



Ειδικό πρόγραμμα ελέγχου για τον ιό του Δυτικού Νείλου και την ελονοσία,
ενίσχυση της επιτήρησης στην ελληνική επικράτεια (MIS 365280)



**«Ειδικό πρόγραμμα ελέγχου για τον ιό του Δυτικού Νείλου και την ελονοσία,
ενίσχυση της επιτήρησης στην ελληνική επικράτεια»**

Παραδοτέο Π1.34

**Έκθεση αποτελεσμάτων της ανάλυσης γενετικών πολυμορφισμών
σε ανθρώπους για τον ιό του ΔΝ**

Υπεύθυνοι φορείς:

Εργαστήριο Γενετικής, Εξελικτικής και Συγκριτικής Βιολογίας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Λάρισα, 2013

Περιεχόμενα

| | |
|-------------------------------|----|
| Εισαγωγή | 3 |
| Μεθοδολογία | 6 |
| Αποτελέσματα | 8 |
| Συμπεράσματα – Συζήτηση | 21 |
| Βιβλιογραφία | 23 |

Εισαγωγή

Η μόλυνση από τον Ιό του Δυτικού Νείλου (WNV) είναι ασυμπτωματική στα περισσότερα άτομα, ενώ μια μειοψηφία εκδηλώνει συμπτώματα που κυμαίνονται από πυρετό (20% των περιπτώσεων) έως πιο σοβαρές νευροεπεκτατικές ασθένειες όπως η εγκεφαλίτιδα, μηνιγγίτιδα, μηνιγγοεγκεφαλίτιδα και οξεία χαλαρή παράλυση (1% των περιπτώσεων) (Mostashari et al. 2001). Η δυναμική ξενιστή-ιού που αποτελεί τη βάση της ανάπτυξης σοβαρών νευρολογικών συμπτωμάτων στη μόλυνση από τον WNV είναι ένα πεδίο έντονης ερευνητικής δραστηριότητας. Παράλληλες μελέτες σε ζώα και ανθρώπους έχουν δείξει ότι τα συστήματα τόσο της φυσικής όσο και της επίκτητης ανοσίας συμμετέχουν στον έλεγχο και την καταπολέμηση του ιού (Diamond et al. 2009). Ωστόσο, κυκλοφορούντες φλεγμονώδεις παράγοντες μπορεί να διευκολύνουν τη διείσδυση του ιού στο κεντρικό νευρικό σύστημα (Wang et al. 2004) και η τοπική φλεγμονώδης αντίδραση που απαιτείται για την καταπολέμηση του ιού έχει συνδεθεί με απώλεια νευρώνων και εμφάνιση κλινικών συμπτωμάτων (Samuel and Diamond 2006). Έχει προταθεί πως τα ρυθμιστικά CD4+ T κύτταρα (Tregs) θα μπορούσαν να διαδραματίσουν προστατευτικό ρόλο με βάση τα υψηλότερα επίπεδά τους σε ασυμπτωματικά άτομα σε σχέση με συμπτωματικά και την αυξημένη θνησιμότητα που προκαλεί η μόλυνση από τον WNV σε ποντίκια ελλειμματικά σε Tregs (Lanteri et al. 2009). Συνεπώς, τα συμπτώματα της μόλυνσης από τον WNV τείνουν να είναι πιο σοβαρά σε ανοσοκατασταλμένα άτομα, γεγονός που υποδηλώνει τη συμμετοχή του ανοσοποιητικού συστήματος στον έλεγχο των μολύνσεων (Kumar et al. 2004). Επιπλέον, οι ηλικιωμένοι και τα WNV θετικά άτομα με υποκείμενες παθήσεις, όπως υπέρταση και διαβήτη, έχουν υψηλότερο κίνδυνο να αναπτύξουν νευροεπεκτατική νόσο σε σύγκριση με άλλα WNV θετικά άτομα (Jean et al. 2007). Επίσης, γενετικές μεταλλάξεις στον υποδοχέα CCR5 (Glass et al. 2006) και στο γονίδιο OAS1 έχουν

συσχετιστεί με την ανάπτυξη σοβαρής νευροεπεκτατικής νόσου (Samuel et al. 2006, Scherbik et al. 2006).

Στόχος

Στο παρόν πρωτόκολλο η ιδέα είναι η συγκριτική ανάλυση γενετικών πολυμορφισμών του μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας (MHC) του χρωμοσώματος 6 σε ασυμπτωματικά και συμπτωματικά WNV θετικά άτομα (Lichtman 2005). Η περιοχή I του MHC κωδικοποιεί μόρια HLA τάξης I, συμπεριλαμβανομένων των HLA-A, HLA-B, και HLA-C, ενώ περιοχή II του MHC κωδικοποιεί για τα μόρια HLA τάξης II, συμπεριλαμβανομένων των HLA-DP, HLA-DQ, και HLA-DR (Lichtman 2005). Αυτές οι πρωτεΐνες αποτελούν βασικές συνιστώσες της επίκτητης ανοσολογικής απόκρισης, λόγω της συμμετοχής τους στην παρουσίαση του αντιγόνου. Στα εμπύρηνια κύτταρα, τα μόρια HLA τάξης I παρουσιάζουν ενδοκυτταρικά αντιγόνα στα CD8+ T κύτταρα, ενώ οι πρωτεΐνες HLA τάξης II παρουσιάζουν εξωκυτταρικά αντιγόνα στα CD4+ T κύτταρα (Lichtman 2005). Επομένως, η επίκτητη ανοσολογική απόκριση του ξενιστή εξαρτάται από την ικανότητα των αντιγόνο-παρουσιαστικών κυττάρων να παρουσιάσουν πεπτίδια, που προέρχονται από τα παθογόνα, στα CD4+ και CD8+ T κύτταρα.

Τα γονίδια που κωδικοποιούν μόρια HLA τάξης I και II είναι σε υψηλό βαθμό πολυμορφικά (Schreuder et al. 2001) γεγονός που συνεπάγεται μικρές διαφοροποιήσεις των αμινοξέων στους βασικούς τομείς του HLA-πεπτιδίου στις θέσεις σύνδεσης (Bade-Doeding et al. 2010) επηρεάζοντας την ικανότητα των πρωτεϊνών HLA να παρουσιάσουν τα ειδικά πεπτίδια που προέρχονται από τα παθογόνα (Elamin et al. 2010, Wang et al. 2010 Axelsson-Robertson et al. 2011). Ως εκ τούτου, η μεγάλη μεταβλητότητα των μορίων HLA μπορεί να μεταφραστεί σε διαφορεική ικανότητα παρουσίασης αντιγόνων προκειμένου να προκληθεί η ανοσολογική απόκριση εναντίον εισβολέων (Huang et al. 2010). Πολλές

μελέτες έχουν αναφέρει συσχετίσεις μεταξύ πολυμορφισμών των HLA και των αποτελεσμάτων μολυσματικών ασθενειών (Louie et al. 1999, Kuhn et al. 2004, Neumann-Haefelin et al. 2006, Hrabec et al. 2007, Kamatani et al. 2009, van Manen et al. 2009), συμπεριλαμβανομένων των ασθενειών από φλαβοϊούς (LaFleur et al. 2002, Zivna et al. 2002, Stephens et al. 2002, Polizel et al. 2004, Sierra et al. 2007, Nguyen et al. 2008, Falcon-Lezama et al. 2009, Appanna et al. 2010).

Επομένως έχει αξία μια σύγκριση των αλληλόμορφων HLA σε ομάδες ατόμων WNV θετικών που είναι ασυμπτωματικοί και συμπτωματικοί. "Ευαίσθητα" αλληλόμορφα HLA αναμένεται να βρίσκονται στατιστικώς συχνότερα σε άτομα με νευροεπεκτατική νόσο σε σχέση με ασυμπτωματικά άτομα. Αντίθετα, τα "προστατευτικά" αλληλόμορφα HLA αναμένεται να εμφανίζονται πιο συχνά σε ασυμπτωματικά άτομα.

Μεθοδολογία

Στην παρούσα μελέτη πραγματοποιήθηκε η συγκριτική ανάλυση γενετικών πολυμορφισμών των γονιδίων HLA-DPA1 εξώνιο 2, HLA-DQA1 εξώνιο 2, HLA-DRB1 εξώνιο 2, του μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας (MHC) και TLR3 εξώνιο 2 σε 23 συμπτωματικά WNV θετικά άτομα και 34 άτομα μάρτυρες.

