 1 υγιή αίγα. Ενώ η αντικατάσταση της ασπαργίνης (N) από ασπαρτικό οξύ (D) στο κωδικόνιο 146 δεν παρατηρήθηκε στις αίγες που μελετήθηκαν.

Η ύπαρξη του αλληλομόρφου της ιστιδίνης (H) στο κωδικόνιο 154 παρατηρήθηκε και στις δύο ομάδες ζώων και δεν ήταν δυνατόν να συνδεθεί με μερική προστασία έναντι της νόσου όπως προτάθηκε αρχικά από τους Billinis et al., 2002. Επίσης, το αλληλόμορφο H154 δεν ήταν δυνατόν να συσχετιστεί με την Άτυπη Τρομώδη Νόσο στις αίγες σύμφωνα με τους Colussi et al., 2008; Seuberlich et al., 2007 και Bouzalas et al., 2008 μιας και δεν υπήρχαν ανάλογα περιστατικά στα δείγματα εγκεφάλου που μας παραχωρήθηκαν.

Η αντικατάσταση της γλουταμίνης (Q) από λυσίνη (K) στο κωδικόνιο 222, με εξαίρεση την ‘ύποπτη’ αίγα που είχε και R211Q, βρέθηκε στο 3,9% και 6,1% των υγιών αιγών της παρούσας μελέτης, βάσει της ανάλυσης με ηλεκτροφόρηση σε τριχοειδές και με DGGE. Στις ιταλικές φυλές αιγών, ο διμορφισμός Q222K βρέθηκε στο 16,4% (Acutis et al., 2006) και 21,3% (Vaccari et al., 2006; Agrimi et al., 2003) των υγιών ζώων και εκτιμάται ότι πιθανά προσδίδει ανθεκτικότητα των αιγών στην Κλασική Τρομάδη Νόσο.

Παρομοίως, ο πολυμορφισμός P168Q στην παρούσα μελέτη παρατηρήθηκε μόνο στις υγιείς αίγες σε ποσοστό 11,7% και σε ομοζυγωτία Q168Q μόνο σε μία αίγα με Τρομάδη Νόσο. Ο πολυμορφισμός έχει παρατηρηθεί και στα πρόβατα όπου η προλίνη (P) αντικαθίσταται από λευκίνη (L) και σχετίζεται με επιμήκυνση της περιόδου επώασης της Τρομάδους Νόσου (Baylis and Goldmann, 2004). Στη διεθνή βιβλιογραφία, υπάρχουν αναφορές για την παρουσία του P168Q είτε μόνο σε υγιείς (Billinis et al., 2002) είτε και σε προσβεβλημένες αίγες (Acutis et al., 2006; Papasavva-Stylianou et al., 2007). Παρόλα αυτά, οι συχνότητες του P168Q και στις δύο ομάδες αιγών είναι αμελητέες και η επίδραση του κωδικονίου 168 στην εμφάνιση της Τρομάδους Νόσου μελετάται ακόμα.

Στη διεθνή βιβλιογραφία, η αντικατάσταση της ισολευκίνης (I) από μεθειονίνη (M) στο κωδικόνιο 142 συνδέεται με επιμήκυνση της περιόδου επώασης της νόσου. Η συχνότητα του αλληλόμορφου M στο κωδικόνιο 142 ήταν 0,015 στις αίγες με Τρομάδη Νόσο και έως 0,007 στα υγιή ζώα. Παρόμοιες συχνότητες της τάξης του 0,020 αναφέρονται και στις Ιταλικές φυλές αιγών (Acutis et al., 2006) ενώ τα αντίστοιχα ποσοστά ήταν 0,284 για τις αίγες του Ηνωμένου Βασιλείου (Goldmann et al., 2004). Στην παρούσα μελέτη ο διμορφισμός I142M δεν ήταν δυνατόν να συσχετιστεί με παρατεταμένη περίοδο επώασης της Τρομάδους Νόσου καθώς βρέθηκε σε 4 υγιείς αίγες και σε μία θετική αίγα 3 ετών. Η συγκεκριμένη αίγα δεν ήταν η γηραιότερη με Τρομάδη Νόσο ενώ η ηλικία της συνέπιπτε με το μέσο όρο που εμφάνισε το σύνολο των ασθενών αιγών της παρούσας μελέτης.

Όλες οι αίγες που γονοτυπήθηκαν στην παρούσα μελέτη βρέθηκαν ομοζύγωτες στην αλανίνη (A) για το κωδικόνιο 136 και στη γλουταμίνη (Q) για το κωδικόνιο 171 του Prip γονιδίου. Στα πρόβατα, ο γονότυπος AA₁₃₆QQ₁₇₁ θεωρείται ο «άγριος» γονότυπος που εμφανίζεται τόσο σε υγιή όσο και σε νοσούντα ζώα, ενώ ο Q171Q σχετίζεται με αυξημένη ευαισθησία στην Τρομάδη Νόσο. Κατά αντιστοιχία στις αίγες, όπως επιβεβαιώθηκε και από την παρούσα έρευνα, ο γονότυπος AA₁₃₆QQ₁₇₁ παρατηρήθηκε τόσο σε υγιή όσο και σε νοσούντα ζώα.

Επίσης για το κωδικόνιο 240, που δεν φαίνεται να συνδέεται με την εμφάνιση της Τρομάδους Νόσου, αναφέρεται ότι ο γονότυπος P240P παρατηρήθηκε σε ποσοστό 50% (σε 102/201 ζώα) των αιγών της παρούσας μελέτης. Η αντίστοιχη συχνότητα ήταν 44% στις αίγες του Ηνωμένου Βασιλείου (Goldmann et al., 1996;2004) και 61,2% στις Κυπριακές αίγες (Papasavva-Stylianou et al., 2007). Ενώ, η συχνότητα του P240P της παρούσας έρευνας διαφοροποιείται σημαντικά από εκείνη του 90% που αναφέρουν οι Billinis et al., 2002.

Τέλος πρώτη φορά καταγράφεται στις αίγες η έλλειψη της οκταπεπτιδικής (PHGGGWGQ) επανάληψης από το κωδικόνιο 70 έως 77 του Prnp γονιδίου. Οι Goldmann et al., 1998 ανέφεραν σε υγιείς αίγες την έλλειψη δύο οκταπεπτιδικών επαναλήψεων μεταξύ των κωδικονίων 63 και 78, σε συνδυασμό με την εμφάνιση της γλυκίνης (G) στο κωδικόνιο 102, που δεν παρατηρήθηκε στην παρούσα μελέτη. Αντιθέτως παρατηρήθηκαν κυρίως οι πέντε οκταπεπτιδικές επαναλήψεις μεταξύ των κωδικονίων 52 και 102, όπως αναφέρουν άλλοι ερευνητές (Billinis et al., 2002; Acutis et al., 2006; Vaccari et al., 2006; Papasavva-Stylianou et al., 2007; Seuberlich et al., 2007; Kurosaki et al., 2005; Sofianidis et al., 2006; 2008). Η παρουσία τεσσάρων οκταπεπτιδικών επαναλήψεων έχει καταγραφεί σε έναν άνθρωπο με νόσο CJD από τους Palmer et al., 1993 και Cervenakova et al., 1994, χωρίς να έχει μελετηθεί η σημασία της. Στην παρούσα μελέτη, η τετραπλή επανάληψη του οκταπεπτιδίου παρατηρήθηκε τόσο σε υγιείς όσο και σε νοσούσες αίγες και σε περιορισμένο αριθμό που δεν επέτρεψε στατιστικώς την αξιολόγηση της.

IV.3. Νουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί του Prnp γονιδίου στις υπό μελέτη ελληνικές φυλές αιγών

Στην παρούσα μελέτη, οι δύο ελληνικές φυλές αιγών, εγχώρια και Σκοπέλου, εμφάνισαν κατά προσέγγιση τις ίδιες συχνότητες αλληλομόρφων και ιδιαίτερα για τα κωδικόνια 146, 151, 154, ενώ για το 222 παρατηρήθηκε μια τάση διαφοροποίησης ($p < 0,10$) (πίνακας 12). Οι δύο πληθυσμοί των αιγών βρέθηκαν σε γενετική ανισορροπία και παρατηρήθηκε έλλειμμα ετεροζυγωτών ατόμων, που πιθανά οφείλεται στο συνδυασμό της εμφάνισης ομομειξίας λόγω των μη τυχαίων συζεύξεων μεταξύ των ζώων.

Η παρουσία των αλληλομόρφων προλίνης (P) και σερίνης (S) στο κωδικόνιο 240 στις ελληνικές φυλές αιγών παρατηρήθηκε στην παρούσα μελέτη, σύμφωνα και με την πρώτη αναφορά των Billinis et al., 2002, ενώ έχει παρατηρηθεί και στις Κυπριακές (Papasanva-Stylianou et al., 2007), στις Ιταλικές (Acutis et al., 2008), στις Κινέζικες (Zhou et al., 2008; Zhang et al., 2004) και στις Ιαπωνικές (Kurosaki et al., 2005) φυλές αιγών. Ο γονότυπος S240S, που αποτελεί τον 'άγριο-τύπο' της PrP των προβάτων, εμφανίστηκε και στις δύο ελληνικές φυλές αιγών σε συχνότητα περίπου 22% ενώ υπερίσχυσε ο γονότυπος P240P, με συχνότητα 59% για την εγχώρια και 69,7% για την φυλή Σκοπέλου. Τέλος στις δύο ελληνικές φυλές αιγών παρατηρήθηκε η σιωπηλή μετάλλαξη στο κωδικόνιο 138 (*agc*→*agt*) με την ίδια συχνότητα για τα δύο αλληλόμορφα (περί το 40% για το c και 60% για το t), και με την ίδια συχνότητα για τους ομόζυγους γονότυπους (43% για το agt) όπως παρατηρήθηκε και στις ιταλικές φυλές αιγών (41,6%) (Acutis et al., 2008).

Η εγχώρια ελληνική φυλή αίγας σε σύγκριση με τη φυλή Σκοπέλου, φάνηκε να μοιάζει γενετικά περισσότερο με τις Νότιες Ιταλικές φυλές αιγών (Garganica, Ionica, Maltese και Mediterranea Rossa) όσο αφορά τις συχνότητες των αλληλομόρφων στο κωδικόνιο 222 του γονιδίου της πρωτεΐνης prion. Πιο συγκεκριμένα, στην εγχώρια ελληνική φυλή αίγας παρατηρήθηκε το αλληλόμορφο της λυσίνης (K) στο κωδικόνιο 222, που σχετίζεται με ανθεκτικότητα στην Τρομάδη Νόσο, σε συχνότητα 10% ενώ η αντίστοιχη συχνότητα στις Νότιες Ιταλικές φυλές αιγών ήταν 15,7%. Στη φυλή Σκοπέλου η συχνότητα του K222 ήταν 3%, δηλαδή παρόμοια με την αντίστοιχη στις Βόρειες Ιταλικές φυλές αιγών που ήταν 2,8% (Acutis et al., 2008). Αντιθέτως για το αλληλόμορφο Q211, η εγχώρια ελληνική φυλή εμφάνισε συχνότητα 1,7% που παρατηρείται στις Βόρειες Ιταλικές φυλές αιγών (Camosciata dell'Alpi, Roccaverano, Valdostana) και στις

οποίες έχει μεγαλύτερη συχνότητα της τάξης του 11,8% (Acutis et al., 2008). Αντίστοιχα, στις Νότιες Ιταλικές φυλές και στη φυλή Σκοπέλου η συχνότητα του αλληλόμορφου Q211 ήταν μηδενική.

Τέλος, η ανθεκτικότητα/ευαισθησία των δύο ελληνικών φυλών αίγας στην Τρομώδη Νόσο θα μπορούσε να εκτιμηθεί αν υπήρχαν νοσούντα και αντίστοιχα υγιή ζώα και από τις δύο φυλές αλλά και από ίδιες περιοχές, ώστε να αναφέρονται πιθανά σε κοινό στέλεχος του μολυσματικού παράγοντα και σε όμοιο διαχειριστικό σύστημα των ζώων. Αντιθέτως στα πρόβατα, οι γονότυποι που σχετίζονται με ευαισθησία στην Τρομώδη Νόσο δεν εμφανίστηκαν σε όλες τις φυλές στο ίδιο ποσοστό. Υπάρχουν φυλές προβάτων στις οποίες εμφανίζονται σε πολύ μικρό ποσοστό ή δεν εμφανίζονται καθόλου, όπως στην Ελληνική φυλή προβάτου Χίου (Ekateriniadou et al., 2007a) και άλλες φυλές, όπως Cheviot, Texel, Dorset στις οποίες εμφανίστηκαν σε ποσοστά της τάξεως του 5 με 8% (Hunter et al., 1994; Baylis and Goldmann, 2004).

Μέχρι σήμερα υπάρχουν αναφορές για προσβολή από την Τρομώδη Νόσο των αιγών που ανήκουν στις φυλές Ionica, Saanen, Δαμασκού, Camosciata dell' Alpi, Maltese, African dwarf, Anglo-Nubian, Toggenburg, Angora και Alpine, στην εγχώρια ελληνική φυλή καθώς και σε διασταυρώσεις αυτών (Agrimi et al., 2003; Acutis et al., 2006; Papasavva-Stylianou et al., 2007; Vaccari et al., 2006; Foster et al., 2001b; Goldmann, 1996, 2008; Billinis et al., 2002; Sofianidis et al., 2006, 2008).

