

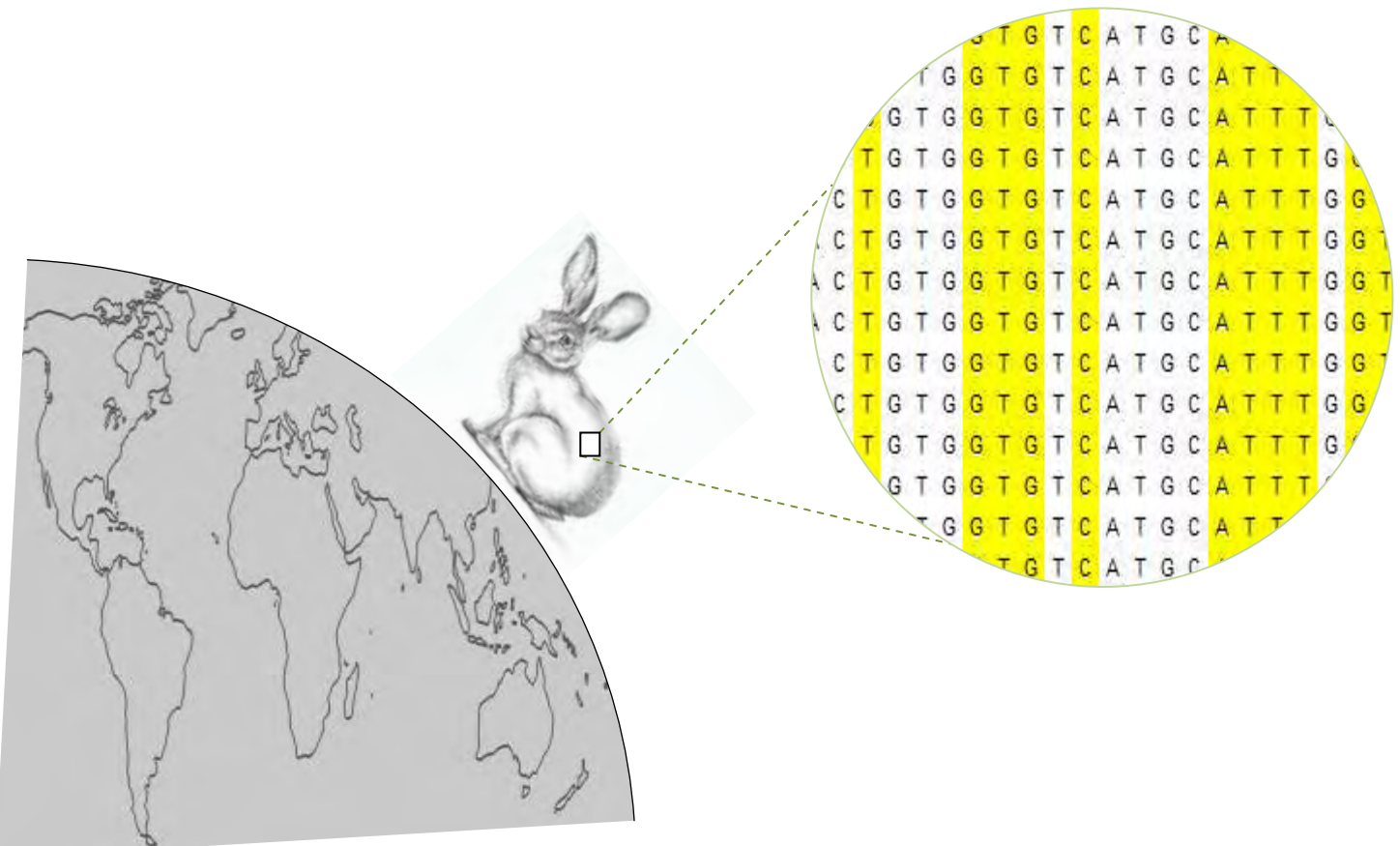


ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ
Λάρισα, 2016

Πτυχιακή Διατριβή:

Ανάλυση του πολυμορφισμού της περιοχής ελέγχου (D-loop)
του μιτοχονδριακού DNA στο είδος *Lepus europaeus*

Αριστείδης Λέντζας



**Ανάλυση του πολυμορφισμού της περιοχής ελέγχου (D-loop) του
μιτοχονδριακού DNA στο είδος *Lepus europaeus***

**Polymorphism analysis in the control region (D-loop) of
mitochondrial DNA in European brown hare (*L.europhaeus*)**

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

ΜΑΜΟΥΡΗΣ ΖΗΣΗΣ:

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ
Καθηγητής Γενετικής Ζωικών
Πληθυσμών του Τμήματος Βιοχημείας
και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου
Θεσσαλίας

ΜΟΥΤΟΥ ΑΙΚΑΤΕΡΙΝΗ

Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιολογίας
Σπονδυλωτών του Τμήματος Βιοχημείας
και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου
Θεσσαλίας

ΣΤΑΜΑΤΗΣ ΚΩΣΤΑΣ

Μέλος ΕΔΙΠ, Τμήματος Βιοχημείας και
Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου
Θεσσαλίας

Η παρούσα πτυχιακή διατριβή εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Γενετικής, Συγκριτικής και Εξελικτικής Βιολογίας του τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Αρχικά, θα ήθελα να εκφράσω τις θερμές μου ευχαριστίες στον καθηγητή μου, Καθηγητή Γενετικής Ζωικών Πληθυσμών, κ. Ζήση Μαμούρη καθώς επίσης στην Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιολογίας Σπονδυλωτών, κ. Αικ. Μούτου, και τον υπεύθυνο του εργαστηρίου και διδάκτορα κ. Κ. Σταμάτη για την πολύτιμη βοήθεια τους και τη συμμετοχή τους στην τριμελή συμβουλευτική επιτροπή. Πολλά ευχαριστώ οφείλω στον υποψήφιο διδάκτορα Γιαννούλη Θέμη για την επιστημονική του καθοδήγηση, τις πολύτιμες συμβουλές και συζητήσεις που με βοήθησαν να διευρύνω το πεδίο της αντίληψης μου σχετικά με την επιστήμη και τη Γενετική. Δεν θα μπορούσα να μην ευχαριστήσω τους επίσης υποψήφιους διδάκτορες, Κωνσταντίνα Σαρρή και Αντρέα Τσιπρουλιάνο, για τη χρήσιμη βοήθεια σε τεχνικά και επιστημονικά ζητήματα και για το ευχάριστο κλίμα συνεργασίας που υπήρχε μέσα στο εργαστήριο.

Τέλος, θα ήθελα να αφιερώσω την παρούσα πτυχιακή διατριβή στους γονείς μου, οι οποίοι στήριξαν τις σπουδές μου με όλους τους δυνατούς τρόπους, φροντίζοντας για την καλύτερη δυνατή μόρφωση μου.

Πίνακας περιεχομένων

Περίληψη	7
Abstract.....	8
1. Εισαγωγή	9
1.1 Πληθυσμιακή Γενετική	10
1.2 Γενετική ποικιλομορφία	10
1.2.1 Δράση της φυσικής επιλογής και άλλων εξελικτικών διεργασιών	11
1.3 Μελέτη φυλογενετικών σχέσεων	12
1.4 Μιτοχόνδριο.....	13
1.5 Μιτοχονδριακό DNA (mtDNA)	15
1.5.1 Αντιγραφή, μεταγραφή, μετάφραση	17
1.5.2 Σχέση πυρηνικού και μιτοχονδριακού γονιδιώματος	20
1.5.3 Το μιτοχονδριακό DNA ως μοριακός δείκτης	21
1.6 Περιοχή ελέγχου (D-loop) του mtDNA	23
1.7 Ευρωπαϊκός λαγός (<i>Lepus europaeus</i> Pallas, 1778)	27
1.8 Προηγούμενες μελέτες στο mtDNA του <i>Lepus europaeus</i>	29
1.9 Σκοπός της παρούσας μελέτης	31
2. Υλικά και μέθοδοι	33
2.1 Απομόνωση γενετικού υλικού	34
2.2 Προσδιορισμός της συνολικής ποσότητας στο δείγμα.....	36
2.3 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)	38
2.4 Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων PCR.....	40
2.5 Εξαγωγή ζωνών από την πηκτή και καθαρισμός του DNA	41
2.6 Αλληλούχηση κατά Sanger	42
2.7 Ανάλυση χρωματογραφημάτων αλληλούχησης	44
3. Αποτελέσματα	46
3.1 Απομόνωση γενετικού υλικού	47
3.2 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)	48
3.3 Καθαρισμός του DNA (DNA purification)	49
3.4 Αλληλούχηση	51
3.5 Ανάλυση της αλληλουχίας της περιοχής ελέγχου	53
3.5.1 Το αριστερό τμήμα	53

3.5.2 Το κεντρικό τμήμα	54
3.5.3 Το δεξιό τμήμα	55
3.6 Ανάλυση των πολυμορφισμών με τον αλγόριθμο MEGA.....	57
4. Συζήτηση.....	59
5. Βιβλιογραφία	66

Περίληψη

Παρόλο το μικρό του μέγεθος, το μιτοχονδριακό DNA (mtDNA) αποτελεί έναν εξαιρετο μοριακό δείκτη πληθυσμιακής γενετικής. Τα χαρακτηριστικά του, τόσο από εξελικτικής όσο και από τεχνικής άποψης, το καθιστούν ιδιαίτερα χρήσιμο εργαλείο για την ανίχνευση γενετικών πολυμορφισμών και για την διερεύνηση της τοπικής προσαρμογής και της αναπαραγωγικής επιτυχίας, ιδιαίτερα μεταξύ απομακρυσμένων πληθυσμών ενός είδους. Με τη χρήση ενζύμων που κωδικοποιούνται από το πυρηνικό DNA, το mtDNA αντιγράφεται δίχως επιδιορθωτικό μηχανισμό τυχόν μεταλλάξεων, μεταγράφεται και μεταφράζεται διαθέτοντας το δικό του γενετικό κώδικα. Η ρύθμιση των διαδικασιών αυτών εντοπίζεται σε ένα ειδικό τμήμα του mtDNA που ονομάζεται περιοχή ελέγχου (D-loop) καθώς σε αυτή χαρτογραφούνται απαραίτητα cis-δραστικά στοιχεία (σημεία έναρξης και υποκινητές). Αυτή η σύντομη μη-κωδική περιοχή, συνιστά την πιο πολυμορφική και την ταχύτερα εξελισσόμενη περιοχή του μιτοχονδριακού γονιδιώματος. Περιλαμβάνει τόσο συντηρημένες όσο και υπερμεταβλητές περιοχές (HVRs) οι οποίες χαρακτηρίζονται από ταχύ ρυθμό εξέλιξης. Ο αυξημένος ρυθμός εμφάνισης πολυμορφικών θέσεων και επαναλήψεων διαφόρων μεγεθών καθιστά το μέγεθος αυτής της περιοχής εξαιρετικά μεταβλητό ακόμα και ανάμεσα σε άτομα του ίδιου είδους.

Κατά τη παρούσα μελέτη, μελετήθηκε τμήμα της αλληλουχίας της περιοχής ελέγχου (D-loop) στο είδος *Lepus europaeus* σε πληθυσμούς του είδους από Ελλάδα, Τουρκία, Γαλλία, Ισραήλ, Κύπρο και Γερμανία. Πραγματοποιήθηκε αλληλούχηση, ανάλυση και σύγκριση 28 δειγμάτων από τους διάφορους πληθυσμούς. Κατόπιν, ορίστηκαν ο ακριβής αριθμός και οι θέσεις των πολυμορφισμών ανάμεσα στις υπό μελέτη αλληλουχίες καθώς και η δομή συγκεκριμένων πολύ καλά χαρακτηρισμένων περιοχών (το αριστερό, κεντρικό και δεξί τμήμα) όπως και διάφορα συντηρημένα τμήματα και επαναλήψεις. Βάσει των αριθμών των πολυμορφικών θέσεων έγινε μια πρώτη εκτίμηση και της γενετικής ποικιλότητας ανάμεσα στους πληθυσμούς *Lepus europaeus* των διαφόρων χωρών όσον αφορά την περιοχή ελέγχου (D-loop).

Abstract

Despite its small size, the mitochondrial DNA (mtDNA) is an exceptional molecular marker for studies of population genetics. Its features, both evolutionary and technically, make it a particularly useful tool for the detection of genetic polymorphisms and the investigation of the local adaptation and reproductive success, especially among diversified populations of an individual species. By using enzymes encoded by the nuclear DNA, the mtDNA is replicated without the repair mechanisms in case of mutations, transcribed and translated having its own genetic code. The regulation of these processes lies in a special region, called the mtDNA control region (D-loop) as in this region are mapped essential cis-acting elements (start points and promoters). This short non-coding region, is the most versatile and rapidly evolving region of the mitochondrial genome. It includes both conserved and hypervariable regions (HVRs) which are characterized by rapid changes. The increasing rate of polymorphic sites and repetitions of different sizes makes the length of this region highly variable even among individuals of the same species.

In this study, is analyzed a part of the control region sequence (D-loop) in the species *Lepus europaeus* in populations of Greece, Turkey, France, Israel, Cyprus and Germany. Sequencing, analysis and comparison of 28 samples from different populations were carried out. Moreover, the exact number and positions of polymorphisms were calculated in the studying samples and among well characterized regions such as the left, center and right part as well as various conserved sequences and repetitions were positioned. Based on the number of polymorphic sites, a superficial assessment of genetic diversity was estimated among populations of *Lepus europaeus* from the different countries regarding the control region (D-loop).

1. Εισαγωγή

1.1 Πληθυσμιακή Γενετική

Η πληθυσμιακή γενετική ερευνά τα αίτια των προτύπων της γενετικής ποικιλομορφίας που παρατηρούνται ανάμεσα στα άτομα ενός πληθυσμού και ανάμεσα σε διαφορετικούς πληθυσμούς. Συμπεριλαμβάνει πειραματικές μελέτες για την μέτρηση και την ποσοτικοποίηση της γενετικής ποικιλομορφίας, αλλά και θεωρητικές μελέτες με χρήση μαθηματικών μοντέλων, με σκοπό την ερμηνεία των παρατηρούμενων προτύπων ποικιλομορφίας βάσει των εξελικτικών διεργασιών που επηρεάζουν τις γονιδιακές συχνότητες. (Russell, 2009)

Σύμφωνα με το νόμο των Hardy-Weinberg , σε ένα μεγάλο πληθυσμό που τα άτομα του διασταυρώνονται τυχαία και δεν επηρεάζεται από εξελικτικές δυνάμεις, οι συχνότητες των αλληλομόρφων δε μεταβάλλονται και οι γονοτυπικές συχνότητες σταθεροποιούνται μετά από μία γενιά. Ο νόμος των Hardy-Weinberg και όλοι οι άλλοι νόμοι της πληθυσμιακής γενετικής εφαρμόζονται σε όλα τα αλληλόμορφα που κληρονομούνται, σύμφωνα με τους νόμους του Mendel.

Η πληθυσμιακή γενετική (population genetics) είναι άρρηκτα συνδεδεμένη με την εξέλιξη και αποτελεί τη βάση για την γενετική βελτίωση των ζωικών οργανισμών, τη διατήρηση των ειδών και της βιοποικιλότητας. Παράλληλα, εφαρμόζει τις αρχές της κλασικής γενετικής σε μεγάλες ομάδες ατόμων και επικεντρώνεται στις διεργασίες μεταβίβασης που αφορούν έναν ή λίγους γενετικούς τόπους.

1.2 Γενετική ποικιλομορφία

Ένα από τα σημαντικότερα ερωτήματα που θέτει η πληθυσμιακή γενετική αφορά την ποσότητα της γενετικής ποικιλομορφίας που υπάρχει ανάμεσα στα άτομα ενός πληθυσμού. Η ενδοπληθυσμιακή γενετική ποικιλομορφία είναι σημαντική για πολλούς λόγους. Πρώτον , προσδιορίζει την δυναμική της εξελικτικής δυναμικής και της προσαρμογής. Η ποσότητα της ποικιλομορφίας παρέχει επίσης σημαντικά στοιχεία για τη σχετική σημασία διαφόρων εξελικτικών διεργασιών , επειδή κάποιες διεργασίες αυξάνουν την ποικιλομορφία ενώ άλλες τις μειώνουν. Ο τρόπος με τον οποίο εμφανίζεται ένα νέο είδος μπορεί να εξαρτάται από το μέγεθος της ενδοπληθυσμιακής γενετικής ποικιλομορφίας που υπάρχει. Επιπλέον η ικανότητα ενός πληθυσμού να επιβιώνει εξαρτάται από την ποσότητα της γενετικής ποικιλομορφίας που έχει στη διάθεσή του και μπορεί να αξιοποιήσει σε περίπτωση περιβαλλοντικών αλλαγών. (Russell, 2009)

Η πληθυσμιακή γενετική ποικιλομορφία προκύπτει από μεταλλαγές και ανασυνδυασμό, δηλαδή σε διαφοροποίηση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας. Μεταλλαγή είναι οποιαδήποτε νουκλεοτιδική αλλαγή ή ανεπαρκής επιδιόρθωση του DNA. Οι μεταλλάξεις προκύπτουν είτε από λάθη κατά την αντιγραφή και αν συμβούν στα κύτταρα της γαμετικής σειράς είναι δυνατόν να μεταβιβαστούν στις

επόμενες γενιές, είτε από επίδραση μεταλλαξιγόνων παραγόντων. Μπορεί να είναι σημειακές, ένθεσης και απαλοιφής. Γενετική ποικιλότητα προκύπτει επίσης από τον γενετικό ανασυνδυασμό. Ο ανασυνδυασμός αυτός μπορεί να είναι ομόλογος, δηλαδή να συμβαίνει μεταξύ τμημάτων μορίων DNA που μοιράζονται εκτεταμένες ομόλογες αλληλουχίες, τοποειδικός οπότε συμβαίνει μεταξύ μορίων DNA που έχουν ομόλογες περιοχές μικρής έκτασης ή μετάθεσης που οδηγεί σε μεταφορά ενός τμήματος DNA από μια θέση του γονιδιώματος σε μια άλλη. (Lewin, 2004)

1.2.1 Δράση της φυσικής επιλογής και άλλων εξελικτικών διεργασιών

«Δεν είναι τα πιο δυνατά είδη που επιβιώνουν ή τα πιο έξυπνα, αλλά αυτά που ανταποκρίνονται καλύτερα στις αλλαγές.», τόνισε ο Κάρολος Δαρβίνος στο βιβλίο του «Η προέλευση των ειδών» (Darwin, 1859). Σύμφωνα με τη θεωρία της εξέλιξης, το «είδος» δεν είναι σταθερό κι αναλλοίωτο. Όλα τα είδη των φυτών και των ζώων, που έζησαν πάνω στη Γη ή που εξακολουθούν να ζουν, είναι το αποτέλεσμα της ασταμάτητης μεταβολής και εξέλιξης από μια ή ελάχιστες υποτυπώδεις αρχικές μορφές. Αιτία της εξέλιξης είναι η φυσική επιλογή, που οφείλεται στον αγώνα για τη «διαίωνιση του είδους». Κάθε άτομο και κάθε είδος αναπτύσσει εκείνες τις ιδιότητες που το βοηθούν να επιβιώσει ή δημιουργεί νέες, ανάλογα με το τι απαιτεί η προσαρμογή του στο περιβάλλον, ώστε να εξασφαλιστεί η διαίωνιση του. Η φυσική επιλογή είναι η αναπόφευκτη συνέπεια της κληρονομικής ποικιλίας στην αναπαραγωγική επιτυχία. Αν και πολλές είναι οι εξελικτικές διεργασίες, όπως η μεταλλαγή, η τυχαία γενετική παρέκκλιση, ο ανασυνδυασμός και η μετανάστευση, η φυσική επιλογή αποτελεί τη μόνη διεργασία που προκαλεί προσαρμογή (Barton, & Briggs, 2013).

Η θεμελιώδης τυχειότητα της αναπαραγωγής των ατόμων και των γονιδίων που φέρουν, οδηγούν αναπόφευκτα σε μια διαδικασία που ονομάζεται γενετική παρέκκλιση (genetic drift). Το φαινόμενο αυτό μειώνει την γενετική ποικιλομορφία και μπορεί να οδηγήσει σε απότομες αλλαγές των αλληλομορφικών συχνοτήτων σε σύντομο χρονικό διάστημα. Μπορεί να συμβάλλει στην εγκαθίδρυση νέων αλληλομόρφων αλλά και στην απώλεια τους και συνεπώς την σημαντική αλλοίωση της γενετικής ποικιλότητας. (Russell, 2009)

Η πληθυσμιακή γενετική διαπραγματεύεται τη μετακίνηση γονιδίων, η οποία είναι δυνατόν να συντελείται ή να μη συντελείται με την μετακίνηση των οργανισμών. Η μετακίνηση γονιδίων λαμβάνει χώρα μόνο όταν οργανισμοί ή γαμέτες μεταναστεύσουν και συνεισφέρουν τα γονιδιά τους στο γονιδιακό απόθεμα του πληθυσμού-δέκτη. Η διεργασία αυτή αποκαλείται γονιδιακή ροή (gene flow). Η γονιδιακή ροή ασκεί δύο κύριες επιδράσεις σε ένα πληθυσμό. Πρώτον, εισάγει νέα αλληλόμορφα στον πληθυσμό. Εφόσον η μεταλλαγή είναι ένα σπάνιο γεγονός, ένα

συγκεκριμένο μεταλλαγμένο αλληλόμορφο μπορεί να εμφανιστεί μόνο σε έναν πληθυσμό και όχι σε άλλον. Η γονιδιακή ροή προκαλεί την εξάπλωση των νέων αλληλομόρφων σε άλλους πληθυσμούς και, όπως και η μεταλλαγή, αποτελεί πηγή γενετικής ποικιλομορφίας για τον πληθυσμό-δέκτη. Δεύτερον, στην περίπτωση που οι συχνότητες των αλληλομόρφων των μεταναστών και του πληθυσμού-δέκτη διαφέρουν, η γονιδιακή ροή μεταβάλλει τις συχνότητες αλληλομόρφων εντός του πληθυσμού-δέκτη. Μέσω της ανταλλαγής γονιδίων, διαφορετικοί πληθυσμοί διατηρούνται όμοιοι. Συνεπώς, η μετανάστευση είναι μία δύναμη που προκαλεί ομογενοποίηση, δηλαδή τείνει να εμποδίζει τη συσσώρευση γενετικών διαφορών μεταξύ των πληθυσμών. (Ellstrand et al, 2016)

Η συνέχεια της εξέλιξης καθιστά δύσκολη τη χάραξη ορίων γύρω από τα είδη. Εντούτοις, οι οργανισμοί όντως ομαδοποιούνται σε διακριτές μορφές, εξαιτίας τόσο της γενετικής τους σχέσης όσο και των διακριτών οικολογικών θώκων στους οποίους προσαρμόζονται. Συνεπώς, στη φυλετική αναπαραγωγή ισχύει το βιολογικό είδος, το οποίο αντιστοιχεί σε χωριστή γονιδιακή δεξαμενή.

Ο ρόλος της φυσικής επιλογής στην ειδογένεση, που περιγράφηκε για πρώτη φορά από το Δαρβίνο, έχει γίνει ευρέως αποδεκτός. Ωστόσο, η φύση και η χρονική πορεία των γενετικών αλλαγών που οδηγούν σε ειδογένεση παραμένουν κρυφές. Μέχρι σήμερα, οι γενετικές αναλύσεις έχουν επικεντρωθεί σχεδόν αποκλειστικά στην αναδρομική ανάλυση της αναπαραγωγικής απομόνωσης μεταξύ των ειδών ή υποειδών βάσει της γονιδιακής ροής. Με τη μελέτη των γενετικών αιτιών της αναπαραγωγικής απομόνωσης μεταξύ διαφόρων φυλών, μπορούν να εντοπιστούν τα όρια στην γονιδιακή ροή. Αυτή η προσέγγιση σε επίπεδο πληθυσμού μπορεί να αποκαλύψει μοτίβα που γίνονται αόρατα με την πάροδο του χρόνου. Γενικά πιστεύεται ότι η αναπαραγωγική απομόνωση συμβαίνει έμμεσα, ως «υποπροϊόν» των γενετικών αλλαγών που αυξάνουν την προσαρμογή (Coyne & Orr, 2004).

1.3 Μελέτη φυλογενετικών σχέσεων

Ο Δαρβίνος πρότεινε ότι όλοι οι οργανισμοί έχουν προέλθει από ένα κοινό πρόγονο, την πρώτη μορφή ζωής που έκανε την εμφάνιση της στη Γη. Η μελέτη των εξελικτικών σχέσεων μεταξύ των οργανισμών, πληθυσμών και ειδών όπως αυτές διαμορφώνονται με το πέρασμα του χρόνου ονομάζεται φυλογένεση και η δένδροειδής αναπαράσταση αυτής, φυλογενετικό δένδρο. Η εξελικτική αυτή διαδικασία είναι δυνατόν να δημιουργήσει διακλαδώσεις, καθώς οι πληθυσμοί μεταβάλλονται στο χρόνο, διαχωρίζονται σε ξεχωριστούς κλάδους, διασταυρώνονται ή εξαφανίζονται. Στόχος των ειδικών είναι η ταξινόμηση, η οποία να αντανakλά όσο το δυνατόν πιο πιστά γίνεται τις φυλογενετικές σχέσεις.

Η φυλογένεση επιτυγχάνεται με τη μελέτη των χαρακτηριστικών των οργανισμών που ονομάζονται χαρακτήρες και οι οποίοι διαφέρουν ανάμεσα στα είδη ώστε να

μελετηθεί η ποικιλομορφία τόσο μέσα, όσο και ανάμεσα στα είδη. Μπορεί να είναι: 1) Μορφολογικοί, 2)Χρωμοσωμικοί, 3)Μοριακοί (ή βιοχημικοί), 4)Ηθολογικοί ή οικολογικοί χαρακτήρες. Αν δύο οργανισμοί έχουν παρόμοιους χαρακτήρες μπορεί να τους έχουν κληρονομήσει από κάποιον κοινό πρόγονο. Οι κοινοί χαρακτήρες, δηλαδή, είναι το αποτέλεσμα της κοινής καταγωγής και καλούνται ομόλογοι. Συνεπώς, βασική προϋπόθεση για την διαπίστωση της κοινής καταγωγής των ειδών είναι η ομολογία.

Παλαιότερα, η ανάλυση των εξελικτικών σχέσεων μεταξύ των οργανισμών βασιζόταν κυρίως σε φαινοτυπικά χαρακτηριστικά, στη μορφολογία, στη φυσιολογία. Με την ανάπτυξη, της τεχνολογίας και των μοριακών τεχνικών, όπως η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR), κατάφεραν οι ερευνητές να επεξεργάζονται και να προσδιορίζουν αλληλουχίες DNA σε μεγάλη κλίμακα. Έτσι η μοριακή και αλγοριθμική κατ' επέκταση ανάλυση έγιναν αναπόσπαστο κομμάτι της μελέτης φυλογενετικών σχέσεων, καθώς τα μοριακά δεδομένα και η εύρεση της αλληλουχίας του DNA παρέχουν αποδείξεις για τις σχέσεις φυλογένεσης. Η επεξεργασία του DNA χάρη σε αυτές τις τεχνικές συνεισφέρει στην άμεση ανάλυση του γενετικού υλικού το οποίο έχει κληρονομήθει από τους προγόνους του ατόμου και αντανακλά την γενεαλογία του. Αν και το κόστος της διαδικασίας αυτής ήταν βασικό μειονέκτημα, τώρα πια η τεχνολογία του DNA γίνεται όλο και πιο οικονομική και γρήγορη.

Οι φυλογενετικές μελέτες με την μεγαλύτερη αξιοπιστία βασίζονται στον συνδυασμό διαφορετικών ειδών δεδομένων. Με βάση αυτή την προσέγγιση είναι πιο ολοκληρωμένες, ενώ μειώνεται η πιθανότητα να υπάρχουν σφάλματα όσον αφορά τα συμπεράσματα που εξαγονται, ιδιαίτερα αν αυτά συμφωνούν σε διάφορα είδη αναλύσεων (Bininda-Emonds,2000). Γενικότερα, οι φυλογενετικές σχέσεις που έχουν δημιουργηθεί από τη μοριακή ανάλυση ακόμα και μεταξύ ανώτερων ταξινομικών μονάδων δεν μπορούν να αμφισβητηθούν.