Γενωμικό DNA απομονώθηκε από περιφερικά μονοπύρρηνα κύτταρα (PBMC) των 57 ατόμων με τη χρήση QIAamp DNeasy Blood and Tissue Kit (Qiagen, Βαλένθια, CA) σύμφωνα με το πρωτόκολλο του κατασκευαστή. Εξειδικευμένοι εκκινητές (primers) χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση των εξωνίων. Τα προϊόντα της PCR ελέγχθηκαν με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 1% και χρώση με βρωμιούχο αιθίδιο. Στη συνέχεια έγινε καθαρισμός με τη χρήση του kit Millipore Multiscreen HTSTM plate (Millipore Corporation, Bedford, MA) και επαναδιάλυση των προϊόντων σε δις απεσταγμένο νερό.

Ανάλυση SSCP (single-strand conformation polymorphism)

Όλα τα δείγματα ελέγχθηκαν για πολυμορφισμό με τη μέθοδο SSCP (single-strand conformation polymorphism). Ειδικότερα, 5μl προϊόντος PCR αναμείχθηκαν με 10μl χρωστικής (95% v/v φορμαμίδη, 10 mM NaOH, 0.05% w/v μπλε της βρωμοφαινόλης, 0.05% w/v xylene cyanol), αποδιατάχθηκαν στους 95°C για 6min, ψύχτηκαν σε πάγο και ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου συγκέντρωσης 10% (37,5:1 acrylamide/bisacrylamide). Η ηλεκτροφόρηση έγινε σε ρυθμιστικό διάλυμα 0,5×TBE σε 220V για 18-20h στους 4°C και τα μονόκλινα μόρια DNA οπτικοποιήθηκαν με χρώση αργύρου. Τα προϊόντα PCR με ίδιο πρότυπο SSCP ομαδοποιήθηκαν και τουλάχιστον δύο αντιπροσωπευτικά δείγματα από κάθε πρότυπο αλληλουχήθηκαν.

Τα προϊόντα της PCR που προέρχονταν από ετεροζυγωτικά άτομα κλωνοποιήθηκαν στον φορέα (vector) pCR2.1 (Invitrogen) και ακολούθως εισήχθησαν σε δεκτικά (competent) κύτταρα *E. coli* στελέχους DH5α (Life Technologies). Τα ανασυνδυασμένα πλασμίδια

απομονώθηκαν με το Kit QIAprep® Spin Miniprep (Qiagen). Τέλος, θα επιλέχθηκαν και αλληλουχήθηκαν τουλάχιστον πέντε ανασυνδυασμένοι θετικοί κλώνοι ανά άτομο.

Στατιστική επεξεργασία των μοριακών δεδομένων - Ανάλυση και συνδυασμένη στατιστική επεξεργασία μοριακών και επιδημιολογικών δεδομένων

Για τη σύγκριση των αλληλουχιών μεταξύ τους, αλλά και με τις ήδη υπάρχουσες στις βάσεις δεδομένων χρησιμοποιήθηκε το προγράμματα ClustalW και BLAST. Οι αλληλομορφικές συχνότητες, οι εκτιμήσεις κατά Νει (1978) της αναμενόμενης (H_e) και παρατηρούμενης (H_o) ετεροζυγωτίας και ο μέσος αριθμός των αλληλομόρφων ανά τόπο πραγματοποιήθηκε με το στατιστικό πακέτο BIOSYS-1. Το στατιστικό πακέτο GENEPOP version 3.2, χρησιμοποιήθηκε για τον έλεγχο των αποκλίσεων των γενοτυπικών συχνοτήτων από τις αναμενόμενες κατά Hardy-Weinberg καθώς και για τον έλεγχο της ανισορροπίας σύνδεσης.

Για να εξεταστεί η συσχέτιση του κάθε αλληλομόρφου με τα αποτελέσματα των μολύνσεων από τον WNV, ελέγχθηκε η συχνότητα των αλληλομόρφων στις δύο ομάδες ατόμων. Η κατανομή των συχνοτήτων συγκρίθηκε ανά δύο με τον έλεγχο χ^2 κατά Fisher με τη χρήση της διαδικασίας FREQ (SAS/STAT 9.1.3) και τα διαστήματα εμπιστοσύνης (CIs) για άτομα με ειδικό αλληλομορφικό φαινότυπο ή αλληλομορφικές συχνότητες υπολογίστηκαν με τη μέθοδο Woolf (1955). Όλες οι πιθανότητες διορθώθηκαν για σύγκριση πολλαπλών δειγμάτων.

Αποτελέσματα

Πραγματοποιήθηκε η συγκριτική ανάλυση γενετικών πολυμορφισμών των γονιδίων HLA-DPA1 εξώνιο 2, HLA-DQA1 εξώνιο 2, HLA-DRB1 εξώνιο 2, του μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας (MHC) και TLR3 εξώνιο 2 σε 23 συμπτωματικά WNV άτομα και 34 άτομα μάρτυρες. Πέντε, έξι, 16 και δύο διαφορετικά αλληλόμορφα αντίστοιχα ανιχνεύτηκαν συνολικά στα 57 άτομα.

Το εξώνιο 2 του γονιδίου DPA1

Τα πέντε αλληλόμορφα που ανιχνεύτηκαν για το εξώνιο 2 του γονιδίου DPA1 (Εικόνα 1) δεν έχουν αναφερθεί στην παγκόσμια βιβλιογραφία και εμφανίζονται για πρώτη φορά στον ελληνικό πληθυσμό. Το αλληλόμορφο DPA1_1 βρέθηκε σε υψηλές συχνότητες και στις δύο πληθυσμιακές ομάδες, ενώ οι συχνότητες των υπολοίπων τεσσάρων αλληλομόρφων κυμάνθηκαν από 0,00 έως 0,013 (Πίνακας 1, Εικόνα 2). Τα ποσοστά ετεροζυγωτίας ήταν ίδια ανάμεσα στις δύο ομάδες (Πίνακας 2).

Σημαντικές διαφορές ανάμεσα στις συχνότητες των αλληλομόρφων μεταξύ των δύο ομάδων εμφάνισαν τα αλληλόμορφα DPA1_2, DPA1_3, DPA1_4, ενώ το αλληλόμορφο DPA1_5 δεν ανιχνεύτηκε στην ομάδα ελέγχου.

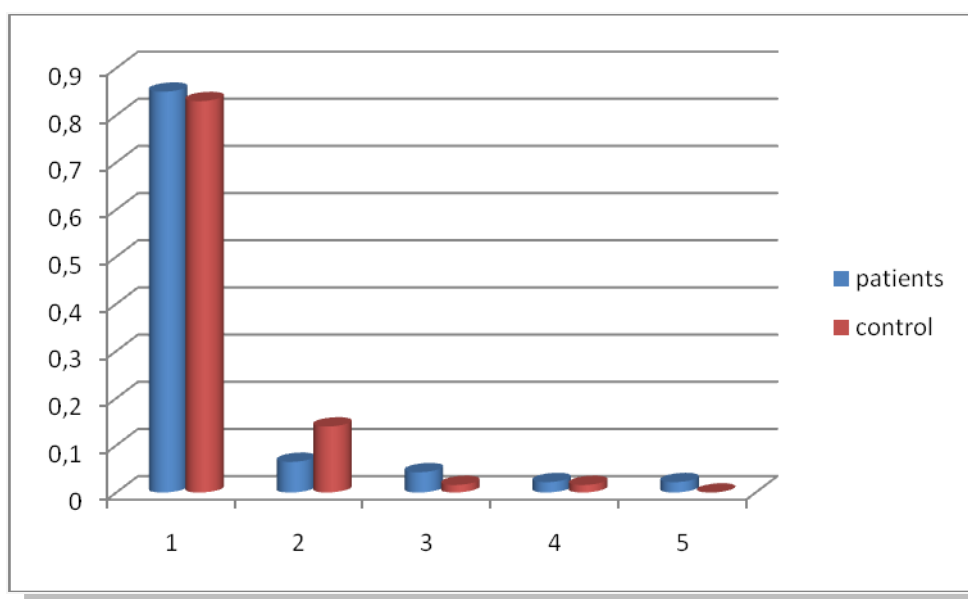
| | 10 | 20 | 30 | 40 | 50 | 60 |
|--------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| | | | | | | |
| DPA1_1 | GACCACTTGC | ATATTCAAAC | TGACATTTTG | TCCTGTTTTT | CTCTACTGTC | TTTATGCAGC |
| DPA1_2 | GACCACTTGC | ATATTCAAAC | TGACATTTTG | TCATGTTTTT | CTCTACTTTC | TTTATGCAGC |
| DPA1_3 | GACCACTTGC | ATATTCAAAC | TGACATTTTG | TCATGTTTTT | CTCTACTTTC | TTTATGCAGC |
| DPA1_4 | GACCACTTGC | ATATTCAAAC | TGACATTTTG | TCATGTTTTT | CTCTACTTTC | TTTATGCAGC |
| DPA1_5 | GACCACTTGC | ATATTCAAAC | TGACATTTTG | TCCTGTTTTT | CTCTACTGTC | TTTATGCAGC |
| | 70 | 80 | 90 | 100 | 110 | 120 |
| | | | | | | |
| DPA1_1 | GGACCATGTG | TCAACTTATG | CCGCGTTTGT | ACAGACGCAT | AGACCAACAG | GGGAGTTTAT |
| DPA1_2 | GGACCATGTG | TCAACTTATG | CCGCGTTTGT | ACAGACC | AGACCAACAG | GGGAGTTTAT |