IV.4. Πρωτόκολλο DGGE για την ανεύρεση των σημαντικότερων μεμονωμένων νουκλεοτιδικών πολυμορφισμών του Prnp γονιδίου στις αίγες

Η DGGE έχει χρησιμοποιηθεί για την ανάλυση αλληλουχίας του ORF του Prnp γονιδίου στον άνθρωπο (Fink et al., 1991; 1994), στα πρόβατα (Laplanche et al., 1993; Belt et al., 1995; Thorgeirsdottir et al., 1999; Παπασάββα-Στυλιανού, 2003) αλλά και στις αίγες (Papasanna-Stylianou et al., 2007). Πρόκειται για γρήγορη και αξιόπιστη μέθοδο για την ανίχνευση συγκεκριμένων νουκλεοτιδικών πολυμορφισμών του Prnp γονιδίου. Δεν απαιτείται δαπανηρός εξοπλισμός και αναλώσιμα για την εφαρμογή της, ενώ οι χρήστες της μεθόδου μπορούν να εκπαιδευτούν χωρίς ιδιαίτερη δυσκολία.

Το πρωτόκολλο της DGGE που αναπτύχθηκε στην παρούσα έρευνα αποσκοπούσε στην ανίχνευση όσο το δυνατόν περισσότερων νουκλεοτιδικών πολυμορφισμών του Prnp γονιδίου και ιδιαίτερα στα κωδικόνια 142, 146, 151, 154 και 222 τα οποία σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, έχουν συσχετιστεί με την ευαισθησία των αιγών στην Τρομάδη Νόσο (Goldmann et al., 1996; Papasanna-Stylianou et al., 2007; Billinis et al., 2002; Acutis et al., 2006; Vaccari et al., 2006; Colussi et al., 2008).

Αρχικά, εκτιμήθηκε αν η ενίσχυση όλου του ORF σε μία ΑΑΠ και η ανάλυση του στη DGGE θα μπορούσε να αξιοποιηθεί στις αίγες. Σύμφωνα με τους Laplanche et al., 1993; Belt et al., 1995 και Thorgeirsdottir et al., 1999 η αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση ενός προϊόντος 800bp που αντιστοιχεί σε ολόκληρο το ORF του Prnp, επέτρεπε την ανίχνευση των πολυμορφικών κωδικονίων 136, 137, 138, 151, 154 και 171 στα πρόβατα. Στην περίπτωση ωστόσο του Prnp γονιδίου της αίγας, τα κωδικόνια 136, 137, 138 και 171 δεν παρουσιάζουν έντονο πολυμορφισμό και η παραπάνω επιλογή δεν κρίθηκε ικανοποιητική. Από την άλλη πλευρά, οι Papasanna-Stylianou et al., 2007 με τη μέθοδο DGGE στις αίγες, ανέλυσαν ένα προϊόν ΑΑΠ από το κωδικόνιο 72 έως 215 του Prnp γονιδίου (τροποποιημένο από Laplanche et al., 1993) και κατάφεραν να μελετήσουν τα πολυμορφικά κωδικόνια 146, 151, 154 και 168. Η ανάλυση αλληλουχιών DNA με ηλεκτροφόρηση σε τριχοειδές, που προηγήθηκε της DGGE, ανέδειξε τα πολυμορφικά κωδικόνια που αναμένονταν στο παρόντα πληθυσμό αιγών. Αυτά εκτείνονταν και μετά το κωδικόνιο 168, και συγκεκριμένα εκτιμήθηκε ότι το κωδικόνιο 211 και 222 έπρεπε να μελετηθούν, για αυτό το λόγο έγινε νέος σχεδιασμός των προϊόντων της ΑΑΠ που θα αναλύονταν με την DGGE.

Επιλέχθηκε η ανάλυση των τμημάτων α και β , με βάση την καμπύλη τήξεως τους. Το τμήμα α εκτείνεται από το νουκλεοτίδιο -24 έως 460 του ORF του Prip γονιδίου και δίνει πληροφορία μέχρι και το 154 κωδικόνιο. Το πεδίο ανάλυσης του τμήματος β , εκτείνεται μεταξύ των νουκλεοτιδίων 327 και 771 και έδωσε ευδιάκριτα πρότυπα ζωνών για τα κωδικόνια 211, 222 και 240. Αυτή η δυνατότητα δεν υπήρχε με την ανάλυση ολόκληρου του ORF, καθώς στα περισσότερα δείγματα οι ζώνες συνέπιπταν σε μια ή τα πρότυπα των ζωνών δεν μπορούσαν να συσχετιστούν αξιόπιστα με κάποιο πολυμορφισμό.

Με τον παρόντα σχεδιασμό της DGGE έγινε δυνατή η διάκριση πολυμορφισμών σε περισσότερα κωδικόνια που σχετίζονται με ανθεκτικότητα/ευαισθησία στην Τρομάδη Νόσο της αίγας, όπως τα κωδικόνια 142, 146, 151, 154, 222 και το 211, 240 καθώς και η σιωπηλή μετάλλαξη στο κωδικόνιο 138.

Οι πολυμορφισμοί στα κωδικόνια 127, 143 και 168 δεν ανιχνεύθηκαν στην ειδική πηκτή, πιθανά γιατί συνέπιπταν τα ετεροδιμερή τους με εκείνα άλλων πολυμορφικών κωδικονίων. Στην περίπτωση αυτή εμφανίζονταν πολλαπλές ζώνες υπό τη μορφή επιχρίσματος (smear) που οφείλεται στην πλειονότητα των μη ειδικών ανασυνδυασμένων τεμαχίων που έχουν θερμοκρασίες τήξεως χαμηλότερες από εκείνες των ομόδιπλων μορίων (Sheffield et al., 1989). Οι διάκριση των νουκλεοτιδικών πολυμορφισμών στα κωδικόνια 151 και 154, που έχουν παρατηρήσει και άλλοι ερευνητές, ήταν ένα μειονέκτημα που δεν αντιμετωπίστηκε με το παρόν πρωτόκολλο. Η διαφοροποίησή τους έγινε με PCR-RFLP με το περιοριστικό ένζυμο *Bsp*HI (Laplanche et al., 1993), παρόμοια με το *Ava*II (Thorgeirsdottir et al., 1999).

Από την άλλη πλευρά, υπήρχαν περιπτώσεις όπως π.χ. του προτύπου 4 (A136A, c138t, R151H ή R154H) για το τμήμα α , που αντί για τέσσερις ζώνες ανιχνεύονταν μόνο δύο στην ειδική πηκτή, ή στην περίπτωση του προτύπου 5 (A136A, R154R, N146S) του τμήματος α , που αντί για τις αναμενόμενες τέσσερις ζώνες λαμβάνονταν τρεις. Αυτές οι ιδιόμορφες απεικονίσεις, που έχουν παρατηρηθεί και από τους Laplanche et al., 1993, αντιπροσωπεύουν τα δύο ομόδιπλα μόρια με μη αποδιαταγμένα τα ετερόδιπλα (τρεις ζώνες αντί για τέσσερις) ή τα ελλιπώς αποδιαταγμένα τόσο ομόδιπλα όσο και τα ετερόδιπλα μόρια (δύο ζώνες αντί για τέσσερις). Λόγω της παρουσίας των ιδιόμορφων αυτών απεικονίσεων, η χρήση μαρτύρων γνωστής αλληλουχίας ήταν απαραίτητη σε κάθε ηλεκτροφόρηση. Με αυτό τον τρόπο ομαδοποιούνταν τα δείγματα βάση της απεικόνισης τους και για την τελική επιβεβαίωση γινόταν ανάλυση αλληλουχίας DNA για όλο το ORF του Prip γονιδίου, σε αντιπροσωπευτικά δείγματα της κάθε ομάδας.

IV.5. Ανοσοβιοχημική σύγκριση απομονώσεων της PrP^{Sc} από αίγες που εκτρέφονται στην Ελλάδα με αντίστοιχες της Ιταλίας

Η ύπαρξη στελεχών prion αναφέρεται για πρώτη φορά στις αίγες (Pattison and Milson, 1961). Τα στελέχη prion που έχουν ταυτοποιηθεί στις αίγες είναι πολύ λιγότερα από τα αντίστοιχα στα προβάτα και σύμφωνα με τη μελέτη της βιβλιογραφίας είναι τα 79A, 79V, 22C και 80V (που όλα ανήκουν στην οικογένεια SSBP/1 όπου περιέχονται και στελέχη προβάτων), καθώς επίσης το 139A και το 124A, το οποίο δεν έχει πλήρως χαρακτηριστεί (Hornlimann et al., 2006). Από τον ορισμό που δόθηκε στο γενικό μέρος, γίνεται σαφές ότι η ταυτοποίηση ενός στελέχους prion μπορεί να γίνει μόνο μέσω της βιολογικής δοκιμής, κατά την οποία τα χαρακτηριστικά του στελέχους μεταδίδονται και εκδηλώνονται σε νέα ζωικά είδη. Παρόλα αυτά, οι βιοχημικές ιδιότητες ενός στελέχους prion αποτελούν σημαντικό δείκτη της βιολογικής του δράσης, όπως για παράδειγμα η θέση αποκοπής της PrP^{Sc} μετά από την επώαση της με πρωτεΐνωση- K και ο καθορισμός του γλυκοτύπου. Ενώ, τα υπόλοιπα χαρακτηριστικά, όπως η περίοδος επώασης και η κατανομή των ιστοπαθολογικών αλλοιώσεων, εξαρτώνται από την PrP^C του οργανισμού που ενοφθαλμίζεται.

Συγκεκριμένα, η αποκοπή της PrP^{Sc} από την πρωτεΐνωση-K, αποδίδεται στις ιδιαίτερες τριτοταγείς δομές του μορίου του στελέχους prion. Ενώ η σχετική αναλογία των ευδιάκριτων γλυκοζυλιωμένων κλασμάτων της PrP^{Sc} μπορεί να καθορίσει τη δομή του μολυσματικού πυρήνα prion και συνεπώς τις ιδιότητες του στελέχους prion (Collinge, 2005). Σύμφωνα με την παραπάνω θεωρία, τα δι-, μονο- και μη γλυκοζυλιωμένα κλάσματα της PrP^{Sc} μπορούν να σχηματίσουν ένα ολιγομερές μόριο ειδικού τύπου, που δημιουργεί μεγαλύτερα συσσωματώματα, αναπαράγοντας τη δομή του αρχικού πυρήνα. Ο μολυσματικός πυρήνας θα καθορίσει το ποσοστό των διαφοροποιημένων δι-, μονο- και μη γλυκοζυλιωμένων κλασμάτων των μορίων της PrP^{Sc} που ενσωματώνονται στο νέο ολιγομερές ή στα συσσωματώματα. Η ανάλυση του γλυκοτύπου της PrP σε υγιή και προσβεβλημένο από νόσημα prion εγκέφαλο ανθρώπου και ποντικού, αποκάλυψε ότι τα γλυκοζυλιωμένα κλάσματα μπορούν να απομονωθούν από την PrP^C, ενώ τα διαφοροποιημένα γλυκοζυλιωμένα κλάσματα της PrP^{Sc} κατακρημνίζονταν όλα μαζί με χρήση ανοσολογικών δοκιμών, όπως η ανοσοκαθήλωση (Khalili-Shirazi et al., 2005).

Στο τέταρτο μέρος της παρούσας έρευνας επιδιώχθηκε για πρώτη φορά η ανοσοβιοχημική σύγκριση ελληνικών απομονώσεων της PrP^{Sc} με αντίστοιχες άλλης

ευρωπαϊκής χώρας και με περιστατικό Σπογγώδους Εγκεφαλοπάθειας των Βοοειδών σε πρόβατο. Μετά από την επώαση με πρωτεΐνωση-K τόσο οι απομονώσεις ελληνικής όσο και ιταλικής προέλευσης έδωσαν το χαρακτηριστικό πρότυπο των τριών ζωνών της PrP^{Sc} (γλυκοτύπος). Η αναλογία του δι- και μονογλυκοσυλιωμένου κλάσματος της PrP27-30 για τα ελληνικά και ιταλικά δείγματα της Τρομάδους Νόσου κυμάνθηκε στα ίδια επίπεδα και συγκεκριμένα μεταξύ 57:30 και 62:29, ενώ για την πειραματική Σπογγώδη Εγκεφαλοπάθεια των Βοοειδών σε πρόβατο ήταν 81:15. Πρόκειται για τιμές που προέκυψαν με τη χρήση των ειδικών μονοκλωνικών αντισωμάτων P4 και SAF84 και είναι χαρακτηριστικές της Κλασικής Τρομάδους Νόσου που παρατηρείται και στα πρόβατα.

Βάσει της πρόδρομης αυτής μοριακής ταυτοποίησης, οι απομονώσεις που προέρχονται και από τις δύο χώρες φαίνεται ότι ανήκουν στο ίδιο στέλεχος prion, το οποίο εμφανίζει ομοιότητες με εκείνο των προβάτων και που διαφοροποιείται σαφώς από τη Σπογγώδη Εγκεφαλοπάθεια των Βοοειδών. Η επίδραση του γονοτύπου της αίγας στα ανοσοβιοχημικά χαρακτηριστικά της PrP^{Sc} δεν μπόρεσε να εκτιμηθεί λόγω της ελάχιστης παραλλακτικότητας τους.

Για την τελική και αξιόπιστη ταυτοποίηση του/των 'ελληνικών' στελεχών prion στις αίγες, αναμένονται σε βάθος χρόνου τα πορίσματα της βιολογικής δοκιμής, καθώς οι απομονώσεις έχουν ενοφθαλμιστεί σε διαγονιδιακά Tg338 ποντίκια και σε τροφτικά του είδους *Myodes glareolus*, τα οποία αποτελούν ευαίσθητα πειραματόζωα για τη μελέτη των νοσημάτων prion (Nonno et al., 2006; Agrimi et al., 2008; Di Bari et al., 2009). Πρόκειται για ερευνητικό αντικείμενο, που ξεπερνά τους στόχους της παρούσας διατριβής καθώς διαφοροποιείται από τη μελέτη του Prnp γονιδίου στις αίγες, αλλά που ανοίγει διαύλους συνεργασίας στη μελέτη των νοσημάτων prion στα μικρά μηρυκαστικά.

V. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στην παρούσα έρευνα, η ανάλυση του ανοιχτού αναγνωστικού πλαισίου του γονιδίου της πρωτεΐνης prion σε 68 αίγες με Κλασική Τρομώδη Νόσο και σε 126 υγιείς αίγες αποκάλυψε την παρουσία λειτουργικών σημειακών μεταλλάξεων σε συνολικά 16 κωδικόνια και σιωπηλών μεταλλάξεων σε 3 κωδικόνια. Οι συχνότητες των αλληλομόρφων και των γονοτύπων μεταξύ των δύο ομάδων αιγών διαφοροποιήθηκαν στατιστικώς μόνο για το κωδικόνιο 240 και για τις σιωπηλές μεταλλάξεις στα κωδικόνια 42 και 138. Ενώ, μια τάση για διαφοροποίηση μεταξύ των δύο ομάδων αιγών παρατηρήθηκε για το κωδικόνιο 110 και 146. Τέλος, παρατηρήθηκαν 32 συνδυασμένοι γονότυποι που εκτιμάται ότι αντιστοιχούν σε 22 ‘ώριμες’ πρωτεΐνες prion. Οι συνδυασμένοι γονότυποι της πρωτεΐνης prion δεν διαφοροποιήθηκαν στατιστικά μεταξύ των υγιών αιγών και εκείνων με Τρομώδη Νόσο

Σημαντικό εύρημα της παρούσας μελέτης ήταν η ανάδειξη αποκλειστικών αλληλομόρφων και στις δύο ομάδες των αιγών. Αυτά τα αποκλειστικά αλληλόμορφα, παρά τις μικρές συχνότητες εμφάνισης τους, αποτελούν πιθανά δείκτες προδιάθεσης στην Κλασική Τρομώδη Νόσο και θα μπορούσαν να σχετιστούν με αυξημένη ευαισθησία στη νόσο. Αντιθέτως η παρουσία των αποκλειστικών αλληλομόρφων στην ομάδα των υγιών αιγών, κυρίως στα κωδικόνια 110, 143, 146 και 222, ίσως να προσδίδει αυξημένη ανθεκτικότητα στην Κλασική Τρομώδη Νόσο.

Ομοίως, οι δύο ελληνικές φυλές αιγών δεν διαφοροποιήθηκαν στις συχνότητες των αλληλομόρφων τους για τα κωδικόνια της πρωτεΐνης prion που μελετήθηκαν. Το γεγονός ότι οι δύο πληθυσμοί βρέθηκαν σε γενετική ανισορροπία και παρατηρήθηκε έλλειμμα ετεροζυγωτών ατόμων, αποδίδεται πιθανά στις μη τυχαίες συζεύξεις μέσα στα ποιμνία δηλαδή στον παράγοντα ομομειξίας και πιθανά στο μικρό δείγμα που εξετάστηκε. Η ανεύρεση γονοτύπων που να συνδέονται αποκλειστικά με ευαισθησία/ανθεκτικότητα της Τρομώδους Νόσου στις αίγες προϋποθέτει ένα πολύ μεγάλο αριθμό επίσημα ταυτοποιημένων θετικών δειγμάτων, προερχόμενων από διαφορετικές φυλές αιγών, ο οποίος θα επιτρέπει τη διεξαγωγή ασφαλών συμπερασμάτων, όπως έγινε στα πρόβατα.

Από την άλλη πλευρά, κάθε έτος στο ΕΕΑ-ΜΣΕ ταυτοποιούνται 6-8 θετικά δείγματα αιγών και αντίστοιχα 100-150 θετικά δείγματα προβάτων (στοιχεία περιόδου 2003-2009), ενώ πολλές μονάδες θετικές στην Τρομώδη Νόσο του προβάτου είναι μικτές και άρα οι αίγες είναι σε άμεση και συνεχή επαφή με το μολυσματικό παράγοντα. Τα

στοιχεία αυτά οδηγούν στο συμπέρασμα ότι οι αίγες στην Ελλάδα είναι αρκετά ανθεκτικά ζώα και οι γονότυποι τους συνδέονται περισσότερο με ανθεκτικότητα και λιγότερο με ευαισθησία.

Η αξία της παρούσας έρευνας έγκειται στο γεγονός ότι περιέχει το δεύτερο μεγαλύτερο αριθμό παρατηρήσεων σε παγκόσμιο επίπεδο και μπορεί να λειτουργήσει «διορθωτικά» στα μέχρι τώρα συμπεράσματα. Η σημασία της επαυξάνεται με δεδομένη τη βούληση της Ευρωπαϊκής Ένωσης να υιοθετήσει και για τις αίγες σύστημα αξιολόγησης και κατάταξης γονοτύπων έναντι της Τρομώδους Νόσου.

Αναφορικά με το πρωτόκολλο γονοτύπησης που αναπτύχθηκε η χρησιμοποίησή του ενδείκνυται για το μαζικό-προκαταρκτικό έλεγχο ενός σημαντικού αριθμού αιγών με οικονομικό τρόπο. Το παρόν πρωτόκολλο θα πρέπει να προσαρμοστεί στους σημαντικότερους γονότυπους που αναδείχθηκαν και από την παρούσα έρευνα- δηλαδή για τα κωδικόνια 110, 143, 146 και 222, έτσι ώστε αυτά να αναλύονται με μία και μόνο αντίδραση. Τα δείγματα μπορούν να ομαδοποιηθούν με βάση το πρότυπο τους στην DGGE και η λεπτομερής αλληλούχηση ενός δείγματος ανά ομάδα επιτρέπει την αναγωγή της πληροφορίας στο σύνολο των δειγμάτων της.

Τέλος, η πρόδρομη μοριακή ταυτοποίηση και σύγκριση των απομονώσεων της παθολογικής πρωτεΐνης prion στις αίγες της παρούσας μελέτης ανέδειξε ανοσοβιοχημικά το ίδιο στέλεχος prion μεταξύ της Ελλάδας και της Ιταλίας. Ο πλήρης χαρακτηρισμός του αναμένεται μετά την ολοκλήρωση της βιολογικής δοκιμής.

Η εκρίζωση της Τρομώδους Νόσου αποτελεί εθνική υπόθεση όπως αποδεικνύεται και από τα προγράμματα επαγρύπνησης της νόσου σε πολλές Ευρωπαϊκές χώρες (Ηνωμένο Βασίλειο, Γαλλία, Γερμανία, Νορβηγία) αλλά και διεθνώς (ΗΠΑ, Νέα Ζηλανδία, Αυστραλία). Η γενετική βελτίωση και επιλογή ανθεκτικών ζώων δεν παύει να αποτελεί ένα από τα μέτρα αντιμετώπισης της Τρομώδους Νόσου στα πρόβατα. Στις αίγες όμως η εφαρμογή της φαίνεται ακόμα αδύνατη. Ο ακρογωνιαίος λίθος για την πιθανή εκρίζωση της Τρομώδους Νόσου στα μικρά μηρυκαστικά φαίνεται να είναι πρωτίστως η διαχείριση-υγιεινή της εκτροφής και η διακοπή βόσκησης σε κοινά και άρα εν δυνάμει μολυσμένα βοσκοτόπια. Ωστόσο κανένα μέτρο καταστολής δεν είναι απόλυτα αποτελεσματικό για ένα νόσημα, του οποίου ο αιτιολογικός παράγοντας δεν έχει αποσαφηνιστεί πλήρως.

VI. ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Σκοπός της παρούσας έρευνας ήταν η μελέτη του γονιδίου της πρωτεΐνης p10n (P10n γονίδιο) στις αίγες για την ανεύρεση πιθανών νουκλεοτιδικών πολυμορφισμών που να συσχετίζονται με την εμφάνιση ή μη της Τρομώδους Νόσου. Στόχος ήταν επίσης α) η μελέτη του P10n γονιδίου σε αίγες των ελληνικών φυλών β) η δημιουργία ενός αξιόπιστου διαγνωστικού πρωτοκόλλου για την ανεύρεση «ανθεκτικών» ατόμων και γ) η πρόδρομη μοριακή ταυτοποίηση και σύγκριση των απομονώσεων της παθολογικής πρωτεΐνης p10n στις αίγες που εκτρέφονται εντός και εκτός Ελλάδας.

Στην παρούσα έρευνα χρησιμοποιήθηκαν δείγματα πλήρους αίματος ή εγκεφαλικού ιστού από 317 αίγες για την απομόνωση του γονιδιωματικού DNA. Τα δείγματα ανήκαν σε 126 υγιείς αίγες και 68 αίγες με Τρομώδη Νόσο (που παραχωρήθηκαν από το Εθνικό Εργαστήριο Αναφοράς των Μεταδοτικών Σπογγωδών Εγκεφαλοπαθειών), σε 90 βιολογικά εκτρεφόμενες αίγες της εγχώριας ελληνικής φυλής και 33 της φυλής Σκοπέλου. Για την ανάλυση αλληλουχίας DNA ολόκληρου του ανοιχτού αναγνωστικού πλαισίου του P10n γονιδίου χρησιμοποιήθηκε η τεχνική της ηλεκτροφόρησης σε τριχοειδές. Στη συνέχεια αναπτύχθηκε ένα πρωτόκολλο βασισμένο στην ηλεκτροφόρηση πηκτής με διαβαθμισμένη αποδιατακτική σύσταση (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis- DGGE), σε συνδυασμό με τη δοκιμή της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction –PCR) και την ανάλυση πολυμορφισμών μήκους τεμαχίων περιορισμού (Restriction Fragment Length Polymorphisms-RFLP) ή PCR-RFLP. Ενώ για τη μοριακή ταυτοποίηση και σύγκριση 15 απομονώσεων της παθολογικής πρωτεΐνης p10n στις αίγες χρησιμοποιήθηκε η δοκιμή της ανοσοκαθήλωσης (western blot) με τη χρήση των μονοκλωνικών αντισωμάτων P4 και SAF84.

Από τις παραπάνω αναλύσεις βρέθηκαν σημειακές μεταλλάξεις, που συνεπάγονταν αντικατάσταση αμινοξέος σε συνολικά 16 κωδικόνια και σιωπηλές μεταλλάξεις σε 3 κωδικόνια. Από αυτές, 4 λειτουργικές και μία σιωπηλή μετάλλαξη παρατηρήθηκαν για πρώτη φορά στις αίγες. Επίσης ανιχνεύθηκε μια έλλειψη 24bp μεταξύ των κωδικονίων 70-77 σε μία υγιή και 3 νοσούσες αίγες, η οποία στοιχειοθετεί για πρώτη φορά την ύπαρξη τεσσάρων οκταπεπτιδικών επαναλήψεων στο P10n γονίδιο των αιγών. Οι συχνότητες των αλληλομόρφων και των γονοτύπων μεταξύ των δύο ομάδων αιγών διαφοροποιήθηκαν στατιστικώς μόνο για το κωδικόνιο 240 και για τις σιωπηλές μεταλλάξεις στα κωδικόνια

42 και 138 ($p \leq 0,05$). Ενώ, μια τάση για διαφοροποίηση μεταξύ των δύο ομάδων αιγών παρατηρήθηκε για το κωδικόνιο 110 και 146 ($p \leq 0,10$).

Σημαντικό εύρημα της παρούσας μελέτης ήταν η ανάδειξη αποκλειστικών αλληλομόρφων και στις δύο ομάδες των αιγών. Η παρουσία αποκλειστικών αλληλομόρφων στην ομάδα των υγιών αιγών για τα κωδικόνια 110, 143, 146 και 222 πιθανά προσδίδει αυξημένη ανθεκτικότητα στην Κλασική Τρομάδη Νόσο. Οι συνδυασμένοι γονότυποι της πρωτεΐνης prion δεν διαφοροποιήθηκαν στατιστικά μεταξύ των υγιών και των νοσούσων αιγών. Ομοίως, οι δύο ελληνικές φυλές αιγών δεν εμφάνισαν διαφορές στις συχνότητες των αλληλομόρφων τους για τα πολυμορφικά κωδικόνια της πρωτεΐνης prion που μελετήθηκαν.

Αναφορικά, στο πρωτόκολλο της DGGE που αναπτύχθηκε στην παρούσα διατριβή, εκτιμάται ότι μπορεί να συμβάλλει στην προκαταρκτική γονοτύπηση και κατηγοριοποίηση των δειγμάτων με βάση το κοινό πρότυπο τους (pattern). Στη συνέχεια, απαιτείται πλήρης αλληλούχηση ενός δείγματος ανά κατηγορία ώστε να αναχθεί η πληροφορία για το σύνολο των δειγμάτων της.

Τέλος, η πρόδρομη μοριακή ταυτοποίηση και σύγκριση των απομονώσεων της παθολογικής πρωτεΐνης prion στις αίγες της παρούσας μελέτης ανέδειξε ανοσοβιοχημικά το ίδιο στέλεχος prion μεταξύ της Ελλάδας και της Ιταλίας. Ο πλήρης χαρακτηρισμός του αναμένεται μετά την ολοκλήρωση της βιολογικής δοκιμής σε πειραματόζωα.

Παρά το γεγονός ότι η παρούσα έρευνα είναι η δεύτερη στη διεθνή βιβλιογραφία σε αριθμό νοσούσων αιγών, δεν αποσαφηνίζει τη πιθανή γενετική προδιάθεση της Τρομάδους Νόσου στις αίγες. Για να γίνει αυτό, απαιτείται ακόμα μεγαλύτερος αριθμός παρατηρήσεων από αίγες με Τρομάδη Νόσο, όπως έγινε στην περίπτωση των προβάτων, ώστε να εξαχθούν κατά το δυνατόν ασφαλή συμπεράσματα.