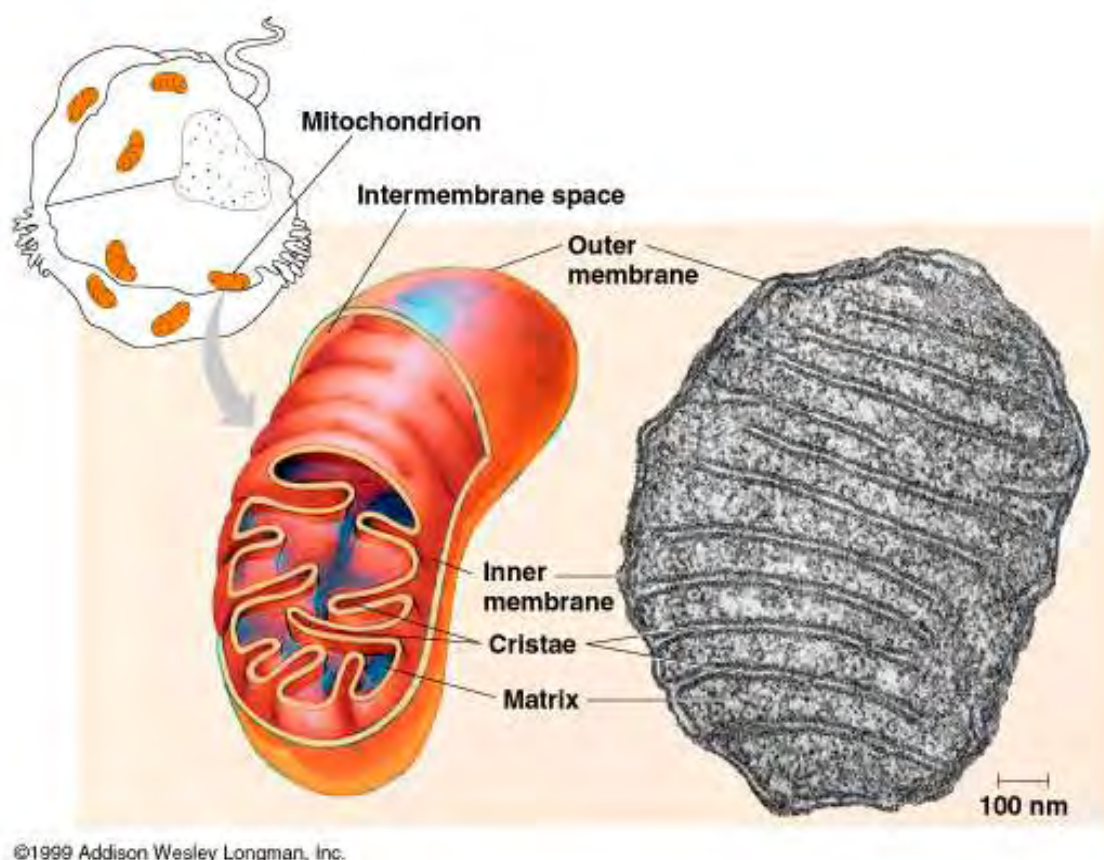
1.4 Μιτοχόνδριο

Το μιτοχόνδριο, είναι βακτηριόμορφο ή ινώδες μικροσκοπικό οργανίδιο, που βρίσκεται μέσα στο κυτόπλασμα των ζωικών και φυτικών κυττάρων. Ο ρόλος των μιτοχονδρίων είναι η εξασφάλιση ενέργειας. Τα μιτοχόνδρια χρησιμοποιούνται από τα κύτταρα για τον μεταβολισμό των βιολογικών μακρομορίων που προσλαμβάνουν οι οργανισμοί με τις τροφές. Έτσι, με τη βοήθεια των μιτοχονδρίων τα κύτταρα διασπούν τους υδατάνθρακες και τα λίπη, συνθέτοντας μόρια τριφωσφορικής αδενοσίνης (ATP), μέσω της διαδικασίας της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης.

Τα μιτοχόνδρια σε μεγάλη ποσότητα εμφανίζονται σε κύτταρα με υψηλές απαιτήσεις σε ενέργεια (μυϊκά κύτταρα, νευρικά κύτταρα, κύτταρα των αισθητηρίων οργάνων, ωάρια, κ.λπ.). Στα μυϊκά κύτταρα της καρδιάς, τα

μιτοχόνδρια καταλαμβάνουν περίπου το 36% του κυττάρου. Ευκαρυωτικά κύτταρα, που θα χάσουν τα μιτοχόνδριά τους, δεν μπορούν πλέον να αναζωογονηθούν. Ωστόσο, υπάρχουν και ευκαρυωτικά κύτταρα χωρίς μιτοχόνδρια (π.χ. ορισμένα πρωτόζωα).

Τα μιτοχόνδρια έχουν επίμηκες, σφαιρικό ή ωσειδές σχήμα. Περιβάλλονται από δύο μεμβράνες, την εξωτερική και την εσωτερική. Η εξωτερική τους μεμβράνη είναι λεία, έχει κυλινδρικό σχήμα και δεν φέρει οξυσώματα. Η εσωτερική μεμβράνη είναι αναδιπλωμένη, σχηματίζει πολυάριθμες δισκοειδείς ή δακτυλιοειδείς πτυχώσεις και φέρει οξυσώματα που αποτελούνται από πολυενζυμικά συστήματα τα οποία και ευθύνονται για τη φωσφορυλίωση και την αναπνευστική αλυσίδα. Η εσωτερική και η εξωτερική μεμβράνη δημιουργούν δύο μιτοχονδριακά διαμερίσματα: έναν μεγάλο εσωτερικό χώρο γνωστό ως στρώμα(matrix) και ένα πολύ στενότερο, το διαμεμβρανικό διάστημα ή μεσομεμβρανικό χώρο του μιτοχονδρίου. Ο χώρος αυτός πληρείται από υγρό που χρησιμεύει στη λειτουργική επικοινωνία των δύο μεμβρανών. (Alberts et al., 2011)(Εικόνα 1)



Εικόνα 1 : Δομή μιτοχονδρίου

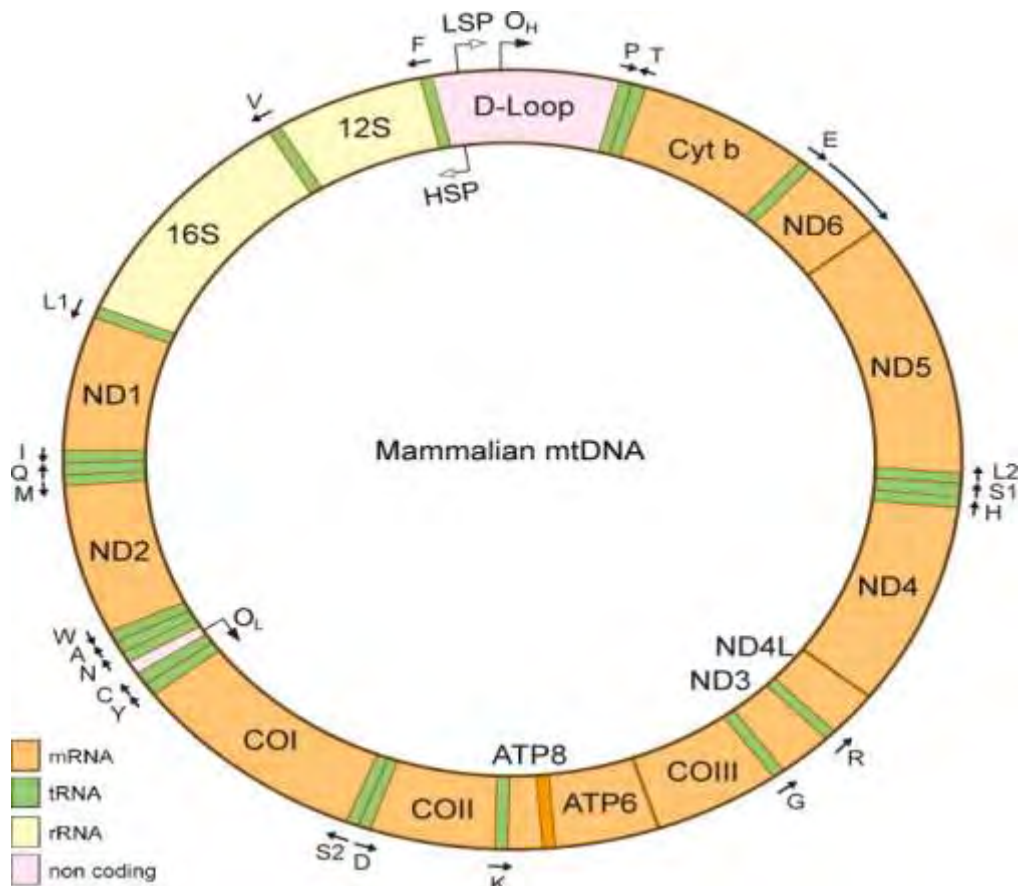
Η είσοδος των πρωτεϊνών στο μιτοχόνδριο πραγματοποιείται με τη βοήθεια ενός ειδικού σήματος και της κυτοσολικής συνοδού HSC70, η οποία αποτρέπει το πρώιμο δίπλωμα της πρωτεΐνης. Στη συνέχεια προσδένεται σε ένα πρωτεϊνικό σύμπλοκο της εξωτερικής μεμβράνης του μιτοχονδρίου και έπειτα στο εσωτερικό σύμπλοκο. Μόλις φτάσει στη μήτρα του μιτοχονδρίου, μια πεπτιδάση αφαιρεί το ειδικό σήμα διαλογής. Εάν όμως η πρωτεΐνη έχει στόχο να αγκυροβολήσει στις βιομεμβράνες του οργανιδίου, θα εμφανιστεί μετά την αποκοπή του σήματος διαλογής, ένα άλλο ειδικό σήμα θέσης.

Τα μιτοχόνδρια είναι ημιαυτόνομα οργανίδια και διαθέτουν το δικό τους DNA, έτσι ώστε να μπορούν να αναπαράγονται χωρίς να χρειάζεται να διαιρεθεί το κύτταρο. Το DNA των μιτοχονδρίων είναι δίκλωνο κυκλικό και είναι τοποθετημένο στις εσοχές που δημιουργεί η εσωτερική μεμβράνη. Κάθε μιτοχόνδριο περιέχει δύο έως δέκα αντίγραφα του κυκλικού αυτού μορίου DNA.

1.5 Μιτοχονδριακό DNA (mtDNA)

Όπως αναφέρθηκε, τα μιτοχόνδρια έχουν το δικό τους μικρό κυκλικό γονιδίωμα, το οποίο ποικίλει σε μέγεθος από 6.000 ζεύγη βάσεων (μιτοχόνδρια του πρωτοζώου *Plasmodium falciparum*) μέχρι 300.000 ζεύγη βάσεων (μιτοχόνδρια μερικών φυτικών κυττάρων). Το γονιδίωμα του μιτοχονδρίου περιλαμβάνει 37 γονίδια που κωδικοποιούν για 13 πολυπεπίδια (υπομονάδες του συστήματος παραγωγής ενέργειας: επτά υπομονάδες NADH αφυδρογονάσης, τρεις υπομονάδες κυτοχρωμικής οξειδάσης, δύο υπομονάδες ATP-συνθετάσης και κυτόχρωμα b), δύο γονίδια rRNA και 22 γονίδια tRNA ως μέρος του μιτοχονδριακού συστήματος μετάφρασης, τα οποία συνεργάζονται με 1500 γονίδια που κωδικοποιούνται από το πυρηνικό γονιδίωμα (nuclearDNA ή nDNA). Η ύπαρξη πρωτεϊνοσύνθεσης στα μιτοχόνδρια αποκαλύφθηκε από τον Simpson και τους συνεργάτες του το 1955. (Εικόνα 2)

Επιπλέον υπάρχει μια μεγάλη μη κωδική περιοχή (D-loop), η οποία είναι γνωστό ότι περιέχει στοιχεία ελέγχου της αντιγραφής και της μεταγραφής (Krzyszewski et al., 2006). Δεν είναι ξεκάθαρο κατά πόσο αυτές οι περιοχές ελέγχου είναι ομόλογες μεταξύ απόμακρων ζωικών ειδών ή έχουν προκύψει ανεξάρτητα από διαφορετικές μη κωδικές αλληλουχίες σε ξεχωριστές εξελικτικές γενεαλογίες, δεδομένου ότι δεν παρουσιάζουν νουκλεοτιδική ομολογία εκτός από τις περιπτώσεις που πρόκειται για στενά συγγενικά είδη (Boore, 1999).



Εικόνα 2 : Μιτοχονδριακό DNA (mtDNA) (Chan Bae Park et al., 2011)

Με το mtDNA έχει βρεθεί ότι σχετίζονται τουλάχιστον 29 πρωτεΐνες που δημιουργούν τα μιτοχονδριακά νουκλεοειδή (mt-nucleoid). Στα μιτοχόνδρια του *Saccharomyces cerevisiae* υπάρχουν δύο πληθυσμοί νουκλεοειδών που συνδέονται μέσω πρωτεϊνικών συμπλεγμάτων (TMS) με τη μιτοχονδριακή μεμβράνη (εξωτερική και εσωτερική). Οι πρωτεΐνες αυτές σταθεροποιούν τα νουκλεοειδή και κατευθύνουν την αντιγραφή του mtDNA.

Το μιτοχονδριακό γονιδίωμα έχει δύο σημαντικά χαρακτηριστικά. Το πρώτο ιδιαίτερο χαρακτηριστικό είναι η απουσία ενός αυστηρά ελεγχόμενου διαχωρισμού των αντιγράφων των χρωμοσωμάτων, όπως αυτού που παρατηρείται κατά τη μίτωση και τη μείωση των χρωμοσωμάτων του πυρήνα. Σε κάθε κυτταρική διαίρεση, τα πολλαπλά αντίγραφα του mtDNA κάθε μιτοχονδρίου του διαιρούμενου κυττάρου αντιγράφονται και κατανέμονται τυχαία μεταξύ των νεοσυντιθέμενων μιτοχονδρίων. Επιπλέον, τα μιτοχόνδρια κατανέμονται τυχαία μεταξύ των δύο θυγατρικών κυττάρων. Αυτή η διαδικασία είναι γνωστή ως διαχωρισμός κατά την αντιγραφή.

Το δεύτερο ιδιαίτερο χαρακτηριστικό της γενετικής του mtDNA οφείλεται στο γεγονός ότι τα περισσότερα κύτταρα διαθέτουν πολλά αντίγραφα μορίων mtDNA. Όταν συμβεί μια μετάλλαξη στο mtDNA, στην αρχή είναι παρούσα μόνο σε ένα από τα μόρια του DNA ενός μιτοχονδρίου. Μέσω του διαχωρισμού κατά την αντιγραφή, το μιτοχόνδριο που φέρει το μεταλλαγμένο μόριο DNA θα αποκτήσει πολλαπλά αντίγραφα αυτού του μορίου. Κατά την κυτταρική διαίρεση, ένα κύτταρο που διαθέτει ένα μείγμα φυσιολογικών και μεταλλαγμένων μορίων mtDNA, θα μεταβιβάσει στο θυγατρικό του κύτταρο και τους δύο αυτούς τύπους mtDNA αλλά με πολύ διαφορετική μεταξύ τους αναλογία. Ένα θυγατρικό κύτταρο μπορεί, τυχαία, να λάβει μιτοχόνδρια που όλα φέρουν μόνο φυσιολογικά ή μόνο μεταλλαγμένα μόρια mtDNA (η κατάσταση αυτή είναι γνωστή ως ομοπλασμία). Εναλλακτικά, ένα θυγατρικό κύτταρο μπορεί να λάβει ένα μίγμα μιτοχονδρίων όπου ορισμένα από αυτά θα φέρουν το φυσιολογικό ενώ άλλα το μεταλλαγμένο mtDNA (ετεροπλασμία) (Nussbaum, 2011).

Για τα ανώτερα ζώα και τον άνθρωπο το mtDNA κληρονομείται, εκτός εξαιρέσεων, μόνο από τη μητέρα, αφού από τα δύο γεννητικά κύτταρα, μόνο τα μιτοχόνδρια του ωαρίου χρησιμοποιούνται κατά την εμβρυογένεση (αυτό συμβαίνει επειδή το μαστίγιο του σπερματοζωαρίου, το οποίο φέρει τη συντριπτική πλειονότητα των μιτοχονδρίων του, δεν εισέρχεται στο ωάριο κατά τη γονιμοποίηση) (Alberts et al., 2011).

Επιπροσθέτως, στο μιτοχονδριακό DNA δεν υπάρχουν ιστόνες, άρα δεν οργανώνεται σε νουκλεοσώματα. Επίσης δεν έχουν βρεθεί ιντρόνια και ψευδογονίδια και οι μη-κωδικές περιοχές είναι μικρού μήκους. Το mtDNA αποτελεί ένα μικρό ποσοστό του συνόλου του DNA του κυττάρου (1-2% στα ζωικά κύτταρα), ενώ η αντιγραφή του γίνεται σε όλη τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου κι όχι μόνο κατά τη φάση S όπως συμβαίνει στο πυρηνικό DNA. Στα μιτοχόνδρια δεν υπάρχουν συστήματα επιδιόρθωσης DNA και άρα ο ρυθμός μεταλλακτικότητας είναι υψηλός και αυτό καθιστά το μιτοχονδριακό DNA πολύτιμο εργαλείο στη μελέτη φυλογενετικών σχέσεων όπως θα αναλυθεί εκτενέστερα στη συνέχεια.

1.5.1 Αντιγραφή, μεταγραφή, μετάφραση

Τα προϊόντα των γονιδίων, μαζί με μόρια και πρωτεΐνες που εισέρχονται από το κυτταρόπλασμα, παρέχουν στο μιτοχόνδριο το δικό του σύστημα αντιγραφής, μεταγραφής και μετάφρασης.

Οι δύο αλυσίδες του μιτοχονδριακού DNA χαρακτηρίζονται ως ελαφριά (L) και βαριά (H) και τα ονόματά τους αντικατοπτρίζουν τη διαφορά τους στο ποσοστό γουανίνης και θυμίνης (G+T) που περιέχουν, η οποία αντανακλάται σε διαφορετική συμπεριφορά σε διαβάθμιση πυκνότητας CsCl₂ (Meyer 1993). Το σημείο έναρξης της αντιγραφής της H-αλυσίδας (OH) βρίσκεται στη βασική μη κωδικοποιούσα

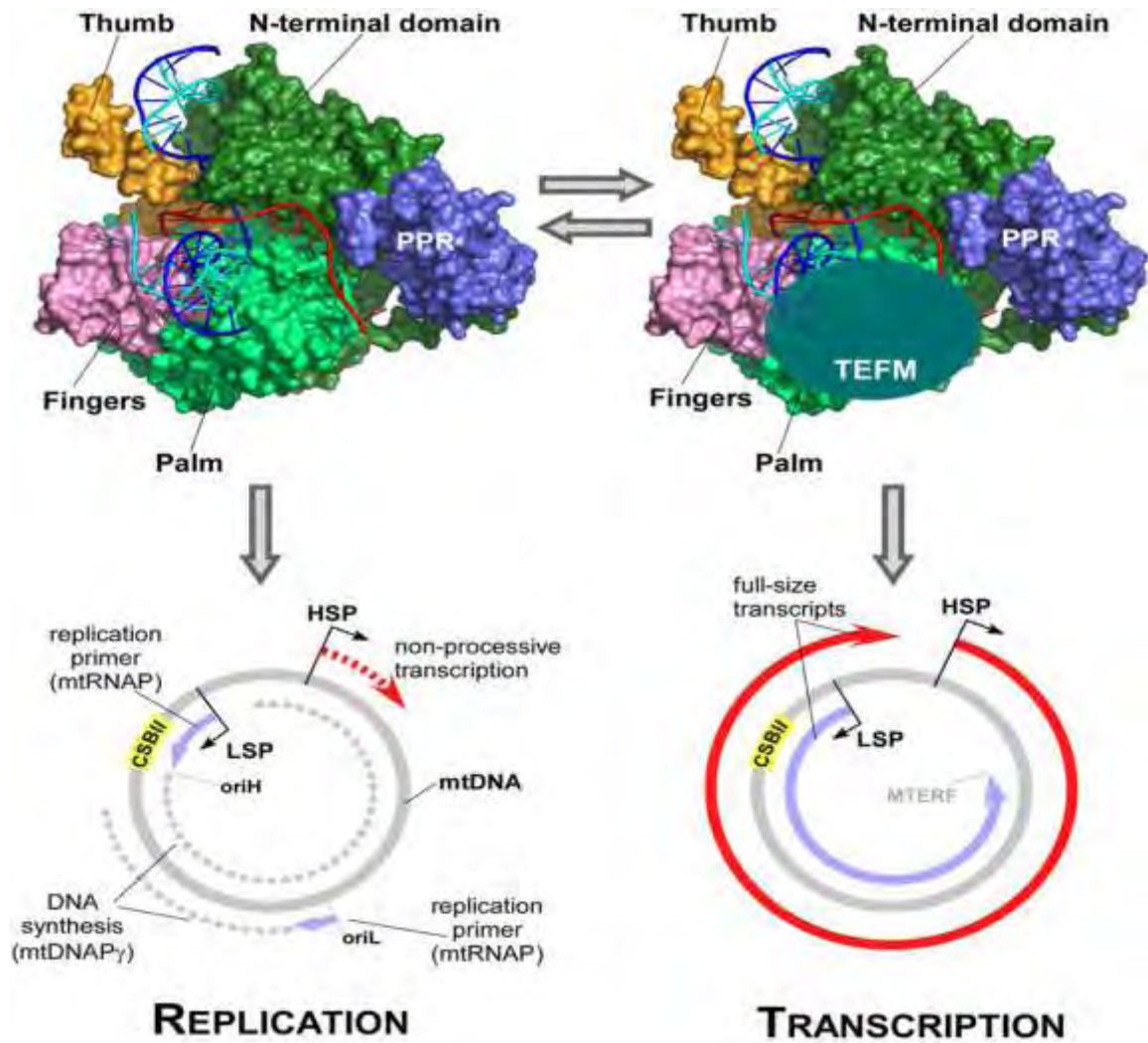
περιοχή, γνωστή ως περιοχή ελέγχου ή βρόγχος εκτόπισης (D-Loop), ενώ το σημείο έναρξης της αντιγραφής της L-αλυσίδας (O_L) βρίσκεται στην περιοχή ενός συμπλόκου tRNA γονιδίων, αρκετά απομακρυσμένων από την D-Loop. Στον ποντικό, έχει περιγραφεί ένα μόριο αποτελούμενο από RNA στο 5' άκρο του και από DNA στο υπόλοιπο μέρος του (Chang et al., 1985). Η ανάλυση έχει δείξει ότι το μόριο αυτό αποτελεί επίσης το σημείο εκκίνησης της μεταγραφής της H-αλυσίδας (O_H) (Clayton, 1991). Συνεπώς, θεωρείται ότι η διαδικασία της αντιγραφής και της μεταγραφής της H-αλυσίδας ξεκινά στο ίδιο σημείο.

Η αντιγραφή γίνεται καθ' όλη τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου και η μιτοχονδριακή DNA πολυμεράση προέρχεται από το πυρηνικό DNA. Η αντιγραφή είναι αργή ενώ, όπως προαναφέρθηκε, δεν πραγματοποιείται επιδιόρθωση λαθών. Έτσι, ο ρυθμός μη συνώνυμων αντικαταστάσεων ποικίλλει σημαντικά μεταξύ των γονιδίων του μιτοχονδρίου αλλά σε κάθε περίπτωση είναι σημαντικά υψηλότερος από το μέσο ρυθμό συνώνυμων αντικαταστάσεων που παρατηρείται στα πυρηνικά γονίδια. Αυτό σχετίζεται με την χαμηλότερη αξιοπιστία του μηχανισμού αντιγραφής του DNA, γεγονός που έχει ως συνέπεια τον υψηλότερο ρυθμό εισαγωγής σφαλμάτων κατά την αντιγραφή και επιδιόρθωση του DNA. Επίσης, οι υψηλότερες συγκεντρώσεις μεταλλαξιόνων, όπως οι ελεύθερες ρίζες οξυγόνου, οι οποίες προκύπτουν από μεταβολικές διεργασίες που συμβαίνουν στα μιτοχόνδρια, είναι δυνατόν να παίζουν ρόλο στους υψηλότερους ρυθμούς νουκλεοτιδικών αντικαταστάσεων.

Αντίστοιχα, κατά την μεταγραφή, η μιτοχονδριακή RNA πολυμεράση προέρχεται από το πυρηνικό γονιδίωμα. Επίσης οι μεταγραφικοί παράγοντες οι οποίοι είναι απαραίτητοι κατά την μεταγραφή κωδικοποιούνται από γονίδια του πυρήνα.

Η συντονισμένη αντιγραφή και έκφραση του μιτοχονδριακού γονιδιώματος είναι κρίσιμη για μεταβολικά ενεργά κύτταρα κατά τα διάφορα στάδια της ανάπτυξης. Ωστόσο, δεν είναι γνωστό εάν η αντιγραφή και η μεταγραφή μπορεί να συμβούν ταυτόχρονα χωρίς να παρεμβάλλονται μεταξύ τους και αν ο αριθμός αντιγράφων mtDNA μπορεί να ρυθμίζεται από τον μηχανισμό μεταγραφής. Βρέθηκε ότι η αλληλεπίδραση του παράγοντα επιμήκυνσης της μεταγραφής, TEFM με τη μιτοχονδριακή RNA πολυμεράση (mtRNAP) αποτρέπει την παραγωγή των εκκινητών αντιγραφής και αυξάνει την διαδικασία μεταγραφής λειτουργώντας ως μοριακός διακόπτης μεταξύ της αντιγραφής και μεταγραφής (Karen Agaronyan et al., 2015). Με την απουσία του παράγοντα επιμήκυνσης TEFM, η mtRNAP εκκινεί τη μεταγραφή στον υποκινητή LSP αλλά τερματίζει στην πολυμορφική περιοχή CSBII και παράγει έναν εκκινητή αντιγραφής 120 nt στη περιοχή αντιγραφής oriH. Ο εκκινητής χρησιμοποιείται από το ρεπλίσομα για την αντιγραφή του βαρεού κλώνου του mtDNA, κατά την οποία ένα ξεχωριστό γεγονός έναρξης που περιλαμβάνει την mtRNAP παράγει έναν εκκινητή αντιγραφής στην oriL. Λόγω της

χαμηλής επεξεργασίας, η μεταγραφή από τον υποκινητή HSP δεν παράγει ένα μετάγραφο πλήρους μεγέθους. Όταν ο TEFM δεσμεύεται, η mtRNAP δεν μπορεί να τερματίσει στην CSBII περιοχή και δημιουργεί μετάγραφα πλήρους μεγέθους και από τον LSP και από τον HSP (Εικόνα 3). Η δραστηριότητα αντιτερματισμού του TEFM διασφαλίζει ότι τα γεγονότα της αντιγραφής επηρεάζουν την έκφραση του μιτοχονδριακού γονιδιώματος.



Εικόνα 3: Μοντέλο για την αλλαγή αντιγραφής-μεταγραφής στα μιτοχόνδρια. (Karen Agaronyan et al.,2015)

Η μιτοχονδριακή πρωτεϊνοσυνθετική μηχανή διαφέρει από την κυτταροπλασματική. Ο γενετικός κώδικας των μιτοχονδρίων (Εικόνα 4) διαφέρει από τον συνηθισμένο γενετικό κώδικα των πυρηνικών γονιδίων. Πιο συγκεκριμένα, η τριπλέτα UGA που είναι κωδικόνιο λήξης στο κυτταρόπλασμα, χρησιμεύει για κωδικοποίηση τρυπτοφάνης στα μιτοχόνδρια, οι τριπλέτες AGA και AGG, που στο κυτταρόπλασμα κωδικοποιούν την αργινίνη, στα μιτοχόνδρια των θηλαστικών αποτελούν κωδικόνια λήξης, η τριπλέτα AUA που κωδικοποιεί για ισολευκίνη στο κυτταρόπλασμα, χρησιμοποιείται για την έναρξη της μετάφρασης και κωδικοποιεί για μεθειονίνη στα

μιτοχόνδρια των ζωικών κυττάρων. Τα 22 μιτοχονδριακά tRNAs αναγνωρίζουν τέσσερα διαφορετικά κωδικόνια, που έχουν κοινά τα δύο πρώτα νουκλεοτίδια. Τέλος, η έναρξη της μετάφρασης στα ευκαρυωτικά οργανίδια περιλαμβάνει το φορμυλ-μεθειονυλ-tRNA.

		Second letter				
		U	C	A	G	
First letter	U	UUU } Phe UUC } UUA } Leu UUG }	UCU } UCC } Ser UCA } UCG }	UAU } Tyr UAC } UAA Stop UAG Stop	UGU } Cys UGC } UGA Trp UGG Trp	U C A G
	C	CUU } CUC } Leu CUA } CUG }	CCU } CCC } Pro CCA } CCG }	CAU } His CAC } CAA } Gln CAG }	CGU } CGC } Arg CGA } CGG }	U C A G
	A	AUU } Ile AUC } AUA } Met AUG }	ACU } ACC } Thr ACA } ACG }	AAU } Asn AAC } AAA } Lys AAG }	AGU } Ser AGC } AGA Stop AGG Stop	U C A G
	G	GUU } GUC } Val GUA } GUG }	GCU } GCC } Ala GCA } GCG }	GAU } Asp GAC } GAA } Glu GAG }	GGU } GGC } Gly GGA } GGG }	U C A G
						Third letter

Εικόνα 4:Μιτοχονδριακός γενετικός κώδικας

Ωστόσο, να επισημανθεί, ότι μέχρι σήμερα δεν είναι γνωστός ο ακριβής και πλήρης μηχανισμός με τον οποίο ορίζεται η μετατροπή από RNA σε DNA στην περίπτωση της αντιγραφής, ή η διατήρηση της σύνθεσης RNA ακολουθίας στην περίπτωση της μεταγραφής του mtDNA.

1.5.2 Σχέση πυρηνικού και μιτοχονδριακού γονιδιώματος

Το mtDNA διαθέτει πληθώρα γονιδίων που κωδικοποιούν για tRNA, rRNA, καθώς και mRNAs για τη σύνθεση πρωτεϊνών στα οργανιδιακά ριβοσώματα. Όμως η σύνθεση αυτή δεν επαρκεί για τις λειτουργικές και δομικές ανάγκες των οργανιδίων και κατά συνέπεια τα μιτοχόνδρια δεν έχουν πλήρη αυτονομία. Τα μιτοχόνδρια όντας ημιαυτόνομα, προκειμένου να συνθέσουν όλα τα απαραίτητα συστατικά (ένζυμα, ρυθμιστικές και ριβοσωμικές πρωτεΐνες, κ.λπ.), χρειάζονται πληροφορίες που περιέχονται στο nDNA.