| | | | | | | | |
|--------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| DPA1_3 | GGACCATGTG | TCAACTTATG | CCATGTTTGT | ACAGACC | CAT | AGACCAACAG | GAGAGTTTAT |
| DPA1_4 | GGACCATGTG | TCAACTTATG | CCGCGTTTGT | ACAGACGCAT | | AGACCAACAG | GGGAGTTTAT |
| DPA1_5 | GGACCATGTG | TCAACTTATG | CCGCGTTTGT | ACAGACGCAT | | AGACCAACAG | GGGAGTTTAT |
| | 130 | 140 | 150 | 160 | 170 | 180 | |
| | | | | | | | |
| DPA1_1 | GTTTGAATTT | GATGAAGATG | AGATGTTCTA | TGTGGATCTG | GACAAGAAGG | AGACCGTCTG | |
| DPA1_2 | GTTTGAATTT | GATGAAGATG | AGCAGTTCTA | TGTGGATCTG | GATAAAAGG | AGACCGTCTG | |
| DPA1_3 | GTTTGAATTT | GATGAAGATG | AGCAGTTCTA | TGTGGATCTG | GATAAGAAGG | AGACCGTCTG | |
| DPA1_4 | GTTTGAATTT | GATGAAGATG | AGCAGTTCTA | TGTGGATCTG | GATAAAAGG | AGACCGTCTG | |
| DPA1_5 | GTTTGAATTT | GATGAAGATG | AGATGTTCTA | TGTGGATCTG | GACAAGAAGG | AGACCGTCTG | |
| | 190 | 200 | 210 | 220 | 230 | 240 | |
| | | | | | | | |
| DPA1_1 | GCATCTGGAG | GAGTTTGGCC | AAGCCTTTTC | CTTTGAGGCT | CAGGGCGGGC | TGGCTAACAT | |
| DPA1_2 | GCATCTGGAG | GAGTTTGGCC | GAGCCTTTTC | CTTTGAGGCT | CAGGGCGGGC | TGGCTAACAT | |
| DPA1_3 | GCATCTGGAG | GAGTTTGGCC | GAGCCTTTTC | CTTTGAGGCT | CAGGGCGGGC | TGGCTAACAT | |
| DPA1_4 | GCATCTGGAG | GAGTTTGGCC | GAGCCTTTTC | CTTTGAGGCT | CAGGGCGGGC | TGGCTAACAT | |
| DPA1_5 | GCATCTGGAG | GAGTTTGGCC | AAGCCTTTTC | CTTTGAGGCT | CAGGGCGGGC | TGGCTAACAT | |
| | 250 | 260 | 270 | 280 | 290 | 300 | |
| | | | | | | | |
| DPA1_1 | TGCTATATTG | AACAACAAC | TGAATACCTT | GATCCAGCGT | TCCAACCACA | CTCAGGCCAC | |
| DPA1_2 | TGCTATATTG | AACAACAAC | TGAATACCTT | GATCCAGCGT | TCCAACCACA | CTCAGGCCGC | |
| DPA1_3 | TGCTATATTG | AACAACAAC | TGAATACCTT | GATCCAGCGT | TCCAACCACA | CTCAGGCCGC | |
| DPA1_4 | TGCTATATTG | AACAACAAC | TGAATACCTT | GATCCAGCGT | TCCAACCACA | CTCAGGCCGC | |
| DPA1_5 | TGCTATATTG | AACAACAAC | TGAATACCTT | GATCCAGCGT | TCCAACCACA | CTCAGGCCGC | |
| | 310 | 320 | 330 | | | | |
| | | | | | | | |
| DPA1_1 | CAACGGTACG | CCCTATCTTT | GCCTCTTCCT | CTGTA | | | |
| DPA1_2 | CAATGGTACT | GCCTATCTTT | GCCTCTTCCT | CTGTA | | | |
| DPA1_3 | CAATGGTACT | GCCTATCTTT | GCCTCTTCCT | CTGTA | | | |
| DPA1_4 | CAATGGTACT | GCCTATCTTT | GCCTCTTCCT | CTGTA | | | |
| DPA1_5 | CAATGGTACT | GCCTATCTTT | GCCTCTTCCT | CTGTA | | | |

Εικόνα 1. Αλληλουχίες και στοίχιση των πέντε αλληλομόρφων του DPA1

Πίνακας 1. Αριθμοί και συχνότητες, σε παρένθεση, των πέντε αλληλομόρφων του DPA1 και τα παρατηρούμενα ποσοστά ετεροζυγωτίας στις δύο πληθυσμιακές ομάδες

| Αλληλόμορφα | Ασθενείς (n=23) | Control (n=34) |
|--------------------------|-----------------|----------------|
| DPA1_1 | 39 (0,85) | 53 (0,78) |
| DPA1_2 | 3 (0,065) | 9 (0,13) |
| DPA1_3 | 2 (0,043) | 1 (0,014) |
| DPA1_4 | 1 (0,022) | 1 (0,014) |
| DPA1_5 | 1 (0,022) | 0 |
| Ετεροζυγωτία (Ho) | 30% | 30,1% |



Εικόνα 2. Ιστογράμματα της κατανομής των συχνοτήτων των πέντε αλληλομόρφων του DPA1 στις δύο πληθυσμιακές ομάδες

Το εξώνιο 2 του γονιδίου DQA1

Τα έξι αλληλόμορφα που ανιχνεύτηκαν για το εξώνιο 2 του γονιδίου DQA1 (Εικόνα 3) έχουν αναφερθεί στην παγκόσμια βιβλιογραφία να εμφανίζονται και σε άλλες ομάδες πληθυσμών εκτός του ελληνικού. Οι συχνότητες των αλληλομόρφων κυμάνθηκαν από 0,00 έως 0,39 (Πίνακας 2, Εικόνα 4). Τα ποσοστά ετεροζυγωτίας εμφανίστηκαν σημαντικά αυξημένα στην ομάδα ελέγχου σε σχέση με την ομάδα των ασθενών (Πίνακας 2). Και τα έξι αλληλόμορφα εμφάνισαν στατιστικώς σημαντικές διαφορές ανάμεσα στις δύο ομάδες. Το αλληλόμορφο DQA1_5 απουσίαζε από την ομάδα ελέγχου, ενώ το αλληλόμορφο DQA1_6 απουσίαζε από την ομάδα των ασθενών (Πίνακας 2).