VII. SUMMARY

“STUDY OF PRION PROTEIN GENE IN HEALTHY AND SCRAPIE AFFECTED GOATS”

The aim of the present study was to analyze the prion protein gene (Prnp gene) polymorphisms in goats and their possible association to natural Scrapie. Additionally a) Prnp gene polymorphisms were detected and described in goats of the indigenous greek and Skopelou breed, b) the establishment of an allele-specific screening protocol for the detection of “Scrapie-resistant” goats was attempted and c) the molecular characterization of 15 Greek caprine natural Scrapie isolates and their comparison to Italian caprine Scrapie isolates was performed.

Frozen brain material or EDTA-treated blood samples from 317 goats were used for genomic DNA extraction. Samples originated from 126 healthy and 68 Scrapie affected goats, were kindly provided by the Greek Reference Laboratory of Transmissible Spongiform Encephalopathies (TSE). Also samples from 90 organically reared goats of the indigenous greek breed and 33 goats of Skopelou breed were used for DNA extraction. In most samples, the entire Open Reading Frame of Prnp gene was direct-sequenced by using capillary electrophoresis. Establishment of an allele-specific screening protocol for the detection of “Scrapie-resistant” goats was based on the use of Denaturing Gradient Gel Electrophoresis- DGGE, combined with PCR-RFLP. Western blotting and treatment with P4 and SAF84 monoclonal antibodies was also used for the determination of prion protein profile from natural Scrapie affected goats.

The presence of coding-point mutations in 16 polymorphic codons and silent mutations in 3 codons of ORF Prnp gene were identified. Among them 4 point mutations leading to amino-acid substitution and one silent mutation were observed for the first time. Also, a 24bp deletion between codons 70-77 was detected in one healthy and 3 Scrapie-affected goats, recording the presence of four-octapeptide repeats in goats for the first time. Allelic and genotypic frequencies between healthy and Scrapie-affected goats differed significantly only for polymorphic codon 240 and for codons 42 and 138 where silent mutations were observed ($p \leq 0,05$). Between the two groups, a tendency to allelic frequency differentiation was observed for codons 110 and 146 ($p \leq 0,10$).

Important finding of the present study was the presence of private alleles in each group of goats. Private alleles in the population of healthy goats, referring to polymorphic

codons 110, 143, 146 and 222, can possibly be associated to Scrapie resistance. No significant difference in the distribution of combined prion protein genotypes between healthy and Scrapie-affected goats was found. Similarly, the allelic frequencies of prion protein polymorphic codons were not significantly different between the two greek goat breeds.

DGGE protocol presented in this work allows samples grouping based on their pattern and subsequently based on their allele-specific polymorphisms, by using a relative inexpensive and less sophisticated sequencing method. Representative samples from each group could be further direct-sequenced by a reference method extrapolating data to all group's samples.

All Greek caprine natural Scrapie isolates had the same typical PrP^{Sc} western blot profile,, similar to Italian caprine classical Scrapie isolates. The prion strain typing of the Greek caprine classical Scrapie isolates remains to be clarified by the ongoing bioassay in animal models.

To our knowledge, the present study comprises the second larger number of Scrapie-affected goats presented worldwide. Nevertheless, it cannot adequately elucidate the genetic susceptibility of natural classical Scrapie in goats. Larger number of observations are needed to fully describe in detail.

VIII. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Ξενόγλωσση

- Acin C, Martin-Burriel, I, Monleon E, Rodellar C, Badiola JJ, Zaragoza P. Characterisation of the caprine PrP gene. Study of new polymorphisms and relationship with the resistance/susceptibility to the scrapie disease. Book of abstracts of 1st International Conference of the NeuroPrion European Network of Excellence, Paris 2004, pp. 115.
- Acutis PL, Bossers A, Priem J, Riina MV, Peletto S, Mazza M, Casalone C, Forloni G, Ru G, Caramelli M. Identification of prion protein gene polymorphisms in goats from Italian scrapie outbreaks. *J Gen Virol* 2006, 87: 1029-1033.
- Acutis PL, Colussi S, Riina MV, Maniaci MG, Peletto S, Zuccon F, Biagetti M, Di Marco V, Lorenzetti R, Di Ventura M, Ru G, Maurella C, Caramelli M. A case-control study on the association of codon 222 polymorphism with resistance to scrapie in Italian goats using the pyrosequencing technique. *PRION2006*, Turin, 2006b.
- Acutis PL, Colussi S, Santagada G, Laurenza C, Maniaci MG, Riina MV, Peletto S, Goldmann W, Bossers A, Caramelli M, Cristoferi I, Maione S, Sacchi P, Rasero R. Genetic variability of the PRNP gene in goat breeds from Northern and Southern Italy. *J Appl Micr* 2008, 104: 1782-1789.
- Agrimi U, Conte M, Morelli L, Di Bari MA, Di Guardo G, Ligios C, Antonucci G, Aufiero GM, Pozzato N, Mutinelli F, Nonno R, Vaccari G. Animal transmissible spongiform encephalopathies and genetics. *Vet Res Com* 2003, 27 Suppl 1: 31-38.
- Agrimi U, Nonno R, Dell'Omo G, Di Bari MA, Conte M, Chiappini B, Esposito E, Di Guardo G, Windl O, Vaccari G, Lipp HP. Prion protein amino acid determinants of differential susceptibility and molecular feature of prion strains in mice and voles. *PLoS Pathog* 2008, 4:e1000113.
- Agrimi U, Ru G, Cardone F, Pocchiari M, Caramelli M. Epidemic of transmissible spongiform encephalopathy in sheep and goats in Italy, *Lancet* 1999, 353: 560-561.
- Aguzzi A, Heikenwalder M, Polymenidou M. Insights into prion strains and neurotoxicity. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007, 8: 552-561.
- Alper T, Haig DA, Clarke MC. The exceptionally small size of the scrapie agent. *Biochem Biophys Res Commun* 1966, 22: 278-284.
-

- Alper T. Photo-and radiobiology of the scrapie agent. In: Prusiner SB, Collinge J, Powell J et al, editors. Prion diseases of humans and animals. Ellis Horwood, New York, 1992, pp. 30-39.
- Andréoletti O, Berthon P, Marc D, Sarradin P, Grosclaude J, van Keulen L, Schelcher F, Elsen JM, Lantier F. Early accumulation of PrP(Sc) in gut-associated lymphoid and nervous tissues of susceptible sheep from a Romanov flock with natural scrapie. *J Gen Virol* 2000, 81: 3115-3126.
- Andréoletti O, Lacroux C, Chabert A, Monnereau L, Tabouret G, Lantier F, Berthon P, Eychenne F, Lafond-Benestad S, Elsen JM, Schelcher F. PrP^{Sc} accumulation in placentas of ewes exposed to natural scrapie: influence of foetal PrP genotype and effect on ewe-to-lamb transmission. *J Gen Virol* 2002, 83: 2607-2616.
- Andrews AH, Laven R, Matthews JG. Clinical observations on four cases of scrapie in goats. *Vet Rec* 1992, 130: 101.
- Babar ME, Abdullah M, Nadeem A, Haq AU. Prion protein gene polymorphisms in four goat breeds of Pakistan, *Mol Biol Rep* 2009, 36: 141-144.
- Bailly YJR. The function and cell biology of PrP^c, Madrid 8th-10th October 2008. NeuroPrion newsletter, PRION2008 Special Issue 2008, pp. 6-8. <http://www.NeuroPrion.com>
- Baylis M and Goldmann W. The genetics of scrapie in sheep and goats. *Curr Mol Med* 2004, 4: 385-396.
- Belt PBGM, Muileman IM, Schreuder BEC, Bos-deRuijter J, Gielkens ALJ, Smits MA. Identification of five allelic variants of the sheep PrP gene and their association with natural scrapie. *J Gen Virol* 1995, 76: 509-517.
- Bendheim PE, Brown HR, Rudelli RD, Scala LJ, Goller NL, Wen GY, Kascsak RJ, Cashman NR, Bolton DC. Nearly ubiquitous tissue distribution of the scrapie agent precursor protein. *Neurol* 1992, 42:
- Benestad SL, Sarradin P, Thu B, Schönheit J, Tranulis MA, Bratberg B. Cases of scrapie with unusual features in Norway and designation of a new type, Nor98. *Vet Rec* 2003, 153: 202-208.
- Billeter M, Riek R, Wider G, Hornemann S, Glockshuber R, Wüthrich K. Prion protein NMR structure and species barrier for prion diseases. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997, 94: 7281-7285.
-

- Billinis C, Panagiotidis CH, Psychas V, Argyroudis S, Nicolaou A, Leontides S, Papadopoulou O, Sklaviadis T. Prion protein gene polymorphisms in natural goat scrapie. *J Gen Virol* 2002, 83: 713-721.
- Bolton DC, McKinley MP, Prusiner SB. Identification of a protein that purifies with the scrapie prion. *Science* 1982, 218: 1309-1311.
- Bossers A, Schreuder BE, Muileman IH, Belt PBGM, Smits MA. PrP genotype contributes to determining survival times of sheep with natural scrapie. *J Gen Virol* 1996, 77: 2669–2673.
- Bouzas I, Dovas C, Kritas S, Papanastasopoulou M, Papakostaki D, Chatzinasiou E, Koptopoulos G. Different PrP^{Sc} accumulation patterns in goat brain. Should the official way of sampling be reconsidered? PRION2008, Madrid 2008, pp.150.
- Brash AG. Scrapie in imported sheep in New Zealand. *N Z Vet J* 1952, 1: 27-30.
- Brown DR, Qin K, Herms JW, Madlung A, Manson J, Strome R, Fraser PE, Kruck T, von Bohlen A, Schulz-Schaeffer W, Giese A, Westaway D, Kretzschmar H. The cellular prion protein binds copper in vivo. *Nature* 1997, 390: 684-687.
- Brown P, Gajdusek DC. Survival of scrapie virus after 3 years' interment. *Lancet* 1991, 337: 269-270.
- Bruce M, Chree A, McConnell I, Foster J, Pearson G, Fraser H. Transmission of bovine spongiform encephalopathy and scrapie to mice: strain variation and the species barrier. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 1994, 343: 405-411.
- Bruce ME, McConnell I, Fraser H, Dickinson AG. The disease characteristics of different strains of scrapie in Sinc congenic mouse lines: implications for the nature of the agent and host control of pathogenesis. *J Gen Viro*. 1991, 72: 595-603.
- Büeler H, Aguzzi A, Sailer A, Greiner RA, Autenried P, Aguet M, Weissmann C. Mice devoid of PrP are resistant to scrapie. *Cell* 1993, 73: 1339-1347.
- Burger D and Hartsough GR. Encephalopathy of mink. II. Experimental and natural transmission. *J Infect Dis* 1965, 115: 393-399.
- Capucchio MT, Guarda F, Isaia MC, Caracappa S, Di Marco V. Natural occurrence of scrapie in goats in Italy. *Vet Rec* 1998, 143: 452-453.
-

- Capucchio MT, Guarda F, Pozzato N, Coppolino S, Caracappa S, Di Marco V. Clinical signs and diagnosis of scrapie in Italy: a comparative study in sheep and goats. *J Vet Med* 2001, 48:23-31.
- Caramelli M, Ru G, Casalone C, Bozzetta E, Acutis PL, Calella A, Forloni G. Evidence for the transmission of scrapie to sheep and goats from a vaccine against *Mycoplasma agalactiae*. *Vet Rec* 2001, 148: 531-536.
- Carp RI, Merz PA, Kascsak RJ, Merz G, Wisniewski HM. Biological properties of scrapie, an unconventional slow virus. *J Gen Virol* 1985, 53:596-606.
- Castilla J, Saa P, Hetz C, Soto C. In vitro generation of infectious scrapie prions. *Cell* 2005, 121: 195-206.
- Cervenakova L, Brown P, Nagle J, Goldfarb LG, Gajdusek DC. R3-R4 deletion in the PRNP gene is associated with Creutzfeldt-Jakob disease (CJD). *Am J Hum Genet* 1994, 55: 3.
- Chelle PLP. A case of trembling in the goat. *Bull Acad Vét Fr* 1942, 15: 294-295.
- Cohen FE, Pan KM, Huang Z, Baldwin M, Fletterick RJ, Prusiner SB. Structural clues to prion replication. *Science* 1994, 264: 530-531.
- Collinge J. Molecular neurology of prion disease. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatr.* 2005, 76: 906-919.
- Colussi S, Vaccari G, Maurella C, Bona C, Lorenzetti R, Troiano P, Casalnuovo F, Di Sarno A, Maniaci MG, Zuccon F, Nonno R, Casalone C, Mazza M, Ru G., Caramelli M, Agrimi U, Acutis PL. Histidine at codon 154 of the prion protein gene is a risk factor for Nor98 scrapie in goats. *J Gen Virol* 2008, 89: 3177-3184.
- Come JH, Fraser PE, Lansbury PT Jr. A kinetic model for amyloid formation in the prion diseases: importance of seeding. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993, 90: 5959-5963.
- Cosseddu GM, Agrimi U, Pinto J, Schudel AA. Advances in scrapie research. *Rev Sci Tech Off int Epiz* 2007, 26: 657-668.
- Creutzfeldt HD. Über eine eigenartige herdförmige Erkrankung des Zentralnervensystems. *Z Ges Neurol Psychiat* 1920, 57: 1-18.
- CRL_STEG (TSE Community Reference Laboratory Expert Group on Strains), Summary of the STEG opinion on two caprine isolates (08-357 from France; G08-1469 from the UK) referred to the group following the identification of
-

unusual molecular profiles on discriminatory Western blot (as required in EU Regulation 36/2005.), 2008.
www.defra.gov.uk/vla/science/docs/sci_tse_rl_steg1008.pdf.