Τα επίπεδα στα οποία συνεργάζονται τα γονίδια τόσο του πυρηνικού όσο και του μιτοχονδριακού DNA είναι πολλά. Η συνεργασία λαμβάνει χώρα κατά την οξειδωτική φωσφορυλίωση και όπως είδαμε στην αντιγραφή, στη μεταγραφή και

στη μετάφραση. Στην οξειδωτική φωσφορυλίωση συμμετέχουν πρωτεϊνικά σύμπλοκα τα οποία αποτελούνται από πρωτεϊνικές υπομονάδες, οι οποίες κωδικοποιούνται από γονίδια τόσο του μιτοχονδριακού γονιδιώματος όσο και του πυρηνικού. Πιο συγκεκριμένα, αυτά τα μιτοχονδριακά γονίδια είναι τα ακόλουθα: 7 γονίδια που κωδικοποιούν για υπομονάδες της αφυδρογονάσης του NADH (ND1, 2, 3, 4, 4L, 5 και 6) 1 υπομονάδα του κυτοχρώματος b, 3 υπομονάδες της οξειδάσης του κυτοχρώματος c (CO I, II, III) και 2 υπομονάδες της μιτοχονδριακής συνθετάσης του ATP (ATPase 6 και 8) (Moritz et al., 1987). Αντίστοιχα, τα πυρηνικά γονίδια για την πρώτη υπομονάδα είναι 37, για την τρίτη υπομονάδα είναι 3, για την τέταρτη είναι 17 και για την πέμπτη 16. Επιπλέον, πυρηνικά γονίδια κωδικοποιούν για πρωτεΐνες που είναι υπεύθυνες για την συναρμολόγηση του συμπλόκου (assembly factors). Σε αντίθεση, το κυτόχρωμα c, το οποίο κωδικοποιείται από ένα πυρηνικό γονίδιο, μεταφέρει ηλεκτρόνια μεταξύ του συμπλόκου III (κυτόχρωμα bc1) και του συμπλόκου IV (κυτοχρωμική c οξειδάση). Συνεπώς, γίνεται αντιληπτό ότι η συνεργασία των γονιδίων είναι αναπόφευκτη ώστε να πραγματοποιηθεί η οξειδωτική φωσφορυλίωση.

1.5.3 Το μιτοχονδριακό DNA ως μοριακός δείκτης

Παρόλο που ποσοτικά το πυρηνικό DNA είναι κατά πολύ μεγαλύτερο από το μιτοχονδριακό (16.000 – 20.000 ζεύγη βάσεων στο μιτοχονδριακό και 10^6 έως 10^9 στο πυρηνικό), στις περισσότερες μελέτες που αφορούν τη δομή πληθυσμών και τη γονιδιακή ροή, τον υβριδισμό, τη βιογεωγραφία και τις φυλογενετικές σχέσεις (Moritz et al., 1987, Avise 1994) έχει χρησιμοποιηθεί το μιτοχονδριακό DNA, αφού διαθέτει μια σειρά από χαρακτηριστικά, τόσο από εξελικτικής όσο και από τεχνικής άποψης, που το καθιστούν ιδιαίτερα χρήσιμο σύστημα για την ανίχνευση γενετικών διαφορών σε κάθε επίπεδο. Συγκεκριμένα, τα πλεονεκτήματα αυτού είναι:

1) Ο αριθμός των αντιγράφων του mtDNA στα κύτταρα είναι εξαιρετικά υψηλός (εκατοντάδες έως χιλιάδες) σε σχέση με τα αντίγραφα του πυρηνικού DNA (ένα στους απλοειδείς και δύο στους διπλοειδείς οργανισμούς).

2) Το μιτοχονδριακό DNA είναι πολύ καλά χαρακτηρισμένο σε σχέση με το πυρηνικό (Hagelberg, 1994).

3) Ο μητρικός τρόπος κληρονομικότητας του mtDNA, γεγονός που υποδηλώνει ότι μόνο ένας τύπος μιτοχονδρίου είναι παρών σε κάθε άτομο. Έτσι το μιτοχονδριακό DNA κάθε οργανισμού, με εξαίρεση πιθανές μεταλλάξεις, είναι πανομοιότυπο με το αντίστοιχο της μητέρας του.

4) Δεν ανασυνδυάζεται, δηλαδή οι τυχόν ανασυνδυασμοί που λαμβάνουν χώρα στο πυρηνικό DNA, δεν εμφανίζονται στο μιτοχονδριακό DNA και έτσι οι

διαφοροποιήσεις που παρατηρούνται είναι καθαρά αποτέλεσμα μεταλλαγών και όχι ανασυνδυασμών (Hagelberg, 1994).

5) Είναι απλοειδές.

6) Έχει απλή γενετική δομή και είναι σχετικά εύκολο να δουλευτεί σε εργαστηριακό επίπεδο. Το μικρό του μέγεθος σε συνδυασμό με την συντηρημένη διευθέτηση των γονιδίων σε αυτό υποδηλώνει ότι πολλά ζευγάρια γενικευμένων εκκινητών (universal primers) θα είναι σε θέση να πολλαπλασιάσουν περιοχές του mtDNA σε ένα μεγάλο εύρος σπονδυλωτών και ασπονδύλων.

7) Διάφορα στοιχεία που χαρακτηρίζουν το πυρηνικό DNA, όπως τα μεταθετά στοιχεία, τα ψευδογονίδια, τα ιντρόνια και το επαναληπτικό DNA απουσιάζουν (Avisé et al., 1987).

8) Έχει γρήγορο ρυθμό εξέλιξης. Το mtDNA φαίνεται να εξελίσσεται 5-10 φορές ταχύτερα συγκρινόμενο με το μοναδικό (μη επαναλαμβανόμενο) πυρηνικό DNA. Ο γρήγορος ρυθμός εξέλιξης του mtDNA εξηγείται κυρίως λόγω απουσίας ενζύμων διόρθωσης ή η ανικανότητα της μιτοχονδριακής πολυμεράσης να διορθώνει λάθη.

Η σύγκριση της οργάνωσης των μιτοχονδριακών γονιδίων είναι δυνατόν να οδηγήσει στην εξαγωγή αρχαίων εξελικτικών σχέσεων, καθώς η διάταξη των γονιδίων σε απόμακρες ταξινομικά ομάδες είναι μοναδική και έτσι είναι σχεδόν αδύνατο να συμβεί αυτό το γεγονός με τον ίδιο τρόπο σε ανεξάρτητες εξελικτικά γενεαλογίες (Boore, 1999).

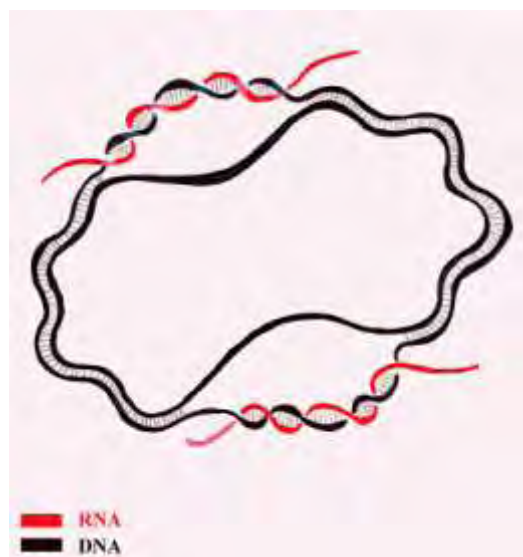
Επειδή όλο το μιτοχονδριακό DNA κληρονομείται ως μια μονάδα, η σύγκριση του από διαφορετικά άτομα μπορεί να παρουσιαστεί με τη μορφή φυλογενετικού δέντρου. Το mtDNA γενικά περνάει χωρίς επιμείξεις από τις μητέρες στα παιδιά και των δύο φύλων, κατά μήκος της μητρική γραμμής. Η μητρική καταγωγή πηγαίνει πίσω στις μητέρες μας, στις μητέρες τους, μέχρι τη σύγκλιση όλων των θηλυκών γραμμών καταγωγής του δέντρου. Οι κλάδοι ταυτοποιούνται με έναν ή περισσότερους δείκτες, οι οποίοι δίνουν στο μιτοχονδριακό DNA μία "υπογραφή" ή έναν "απλότυπο". Οι επιστήμονες κατατάσσουν τα αποτελέσματα από το μιτοχονδριακό DNA σε περισσότερο ή λιγότερο σχετικές ομάδες, με περισσότερους ή λιγότερους κοινούς προγόνους. Αυτό οδηγεί στην κατασκευή ενός δέντρου, στο οποίο οι κοινοί μας πρόγονοι όπως η Μιτοχονδριακή Εύα βρίσκονται στα σημεία διακλαδώσεων. Οι μεγάλοι κλάδοι λέγεται ότι ορίζουν μια απλοομάδα, και οι μεγαλύτεροι κλάδοι που περιέχουν πολλές απλοομάδες καλούνται "μακρο-απλοομάδες".

Οι διαφορές του μιτοχονδριακού DNA ανάμεσα σε διαφορετικά άτομα ενός είδους μπορούν να χρησιμοποιηθούν, προκειμένου να υπολογιστεί ο χρόνος πίσω σε έναν

κοινό πρόγονο, όπως η Μιτοχονδριακή Εύα. Αυτό συμβαίνει γιατί, πάνω σε οποιαδήποτε γραμμή καταγωγής, το μιτοχονδριακό DNA συσσωρεύει μεταλλάξεις με ρυθμό περίπου μία κάθε 3.500 χρόνια. Συγκεκριμένος αριθμός αυτών των εναλλαγών θα επιβιώσουν μέχρι τους σύγχρονους καιρούς και θα γίνουν αναγνωρίσιμες ως ξεχωριστές γραμμές καταγωγής. Την ίδια στιγμή μερικοί κλάδοι, συμπεριλαμβανομένου και μερικών πολύ παλαιών, εξαφανίζονται όταν το τελευταίο οικογενειακό μέλος σε έναν ξεχωριστό κλάδο δεν έχει κόρες.

1.6 Περιοχή ελέγχου (D-loop) του mtDNA

Στην μοριακή βιολογία, ένας βρόχος εκτόπισης (displacement loop) ή D-loop είναι μία δομή DNA όπου οι δύο κλώνοι ενός δίκλωνου μορίου DNA διαχωρίζονται και παραμένουν σε απόσταση από ένα τρίτο κλώνο του DNA. Ο τρίτος κλώνος έχει μία αλληλουχία βάσεων η οποία είναι συμπληρωματική με έναν από τους δύο κλώνους και ζεύγαρων με αυτόν, εκτοπίζοντας έτσι τον άλλο συμπληρωματικό κλώνο στην περιοχή. Εντός αυτής της περιοχής η δομή αυτή έχει τη μορφή τριπλής έλικας DNA (Kasamatsu et al., 1971).



Εικόνα 5 : Δομή D-loop

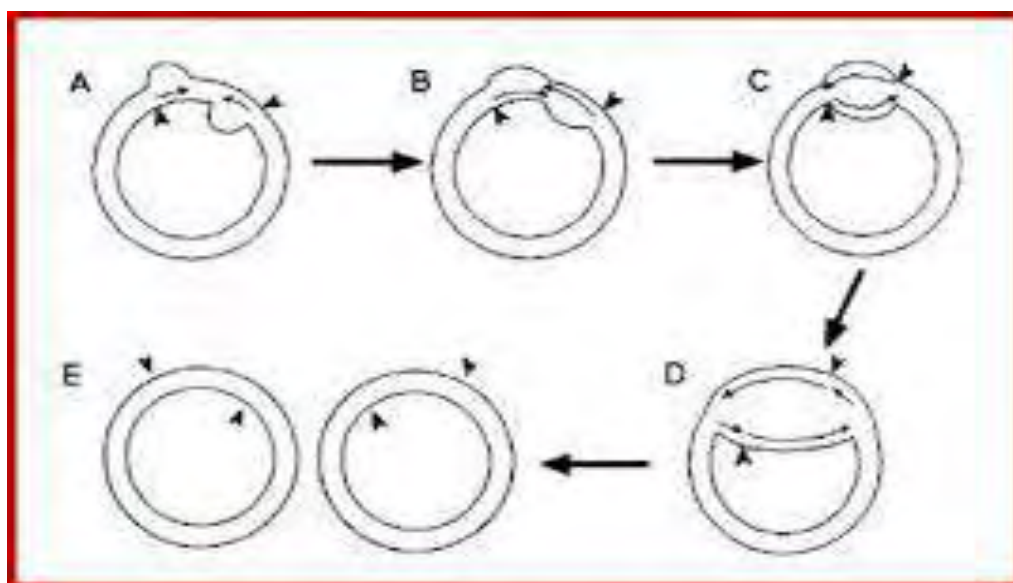
Η περιοχή ελέγχου είναι η μοναδική μη κωδικοποιούσα περιοχή του μιτοχονδριακού γονιδιώματος. Πολλές μελέτες έχουν δείξει ότι αποτελεί την πιο πολυμορφική και την ταχύτερα εξελισσόμενη περιοχή του μιτοχονδριακού γονιδιώματος (Stoneking et al., 1991). Επίσης, η περιοχή ελέγχου του mtDNA περιέχει την θέση έναρξης της αντιγραφής του ενός κλώνου, και την θέση έναρξης της μεταγραφής και για τους δύο κλώνους (Anderson et al., 1981).

Το μέγεθος της είναι περίπου 1000 bp αν και συνήθως ποικίλει μεταξύ των διαφορετικών ειδών. Παρά όλα αυτά, το κεντρικό της τμήμα παρουσιάζει σημαντικές ομοιότητες σε επίπεδο νουκλεοτιδικής ακολουθίας μεταξύ των ειδών (παρόμοια με αυτή των γονιδίων του mtDNA). Εκτός του κεντρικού τμήματος, η

ακολουθία της περιοχής ελέγχου παρουσιάζει πολύ μικρή ομοιότητα μεταξύ διαφορετικών ειδών με εξαίρεση κάποιες ιδιότητες όπως η περιεκτικότητα σε GC και πιθανές δευτεροταγείς δομές. Το γεγονός αυτό υποδεικνύει ότι η επιλεκτική πίεση ασκείται περισσότερο σε επίπεδο δευτεροταγών δομών και λιγότερο σε επίπεδο νουκλεοτιδικής ακολουθίας (Gemell et al., 1996).

Όπως προαναφέρθηκε, σε όλα τα είδη, η περιοχή ελέγχου περιλαμβάνει τα σημεία έναρξης για την αντιγραφή και τη μεταγραφή του mtDNA. Αυτά περιλαμβάνουν το σημείο έναρξης αντιγραφής της Η αλυσίδας (O_H) και τους υποκινητές για τη μεταγραφή των δύο αλυσίδων (HSP και LSP). Τα ακριβή γεγονότα και στοιχεία που παίρνουν μέρος στην αντιγραφή του μιτοχονδριακού γονιδιώματος δεν είναι μέχρι σήμερα πλήρως γνωστά, είναι όμως πολύ πιθανό, σύμφωνα με πολλές μελέτες, ότι οι νουκλεοτιδικές ακολουθίες οι οποίες παίζουν ρόλο στον έλεγχο αυτών των διαδικασιών να βρίσκονται στην περιοχή ελέγχου (Gemell et al., 1996).

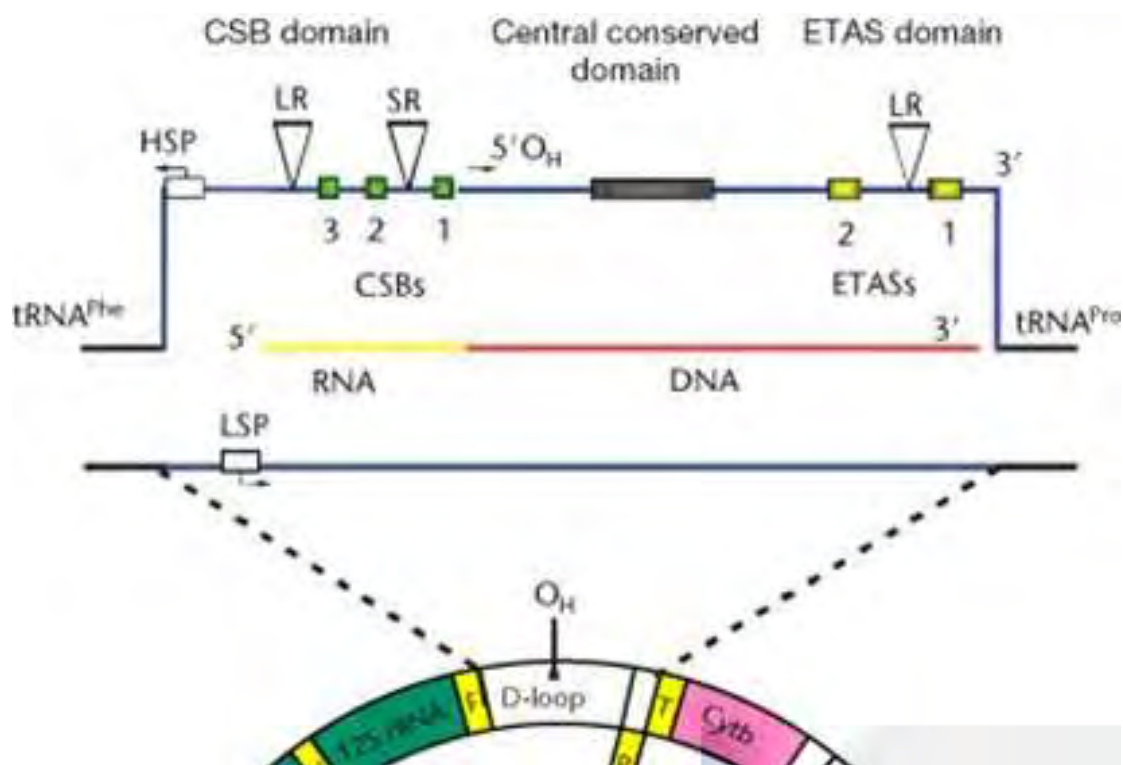
Η αντιγραφή mtDNA αρχίζει στη D-loop περιοχή με αποτέλεσμα το σχηματισμό του βρόχου εκτόπισης με ένα νεοσυντιθέμενο βαρύ, ή Η, κλώνο περίπου 700nt γνωστό ως 7S DNA (Sbisa et al., 1997) (Εικόνα 6). Και οι δύο κλώνοι του mtDNA μεταγράφονται πλήρως από τους υποκινητές της D-loop.



Εικόνα 6 : Σχηματισμός D-Loop κατά την αντιγραφή

Η γενική μοριακή δομή της περιοχής ελέγχου περιλαμβάνει τρία τμήματα (Εικόνα 7). Το τμήμα I (τμήμα ETAS) βρίσκεται αμέσως μετά το 3' άκρο του tRNA_{pro} το οποίο περιλαμβάνει ακολουθίες που συσχετίζονται με τον τερματισμό της αντιγραφής της Η αλυσίδας (TAS) (Doda et al., 1981) και έχει βρεθεί ότι συχνά περιλαμβάνει επαναλήψεις VNTRS (Variable Number Tandem Repeats). Στοιχίσεις στο τμήμα ETAS έδειξαν δύο συντηρημένα στοιχεία περίπου 60bp που καλούνται, ETAS1 και ETAS2 (Sbisa et al., 1997). Το κεντρικό τμήμα (Τμήμα II) περιλαμβάνει

περιοχές με ιδιαίτερα συντηρημένες ακολουθίες οι οποίες ονομάζονται «κουτιά» B, C, D, E και F (Ray & Densmore, 2002). Το τμήμα III βρίσκεται πριν το 5' άκρο του tRNA^{Phe} και συνήθως περιλαμβάνει το σημείο έναρξης της αντιγραφής της Η αλυσίδας (OH), τρία μικρά συντηρημένα τμήματα (CSB1, CSB2 και CSB3), τα οποία παίζουν βασικό ρόλο στην έναρξη της αντιγραφής και τη μετάβαση από RNA σε DNA σύνθεση (Sbisa et al., 1997) και τους υποκινητές για τη μεταγραφή της Η και L αλυσίδας. Όπως το τμήμα I, το τμήμα III συνήθως περιλαμβάνει επαναλήψεις VNTRs σε πολλά είδη.

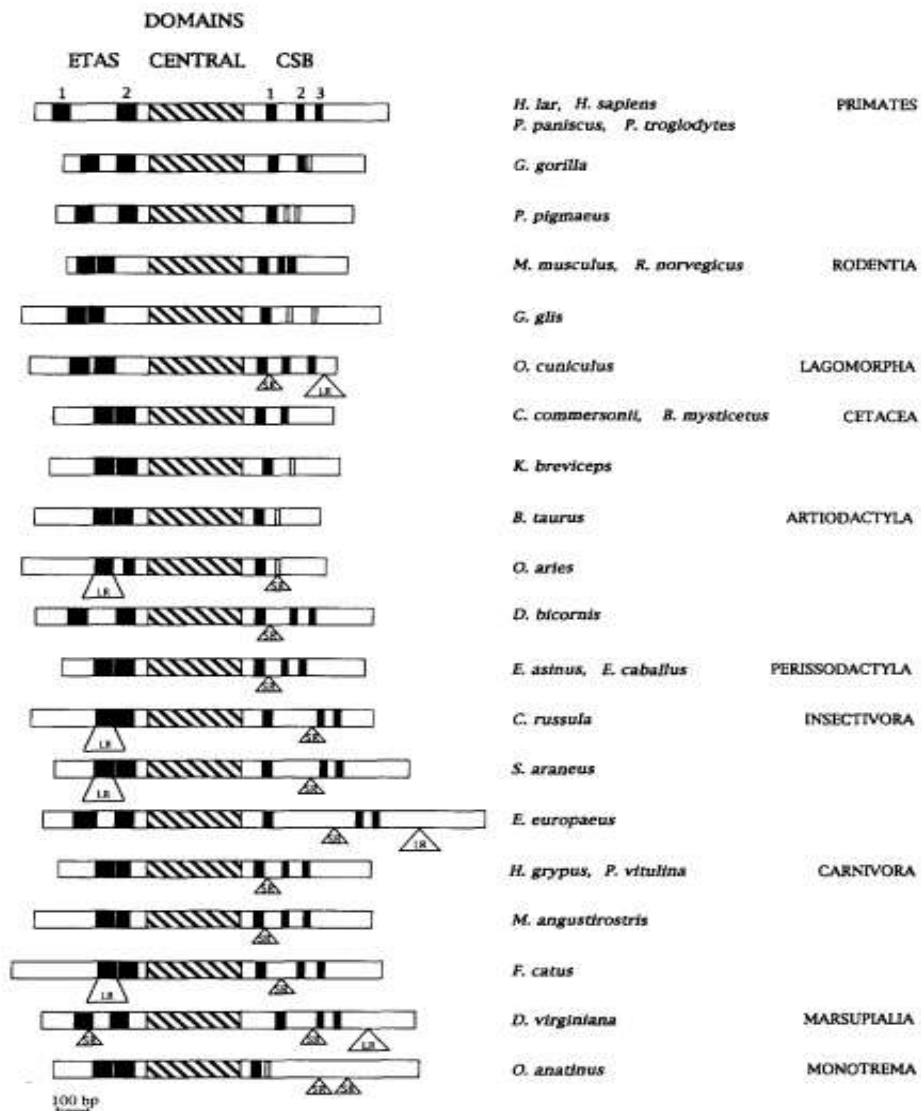


Εικόνα 7 : Δομική ανάλυση D-loop περιοχής ελέγχου

Οι πιο μεταβλητές περιοχές της περιοχής ελέγχου mtDNA περιλαμβάνονται εντός των τομέων ETAS και CSB (Matson & Baker, 2001). Συγκεκριμένα, συνορεύουν με το γονίδιο tRNA^{Phe} και περιέχουν τους L και H υποκινητές των αντίστοιχων κλώνων καθώς και το 5' άκρο για τη σύνθεση Η-κλώνου DNA. Οι μη συντηρημένες αυτές περιοχές της D-Loop θεωρούνται θερμά σημεία (hot spots), δηλαδή σημεία που εξελίσσονται με πολύ μεγαλύτερο ρυθμό από τον μέσο, και ονομάζονται υπερμεταβλητές περιοχές (hypervariable regions, HVRs). Χωρίζονται σε δύο κατηγορίες ως προς το ρυθμό εξέλιξης τους, τις HV1 και HV2. Το συνολικό μέσο εξελικτικό ποσοστό για κάθε υπερμεταβλητή περιοχή (HV1 και HV2) έχει βρεθεί να είναι 0,60 για HV1 μόνο και 0,54 για HV1 και HV2 (Stoneking, 2000).

Αναλύσεις μιτοχονδριακού DNA έχουν επικεντρωθεί κυρίως στην HV1 περιοχή, ενώ η συσχέτιση μεταξύ της HV1 και HV2 δεν έχει εντοπιστεί (Salas et al., 2001).

Συγκριτικές μελέτες της ποικιλότητας της περιοχής ελέγχου στα θηλαστικά έχουν αποκαλύψει ένα μωσαϊκό μοτίβο διακύμανσης, με ορισμένες περιοχές να εξελίσσονται με γοργούς ρυθμούς (π.χ. ETAS και CSB τομείς) και άλλες διατηρούν υψηλή ομοιότητα ακολουθίας σε όλες τις ταξινομικές μονάδες taxa. Αυτή η προφανής, μεταξύ των περιοχών, ετερογένεια εντός της περιοχής ελέγχου έχει χρησιμοποιηθεί για τη μελέτη σε πρότυπα γενετικής ποικιλομορφίας σε διάφορα επίπεδα απόκλισης μεταξύ πληθυσμών. Για παράδειγμα, περισσότερες μεταβλητές περιοχές εντός της περιοχής ελέγχου (ETAS και CSB τομείς) έχουν χρησιμοποιηθεί για λεπτομερείς έρευνες τόσο για τη γενετική δομή ενός πληθυσμού όσο και για τη φυλογεωγραφική δομή του, ενώ περισσότερες συντηρημένες περιοχές (π.χ. το κεντρικό τμήμα) μπορούν να αποδειχθούν χρήσιμες σε φυλογενετικές μελέτες των πιο αποκλίνουσων taxa (Matson & Baker, 2001). Στην εικόνα 8 φαίνεται σχηματικά η δομική οργάνωση της D-loop περιοχής και τα κοινά στοιχεία της σε διάφορους οργανισμούς.



Εικόνα 8 : Οργάνωση των περιοχών της D-loop σε διάφορα θηλαστικά (Sbisa et al., 1997)

Τέλος, μια σειρά από μελέτες έχουν τεκμηριώσει την ύπαρξη ετεροπλασμίας (η ύπαρξη περισσότερων του ενός τύπων mtDNA) για θέσεις στην περιοχή ελέγχου mtDNA (Comas et al 1995, Bendall et al. 1996-1997, Wilson et al. 1997, Huhne et al. 1998, Sigurdardottir et al. 2000, Tully et al. 2000). Η ετεροπλασμική κατάσταση ενός ατόμου θα μπορούσε να έχει προκύψει είτε μέσω μετάδοσης από τη μητέρα (δηλαδή, μέσω της βλαστικής σειράς) ή μέσω μιας νέας σωματικής μετάλλαξης που συμβαίνει μέσα στο άτομο. Οι περισσότερες από τις μελέτες που έχουν αναφερθεί σε ετεροπλασμία δεν έχουν προσπαθήσει να καθορίσουν ποιος μηχανισμός θα μπορούσε να είναι υπεύθυνος. Το μέσο εξελικτικό ποσοστό για τις περιοχές στις οποίες παρατηρήθηκαν αυτές οι ετεροπλασμικές μεταλλάξεις είναι 2,87, το οποίο είναι 4,8 φορές μεγαλύτερο από το συνολικό εξελικτικό ποσοστό για HV1 (Mark Stoneking, 2000).

1.7 Ευρωπαϊκός λαγός (*Lepus europaeus* Pallas, 1778)

Συστηματική κατάταξη του είδους *Lepus europaeus*

Βασίλειο:	Ζώα
Φύλο:	Χορδωτά
Υπό- φύλο:	Σπονδυλωτά
Κλάση:	Θηλαστικά
Τάξη:	Λαγόμορφα
Οικογένεια:	Leporidae
Γένος:	<i>Lepus</i>
Είδος:	<i>L. europaeus</i>



Εικόνα 9: *Lepus europaeus*

Από: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/taxonomy/>

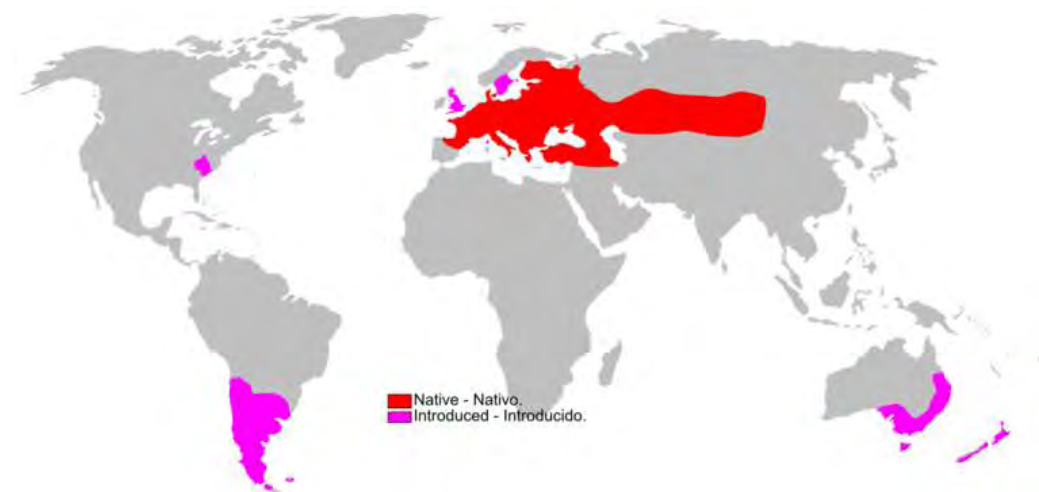
Φυσική περιγραφή

Ο ευρωπαϊκός λαγός (*Lepus europaeus*) είναι ένα θηλαστικό προσαρμοσμένο σε περιοχές με εύκρατο κλίμα. Σχετίζεται και είναι παρόμοιος μορφολογικά με το ευρωπαϊκό κουνέλι, το οποίο ανήκει στην ίδια οικογένεια με το λαγό, αλλά σε διαφορετικό γένος. Ο ευρωπαϊκός λαγός έχει συνολικό μήκος που κυμαίνεται από 60 έως 75cm και ζυγίζει από 3 έως 5 κιλά (Hall & Kelson, 1959, Peterson, 1966). Το χρώμα του είναι καστανόγκριζο έως γκριζο καφέ, εκτός από την περιοχή της κοιλιάς που είναι γκρι-άσπρη. Το κεφάλι έχει καφέ αποχρώσεις με πιο ανοιχτόχρωμους

κύκλους γύρω από τα μάτια. Έχει μακριά αυτιά, τα πίσω πόδια του είναι πιο μακριά από τα μπροστινά, ενώ τα πέλματά του καλύπτονται από παχύ τρίχωμα για να εμποδίζουν την ολίσθηση. Η ουρά, με μήκος συνήθως 7-11cm, είναι μαύρη στο επάνω μέρος της και άσπρη στο κάτω. Η διάρκεια ζωής του φτάνει τα 7-8 χρόνια (Peterson, 1966, Bansfield, 1974). Το χειμώνα το τρίχωμα του ευρωπαϊκού λαγού γίνεται ελαφρώς πιο γκριζο. Επίσης, δεν έχει παρατηρηθεί αξιοσημείωτος διμορφισμός ανάμεσα στα δύο φύλα. Η μοναδική διαφορά που έχει παρατηρηθεί είναι ότι τα αρσενικά έχουν συνήθως πιο παχύ και κοντό λαιμό σε σχέση με τα θηλυκά άτομα (Bansfield, 1974, Dragg, 1974).

