



ΘΕΜΑ ΠΤΥΧΙΑΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ:

**Διερεύνηση πολυμορφισμών στα γονίδια *ATP6* και *NADH2*
του μιτοχονδρίου, σε πληθυσμούς του είδους *Lepus*
*europaeus***



Καριώτη Δάφνη

-ΛΑΡΙΣΑ 2010-

**Διερεύνηση πολυμορφισμών στα γονίδια ATP6 και NADH2
του μιτοχονδρίου, σε πληθυσμούς του είδους *Lepus
europaeus***

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ:

**Μαμούρης Ζήσης
Καθηγητής Γενετικής Ζωικών Πληθυσμών**

ΜΕΛΗ ΤΡΙΜΕΛΟΥΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ:

Μαμούρης Ζήσης: Καθηγητής Γενετικής Ζωικών Πληθυσμών

Μούτου Αικατερίνη: Επίκουρος Καθηγήτρια Βιολογίας Σπονδυλωτών

**Σαραφίδου Θεολογία: Λέκτορας Μοριακής Γενετικής Ζωικών
Πληθυσμών**

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	σελ.6
1.1. Γενική εισαγωγή	σελ.6
1.2. Το είδος <i>Lepus europaeus</i>	σελ.6
1.2.1 Φυσική περιγραφή	σελ.6
1.2.2 Συμπεριφορά	σελ.7
1.2.3. Εξάπλωση	σελ.7
1.2.4. Βιότοπος.....	σελ.7
1.2.5. Τροφή.....	σελ.8
1.2.6. Αναπαραγωγή	σελ.8
1.2.7. Κίνδυνοι & Απειλές	σελ.9
1.2.8 Οικονομική σημασία για τον άνθρωπο	σελ.9
1.2.9. Ερευνητική σημασία	σελ.9
1.2.10. Μελέτες πληθυσμιακής γενετικής στο είδος <i>L. Europaeus</i> σε Ευρώπη και Ασία.....	σελ.9
1.3. Το μιτοχόνδριο.....	σελ.10
1.3.1. Το μιτοχονδριακό DNA (mtDNA)	σελ.11
1.4. Οξειδωτική φωσφορυλίωση	σελ.13
1.4.1. ATP και ADP	σελ.13
1.5. ATP συνθάση και σύνθεση της ATP	σελ.14
1.5.1. Δομή της συνθάσης ATP	σελ.15
1.5.2. Βιοχημική προσέγγιση της σύνθεσης της ATP	σελ.16
1.5.3. Υδρόλυση ATP	σελ.17
1.5.4. Το γονίδιο της συνθάσης ATP στο είδος <i>L. Europaeus</i>	σελ.18
1.6. Οξειδοαναγωγή του ζεύγους NADH-Q.....	σελ.19
1.6.1. Δομή της οξειδοαναγωγής του ζεύγους NADH-Q....	σελ.19
1.6.2. Λειτουργία της οξειδοαναγωγής του ζεύγους NADH-Q	σελ.20
1.6.3. Το γονίδιο της οξειδοαναγωγής του ζεύγους NADH-Q	σελ.22
1.7. Μελέτες των πολυμορφισμών στα γονίδια ATP6 και NADH2 σε άλλους οργανισμούς.....	σελ.23
1.8. Πολυμορφισμοί στα μιτοχονδριακά γονίδια που σχετίζονται με την παραγωγή ATP (ATP6, NADH2) και το φαινόμενο μειωμένης γονιμότητας (the mother's curse).....	σελ.23
1.9. Σκοπός της πτυχιακής εργασίας.....	σελ.24
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	σελ.25
2.1. Συλλογή δειγμάτων	σελ.25
2.2. Εκτίμηση της απόδοσης πρωτοκόλλου απομόνωσης DNA	σελ.25
2.2.1. Ποσοτικός προσδιορισμός	σελ.25
2.2.2. Ποιοτικός προσδιορισμός	σελ.25
2.3. Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης – PCR.....	σελ.26
2.3.1. Η μέθοδος της PCR.....	σελ.27
2.3.2. Υλικά της PCR.....	σελ.27
2.3.3. Στάδια της θερμικής κυκλοποίησης.....	σελ.28
2.3.4. Έλεγχος προϊόντων PCR	σελ.30

2.3.5. Παρασκευή διαλύματος TAE 1X	σελ.31
2.3.6. Ηλεκτροφόρηση προϊόντων PCR σε πηκτή αγαρόζης 2%	σελ.31
2.4. Ανάλυση πολυμορφισμού μονόκλωνης διαμόρφωσης (SSCP)....	σελ.32
2.4.1. Παρασκευή 125 ml πηκτής ακρυλαμίδης 8%.....	σελ.33
2.4.2. Παρασκευή ρυθμιστικού διαλύματος TBE 10X.....	σελ.34
2.4.3. Χρώση με νιτρικό άργυρο (silver staining)	σελ.35
2.5. Καθαρισμός των PCR προϊόντων	σελ.35
2.5.1. Ποσοτική εκτίμηση του καθαρισμού.....	σελ.36
2.5.2. Ποιοτική εκτίμηση του καθαρισμού.....	σελ.36
2.5.3. Κατακρήμνιση του καθαρού PCR προϊόντος	σελ.36
2.6. Προετοιμασία των primers για αλληλούχηση	σελ.37
2.7. Κυκλική αλληλούχηση	σελ.37
2.8. Δενδρογράμματα.....	σελ.39
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	σελ.40
3.1. Αποτελέσματα PCR	σελ.40
3.2. Αποτελέσματα SSCP	σελ.40
3.3. Αποτελέσματα αλληλούχησης.....	σελ.41
3.4. Αμινοξική ανάλυση πρότυπων αλληλουχιών	σελ.46
3.5. Συγκρίσεις πολυμορφισμών.....	σελ.49
4. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	σελ.55

Ευχαριστίες

Η παρούσα πτυχιακή εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Γενετικής, Εξελικτικής και Συγκριτικής Βιολογίας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, κατά το χρονικό διάστημα 15/2/2010 έως 30/7/2010. Θα ήθελα να ευχαριστήσω τα μέλη της τριμελούς συμβουλευτικής μου επιτροπής: τον κ. Μαμούρη Ζήση, Καθηγητή Γενετικής Ζωικών Πληθυσμών που με δέχτηκε στο εργαστήριό του ώστε να μπορέσω να εκπονήσω την παρούσα πτυχιακή εργασία, την κα. Μούτου Αικατερίνη, επίκουρο καθηγήτρια βιολογίας σπονδυλωτών καθώς και την κα. Σαραφίδου Θεολογία, λέκτορα μοριακής γενετικής ζωικών οργανισμών του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας για την τιμή που μου κάνουν συμμετέχοντας στην τριμελή μου επιτροπή.