Cuillé J et Chelle PI. La maladie dite tremblante du mouton est-elle inoculable?. C R Acad Sci Paris 1936, 203: 1552-1554.

Czub M, Braig HR, Diringer H. Replication of scrapie agent in hamsters infected intracerebrally confirms the pathogenesis of an amyloid-inducing virosis. J Gen Virol 1988, 69: 1753-1756.

Dawson M, Moore RC, Bishop SC. Progress and limits of PrP gene selection policy. Vet Res 2008, 39: 25.

Detwiler LA. Scrapie. Rev Sci Tech Off int Epiz 1992, 11: 491-537.

Di Bari MA, Chianini F, Vaccari G, Esposito E, Conte M, Eaton SL, Hamilton S, Finlayson J, Steele PJ, Dagleish MP, Reid HW, Bruce M, Jeffrey M, Agrimi U, Nonno R. The bank vole (*Myodes glareolus*) as a sensitive bioassay for sheep scrapie. J Gen Virol. 2008, 89: 2975-2985.

Dickinson AG, Outram GW. The scrapie replication-site hypothesis and its implication for pathogenesis. In: Prusiner SB et Hadlow WJ. Slow transmissible diseases of the nervous system. Academic Press, New York, 1979, 2:13-32.

Dickinson AG. Scrapie in sheep and goats. In: 'Slow virus diseases of animals and man', Kimberlin RH, Amsterdam, 1976, pp. 209-241.

Díez B, Pedrós-Alió C, Marsh TL, Massana R: Application of Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) To Study the Diversity of Marine Picoeukaryotic Assemblages and Comparison of DGGE with Other Molecular Techniques. Appl Envir Microb 2001, 67: 2942-2951.

Duffy P, Wolf J, Collins G. Possible person-to-person transmission of Creutzfeldt-Jacob disease. N Engl J Med 1974, 290: 692-693.

Dustan BH, Spencer YI, Casalone C, Brownlie J, Simmons MM. A histopathologic and immunohistochemical review of archived UK caprine scrapie cases. Vet Pathol 2008, 45: 443-454.

EFSA. Opinion of the Scientific Panel on Biological Hazards on a request from the European Commission on the human and animal exposure risk related to Transmissible Spongiform Encephalopathies (TSEs) from milk and milk products derived from small ruminants. EFSA J 2008, 849: 1-37. Απόφαση ληφθείσα την 22 Οκτωβρίου 2008.

- EFSA. Opinion of the Scientific Panel on Biological Hazards on a request from the European Commission on certain aspects related to the risk of Transmissible Spongiform Encephalopathies (TSEs) in ovine and caprine animals. *EFSA J* 2007, 466: 1-10.
- EFSA. Opinion of the Scientific Panel on Biological Hazards on the request from the European Commission on classification of atypical Transmissible Spongiform Encephalopathy (TSE) cases in Small Ruminants. *EFSA J* 2005, 276: 1-30.
- Eigen M. Prionics or the kinetic basis of prion diseases. *Biophys Chem* 1996, 63: A1-18.
- Ekateriniadou L, Kanata E, Panagiotidis C, Nikolaou A, Koutsoukou E, Lymberopoulos A, Sklaviadis T. PrP genotypes in scrapie-affected sheep in Greece—The contribution of the AHQ 1 polymorphism. *Small Rumin Res* 2007b, 73: 142-149.
- Ekateriniadou LV, Panagiotidis CH, Terzis A, Ploumi K, Triantafyllidis A, Deligiannidis P, Triantaphyllidis C, Sklaviadis T. Genotyping for PrP gene polymorphisms in rare Greek breeds of sheep. *Vet Rec* 2007a, 160: 194-195.
- Eloit M, Adjou K, Couplier M, Fontaine JJ, Hamel R, Lilin T, Messiaen S, Andreoletti O, Baron T, Bencsik A, Biacabe AG, Beringue V, Laude H, Le Dur A, Vilotte JL, Comoy E, Deslys JP, Grassi J, Simon S, Lantier F, Sarradin P. BSE agent signatures in a goat. *Vet Rec* 2005, 156: 523-524.
- Fink JK, Peacock ML, Warren JT Jr., Roses AD, Prusiner SB: Detecting prion protein gene mutations by denaturing gradient gel electrophoresis. *Hum Mutat* 1994, 4: 42-50.
- Fink JK, Warren JT Jr, Drury I, Murman D, Peacock ML. Allele-specific sequencing confirms novel prion gene polymorphism in Creutzfeldt-Jakob disease. *Neurol* 1991, 41: 1647-1650.
- Fischer SG, Lerman LS. Length-independent separation of DNA restriction fragments in two-dimensional gel electrophoresis. *Cell* 1979, 16: 191-200.
- Fischer SG, Lerman LS: DNA fragments differing by single base-pair substitutions are separated in denaturing gradient gels: correspondence with melting theory. *Proc Natl Acad Sci USA* 1983, 80: 1579-1583.
-

- Foster J, Goldmann W, Parnham D, Chong A, Hunter N. Partial dissociation of PrP(Sc) deposition and vacuolation in the brains of scrapie and BSE experimentally affected goats. *J Gen Virol* 2001a, 82: 267-273.
- Foster J, McKelvey W, Fraser H, Chong A, Ross A, Parnham D, Goldmann W, Hunter N. Experimentally induced bovine spongiform encephalopathy did not transmit via goat embryos. *J Gen Virol* 1999, 80: 517-524.
- Foster JD, Hope J, Fraser H. Transmission of bovine spongiform encephalopathy to sheep and goats. *Vet Rec* 1993, 133: 339-341.
- Foster JD, Parnham D, Chong A, Goldmann W, Hunter N. Clinical signs, histopathology and genetics of experimental transmission of BSE and natural scrapie to sheep and goats. *Vet Rec* 2001b, 148: 165-171.
- Fournier JG, Escaig-Haye F, Billette de Villemeur T, Robain O, Lasmézas CI, Deslys JP, Dormont D, Brown P. Distribution and submicroscopic immunogold localization of cellular prion protein (PrP^c) in extracerebral tissues. *Cell Tissue Res* 1998, 292: 77-84.
- Fournier JG, Escaig-Haye F, Grigoriev V. Ultrastructural localization of prion proteins: physiological and pathological implications. *Microsc Res Tech* 2000, 50: 76-88.
- Fraser H. A survey of primary transmission of Icelandic scrapie (Rida) in mice. In: *Virus non-conventionnels et affections du système nerveux central*. Court LA, Cathala F. Masson, Paris, 1993, pp. 34-36.
- Gajdusek DC, Gibbs CJ Jr, Alpers M. Experimental transmission of a kuru-like syndrome to chimpanzees. *Nature* 1966, 209: 794-796.
- Georgsson G, Sigurdarson S, Brown P. Infectious agent of sheep scrapie may persist in the environment for at least 16 years. *J Gen Virol* 2006, 87: 3737-3740.
- Gerstmann J, Sträussler E, Scheinker I. Über eine eigenartige hereditär- familiäre Erkrankung des Zentralnervensystems. Zugleich ein Beitrag zur Frage des vorzeitigen lokalen Alterns. *Z Ges Neurol Psychiat* 1936, 154: 736-762.
- Gibbons RA, Hunter GD. Nature of the scrapie agent. *Nature* 1967, 215: 1041-1043.
- Goldmann W, Chong A, Foster J, Hope J, Hunter N. The shortest known prion protein gene allele occurs in goats, has only three octapeptide repeats and is non-pathogenic. *J Gen Virol* 1998, 79: 3173-3176.
-

- Goldmann W, Martin T, Foster J, Hughes S, Smith G, Hughes K, Dawson M, Hunter N. Novel polymorphisms in the caprine PrP gene: a codon 142 mutation associated with scrapie incubation period. *J Gen Virol* 1996, 77: 2885-2891.
- Goldmann W, Perucchini M, Smith A, Hunter N. Genetic variability of the PrP gene in a goat herd in the UK. *Vet Rec* 2004, 155: 177-178.
- Goldmann W. PrP genetics in ruminant transmissible spongiform Encephalopathies. *Vet Researc* 2008, 39: 30.
- Gombojav A, Ishiguro N, Horiuchi M, Serjmyadag D, Byambaa B, Shinagawa M. Amino acid polymorphisms of PrP gene in Mongolian sheep. *J Vet Med Sci.* 2003, 65:75-81.
- González L, Dagleish MP, Martin S, Dexter G, Steele P, Finlayson J, Jeffrey M. Diagnosis of preclinical scrapie in live sheep by the immunohistochemical examination of rectal biopsies. *Vet Rec* 2008, 162: 397-403.
- Gonzalez-Romero D, Barria MA, Leon P, Morales R, Soto C. Detection of infectious prions in urine. *FEBS Letters* 2008, 582: 3161-3166.
- Gordon WS, Brownlee A, Wilson DR. Studies in the louping-ill, tick-born fever and scrapie. *Proc. 3rd Int. Congress of Microbiologists* 1939, New York, pp. 130-131.
- Gordon WS. Louping ill, tickborne fever and scrapie. *Vet Rec* 1946, 47: 516-520.
- Goudet J, Raymond M, de Meeus T, Rousset F. Testing differentiation in diploid populations. *Genetics* 1996, 144: 1931-1938.
- Govaerts C, Wille H, Prusiner SB, Cohen FE. Evidence for assembly of prions with left-handed beta-helices into trimers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004, 101: 8342-8347.
- Gravenor MB, Papasozomenos P, McLean AR, Neophytou G. A scrapie epidemic in Cyprus. *Epidem Infec* 2004, 132: 751-760.
- Gregori L, Kovacs GG, Alexeeva I, Budka H, Rohwer RG. Excretion of transmissible spongiform encephalopathy infectivity in urine. *Emerg Infect Dis* 2008, 14:1406-1412.
- Griffith JS. Self-replication and scrapie. *Nature* 1967, 215: 1043- 1044.
-

- Gruner L, Elsen JM, Vu Tien Khang J, Eychenne F, Caritez JC, Jacquiet P, Andreoletti O, Sarradin P, Cortet J, Richer N, Leroux H. Nematode parasites and scrapie: experiments in sheep and mice. *Parasitol Res* 2004, 93: 493-498.
- Gut IG. Automation in Genotyping of Single Nucleotide Polymorphisms. *Hum Mut* 2001, 17: 475-492.
- Hadlow WJ, Kennedy RC, Race RE, Eklund CM. Virologic and neurohistologic findings in dairy goats affected with natural scrapie. *Vet Pathol* 1980, 17: 187-199.
- Hadlow WJ, Kennedy RC, Race RE. Natural infection of Suffolk sheep with scrapie virus. *J Infect Dis* 1982, 146: 657-664.
- Hadlow WJ. Scrapie and Kuru. *Lancet* 1959, 2: 289-290.
- Haley NJ, Seelig DM, Zabel MD, Telling GC, Hoover EA. Detection of CWD Prions in Urine and Saliva of Deer by Transgenic Mouse Bioassay. *PLoS ONE* 2009, 4: e4848. doi:10.1371/journal.pone.0004848.
- Harcourt RA and Anderson MA. Naturally-occurring scrapie in goats. *Vet Rec* 1974, 94: 504.
- Hartsough GR and Burger D. Encephalopathy of mink. I. Epizootiologic and clinical observations. *J Infect Dis* 1965, 115: 387-392.
- Hayes VM, Wu Y, Osinga J, Mulder IM, van der Vlies P, Elfferich P, Buys CH, Hofstra RM: Improvements in gel composition and electrophoretic conditions for broad-range mutation analysis by denaturing gradient gel electrophoresis. *Nucl Acid Res* 1999, 27:e29i-v.
- Heggebø R, Press CM, Gunnes G, Lie KI, Tranulis MA, Ulvund M, Groschup MH, Landsverk T. Distribution of prion protein in the ileal Peyer's patch of scrapie-free lambs and lambs naturally and experimentally exposed to the scrapie agent. *J Gen Virol* 2000, 81: 2327-2337.
- Herms J, Tings T, Gall S, Madlung A, Giese A, Siebert H, Schürmann P, Windl O, Brose N, Kretzschmar H. Evidence of presynaptic location and function of the prion protein. *J Neurosci* 1999, 19: 8866-8875.
- Horiuchi M, Yamazaki N, Ikeda T, Ishiguro N, Shinagawa M. A cellular form of prion protein (PrP^c) exists in many non-neuronal tissues of sheep. *J Gen Virol* 1995, 76: 2583-2587.
- Hörnlimann B, Riesner D, Kretzschmar H. Prions in humans and animals. De Gruyter, Berlin, 2006.
-