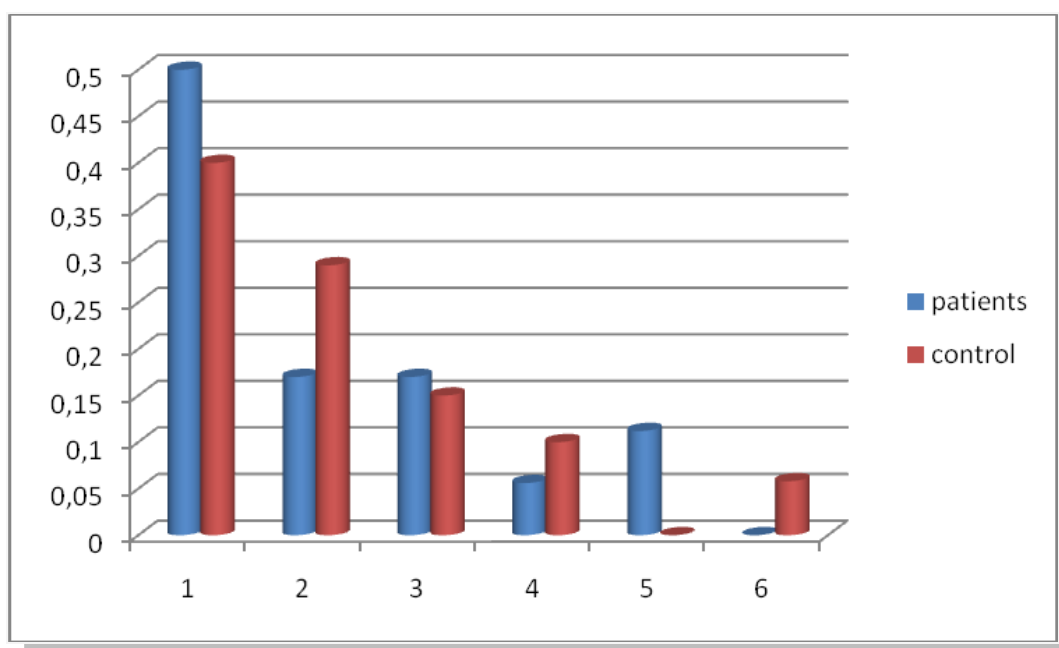
| | | | | | | |
|--------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| DQA1_4 | AGTTCTATG | GGACCTGGAG | AGGAAGGAGA | CTGTCCTGGCA | GTTGCCTCTG | TTCACGAGAT |
| DQA1_5 | AGTTCTATG | GGACCTGGAG | AGGAAGGAGA | CTGTCCTGAA | GTTGCCTCTG | TTCACAGAC |
| DQA1_6 | AGTTCTACGT | GGACCTGGAG | AGGAAGGAGA | CTGCCTGGCG | CTGGCCTGAG | TTCAGCAAAT |
| | 190 | 200 | 210 | 220 | 230 | 240 |
| | | | | | | |
| DQA1_1 | TTGGAGGTTT | TGACCCGCAG | GGTGCCTGA | GAAACATGGC | TGTGGCAAAA | CACAACCTGA |
| DQA1_2 | TTGGAGGTTT | TGACCCGCAG | GGTGCCTGA | GAAACATGGC | TGTGGCAAAA | CACAACCTGA |
| DQA1_3 | TTGGAGGTTT | TGACCCGCAG | GGTGCCTGA | GAAACATGGC | TGTGGCAAAA | CACAACCTGA |
| DQA1_4 | TTAGAAGATT | TGACCCGCAA | TTTGCCTGA | CAAAACATCGC | TGTGCTAAAA | CATAAATCTGA |
| DQA1_5 | TTA--GATT | TGACCCGCAA | TTTGCCTGA | CAAAACATCGC | TGTGCTAAAA | CATAAATCTGA |
| DQA1_6 | TTGGAGGTTT | TGACCCGCAG | GGTGCCTGA | GAAACATGGC | TGTGGCAAAA | CACAACCTGA |
| | 250 | 260 | 270 | 280 | 290 | |
| | | | | | | .. |
| DQA1_1 | ACATCATGAT | TAAACGCTAC | AACTCTACCG | CTGCTACCAA | TGGTATGCGT | CC |
| DQA1_2 | ACATCATGAT | TAAACGCTAC | AACTCTACCG | CTGCTACCAA | TGGTATGCGT | CC |
| DQA1_3 | ACATCATGAT | TAAACGCTAC | AACTCTACCG | CTGCTACCAA | TGGTATGCGT | CC |
| DQA1_4 | ACATCGTGAT | TAAACGCTCC | AACTCTACCG | CTGCTACCAA | TGGTATGCGT | CC |
| DQA1_5 | ACATCCTGAT | TAAACGCTCC | AACTCTACCG | CTGCTACCAA | TGGTATGCGT | CC |
| DQA1_6 | ACATCATGAT | TAAACGCTAC | AACTCTACCG | CTGCTACCAA | TGGTATGCGT | CC |

Εικόνα 3. Αλληλουχίες και στοίχιση των έξι αλληλομόρφων του DQA1

Πίνακας 2. Αριθμοί και συχνότητες, σε παρένθεση, των έξι αλληλομόρφων του DQA1 και τα παρατηρούμενα ποσοστά ετεροζυγωτίας στις δύο πληθυσμιακές ομάδες

| Αλληλόμορφα | Ασθενείς (n=23) | Control (n=34) |
|-------------|-----------------|----------------|
| DQA1_1 | 18 (0,39) | 21 (0,31) |
| DQA1_2 | 6 (0,13) | 15 (0,23) |
| DQA1_3 | 6 (0,13) | 6 (0,09) |
| DQA1_4 | 2 (0,04) | 5 (0,73) |
| DQA1_5 | 4 (0,08) | 0 |

| | | |
|--------------------------|--------------|--------------|
| DQA1_6 | 0 | 2 (0,03) |
| Ετεροζυγωτία (Ho) | 11,1% | 19,2% |



Εικόνα 4. Ιστογράμματα της κατανομής των συχνοτήτων των έξι αλληλομόρφων του DQA1 στις δύο πληθυσμιακές ομάδες

Το εξώνιο 2 του γονιδίου DRB1

Από τα 16 αλληλόμορφα που ανιχνεύτηκαν για το εξώνιο 2 του γονιδίου DRB1 (Εικόνα 5), τέσσερα (DRB1_1, DRB1_3, DRB1_14, DRB1_16) δεν έχουν αναφερθεί στην παγκόσμια βιβλιογραφία και εμφανίζονται για πρώτη φορά στον ελληνικό πληθυσμό, ενώ τα υπόλοιπα 12 έχουν αναφερθεί να εμφανίζονται και σε άλλες ομάδες πληθυσμών εκτός του ελληνικού. Οι συχνότητες των αλληλομόρφων κυμάνθηκαν από 0,00 έως 0,25 (Πίνακας 3, Εικόνα 6). Τα ποσοστά ετεροζυγωτίας εμφανίστηκαν μειωμένα στην ομάδα ελέγχου σε σχέση με την ομάδα των ασθενών (Πίνακας 3). Πέντε αλληλόμορφα (DRB1_2, DRB1_3

DRB1_6, DRB1_9, DRB1_11) εμφάνισαν στατιστικώς σημαντικές διαφορές ανάμεσα στις δύο ομάδες. Τα αλληλόμορφα DQA1_1, DQA1_8, DQA1_16 απουσίαζαν από την ομάδα των ασθενών, ενώ τα αλληλόμορφα DQA1_4, DQA1_12, DQA1_14, DQA1_15 απουσίαζαν από την ομάδα ελέγχου (Πίνακας 3).

| | 10 | 20 | 30 | 40 | 50 | 60 |
|---------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| | | | | | | |
| DRB1_1 | CGCCCTGTTG | ACCGGATGGT | TCGTGTCCCC | ACAGCACGTT | TCCTGTGGCA | GCCTAAGAGG |
| DRB1_2 | CGCCCTGTTG | ACCGGATGGT | TCGTGTCCCC | ACAGCACGTT | TCCTGTGGCA | GCCTAAGAGG |
| DRB1_3 | CGCCCTGTTG | ACCGGATGGT | TCGTGTCCCC | ACAGCACGTT | TCCTGTGGCA | GCCTAAGAGG |
| DRB1_4 | CGCCCTGTTG | ACCGGATGGT | TCGTGTCCCC | ACAGCACGTT | TCCTGTGGCA | GCCTAAGAGG |
| DRB1_5 | CGCCCTGTTG | ACCGGATGGT | TCGTGTCCCC | ACAGCACGTT | TCCTGTGGCA | GCCTAAGAGG |
| DRB1_6 | CGCCTGTGTG | ACTGGATCGT | TCGTGTCCCC | ACAGCACGTT | TCTTGGAGTA | CTCTACGTCT |
| DRB1_7 | CGCCTGTGTG | ACTGGATCGT | TCGTGTCCCC | ACAGCACGTT | TCTTGGAGTA | CTCTACGTCT |
| DRB1_8 | CGCCTGTGTG | ACTGGATCGT | TCGTGTCCCC | ACAGCACGTT | TCTTGGAGTA | CTCTACGTCT |
| DRB1_9 | CGCCTGTGTG | ACTGGATCGT | TCGTGTCCCC | ACAGCACGTT | TCTTGGAGTA | CTCTACGTCT |
| DRB1_10 | CGCCTGTGTG | ACTGGATCGT | TCGTGTCCCC | ACAGCACGTT | TCTTGGAGTA | CTCTACGTCT |
| DRB1_11 | CGCCTGTGTG | ACTGGATCGT | TCGTGTCCCC | ACAGCACGTT | TCTTGGAGTA | CTCTACGTCT |
| DRB1_12 | CGCCTGTGTG | ACTGGATCGT | TCGTGTCCCC | ACAGCACGTT | TCTTGGAGTA | CTCTACGGGT |
| DRB1_13 | CGCCTGTGTG | ACTGGATCGT | TCGTGTCCCC | ACAGCACGTT | TCTTGGAGTA | CTCTACGTCT |
| DRB1_14 | CGCCTGTGTG | ACTGGATCGT | TCGTGTCCCC | ACAGCACGTT | TCTTGGAGTA | CTCTACGTCT |
| DRB1_15 | CGCCTGTGTG | ACTGGATCGT | TCGTGTCCCC | ACAGCACGTT | TCTTGGAGTA | CTCTACGGGT |
| DRB1_16 | CGCCTGTGTG | ACTGGATCGT | TCGTGTCCCC | ACAGCACGTT | TCTTGGAGTA | CTCTACGGGT |
| | 70 | 80 | 90 | 100 | 110 | 120 |
| | | | | | | |
| DRB1_1 | GAGTGTCAAT | TCTTCAATGG | GACGGAGCGG | GTGCGGTTCC | TGGACAGATA | CTTCTATAAC |
| DRB1_2 | GAGTGTCAAT | TCTTCAATGG | GACGGAGCGG | GTGCGGTTCC | TGGACAGATA | CTTCTATAAC |
| DRB1_3 | GAGTGTCAAT | TCTTCAATGG | GACGGAGCGG | GTGCGGTTCC | TGGACAGATA | CTTCTATAAC |
| DRB1_4 | GAGTGTCAAT | TCTTCAATGG | GACGGAGCGG | GTGCGGTTCC | TGGACAGATA | CTTCTATAAC |
| DRB1_5 | GAGTGTCAAT | TCTTCAATGG | GACGGAGCGG | GTGCGGTTCC | TGGACAGATA | CTTCTATAAC |
| DRB1_6 | GAGTGTCAAT | TCTTCAATGG | GACGGAGCGG | GTGCGGTTCC | TGGACAGATA | CTTCTATAAC |
| DRB1_7 | GAGTGTCAAT | TCTTCAATGG | GACGGAGCGG | GTGCGGTTCC | TGGACAGATA | CTTCTATAAC |
| DRB1_8 | GAGTGTCAAT | TCTTCAATGG | GACGGAGCGG | GTGCGGTTCC | TGGACAGATA | CTTCCATAAC |
| DRB1_9 | GAGTGTCAAT | TCTTCAATGG | GACGGAGCGG | GTGCGGTTCC | TGGACAGATA | CTTCCATAAC |