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω την κα. Κουτσογιαννούλη Ευαγγελία για την προσφορά των δειγμάτων *Lepus europaeus* καθώς και τους υποψήφιους διδάκτορες κ. Σταμάτη Κωνσταντίνο και Γιαννούλη Θεμιστοκλή για τη σημαντική βοήθεια που μου παρείχαν στο πειραματικό κομμάτι της εργασίας κατά τη διάρκεια παραμονής μου στο εργαστήριο, τις συμβουλές και τις υποδείξεις τους.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1. Γενική εισαγωγή

Οι γενετικές μελέτες βασίζονται σε επιλεκτικά ουδέτερους δείκτες (π.χ. μικροδορυφόροι) και έχουν ως σκοπό την εκτίμηση της διαφοροποίησης και της γενετικής ποικιλομορφίας των φυσικών πληθυσμών, δίνοντας σαφείς ενδείξεις για την επιρροή του περιβάλλοντος σε αυτούς, όπως επίσης και των ανθρώπινων ενεργειών. Ο μηχανισμός ο οποίος διατηρεί τη γενετική ποικιλομορφία, η σχετική συνεισφορά διάφορων γεγονότων μικροεξέλιξης καθώς και η δράση της φυσικής επιλογής η οποία διατηρεί τους προσαρμοστικούς πολυμορφισμούς είναι αντικείμενο της επιστήμης της εξελικτικής βιολογίας. Στα πλαίσια αυτά, θα μελετηθούν στη συγκεκριμένη εργασία οι πολυμορφισμοί που εμφανίζονται σε δύο μιτοχονδριακά γονίδια, το ATP6 και το NADH2, του είδους *Lepus europaeus*. Ο *Lepus europaeus* (Pallas 1778), ονομάζεται αλλιώς ευρωπαϊκός ή καφέ λαγός, είναι ένα σημαντικό είδος θηλαστικού της Ευρώπης, το οποίο προήλθε από την Ευρασία και έχει πλέον προσαρμοστεί άριστα σε πολλές χώρες ανά τον κόσμο.

1.2. Το είδος *Lepus europaeus*

Πίνακας 1: Ταξινόμηση του είδους *Lepus europaeus*

Ταξινόμηση του <i>L. Europaeus</i> (Hoffman et al. 2005)	
Βασίλειο:	Ζώων
Φύλο:	Χορδωτά
Υπο-φύλο:	Σπονδυλωτά
Κλάση:	Θηλαστικά
Τάξη:	Λαγόμορφα
Οικογένεια:	Leporidae
Γένος:	Lepus
Είδος:	Europaeus

1.2.1 Φυσική περιγραφή

Ο *Lepus europaeus* είναι ζώο θηλαστικό, χορτοφάγο με μέσο μήκος περίπου 55 με 60 εκατοστά και ζυγίζει από 2,5 έως 6,5 κιλά. Το χρώμα του είναι καστανόγκριζο έως γκριζο καφέ, εκτός από την περιοχή της κοιλιάς που είναι γκρι-άσπρη. Το κεφάλι είναι σε καφέ αποχρώσεις με πιο ανοιχτόχρωμους κύκλους γύρω από τα μάτια (Εικόνα 1). 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 7-11 εκατοστά, είναι μαύρη στο επάνω μέρος της και



Εικόνα 1: *Lepus europaeus* σε φυσικό περιβάλλον
(<http://www.asturnatura.com/especie/lepus-europaeus.html>)

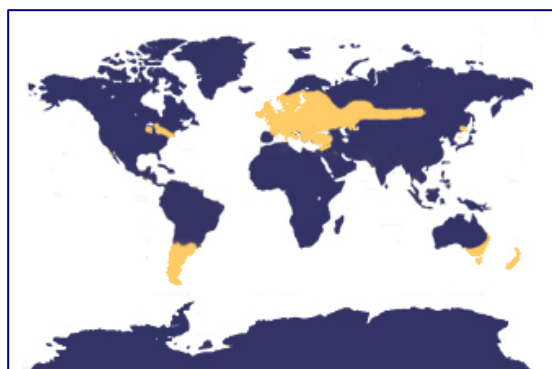
άσπρη στο κάτω. Η διάρκεια ζωής του φτάνει τα 7-8 χρόνια (Bansfield et al. 1974). Το χειμώνα ο *Lepus europaeus* δεν αλλάζει το τρίχωμά του σε άσπρο, αποκτά όμως συχνά μια ελαφρώς πιο γκριζα απόχρωση. Δεν έχει παρατηρηθεί διμορφισμός ανάμεσα στα δύο φύλα, τα οποία διαφέρουν μεταξύ τους μόνο ίσως ως προς το γεγονός ότι τα αρσενικά έχουν συνήθως πιο κοντό και παχύ λαιμό (Bansfield et al. 1974, Dragg et al. 1974)

1.2.2. Συμπεριφορά

Γενικά ο *Lepus europaeus* θεωρείται νυκτόβιο ζώο. Κινείται περισσότερο τις νυχτερινές ώρες, είναι ζώο δειλό αλλά η πονηριά και η ταχύτητα του τού επιτρέπουν να κινείται και την ημέρα όποτε χρειαστεί. Γενικά προτιμά τη μοναχική ζωή αν και έχουν παρατηρηθεί εμφανίσεις του σε μικρές ομάδες. Χαρακτηριστικό του γνώρισμα είναι η μεγάλη ταχύτητα που αναπτύσσει, η οποία μπορεί να φτάσει τα 70 χιλιόμετρα την ώρα. Ο λαγός είναι συνεχώς σε εγρήγορση. Όταν ακούσει θόρυβο στέκεται στα πίσω πόδια για να έχει καλύτερη εποπτεία του χώρου, με σηκωμένα τα χαρακτηριστικά μακριά αυτιά του (Hamilton et al. 1943).

1.2.3. Εξάπλωση

Ο *Lepus europaeus* προήλθε αρχικά από την Ευρασία και έχει πλέον προσαρμοστεί άριστα σε πολλές χώρες ανά τον κόσμο. Σήμερα συναντάται σε όλη την Ευρώπη, Μ. Ασία, Αραβία, Βόρεια Αφρική ενώ έχει επίσης εισαχθεί στην Αμερική, Αυστραλία και στη Νέα Ζηλανδία (Εικόνα 3). Λόγω της μεγάλης του εξάπλωσης, το είδος μπορεί να παρουσιάζει κάποιες μικρές διαφορές από τόπο σε τόπο. Για παράδειγμα στη νότια Ευρώπη ο *L.europaesus* έχει μικρότερο μέσο μέγεθος σώματος και κοντότερο τρίχωμα από τους *L.europaesus* της βόρειας Ευρώπης (Lincoln et al. 1974, Poli et al. 1991).