- Hourrigan JL, Klingsporn AL, McDaniel HA, Riemenschneider MN. Natural scrapie in a goat. *J Am Vet Med Assoc* 1969, 154: 538-539.
- Hunter N and Bossers A. The PrP genotype as a marker for scrapie susceptibility in sheep. Στο βιβλίο: Hörnlimann B, Riesner D, Kretzschmar H. Prions in humans and animals. De Gruyter, Berlin, 2006.
- Hunter N, Foster JD, Dickinson AG, Hope J. Linkage of the gene for the scrapie-associated fibril protein (PrP) to the Sip gene in Cheviot sheep. *Vet Rec* 1989, 124: 364–366.
- Hunter N, Goldmann W, Smith G, Hope J. The association of codon 136 PrP gene variant with the occurrence of natural scrapie. *Arch Virol* 1994, 137: 171–177.
- Ikeda T, Horiuchi M, Ishiguro N, Muramatsu Y, Kai-Uwe GD, Shinagawa M. Amino acid polymorphisms of PrP with reference to onset of scrapie in Suffolk and Corriedale sheep in Japan. *J Gen Virol*. 1995, 76: 2577-2581.
- Imrie CE, Korre A, Munoz-Melendez G. Spatial correlation between the prevalence of transmissible spongiform diseases and British soil geochemistry. *Environ Geochem Health*. 2008, DOI 10.1007/s10653-008-9172-y.
- Jeffrey M and Wells GAH. Spongiform encephalopathy in a nyala (*Tragelaphus angasi*). *Vet Pathol* 1988, 25: 398-399.
- Jeffrey M, Martin S, Gonzalez L, Foster J, Langeveld JP, van Zijderveld FG, Grassi J, Hunter N. Immunohistochemical features of PrP(d) accumulation in natural and experimental goat transmissible spongiform encephalopathies, *J Comp Pathol* 2006, 134: 171-181.
- Johnson CJ, Pedersen JA, Chappell RJ, McKenzie D, Aiken JM. Oral transmissibility of prion disease is enhanced by binding to soil particles. *PLoS Pathog* 2007, 3:e93. doi:10.1371/journal.ppat.0030093.
- Johnson CJ, Phillips KE, Schramm PT, McKenzie D, Aiken JM, Pedersen JA. Prions adhere to soil minerals and remain infectious. *PLoS Pathog* 2006, 2:e32.
- Kaneko K, Zulianello L, Scott M, Cooper CM, Wallace AC, James TL, Cohen FE, Prusiner SB. Evidence for protein X binding to a discontinuous epitope on the cellular prion protein during scrapie prion propagation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997, 94: 10069-1074.
- Khalili-Shirazi A, Summers L, Linehan J, Mallinson G, Anstee D, Hawke S, Jackson GS, Collinge J. PrP glycoforms are associated in a strain-specific ratio in native PrP^{Sc}. *J. Gen. Virol*. 2005, 86: 2635–2644.
-

- Kimberlin RH, Cole S, Walker CA. Temporary and permanent modifications to a single strain of mouse scrapie on transmission to rats and hamsters. *J Gen Virol* 1987, 68: 1875-1881.
- Kimberlin RH, Walker CA, Fraser H. The genomic identity of different strains of mouse scrapie is expressed in hamsters and preserved on reisolation in mice. *J Gen Virol* 1989, 70: 2017-2025.
- Kimberlin RH. Scrapie agent: prions or virinos? *Nature* 1982, 297:107-108.
- Konold T, Moore SJ, Bellworthy SJ, Simmons HA. Evidence of scrapie transmission via milk. *BMC Vet Res* 2008, 1: 14.
- Krakauer DC, Pagel M, Southwood TR, Zanotto PM. Phylogenesis of prion protein. *Nature* 1996, 380: 675.
- Kurosaki Y, Ishiguro N, Horiuchi M, Shinagawa M. Polymorphisms of caprine PrP gene detected in Japan. *Japan Soc Vet Scien* 2005, 67: 321-323.
- Lacroux C, Simon S, Benestad SL, Maillet S, Mathey J, Lugan S, Corbière F, Cassard H, Costes P, Bergonier D, Weisbecker JL, Moldal T, Simmons H, Lantier F, Feraudet-Tarisse C, Morel N, Schelcher F, Grassi J, Andréoletti O. Prions in Milk from Ewes Incubating Natural Scrapie. *PLoS Pathogens* 2008, 4(12): e1000238.
- Laplanche JL, Chatelain J, Westaway D, Thomas S, Dussaucy M, Brugere-Picoux J, Launay JM. PrP polymorphisms associated with natural scrapie discovered by denaturing gradient gel electrophoresis. *Genomics* 1993, 15: 30-37.
- Lasmezas CL, Deslys JP, Robain O, Jaegly A, Beringue V, Peyrin JM, Hauw J, Rossier J, Dormont D. Transmission of the BSE agent to mice in the absence of detectable abnormal prion protein. *Science*, 1997, 275: 402-405.
- Legname G, Baskakov IV, Nguyen HO, Riesner D, Cohen FE, DeArnold SJ, Prusiner SB. Synthetic mammalian prions. *Science* 2004, 305: 673-676.
- Leontides S, Psychas V, Billinis C, Argyroudis S, Papadopoulos O The first cases of scrapie in goats in Greece. *Proceedings 8th Hellenic Veterinary Congress*, 1999, pp. 200.
- Leontides S, Psychas V, Argyroudis S, Giannati-Stefanou A, Paschaleri-Papadopoulou E, Manousis T, Sklaviadis T. A survey of more than 11 years of neurologic diseases of ruminants with special reference to transmissible
-

spongiform encephalopathies (TSEs) in Greece. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* 2000, 47: 303-309.

Lewis P, Zaykin D. GDA User's manual. 2002.

Liberski PP, Jaskólski M. Prion Diseases: a dual view of the prion hypothesis as seen from a distance. *Acta Neurobiol Exp* 2002, 62: 197-226.

Liemann S, Glockshuber R. Influence of amino acid substitutions related to inherited human prion diseases on the thermodynamic stability of the cellular prion protein. *Biochem* 1999, 38: 3258-3267.

Ligios C, Sigurdson CJ, Santucci C, Carcassola G, Manco G, Basagni M, Maestrone C, Cancedda MG, Madau L, Aguzzi A. PrP^{Sc} in mammary glands of sheep affected by scrapie and mastitis. *Nat Med* 2005, 11: 1137-1138.

Lühken G, Buschmann A, Brandt H, Eiden M, Groschup MH, Erhardt G. Epidemiological and genetical differences between classical and atypical scrapie cases. *Vet Res* 2007, 38: 65-80.

Lugaresi E, Medori R, Montagna P, Baruzzi A, Cortelli P, Lugaresi A, Tinuper P, Zucconi M, Gambetti P. Fatal familial insomnia and dysautonomia with selective degeneration of thalamic nuclei. *N Engl J Med* 1986, 315: 997-1003.

Lysek DA, Schorn C, Nivon LG, Esteve-Moya V, Christen B, Calzolari L, von Schroetter C, Fiorito F, Herrmann T, Güntert P, Wüthrich K. Prion protein NMR structures of cats, dogs, pigs, and sheep. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005, 102: 640-645.

Mabbot N and Bruce M. The immunobiology of TSE diseases. *J Gen Virol* 2001, 82: 2307-2318.

Manuelidis L, Murdoch G, Manuelidis EE. Potential involvement of retroviral elements in human dementias. *Ciba Foundation Symposium* 1988, 135: 117-129.

Manuelidis L. A 25nm virion is the likely cause of transmissible spongiform encephalopathies. *J Cell Biochemistry* 2006, 100: 897-915.

Mathiason C, Hays S, Hayes-Klug J, Powers J, Mason G, Hoover E. Tracking prion infectivity in the blood of deer with chronic wasting disease. *PRION2008*, Madrid 2008, pp.73.

Maxam M and Gilbert W. "A new method for sequencing DNA". *Proc Natl Acad Sci USA* 1977, 74: 560-564.

- May BC, Govaerts C, Prusiner SB, Cohen FE. Prions: so many fibers, so little infectivity. *Trends Biochem Sci* 2004, 29: 162-165.
- McGowan JP. Scrapie in sheep. *Scottish J Agric* 1922, 5: 365-375.
- Meggendorfer F. Klinische und genealogische Beobachtungen bei einem Fall von spastischer Pseudosklerose. *Z Ges Neurol Psychiat* 1930, 128: 337.
- Moreno CR, Moazami-Goudarzi K, Laurent P, Cazeau G, Andreoletti O, Chadi S, Elsen JM, Calavas D. Which PrP haplotypes in a French sheep population are the most susceptible to atypical scrapie? *Arch Virol* 2007, 152: 1229-1232.
- Moser M, Colello RJ, Pott U, Oesch B. Developmental expression of the prion protein in glial cells. *Neuron* 1995, 14: 509-517.
- Moum T, Olsaker I, Hopp P, Moldal T, Valheim M, Moum T, Benestad SL. Polymorphisms at codons 141 and 154 in the ovine prion protein gene are associated with scrapie Nor98 cases. *J Gen Virol* 2005, 86: 231-235.
- Mullis KB and Faloona F. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Meth Enzymol* 1987, 155: 335-350.
- Muyzer G, de Waal EC, Uitterlinden AG: Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl Environ Microbiol.* 1993, 59:695-700.
- Myers RM, Fischer SG, Lerman LS, Maniatis T: Nearly all single base substitutions in DNA fragments joined to a GC-clamp can be detected by denaturing gradient gel electrophoresis. *Nucl Acid Res* 1985b, 13: 3131-3145.
- Myers RM, Fischer SG, Maniatis T, Lerman LS: Modification of the melting properties of duplex DNA by attachment of a GC-rich DNA sequence as determined by denaturing gradient gel electrophoresis. *Nucl Acid Res* 1985a, 13: 3111-3129.
- Narang HK, Asher DM, Gajdusek DC. Evidence that DNA is present in abnormal tubulofilamentous structures found in scrapie. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988, 85: 3575-3579.
- Narang HK. Evidence that homologous ssDNA is present in scrapie, Creutzfeldt-Jakob disease, and bovine spongiform encephalopathy. *Ann N Y Acad Sci.* 1994, 6: 314-326.
-

- Narang HK. Evidence that single-stranded DNA wrapped around the tubulofilamentous particles termed "nemaviruses" is the genome of the scrapie agent. *Res Virol*, 1998, 149: 375-382.
- Nentwig A, Oevermann A, Heim D, Botteron C, Zellweger K, Drogemuller C, Zurbriggen A, Seuberlich T. Diversity in neuroanatomical distribution of abnormal prion protein in atypical scrapie. *PLoS pathogens* 2007, 3: e82.
- Nonno R, Di Bari MA, Cardone F, Vaccari G, Fazzi P, Dell'Omo G, Cartoni C, Ingrosso L, Boyle A, Galeno R, Sbriccoli M, Lipp HP, Bruce M, Pocchiari M, Agrimi U. Efficient transmission and characterization of Creutzfeldt-Jakob disease strains in bank voles. *PLoS Pathog* 2006 2: e12.
- Nonno R, Esposito E, Vaccari G, Conte M, Marcon S, Di Bari M, Ligios C, Di Guardo G, Agrimi U. Molecular analysis of cases of Italian sheep scrapie and comparison with cases of bovine spongiform encephalopathy (BSE) and experimental BSE in sheep. *J Clin Microbiol*. 2003, 41:4127-33.
- Oesch B, Westaway D, Wälchli M, McKinley MP, Kent SB, Aebersold R, Barry RA, Tempst P, Teplow DB, Hood LE. A cellular gene encodes scrapie PrP27-30 protein. *Cell* 1985, 40: 735-746.
- OIE. Organisation Internationale d' Epizooties. WAHID (World Animal Health Identification Database). 2008.
http://www.oie.int/wahis/public.php?page=disease_status_map
- Onodera T and Saeki K. Japanese scrapie cases. *Jpn J Infect Dis* 2000, 53: 56-61.
- Onodera T, Ikeda T, Muramatsu Y, Shinagawa M. Isolation of scrapie agent from the placenta of sheep with natural scrapie in Japan. *Microbiol Immunol* 1993, 37: 311-316.
- Palmer MS, Mahal SP, Campbell TA, Hill AF, Sidle KC, Laplanche JL, Collinge J. Deletions in the prion protein gene are not associated with CJD. *Hum Mol Genet* 1993, 2: 541-544.
- Pammer J, Cross HS, Frobert Y, Tschachler E, Oberhuber G. The pattern of prion-related protein expression in the gastrointestinal tract. *Virchows Arch* 2000, 436: 466-472.
- Papasavva-Stylianou P, Kleanthous M, Toumazos P, Mavrikiou P, Loucaides P. Novel polymorphisms at codons 146 and 151 in the prion protein gene of Cyprus goats, and their association with natural scrapie. *Vet J* 2007, 173: 459-462.
-

- Parchi P, Capellari S, Chin S, Schwarz HB, Schechter NP, Butts JD, Hudkins P, Burns DK, Powers JM, Gambetti P. A subtype of sporadic prion disease mimicking fatal familial insomnia. *Neurol* 1999, 52: 1757-1763.
- Parry HB. Scrapie disease in sheep. Oppenheimer DR, Academic Press, London, 1983.
- Parry HB. Scrapie: a transmissible and hereditary disease of sheep. *Hered* 1962, 17: 75-105.
- Pattison IH, Gordon WS, Millson GC. Experimental production of scrapie in goats. *J Comp Pathol* 1959, 69: 300-312.
- Pattison, IH, Millson GC. Scrapie produced experimentally in goats with special reference to the clinical syndrome. *J Comp Pathol* 1961, 71:101–108.
- Post K, Riesner D, Walldorf V, Mehlhorn H. Fly larvae and pupae as vectors for scrapie. *Lancet* 1999, 354: 1969-70.
- Priola SA, Chesebro B, Caughey B. Biomedicine. A view from the top- prion diseases from 10,000 feet. *Science* 2003, 300: 917-919.
- Prusiner SB, Scott M, Foster D, Pan KM, Groth D, Mirinda C, Torchia M, Yang SL, Serban D, Carlson GA, et al. Transgenic studies implicate interactions between homologous PrP isoforms in scrapie prion replication. *Cell* 1990, 63: 673-686.
- Prusiner SB. Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. *Science* 1982, 216: 136-144.
- Prusiner SB. Prion diseases and the BSE crisis. *Science* 1997, 278: 245-251.
- Prusiner SB. The prion diseases. *Sci Am* 1995, 272: 48-57.
- Raymond M, Rousset F. GENEPOP Version 1.2: population genetics software for exact tests and ecumenicism. *J. Hered.* 1995, 86: 248-249.
- Regensbogenova M, Pristas P, Javorsky P, Moon-van der Staay SY, van der Staay GW, Hackstein JH, Newbold CJ, McEwan NR. Assessment of ciliates in the sheep rumen by DGGE. *Let Appl Microbiol* 2004, 39: 144-147.
- Riek R, Hornemann S, Wider G, Billeter M, Glockshuber R, Wüthrich K. NMR structure of the mouse prion protein domain PrP(121-321). *Nature* 1996, 382: 180-182.
- Robinson MM. Transmissible encephalopathies and biopharmaceutical production. *Dev Biol Stand* 1996, 88: 237-241.
-