DRB1_10 GAGTGTCAATT TCTTCAATGG GACGGAGCGG GTGCGGTTCC TGGACAGATA CTTC CATAAC
 DRB1_11 GAGTGTCAATT TCTTCAATGG GACGGAGCGG GTGCGGTTCC TGGACAGATA CTTC CATAAC
 DRB1_12 GAGTGTCAATT TCTTCAATGG GACGGAGCGG GTGCGGTTCC TGGACAGATA CTTCCTATAAC
 DRB1_13 GAGTGTCAATT TCTTCAATGG GACGGAGCGG GTGCGGTTCC TGGACAGATA CTTC CATAAC
 DRB1_14 GAGTGTCAATT TCTTCAATGG GACGGAGCGG GTGCGGTTCC TGGACAGATA CTTCCTATAAC
 DRB1_15 GAGTGTCAATT TCTTCAATGG GACGGAGCGG GTGCGGTTCC TGGACAGATA CTTCCTATAAC
 DRB1_16 GAGTGTCAATT TCTTCAATGG GACGGAGCGG GTGCGGTTCC TGGAGAGACA CTTC CATAAC

130 140 150 160 170 180

.....|.....||.....||.....||.....||.....||.....|
 DRB1_1 CAGGAGGAGT CCGTGCCTT CGACAGCGAC GTGGGGGAGT ACCGGGCGGT GACGGAGCTG
 DRB1_2 CAGGAGGAGT CCGTGCCTT CGACAGCGAC GTGGGGGAGT TCCGGGCGGT GACGGAGCTG
 DRB1_3 CAGGAGGAGT CCGTGCCTT CGACAGCGAC GTGGGGGAGT ACCGGGCGGT GACGGAGCTG
 DRB1_4 CAGGAGGAGT CCGTGCCTT CGACAGCGAC GTGGGGGAGT ACCGGGCGGT GACGGAGCTG
 DRB1_5 CAGGAGGAGT CCGTGCCTT CGACAGCGAC GTGGGGGAGT TCCGGGCGGT GACGGAGCTG
 DRB1_6 CAAGAGGAGT ACGTGCCTT CGACAGCGAC GTGGGGGAGT TCCGGGCGGT GACGGAGCTG
 DRB1_7 CAAGAGGAGT ACGTGCCTT CGACAGCGAC GTGGGGGAGT TCCGGGCGGT GACGGAGCTG
 DRB1_8 CAGGAGGAGT TCGTGCCTT CGACAGCGAC GTGGGGGAGT ACCGGGCGGT GACGGAGCTG
 DRB1_9 CAGGAGGAGA ACGTGCCTT CGACAGCGAC GTGGGGGAGT TCCGGGCGGT GACGGAGCTG
 DRB1_10 CAGGAGGAGT TCGTGCCTT CGACAGCGAC GTGGGGGAGT ACCGGGCGGT GACGGAGCTG
 DRB1_11 CAGGAGGAGA ACGTGCCTT CGACAGCGAC GTGGGGGAGT TCCGGGCGGT GACGGAGCTG
 DRB1_12 CAAGAGGAGT ACGTGCCTT CGACAGCGAC GTGGGGGAGT ACCGGGCGGT GACGGAGCTG
 DRB1_13 CAGGAGGAGA ACGTGCCTT CGACAGCGAC GTGGGGGAGT TCCGGGCGGT GACGGAGCTG
 DRB1_14 CAAGAGGAGT ACGTGCCTT CGACAGCGAC GTGGGGGAGT ACCGGGCGGT GACGGAGCTG
 DRB1_15 CAAGAGGAGT ACGTGCCTT CGACAGCGAC GTGGGGGAGT ACCGGGCGGT GACGGAGCTG
 DRB1_16 CAGGAGGAGT TCGTGCCTT CGACAGCGAC GTGGGGGAGT TCCGGGCGGT GACGGAGCTG

190 200 210 220 230 240

.....|.....||.....||.....||.....||.....||.....|
 DRB1_1 GGGCGGCCTG ACGCTGAGTA CTGGAACAGC CAGAAGGACT TCCTGGAAGA CAGGCGGCC
 DRB1_2 GGGCGGCCTG ACGCTGAGTA CTGGAACAGC CAGAAGGACA TCCTGGAAGA GGC GCGGGCC
 DRB1_3 GGGCGGCCTG ACGCTGAGTA CTGGAACAGC CAGAAGGACT TCCTGGAAGA CAGGCGGCC
 DRB1_4 GGGCGGCCTG ACGCTGAGTA CTGGAACAGC CAGAAGGACC TCCTGGAAGA CAGGCGGCC
 DRB1_5 GGGCGGCCTG ACGCTGAGTA CTGGAACAGC CAGAAGGACA TCCTGGAAGA GGC GCGGGCC
 DRB1_6 GGGCGGCCTG ATGAGGAGTA CTGGAACAGC CAGAAGGACT TCCTGGAAGA CAGGCGGGCC
 DRB1_7 GGGCGGCCTG ATGAGGAGTA CTGGAACAGC CAGAAGGACT TCCTGGAAGA CAGGCGGGCC

DRB1_8 GGGCGGCCTG CTGCGGAGCA CTGGAACAGC CAGAAGGACC TCCTGGAGCG GAGGCGGGCC
 DRB1_9 GGGCGGCCTG ATGCCGAGTA CTGGAACAGC CAGAAGGACA TCCTGGAAGA CGAGCGGGCC
 DRB1_10 GGGCGGCCTG CTGCGGAGCA CTGGAACAGC CAGAAGGACC TCCTGGAGCG GAGGCGGGCC
 DRB1_11 GGGCGGCCTG ATGCCGAGTA CTGGAACAGC CAGAAGGACA TCCTGGAAGA CGAGCGGGCC
 DRB1_12 GGGCGGCCTG ATGCCGAGTA CTGGAACAGC CAGAAGGACT TCCTGGAAGA CAGGCGGGCC
 DRB1_13 GGGCGGCCTG ATGCCGAGTA CTGGAACAGC CAGAAGGACC TCCTGGAGCA GAAGCGGGCC
 DRB1_14 GGGCGGCCTA GCGCCGAGTA CTGGAACAGC CAGAAGGACT TCCTGGAAGA CAAGCGGGCC
 DRB1_15 GGGCGGCCTA GCGCCGAGTA CTGGAACAGC CAGAAGGACT TCCTGGAAGA CAGGCGGGCC
 DRB1_16 GGGCGGCCTG TCGCCGAGTC CTGGAACAGC CAGAAGGACA TCCTGGAAGA CAGGCGCGCC