Γεωγραφική εξάπλωση

Οι Ευρωπαϊκοί λαγοί είναι εγγενείς σε ένα μεγάλο μέρος της ηπειρωτικής Ευρώπης. Το φάσμα τους εκτείνεται από τη βόρεια Ισπανία στη νότια Σκανδιναβία, την Ανατολική Ευρώπη και βόρεια τμήματα της Μέσης Ανατολής και της Κεντρικής Ασίας. Έχουν επεκτείνει την εμβέλεια τους και στην Σιβηρία (Flux, 1991). Επίσης, έχουν εισαχθεί, κυρίως ως θηραμάτα, στη Βόρεια Αμερική και στη Νότια Αμερική (Βραζιλία, Χιλή, Αργεντινή, Ουρουγουάη, Παραγουάη Βολιβία, Περού και τα νησιά Φώκλαντ), την Αυστραλία, δύο νησιά της Νέας Ζηλανδίας και τη νότια Ειρηνική ακτή της Ρωσίας (Lincoln, 1974, Caillol & Meunier, 1989, Bonino & Montenegro, 1997).(Εικόνα 10)



Εικόνα 10 : Παγκόσμια κατανομή του *Lepus europaeus*

Η εκτεταμένη κατανομή του και το γεγονός ότι ανταποκρίνεται ταχύτατα στις αλλαγές ενδιαίτημάτων του, καθιστούν τον ευρωπαϊκό λαγό ένα είδος-μοντέλο μέσω του οποίου μπορούμε να καταλήξουμε σε χρήσιμα συμπεράσματα όσον αφορά την συμπεριφορά, τη βιολογία και την πληθυσμιακή δομή του είδους αυτού.

1.8 Προηγούμενες μελέτες στο mtDNA του *Lepus europaeus*

Ο προσδιορισμός της αλληλουχίας ολόκληρου του μιτοχονδριακού γονιδιώματος του ευρωπαϊκού λαγού (17734 bp) πραγματοποιήθηκε από τους Arnason et al. το 2002.

Αρχικά, μεγάλη ενδοειδική διαφοροποίηση του mtDNA στο είδος *L. europaeus* παρατηρήθηκε στην Ιβηρική χερσόνησο κατά την έρευνα των Perez- Suarez, (1994), που αποτελεί ένδειξη υβριδισμού του *L. europaeus* με τα είδη *L. castroviejo* και *L. granatensis* που συνυπάρχουν στην περιοχή.

Κατόπιν, η μελέτη των Thulin et al. (1997) σε πληθυσμούς *L. europaeus* και *L. timidus* της Σουηδίας βασίστηκε στην ανάλυση του mtDNA με τη μέθοδο RFLP. Στους πληθυσμούς του *L. europaeus*, ανιχνεύτηκε χαμηλή διαφοροποίηση απλοτύπων, γεγονός που οφείλεται στο ότι οι πληθυσμοί του *L. europaeus* στις Σκανδιναβικές χώρες εισήχθησαν από περιοχές της κεντρικής και βόρειας Ευρώπης, στις οποίες παρατηρείται χαμηλό επίπεδο γενετικής ποικιλότητας. Επίσης τα αποτελέσματα της έρευνας αυτής ανέδειξαν τον υβριδισμό φυσικών πληθυσμών των ειδών *L. europaeus* και *L. timidus*.

Έπειτα, ο Μαμούρης και οι συνεργάτες του (2001) μελέτησαν την γενετική διαφοροποίηση και τη φυλογενετική κατάσταση πληθυσμών του *L. europaeus* της κεντρικής Ελλάδας, καθώς και την επίδραση των απελευθερώσεων εκτρεφόμενων λαγών στη γενετική δομή των φυσικών πληθυσμών. Για το σκοπό αυτό αναλύθηκαν τμήματα του mtDNA με τη μέθοδο RFLP-PCR. Η ανάλυση των δεδομένων αποκάλυψε εκτεταμένη απλοτυπική ποικιλότητα εντός και μεταξύ των φυσικών πληθυσμών. Η απλοτυπική ποικιλότητα ήταν εξίσου κατανομημένη εντός και μεταξύ των γεωγραφικών περιοχών, ενώ η ετερογένεια των απλοτυπικών συχνοτήτων, έδειξε σημαντική γενετική διαφοροποίηση μεταξύ των περιοχών δειγματοληψίας. Επίσης, για να διαφοροποιηθούν πλήρως οι εκτρεφόμενοι από τους φυσικούς πληθυσμούς προσδιορίστηκαν συγκεκριμένα πρότυπα mtDNA που αποδείκνυαν την ύπαρξη εκτρεφόμενων λαγών εντός των φυσικών πληθυσμών, πιθανόν από παλαιότερες απελευθερώσεις.

Στην συνέχεια, ο Κασαπίδης και οι συνεργάτες του (2005) μελέτησαν τη φυλογεωγραφία του ευρωπαϊκού λαγού, αναλύοντας αλληλουχίες της περιοχής ελέγχου του mtDNA από 98 λαγούς από την ηπειρωτική και νησιώτικη Ελλάδα, τη Βουλγαρία, την Κύπρο, το βόρειο Ισραήλ και την Ιταλία. Τα αποτελέσματα της μελέτης υποδεικνύουν δύο διακριτούς τύπους μιτοχονδριακού DNA, έναν «ανατολικό τύπο» και ένα «δυτικό τύπο». Ο «ανατολικός τύπος» περιλαμβάνει απλότυπους από τα νησιά του Ανατολικού Αιγαίου, την Κύπρο, το βόρειο Ισραήλ, τη Θράκη και την ανατολική Μακεδονία. Αντίθετα, στον «δυτικό τύπο» περιλαμβάνονται οι απλότυποι από την Κρήτη, τη Λευκάδα, τη Νάξο, τα Κύθηρα και

την ηπειρωτική Ελλάδα καθώς και οι απλότυποι της Αυστρίας, της Γερμανίας, της Ουγγαρίας, της Σερβίας, της Ρουμανίας, της Βουλγαρίας και της Ιταλίας. Μία ζώνη επικάλυψης των δύο τύπων μιτοχονδριακού DNA εντοπίζεται στην περιοχή της Θράκης και της Βουλγαρίας.

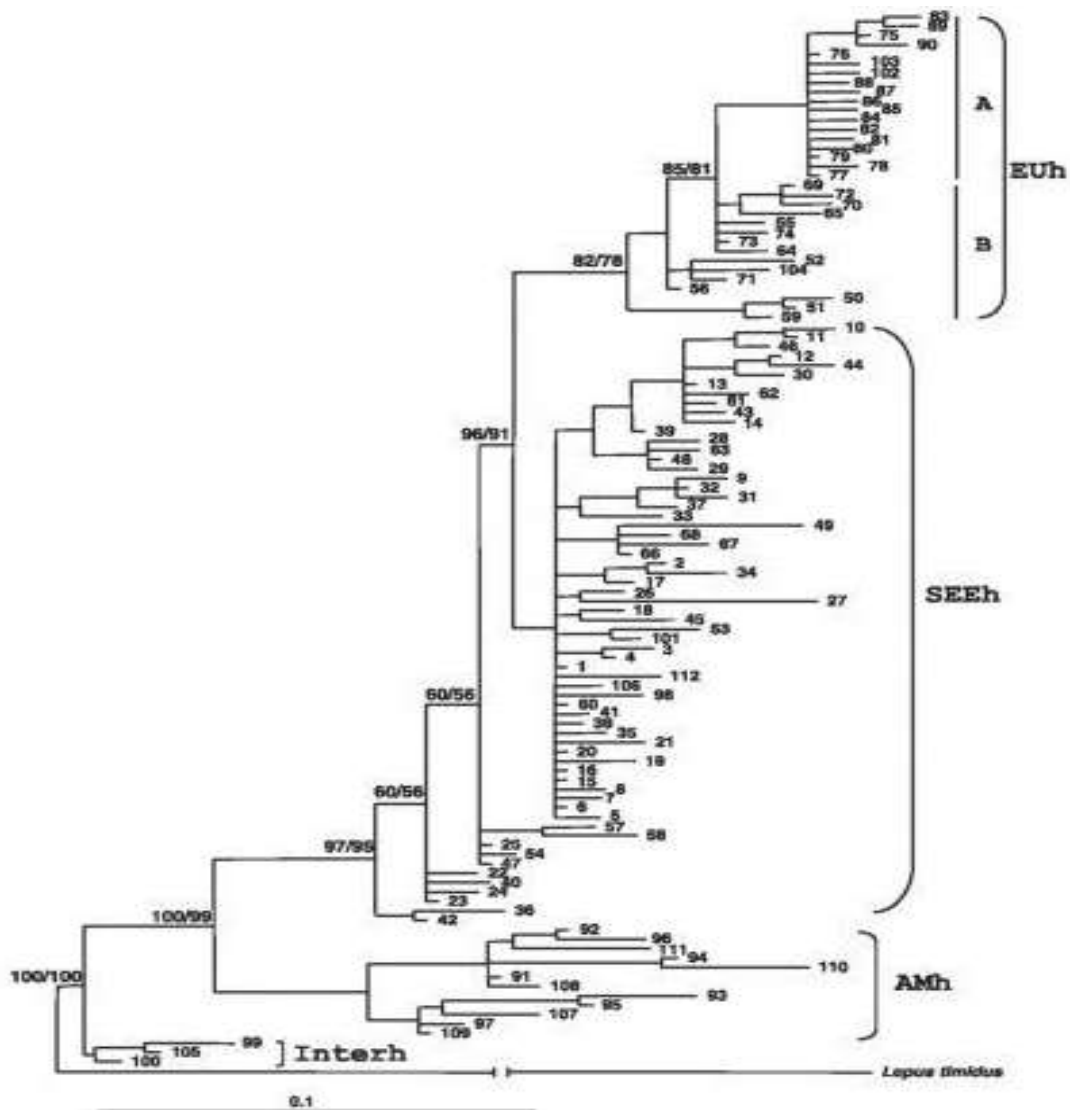
Επιπλέον, ο Fickel και οι συνεργάτες του, (2008) αναλύοντας αλληλουχίες της περιοχής ελέγχου (control region, CR) του mtDNA, σε πληθυσμούς ευρωπαϊκού λαού, έδειξαν ότι η Ιταλική χερσόνησος αποτέλεσε ένα επιπλέον καταφύγιο για τους λαούς κατά την τελευταία Περίοδο των Παγετώνων, από τις οποίες προέκυψε και η αποικία τους στις χώρες της κεντρικής Ευρώπης.

Τέλος, ο Σταμάτης και οι συνεργάτες του, (2009) με βάση φυλογενετικά δεδομένα του mtDNA και σε συνδυασμό με την ανάλυση του γονιδίου Cytb, απέδειξαν φυλογεωγραφικά την ύπαρξη 112 απλοτύπων, τους οποίους κατέταξαν σε 4 διαφορετικές απλοομάδες με πολύ καλά προσδιορισμένη κατανομή στην Ευρώπη και την Ανατολία (Εικόνα 11). Πιο συγκεκριμένα, έχουμε τις εξής 4 απλοομάδες:

1. Ευρωπαϊκή απλοομάδα (EUh) που διακρίνεται σε δύο υπότυπους λόγω φυλογεωγραφίας: α) Ευρωπαϊκή απλοομάδα A (EUh-A, Αγγλία, Ισπανία, Γαλλία, Ολλανδία, βόρεια Γερμανία) και β) Ευρωπαϊκή απλοομάδα B (EUh-B, κεντρική και βόρεια Ελλάδα, Κρήτη)
2. Νότιο-ανατολική ευρωπαϊκή απλοομάδα (SEeh, Ελλάδα, Βουλγαρία)
3. Ανατολική/Μέση Ανατολική απλοομάδα (AMh, Τουρκία, Κύπρος, Ισραήλ)
4. Ενδιάμεση απλοομάδα (INTERh, ενδιάμεση μεταξύ AMh και SEeh)

Στην Βουλγαρία και στην βορειοανατολική Ελλάδα διάσπαρτοι απλότυποι από όλες τις απλοομάδες ήταν παρόντες, σχηματίζοντας έτσι μια μεγάλη ζώνη αλληλεπικάλυψης.

Η απόκλιση των mtDNA απλοτύπων εντός της EUh-A δείχνει γενετική διαφοροποίηση σε όλη την κεντρική, βόρειο-δυτική και νότιο-δυτική Ευρώπη. Αυτό όμως δεν υποστηρίζει την ύπαρξη καταφυγίου λόγω των παγετώνων για λαούς στην Ιβηρική Χερσόνησο (Corbet, 1986, Suchentrunk et al., 2000), ούτε αναφέρει την μετά παγετώνων γονιδιακή ροή από ανατολικές Ευρωπαϊκές ή δυτικής Σιβηρίας περιοχές (Suchentrunk et al., 2000). Τα δεδομένα αυτά δείχνουν ότι ο αποικισμός σε μεγάλα τμήματα της Ευρώπης από λαούς ξεκίνησε από τα τέλη των παγετώνων ή στις αρχές του Ολόκαινου στα κεντρικά ή νότιο-κεντρικά Βαλκάνια. Το γεγονός αυτό συμβαδίζει και με το γενικό πρότυπο της μετα-παγετώνων επέκτασης των πληθυσμών από νότια (Μεσόγειος) καταφύγια, όπως περιγράφεται από τους Taberlet et al. (1998) και Hewitt (2000). Αυτή η βόρεια επέκταση των αποικίσει πληθυσμών ήταν σχετικά γρήγορη και πιθανώς να έφτασαν ως την Ιβηρική Χερσόνησο.



Εικόνα 11: Φυλογενετικό δέντρο για την ομαδοποίηση των 112 απλότυπων του *Lepus europaeus*. Ως εξωμάδα χρησιμοποιήθηκε το είδος *Lepus timidus* (Stamatis et al., 2009)

1.9 Σκοπός της παρούσας μελέτης

Η περιοχή ελέγχου (D-loop) του μιτοχονδριακού γονιδιώματος έχει χρησιμοποιηθεί σε πολλές φυλογενετικές και πληθυσμιακές μελέτες, λόγω των ιδιαίτερων χαρακτηριστικών που παρουσιάζει, ενώ δεν έχει χρησιμοποιηθεί μέχρι σήμερα ευρύτατα για τη μελέτη των σχέσεων στον *L. europaeus*. Επίσης, υπάρχουν περιορισμένα δεδομένα σε σχέση με τη μοριακή δομή της περιοχής ελέγχου σε αυτό το είδος.

Στην εργασία αυτή πραγματοποιήθηκε πληθυσμιακή ανάλυση σε πληθυσμούς *Lepus europaeus* από Ελλάδα, Τουρκία, Γαλλία, βόρειο Ισραήλ, Κύπρο και Γερμανία. Η μελέτη στηρίχθηκε στην ανάλυση του μιτοχονδριακού DNA ως μοριακό δείκτη

χρησιμοποιώντας κυρίως τις μοριακές τεχνικές της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) και της αλληλούχησης.

Οι βασικοί στόχοι της μελέτης είναι οι εξής:

1. Ανίχνευση πολυμορφισμών, δηλαδή προσδιορισμός μεταλλάξεων της περιοχής ελέγχου D-loop και κατ' επέκταση εύρεση των παρόντων mtDNA απλοτύπων
2. Εκτίμηση της γενετικής ποικιλομορφίας μεταξύ των πληθυσμών του *L. euroraeus* που αναλύθηκαν

2. Υλικά και Μέθοδοι

2.1 Απομόνωση γενετικού υλικού

Τα δείγματα μελέτης συλλέχθηκαν από διάφορα ενδιαυτήματα όπου είχαν αποικίσει άτομα του είδους *Lepus europaeus* στις διάφορες χώρες. Η συλλογή αυτή έγινε με τη βοήθεια τοπικών κυνηγετικών συλλόγων και ο ιστός που αφαιρέθηκε και χρησιμοποιήθηκε για την απομόνωση του γενετικού υλικού των λαγών ήταν ιστός από το ήπαρ. Επειδή δεν υπήρχε δυνατότητα επεξεργασίας όλων των ιστών την ίδια μέρα, η διατήρηση έγινε σε αποστειρωμένα φιαλίδια erpendorfs με αιθανόλη στην κατάψυξη μέχρι την ημέρα της επεξεργασίας.

Αρχικά, το πρώτο βήμα είναι η απομόνωση του γενετικού υλικού, το οποίο περιλαμβάνει το πυρηνικό και το μιτοχονδριακό DNA. Ακολούθησε αξιολόγηση της ποιότητας και της ποσότητας του γενετικού υλικού εφαρμόζοντας πρωτόκολλο απομόνωσης. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκε το πρωτόκολλο TNES-Urea Buffer (Asahida et al., 1996) κάνοντας τις απαραίτητες τροποποιήσεις. Τα δείγματα από τα οποία απομονώθηκε το γενετικό υλικό παρουσιάζονται στον πίνακα 1.

Δείγμα	Δείγμα
Greece 1	L. North Israel 1
Greece 3	L. North Israel 3
Greece 4	L. North Israel 4
Greece 5	Cyprus 1
Greece 6	Cyprus 3
Greece 7	Cyprus 4
Greece 8	Cyprus 8
Greece 13	Cyprus 9
Turkey 3	Cyprus 14
Turkey 4	Cyprus 18
Turkey 5	Cyprus 26
Turkey 6	Cyprus 28
Turkey 7	Cyprus 37
Turkey 13	Germany 4
Turkey 14	Germany 5
Turkey 19	Germany 8
France 1	Germany 10
France 2	Germany 18
France 3	Germany 23
France 10	Germany 26

Πίνακας 1: Δείγματα μελέτης

Σύμφωνα με το πρωτόκολλο για την απομόνωση χρησιμοποιείται 50 έως 100 mg ιστού και η πειραματική διαδικασία που ακολουθείται είναι η εξής:

1. Ο ιστός τοποθετείται τεμαχισμένος σε σωλήνα erpendorf του 1,5 ml και προσθέτουμε 650 μl TNES-Urea buffer
2. Προστίθενται 10 μl πρωτεϊνάσης K 10mg/ul ώστε να γίνει η πέψη των πρωτεϊνών
3. Γίνεται επώαση στους 37 °C για 24 ώρες
4. Προστίθενται 700 μl φαινόλη στα δείγματα και αναδεύουμε με την βοήθεια vortex έντονα
5. Φυγοκέντρηση στις 13.000 rpm στους 4 °C για 10 min
6. Απομακρύνεται το υπερκείμενο από τα δείγματα και μεταφέρεται σε νέους σωλήνες. Έπειτα, προστίθεται 350 μl φαινόλη και 350 μl χλωροφορμίου/ ισοαμλικής αλκοόλης (24:1).
7. Φυγοκέντρηση στις 13.000 rpm στους 4 °C για 10 min
8. Απομακρύνεται το υπερκείμενο από τα δείγματα και μεταφέρεται σε νέους σωλήνες. Προστίθεται 700 μl χλωροφορμίου/ ισοαμλικής αλκοόλης (24:1).
9. Φυγοκέντρηση στις 13.000 rpm στους 4 °C για 10 min
10. Απομακρύνεται το υπερκείμενο σε νέα erpendorf.
11. Ακολουθεί κατακρήμνιση DNA, προσθέτοντας 10% του όγκου CH₃COONa και 2 όγκους 100% αιθανόλη.
12. Αφού ανακινηθεί ελαφρά, αποθηκεύεται στους -20 °C για 1h.
13. Φυγοκέντρηση στις 13.000 rpm στους 4 °C για 20 min
14. Απομακρύνεται τα υπερκείμενο και έκπλυση με διάλυμα 100% αιθανόλης
15. Φυγοκέντρηση στις 13.000 rpm στους 4 °C για 5 min
16. Απομακρύνεται η αιθανόλη, ακολουθεί επαναδιάλυση του DNA σε 100μl ddH₂O και επώαση στους 55 °C για 1h.

2.2 Προσδιορισμός της συνολικής ποσότητας στο δείγμα

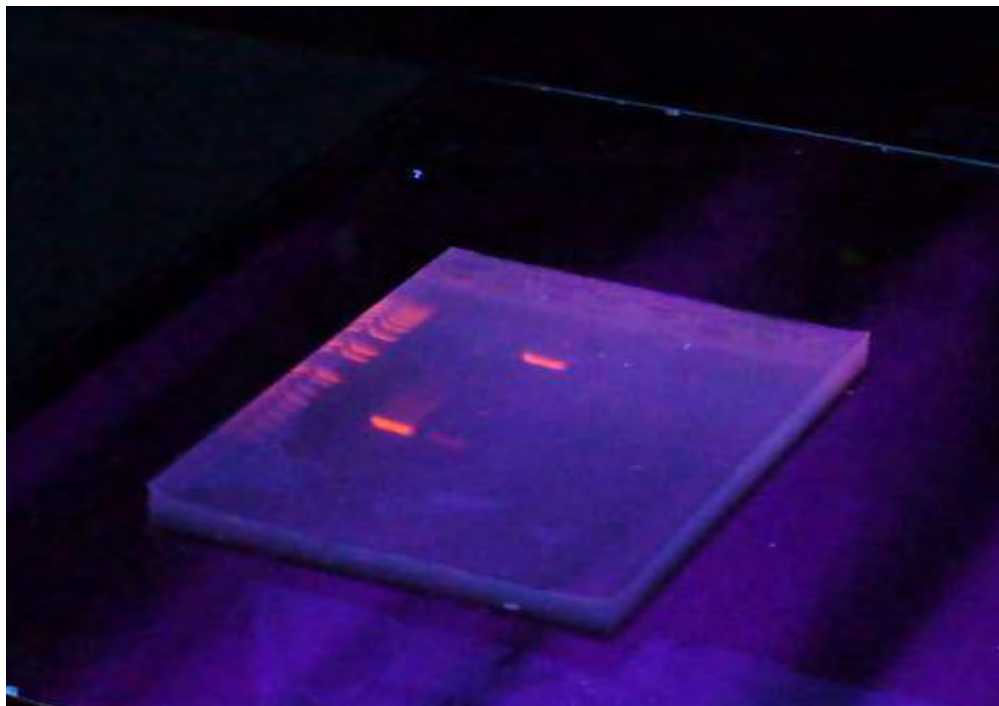
Μετά την απομόνωση του DNA πρέπει να προσδιοριστεί η ποσότητα του. Πραγματοποιείται είτε μέσω φωτομέτρησης ποσοτικά είτε μέσω ηλεκτροφόρησης σε πηκτή αγαρόζης 1% w/v. Για την φωτομέτρηση των δειγμάτων γίνεται αραιώση 1μl διαλύματος DNA σε 49μl ddH₂O. Οι τιμές της απορρόφησης στα 260nm ανάγονται σε συγκέντρωση DNA η οποία ενδείκνυται να είναι πάνω από 150 ng/μl.

Η κύρια μέθοδος ποιοτικού προσδιορισμού της ποσότητας του DNA σε κάθε δείγμα είναι η ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 1% w/v. Πρόκειται για μια τεχνική διαχωρισμού φορτισμένων μορίων (του DNA στο πείραμα αυτό). Το DNA είναι ένα αρνητικά φορτισμένο μόριο το οποίο κινείται διαμέσου της πηκτής της αγαρόζης από τον αρνητικό πόλο προς τον θετικό της συσκευής ηλεκτροφόρησης. Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό τμημάτων DNA ανάλογα με το μέγεθος τους. Το μέγεθος των τμημάτων εκτιμάται με βάση κάποιο μάρτυρα μοριακών μεγεθών τμημάτων DNA (ladder).

Για την προετοιμασία του πηκτώματος χρησιμοποιείται αγαρόζη, που αποτελεί έναν ευθύγραμμο πολυσακχαρίτη ο οποίος εκχυλίζεται σε μεγάλες ποσότητες από αρκετά είδη ερυθροφύκων και σχηματίζει πήκτωμα με πόρους που κυμαίνονται από 100 έως 300nm διάμετρο. Το μέγεθος των πόρων εξαρτάται από τη συγκέντρωση της αγαρόζης στο πήκτωμα. Η συγκέντρωση της αγαρόζης καθορίζει συνεπώς, το εύρος των τμημάτων DNA που μπορούν να διαχωριστούν.

Αρχικά, παρασκευάζουμε διάλυμα TAE 1X αραιώνοντας το διάλυμα stock 50X (20ml σε τελικό όγκο 1lt). Σε μια κωνική φιάλη των 200 ml μεταφέρονται 0.3 gr αγαρόζης σε 50 ml TAE 1X (τελική συγκέντρωση 1% w/v). Έπειτα, η φιάλη τοποθετείται σε φούρνο μικροκυμάτων για μερικά λεπτά. Μετά το τέλος αυτής της διαδικασίας, η φιάλη τοποθετείται κάτω από την βρύση για να κρυώσει λίγο. Κατόπιν, μεταφέρεται στον απαγωγό και προστίθενται 5 μl βρωμιούχο αιθίδιο (EtBr), ενώ αναδεύεται ελάχιστα. Πρέπει να αναφερθεί ότι το βρωμιούχο αιθίδιο χρήζει υψηλής προσοχής κατά την χρήση του. Ωστόσο, είναι πολύ χρήσιμο για το πείραμα καθώς έχει την ιδιότητα να εισχωρεί στις έλικες του DNA και να τις κάνει ορατές όταν το τελευταίο εκτεθεί σε υπέρυθη ακτινοβολία με αποτέλεσμα να καθίσταται δυνατή η ανίχνευση του DNA και η εξέταση των αποτελεσμάτων της απομόνωσης γενετικού υλικού. Στην συνέχεια, το διάλυμα χύνεται ομοιογενώς στην ειδική πλάκα ηλεκτροφόρησης στην οποία τοποθετούνται «χτενάκια», ξεκινώντας από την μέση της πλάκας αυτής. Το κάθε «χτενάκι» αποτελείται από έναν οριζόντιο άξονα κατά μήκος του οποίου ξεκινούν 12 κάθετοι άξονες (θέσεις) και χρησιμοποιείται για την δημιουργία θέσεων μέσα στο πήκτωμα αγαρόζης. Η πλάκα ηλεκτροφόρησης που περιέχει το πήκτωμα αγαρόζης αφήνεται για λίγα λεπτά μέσα στον απαγωγό ώστε να στερεοποιηθεί (πολυμερισμός). Σε αυτό το στάδιο το περιεχόμενο των

δειγμάτων απομόνωσης του DNA μπορεί να μεταφερθεί στο πήκτωμα αγαρόζης στη συσκευή ηλεκτροφόρησης στην οποία έχει προστεθεί TAE Buffer 1X. Συγκεκριμένα, μεταφέρονται 3 μl ειδικής χρωστικής loading buffer 6x ανά 3 μl δείγματος στο κάθε πηγαδάκι της πηκτής. Τέλος, η συσκευή ηλεκτροφόρησης ρυθμίζεται στα 100V και ενεργοποιείται για περίπου 20 λεπτά. Μετά το πέρας του χρόνου αυτού ακολουθεί παρατήρηση της πηκτής σε λάμπα υπεριώδους φωτός και παρατήρηση των αποτελεσμάτων (εικόνα 12).



Εικόνα 12 : Παράδειγμα πηκτής αγαρόζης υπό υπεριώδη ακτινοβολία με ζώνες που γίνονται ορατές χάρη στο βρωμιούχο αιθίδιο (EtBr)

Τα διαλύματα που χρησιμοποιούνται για την τεχνική αυτή είναι τα εξής:

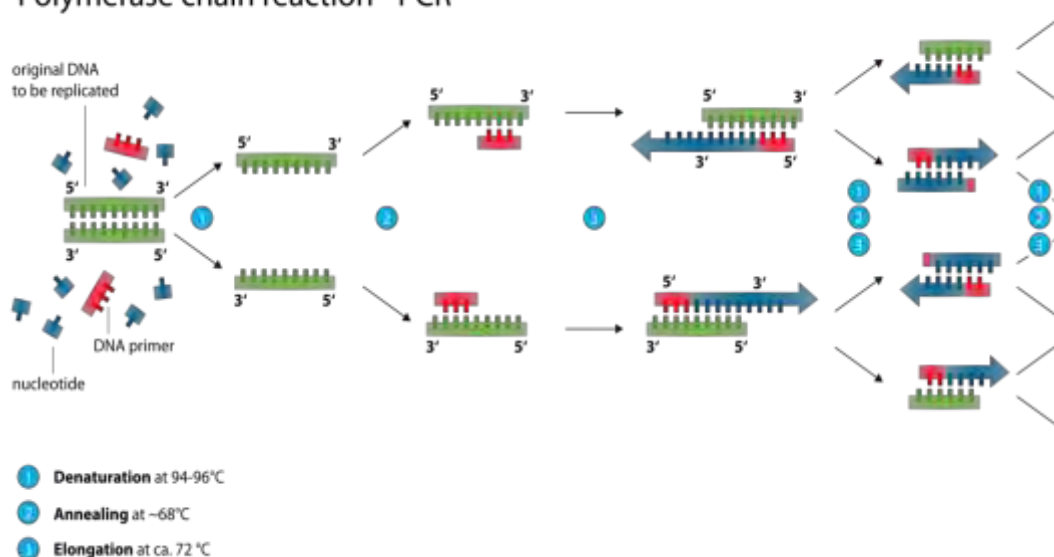
TAE 50x (500ml)	Loading buffer 6x (10ml)
1.Tris Base 121gr	1.Bromophenol blue 1ml 1% w/v
2.Acetic Acid 28,5ml	2.TBE 20x 0,5ml
3.EDTA 0,5M 50ml	3.Glycerol 5ml

2.3 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Η βασική μέθοδος που εφαρμόστηκε στα πλαίσια της παρούσας εργασίας είναι η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR). Είναι μια σχετικά νέα μέθοδος που επιτρέπει τον ενζυμικό πολλαπλασιασμό *in vitro* επιλεγμένων αλληλουχιών του DNA από ελάχιστες αρχικές ποσότητες υλικού. Μέσω της PCR καθίσταται δυνατή η παραγωγή τεράστιου αριθμού πιστών αντιγράφων μιας συγκεκριμένης αλληλουχίας DNA με απλό σχετικά τρόπο. Χάρη στην εξαιρετική ταχύτητα, ευαισθησία και εντυπωσιακή της απλότητα, η αντίδραση της PCR αποτελεί σήμερα το πλέον βασικό και ουσιαστικό εργαλείο στη διερεύνηση της γενετικής ποικιλότητας των διαφόρων πληθυσμών, αλλά και στις μελέτες της μοριακής γενετικής, γενικότερα.