- Rousset F, Raymond M. Testing heterozygote excess and deficiency. *Genetics* 1995, 140: 1413-1419.
- Rousset F. Genepop'007: a complete reimplementation of the Genepop software for Windows and Linux. *Mol. Ecol. Notes* 2007, 8: 103–106.
- Saborio GP, Permanne B, Soto C. Sensitive detection of pathological prion protein by cyclic amplification of protein misfolding. *Nature* 2001, 411: 810-813.
- Safar JG, Kellings K, Serban A, Groth D, Cleaver JE, Prusiner SB, Riesner D. Search for a prion-specific nucleic acid. *J Virol* 2005, 79: 10796-1806.
- Safar JG, Lessard P, Tamgüney G, Freyman Y, Deering C, Letessier F, Dearmond SJ, Prusiner SB. Transmission and detection of prions in feces. *J Infect Dis.* 2008, 198: 81-89.
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors, *Proc Natl Acad Sci USA* 1977, 74: 5463-5467.
- Saunders GC, Cawthraw S, Mountjoy SJ, Hope J, Windl O. PrP genotypes of atypical scrapie cases in Great Britain. *J Gen Virol* 2006, 87: 3141-3149.
- Sbaiz L, Peletto S, Riina MV, Mirisola A, Maniaci MG, Ru G, Bossers A, Maroni A, Moda G, Caramelli M, Acutis PL. Prion protein genotyping of minor italian ovine breeds. Book of abstracts, PRION2004, Paris 2004.
- Schmerr MJ, Jenny AL, Bulgin MS, Miller JM, Hamir AN, Cutlip RC, Goodwin KR. Use of capillary electrophoresis and fluorescent labeled peptides to detect the abnormal prion protein in the blood of animals that are infected with a transmissible spongiform encephalopathy. *J Chromatogr A* 1999, 853: 207-214.
- Scott M, Foster D, Mirenda C, Serban D, Coufal F, Wälchli M, Torchia M, Groth D, Carlson G, DeArmond SJ, et al. Transgenic mice expressing hamster prion protein produce species-specific scrapie infectivity and amyloid plaques. *Cell* 1989, 59: 847-857.
- Scott M, Groth D, Foster D, Torchia M, Yang SL, DeArmond SJ, Prusiner SB. Propagation of prions with artificial properties in transgenic mice expressing chimeric PrP genes. *Cell* 1993, 73: 979-988.
- Seuberlich T, Botteron C, Benestad SL, Brunisholz H, Wyss R, Kihm U, Schwermer H, Friess M, Nicolier A, Heim D, Zurbriggen A. Atypical scrapie in a Swiss goat and implications for transmissible spongiform encephalopathy surveillance. *J Vet Diagn Invest* 2007, 19: 2-8.
-

- Sheffield VC, Cox DR, Lerman LS, Myers RM: Attachment of a 40-base-pair G + C-rich sequence (GC-clamp) to genomic DNA fragments by the polymerase chain reaction results in improved detection of single-base changes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989, 86: 232-236.
- Sigurdsson B. Rida- a chronic encephalitis of sheep: with general remarks on onfections which develop slowly and some of their special characteristics. *Br Vet J* 1954, 110: 341-354.
- Silveira JR, Raymond GJ, Hughson AG, Race RE, Sim VL, Hayes SF, Caughey B. The most infectious prion protein particles. *Nature* 2005, 437: 257-261.
- Sklaviadis TK, Manuelids L, Manuelidis EE. Physical properties of the Creutzfeldt-Jakob disease agent. *J Virol* 1989, 63: 1212-1222.
- Sofianidis G, Psychas V, Billinis C, Spyrou V, Argyroudis S, Papaioannou N, Vlemmas I. Histopathological and immunohistochemical features of natural goat scrapie. *J Comp Pathol* 2006, 135: 116-129.
- Sofianidis G, Psychas V, Billinis C, Spyrou V, Argyroudis S, Vlemmas G. Atypical PrP^{Sc} Distribution in goats naturally affected with scrapie. *J Comp Pathol* 2008, 138: 90-101.
- Soler L, Caffrey P, McMahon HEM. Effects of new amphotericin analogues on the scrapie isoform of the prion protein. *Biochimi Biophys Acta* 2008, 1780: 1162–1167.
- Somerville RA. Host and transmissible spongiform encephalopathy agent strain control glycosylation of PrP. *J GenViro*, 1999, 80: 1865–1872.
- Soto C and Castilla J. The controversial protein-only hypothesis of prion propagation. *Nat Med.* 2004, 10 Suppl: S63-67.
- Stahl N, Baldwin MA, Burlingame AL, Prusiner SB. Identification of glycoinositol phospholipid linked and truncated forms of the scrapie prion protein. *Biochem* 1990, 29: 8879-8885.
- Stamp JT, Brotherston JG, Zlotnik I, Mackay JM, Smith W. Further studies on scrapie. *J Comp Pathol* 1959, 69: 268-80.
- Stemshorn BW. [Case of scrapie in a goat]. *Can Vet J* 1975, 16: 84-86.
- Telling GC, Scott M, Mastrianni J, Gabizon R, Torchia M, Cohen FE, DeArmond SJ, Prusiner SB. Prion propagation in mice expressing human and chimeric PrP
-

transgenes implicates the interaction of cellular PrP with another protein. *Cell* 1995, 83: 79-90.

Thorgeirsdottir S, Sigurdarson S, Thorisson H.M, Georgsson G, Palsdottir A PrP gene polymorphism and natural scrapie in Icelandic sheep. *J Gen Virol* 1999, 80: 2527–2534.

Toumazos P and Alley MR. Scrapie in goats in Cyprus. *N Z Vet J* 1989, 37: 160-162.

Tranulis MA, Osland A, Bratberg B, Ulvund MJ. Prion protein gene polymorphisms in sheep with natural scrapie and healthy controls in Norway. *J Gen Virol* 1999, 80: 1073–1077.

Vaccari G, Conte M, Morelli L, Di Guardo G, Petraroli R, Agrimi U. Primer extension assay for prion protein genotype determination in sheep. *Mol Cell Probes* 2004, 18: 33-37.

Vaccari G, Di Bari MA, Morelli L, Nonno R, Chiappini B, Antonucci G, Marcon S, Esposito E, Fazzi P, Palazzini N, Troiano P, Petrella A, Di Guardo G, Agrimi U. Identification of an allelic variant of the goat PrP gene associated with resistance to scrapie. *J Gen Virol* 2006, 87: 1395-1402.

Vaccari G, Petraroli R, Agrimi U, Eleni C, Perfetti MG, Di Bari MA, Morelli L, Ligios C, Busani L, Nonno R, Di Guardo G. PrP genotype in Sarda breed sheep and its relevance to scrapie. Brief report. *Arch Virol* 2001, 146: 2029-2037.

Valdez RA, Rock MJ, Anderson AK, O'Rourke KI. Immunohistochemical detection and distribution of prion protein in a goat with natural scrapie. *J Vet Diagn Invest* 2003, 15: 157-162.

Vascellari M, Nonno R, Mutinelli F, Bigolaro M, Di Bari MA, Melchiotti E, Marcon S, D'Agostino C, Vaccari G, Conte M, De Grossi L, Rosone F, Giordani F, Agrimi U. PrP^{Sc} in salivary glands of scrapie-affected sheep. *J Virol*. 2007, 81: 4872-4876.

Weissmann C. A 'unified theory' of prion propagation. *Nature* 1991, 352: 679-683.

Wells GA, Scott AC, Johnson CT, Gunning RF, Hancock RD, Jeffrey M, Dawson M, Bradley R. A novel progressive spongiform encephalopathy in cattle. *Vet Rec* 1987, 121: 419-420.

- Westaway D, Cooper C, Turner S, Da Costa M, Carlson GA, Prusiner SB. Structure and polymorphism of the mouse prion protein gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994, 91: 6418-6422.
- Westaway D, Zuliani V, Miranda-Cooper C, DaCosta M, Neuman S, Jenny AL, Detwiler L, Prusiner SB. Homozygosity for prion protein alleles encoding glutamine-171 renders sheep susceptible to natural scrapie. *Genes Dev* 1994, 8: 959-969.
- White S, Herrmann-Hoesing L, O'Rourke K, Waldron D, Rowe J, Alverson J. Prion gene (PRNP) haplotype variation in United States goat breeds (Open Access publication). *Genet Sel Evol* 2008, 40: 553-561.
- Will RG, Ironside JW, Zeidler M, Cousens SN, Estibeiro K, Alperovitch A, Poser S, Pocchiari M, Hofman A, Smith PG. A new variant of Creutzfeldt-Jakob disease in the UK. *Lancet* 1996, 347: 921-925.
- Williams ES and Young S. Chronic wasting disease of captive mule deer: a spongiform encephalopathy. *J Wildl Dis* 1980, 16: 89-98.
- Wisniewski HM, Sigurdarson S, Rubenstein R, Kascsak RJ, Carp RI. Mites as vectors for scrapie. *Lancet* 1996, 347:1114.
- Wood JL, Done SH. Natural scrapie in goats: neuropathology. *Vet Rec* 1992a, 131: 93-96.
- Wood JL, McGill IS, Done SH, Bradley R. Neuropathology of scrapie: a study of the distribution patterns of brain lesions in 222 cases of natural scrapie in sheep, 1982-1991. *Vet Rec* 1997, 140: 167-173.
- Wood JN, Done SH, Pritchard GC, Wooldridge MJ. Natural scrapie in goats: case histories and clinical signs. *Vet Rec* 1992b, 131: 66-68.
- Wopfner F, Weidenhöfer G, Schneider R, von Brunn A, Gilch S, Schwarz TF, Werner T, Schätzl HM. Analysis of 27 mammalian and 9 avian PrPs reveals high conservation of flexible regions of the prion protein. *J Mol Biol* 1999, 289: 1163-1178.
- Wrathall AE, Holyoak GR, Parsonson IM, Simmons HA. Risks of transmitting ruminant spongiform encephalopathies (prion diseases) by semen and embryo transfer techniques. *Theriogenol* 2008, 70: 725-745.
- Wu Y, Hayes VM, Osinga J, Mulder IM, Looman MW, Buys CH, Hofstra RM: Improvement of fragment and primer selection for mutation detection by denaturing gradient gel electrophoresis. *Nucl Acid Res* 1998, 26: 5432-5440.
-

- Wyatt JM, Pearson GR, Smerdon TN, Gruffydd-Jones TJ, Wells GA, Wilesmith JW. Spongiform encephalopathy in a cat. *Vet Rec* 1990, 126: 513.
- Zanusso G, Casalone C, Acutis P, Bozzetta E, Farinazzo A, Gelati M, Fiorini M, Forloni G, Sy MS, Monaco S, Caramelli M. Molecular analysis of iatrogenic scrapie in Italy. *J Gen Virol* 2003, 84: 1047-1052.
- Zhang L, Li N, Fan B, Fang M, Xu W. PRNP polymorphisms in Chinese ovine, caprine and bovine breeds. *Anim Genet* 2004, 35: 457-461.
- Zhou RY, Li XL, Li LH, Wang HY, Lu JG. Polymorphism of the PRNP gene in the main breeds of indigenous Chinese goats. *Arch Virol* 2008, 153: 979-982.
- Zigas V and Gajdusek DC. Kuru: clinical study of a new syndrome resembling paralysis agitans in natives of the Eastern Highlands of Australian New Guinea. *Med J Aust* 1957, 2: 245-254.
- Zijngel V, Welling WG, Degener JE, van Winkelhoff AJ, Abbas F, Harmsen HJM. Denaturing gradient gel electrophoresis as a diagnostic tool in periodontal microbiology. *J Clin Microbiol* 2006, 44: 3628–3633.
- Zlotnik IK and Katiyar RD. The occurrence of scrapie disease in sheep of the remote Himalayan foot hills. *Vet Rec* 1961, 73: 543-544.
- Zlotnik I. The histopathology of the brain of goats affected with scrapie. *J Comp Pathol* 1961, 71: 444-448.
- Zlotnik I. The pathology of scrapie: A comparative study of the lesions in the brain of sheep and goats. *Acta Neuropathol* 1962, Suppl. 1: 6170.
- Zygoiannis D and Katsaounis N. Milk yield and milk composition of indigenous goats in Greece. *Anim Product* 1986, 42: 365-374.

Ελληνική βιβλιογραφία

- Αγγελοπούλου Κ. Βασικές αρχές μοριακής βιολογίας. Εκδόσεις Αριστοτέλειου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης, 2004.
- Αικατερινιάδου Λ, Ξυλούρη Ε, Γεωργακίλας Ε, Κρητικός Ι, Κανατά Ε, Φραγκιαδάκη Ε, Σκλαβιάδης Θ. Μελέτη για την ανίχνευση των Scrapie-
-

ευαίσθητων προβάτων σε βιολογικές εκτροφές της Ελλάδας. 21ο Ετήσιο Συνέδριο της Ελληνικής Ζωοτεχνικής Εταιρείας. Βέροια, 5-7 Οκτωβρίου 2005.