Εικόνα 2: Γεωγραφική κατανομή του *Lepus europaeus* (κίτρινο χρώμα) ανά τον κόσμο. (Hare Preservation Trust <http://www.hare-preservation-trust.co.uk/img/>)

1.2.4. Βιότοπος

Με το μιμητικό του περιβάλλοντος τρίχωμά του, ο καφέ λαγός υπάρχει σχεδόν παντού και σε όλον τον κόσμο, σε πεδιάδες και σε βουνά μέχρι τα 1800μ υψόμετρο. Συνήθως δραστηριοποιείται σε ανοιχτές περιοχές, ενώ αποφεύγει τα μέρη με πολλή υγρασία. Εκτιμά τα ξηρά, υγιή και αεριζόμενα εδάφη, όπως μεγάλα δάση δίπλα σε πεδιάδες, παράκτιες περιοχές με καλλιέργειες κ.λπ. Συνήθως διαθέτει μια ζωτική περιοχή 300 περίπου στρεμμάτων την οποία μοιράζεται με τους ομοφύλους του. Στο χώρο αυτό υπάρχουν και διαδρομές διαφυγής, ενώ ο χώρος που συχνάζει είναι 10-15 στρέμματα. Η φωλιά του βρίσκεται σε κοιλώματα, τρύπες, σε ψηλά χόρτα ή θάμνους, καλά καμουφλαρισμένη. Δεν τη διαμορφώνει ο ίδιος, όπως για παράδειγμα το συγγενικό του κουνέλι, αλλά την αναζητά σε φυσικά προστατευμένα σημεία (Bansfield et al. 1974).

1.2.5. Τροφή

Την ημέρα ο *L.europraeus* συνήθως κρύβεται και το σούρουπο αφήνει τη φωλιά για να αρχίσει την αναζήτηση της τροφής του. Αυτή αποτελείται από μεγάλη ποικιλία και εξαρτάται από τις εποχές του έτους. Γενικά μπορεί να φάει κάθε είδους φυτά, χόρτα, σιτηρά, λαχανικά, φύλλα θάμνων, κλαδιά αλλά και μπουμπούκια δένδρων. Επίσης χαρακτηριστικό του είναι και η κοπροφαγία, συχνά δηλαδή φαίνεται να καταναλώνει μαλακές κουτσουλιές πουλιών οι οποίες είναι πλούσιες σε βιταμίνες, αμινοξέα και βακτήρια τα οποία του είναι απαραίτητα (Bansfield et al. 1974, Hamilton et al. 1943).

1.2.6. Αναπαραγωγή

Αν και γενικά μοναχικό ζώο, ο *Lepus eurpraeus* κοινωνικοποιείται ιδιαίτερα κατά την περίοδο του ζευγαρώματος, προς το τέλος του χειμώνα, κατά τη διάρκεια της οποίας επιδίδεται σε θεαματικά άλματα και μάχες (Εικόνα 2) διεκδικώντας το αίρι του. Μέχρι πρόσφατα οι μάχες αυτές, κατά τις οποίες ο ένας λαγός χτυπούσε τον αντίπαλο με τις πατούσες του, θεωρούνταν μια μορφή ανταγωνισμού μεταξύ των αρσενικών. Μια πιο στενή παρακολούθηση όμως έδειξε πως πολλές φορές επρόκειτο για θηλυκά άτομα που χτυπούσαν αρσενικά είτε για να δείξουν πως δεν ήταν ακόμα έτοιμα για ζευγάρωμα είτε για να δοκιμάσουν την αποφασιστικότητα των αρσενικών. Το θηλυκό γεννά τρεις ως τέσσερις φορές το χρόνο, έπειτα από κυοφορία 30-45 ημερών. Την πρώτη φορά, συνήθως τον Μάρτιο, γεννά 1-2 μικρά, τη δεύτερη 3-4 μικρά και την τρίτη και τέταρτη φορά 1-2 μικρά. Η τελευταία γέννα συνήθως είναι στο τέλος του καλοκαιριού (Bonino and Montenegro 1997)



Εικόνα 3: *Lepus europaeus* σε περίοδο ζευγαρώματος (http://www.ifaw.org/ifaw_united_kingdom/save_animals/hares/brown_hare.php)

Τα μικρά γεννιούνται καλυμμένα από παχύ τρίχωμα με τα μάτια ανοιχτά και μπορούν να κινηθούν και να βαδίσουν άνετα αμέσως, ένα εξελικτικό χαρακτηριστικό που προέκυψε σχετικά πρόσφατα στην ιστορία του είδους και δεν συναντάται σε συγγενικά είδη όπως πχ. στα νεογέννητα κουνέλια (Roellig et al. 2010). Τα μικρά του λαγού θηλάζουν μόνο μία εβδομάδα και για τις δύο επόμενες εβδομάδες μένουν κρυμμένα στην ίδια ή σε διαφορετική φωλιά από αυτή που γεννήθηκαν ενώ η μητέρα κάνει κύκλους για να τα φροντίσει και να φέρει στο καθένα τους τροφή. Αυτό το σκόρπισμα των νεογνών σε μια ευρεία περιοχή γίνεται συνήθως από την ίδια τη μητέρα για να προστατέψει τα μικρά της από κάποια επίθεση θηρευτή, που θα τα αφάνιζε όλα (Peterson et al. 1966). Ύστερα από 3 με 4 εβδομάδες τα μικρά έχουν ανεξαρτητοποιηθεί πλήρως και φροντίζουν μόνα τους για την αναζήτηση της τροφής τους, αλλά δεν αρχίζουν να ζευγαρώνουν και να αναπαράγονται πριν από τον πρώτο χρόνο της ζωής τους.

1.2.7. Κίνδυνοι και Απειλές

Ο *Lepus europaeus* αποτελεί θήραμα πολλών αρπακτικών και για το λόγο αυτό θεωρείται αρκετά σημαντικός οικολογικός παράγοντας σταθερότητας του οικοσυστήματος. Τον κυνηγούν σχεδόν όλα τα σαρκοφάγα ζώα, όπως ο λύκος, ο σκύλος, το κουνάβι, η αλεπού αλλά ακόμη και τα αρπακτικά πτηνά, όπως για παράδειγμα τα γεράκια. Φυσικά από τη λίστα των εχθρών του δε θα μπορούσε να λείπει και ο άνθρωπος ως κυνηγός του. Ο λαγός αμύνεται τρέχοντας, χρησιμοποιώντας ταυτόχρονα ταχύτατους ελιγμούς για να μπερδέψει το θηρευτή του ή μένοντας κρυμμένος στο έδαφος. Ο πληθυσμός του παρουσιάζει κατά καιρούς έντονες και ακανόνιστες αυξομειώσεις που μπορεί να οφείλονται σε παράγοντες όπως η ποσότητα και ποιότητα της διαθέσιμης τροφής, οι κλιματικοί παράγοντες, καθώς και ο μεγάλος αριθμός των ατόμων του πληθυσμού και ο ανταγωνισμός στην εξεύρεση τροφής. Οι παραπάνω λόγοι έχουν σαν αποτέλεσμα την μείωση του ρυθμού της αναπαραγωγής των *L.europraeus* και την ελάττωση της αντοχής τους σε ασθένειες (Smith et al. 2008).

1.2.8. Οικονομική σημασία για τον άνθρωπο

Σχεδόν σε όλες τις περιοχές του κόσμου ο λαγός αποτελεί ένα σημαντικό θήραμα, λόγω του άσπρου και εξαιρετικά νόστιμου κρέατός του (Bansfield 1974, Hamilton 1943). Σε πολλές όμως περιοχές όπως είναι για παράδειγμα η Αργεντινή, η Αυστραλία και η Νότια Αμερική, ο *Lepus europaeus* εκτός από θηρεύσιμο είδος θεωρείται και ιδιαίτερα ζημιογόνο, εξαιτίας του γρήγορου ρυθμού αναπαραγωγής του και των καταστροφών που προκαλεί στις γεωργικές καλλιέργειες των περιοχών στην προσπάθειά του να τραφεί (Campbell et al. 2006).