Η αρχή λειτουργίας της μεθόδου βασίζεται στη χρήση μιας ειδικής DNA (της θερμοσταθερής Taq DNA πολυμεράσης που έχει απομονωθεί από το θερμοφίλο βακτήριο *Thermus aquaticus* και αντέχει σε θερμοκρασίες έως 95 °C), ενός ζεύγους συνθετικών ολιγονουκλεοτιδίων (συνήθως 20-30 βάσεων) που ονομάζονται εκκινητές (primers), ενός διαλύματος ελεύθερων 5' τριφωσφορικών δεοξυριβονουκλεοτιδίων (dNTPs), ενός διαλύματος MgCl₂, ενός ειδικού διαλύματος για την Taq DNA πολυμεράση και στην παρουσία μιας ποσότητας DNA που παίζει το ρόλο του μορίου-μήτρας. Για την επιλογή των δύο κατάλληλων αλληλουχιών-αφετηριών πρέπει να είναι γνωστή η αλληλουχία των βάσεων των δύο άκρων του τμήματος του DNA, το οποίο μελετάται. Η αλληλουχία του κάθε εκκίνητη είναι συμπληρωματική με την αλληλουχία ενός κλώνου της δίκλωνης έλικας του DNA στα δύο αντίθετα άκρα της επιλεγμένης περιοχής. Ένα τυπικό πρωτόκολλο της PCR διακρίνεται σε τρεις φάσεις: την αποδιάταξη της διπλής έλικας (denaturation), την πρόσδεση (annealing) των ειδικών εκκινητών με τις μονές έλικες και την επέκταση (extension) των εκκινητών. Στην πρώτη φάση της αντίδρασης σε υψηλή θερμοκρασία, 92 °C, η διπλή έλικα του DNA διασπάται σε δύο μονές έλικες. Αμέσως μετά σε θερμοκρασία χαμηλότερη με διαφορά της τάξης των 35 °C - 40 °C (η θερμοκρασία αυτού του σταδίου εξαρτάται από την αλληλουχία των εκκινητών) οι εκκινητές (primers) προσδένονται πάνω στο μόριο RNA με τα αντίστοιχα συμπληρωματικά προς αυτά άκρα των δύο αλυσίδων. Στην τρίτη φάση η θερμοκρασία ανεβαίνει στους 72 °C, οπότε η πολυμεράση καταλύει την επέκταση του κάθε ολιγονουκλεοτιδίου σύμφωνα με την αλληλουχία που χρησιμοποιείται σαν εκμαγείο. Η επέκταση γίνεται πάντοτε προς την πλευρά της 3' θέσης. Η διαδικασία επαναλαμβάνεται αρκετές φορές (Εικόνα 12). Έτσι, από τη μία διπλή έλικα δημιουργούνται δύο διπλές έλικες, στον αμέσως επόμενο κύκλο οι έλικες έχουν γίνει 4 και ο πολλαπλασιασμός συνεχίζεται εκθετικά για 35 κύκλους. Το αποτέλεσμα είναι ο πολλαπλασιασμός του τμήματος στόχου μέχρι μερικά εκατομμύρια φορές σε λίγες ώρες (Τριανταφυλλίδης, 2001).

Polymerase chain reaction - PCR



Εικόνα 13 : Σχηματική αναπαράσταση της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR)

Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματοποιήθηκε για την ενίσχυση του τμήματος της περιοχής ελέγχου (D-loop). Για την PCR χρησιμοποιήθηκαν οι παρακάτω εκκινητές, οι οποίοι σχεδιάστηκαν στην διαθέσιμη αλληλουχία μιτοχονδριακού DNA του είδους (Accession number : AJ421471)

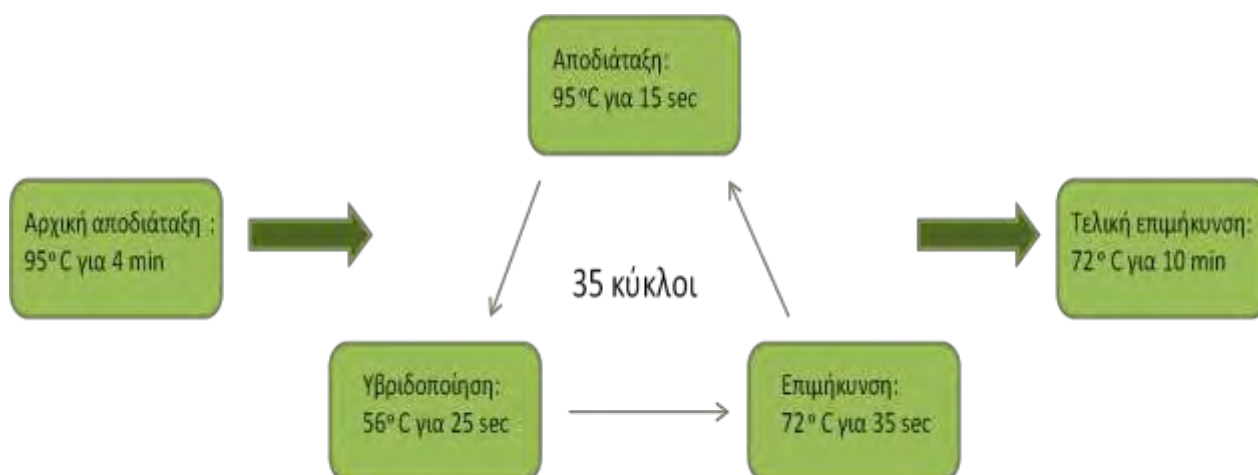
Εκκινητής	Αλληλουχία
16670 RV	5'-AGG TGC TAT GTC GTG ATT CTT GT-3'
15900-16900 FW	5'-CCG GGC CCA TTC TAC TTG G-3'

Η σύσταση των διαλυμάτων που χρησιμοποιήθηκαν κατά την αντίδραση είναι η εξής:

Υλικά	Αρχική συγκέντρωση	Τελική συγκέντρωση	Ποσότητα
Εκμαγείο DNA	-	2-4ng/ul	0,5-1 μl
dNTPs	10mM each	0,2 mM	1 μl
MgCl ₂	50mM	2mM (0,5mM)	2 μl
Buffer	10x	1x	5 μl
Εκκινητής FW	50pmol/μl	0,7pmol	0,7 μl
Εκκινητής RV	50pmol/μl	0,7pmol	0,7 μl
Taq DNA Polymerase	5 U/μl	1U	0,2 μl
ddH ₂ O	-	-	έως 50μl
Συνολικός όγκος	-	-	50μl

Να σημειωθεί ότι προκειμένου να πολλαπλασιαστεί επιλεκτικά μόνο ο επιθυμητός στόχος DNA, οι εκκινητές πρέπει να έχουν υψηλή εξειδίκευση και αποδοτικότητα, συνεπώς ο επιτυχής σχεδιασμός τους είναι πολύ σημαντικός. Επίσης, είναι σημαντικό τα δεοξυριβονουκλεοτίδια να βρίσκονται σε ίση συγκέντρωση μεταξύ τους για να μην γίνονται λάθη κατά την αντιγραφή του στόχου DNA. Ιδιαίτερη προσοχή απαιτεί και η συγκέντρωση του $MgCl_2$ καθώς επηρεάζει τον υβριδισμό του εκκινητή, τη θερμοκρασία αποδιάταξης του DNA και των προϊόντων PCR, τη δημιουργία διμερών από τους εκκινητές, την εξειδίκευση των προϊόντων και τη δραστηριότητα και πιστότητα της πολυμεράσης. Προϊόντα που δεν αντιστοιχούν στην αλληλουχία του στόχου DNA μπορούν να παραχθούν όταν η συγκέντρωση $MgCl_2$ είναι υψηλή. Τέλος, είναι ιδιαίτερα σημαντική η διατήρηση της πολυμεράσης, λόγω του μεγάλου κόστους της και της εξαιρετικής ευαισθησίας της. Έτσι, καθ όλη την διάρκεια της διαδικασίας πρέπει να παραμένει σε χαμηλές θερμοκρασίες ($-20\text{ }^\circ\text{C}$) και να είναι πάντα το τελευταίο συστατικό που προστίθεται στο μείγμα.

Οι συνθήκες PCR ώστε να ενισχυθεί το τμήμα της περιοχής ελέγχου είναι :



Έπειτα, ακολούθησε προσδιορισμός των αποτελεσμάτων της διαδικασίας αυτής, δηλαδή των προϊόντων PCR.

2.4 Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων PCR

Η ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης έχει ως στόχο τον προσδιορισμό της ποσότητας και της ποιότητας των προϊόντων PCR ώστε να μελετηθούν πολυμορφισμοί στο συγκεκριμένο τμήμα που ενισχύθηκε.

Αυτή τη φορά για τον προσδιορισμό των αποτελεσμάτων PCR χρησιμοποιείται πηκτή αгарόζης 2% w/v. Η διαδικασία που ακολουθείται είναι η ίδια με την

ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 1% w/v με μερικές διαφορές στις ποσότητες των διαλυμάτων που χρησιμοποιούνται. Συγκεκριμένα, σε αντίθεση με την ηλεκτροφόρηση με DNA, σε αυτή την περίπτωση παρασκευάζουμε διάλυμα TAE 1x αραιώνοντας το διάλυμα stock 50x (20 ml σε τελικό όγκο 1 lt) και διαλύουμε 0,6 gr αγαρόζης σε 50 ml TAE 1x με θέρμανση και προσθέτουμε 5 ml βρωμιούχου αιθιδίου (EtBr 10mg/ml). Σε 5 ml PCR προϊόντος προστίθενται 3 ml loading buffer. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται στα 100 volts και ακολουθεί παρατήρηση της πηκτής σε λάμπα υπεριώδους φωτός.

Μερικές φορές, περισσότερες από μία αλληλουχία DNA μπορεί να πολλαπλασιαστούν με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR). Η ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να ελέγξει κατά πόσο ή όχι λαμβάνει χώρα κάτι τέτοιο. Αν έχει αντιγραφεί μόνο η αλληλουχία που μας ενδιαφέρει, θα πρέπει να εμφανιστεί μια μονή ζώνη στη πηκτή (όλα τα αντίτυπα ακολουθίας θα είναι το ίδιο μέγεθος, και θα πρέπει να τρέξουν την ίδια απόσταση μέσω της πηκτής). Αν έχουν αντιγραφεί περισσότερες από μία αλληλουχίες, θα εμφανιστούν περισσότερες από μία μπάντα (κάθε ζώνη αντιπροσωπεύει διαφορετικού μεγέθους κομμάτια DNA). Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, όταν είναι γνωστό το μέγεθος του θραύσματος DNA που επιθυμούμε να αντιγραφεί, μπορούμε να συγκρίνουμε τις μπάντες των δειγμάτων με τις μπάντες από έναν μάρτυρα του DNA (DNA ladder). Αυτό θα βοηθήσει να εντοπιστεί η μπάντα που περιέχει το DNA που μας ενδιαφέρει. Το DNA μπορεί στη συνέχεια να εξαχθεί από την πηκτή και να χρησιμοποιηθεί για περαιτέρω ανάλυση.

2.5 Εξαγωγή ζωνών από την πηκτή και καθαρισμός του DNA

Εξαγωγή πηκτής ή απομόνωση πηκτής (gel extraction) είναι μια τεχνική που χρησιμοποιείται για την απομόνωση ενός επιθυμητού θραύσματος DNA από μία πηκτή αγαρόζης, μετά από ηλεκτροφόρηση, με βάση το μέγεθος. Η μέθοδος αυτή επιτρέπει στην συνέχεια και τον καθαρισμό των τμημάτων DNA (DNA purification).

Περιλαμβάνει τα εξής βασικά βήματα :

1. Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης, μεταφέρεται σε μια λάμπα υπεριώδους φωτός, όπου γίνεται ταυτοποίηση των τμημάτων/ζωνών που μας ενδιαφέρουν
2. Με ένα καθαρό, αποστειρωμένο νυστέρι πραγματοποιείται κοπή του επιθυμητής ζώνης DNA από το πηκτή
3. Τοποθέτηση των κομματιών πηκτής σε φιαλίδια eppendorfs
4. Χρησιμοποιώντας ζυγό ακριβείας, ζυγίζονται τα eppendorfs με το κομμάτι πηκτής αφού μηδενιστεί ο ζυγός με ένα άδειο eppendorf. Το βάρος του κομματιού πηκτής είναι ευθέως ανάλογο με τον όγκο του και

χρησιμοποιείται για να καθορίσει την ποσότητα που απαιτείται από κάθε διάλυμα (buffer) για να προστεθεί κατά το στάδιο του καθαρισμού του DNA.

5. Τέλος, είναι επιθυμητή η απομόνωση του DNA από τη πηκτή. Αυτό γίνεται με ένα εμπορικό κιτ καθαρισμού πηκτής, όπως το QIAquick Gel Extraction Kit και ακολουθούνται οι οδηγίες του κατασκευαστή.

2.6 Αλληλούχηση κατά Sanger

Απαραίτητο καθίσταται να γνωρίζουμε τις αλληλουχίες των περιοχών ελέγχου D-loop των ατόμων των οποίων ερευνούμε τις φυλογενετικές σχέσεις. Γι' αυτό το λόγο, τα προϊόντα PCR που επιλέγονται αφού καθαριστούν με τη χρήση κατάλληλου kit ώστε να αφαιρεθούν τα παραπροϊόντα, στη συνέχεια αποστέλλονται σε εταιρείες που πραγματοποιούν αυτού του είδους αλληλούχηση.

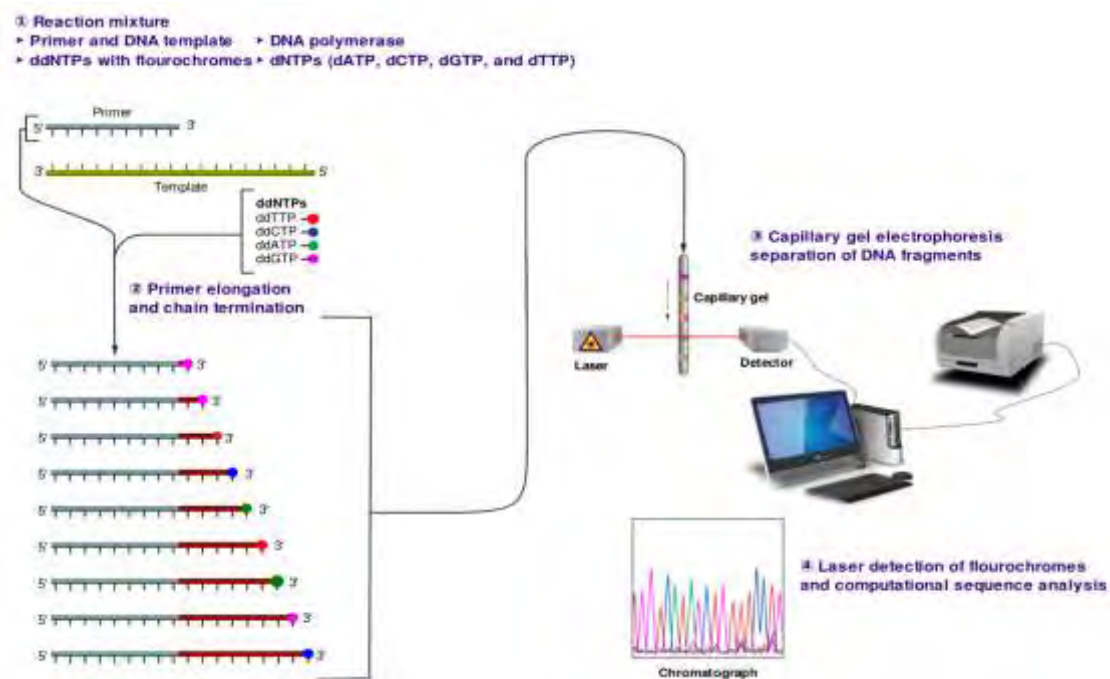
Η αλληλούχηση κατά Sanger, επίσης γνωστή ως αλληλούχηση τερματισμού αλυσίδας, αναφέρεται ως μία μέθοδος προσδιορισμού αλληλουχίας του DNA που αναπτύχθηκε από τον Frederick Sanger το 1977. Αυτή η μέθοδος βασίζεται στην ενίσχυση του θραύσματος DNA που πρόκειται να αλληλουχηθεί με DNA πολυμεράση και στην ενσωμάτωση τροποποιημένων νουκλεοτιδίων που είναι γνωστά ως διδεοξυνουκλεοτίδια (ddNTPs).

Η κλασική μέθοδος τερματισμού αλυσίδας απαιτεί ένα μονόκλωνο εκμαγείο DNA, έναν εκκινητή DNA, μια DNA πολυμεράση, κανονικά τριφωσφορικά δεοξυριβονουκλεοτίδια (dNTPs), και τροποποιημένα νουκλεοτίδια (dideoxynTPs) που τερματίζουν την επιμήκυνση του κλώνου DNA. Αυτά τα νουκλεοτίδια τερματισμού αλυσίδας στερούνται ομάδα 3'-OH που απαιτείται για τον σχηματισμό ενός φωσφοδιεστερικού δεσμού μεταξύ δύο νουκλεοτιδίων, προκαλώντας τη DNA πολυμεράση να σταματήσει την επέκταση του DNA όταν ένα ddNTP ενσωματώνεται. Τα ddNTPs μπορεί να είναι ραδιενεργά ή να έχουν σημανθεί με φθορίζουσες ουσίες για ανίχνευση σε αυτοματοποιημένης ανάλυσης ακολουθίας μηχανήματα.

Στη μη αυτοματοποιημένη μέθοδο το DNA δείγμα διαιρείται σε τέσσερις ξεχωριστές αντιδράσεις προσδιορισμού της αλληλουχίας, που περιέχουν και τα τέσσερα δεοξυριβονουκλεοτίδια (dATP, dGTP, dCTP και dTTP) και την DNA πολυμεράση. Σε κάθε αντίδραση προστίθεται μόνο ένα από τα τέσσερα διδεοξυνουκλεοτιδίων (ddATP, ddGTP, ddCTP ή ddTTP). Μετά από γύρους επέκτασης του δείγματος DNA από το δεσμευμένο εκκινητή, τα προκύπτοντα θραύσματα DNA αποδιατάσσονται με θερμότητα και διαχωρίζονται κατά μέγεθος με ηλεκτροφόρηση σε αποδιατακτικό πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου-ουρίας με καθεμία από τις τέσσερις αντιδράσεις να πραγματοποιούνται σε καθεμία από τις τέσσερις μεμονωμένες λωρίδες (γραμμές A, T, G, C). Οι ζώνες του DNA μπορούν στη συνέχεια να γίνουν

ορατές με αυτοραδιογραφία ή υπεριώδες φως και η αλληλουχία DNA μπορεί άμεσα να διαβαστεί με βάση την ένδειξη του φιλμ ακτίνων-X ή την εικόνα της πηκτής.

Τεχνική παραλλαγή της αλληλούχησης τερματισμού αλυσίδας περιλαμβάνει ετικέτες με νουκλεοτίδια που περιέχουν ραδιενεργό φωσφόρο για ραδιοσήμανση, ή χρησιμοποιώντας έναν εκκινητή σημασμένο στο 5' άκρο με μια φθορίζουσα χρωστική. Ο φθορίζοντας εκκινητής διευκολύνει την ανάγνωση σε ένα οπτικό σύστημα για την ταχύτερη και πιο οικονομική ανάλυση και αυτοματοποίηση. Η τελευταία αυτή ανάπτυξη, από τον Leroy Hood και τους συνεργάτες του, για τη σήμανση μέσω φθορισμού ddNTPs και εκκινητών θέτει τη βάση για την αυτοματοποιημένη, υψηλής απόδοσης αλληλούχηση DNA. Με αυτό τον τρόπο οι μέθοδοι τερματισμού αλυσίδας έχουν απλοποιηθεί σε μεγάλο βαθμό για την εύρεση της αλληλουχίας του DNA. Η αλληλούχηση αυτή χρησιμοποιεί σήμανση των ddNTPs αλυσίδας τερματισμού, η οποία επιτρέπει αλληλούχηση σε μία μόνο αντίδραση, αντί για τέσσερις αντιδράσεις όπως στη μη-αυτοματοποιημένη μέθοδο. Καθένα από τα τέσσερα διδεοξυριβονουκλεοτίδια που σταματούν την επιμήκυνση της αλυσίδας είναι σημασμένα με τις φθορίζουσες χρωστικές και εκπέμπουν φως σε διαφορετικά μήκη κύματος. Καθώς τα τμήματα DNA διαχωρίζονται και κινούνται στην πηκτή κατά την ηλεκτροφόρηση μια ακτίνα λέιζερ διεγείρει τις φθορίζουσες χρωστικές. Κατόπιν, από κάθε τμήμα DNA εκπέμπεται φως/σήμα που αντιστοιχεί στο είδος της βάσης που υπάρχει στο 3' άκρο της αλυσίδας και ευθύνεται για τον τερματισμό επέκτασης της. Στην συνέχεια, το φως συλλέγεται από έναν ανιχνευτή φωτός και τα δεδομένα αποστέλλονται σε υπολογιστή που μεταφράζει τα σήματα φθορισμού σε αλληλουχίες βάσεων με τη χρήση ειδικών αλγορίθμων (π.χ. αλγόριθμος Phred) (Εικόνα 14).



Εικόνα 14 : Σχηματική αναπαράσταση αυτοματοποιημένης μεθόδου κατά Sanger

Τελικά, παραλαμβάνεται ένα χρωματογράφημα, όπως της εικόνας 14, μέσω του οποίου μπορούμε να εξάγουμε την επιθυμητή αλληλουχία και με προγράμματα βιοπληροφορικής να οδηγηθούμε σε ανάλυση των φυλογενετικών σχέσεων.

2.7 Ανάλυση χρωματογραφημάτων αλληλούχησης

Η ανάλυση αυτή πραγματοποιείται με τη χρήση του προγράμματος BioEdit. Το BioEdit εκτός από το ευέλικτο περιβάλλον που δίνει ο Editor, παρέχει και τα περισσότερα εργαλεία ανάλυσης όπως: αναλύσεις υδοφοβικότητας, προγνωστικούς αλγόριθμους, οπτικοποίηση περιοριστικών χαρτών, διασυνδέσεις με πολλές βάσεις δεδομένων, εργαλεία στοίχισης και οπτικοποίησης στοιχίσεων (BLAST, dot plot κλπ.), αναζητήσεις προτύπων, αμοιβαία πληροφορία, εργαλεία φυλογενετικής ανάλυσης, αλλά και δυνατότητα προσθήκης και άλλων εργαλείων από το χρήστη.

Στο χρωμάτογράφημα, απεικονίζονται 4 καμπύλες με διαφορετικά χρώματα, το καθένα από τα οποία αντιστοιχεί και σε διαφορετικό νουκλεοτίδιο. Έτσι, παρατηρώντας το χρώμα της κορυφής της καμπύλης σε κάθε διαφορετική θέση, μπορούμε να συμπεράνουμε ποιο νουκλεοτίδιο βρίσκεται στη θέση αυτή. Η αλληλούχηση γίνεται και για τις δυο αλυσίδες (με διαφορετικό εκκινητή για την κάθε μια) και στη συνέχεια οι δυο αλληλουχίες που προκύπτουν ομοπαράτιθενται με τη χρήση κατάλληλου προγράμματος βιοπληροφορικής. Υπάρχουν πολλές παραλλαγές για την μέθοδο τέτοιου τύπου ανάλυσης που κυρίως έχουν να κάνουν με την επιλογή αλγορίθμου για την εύρεση των ομόλογων αλλά και για την κατασκευή της πολλαπλής στοίχισης. Γενικά, όλες οι επιλογές είναι θεμιτές αλλά η πιο εύκολη και πρακτική λύση είναι ο συνδυασμός BLAST και CLUSTAL.

Ο αλγόριθμος BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) χρησιμοποιείται για τη σύγκριση μιας ακολουθίας με μια βάση δεδομένων. Έχει αρχικά αναπτυχθεί και διατηρείται από το NCBI (National Center for Biotechnology Information) αλλά λόγω του ότι διατίθεται ελεύθερα υπάρχουν εκδόσεις του και σε άλλες αντίστοιχες βάσεις. Είναι ένας ευριστικός (heuristic) αλγόριθμος σύγκρισης ακολουθιών βελτιστοποιημένης ταχύτητας που χρησιμοποιείται για να ψάχνει σε βάσεις ακολουθιών την άριστη τοπική στοίχιση με μια αναζήτηση.

Το CLUSTALW είναι το πιο διαδεδομένο πρόγραμμα πολλαπλής στοίχισης βιολογικών ακολουθιών. Το πρόγραμμα χρησιμοποιεί έναν ιδιαίτερα πολύπλοκο αλγόριθμο προδευτικής στοίχισης (progressive alignment) για να κάνει σταδιακή στοίχιση πολλαπλών πρωτεϊνικών ή νουκλεοτιδικών (DNA) ακολουθιών. Όλες οι ακολουθίες πρέπει να είναι ένα αρχείο, η μία μετά την άλλη. Το CLUSTALW χρησιμοποιείται για την εύρεση τυχών λαθών που προκύπτουν κατά τη διαδικασία αυτή (Thompson et al, 1997). Συνεπώς, αποτελεί ίσως το πιο γνωστό και περισσότερο χρησιμοποιούμενο πρόγραμμα πολλαπλής στοίχισης (Thompson, Higgins & Gibson, 1994). Ποικίλες τεχνικές έχουν κάνει το CLUSTALW

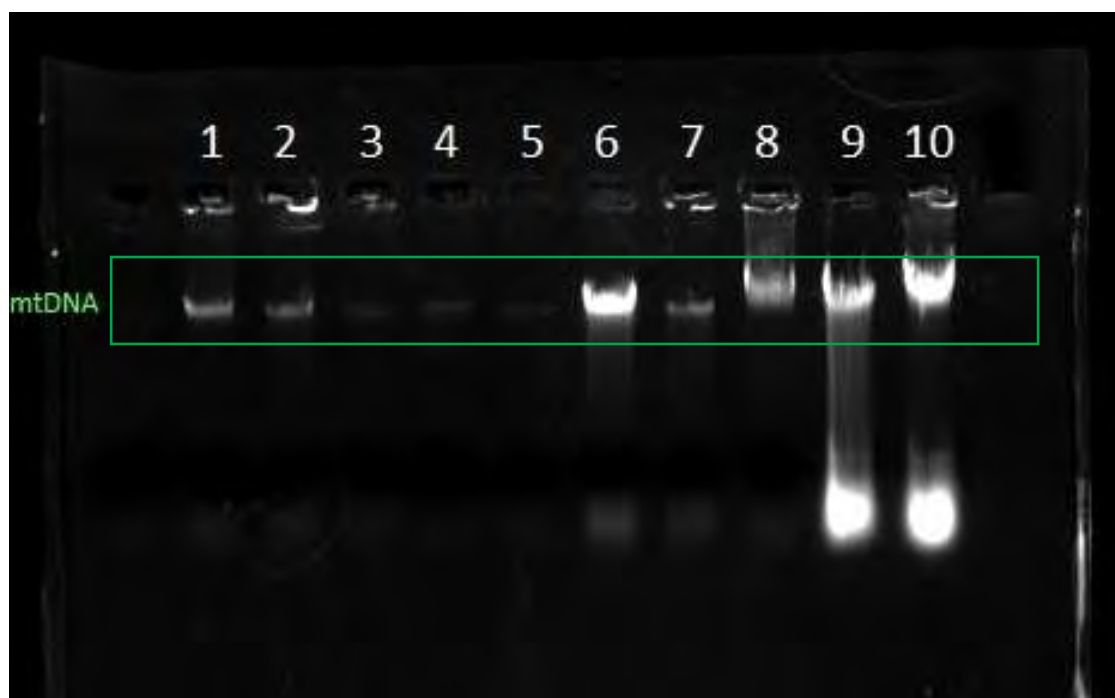
να είναι από τα πιο αξιόπιστα εργαλεία, παρόλο που κατά βάση στηρίζεται σε μια απλή ευριστική μέθοδο. Μετά το τέλος και αυτής της διαδικασίας, έχουμε την πλήρη αλληλουχία του τμήματος που μας ενδιαφέρει.