250 260 270 280 290 300

.....|.....||.....||.....||.....||.....||.....|
 DRB1_1 GCGGTGGACA CCTACTGCAG ACACAACACTAC GGGGTTGTGG AGAGCTTCAC AGTGCAGCGG
 DRB1_2 GCGGTGGACA CCTACTGCAG ACACAACACTAC GGGGTTGTGG AGAGCTTCAC AGTGCAGCGG
 DRB1_3 GCGGTGGACA CCTACTGCAG ACACAACACTAC GGGGTTG GTG AGAGCTTCAC AGTGCAGCGG
 DRB1_4 GCGGTGGACA CCTACTGCAG ACACAACACTAC GGGGTTG GTG AGAGCTTCAC AGTGCAGCGG
 DRB1_5 GCGGTGGACA CCTACTGCAG ACACAACACTAC GGGGTTG GTG AGAGCTTCAC AGTGCAGCGG
 DRB1_6 GCGGTGGACA CCTACTGCAG ACACAACACTAC GGGGTTG GTG AGAGCTTCAC AGTGCAGCGG
 DRB1_7 GCGGTGGACA CCTACTGCAG ACACAACACTAC GGGGTTGTGG AGAGCTTCAC AGTGCAGCGG
 DRB1_8 GAGGTGGACA CCTA T TGCAG ACACAACACTAC GGGGTTGTGG AGAGCTTCAC AGTGCAGCGG
 DRB1_9 GCGGTGGACA CCTACTGCAG ACACAACACTAC GGGGTTG GTG AGAGCTTCAC AGTGCAGCGG
 DRB1_10 GAGGTGGACA CCTA T TGCAG ACACAACACTAC GGGGTTGTGG A AAGCTTCAC AGTGCAGCGG
 DRB1_11 GCGGTGGACA CCTACTGCAG ACACAACACTAC GGGGTTGTGG AGAGCTTCAC AGTGCAGCGG
 DRB1_12 CTGGTGGACA CCTACTGCAG ACACAACACTAC GGGGTTGTGG AGAGCTTCAC AGTGCAGCGG
 DRB1_13 CGGGTGGACA A CTACTGCAG ACACAACACTAC GGGGTTGTGG AGAGCTTCAC AGTGCAGCGG
 DRB1_14 GCGGTGGACA CCTACTGCAG ACACAACACTAC GGGGTTG GTG AGAGCTTCAC GGTGCAGCGG
 DRB1_15 CTGGTGGACA CCTACTGCAG ACACAACACTAC GGGGTTG GTG AGAGCTTCAC GGTGCAGCGG
 DRB1_16 GCGGTGGACA CCTACTGCAG ACACAACACTAC GGGGTTGTGG AGAGCTTCAC AGTGCAGCGG

310 320 330

.....|.....||.....||.....||.....|
 DRB1_1 CGAGGTGAGC GCGGCGCGGG GCGGGGCCTG AGTCCC
 DRB1_2 CGAGGTGAGC ATGGC CGCGG GCGGGGCCTG AGTCCC
 DRB1_3 CGAGGTGAGC ATGGT GGGGG GCGGGGCCTG GTCCCT
 DRB1_4 CGAGGTGAGC ATGGT GGGGG GCGGGGCCTG GTCCCT
 DRB1_5 CGAGGTGAGC ATGGC CGCGG GCGGGGCCTG AGTCCC

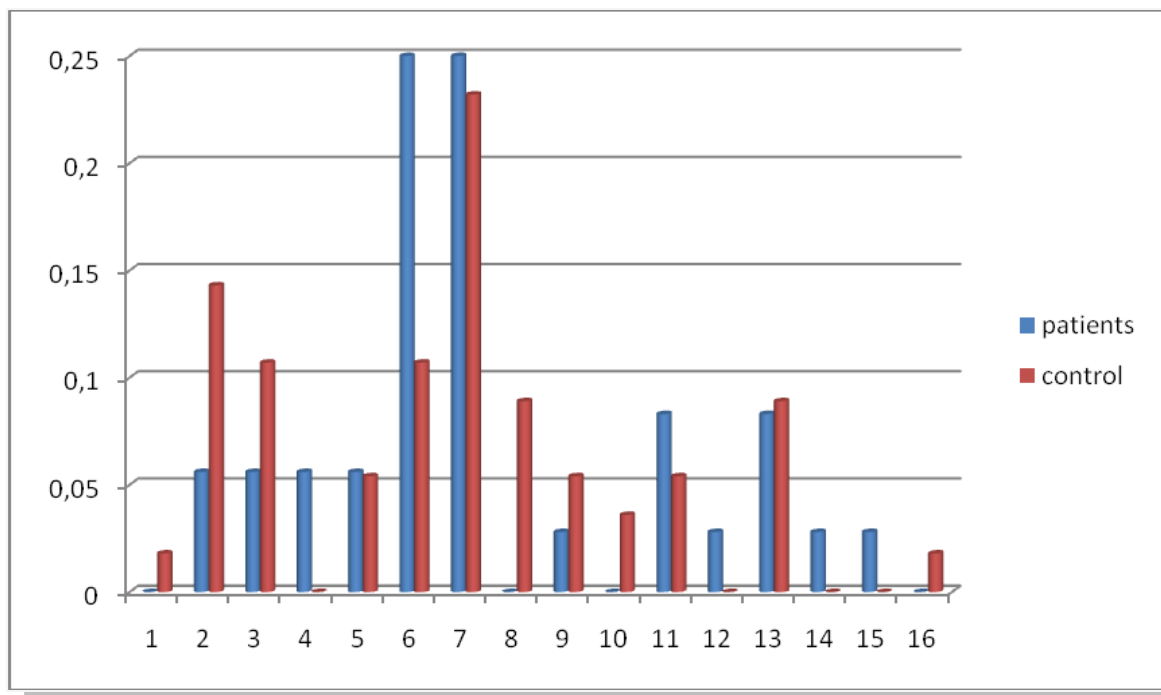
| | | | | |
|---------|------------|------------|------------|--------|
| DRB1_6 | CGAGGTGAGC | GCGGCGCGGG | GCGGGGCCTG | AGTCCC |
| DRB1_7 | CGAGGTGAGC | GCGGCGCGGG | GCGGGGCCTG | AGTCCC |
| DRB1_8 | CGAGGTGAGC | GCGGCGCGGG | GCGGGGCCTG | AGTCCC |
| DRB1_9 | CGAGGTGAGC | GCGGCGCGGG | GCGGGGCCTG | AGTCCC |
| DRB1_10 | CGAGGTGAGC | GCGGCGCGGG | GCGGGGCCTG | AGTCCC |
| DRB1_11 | CGAGGTGAGC | GCGGCGCGGG | GCGGGGCCTG | AGTCCC |
| DRB1_12 | CGAGGTGAGC | GCGGCGCGGG | GCGGGGCCTG | AGTCCC |
| DRB1_13 | CGAGGTGAGC | GCGGCGCGGG | GCGGGGCCTG | AGTCCC |
| DRB1_14 | CGAGGTGAGC | GCGGCGCGGG | GCGGGGCCTG | AGTCCC |
| DRB1_15 | CGAGGTGAGC | GCGGCGCGGG | GCGGGGCCTG | AGTCCC |
| DRB1_16 | CGAGGTGAGC | GCGGCGCGGG | GCGGGGCCTG | AGTCCC |

Εικόνα 5. Αλληλουχίες και στοίχιση των 16 αλληλομόρφων του DRB1

Πίνακας 3. Αριθμοί και συχνότητες, σε παρένθεση, των 16 αλληλομόρφων του DRB1 και τα παρατηρούμενα ποσοστά ετεροζυγωτίας στις δύο πληθυσμιακές ομάδες

| Αλληλόμορφα | Ασθενείς (n=23) | Control (n=34) |
|-------------|-----------------|----------------|
| DRB1_1 | 0 | 1 (0,018) |
| DRB1_2 | 2 (0,056) | 8 (0,143) |
| DRB1_3 | 2 (0,056) | 6 (0,107) |
| DRB1_4 | 2 (0,056) | 0 |
| DRB1_5 | 2 (0,056) | 3 (0,054) |
| DRB1_6 | 9 (0,25) | 6 (0,107) |
| DRB1_7 | 9 (0,25) | 13 (0,232) |
| DRB1_8 | 0 | 5 (0,089) |
| DRB1_9 | 1 (0,028) | 3 (0,054) |
| DRB1_10 | 0 | 2 (0,036) |
| DRB1_11 | 3 (0,083) | 3 (0,054) |
| DRB1_12 | 1 (0,028) | 0 |
| DRB1_13 | 3 (0,083) | 5 (0,089) |
| DRB1_14 | 1 (0,028) | 0 |
| DRB1_15 | 1 (0,028) | 0 |

| | | |
|--------------------------|--------------|--------------|
| DRB1_16 | 0 | 1 (0,018) |
| Ετεροζυγωτία (Ho) | 38,9% | 32,1% |



Εικόνα 6. Ιστογράμματα της κατανομής των συχνοτήτων των 16 αλληλομόρφων του DRB1 στις δύο πληθυσμιακές ομάδες