1.2.9. Ερευνητική σημασία

Ο ευρωπαϊκός λαγός, είναι ένα είδος του οποίου η φυλογεωγραφική και πληθυσμιακή δομή έχει μελετηθεί αρκετά, ιδιαίτερα σε περιοχές της κεντρικής Ευρώπης. Αποτελεί ένα από τα κυρίαρχα στοιχεία της πανίδας των ανοικτών εκτάσεων και διαθέτει ιδιαίτερη οικονομική σημασία. Η σημασία αυτή σε συνδυασμό με το γεγονός ότι η διεκπεραίωση ολοκληρωμένων μελετών του είδους στο χώρο της Βαλκανικής ενέχει ορισμένες από τις πιο σημαντικές προκλήσεις στο χώρο της θεωρητικής πληθυσμιακής γενετικής, καθιστούν τη μελέτη του ευρωπαϊκού λαγού εξαιρετικής σημασίας, με ιδιαίτερο επιστημονικό ενδιαφέρον (Αντωνίου 2008).

1.2.10. Μελέτες πληθυσμιακής γενετικής στο είδος *L. europaeus* σε Ευρώπη και Ασία

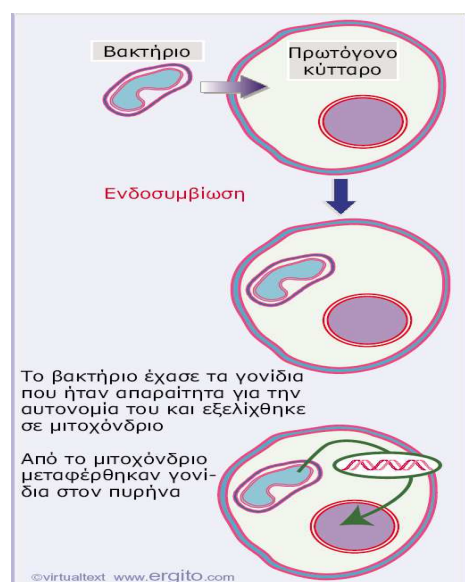
Δεδομένα πληθυσμιακής γενετικής στο είδος του *Lepus europaeus* που έχουν βασιστεί σε δείκτες πυρηνικού DNA έχουν δείξει σχετικά μεγάλη γονιδιακή ροή ανάμεσα σε μεγάλο εύρος περιοχών (Mamuris et al. 2002, Fickel et al. 1999). Ακόμη και αναλύσεις βασισμένες σε μικροδορυφόρους, οι οποίοι παρουσιάζουν γρήγορους εξελικτικούς ρυθμούς και απεικονίζουν καλύτερα την πληθυσμιακή γενετική διαφοροποίηση, έχουν αποκαλύψει κοινά αλληλόμορφα μεταξύ ελληνικών, βουλγαρικών και ανατολικών πληθυσμών του *L. europaeus* (Slimen et al. 2008). Από την άλλη πλευρά, αναλύσεις του μιτοχονδριακού DNA έδειξαν ένα μεγαλύτερο βαθμό τοπολογικού διαχωρισμού (Stamatis et al. 2008, Kasapidis et al. 2005). Η παρατηρούμενη αυτή ασυμφωνία μεταξύ πυρηνικού και μιτοχονδριακού

γονιδιώματος αποδόθηκε στην αυξημένη εξάπλωση των αρσενικών ατόμων και στην πιο φιλοπατρική συμπεριφορά των θηλυκών ατόμων του είδους (Mamuris et al. 2009).

Πρόσφατα, σε μια πιο περιεκτική φυλεογεωγραφική ανάλυση που βασίστηκε σε περίπου 1000 άτομα του είδους από Ευρώπη και Ασία, ταυτοποιήθηκαν πέντε μεγάλοι απλότυποι με καθαρό φυλεογεωγραφικό σήμα, το οποίο αντικατόπτριζε σαφώς την παρουσία των καταφυγίων της πανίδας στα κεντρικά – ανατολικά Βαλκάνια και στην Ανατολή κατά το τέλος περίπου της Πλειστοκένου εποχής. Αυτή η μελέτη ανίχνευσε την παρουσία δύο καλά διαχωρισμένων απλοτύπων mtDNA ανάμεσα σε Ευρώπη και Ανατολή καθώς και την παρουσία τριών διακριτών mtDNA υπο-κλάδων μέσα στην Ευρώπη (Stamatis et al. 2009).

Οι πληθυσμοί του είδους οι οποίοι βρίσκονται στην κεντρική Ευρώπη έχουν σίγουρα επηρεαστεί από τους παγετώνες, στο διάστημα των τελευταίων 18.000 χρόνων. Φαίνεται πολύ πιθανό η σημερινή χωροταξική κατανομή αυτών των πληθυσμών να έχει τις ρίζες της στα γεγονότα που συνέβησαν προς το τέλος της Πλειστόκενου εποχής, με την υποχώρηση των πάγων. Διάφορες μελέτες μιτοχονδριακού DNA (Awadalla et al. 1999, Garrigan et al. 2006), έδειξαν μετά την παγετωνική περίοδο αποικισμούς μεγάλων περιοχών στην Ευρώπη, οι οποίοι άρχισαν από ένα μόνο αρχικό πληθυσμό στα νότια – κεντρικά Βαλκάνια. Γενικά οι πληθυσμοί που προήλθαν από αυτά τα καταφύγια της Πλειστόκενου εποχής είναι πιθανό να έχουν δεχτεί μια μείωση στη γενετική ποικιλομορφία που εμφανίζουν, ως αποτέλεσμα του φαινομένου της αρχής του ιδρυτή. Για το συγκεκριμένο είδος λαγού, το *Lepus europaeus*, η επίδραση αυτή έχει δειχθεί τόσο μέσα από αναλύσεις του μιτοχονδριακού DNA όσο μέσα και από αναλύσεις αλλοενζύμων οι οποίες δείχνουν μειωμένη γενετική ποικιλομορφία ανάμεσα σε πληθυσμούς των Βαλκανίων και της Ανατολής (Sert et al. 2005, Taberlet et al. 1998).