Η τελική ανάλυση για την εύρεση των πολυμορφισμών στην περιοχή ελέγχου D-loop πραγματοποιήθηκε με το πρόγραμμα MEGA (Molecular Evolutionary Genetics Analysis). Το MEGA είναι ένα ελεύθερα διαθέσιμο λογισμικό για τη διεξαγωγή στατιστικής ανάλυσης της μοριακής εξέλιξης, αυτόματης και χειροκίνητης ευθυγράμμισης αλληλουχίας, και για την κατασκευή φυλογενετικών δέντρων. Συγκεκριμένα χρησιμοποιήθηκε η τελευταία έκδοση του (MEGA7, Kumar et al, 2015).

3. Αποτελέσματα

3.1 Απομόνωση γενετικού υλικού

Η αξιολόγηση της ποιότητας και της ποσότητας του γενετικού υλικού έγινε με φωτομέτρηση και ηλεκτροφόρηση σε πηκτική αγαρόζης 1% w/v. Η απομόνωση DNA παρείχε υψηλής ποιότητας DNA, με τιμές συγκέντρωσης κατά μέσο όρο 200 ng/μl και τιμές A^{260}/A^{280} κοντά στο 2. Παράλληλα, στην ηλεκτροφόρηση του DNA σε πηκτική αγαρόζης εμφάνιστηκαν 2 διακριτές ζώνες : 1) μια ζώνη που βρίσκεται ψηλότερα και συνιστά το πυρηνικό DNA, το οποίο είναι μεγάλου μεγέθους και εμφανίζεται περίπου μέσα στο πηγαδάκι της πηκτής, και 2) η δεύτερη ζώνη που εντοπίστηκε χαμηλότερα και αποτελεί το μιτοχονδριακό DNA (Εικόνα 15).



Εικόνα 15 : Ενδεικτική φωτογραφία πηκτής μετά από την ηλεκτροφόρηση του απομονωμένου DNA. Στο πλαίσιο πράσινου χρώματος περιλαμβάνονται οι ζώνες του μιτοχονδριακού DNA.

Σύμφωνα με τη φωτογραφία της πηκτικής αγαρόζης, (Εικόνα 15) ορισμένες ζώνες DNA που εμφανίστηκαν δεν έχουν την ίδια ένταση. Οι ζώνες 3, 4, 5 εμφανίζουν τη χαμηλότερη ένταση, ακολουθούν οι ζώνες 1, 2, 7 με λίγο πιο αυξημένη ένταση και έπειτα οι ζώνες 6, 8, 9, 10 που έχουν τη μεγαλύτερη. Το γεγονός αυτό οφείλεται σε ποικίλους παράγοντες, όπως : 1) ανεπαρκής ποσότητα DNA στα συγκεκριμένα δείγματα, 2) η ποσότητα DNA διαχύθηκε έξω από την πηκτική κατά την ένθεση της, 3) η πηκτική αφέθηκε για αρκετό χρονικό διάστημα μέχρι τη λήψη της φωτογραφίας με αποτέλεσμα την αλλοίωση της έντασης σε μερικές μπάντες.

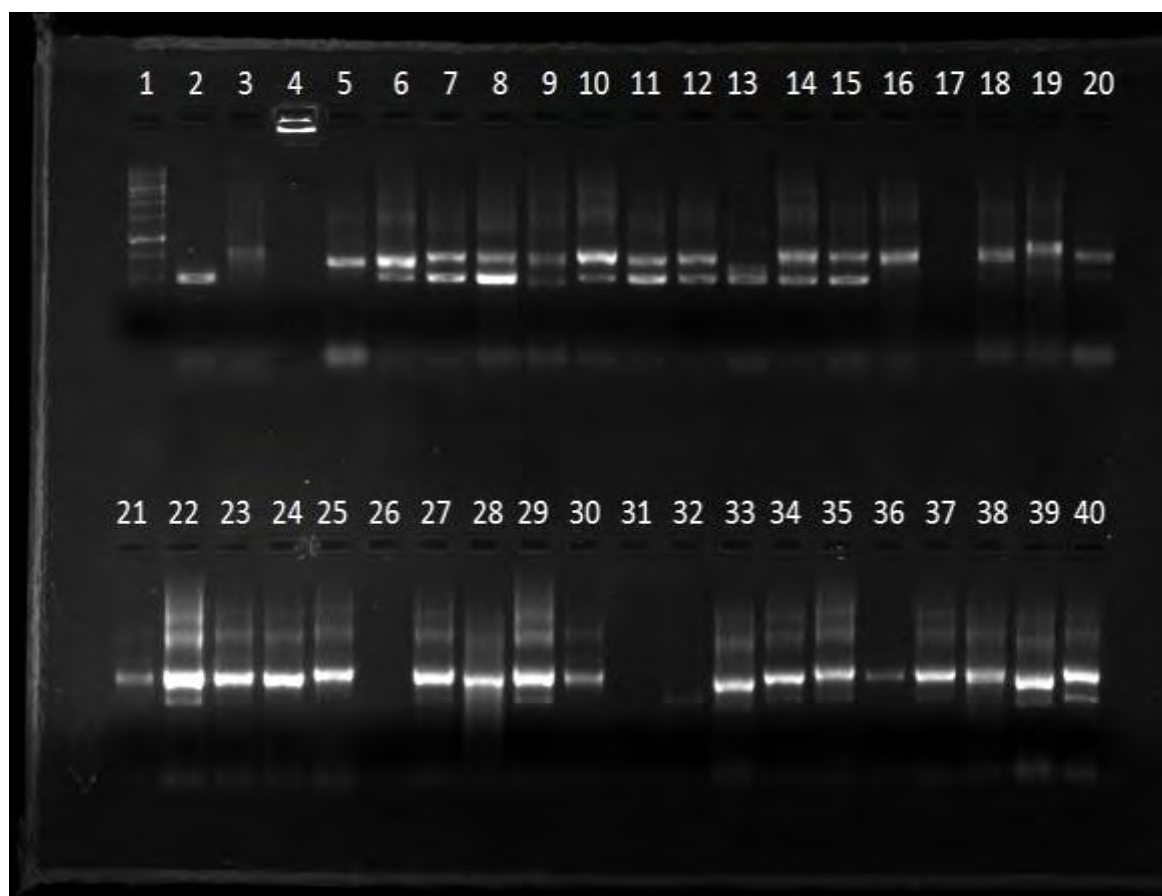
Ταυτόχρονα, σε μερικές ζώνες (συγκεκριμένα στις 1, 2, 6, 8, 9, 10) παρουσιάζονται διαδρομές πηκτής που εμφανίζουν υπολείμματα ζωνώσεων σε όλο τους το μήκος και αναφέρονται με την ορολογία “Smeared” , οι οποίες πιθανόν να εμφανίζονται

λόγω : 1) αποικοδόμησης του DNA από νουκλεάσες, 2) ακατάλληλων συνθηκών ηλεκτροφόρησης, 3) φόρτωσης υπερβολικής ποσότητας DNA στο πηγαδάκι, 4) αυξημένης συγκέντρωσης αλάτων στα συγκεκριμένα δείγματα DNA, 5) κακής μορφής και σχήματος πηγάδια στην πηκτή.

Επίσης, να σημειωθεί ότι οι ζώνες στο κάτω μέρος της πηκτής σχηματίζονται είτε λόγω μη ειδικής ενίσχυσης κάποιων αλληλουχιών με αποτέλεσμα να εμφανίζονται παραπροϊόντα είτε οφείλονται σε διμερισμό των εκκινητών, δηλαδή εκκινητές οι οποίοι προστέθηκαν σε περίσσεια και ένα μέρος αυτών δεν υβριδοποιήθηκε.

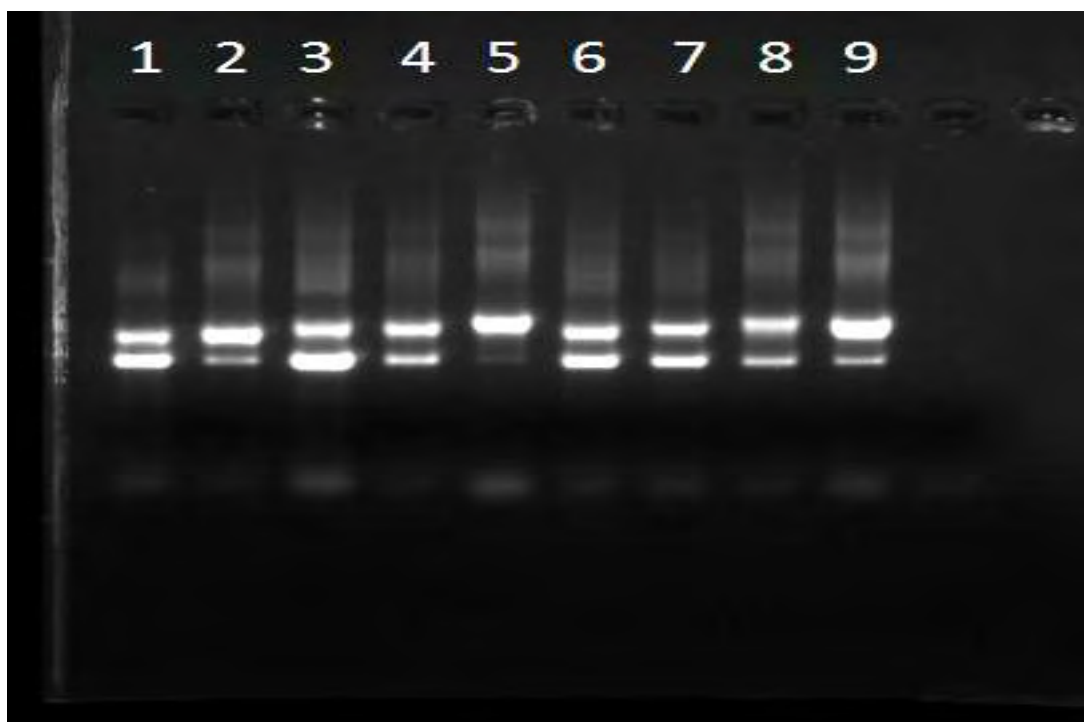
3.2 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Για την ενίσχυση τμήματος του μιτοχονδριακού DNA του *L. europaes* που να περιέχει ολόκληρη την περιοχή ελέγχου, χρησιμοποιήθηκαν ετερόλογοι εκκινητές. Σύμφωνα με το ηλεκτροφορητικό πρότυπο, το τμήμα που ενισχύθηκε παρουσιάζεται σε διάφορα μήκη ζευγών βάσεων, και φαίνεται να έχει, με μικρή διαφορά, ποικίλα μεγέθη για όλα τα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν στην ανάλυση (Εικόνα 16).



Εικόνα 16 : Φωτογραφία της πηκτής μετά την ηλεκτροφόρηση των προϊόντων PCR

Ακολούθησε επαλήθευση του αποτελέσματος και το ηλεκτροφορητικό αυτό πρότυπο εξακολούθησε να παρουσιάζει το ίδιο μοτίβο των πολλαπλών ζωνών. (Εικόνα 17).



Εικόνα 17 : Ενδεικτική φωτογραφία πηκτής αγαρόζης μετά την επαλήθευση του προτύπου πολλαπλών ζωνών

Κατόπιν πολλών επαληθεύσεων του αποτελέσματος αυτού (Εικόνα 17) η αιτιολογία για το πρότυπο στράφηκε στην περιοχή ελέγχου (D-loop) και όχι στις συνθήκες PCR. Έτσι, πραγματοποιήθηκε μελέτη της περιοχής αυτής η οποία απέδειξε ότι αυτό το πρότυπο εδράζεται στην ύπαρξη ετεροπλασμίας (η ύπαρξη περισσότερων του ενός τύπων mtDNA). Όπως αναφέρθηκε στην εισαγωγή (ενότητα 1.6) μια σειρά από μελέτες έχουν τεκμηριώσει την ύπαρξη ετεροπλασμίας για θέσεις στην περιοχή ελέγχου mtDNA (Comas et al. 1995, Bendall et al. 1996-1997, Wilson et al. 1997, Huhne et al. 1998, Sigurdardottir et al. 2000, Tully et al. 2000). Συνεπώς αυτού του τύπου ετεροπλασμία εντοπίζεται και στην περιοχή ελέγχου (D-loop) του είδους του *L. europaeus*.

3.3 Καθαρισμός του DNA (DNA purification)

Λόγω της παρουσίας περισσότερων του ενός προϊόντων, το σημείο της πηκτής με το επιθυμητό προϊόν αφαιρέθηκε και ακολούθησε καθαρισμός. Με καθαρό DNA από αγαρόζη και παραπροϊόντα, πραγματοποιείται ξανά η διαδικασία ηλεκτροφόρησης σε πηκτή αγαρόζης 2% w/v πάλι με την παρουσία ενός μάρτυρα τμημάτων γνωστού μοριακού βάρους (ladder). Το αποτέλεσμα στην φωτογραφία τώρα αναμένεται να

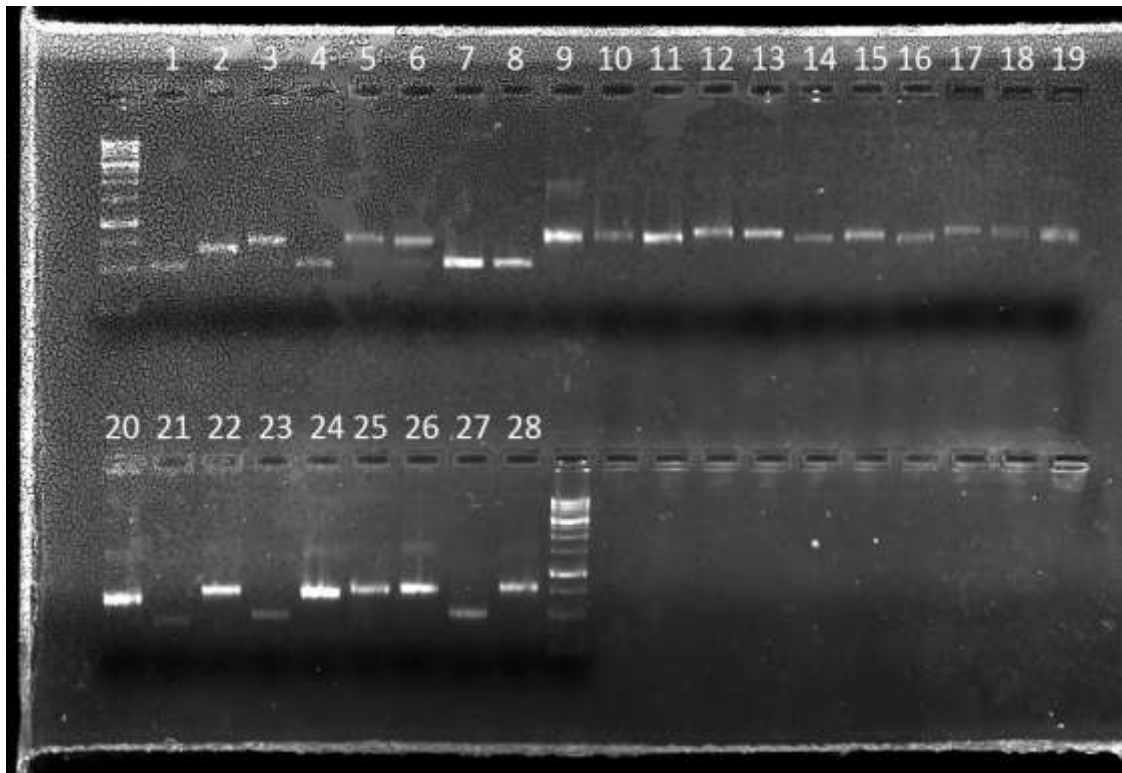
αποδώσει πιο καθαρές οπτικά ζώνες και με αρκετά καθαρότερες διαδρομές πηκτής (Εικόνα 18).

Τα τμήματα/ζώνες DNA που εξήχθησαν από την πηκτική αφαρόζη και τελικά καθαρίστηκαν παρουσιάζονται στον Πίνακα 2.

Δείγματα	Δείγματα
1. Μια ζώνη Greece 13	15. Μια ζώνη Turkey 14
2. Μια ζώνη Greece 6	16. Μια ζώνη France 1
3. Ζώνη 1 Greece 7	17. Μια ζώνη France 2
4. Ζώνη 2 Greece 7	18. Ζώνη 1 L. North Israel TNES 3
5. Ζώνη 1 Greece 3	19. Ζώνη 2 L. North Israel TNES 3
6. Ζώνη 2 Greece 3	20. Ζώνη 1 Cyprus 1
7. Ζώνη 1 Turkey 3	21. Ζώνη 2 Cyprus 1
8. Ζώνη 2 Turkey 3	22. Ζώνη 1 Cyprus 26
9. Μια ζώνη Turkey 13	23. Ζώνη 2 Cyprus 26
10. Μια ζώνη Turkey 19	24. Ζώνη 1 Cyprus 37
11. Μια ζώνη Turkey 6	25. Μια ζώνη Germany 26
12. Μια ζώνη Turkey 4	26. Ζώνη 1 Germany 4
13. Μια ζώνη Turkey 5	27. Ζώνη 2 Germany 4
14. Μια ζώνη Turkey 7	28. Μια ζώνη Germany 23

Πίνακας 2 : Τμήματα/ζώνες που καθαρίστηκαν από την πηκτική

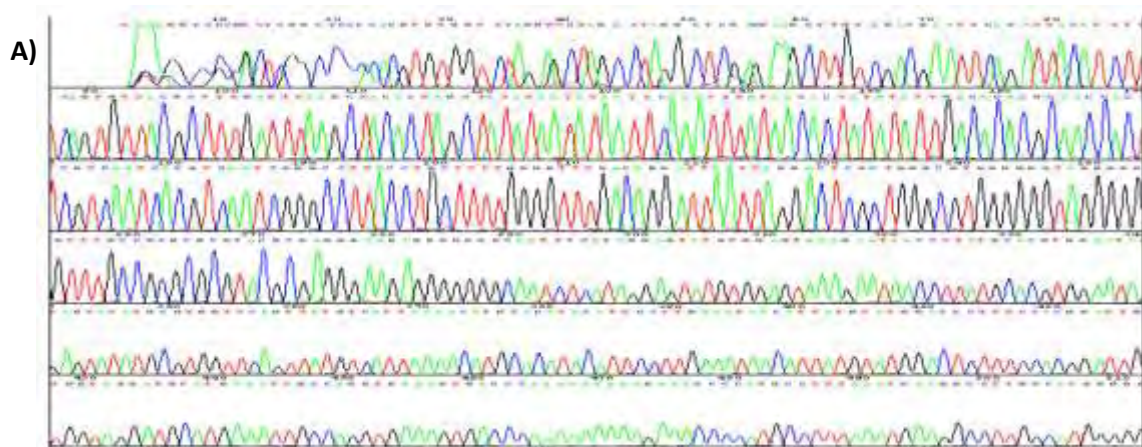
Τα δείγματα του Πίνακα 2 συνιστούν τα επιλέχθέντα δείγματα που θα σταλούν για αλληλούχηση και αποτελούν τα τελικά 28 δείγματα με βάση τα οποία θα πραγματοποιηθεί η ανάλυση των πολυμορφικών θέσεων. Η διαλογή των δειγμάτων αυτών έγινε με βάση το ηλεκτροφορητικό πρότυπο, δηλαδή επιλέχθηκαν οι πιο καθαρές ζώνες και κατά το πλείστον αυτές με το μεγαλύτερο μέγεθος. Επίσης, αξίζει να σημειωθεί ότι επιλέχθηκαν δείγματα αντιπροσωπευτικά για όλα τα ηλεκτροφορητικά πρότυπα, δηλαδή συνδυασμού ενός ή δυο ζωνώσεων και διαφορετικών μεγεθών. Ταυτόχρονα, διαλέχθηκαν δείγματα που αντιπροσώπευαν όλες τις γεωγραφικές περιοχές από όπου έγινε η δειγματοληψία, ώστε να έχουμε όσο το δυνατόν πληρέστερη ανάλυση και σύγκριση της γενετικής ποικιλότητας μεταξύ των διαφόρων πληθυσμών.

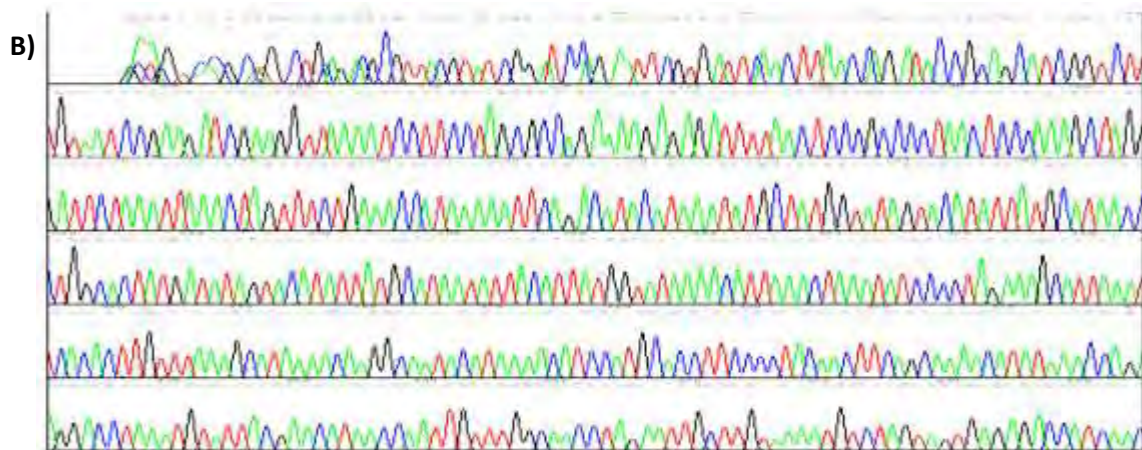


Εικόνα 18 : Φωτογραφία της πηκτής αγαρόζης μετά την ηλεκτροφόρηση των καθαρισμένων προϊόντων PCR

3.4 Αλληλούχηση

Τα δείγματα με το καθαρισμένο DNA στάλθηκαν σε εταιρίες που πραγματοποιούν αλληλούχηση κατά Sanger σε αυτόματο γενετικό αναλυτή με τη χρήση των εκκινητών όπου βρίσκονται στη περιοχή ελέγχου (D-loop) και συνεπώς το «διάβασμα» αφορά μόνο την αλληλουχία της περιοχής αυτής. Το διάβασμα έγινε με δύο εκκινητές (Forward και Reverse) προκειμένου να διασφαλιστεί η αξιοπιστία του αποτελέσματος της αλληλούχησης. Μερικά από τα χρωματογραφήματα που παρελήφθησαν παρουσιάζονται στην εικόνα 19.





Εικόνα 19 : Παραδείγματα χρωματογράφηματος A) όπως προέκυψε από την αλληλούχηση της D-loop με τον εκκινητή 15900-16900 (Forward), B) όπως προέκυψε από την αλληλούχηση της D-loop με τον εκκινητή 16670 (Reverse)

Η πρότυπη αλληλουχία της περιοχής ελέγχου (D-loop) καθίσταται απαραίτητη ώστε να γίνει η σύγκριση με τις αλληλουχίες των δειγμάτων και την ανάλυση των πολυμορφισμών. Η αλληλουχία αυτή όπως κατατέθηκε και βρίσκεται στην διεθνή βάση δεδομένων Genebank μέσω του National Center for Biotechnology Information (NCBI) παρατίθεται στην εικόνα 20.

```

15421 ctctttaaac tattctctgc ttactctta ataacatc caagtaactt gtcactattg
15481 acaaaacacc cttaaatgct atgtaattcg tgcattaatg cttttccca ttaacatgta
15541 cctatactat catttcataa tcaacattag accattacat gtttaatcgt gcattaaagc
15601 tcttcccat gcatataagc tagtacatcc ctgcttaata ggacatagta cattcaccta
15661 ctaaacacac ataactctat caccaacatg gatattcaat tccaacacc accttaatca
15721 acatccagac atccattcct tgatggaaca taaaccatcc gagtcaaatc ctttctgtc
15781 catatgacta tccccctccc ctagtagtct cttaatctac catcctcgt gaaaccagca
15841 accgcccac ctggtgtccc tcttctcgt cgggcccac tctacttggg ggttctagc
15901 gtgaaactat aactggcatc tggttcttac ttcaggcca taaccctaag atcgccaca
15961 cgttccccctt aaataagaca tctcgatgga ctaatgacta atcagcccac gctcacacat
16021 aactgtggtg tcatgcattt ggtattttt aattttggg tagcttggga ctcaacatgg
16081 ccgcccggg ccctgaccg gtgacttat ttagacgag cacctcgatg tacattctc
16141 accctcataa ttatgagcc ggactatcct tcatgcttg acggacataa aagaatttt
16201 cgcgtacacg cacgtacacg cacgtacacg cacgtacacg cacgtacacg cacgtacacg
16261 cacgtacacg cacgtacacg cacgtacacg cacgtacacg cacgtacacg cacgtacacg
16321 cacgtacacg cacgtacacg cacgtacacg cacgtacacg cacgtacacg cacgtacacg
16381 cacgtacacg cacgtacacg cacgtacacg cacgtacacg cacgtacacg cacgtacacg
16441 cacgtacacg cacgtacacg cacgtacacg cacgtacacg cacgtacacg cacgtacacg
16501 cacgtacacg cacgtacacg cacgcccgt ttactgtca taactgaata tatccacaaa
16561 cccccctgc cccctaaaa agtaaatca ttgtcttaag acaatgaata tggctattac
16621 tataaattcc tgccaaacc caaaaacaag aatcagaca tagcacctac ttatcttct
16681 taggtcccc ccccaacct aattaattt ttttccaa aatctccta aatttctagg
16741 ctaaatttgt aaaaccttc atttttggga atttaaacg cacctttaca atactgacat
16801 agcactctgc cttttattc ccctccaaca gccaaaacc taattaattt tttttccaa
16861 aaaaatctct aatttctag gctaaattg taaaaccttc catttttgg aatttaaac
16921 gcacctttac aatactgaca tagcactctg cttttattt ccctccaac aggcaaaacc
16981 ctaattaaat tttttccaa aaaatctcct aatttctag gctaaattg taaaaccttc
17041 catttttgg aatttaaac gcacctttac aatactgaca tagcactctg cttttattt
17101 ccctccaac aggcaaaacc ctaattaaat tttttccaa aaaatctcct aatttctag
17161 gctaaattg taaaaccttc catttttgg aatttaaac gcacctttac aatactgaca
17221 tagcactctg cttttattt ccctccaac aggcaaaacc ctaattaaat tttttccaa
17281 aaaatctcct aatttctag gctaaattg taaaaccttc catttttgg aatttaaac
17341 gcacctttac aatactgaca tagcactctg cttttattt ccctccaac aggcaaaacc
17401 ctaattaaat tttttccaa aaaatctcct aatttctag gctaaattg taaaaccttc
17461 catttttgg aatttaaac gcacctttac aatactgaca tagcactctg cttttattt
17521 ccctccaac aggcaaaacc ctaattaaat tttttccaa aaaatctcct aatttctag
17581 gctaaattg taaaaccttc catttttgg aatttaaac gcacctttac aatactgaca
17641 tagcactctg cttttattt ccctccaac aggcaaaacc ctaattaaat tcaagcaac
17701 ctaaatatta actaaaatat tcttacata atat

```

Εικόνα 20 : Νουκλεοτιδική αλληλουχία της περιοχής ελέγχου (D-loop) από τη θέση 15440 μέχρι τη θέση 17734 του μιτοχondριακού γονιδιώματος του *L. europaeus*

Η αλληλουχία που προέκυψε έχει μέγεθος της τάξης των 700 ζευγών βάσεων όπως αναμενόταν, αλλά παρουσιάζει διακύμανση όπως παρατηρήθηκε και στην εικόνα της ηλεκτροφόρησης (η διάμεσος των μεγεθών είναι 645 ζεύγη βάσεων και η τυπική απόκλιση των μεγεθών είναι 108) και περιλαμβάνει αρκετά μεγάλο μέρος της περιοχής της D-loop. Το ποσοστό των βάσεων κάθε αλληλουχίας και των 28 δειγμάτων καθορίστηκε ως εξής: για 21,8% T(U), 31,7% C, 26,7% A, 19,8% G.

3.5 Ανάλυση της αλληλουχίας της περιοχής ελέγχου

Πραγματοποιήθηκε πολλαπλή στοίχιση των 28 δειγμάτων (με το πρόγραμμα CLUSTALW και ανάλυση με το πρόγραμμα MEGA7) με σκοπό να καθοριστεί η δομή και η οργάνωση της νουκλεοτιδικής ακολουθίας της περιοχής ελέγχου στα τρία βασικά τμήματα (αριστερό, κεντρικό και δεξιό).