Γκουργκούλης Μιχαήλ. Γενετική δομή των εγχώριων πληθυσμών αιγών (*Capra aegagrus forma hircus*). Διδακτορική διατριβή 1999. Τμήμα Ζωικής Παραγωγής, Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών.

EK 999/2001. Θέσπιση κανόνων πρόληψης, καταπολέμησης και εξάλειψης ορισμένων Μεταδοτικών Σπογγωδών Εγκεφαλοπαθειών. Τροποποιήσεις από EK 727/2007, EK 722/2007, EK 1428/2007, EK 21/2008.
<http://www.minagric.gr//greek/2.3.1.menu.html>

Ευρωπαϊκή Επιτροπή (European Commission). Cumulative TSE testing in goats since 2002. (2008a)
http://ec.europa.eu/food/food/biosafety/bse/mthly_gt_cml_reps_tse2002_en.pdf

Ευρωπαϊκή Επιτροπή (European Commission). Cumulative TSE testing in sheep since 2002 [on line] (2008b)
http://ec.europa.eu/food/food/biosafety/bse/mthly_sh_cml_reps_tse2002_en.pdf

Ευρωπαϊκή Επιτροπή (European Commission). Report on the monitoring and testing of ruminants for the presence of transmissible spongiform encephalopathy (TSE) in the EU in 2007. (2007)
http://ec.europa.eu/food/food/biosafety/bse/annual_report_2007_en.pdf

Ελληνική Δημοκρατία, Υπουργείο Αγροτικής Αναπτυξης και Τροφίμων, Γενική Διεύθυνση Κτηνιατρικής, Τμήμα Λοιμωδών Νοσημάτων. Πρόγραμμα Επιτήρησης, Ελέγχου και Εξάλειψης των Μεταδοτικών Σπογγωδών Εγκεφαλοπαθειών (ΜΣΕ) στα μικρά μηρυκαστικά. Αρ. Πρωτ. 258577/ 08-02-2008, Αθήνα. <http://www.minagric.gr//greek/2.3.1.menu.html>

Ζυγογιάννης Δ, Κατσαούνης Ν. Γιδοτροφία. 1992, Α' Εκδόση, Θεσσαλονίκη.

Κανονισμός (ΕΟΚ) αριθ. 2092/91 του Συμβουλίου των Ευρωπαϊκών Κοινοτήτων (EE L 198 της 22.7.1991). «Περί του βιολογικού τρόπου παραγωγής γεωργικών προϊόντων και των σχετικών ενδείξεων στα γεωργικά προϊόντα και στα είδη διατροφής». 24 Ιουνίου 1991.

Κουτσούκου-Χαρτώνα Ε, Παλάσκα Β, Ρίζου Σ, Τσιμπανούδη Σ. Τρομώδης Νόσος των προβάτων και των αιγών (Scrapie), εμφάνιση της νόσου στην ελληνική επικράτεια. Πρακτικά του 10ο Πανελληνίου Κτηνιατρικού Συνεδρίου, 2006, σελ. 233.

Κουτσούκου-Χαρτώνα Ε. Ημερίδα για ΜΣΕ στα μικρά μηρυκαστικά. Ξενοδοχείο Porto Palace, Θεσσαλονίκη, Σεπτέμβριος 2008.

Παπασάββα-Στυλιανού Πηνελόπη: Ο γονότυπος της prion-πρωτεΐνης των προβάτων της Κύπρου και η σχέση του με την Τρομώδη Νόσο (scrapie). Διδακτορική διατριβή 2003. Τμήμα Κτηνιατρικής, Σχολή Γεωτεχνικών Επιστημών, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης.

Τουμάζος Παύλος: Τρομώδης Νόσος των αιγοπροβάτων. Παθογένεια-αλλοιώσεις-διάγνωση. Διδακτορική διατριβή 2000. Τμήμα Κτηνιατρικής, Σχολή Γεωτεχνικών Επιστημών, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης.

Ψηφίδα Α, Δόβας Χ, Μπασδαγιάννη Ζ, Μπάνος Γ. Ανάπτυξη νέας μεθόδου προσδιορισμού της γενετικής σύστασης ενός ποιμνίου προβάτων ως προς την ανοχή στη Scrapie χρησιμοποιώντας την αλυσιδωτή αντίδραση της λιγάσης με ανίχνευση σε πραγματικό χρόνο συμβάντων. Πρακτικά του 9ου Πανελληνίου Συνεδρίου Ιολογίας, Αθήνα, 20-22 Νοεμβρίου 2008, σελ. 83.

IX. ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

Capillary electrophoresis= ηλεκτροφόρηση σε τριχοειδές

DGGE= Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (Ηλεκτροφόρηση πηκτής με διαβαθμισμένη αποδιατακτική σύσταση)

Prnp^{0/0}= διαγονιδιακά ποντίκια, όπου έχει κατασταλεί το Prnp γονίδιο

Prnp= γονίδιο της prion πρωτεΐνης στα ζώα

PRNP= γονίδιο της prion πρωτεΐνης στον άνθρωπο

PrP= prion πρωτεΐνη

PrP^{Sc}= το ανθεκτικό τμήμα της PrP^{Sc} που προκύπτει μετά από την επεξεργασία της με πρωτεΐνάση-K και έχει μοριακό βάρος 27-30 kDa.

PrP^c= φυσιολογική-κυτταρική prion πρωτεΐνη

PrP^{Sc}= παθολογική-μολυσματική prion πρωτεΐνη

RFLP= Restriction Fragment Length Polymorphisms (Πολυμορφισμοί Τεμαχίων Περιορισμένου Μήκους)

Sequencing= ανάλυση της αλληλουχίας του DNA

ΓΦΙ-‘άγκυρα’= Γλυκολ-ΦωσφατιδυλΙνοσιτολική (ΓΦΙ)-‘άγκυρα’ (ή Glycol-Phosphatidyl-Inositol anchor ή GPI-anchor)

bp= ζεύγη βάσεων νουκλεοτιδίων (base pairs)

ΥΠΑΑΤ= Υπουργείο Αγροτικής Ανάπτυξης και Τροφίμων

ΕΕΑ-ΜΣΕ= Εθνικό Κέντρο Αναφοράς Μεταδοτικών Σπογγωδών Εγκεφαλοπαθειών

ΑΑΠ=Αλυσιδωτή Αντίδραση της Πολυμεράσης (PCR-Polymerase Chain Reaction)

Western blot= ανοσοκαθίλωση

X. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑΤΑ

Αμινοξύ	Σύμβολο	DNA κωδικόνια
Ισολευκίνη	I	ATT, ATC, ATA
Λευκίνη	L	CTT, CTC, CTA, CTG, TTA, TTG
Βαλίνη	V	GTT, GTC, GTA, GTG
Φαινυλαλανίνη	F	TTT, TTC
Μεθειονίνη	M	ATG
Κυστεΐνη	C	TGT, TGC
Αλανίνη	A	GCT, GCC, GCA, GCG
Γλυκίνη	G	GGT, GGC, GGA, GGG
Προλίνη	P	CCT, CCC, CCA, CCG
Θρεονίνη	T	ACT, ACC, ACA, ACG
Σερίνη	S	TCT, TCC, TCA, TCG, AGT, AGC
Τυροσίνη	Y	TAT, TAC
Τρυπτοφάνη	W	TGG
Γλουταμίνη	Q	CAA, CAG
Ασπαραγίνη	N	AAT, AAC
Ιστιδίνη	H	CAT, CAC
Γλουταμινικό οξύ	E	GAA, GAG
Ασπαρτικό οξύ	D	GAT, GAC
Λυσίνη	K	AAA, AAG
Αργινίνη	R	CGT, CGC, CGA, CGG, AGA, AGG

Παράρτημα 1. Πίνακας συμβολισμού των αμινοξέων του γενετικού κώδικα με τη χρήση του λατινικού αλφάβητου και αντιστοιχία των κωδικευόντων νουκλεοτιδικών αλληλουχιών ανά αμινοξύ (DNA Κωδικόνια).

- ✓ **Neuroprion.** Network of Excellence dedicated to research on prion diseases
The project NeuroPrion was selected by the European Commission under the Thematic Priority 5 “Food Quality and Safety”.
Project no.: FOOD-CT-2004-506579.
<http://www.neuroprion.com/en/home.html>

- ✓ **‘Goat BSE’** EU funded project. FOOD-CT-2006-36353.
<http://www.goatBSE.eu>

- ✓ **‘Genetics and pathogenesis of scrapie in goats’.** INRA/AFSSA funded project.
<http://www.afsaa.fr>

- ✓ **PrioNet Canada.** PrioNet Canada is a Network of Centres of Excellence for research into prions and prion diseases. <http://www.prionetcanada.ca/>

Παράρτημα 2. Σημαντικότερα διεθνή ενεργά δίκτυα που ασχολούνται με την έρευνα των Μεταδοτικών Σπογγωδών Εγκεφαλοπαθειών.

XI. ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

Η Ειρήνη Γ. Φραγκιαδάκη γεννήθηκε στην Αθήνα Αττικής, στις 31/07/1978.

(e-mail: irfrag@yahoo.com)

ΣΠΟΥΔΕΣ

2006-2009: Διδακτορική φοιτήτρια του ΓΠΑ με θέμα διδακτορικής διατριβής «Μελέτη του γονιδίου της πρωτεΐνης p10n σε αίγες υγιείς και με Τρομώδη Νόσο».

2005: Απόκτηση Μεταπτυχιακού Τίτλου Σπουδών στη «Ζωική Παραγωγή», από το ΓΠΑ, με βαθμό Άριστα. Θέμα μεταπτυχιακής διατριβής «Προσδιορισμός της διασποράς των παθογόνων μυκοβακτηρίων με χρήση μοριακών τεχνικών σε βιολογικές εκτροφές ορνιθίων κρεοπαραγωγής στην Ελλάδα».

2003: Αποφοίτηση από το Τμήμα Κτηνιατρικής, της Σχολής Γεωτεχνικών Επιστημών του Αριστοτελείου Παν/μίου Θεσ/νίκης με βαθμό πτυχίου “Λίαν καλώς” επτα (7), στις 18 Μαρτίου 2003.

ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ

1. Απομόνωση, χαρακτηρισμός και αλληλουχία του ιού Noda σε εκτρεφόμενα λαβράκια (*Dicentrarchus labrax* L.) στην Ελλάδα. Ε. Ξυλούρη, Ι. Κοτζαμάνης, Φ. Αθανασοπούλου, Li Dong, Αλ. Αργυροκαστρίτης, Ε. Φραγκιαδάκη. Περιοδικό της Ελληνικής Κτηνιατρικής Εταιρείας 2005, 56: 105-113.
2. Μυκοβακτηριακές λοιμώξεις των πτηνών. Ανασκόπηση. Ε. Φραγκιαδάκη, Ι. Οικονομόπουλος, Χ. Μπαλάσκας, Μ. Γαζούλη. Περιοδικό Ελληνικής Κτηνιατρικής Εταιρείας 2006, 57: 127-139.
3. Rapid detection of *Arthroderma vanbreuseghemii* in rabbit skin specimens by PCR-RFLP. M. Arabatzis, E. Xylouri, I. Frangiadaki, A. Tzimogianni, A. Milioni, G. Arsenis, A. Velegraki. Eur Soc Vet Dermatol 2006, 17: 322–326.
4. First incidence of clinical signs of Nodavirus infection in sea bream, *Sparus aurata* L..K. Bitchava, E. Xylouri, E. Frangiadaki, F. Athanassopoulou, M. Papanastasopoulou, O. Sabatakou. Isr J Aquacult Bam 2007, 59: 3-9.
5. Comparative evaluation of positive tests to *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in clinically healthy sheep and goats in South-West Greece using molecular techniques, serology and culture. J. Ikonopoulos, C. Balaskas, B.

Kantzoura, E. Fragiadaki, I. Pavlik, M. Bartos, J. C. Lukas, M. Gazouli. Vet J 2007, 174:337-343.

6. Prion protein gene (PrP) polymorphisms in scrapie affected indigenous Greek goats (*Capra prisca*). E. Fragiadaki, L. Ekateriniadou, E. Koutsoukou- Chartona, A. Kominakis, E. Rogdakis, E. Xylouri. XIII International Congress on Animal Hygiene, Tartu, Estonia, 16-21 June 2007, proceedings, 1: 448-451.

7. Estimation of the spread of pathogenic mycobacteria in organic broiler farms by the polymerase chain reaction. J. Ikonomopoulos, E. Fragiadaki, E. Liandris, K. Sotirakoglou, E. Xylouri, J.M. Gazouli. Vet Microbiol 2008, doi:10.1016/j.vetmic.2008.07.006.

ΒΡΑΒΕΙΑ-ΥΠΟΤΡΟΦΙΕΣ

- Πρώτο βραβείο Poster παρουσίασης με τίτλο: “Estimation of the prevalence of pathogenic mycobacteria in organic broiler farms in Greece by the Polymerase Chain Reaction.” E. Fragiadaki, M. Gazouli, K. Sotirakoglou, E. Xylouri, J. Ikonomopoulos. XIIth International Congress on Animal Hygiene, ISAH, Βαρσοβία, Πολωνία. 4-8 Σεπτεμβρίου 2005.
 - Υποτροφία Ιδρύματος Κρατικών Υποτροφιών (Ι.Κ.Υ) για μεταπτυχιακές σπουδές εσωτερικού κατά τα ακαδημαϊκά έτη 2004-2005 και 2006-2009.
-