1.3. Το μιτοχόνδριο

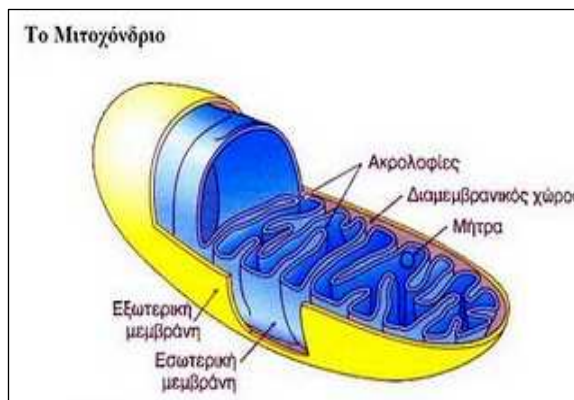


Εικόνα 4: Ενδοσυμβίωση μεταξύ ενός βακτηρίου και ενός πρωτόγονου ευκαρυωτικού κυττάρου (Watson et al. 2007, εκδόσεις Ι. Μπάσδρα)

Τα δύο γονίδια του *Lepus europaeus* που επιλέχθηκαν για να μελετηθούν στην παρούσα εργασία βρίσκονται στο μιτοχονδριακό γονιδίωμα και κωδικοποιούν για δύο πρωτεΐνες οι οποίες εδράζονται στις μεμβράνες των μιτοχονδρίων σαν υπομονάδες πρωτεϊνικών συμπλόκων. Τα μιτοχόνδρια είναι τα οργανίδια του κυττάρου τα οποία παράγουν το μεγαλύτερο μέρος της κυτταρικής ATP, η οποία χρησιμοποιείται σαν πηγή χημικής ενέργειας. Επιπλέον αυτής της παροχής τους σε ενέργεια, τα μιτοχόνδρια εμπλέκονται σε μια ποικιλία άλλων διεργασιών όπως η σηματοδότηση, η κυτταρική διαφοροποίηση, ο κυτταρικός θάνατος και ο κυτταρικός κύκλος (McBride et al. 2006). Είναι ωοειδή οργανίδια που έχουν συνήθως μήκος 2μm και διάμετρο 0,5μm, δηλαδή έχουν διαστάσεις βακτηρίου. Συγκεκριμένα, σύμφωνα με τη θεωρία της ενδοσυμβίωσης (Andersson et al. 2003), τα μιτοχόνδρια προήλθαν από την εισχώρηση ενός

βακτηρίου σε ένα πρωτόγονο ευκαρυωτικό (εμπύρηνο) κύτταρο (Εικόνα 4).

Με μελέτες ηλεκτρονικής μικροσκοπίας αποκαλύφθηκε ότι τα μιτοχόνδρια έχουν δύο συστήματα μεμβρανών οι οποίες αποτελούνται από συμπλέγματα πρωτεϊνών και φωσφολιπιδίων (Alberts et al. 1994): μια εξωτερική μεμβράνη και μια μεγάλων διαστάσεων πτυχωτή εσωτερική μεμβράνη φτιαγμένη έτσι ώστε να παρέχει μεγαλύτερη επιφάνεια για τη σύνθεση του ATP. Οι πτυχώσεις της εσωτερικής μεμβράνης ονομάζονται ακρολοφίες (cristae).



Εικόνα 5: Διάγραμμα ενός μιτοχονδρίου (Wolfe 1981, 2^η έκδοση)

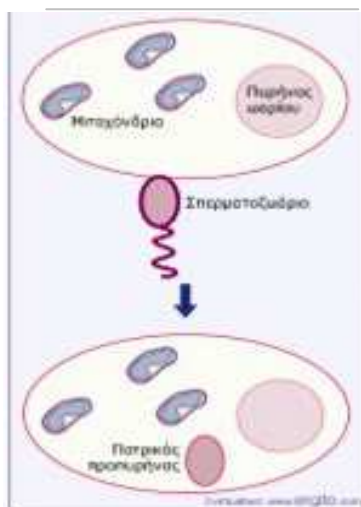
Έτσι δημιουργούνται δύο διαμερίσματα στο μιτοχόνδριο: (1) ο διαμεμβρανικός χώρος μεταξύ της εσωτερικής και της εξωτερικής μεμβράνης και (2) ο χώρος που περιβάλλεται από την εσωτερική μεμβράνη και ονομάζεται μήτρα (matrix). Η οξειδωτική φωσφορυλίωση λαμβάνει χώρα μέσα στην εσωτερική μεμβράνη (Lewin et al. 2003, Ακαδημαϊκές εκδόσεις) (Εικόνα 5). Η εξωτερική μεμβράνη του μιτοχονδρίου είναι διαπερατή από όλα τα μικρά μόρια και ιόντα διότι περιέχει πολλά μόρια μιτοχονδριακής πορίνης, μιας πρωτεΐνης μοριακού βάρους 30-35kD που σχηματίζει πόρους. Αυτή η πρωτεΐνη παίζει ρόλο στη ρυθμιζόμενη ροή των μεταβολιτών – συνήθως ανιόντων όπως φωσφορικού, χλωρίου αλλά και οργανικών ανιόντων και νουκλεοτιδίων αδενίνης – μέσω της εξωτερικής μεμβράνης. Αντίθετα, η εσωτερική μεμβράνη είναι από τη φύση της αδιαπέραστη σε όλα τα ιόντα και τα πολικά μόρια. Για τις απαραίτητες μεταφορές ουσιών, υπάρχει μια μεγάλη οικογένεια μεταφορέων η οποία προάγει τη μετατόπιση μορίων όπως ATP, πυροσταφυλικό και κιτρικό οξύ μέσα από την εσωτερική μεμβράνη του μιτοχονδρίου (Chiruk 2006).

1.3.1. Το μιτοχονδριακό DNA (mtDNA)

Το γονιδίωμα των μιτοχονδρίων (mtDNA) έχει μέγεθος το οποίο γενικά κυμαίνεται σε εύρος που ξεπερνά μια τάξη μεγέθους. Τα ζωικά κύτταρα έχουν σχετικά μικρά μιτοχονδριακά γονιδιώματα, περίπου 16kb για τα θηλαστικά. Υπάρχουν αρκετές εκατοντάδες μιτοχόνδρια ανά κύτταρο και κάθε μιτοχόνδριο διαθέτει πολλαπλά αντίγραφα mtDNA (2-10 αντίγραφα). Ωστόσο η συνολική ποσότητα του μιτοχονδριακού σε σχέση με το πυρηνικό DNA είναι μικρή, λιγότερο όπως υπολογίζεται από 1%. Στα κύτταρα των υπάρχοντων οργανισμών, η συντριπτική πλειοψηφία των μιτοχονδριακών πρωτεϊνών (περίπου 1500 διαφορετικοί τύποι στα θηλαστικά) κωδικοποιούνται από το πυρηνικό DNA, όμως τα γονίδια πολλών από αυτές θεωρείται πως αρχικά ήταν βακτηριακά. Γενικότερα έχει δειχθεί πως το μιτοχονδριακό DNA έχει διαφορετική εξελικτική προέλευση από το πυρηνικό DNA, αφού όπως έχει ήδη αναφερθεί, η θεωρία της ενδοσυμβίωσης υποστηρίζει τη βακτηριακή προέλευση του μιτοχονδρίου. Έτσι, το μιτοχονδριακό DNA προέρχεται από τα κυκλικά γονιδιώματα των βακτηρίων που εισχώρησαν και συγχωνεύτηκαν με τα πρωτόγονα ευκαρυωτικά κύτταρα (Gould et al. 2008).