3.5.1 Το αριστερό τμήμα

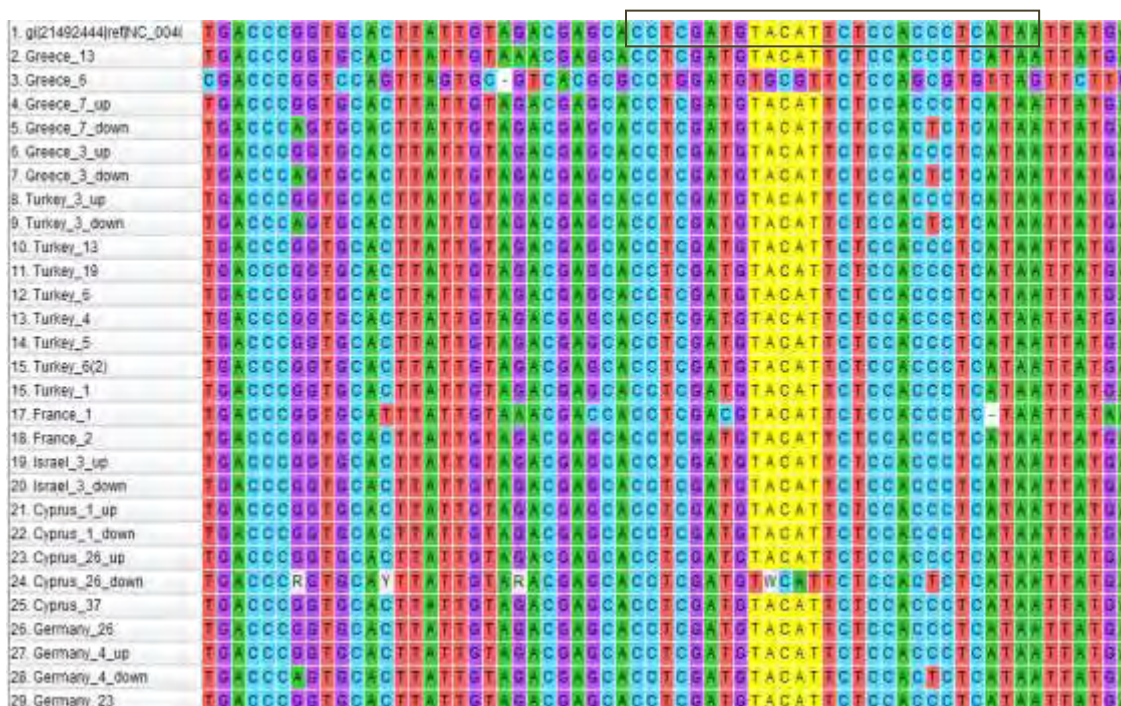
Η ακολουθία του αριστερού τμήματος της περιοχής ελέγχου του *L. europaicus* έχει μήκος κατά μέσο όρο 200 ζευγών βάσεων και περιέχει επαναλαμβανόμενα μοτίβα. Λόγω αυτών των επαναλήψεων, το αριστερό τμήμα ποικίλλει σημαντικά σε μέγεθος, όπως και σε περιεχόμενο νουκλεοτιδίων AT. Στις αλληλουχίες που στοιχίστηκαν βρέθηκε μεγάλη επαναληψιμότητα της αλληλουχίας TACACGCACG η οποία καταμετρείται από 2 (δείγματα 5, 7, 9, 28) έως 31 φορές (δείγματα 3, 8) (Εικόνα 21). Επαναλήψεις στο αριστερό τμήμα συνήθως περιέχουν μεγάλα σε μήκος consensus σε όλα τα σπονδυλωτά (Sbisa et al. 1997).



Εικόνα 21 : Ενδεικτική εικόνα που αποδεικνύει την επανάληψη της αλληλουχίας TACACGCACG σε όλα σχεδόν τα δείγματα (κίτρινο χρώμα)

Όπως αναφέρθηκε στην ενότητα 1.6, το αριστερό τμήμα της περιοχής ελέγχου όλων των σπονδυλωτών περιλαμβάνει διατηρημένες αλληλουχίες, οι οποίες ονομάζονται Termination Association Sequences (TAS) και έχουν συσχετιστεί με την παύση της σύνθεσης της βαριάς αλυσίδας (H-strand) κατά τη διάρκεια της αντιγραφής του μιτοχονδριακού γονιδιώματος (Doda et al., 1981, Foran et al. 1986). Σύμφωνα με τους Saccone et al. (1991), η αλληλουχία «κλειδί» των περιοχών TAS είναι η αλληλουχία TACAT και συχνά ακολουθείται από την αλληλουχία ATGTA, η οποία είναι υπεύθυνη για την δημιουργία μιας δευτεροταγούς δομής τύπου «hairpin» (Douzery & Randi 1997, Liu et al., 2002). Στις υπό μελέτη αλληλουχίες, ένα πρότυπο που περιέχει την αλληλουχία TACAT (TAS 1) έχει αναγνωριστεί (Εικόνα 22). Οι Sbisà et al., (1997) αναγνώρισαν στα θηλαστικά μεγαλύτερα διατηρημένα τμήματα, τα οποία περιλαμβάνουν την αλληλουχία TACAT και ονομάστηκαν διευρυμένα (Extended) TAS (ETAS). Κατά συνέπεια, η περιοχή αυτή προτείνεται ως πιθανή περιοχή ETAS της D-Loop του είδους *L. euroraesus*.

ETAS



Εικόνα 22 : Η αλληλουχία «κλειδί» TACAT με κίτρινο χρώμα που καθορίζει την περιοχή ETAS (αλληλουχία εντός του πλαισίου)

3.5.2 Το κεντρικό τμήμα

Το κεντρικό τμήμα της περιοχής ελέγχου του *L. euroraesus* φαίνεται να είναι ιδιαίτερα διατηρημένο σε σύγκριση με τα περιφερικά τμήματα όσον αφορά στη νουκλεοτιδική σύσταση της αλληλουχίας και το μήκος της (μέγεθος 265 έως 275 ζ.β.). Οι Southern και συνεργάτες (1988) αναγνώρισαν πέντε μικρά τμήματα

διατηρημένων αλληλουχιών (Conserved Sequence Blocks) στο κεντρικό τμήμα των θηλαστικών (CSBs B, C, D, E και F), τα οποία στη συνέχεια αναγνωρίστηκαν σε είδη πτηνών και ερπετών (Randi & Lucchini, 1998, Ray & Densmore 2002). Επιπλέον, τα CSB D, E και F έχουν αναγνωριστεί και σε διάφορα τελεόστεα (Lee et al. 1995, Liu et al. 2002). Στην παρούσα μελέτη τα τμήματα CSB D, E και F αναγνωρίστηκαν σε όλα τα υπό μελέτη δείγματα. Το CSB-D παρουσιάζει τη μεγαλύτερη ομοιότητα και φαίνεται να είναι ιδιαίτερα συντηρημένο μεταξύ τους (Εικόνα 23). Το τμήμα αυτό φαίνεται επίσης να παρουσιάζει μεγάλη ομοιότητα σε όλα τα σπονδυλωτά, υποστηρίζοντας έτσι την υπόθεση του λειτουργικού του ρόλου (Lee et al 1995). Από την άλλη πλευρά, το προτεινόμενο τμήμα CSB-E, εμφανίζει πολύ μικρή ομοιότητα και δεν φαίνεται να είναι ιδιαίτερα συντηρημένο ανάμεσα στα υπό μελέτη δείγματα. Η συντηρημένη αλληλουχία TGGGGGTTT παρουσιάζεται σε όλα τα υπό μελέτη δείγματα και έχει αναγνωριστεί και σε άλλα θηλαστικά, παρόλο που δεν παρουσιάζεται σε όλα τα σπονδυλωτά (Lee et al 1995, Sbisa et al. 1997, Liu et al. 2002). Επίσης, το τμήμα CSB-F φαίνεται να είναι συντηρημένο και παρουσιάζει ομοιότητα ανάμεσα στους πληθυσμούς *L. europaeus*.

CSB-D

1. gj21492444jre5NC_004l	C	T	A	G	C	S	T	G	A	A	C	T	A	A	A	C	T	G	G	T	T	C	T	T	A	C	T	T	C	G	G	S	C	C	A	T	A	A	C	C	C	T	A
2. Greece_13	C	T	A	G	C	S	T	G	A	A	C	T	A	A	A	C	T	G	G	T	T	C	T	T	A	C	T	T	C	G	G	S	C	C	A	T	A	A	C	C	C	T	A
3. Greece_6	C	T	A	G	C	S	T	G	A	A	C	T	A	A	A	C	T	G	G	T	T	C	T	T	A	C	T	T	C	G	G	S	C	C	A	T	A	A	C	C	C	T	A
4. Greece_7_up	C	T	A	G	C	S	T	G	A	A	C	T	A	A	A	C	T	G	G	T	T	C	T	T	A	C	T	T	C	G	G	S	C	C	A	T	A	A	C	C	C	T	A
5. Greece_7_down	C	T	A	G	C	S	T	G	A	A	C	T	A	A	A	C	T	G	G	T	T	C	T	T	A	C	T	T	C	G	G	S	C	C	A	T	A	A	C	C	C	T	A
6. Greece_3_up	C	T	A	G	C	S	T	G	A	A	C	T	A	A	A	C	T	G	G	T	T	C	T	T	A	C	T	T	C	G	G	S	C	C	A	T	A	A	C	C	C	T	A
7. Greece_3_down	C	T	A	G	C	S	T	G	A	A	C	T	A	A	A	C	T	G	G	T	T	C	T	T	A	C	T	T	C	G	G	S	C	C	A	T	A	A	C	C	C	T	A
8. Turkey_3_up	C	T	A	G	C	S	T	G	A	A	C	T	A	A	A	C	T	G	G	T	T	C	T	T	A	C	T	T	C	G	G	S	C	C	A	T	A	A	C	C	C	T	A
9. Turkey_3_down	C	T	A	G	C	S	T	G	A	A	C	T	A	A	A	C	T	G	G	T	T	C	T	T	A	C	T	T	C	G	G	S	C	C	A	T	A	A	C	C	C	T	A
10. Turkey_13	C	T	A	G	C	S	T	G	A	A	C	T	A	A	A	C	T	G	G	T	T	C	T	T	A	C	T	T	C	G	G	S	C	C	A	T	A	A	C	C	C	T	A
11. Turkey_19	C	T	A	G	C	S	T	G	A	A	C	T	A	A	A	C	T	G	G	T	T	C	T	T	A	C	T	T	C	G	G	S	C	C	A	T	A	A	C	C	C	T	A
12. Turkey_6	C	T	A	G	C	S	T	G	A	A	C	T	A	A	A	C	T	G	G	T	T	C	T	T	A	C	T	T	C	G	G	S	C	C	A	T	A	A	C	C	C	T	A
13. Turkey_4	C	T	A	G	C	S	T	G	A	A	C	T	A	A	A	C	T	G	G	T	T	C	T	T	A	C	T	T	C	G	G	S	C	C	A	T	A	A	C	C	C	T	A
14. Turkey_5	C	T	A	G	C	S	T	G	A	A	C	T	A	A	A	C	T	G	G	T	T	C	T	T	A	C	T	T	C	G	G	S	C	C	A	T	A	A	C	C	C	T	A
15. Turkey_8(2)	C	T	A	G	C	S	T	G	A	A	C	T	A	A	A	C	T	G	G	T	T	C	T	T	A	C	T	T	C	G	G	S	C	C	A	T	A	A	C	C	C	T	A
16. Turkey_1	C	T	A	G	C	S	T	G	A	A	C	T	A	A	A	C	T	G	G	T	T	C	T	T	A	C	T	T	C	G	G	S	C	C	A	T	A	A	C	C	C	T	A
17. France_1	C	T	A	G	C	S	T	G	A	A	C	T	A	A	A	C	T	G	G	T	T	C	T	T	A	C	T	T	C	G	G	S	C	C	A	T	A	A	C	C	C	T	A
18. France_2	C	T	A	G	C	S	T	G	A	A	C	T	A	A	A	C	T	G	G	T	T	C	T	T	A	C	T	T	C	G	G	S	C	C	A	T	A	A	C	C	C	T	A
19. Israel_3_up	C	T	A	G	C	S	T	G	A	A	C	T	A	A	A	C	T	G	G	T	T	C	T	T	A	C	T	T	C	G	G	S	C	C	A	T	A	A	C	C	C	T	A
20. Israel_3_down	C	T	A	G	C	S	T	G	A	A	C	T	A	A	A	C	T	G	G	T	T	C	T	T	A	C	T	T	C	G	G	S	C	C	A	T	A	A	C	C	C	T	A
21. Cyprus_1_up	C	T	A	G	C	S	T	G	A	A	C	T	A	A	A	C	T	G	G	T	T	C	T	T	A	C	T	T	C	G	G	S	C	C	A	T	A	A	C	C	C	T	A
22. Cyprus_1_down	C	T	A	G	C	S	T	G	A	A	C	T	A	A	A	C	T	G	G	T	T	C	T	T	A	C	T	T	C	G	G	S	C	C	A	T	A	A	C	C	C	T	A
23. Cyprus_26_up	C	T	A	G	C	S	T	G	A	A	C	T	A	A	A	C	T	G	G	T	T	C	T	T	A	C	T	T	C	G	G	S	C	C	A	T	A	A	C	C	C	T	A
24. Cyprus_26_down	C	T	A	G	C	S	T	G	A	A	C	T	A	A	A	C	T	G	G	T	T	C	T	T	A	C	T	T	C	G	G	S	C	C	A	T	A	A	C	C	C	T	A
25. Cyprus_37	C	T	A	G	C	S	T	G	A	A	C	T	A	A	A	C	T	G	G	T	T	C	T	T	A	C	T	T	C	G	G	S	C	C	A	T	A	A	C	C	C	T	A
26. Germany_26	C	T	A	G	C	S	T	G	A	A	C	T	A	A	A	C	T	G	G	T	T	C	T	T	A	C	T	T	C	G	G	S	C	C	A	T	A	A	C	C	C	T	A
27. Germany_4_up	C	T	A	G	C	S	T	G	A	A	C	T	A	A	A	C	T	G	G	T	T	C	T	T	A	C	T	T	C	G	G	S	C	C	A	T	A	A	C	C	C	T	A
28. Germany_4_down	C	T	A	G	C	S	T	G	A	A	C	T	A	A	A	C	T	G	G	T	T	C	T	T	A	C	T	T	C	G	G	S	C	C	A	T	A	A	C	C	C	T	A
29. Germany_23	C	T	A	G	C	S	T	G	A	A	C	T	A	A	A	C	T	G	G	T	T	C	T	T	A	C	T	T	C	G	G	S	C	C	A	T	A	A	C	C	C	T	A

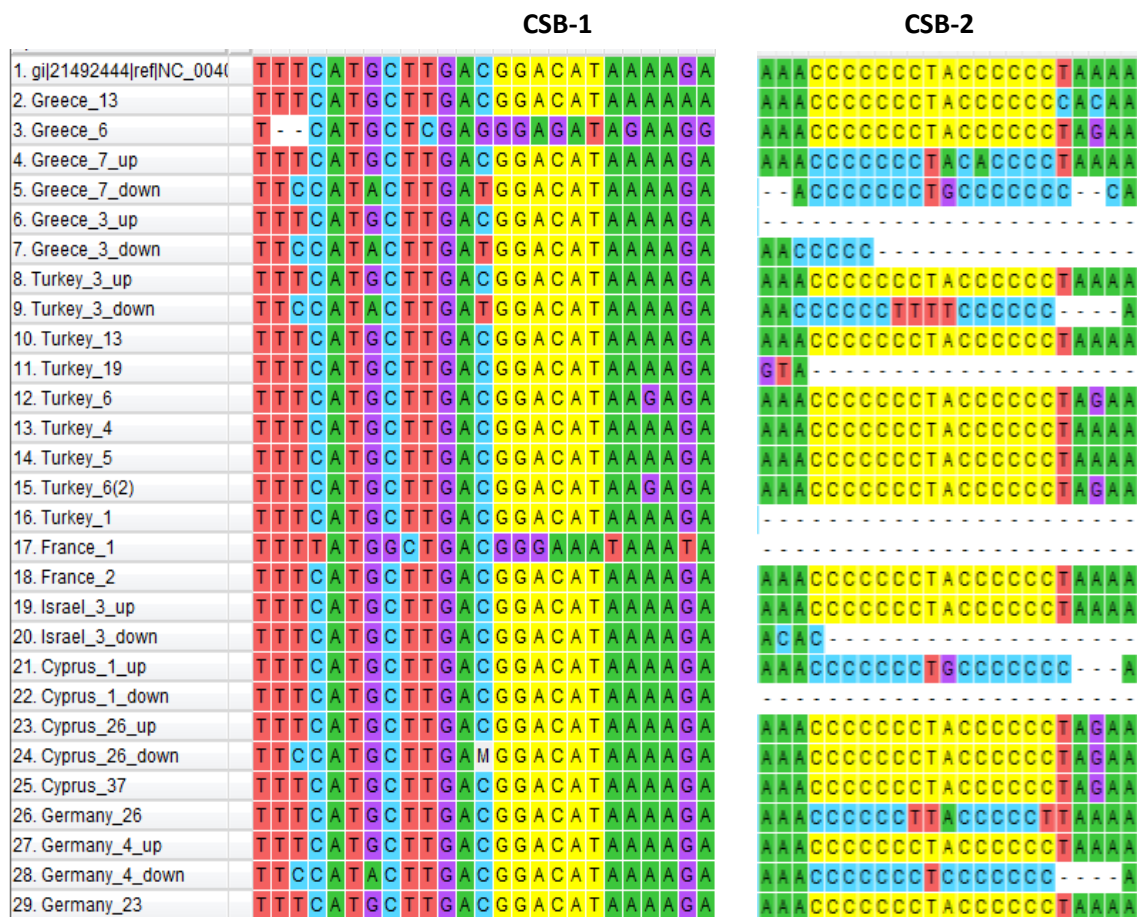
Εικόνα 23 : Εντοπισμός του συντηρημένου τμήματος CSB-D (κίτρινο χρώμα)

3.5.3 Το δεξιό τμήμα

Το δεξιό τμήμα της περιοχής ελέγχου ποικίλει σημαντικά μεταξύ των ειδών λόγω πολύ συχνής παρουσίας εν σειρά επαναλήψεων. Συχνά, αποκαλείται «τμήμα CSB» λόγω του ότι, συνήθως περιλαμβάνει τρία συντηρημένα τμήματα (Conserved

Sequence Blocks) CBS-1, 2 και 3, τα οποία είναι γνωστό ότι έχουν λειτουργικό ρόλο στη ρύθμιση της επεξεργασίας των RNA εκκινητών για τη μεταγραφή της Η-αλυσίδας (Welberg & Clayton, 1981). Σύμφωνα με τους Sbisal et al.,1997, η αλληλουχία «κλειδί» για την αναγνώριση των CSB-1 είναι GGACAT. Βάση αυτής της αλληλουχίας, αναγνωρίστηκε το τμήμα CSB-1 στους πληθυσμούς του *L. europaicus*. Το τμήμα CSB-2 εντοπίστηκε από την συντηρημένη αλληλουχία CCCCCCTACCCCC (Εικόνα 24). Παράλληλα, τα τμήματα CSB-3 παρουσιάζουν πολύ μεγάλη συντήρηση μεταξύ όλων των υπό μελέτη αλληλουχιών, συμπεριλαμβανομένων και πολλών άλλων θηλαστικών και ήταν σχετικά εύκολο να αναγνωριστούν.

Στο τμήμα αυτό, συνήθως εμπεριέχονται και οι αλληλουχίες των υποκινητών για τη μεταγραφή της L και H αλυσίδας του μιτοχονδριακού γονιδιώματος. Μετά από ευθυγράμμιση των ακολουθιών του *L. europaicus* στο 3' άκρο μεταξύ των διαφόρων πληθυσμών δεν προέκυψαν όμοιες αλληλουχίες με αυτές των εκκινήτων όπως σε άλλα θηλαστικά και συνεπώς οι εκκινητές αυτοί δεν είναι δυνατόν να αναγνωριστούν από τα συγκεκριμένα υπό μελέτη δείγματα.



Εικόνα 24 : Τα συντηρημένα τμήματα CSB-1 και CSB-2 κατόπιν στοίχισης των υπό μελέτη δειγμάτων

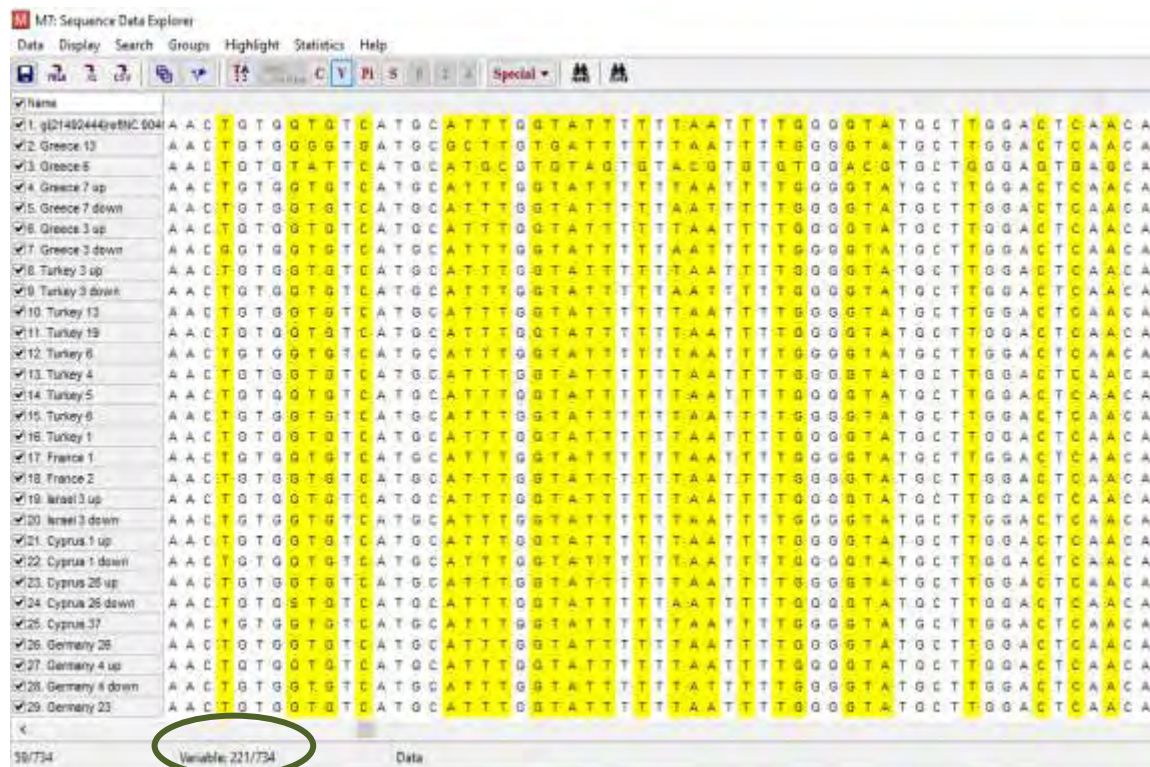
3.6 Ανάλυση των πολυμορφισμών με τον αλγόριθμο MEGA

Το πρόγραμμα MEGA με την τελευταία έκδοση του 7, έχει την δυνατότητα εύρεσης και καταμέτρησης των πολυμορφισμών στις αλληλουχίες που του έχουν κατατεθεί, δηλαδή στις περιοχές ελέγχου (D-loop) του μιτοχονδριακού DNA του *L. europaeus*.

Στο παράθυρο του προγράμματος και συγκεκριμένα στην γραμμή εργαλείων που εμφανίζεται στο πάνω μέρος υπάρχουν επιλογές για την ανίχνευση των πολυμορφικών και συντηρημένων τμημάτων των υπό μελέτη αλληλουχιών. Διατίθενται τέσσερις επιλογές C, V, Pi, S που ερμηνεύονται ως εξής :

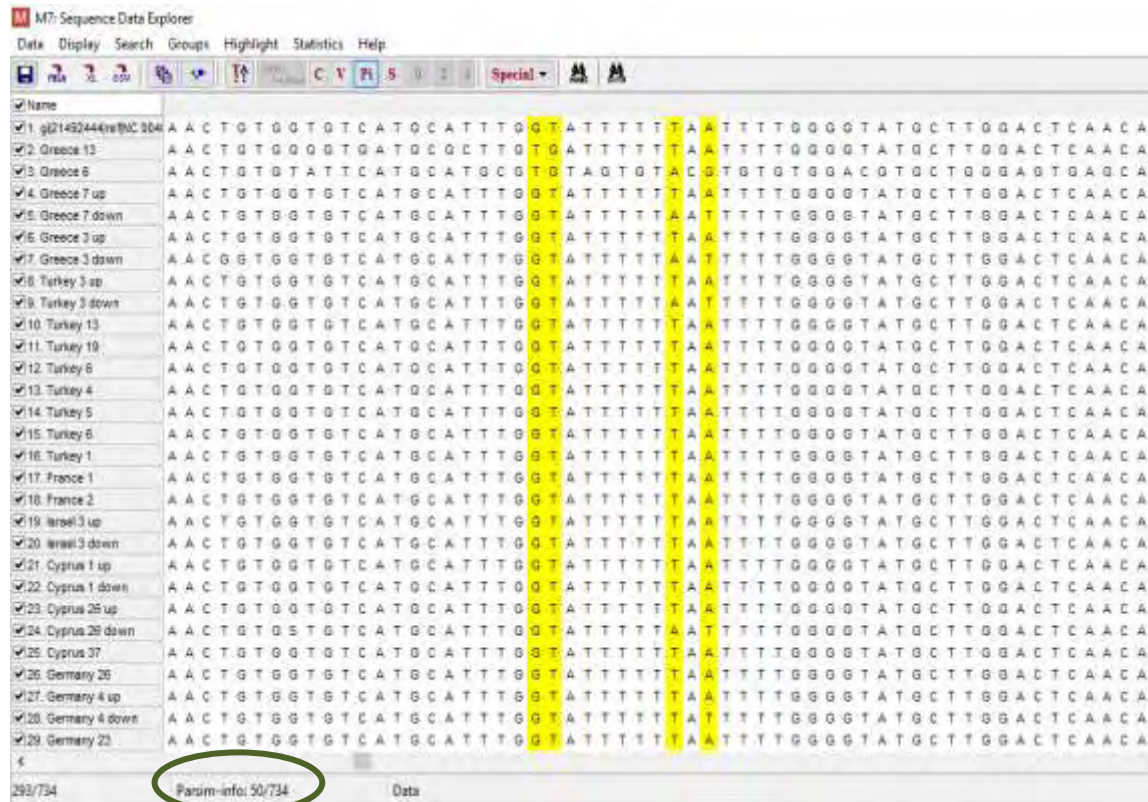
1) C : Η επιλογή αυτή μας δίνει τον αριθμό των συντηρημένων θέσεων ανάμεσα σε όλα τα δείγματα. Ο αριθμός αυτών των θέσεων είναι 511.

2) V : Η επιλογή αυτή μας δίνει τον αριθμό των πολυμορφικών θέσεων ανάμεσα σε όλα τα δείγματα. Ο αριθμός αυτών των θέσεων είναι 221.



Εικόνα 25 : Εντοπισμός των πολυμορφικών θέσεων που φτάνουν τις 221 (πράσινο πλαίσιο)

3) Pi : Εμφανίζονται οι θέσεις που διαφέρουν σε περισσότερα από ένα άτομα (πληροφοριακές για τη φειδωλότητα) και είναι 50 (κίτρινο χρώμα) (Εικόνα 26)



Εικόνα 26 : Εντοπισμός Ρι θέσεων που φτάνουν τις 50 (πράσινο πλαίσιο)

4) S : Εστιάζει στις θέσεις που διαφέρουν σε ένα μόνο άτομο και στις υπό μελέτη αλληλουχίες βρέθηκε ότι είναι 171

4. Συζήτηση

Η φυλογεωγραφική ανάλυση του είδους *Lepus europaeus* με τη βοήθεια του μιτοχονδριακού DNA ως μοριακό δείκτη βασίζεται: 1) στην παρατήρηση ότι η εμφάνιση ορισμένων απλοτύπων συνδέεται συχνά με περιοχές του κόσμου και 2) στο αποτέλεσμα της συσσώρευσης πολυμορφισμών σε διαφορετικές μητρικές γενεαλογίες, οι οποίες σημειώθηκαν καθώς οι λαγοί μετανάστευσαν και αποίκισαν στις νέες περιοχές. Ο ρυθμός μετάλλαξης του μιτοχονδριακού DNA είναι πολλές τάξεις μεγέθους υψηλότερος από εκείνο των πυρηνικών γονιδίων, με εκτιμώμενο ρυθμό $1,7 \times 10^{-8}$ περισσότερες αντικαταστάσεις ανά περιοχή ανά έτος για το σύνολο του γονιδιώματος με εξαίρεση την περιοχή ελέγχου (Ingman et al., 2000). Λαμβάνοντας υπόψη και την περιοχή αυτή, ο ρυθμός αυτός αυξάνεται ραγδαία καθώς αποτελεί τη μη κωδικοποιούσα περιοχή του μιτοχονδριακού γονιδιώματος με πολλά υπερμεταβλητά τμήματα (HVRs). Ωστόσο, το κεντρικό τμήμα της περιοχής ελέγχου παρουσιάζει μεγάλη συντήρηση κι έτσι, θεωρητικά, μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως ικανός δείκτης σε φυλογενετικές αναλύσεις (Saccone et al., 1991, Lee et al., 1995, Liu et al., 2002). Οι ιδιότητες της περιοχής ελέγχου (D-loop) του mtDNA που το καθιστούν πολύτιμο για εξελικτικές και φυλογεωγραφικές μελέτες περιλαμβάνουν υψηλό αριθμό αντιγράφων, κυτταροπλασματική κληρονομικότητα, και ταχύ ρυθμό εξέλιξης (Miyazono et al, 2002, Pereira et al, 2010).

Η περιοχή ελέγχου του *L. europaeus* ακολουθεί τη γενική δομή που περιγράφηκε προηγουμένως (Brown et al 1986, Saccone et al., 1987, Fumagalli et al., 1996, Sbisà et al., 1997). Η παρουσία των τριών τομέων που τεκμηριώνεται από αυτές τις μελέτες υποστηρίζεται και από τα δεδομένα της παρούσας μελέτης. Οι νουκλεοτιδικές αλληλουχίες και η συχνότητα των μεταβλητών θέσεων για το είδος *L. europaeus* συνεισφέρουν για το διαχωρισμό της περιοχής ελέγχου στους τρεις βασικούς τομείς : αριστερό (τομέας ETAS), κεντρικό και δεξιό τμήμα (τομέας CSB).

Υπάρχουν διαφορές στη δομή των βάσεων μεταξύ των τριών τομέων. Η ετερογένεια βάσης αυτού του τύπου έχει προηγουμένως τεκμηριωθεί σε πολλά άλλα taxa θηλαστικών αλλά και ενδοειδικά σύμφωνα με Sbisà και τους συνεργάτες της (1997). Συγκεκριμένα, υπάρχουν διαφορές στις συχνότητες των μεταβλητών θέσεων νουκλεοτιδίων εντός των τριών τομέων που αποτελούν τις πολυμορφικές θέσεις.