Το εξώνιο 2 του γονιδίου TLR3

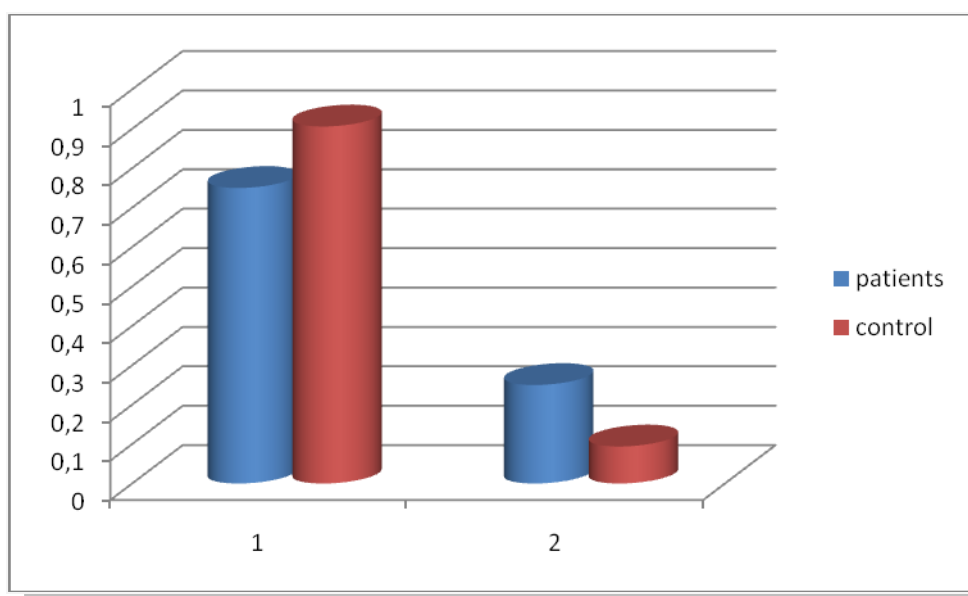
Κανένα από τα δύο αλληλόμορφα που ανιχνεύτηκαν για το εξώνιο 2 του γονιδίου TLR3 (Εικόνα 7) δεν έχουν αναφερθεί στην παγκόσμια βιβλιογραφία και εμφανίζονται για πρώτη φορά στον ελληνικό πληθυσμό. Οι συχνότητες των αλληλομόρφων κυμάνθηκαν από 0,094 έως 0,906 (Πίνακας 4, Εικόνα 8). Τα ποσοστά ετεροζυγωτίας εμφανίστηκαν σημαντικά μειωμένα στην ομάδα ελέγχου σε σχέση με την ομάδα των ασθενών (Πίνακας 4). Και τα δύο αλληλόμορφα εμφάνισαν στατιστικώς σημαντικές διαφορές ανάμεσα στις δύο ομάδες. (Πίνακας 4).

| | | | | | | |
|--------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| | 10 | 20 | 30 | 40 | 50 | 60 |
| | | | | | | |
| TLR3_1 | AGCAAGACTC | TAACATATGC | ATATTATTTT | TCCCTTCAG | AATTTAATCA | CATTAGATCT |
| TLR3_2 | AGCAAGACTC | TAACATATGC | ATATTATTTT | TCCCTTCAG | AATTTAATCA | CATTAGATCT |
| | 70 | 80 | 90 | 100 | 110 | 120 |
| | | | | | | |
| TLR3_1 | GTCTCATAAT | GGCTTGTCAT | CTACAAAATT | AGGAACTCAG | G TTCAGCTGG | AAAATCTCCA |
| TLR3_2 | GTCTCATAAT | GGCTTGTCAT | CTACAAAATT | AGGAACTCAG | G TTCAGCTGG | AAAATCTCCA |
| | 130 | 140 | 150 | 160 | 170 | 180 |
| | | | | | | |
| TLR3_1 | AGAGCTTCTA | TTATCAAACA | ATAAAATTCA | AGCGCTAAAA | AGTGAAGAAC | TGGATATCTT |
| TLR3_2 | AGAGCTTCTA | TTATCAAACA | ATAAAATTCA | AGCGCTAAAA | AGTGAAGAAC | TGGATATCTT |
| | 190 | 200 | 210 | 220 | 230 | 240 |
| | | | | | | |
| TLR3_1 | TGCCAATTCA | TCTTTAAAAA | AATTAGAGTT | GTCATCGAAT | CAAATTAAG | AGGTAAGAAG |
| TLR3_2 | TGCCAATTCA | TCTTTAAAAA | AATTAGAGTT | GTCATCGAAT | CAAATTAAG | AGGTAAGAAG |
| | 250 | 260 | 270 | 280 | 290 | 300 |
| | | | | | | |
| TLR3_1 | TAAGGTAAAA | TTATTTTGCA | TTCTGCCTTT | AAGGTGGATA | GTCCCTATCT | GTGTCACATA |
| TLR3_2 | TAAGGTAAAA | TTATTTTGCA | TTCTGCCTTT | AAGGTGGATA | GTCCCTATCT | GTGTCACATA |
| | 310 | 320 | 330 | | | |
| | | | | ... | | |
| TLR3_1 | CACAGGAATG | TAATGCTCTC | TAGCCTCTGC | CTG | | |
| TLR3_2 | CATAGGAATG | TAATGCTCTC | TAGCCTCTGC | CT | | |

Εικόνα 7. Αλληλουχίες και στοίχιση των επτά αλληλομόρφων του TLR3

Πίνακας 4. Αριθμοί και συχνότητες, σε παρένθεση, των δύο αλληλομόρφων του TLR3 και τα παρατηρούμενα ποσοστά ετεροζυγωτίας στις δύο πληθυσμιακές ομάδες

| Αλληλόμορφα | Ασθενείς (n=23) | Control (n=34) |
|--------------------------|-----------------|----------------|
| 1 | 0,75 | 0,906 |
| 2 | 0,25 | 0,094 |
| Ετεροζυγωτία (Ho) | 39% | 12,7% |



Εικόνα 8. Ιστογράμματα της κατανομής των συχνοτήτων των δύο αλληλομόρφων του TLR3 στις δύο πληθυσμιακές ομάδες

Συμπεράσματα – Συζήτηση

Τρία είναι τα σημαντικότερα στοιχεία που αναδεικνύονται από την παρούσα μελέτη.

Το πρώτο αφορά στην ανεύρεση αλληλομόρφων τα οποία εντοπίζονται για πρώτη φορά παγκοσμίως στον Ελληνικό πληθυσμό σε τρία από τα τέσσερα γονίδια που μελετήθηκαν, αποτελώντας την πρώτη προσπάθεια καταγραφής και χαρτογράφησης των συστημάτων ιστοσυμβατότητας για την Ελλάδα.

Το δεύτερο αφορά στις ετεροζυγωτίες για τα συγκεκριμένα γονίδια. Αν και η θεωρία προβλέπει ότι αυξημένα ποσοστά ετεροζυγωτίας θα μπορούσαν να συμβάλουν θετικά στην ανθεκτικότητα των ατόμων, η ανάλυση δεν έδειξε ένα κοινό πρότυπο, εφόσον για το DPA1 το ποσοστό είναι παρόμοιο στα DRB1 και TLR3 η αύξηση της ετεροζυγωτίας εμφανίζεται στην ομάδα των ασθενών και τέλος για το DQA αυξημένη ετεροζυγωτία εμφανίζεται στην ομάδα ελέγχου.

Το πιο ενδιαφέρον όμως αποτέλεσμα της μελέτης ήταν οι στατιστικώς σημαντικές διαφορές στις συχνότητες ορισμένων αλληλομόρφων σε όλα τα γονίδια ανάμεσα στις δυο πληθυσμιακές ομάδες. Πολλές μελέτες έχουν αναφέρει συσχετίσεις μεταξύ πολυμορφισμών των HLA και των αποτελεσμάτων μολυσματικών ασθενειών (Louie et al. 1999, Kuhn et al. 2004, Neumann-Haefelin et al. 2006, Hraber et al. 2007, Kamatani et al. 2009, van Manen et al. 2009), συμπεριλαμβανομένων των ασθενειών από φλαβοϊούς (LaFleur et al. 2002, Zivna et al. 2002, Stephens et al. 2002, Polizel et al. 2004, Sierra et al. 2007, Nguyen et al. 2008, Falcon-Lezama et al. 2009, Arranna et al. 2010). Ωστόσο, το αποτέλεσμα αυτό θα πρέπει να καταγραφεί με σοβαρές επιφυλάξεις δεδομένου ότι αν και υποδηλώνει την ύπαρξη αλληλομόρφων που προσδίδουν ευαισθησία ή ανθεκτικότητα στο κάθε άτομο, το δείγμα που αναλύθηκε είναι μικρό. Η προσθήκη περισσότερων ατόμων και γονιδίων είναι απαραίτητη προκειμένου να διακριβωθεί η ύπαρξη συσχέτισης των



Ειδικό πρόγραμμα ελέγχου για τον ιό του Δυτικού Νείλου και την ελονοσία,
ενίσχυση της επιτήρησης στην ελληνική επικράτεια (MIS 365280)



αλληλομόρφων του ανοσοποιητικού με την ανθεκτικότητα ή όχι στον ιό του Δυτικού Νείλου.