Στους ανθρώπους (και πιθανότατα στα μετάρζωα γενικά), σε κάθε κύτταρο υπάρχουν περίπου 100-10.000 αντίγραφα mtDNA (εξαιρούνται τα ωοκύτταρα και τα

σπερματοκύτταρα). Στα θηλαστικά, κάθε δίκλωνο κυκλικό μόριο mtDNA αποτελείται από περίπου 15.000-17.000 bp. Οι δύο κλώνοι του mtDNA διαφοροποιούνται μεταξύ τους από το νουκλεοτιδικό τους περιεχόμενο. Ο πλούσιος σε γουανίνη κλώνος ονομάζεται βαριά αλυσίδα ενώ ο πλούσιος σε κυτοσίνη αποτελεί την ελαφριά αλυσίδα. Η βαριά αλυσίδα κωδικοποιεί 28 γονίδια και η ελαφριά 9 γονίδια. Από αυτό το σύνολο των 37 γονιδίων, τα 13 κωδικοποιούν για πρωτεΐνες-ένζυμα της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης, τα 22 για μεταφορικό RNA (tRNA) και τα 2 κωδικοποιούν για τη μεγάλη και τη μικρή υπομονάδα του ριβοσωμικού RNA (rRNA). Αυτό το πρότυπο ισχύει για όλα σχεδόν τα μετάζωα, αν και σε κάποιες περιπτώσεις κάποιο ή κάποια από αυτά τα 37 γονίδια μπορεί να μην είναι παρόντα, όπως επίσης και το μέγεθος του mtDNA μπορεί να ποικίλει σημαντικά (Chan et al. 2006).



Εικόνα 6: μητρικός τρόπος κληρονόμησης του mtDNA (Watson et al. 2007, εκδόσεις I. Μπάσδρα)

Χαρακτηριστικό του μιτοχondριακού DNA είναι ο μητρικός του τρόπος κληρονόμησης. Στους περισσότερους πολυκύτταρους οργανισμούς, το mtDNA κληρονομείται μόνο από τα θηλυκά άτομα στους απογόνους τους, ανεξάρτητα από το φύλο αυτών. Το DNA του σπερματοζωαρίου εισέρχεται από το σπερματοζωάριο στο ωοκύτταρο, όπου σχηματίζει τον αρσενικό προπυρήνα. Κατά την είσοδό του όμως, το σπερματοζωάριο δε συνεισφέρει μιτοχondριακό DNA στο ζυγωτό αλλά αυτό παρέχεται αποκλειστικά από το κυτταρόπλασμα του γονιμοποιημένου ωοκυττάρου (Kimbal et al. 2006) (Εικόνα 6). Οι μηχανισμοί με τους οποίους γίνεται αυτό περιλαμβάνουν την απλή διάχυση (ένα ωοκύτταρο περιέχει 100.000 με 1.000.000 μόρια mtDNA ενώ ένα σπερματοκύτταρο περιέχει μόνο 100 με 1000 μόρια), αποικοδόμηση του mtDNA του σπερματοκυττάρου στο γονιμοποιημένο ωοκύτταρο και - σε ορισμένους οργανισμούς - αποτυχία του mtDNA του σπερματοκυττάρου να εισχωρήσει στο ωοκύτταρο.

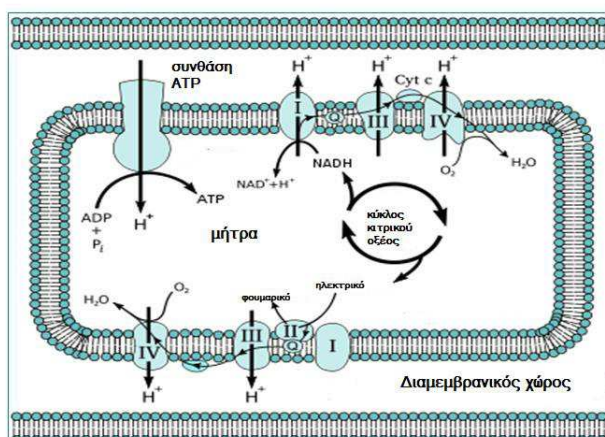
Όποιος και αν είναι για την κάθε περίπτωση οργανισμού ο μηχανισμός, αυτό το πρότυπο κληρονόμησης του μιτοχondριακού DNA από τον ένα μόνο γονιό συναντάται στα περισσότερα ζώα, φυτά και μύκητες (Lewin et al. 2003, Ακαδημαϊκές εκδόσεις).

Μια ακόμη απόρροια της βακτηριακής προέλευσης του μιτοχondρίου είναι ότι τα γονιδιώματα των οργανιδίων αντιγράφονται και κληρονομούνται με διαφορετικό τρόπο απ' ότι τα γονίδια του πυρήνα. Το μικρό μέγεθος του mtDNA και ο εξαιρετικά υψηλός ρυθμός αντικαταστάσεων των βάσεων του έχουν εγείρει μεγάλο ενδιαφέρον σχετικά με την εξέλιξή του. Ο μέσος ρυθμός συνώνυμων αντικαταστάσεων στα μιτοχondριακά γονίδια των θηλαστικών είναι πολύ μεγαλύτερος από το μέσο ρυθμό συνώνυμων μεταλλάξεων των γονιδίων του πυρήνα. Ο ρυθμός μη συνώνυμων αντικαταστάσεων ποικίλλει σημαντικά μεταξύ των γονιδίων του μιτοχondρίου αλλά σε κάθε περίπτωση είναι επίσης σημαντικά υψηλότερος από το μέσο ρυθμό συνώνυμων αντικαταστάσεων που παρατηρείται στα πυρηνικά γονίδια. Το γεγονός αυτό είναι πιθανό να σχετίζεται με την χαμηλότερη αξιοπιστία του μηχανισμού αντιγραφής του DNA και επομένως με υψηλότερο ρυθμό εισαγωγής σφαλμάτων κατά την αντιγραφή. Το μιτοχondριακό DNA είναι ιδιαίτερα επιρρεπές σε ενεργές μορφές οξυγόνου που προκύπτουν από την αναπνευστική αλυσίδα. Είναι μεν 'συσκευασμένο' με πρωτεΐνες και διαθέτει σημαντική ικανότητα επιδιόρθωσης όμως

αυτές οι λειτουργίες είναι λιγότερο αποτελεσματικές από αυτές του πυρηνικού DNA και έτσι το mtDNA μπορεί εύκολα να υποστεί οξειδωτική καταστροφή με αποτέλεσμα να εμφανίζει υψηλά ποσοστά συσσώρευσης μεταλλάξεων (Richter et al. 1988). Μεταλλάξεις στο mtDNA μπορούν σε ορισμένες περιπτώσεις να προκαλέσουν μητρικά κληρονομούμενα νοσήματα και υπάρχουν επίσης ισχυρές ενδείξεις ότι μπορούν να αποτελέσουν σημαντικούς συντελεστές στη διαδικασία γήρανσης του κυττάρου και σε άλλες παθολογικές καταστάσεις (Ozawa et al. 1995).