Όταν περιλαμβάνονται όλες οι αλληλουχίες των πληθυσμών *Lepus europaeus*, οι περιοχές με τους λιγότερους πολυμορφισμούς σε νουκλεοτιδικές θέσεις βρίσκονται σε συγκεκριμένα τμήματα του τομέα CSB και του τομέα ETAS, όπως τα CSB-1, 2, 3 και ETAS-1 αντίστοιχα. Ταυτόχρονα, στην κεντρική περιοχή (τμήματα CSBs B, C, D, E και F), εντοπίστηκε πολύ μικρός αριθμός πολυμορφισμών νουκλεοτιδικών θέσεων σε σύγκριση με το υπόλοιπο τμήμα που μελετήθηκε. Αυτή η συντηρημένη κεντρική περιοχή παρουσιάζει επίπεδα πολυμορφισμών παρόμοια με εκείνα των μιτοχονδριακών γονιδίων rRNA και tRNA, καθώς και μη συνώνυμων θέσεων

γονιδίων που κωδικοποιούν για πρωτεΐνες, ενώ τα ETAS και CSB πεδία έχουν πολύ πιο γρήγορους εξελικτικούς ρυθμούς. Αυτό το μοτίβο πολυμορφικής ετερογένειας νουκλεοτιδικών θέσεων διαφέρει ελαφρώς μεταξύ των διαφόρων πληθυσμών *L. euroraeus*. Γενικότερα, όταν υπολογίζεται η συχνότητα των πολυμορφικών θέσεων μέσα σε ένα είδος, τα ποσοστά πολυμορφισμών στα CSB, ETAS, και κεντρική περιοχή είναι περίπου 4,6%, 5,9% και 1,0%, αντίστοιχα (Pesole et al., 1999).

Εκτός των παραπάνω συντηρημένων τμημάτων η περιοχή ελέγχου (D-loop) αποτελείται κυρίως από μη συντηρημένα τμήματα, όπως αναφέρθηκε στην ενότητα 1.6, τα οποία θεωρούνται θερμά σημεία (hot spots), δηλαδή σημεία που εξελίσσονται με πολύ μεγαλύτερο ρυθμό από τον μέσο. Αυτές οι περιοχές ονομάζονται υπερ-μεταβλητές (hypervariable regions, HVRs) και χωρίζονται σε δύο κατηγορίες ως προς το ρυθμό εξέλιξης τους, τις HV1 και HV2 (Stoneking, 2000). Συνεπώς, οι 221 πολυμορφισμοί που εντοπίστηκαν έπειτα από πολλαπλή στοίχιση με τον αλγόριθμο MEGA βρίσκονται κατά κύριο λόγο σε αυτές τις περιοχές, δηλαδή ανάμεσα στα συντηρημένα τμήματα CSB, ETAS, και κεντρικής περιοχής. Οι Tamura & Nei (1993) έλαβαν με ανάλυση φειδωλότητας, ρυθμό μεταπτώσεως-μεταστροφής (δηλαδή πολυμορφικών θέσεων) 15,7 και για τις δυο περιοχές HVRI και HVRII. Εκτιμάται ότι ο ίδιος ρυθμός στις 28 αλληλουχίες που αναλύθηκαν στην παρούσα μελέτη είναι ελαφρώς χαμηλότερος, δηλαδή 14,7, (εφόσον οι πολυμορφικές θέσεις για τη φειδωλότητα είναι 50/734) από τους Tamura & Nei (1993). Επίσης, σύμφωνα με τον Wakeley (1993) και / ή τους Hasegawa et al. (1993) θέσεις που παρουσίασαν περισσότερες από πέντε αντικαταστάσεις έχουν ταξινομηθεί ως ταχέως εξελισσόμενες και συνεπώς ιδιαίτερα πολυμορφικές. Επίσης θέσεις με περισσότερες από τέσσερις αντικαταστάσεις είναι ταχέως εξελισσόμενες σύμφωνα με αυτές τις μελέτες. Αρκετές τέτοιες θέσεις βρέθηκαν και στις αλληλουχίες των πληθυσμών *L. euroraeus* σε αυτή τη μελέτη. Γενικά, όσο υψηλότερη είναι η εκτίμηση του ρυθμού ετερογένειας, τόσο μεγαλύτερη είναι η συμφωνία με τις θέσεις που έχουν ταξινομηθεί ως ταχέως εξελισσόμενες από τον Wakeley (1993) και / ή τους Hasegawa et al. (1993).

Λόγω της ταχείας εξέλιξης τους, οι αλληλουχίες από τις υπερμεταβλητές περιοχές 1 και 2 έχουν γίνει πολύ δημοφιλείς για την τεκμηρίωση θεμάτων που αφορούν γενετική ποικιλότητα εντός των ειδών. Στους ανθρώπους, έχουν χρησιμοποιηθεί για να αναχθούν πτυχές της ιστορικής βιογεωγραφίας τους (Cannet et al., 1987, Di Rienzo & Wilson 1990, Vigilant et al., 1991), για αναλύσεις στο μοριακό ρολόι της ανθρώπινης προέλευσης, και ακόμη και να καθοριστούν οικογενειακές σχέσεις. Οι μεταβολές στους ρυθμούς υποκατάστασης μεταξύ των διαφόρων τμημάτων HVR1 και HVR2, επηρεάζουν σίγουρα τα αποτελέσματα αυτών και άλλων αναλύσεων. Παρά όλα αυτά όμως συνολικά τα αποτελέσματα αυτής της έρευνας δείχνουν ότι οι υποκαταστάσεις που παρατηρήθηκαν στους υπό μελέτη πληθυσμούς συμβαίνουν

κατά προτίμηση και όχι αποκλειστικά στα πεδία με αυξημένους ρυθμούς εξέλιξης, δηλαδή τις υπερμεταβλητές περιοχές (HVRs).

Επιπροσθέτως, όπως αναφέρθηκε στην ενότητα 1.6, κυρίως το τμήμα I (ETAS) αλλά και το τμήμα III (CSB) της περιοχής ελέγχου (D-loop) συνήθως περιλαμβάνει επαναλήψεις VNTRs (Variable Number Tandem Repeats) σε πολλά είδη οι οποίες ποικίλλουν από 2 μέχρι εκατοντάδες ίδιων μονάδων. Με βάση τα αποτελέσματα της αλληλούχησης για τα 28 δείγματα, αυτό ισχύει και στο είδος *Lepus europaeus* όπου ο αριθμός των επαναλήψεων του τμήματος TACACGCACG εμφανίζεται μεταξύ των αλληλουχιών από 2 έως 31 φορές.

Εάν η σταθεροποιούσα φυσική επιλογή εξουδετερώνει την επίδραση του ρυθμού μεγάλου μεγέθους μεταλλάξεων και διατηρεί τον αριθμό των επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών σε ένα στενό εύρος τιμών σε όλες τις καταγωγές, θα οδηγήσει σε υψηλή ομοιότητα μεταξύ επαναλήψεων και σε συγχρονισμένη εξέλιξη. Αντίθετα, αν η υπόθεση αυτή είναι λανθασμένη, το στενό εύρος διακύμανσης στο σύνολο του δείγματος θα μπορούσε να οφείλεται σε ρυθμό μετάλλαξης μήκους γύρω στο 10^{-7} . Κατά συνέπεια, οι επαναλαμβανόμενες μονάδες ενός μορίου θα πρέπει να αποκλίνουν από το ένα στο άλλο, καθώς αυτός ο ρυθμός μήκους μετάλλαξης είναι παρόμοιος με το ρυθμό υποκατάστασης νουκλεοτιδίων στην περιοχή ελέγχου του μιτοχονδριακού γονιδιώματος (Casane et al., 1997). Διάφορα στοιχεία υποδηλώνουν την ύπαρξη μιας πολύ συντονισμένης εξέλιξης και ενός μηχανισμού διαφοροποίησης του αριθμού αυτών των επαναλήψεων. Σε σύγκριση μεταξύ των ειδών (Πίνακας 4), οι επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες εμφανίζουν σημαντική απόκλιση, και αυτό υποστηρίζει την υπόθεση ενός υψηλού ρυθμού μετάλλαξης μήκους που σχετίζεται με τον έλεγχο του αριθμού των επαναλήψεων γύρω από μια συγκεκριμένη τιμή κάθε φορά (Xu & Arnason 1994, Samuels 2004, Amason & Rand 1992, Prager et al. 1996, Wilkinson & Chapman 1991, Ghivizzani et al., 1993).

Οργανισμός	Ιστός	Εύρος Μεγεθών	Αριθμός Επαναλήψεων
Άνθρωπος (<i>Homo Sapiens</i>)	Μυς	400 bp-2000 bp	2-16
Άλογο (<i>Equus caballus</i>)	Ήπαρ	975-1140 bp	2-29
Γάδος (<i>Gadus morhua</i>)	Ωοθήκες	167-247 bp	2-4
Ποντίκι (<i>Mus musculus</i>)	Ήπαρ	810-983 bp	2-30
Νυχτερίδα	Μυς	516-1018 bp	5-10
Γουρούνι (<i>Sus scrofa</i>)	Ήπαρ	180-700 bp	14-29
<i>Drosophila melanogaster</i>	Έμβρυα	800-1000 bp	3-6
Πουλί (Loggerhead)	Ήπαρ	612-770 bp	2-23
Κουνέλι (<i>Oryctolagus cuniculus</i>)	Ήπαρ	150-270 bp	2-5

Πίνακας 4 : Σύγκριση επαναλήψεων μεταξύ διαφόρων ειδών

Αυτή η διαφορά στον αριθμό των επαναλήψεων δημιουργεί πολλαπλές δυνατότητες για τον έλεγχο της μεταγραφής και της αντιγραφής. Η περιοχή ελέγχου αποτελεί τη θέση δέσμησης για πολυάριθμα μόρια, όπως DNA και RNA πολυμεράσες, μεταγραφικούς και ρυθμιστικούς παράγοντες. Η δέσμηση μεταγραφικών παραγόντων που ακολουθείται από τη σύνδεση της πρωτεΐνης στην μη-κωδική αλληλουχία περιλαμβάνει την διαδικασία σχηματισμού του DNA D-βρόγχου (Ghivizzani et al., 1994). Τα συντηρημένα μπλοκ (CSBs) είναι οι πραγματικές θέσεις δέσμησης τέτοιων πρωτεϊνών. Ωστόσο, η ρύθμιση της μεταγραφής και της αντιγραφής μπορεί να είναι συντονισμένη με βάση τον αριθμό των πρωτεϊνών που είναι συνδεδεμένες με το DNA ο οποίος εξαρτάται από τον αριθμό των επαναλήψεων στην περιοχή. Η ύπαρξη μεγάλου αριθμού δεσμευμένων πρωτεϊνών θα μπορούσε να είναι η αρχή της σταθεροποιούσας επιλογής σχετικά με τον αριθμό των επαναλήψεων. Η σύνδεση πρωτεϊνών δέσμησης στις επαναλήψεις είναι υπό διερεύνηση (Casane et al., 1997).

Εξαιτίας διακυμάνσεων στον αριθμό ενός επαναλαμβανόμενου μοτίβου στην περιοχή ελέγχου (D-loop) του *L. euroraeus*, το μόριο του mtDNA παρουσιάζεται εξαιρετικά ετεροπλασμικό. Το γεγονός αυτό αρχικά καταδείχτηκε στα αποτελέσματα της PCR μέσω της ηλεκτροφόρησης πριν και μετά τον καθαρισμό και πιο συγκεκριμένα από τις πολλαπλές ζώνες και την ανομοιόμορφη κατανομή μεγέθους (σύμφωνα με τους μοριακούς μάρτυρες ladders) στις φωτογραφίες των εικόνων 16, 17, 18. Η ιεραρχική κατανομή της ποικιλίας για τα μεγέθη mtDNA που απεικονίζεται στις πηκτές ηλεκτροφόρησης της παρούσας μελέτης, δείχνει ότι η συντριπτική πλειοψηφία των παραλλαγών μεγέθους βρίσκεται εντός των ατόμων (ετεροπλασμία). Αυτό σημαίνει ότι η δημιουργία της διακύμανσης από μεταλλάξεις μήκους υπερνικά την απώλεια της διακύμανσης που προκαλείται από την τυχαία γενετική παρέκκλιση κατά τη διάρκεια της κυτταρικής διαίρεσης. Η άποψη αυτή επαληθεύεται καθώς όλοι σχεδόν οι πληθυσμοί που μελετήθηκαν ήταν ετεροπλασμικοί για δύο ή περισσότερες παραλλαγές μήκους.

Διάφοροι μηχανισμοί μιτοχονδριακής κληρονομικότητας που ευθύνονται για την ετεροπλασμία μήκους και θα μπορούσαν να είναι συμβατοί με τα δεδομένα της συγκεκριμένης μελέτης στους πληθυσμούς *L. euroraeus* είναι οι εξής:

1) Τα ετεροπλασμικά προφίλ που παρουσιάζονται εδώ μπορούν να αναγεννηθούν de novo σε κάθε άτομο, διότι ο ρυθμός ολίσθησης πολυμεράσης είναι αυξημένος. Η ολίσθηση πολυμεράσης, που προκαλείται από αναντιστοιχίες μεταξύ των κλώνων του DNA ενώ αντιγράφεται κατά τη διάρκεια της μείωσης, πιστεύεται ότι δημιουργεί πολυμορφισμούς μήκους σε ποικιλία καταστάσεων. Υψηλός πολυμορφισμός στον αριθμό των αντιγράφων των επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών στα μιτοχονδριακά γονιδιώματα (Hauswirth et al., 1984, Ghivizzaniet

al., 1993, Hoelzel et al., 1994), και ετεροπλασμίας μήκους στην περιοχή ελέγχου (Hauswirth & Clayton 1985) έχουν αποδοθεί σε ολίσθηση πολυμεράσης.

2) Επιπλέον, η γενετική παρέκκλιση μπορεί να αποτελέσει ένα σημαντικό παράγοντα στον καθορισμό των αναλογιών της ετεροπλασμίας μήκους.

3) Εναλλακτικά, ένας αρκετά μεγάλος αριθμός των μιτοχονδριακών γονιδιωμάτων μπορεί να είναι κληρονομικός σε κάθε γενιά και έτσι να διατηρούνται οι ίδιες αναλογίες των παραλλαγών μήκους ως χαρακτηριστική κατανομή για κάθε καταγωγή. Ούτε η γενετική παρέκκλιση, ούτε η de novo ολίσθηση πολυμεράσης σε κάθε άτομο έχει επαρκώς ισχυρή επίδραση για να μεταβάλλει σημαντικά τις αναλογίες μήκους ετεροπλασμίας σε κάθε άτομο εντός μιας μητρικής γενεαλογίας πάνω από τρεις γενιές.

Ακόμα και αν αυτή η ετεροπλασμία μήκους είναι κληρονομική ή παράγεται de novo σε κάθε άτομο, οι παράγοντες που καθορίζουν τις αναλογίες των παραλλαγών μήκους σε μια γενεαλογία δεν είναι γνωστοί. Ωστόσο, τα χαρακτηριστικά της πολυμεράσης ή άλλα συστατικά της αντιγραφικής συσκευής μπορούν να βοηθήσουν.

Όσον αφορά τη φυλογεωγραφία, οι πολυμορφισμοί που ανιχνεύθηκαν στους λαγούς Ελλάδας βρέθηκαν να είναι 150/734, στους λαγούς Τουρκίας 48/734, στους λαγούς Γαλλίας 14/734, στους λαγούς του Ισραήλ 25/734, στους λαγούς Κύπρου 50/734 και στους λαγούς Γερμανίας 28/734. Βάσει των αποτελεσμάτων αυτών οι λαγοί Ελλάδας εμφανίζουν τη μεγαλύτερη γενετική ποικιλότητα και οι λαγοί της Γαλλίας τη μικρότερη. Ωστόσο, η περιοχή ελέγχου (D-loop) και δεν αποτελεί αξιόπιστο φυλογεωγραφικό δείκτη διότι, υπάρχει μεγάλη ετερογένεια και εντός των πληθυσμών *Lepus europaeus*. Ο συνδυασμός χρήσης μοριακών δεικτών του μιτοχονδριακού και πυρηνικού DNA, θα μπορούσε να μας δώσει ασφαλέστερα συμπεράσματα για τη φυλογεωγραφία του λαγού, τη μετανάστευση των πληθυσμών καθώς και για γεγονότα υβριδισμού, τόσο μεταξύ των πληθυσμών όσο και μεταξύ ειδών του γένους *Lepus*.

Εν κατακλείδι, η εκτεταμένη πολλαπλή στοίχιση των αλληλουχιών της περιοχής ελέγχου (D-loop) στους λαγούς *Lepus europaeus* που αναφέρθηκαν εδώ αποδείχθηκε πολύ χρήσιμη στην αποκάλυψη ενδιαφερόντων χαρακτηριστικών της δομής και της εξελικτικής πορείας της κύριας ρυθμιστικής περιοχής του γονιδιώματος mt. Αυτή η σύντομη μη-κωδική περιοχή, σε ένα γονιδίωμα με ένα πολύ μειωμένο μέγεθος, περίπου 16 kb, περιέχει σε μικρογραφία, στοιχεία και χαρακτηριστικά κοινά με άλλες μη-κωδικοποιούσες περιοχές τόσο σε προκαρυωτικά όσο και ευκαρυωτικά γονιδιώματα. Η συνεχής τάση δημιουργίας μεταλλάξεων, προσθηκών και ελλειμμάτων, καθιστά το μέγεθος αυτής της περιοχής εξαιρετικά μεταβλητό σε διαφορετικούς και μερικές φορές ανάμεσα σε στενά

συνδεδεμένους οργανισμούς. Η τελευταία ιδιότητα και η ικανότητα της να δέχεται επαναλήψεις διαφόρων μεγεθών, ειδικών για κάθε είδος, υποδεικνύει ότι αυτή η περιοχή υπόκειται σε μηχανισμούς επέκτασης DNA πολύ παρόμοιους με εκείνους που συμβαίνουν στο πυρηνικό γονιδίωμα. Αυτές οι διαφορές στο μέγεθος mtDNA μεταξύ των ειδών, έχουν αναγνωριστεί να έχουν σημαντικές συνέπειες για την μελέτη της εξέλιξης του μιτοχονδριακού γονιδιώματος, την αναζήτηση ειδογένεσης και την παραγωγή νοσημάτων. Η παρούσα μελέτη στις περιοχές ελέγχου (D-loop) του είδους *Lepus europaeus* αποτελεί ένα πρώτο βήμα για να αποκαλυφθεί ο ρυθμός πολυμορφισμών που υφίσταται η περιοχή αυτή. Οι εκτιμήσεις των παραμέτρων και των ρυθμών μεταλλάξεων που παρουσιάζονται εδώ μπορούν να χρησιμοποιηθούν για να βελτιωθούν τα μοντέλα της μοριακής δομής και λειτουργίας της περιοχής ελέγχου στο είδος *L. europaeus*, καθώς και στις μεθόδους φυλογενετικών αναλύσεων παρόλη την μικρή δειγματοληψία και αριθμό αλληλουχιών από τις οποίες παρέχονται. Έτσι, μπορεί να επιτευχθεί μια καλύτερη κατανόηση των δυνάμεων και των μηχανισμών που επηρεάζουν την εξέλιξη του τοπού αυτού και να εξαχθούν πιο ορθά συμπεράσματα για την ιστορία των αλληλουχιών D-loop και των πληθυσμών *Lepus europaeus*.

5. Βιβλιογραφία

- Agaronyan K., Morozov Y. I., Anikin M., Temiakov D., (2015) *Science*, Vol. 347, Issue 6221, pp. 548-551
- Alberts, Bray, Hopkin, Johnson, Lewis, Raff, Roberts, Walter (2011), Βασικές αρχές κυτταρικής βιολογίας
- Avise J. (1994) *Molecular Markers, Natural History and Evolution*
- Ballard J. W. O., Kreitman M. (1995), Is mitochondrial DNA a strictly neutral marker?, *Journal of Molecular Evolution*, Volume 10, Issue 12, December 1995, Pages 485-488
- Bankier A. S., Barrell B. G., Bruijn M. H., Coulson A. R., Drouin J., Eperon I. C., Nierlich D. P., Roe B. A., Sanger F., Schreier P. H., Smith A. J., Staden R., Young I. G. (1981) Sequence and organization of the human mitochondrial genome *Nature* 290, 457 - 465
- Barton N. H., Briggs D. E.G, Elisen J. A., Goldstein D. B., Patel N. H. (2013), Εξέλιξη
- Bininda-Emonds O. R.P. (2000), Factors Influencing Phylogenetic Inference: A Case Study Using the Mammalian Carnivores, *Molecular Phylogenetics and Evolution* Volume 16, Issue 1, 113-126
- Boore J. (1999) Animal mitochondrial genomes. *Nucleic Acids Res.* 27(8):1767-80.
- Brown G. G., Gadaleta G., Pepe G., Saccone C., Sbisà E., (1986) Structural conservation and variation in the D-loop-containing region of vertebrate mitochondrial DNA, *Journal of Molecular Biology*, Volume 192, Issue 3, Pages 503-511
- Casane D., Dennebouy N., Rochambeau H., Mounolou J. C. and Monnerot M., (1997), Nonneutral evolution of tandem repeats in the mitochondrial DNA control region of lagomorphs, *Mol Biol Evol.*, 14 (8): 779-789
- Clayton D. A., (1991), Replication and transcription of vertebrate mitochondrial DNA, *Annu Rev Cell Biol.* 453-78
- Coyne J. A. and Orr. H. A. (2004), *Speciation*
- Ellstrand N. C. και Rieseberg L. H. (2016) When gene flow really matters: gene flow in applied evolutionary biology. *Evol Appl.* 9(7): 833–836.
- Faber J. E. and Stepien C. A. (1998), Tandemly Repeated Sequences in the Mitochondrial DNA Control Region and Phylogeography of the Pike-Perches *Stizostedion*, *Molecular Phylogenetics and Evolution* Vol. 10, No. 3, pp. 310–322
- Fickel J., Hauffe H. C., Pecchioli E., Soriguer R., Vapa L., Pitra C. (2008) Cladogenesis of the European brown hare (*Lepus europaeus* Pallas, 1778), *European Journal of Wildlife Research* 54:495
- Gemmell N. J., Western P. S., Watson J. M., and Graves J. A. M., (1996) Evolution of the Mammalian Mitochondrial Control Region-Comparisons of

Control Region Sequences Between Monotreme and Therian Mammals, Genetics and Variation

- Hagelberg (1994) Mitochondrial DNA from ancient bones, Ancient DNA, New York: Springer-Verlag pp. 195-204
- Hasegawa M., Rienzo A. D., Kocher T. D., Wilson A. C., (1993) Toward a more accurate time scale for the human mitochondrial DNA tree, Journal of Molecular Evolution, Volume 37, Issue 4, pp 347–354
- Ingman M., Kaessmann H., Pääbo S., Gyllensten U., (2000) Mitochondrial genome variation and the origin of modern humans, Nature, 408 (6813) : 708-13
- Kasamatsu H., Robberson D. L., and Vinograd J. (1971) A Novel Closed-Circular Mitochondrial DNA with Properties of a Replicating Intermediate, vol. 68 no. 9, 2252–2257
- Kasapidis P., Suchentrunk F., Magoulas A., Kotoulas G. (2005) The shaping of mitochondrial DNA phylogeographic patterns of the brown hare (*Lepus europaeus*) under the combined influence of Late Pleistocene climatic fluctuations and anthropogenic translocations, Molecular Phylogenetics and Evolution 34 ,pp. 55–66
- Krzywinski J., Cong Li, Morris M., Conn J. E., Lima J. B., Pova M. M., and Wilkerson R. C. (2006), Analysis of the evolutionary forces shaping mitochondrial genomes of a Neotropical malaria vector complex, Mol Phylogenet Evol. 2011 Mar; 58(3): 469–477
- Lewin B. (2004), GENES VIII
- Mamuris Z., Moutou K.A., Stamatis C., Sarafidou T., Suchentrunk F. (2010).
- Mamuris Z., Sfouggaris A.I., Stamatis C. (2001). Genetic structure of Greek brown hare (*Lepus europaeus*) populations as revealed by mtDNA RFLP- PCR analysis: implications for conserving genetic diversity. Biological Conservation 101: 187- 196
- Mamuris Z., Sfouggaris A.I., Stamatis C., Suchentrunk F. (2002). Assessment of genetic structure of Greek brown hare (*Lepus europaeus*) populations based on variations in Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD). Biochemical Genetics 40: 323- 338
- Matson C. W. & Baker R. J., (2001), DNA Sequence Variation in the Mitochondrial Control Region of Red-Backed Voles (*Clethrionomys*) 18 (8): 1494-1501
- Mcvean G. A. T. , (2001), What do patterns of genetic variability reveal about mitochondrial recombination?, Heredity (2001) 87, 613–620
- Meyer S., Weiss G., Haeseler A., (1999) Pattern of Nucleotide Substitution and Rate Heterogeneity in the Hypervariable Regions I and II of Human mtDNA, GENETICS vol. 152 no. 3 1103-1110

- Miyazono F., Schneider P. M., Metzger R., Warnecke-Eberz U., Baldus S. E., Dienes H. P., Aikou T. and Hoelscher A. H., (2002) Mutations in the mitochondrial DNA D-Loop region occur frequently in adenocarcinoma in Barrett's esophagus, *Oncogene* (2002) 21, 3780-3783
- Moritz C., Dowling T. E. and Brown W. M., (1987) Evolution of Animal Mitochondrial DNA: Relevance for Population Biology and Systematics, *Annual Review of Ecology and Systematics*, Vol. 18, pp. 269-292
- Neiman M. and Taylor D. R., (2009) The causes of mutation accumulation in mitochondrial genomes, *Proc Biol Sci.* 276(1660): 1201–1209.
- Nussbaum R. L., McInnes R. R., Willard H. F., (2011) Ιατρική Γενετική
- Park C. B. and Larsson N. G., (2011) Mitochondrial DNA mutations in disease and aging, *J Cell Biol.* 193(5): 809–818.
- Pérez-Suárez G., Palacios F., Boursot P. (1994), Speciation and paraphyly in western mediterranean hares (*Lepus castroviejoi*, *L. europaeus*, *L. granatensis*, and *L. capensis*) revealed by mitochondrial DNA phylogeny, *Biochemical Genetics*, Volume 32, Issue 11, pp 423–436
- Ray D. A., Densmore L., (2002) The crocodylian mitochondrial control region: general structure, conserved sequences, and evolutionary implications, Volume 294, Issue 4, Pages 334–345
- Russell P. J. (2009), *iGenetics*
- Saccone C., Attimonelli M., Sbisà E. (1987) Structural elements highly preserved during the evolution of the D-loop-containing region in vertebrate mitochondrial DNA, *Journal of Molecular Evolution*, Volume 26, Issue 3, pp 205–211
- Saccone C., Pesole G., Sbisà E. (1991) The main regulatory region of mammalian mitochondrial DNA: Structure-function model and evolutionary pattern, *Journal of Molecular Evolution*, Volume 33, Issue 1, pp 83–91
- Salas A., Lareu M. V., Carracedo A., (2001) Heteroplasmy in mtDNA and the weight of evidence in forensic mtDNA analysis: a case report, volume 114, Issue 3, pp 186–190
- Sbisà E., Tanzariello F., Reyes A., Pesole G., Saccone C. (1997) Mammalian mitochondrial D-loop region structural analysis: identification of new conserved sequences and their functional and evolutionary implications, *Gene*, Volume 205, Issues 1–2, 31, pp 125–140
- Sigurðardo'ttir S., Helgason A., R. Gulcher J., Stefansson K., and Donnelly P., (2000) The Mutation Rate in the Human mtDNA Control Region, *Am. J. Hum. Genet.* 66:1599–1609
- Stamatidis C., Suchentrunk F., Moutou K.A., Giacometti M., Haerer G., Djan M., Vapa L., Vucovic M., Tvrtkovic. N., Sert H., Alves P., Mamuris Z. (2009). Phylogeography of the Brown Hare, *Lepus europaeus*, in Europe: legacy of southeastern Mediterranean refugia? *Journal of Biogeography* 36:515- 528

- Stamatis C., Suchentrunk F., Sert H., Triantaphyllidis C., Mamuris Z. (2007). Genetic evidence for survival of released captive-bred brown hares *Lepus europaeus* during restocking operations in Greece. *FFI, Oryx*, 41(4), 548–551
- Stoneking M. (2000) Hypervariable Sites in the mtDNA Control Region Are Mutational Hotspots, Volume 67, Issue 4, Pages 1029–1032
- Stoneking M., Hedgecock D., Higuchi R. G., Vigilant L., and Erlich H. A. (1991) Population variation of human mtDNA control region sequences detected by enzymatic amplification and sequence-specific oligonucleotide probes, *Am J Hum Genet.* Feb; 48(2): 370–382.
- Suchentrunk F., Mamuris Z., Sfouggaris A.I., Stamatis C. (2003). Biochemical genetic variability in brown hares (*Lepus europaeus*) from Greece. *Biochemical Genetics* 41: 127- 140
- Tamura K., Nei M., (1993) Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Mol Biol Evol.* 10(3):512-26
- Thulin C. G., Jaarola M., Tegelström H. (1997) The occurrence of mountain hare mitochondrial DNA in wild brown hares, *Molecular Ecology*, Volume6, Issue 5, Pages 463–467
- Tully L. A., Parsons T. J., Steighner R. J., Holland M. M., Marino M. A., Prenger V. L., (2000), A Sensitive Denaturing Gradient-Gel Electrophoresis Assay Reveals a High Frequency of Heteroplasmy in Hypervariable Region 1 of the Human mtDNA Control Region, Volume 67, Issue 2, August 2000, Pages 432–443
- Wakeley J., (1993) Substitution rate variation among sites in hypervariable region 1 of human mitochondrial DNA, *J Mol Evol.*, 37(6):613-23
Y DNA and Mitochondrial lineage in European and Asian populations of the brown hare (*Lepus europaeus*). *Mammalian Biology* 75: 233- 242
- Zhang D. X., Hewitt G. M., (1997) Insect mitochondrial control region: A review of its structure, evolution and usefulness in evolutionary studies, *Biochemical Systematics and Ecology*, Volume 25, Issue 2, March 1997, Pages 99-120