Βιβλιογραφία

Appanna R, Ponnampalavanar S, Lum Chai See L, Sekaran SD (2010) Susceptible and protective HLA class 1 alleles against dengue fever and dengue hemorrhagic fever patients in a Malaysian population. PLoS One 5. doi: 10.1371/journal.pone.0013029.

Axelsson-Robertson R, Ahmed RK, Weichold FF, Ehlers MM, Kock MM, et al. (2011) HLA-A*3001 and A*3002 show distinct peptide binding patterns of the Mycobacterium tuberculosis protein TB10.4: consequences for immune recognition. Clin Vaccine Immunol 18: 125–134.

Bade-Doeding C, Theodossis A, Gras S, Kjer-Nielsen L, Eiz-Vesper B, et al. (2010) The impact of human leucocyte antigen (HLA) micropolymorphism on ligand specificity within the HLA-B*41 allotypic family. Haematologica 96:110–118.

Diamond MS, Mehlhop E, Oliphant T, Samuel MA (2009) The host immunologic response to West Nile encephalitis virus. Front Biosci 14:3024–3034.

Elamin NE, Bade-Doeding C, Blasczyk R, Eiz-Vesper B (2010) Polymorphism between HLA-A*0301 and A*0302 located outside the pocket F alters the PΩmega peptide motif. Tissue Antigens 76: 487–490.

Falcon-Lezama JA, Ramos C, Zuniga J, Juarez-Palma L, Rangel-Flores H, et al. (2009) HLA class I and II polymorphisms in Mexican Mestizo patients with dengue fever. Acta Trop 112: 193–197.

Glass WG, McDermott DH, Lim JK, Lekhong S, Yu SF, et al. (2006) CCR5 deficiency increases risk of symptomatic West Nile virus infection. J Exp Med 203: 35–40.

Hraber P, Kuiken C, Yusim K (2007) Evidence for human leukocyte antigen heterozygote advantage against hepatitis C virus infection. Hepatology 46: 1713–1721.

Huang J, Zarnitsyna VI, Liu B, Edwards LJ, Jiang N, et al. (2010) The kinetics of two-dimensional TCR and pMHC interactions determine T-cell responsiveness. Nature 464: 932–936.

Jean CM, Honarmand S, Louie JK, Glaser CA (2007) Risk factors for West Nile virus neuroinvasive disease, California, 2005. *Emerg Infect Dis* 13: 1918–1920.

Kamatani Y, Wattanapokayakit S, Ochi H, Kawaguchi T, Takahashi A, et al. (2009) A genome-wide association study identifies variants in the HLA-DP locus associated with chronic hepatitis B in Asians. *Nat Genet* 41: 591–595.

Kuhn L, Abrams EJ, Palumbo P, Bulterys M, Aga R, et al. (2004) Maternal versus paternal inheritance of HLA class I alleles among HIV-infected children: consequences for clinical disease progression. *Aids* 18: 1281–1289.

Kumar D, Drebot MA, Wong SJ, Lim G, Artsob H, et al. (2004) A seroprevalence study of west nile virus infection in solid organ transplant recipients. *Am J Transplant* 4: 1883–1888.

LaFleur C, Granados J, Vargas-Alarcon G, Ruiz-Morales J, Villarreal-Garza C, et al. (2002) HLA-DR antigen frequencies in Mexican patients with dengue virus infection: HLA-DR4 as a possible genetic resistance factor for dengue hemorrhagic fever. *Hum Immunol* 63: 1039–1044.

Lanteri MC, O'Brien KM, Purtha WE, Cameron MJ, Lund JM, et al. (2009) Tregs control the development of symptomatic West Nile virus infection in humans and mice. *J Clin Invest* 119: 3266–3277.

Lichtman AKAaAH, ed. (2005) *Cellular and molecular Immunology*. 5th ed Elsevier Saunders. 564 p.

Louie L, Ng S, Hajjeh R, Johnson R, Vugia D, et al. (1999) Influence of host genetics on the severity of coccidioidomycosis. *Emerg Infect Dis* 5: 672–680.

Luo M, Blanchard J, Brunham K, Pan Y, Shen CX, et al. (2001) Two-step high resolution sequence-based HLA-DRB typing of exon 2 DNA with taxonomybased sequence analysis allele assignment. *Hum Immunol* 62: 1294–1310.

Mostashari F, Bunning ML, Kitsutani PT, Singer DA, Nash D, et al. (2001) Epidemic West Nile encephalitis, New York, 1999: results of a household-based seroepidemiological survey. *Lancet* 358: 261–264.

Nguyen TP, Kikuchi M, Vu TQ, Do QH, Tran TT, et al. (2008) Protective and enhancing HLA alleles, HLA-DRB1*0901 and HLA-A*24, for severe forms of dengue virus infection, dengue hemorrhagic fever and dengue shock syndrome. *PLoS Negl Trop Dis* 2: e304.

Neumann-Haefelin C, McKiernan S, Ward S, Viazov S, Spangenberg HC, et al. (2006) Dominant influence of an HLA-B27 restricted CD8+ T cell response in mediating HCV clearance and evolution. *Hepatology* 43: 563–572.

Polizel JR, Bueno D, Visentainer JE, Sell AM, Borelli SD, et al. (2004) Association of human leukocyte antigen DQ1 and dengue fever in a white Southern Brazilian population. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 99: 559–562.

Samuel MA, Diamond MS (2006) Pathogenesis of West Nile Virus infection: a balance between virulence, innate and adaptive immunity, and viral evasion. *J Virol* 80: 9349–9360.

Samuel MA, Whitby K, Keller BC, Marri A, Barchet W, et al. (2006) PKR and RNase L contribute to protection against lethal West Nile Virus infection by controlling early viral spread in the periphery and replication in neurons. *J Virol* 80: 7009–7019.

Scherbik SV, Paranjape JM, Stockman BM, Silverman RH, Brinton MA (2006) RNase L plays a role in the antiviral response to West Nile virus. *J Virol* 80:2987–2999.

Schreuder GM, Hurley CK, Marsh SG, Lau M, Maiers M, et al. (2001) The HLA Dictionary 2001: a summary of HLA-A, -B, -C, -DRB1/3/4/5 and -DQB1 alleles and their association with serologically defined HLA-A, -B, -C, -DR and -DQ antigens. *Eur J Immunogenet* 28: 565–596.

Sierra B, Alegre R, Perez AB, Garcia G, Sturn-Ramirez K, et al. (2007) HLA-A, -B, -C, and -DRB1 allele frequencies in Cuban individuals with antecedents of dengue 2 disease: advantages of the Cuban population for HLA studies of dengue virus infection. *Hum Immunol* 68: 531–540.

Stephens HA, Klaythong R, Sirikong M, Vaughn DW, Green S, et al. (2002) HLA-A and -B allele associations with secondary dengue virus infections correlate with disease severity and the infecting viral serotype in ethnic Thais. *Tissue Antigens* 60: 309–318.

van Manen D, Kootstra NA, Boeser-Nunnink B, Handulle MA, van't Wout AB, et al. (2009) Association of HLA-C and HCP5 gene regions with the clinical course of HIV-1 infection. *Aids* 23: 19–28.

Wang T, Town T, Alexopoulou L, Anderson JF, Fikrig E, et al. (2004) Toll-like receptor 3 mediates West Nile virus entry into the brain causing lethal encephalitis. *Nat Med* 10: 1366–1373.

Wang P, Sidney J, Kim Y, Sette A, Lund O, et al. (2010) Peptide binding predictions for HLA DR, DP and DQ molecules. *BMC Bioinformatics* 11: 568.

Woolf B (1955) On estimating the relation between blood group and disease. *Ann Hum Genet* 19: 251–253.

Zivna I, Green S, Vaughn DW, Kalayanarooj S, Stephens HA, et al. (2002) T cell responses to an HLA-B*07-restricted epitope on the dengue NS3 protein correlate with disease severity. *J Immunol* 168: 5959–5965.

«Αυτό το παραδοτέο έχει παραχθεί για τις ανάγκες του «Ειδικού προγράμματος ελέγχου για τον ιό του Δυτικού Νείλου και την ελονοσία, ενίσχυση της επιτήρησης στην ελληνική επικράτεια» και αντιπροσωπεύει τις απόψεις των συντακτών του. Οι απόψεις αυτές δεν έχουν υιοθετηθεί ή εγκριθεί με οποιοδήποτε τρόπο από την Ειδική Υπηρεσία του τομέα Υγείας & Κοινωνικής Αλληλεγγύης και της Ευρωπαϊκής Επιτροπής, και δεν πρέπει να εκλαμβάνονται ως θέσεις του Υπουργείου ή της Επιτροπής. Η Ειδική Υπηρεσία δεν εγγυάται την ακρίβεια των στοιχείων που περιλαμβάνονται στο παρόν παραδοτέο, ούτε αποδέχεται την ευθύνη για οποιαδήποτε χρήση των πληροφοριών αυτών.»