Παράλληλα, η σχεδόν πλήρης απουσία του γενετικού ανασυνδυασμού στο μιτοχondριακό γονιδίωμα το καθιστά μια χρήσιμη πηγή γενετικής πληροφορίας για επιστημονικές έρευνες πληθυσμιακής γενετικής και εξελικτικής βιολογίας (Awadalla et al. 1999). Επειδή όλο το μιτοχondριακό DNA κληρονομείται σαν μία μονάδα, ή απλότυπος, οι σχέσεις μεταξύ του μιτοχondριακού DNA από διαφορετικά άτομα μπορεί να παρουσιαστεί με τη μορφή δενδρογράμματος. Παρ'όλα αυτά το μιτοχondριακό DNA αντανακλά μόνο την ιστορία των θηλυκών ατόμων του πληθυσμού και έτσι μπορεί να μην αντιπροσωπεύει την εξελικτική ιστορία όλου του πληθυσμού. Για το λόγο αυτό ακολουθούνται συνήθως από μελέτες του πυρηνικού DNA ή χρησιμοποιείται η περιοχή του χρωμοσώματος Y η οποία χαρακτηρίζεται από πατρική κληρονομία (Garrigan et al. 2006).

1.4. Οξειδωτική φωσφορλίωση



Εικόνα 7 : Η διαδικασία της παραγωγής ενέργειας στο εσωτερικό του μιτοχondρίου ([://flaggedrevs.labs.wikimedia.org/wiki/Oxidative_phosphorylation](http://flaggedrevs.labs.wikimedia.org/wiki/Oxidative_phosphorylation))

Πιο συγκεκριμένα, τα δύο υπο μελέτη γονίδια της παρούσας εργασίας κωδικοποιούν για πρωτεΐνες οι οποίες συμμετέχουν στο μονοπάτι της οξειδωτικής φωσφορλίωσης (Εικόνα 7). Η οξειδωτική φωσφορλίωση είναι μια συγκεκριμένη βιοχημική διαδικασία η οποία πραγματοποιείται μέσα στα μιτοχondρία των οργανισμών. Πρόκειται για μια χημική αντίδραση των αερόβιων οργανισμών που γίνεται στο σύστημα μεταφοράς ηλεκτρονίων (ETS) κατά την αεροβική αναπνοή. Κατά τη διάρκειά της

σχηματίζονται μόρια ATP (αδενοσινωτριφωσφορικό οξύ) από ADP (αδενοσινωδιφωσφορικό οξύ) και ανόργανα φωσφορικά όπως ορθοφωσφορικό οξύ, χάρη της ενέργειας που απελευθερώνεται κατά την οξείδωση των τροφών. Η διαδικασία αυτή αποτελεί τον κυριότερο τρόπο με τον οποίο οι αερόβιοι οργανισμοί λαμβάνουν την ενέργειά τους από τις τροφές (Mitchell et al. 1967).

1.4.1. ATP και ADP

Η τριφωσφορική αδενοσίνη ή αδενοσινωτριφωσφορικό οξύ (ATP), είναι το μόριο που αποτελείται από αδερίνη και το σάκχαρο ριβόζη, η ένωση των οποίων δημιουργεί την αδενοσίνη, στο οποίο έχουν συνδεθεί τρεις φωσφορικές ομάδες (φωσφορυλομάδες) PO_3^{-2} , που ενώνονται με δεσμούς υψηλής ενέργειας. Αντίστοιχα,

η διφωσφορική αδενοσίνη ή αδενοσινοδιφωσφορικό οξύ (ADP) είναι το μόριο που αποτελείται από μια ομάδα αδενοσίνης στην οποία είναι συνδεδεμένες δύο φωσφορικές ομάδες που ενώνονται με δεσμό υψηλής ενέργειας (Knowles et al. 1980).

Η υδρόλυση των ειδικών δεσμών της ATP έχει ως αποτέλεσμα την απελευθέρωση ενέργειας. Τα μόρια της ATP δημιουργούνται με δύο κύριες χημικές αντιδράσεις, που και οι δύο συνεπάγονται την προσθήκη ανόργανων φωσφορικών αλάτων στην ADP μέσω δεσμών υψηλής ενέργειας. Τα μόρια ATP που δημιουργούνται κατά τη διαδικασία της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης ενεργούν ως βραχυπρόθεσμες "βιολογικές μπαταρίες" οι οποίες διατηρούν την ενέργεια μέχρι να απαιτηθεί αυτή σε διάφορες βιολογικές διεργασίες όπως η ενεργή μεταφορά, η σύνθεση νέων υλικών, η μετάδοση νευρικών παλμών και η συστολή των μυών (Campbell et al. 2006).

1.5. Σύνθεση ATP και σύνθεση της ATP

Η σύνθεση της ATP πραγματοποιείται από ένα πρωτεϊνικό σύμπλοκο στην εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη. Αυτό το σύμπλοκο αρχικά ονομάστηκε μιτοχονδριακή ATPάση ή F_1F_0 -ATPάση διότι ανακαλύφθηκε ότι καταλύει την αντίστροφη αντίδραση, δηλαδή την υδρόλυση της ATP. Ανήκει σε μια μεγάλη κατηγορία ενζύμων, τις τριφωσφατάσες αδενοσίνης οι οποίες σαν ρόλο έχουν την κατάλυση της αποικοδόμησης της τριφωσφορικής αδενοσίνης (ATP) σε διφωσφορική αδενοσίνη (ADP) και ελεύθερο φωσφορικό ιόν. Αυτή η αντίδραση αποφωσφορυλίωσης απελευθερώνει ενέργεια, την οποία το ένζυμο – στις περισσότερες περιπτώσεις - χρησιμοποιεί για δευτερεύουσες αντιδράσεις. Πρόκειται για μια διαδικασία η οποία συναντάται ευρέως σε όλες τις γνωστές μορφές ζωής. Οι F_1 -ATPάσες είναι η κατηγορία αυτών των ενζύμων οι οποία συναντάται στα μιτοχόνδρια, τους χλωροπλάστες και στις πλασματικές μεμβράνες βακτηρίων και είναι τα ένζυμα-βασικοί παραγωγοί ATP, χρησιμοποιώντας τη διαβάθμιση συγκέντρωσης πρωτονίων η οποία δημιουργείται από τη διαδικασία της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης (μιτοχόνδρια) ή της φωτοσύνθεσης (χλωροπλάστες) (Stryer et al. 2005, Πανεπιστημιακές εκδόσεις Κρήτης).

Η ονομασία συνθάση της ATP χρησιμοποιείται περισσότερο για το ένζυμο αυτό καθώς ανταποκρίνεται στον πραγματικό του ρόλο στο μιτοχόνδριο και ονομάζεται επίσης και σύμπλοκο V (McCarty et al. 1992). Η βασική λειτουργία του ενζύμου στα μιτοχόνδρια και στους χλωροπλάστες φαίνεται να είναι η σύνθεση του ATP και όχι η υδρόλυσή του για να δημιουργήσουν διαβάθμιση πρωτονίων. Η μεταφορά ηλεκτρονίων και η σύνθεση της ATP είναι συζευγμένες με μια βαθμίδωση συγκέντρωσης πρωτονίων μεταξύ των δύο πλευρών της εσωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης. Η μεταφορά ηλεκτρονίων μέσω της αναπνευστικής αλυσίδας οδηγεί σε άντληση πρωτονίων από τη μήτρα προς την άλλη πλευρά της εσωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης. Η συγκέντρωση H^+ γίνεται μικρότερη στη μήτρα και έτσι δημιουργείται μια διαφορά ηλεκτρικού δυναμικού μεταξύ των δύο πλευρών της εσωτερικής μεμβράνης, αρνητική προς την πλευρά της μήτρας και θετική προς την πλευρά του διαμεμβρανικού χώρου. Αυτή η πρωτονιοκίνητη δύναμη οδηγεί στη σύνθεση της ATP από το σύμπλοκο συνθάσης της ATP (Doering et al. 1995).

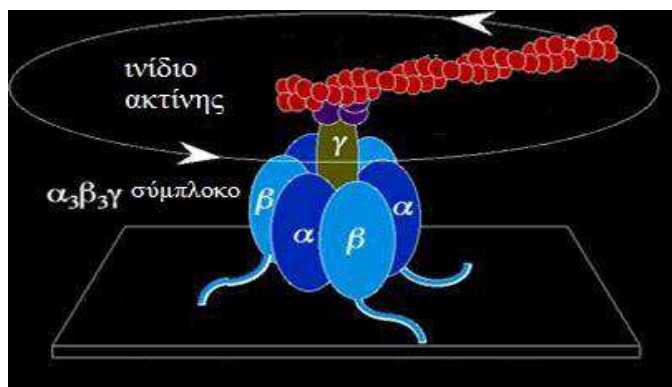
1.5.1. Δομή της συνθάσης ATP

Η συνθάση ATP είναι ένα μεγάλο ενζυμικό σύμπλοκο βυθισμένο στην εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη το οποίο μοιάζει με σφαίρα επάνω σε ράβδο. Η σφαίρα αυτή, είναι γνωστή σαν F1 υπομονάδα και με τη σειρά της χωρίζεται σε 5 υπομονάδες (α , β , δ , ϵ και γ). Προβάλλει στη μήτρα των μιτοχονδρίων και παρουσιάζει την καταλυτική δραστηριότητα της συνθάσης. Η F1 υπομονάδα περιλαμβάνει τρεις υπομονάδες α , τρεις υπομονάδες β και μία υπομονάδα από τις υπόλοιπες (δ , ϵ , γ), δηλαδή είναι της μορφής [$\alpha_3\beta_3\gamma\delta\epsilon$] (Stock 2000). Οι υπομονάδες α και β που αποτελούν το μεγαλύτερο μέρος της F1 είναι χωροθετημένες εναλλάξ ως ένας εξαμερής δακτύλιος. Οι αλυσίδες είναι μεταξύ τους ομόλογες και μπορούν και οι δύο να συνδέουν νουκλεοτίδια αλλά μόνο οι υπομονάδες β συμμετέχουν άμεσα στην καταλυτική αντίδραση (Laurent et al. 2003).

Ο κεντρικός μίσχος της δομής αποτελείται από δύο πρωτεΐνες, τις γ και ϵ . Η υπομονάδα α περιέχει ένα μακρύ α -ελικωμένο σπείραμα το οποίο προεκτείνεται μέσα στο κέντρο του εξαμερούς $\alpha_3\beta_3$. Η υπομονάδα γ αναιρεί τη συμμετρία του διότι κάθε μία από τις υπομονάδες β είναι διάκριτη γιατί αλληλεπιδρά με διαφορετική πλευρά της υπομονάδας γ . Η διάκριση αυτή μεταξύ των τριών υπομονάδων β είναι κρίσιμη για το μηχανισμό σύνθεσης της ATP (Stryer et al. 2005, Πανεπιστημιακές εκδόσεις Κρήτης).

Η υπομονάδα F0 της ATP συνθάσης είναι ένα υδρόφοβο τμήμα που διασχίζει την εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη και αποτελείται από τρεις τουλάχιστον υπομονάδες (A, B και C) – στα μιτοχόνδρια συνήθως έχει 9 υπομονάδες (A-G, F6 και F8). Υπάρχουν κάποιες ελάχιστες διαφορές ανάμεσα στις F-ATPάσες των βακτηρίων, των χλωροπλαστών και των μιτοχονδρίων. Γενικά, το σύμπλοκο F1 είναι υπεύθυνο για τη σύνθεση ή την υδρόλυση του ATP, ενώ το σύμπλοκο F0 παρέχει το διάυλο πρωτονίων του συμπλόκου για τη μετακίνηση των ιόντων H^+ μέσα από τη μεμβράνη. Ο διάυλος αυτός αποτελείται από ένα δακτύλιο ο οποίος έχει από 10 έως 14 υπομονάδες c που είναι βυθισμένες στη μεμβράνη. Μια μοναδική υπομονάδα a προσδένεται στο εξωτερικό αυτού του δακτυλίου και ο διάυλος εξαρτάται από το σύνολο αυτών των υπομονάδων (Knowles et al. 1980).

Οι υπομονάδες F0 και F1 συνδέονται με δύο τρόπους, αρχικά με τον κεντρικό μίσχο γ - ϵ και επιπλέον με μια εξωτερική στήλη. Η τελευταία αποτελείται από μια υπομονάδα a, δύο υπομονάδες b και μια υπομονάδα δ. Έτσι λοιπόν το ένζυμο έχει δύο λειτουργικές συνιστώσες: (1) μία κινούμενη μονάδα ή περιστροφέα (motor), που αποτελείται από το δακτύλιο c και το μίσχο γ - ϵ , και (2) μια στατική μονάδα (stator), η οποία αποτελείται από το υπόλοιπο του μορίου (Stryer et al. 2005, Πανεπιστημιακές εκδόσεις Κρήτης).

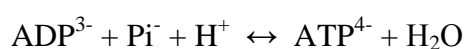


Εικόνα 8: Η δομή της ATP συνθάσης με απεικόνιση της περιστροφικής της κίνησης (Yoshida & Hisabori Lab)

Η κίνηση του συμπλόκου της συνθάσης (*Εικόνα 8*) ανιχνεύτηκε από το εργαστήριο των Yoshida & Hisabori εφαρμόζοντας ένα ινίδιο ακτίνης στη γ-υπομονάδα, το οποίο ήταν σημασμένο με φθορίζουσες ομάδες για να το καταστήσουν ορατό και καταγράφηκε σε μια βιντεοκάμερα που είχε σταθεροποιηθεί στο μικροσκόπιο. Η κίνηση ήταν ανιχνεύσιμη μόνο κατά τη διάρκεια της υδρόλυσης ATP και η κατεύθυνση ήταν αριστερόστροφη όπως φαίνεται από την πλευρά του συμπλόκου F₀, δίνοντας ένδειξη του καταλυτικού μηχανισμού (Hasler et al. 1998). Επίσης, μια εναλλακτική προσέγγιση με τη χρήση φωτομετρικών μεθόδων έχει χρησιμοποιηθεί από το εργαστήριο του W. Junge, όπου μικρά χρωμοφόρα εφαρμόστηκαν απευθείας στη υπομονάδα γ (Laurent et al. 2003).

1.5.2. Βιοχημική προσέγγιση της σύνθεσης της ATP

Η συνθάση της ATP καταλύει το σχηματισμό της ATP από την ADP και το ορθοφωσφορικό:



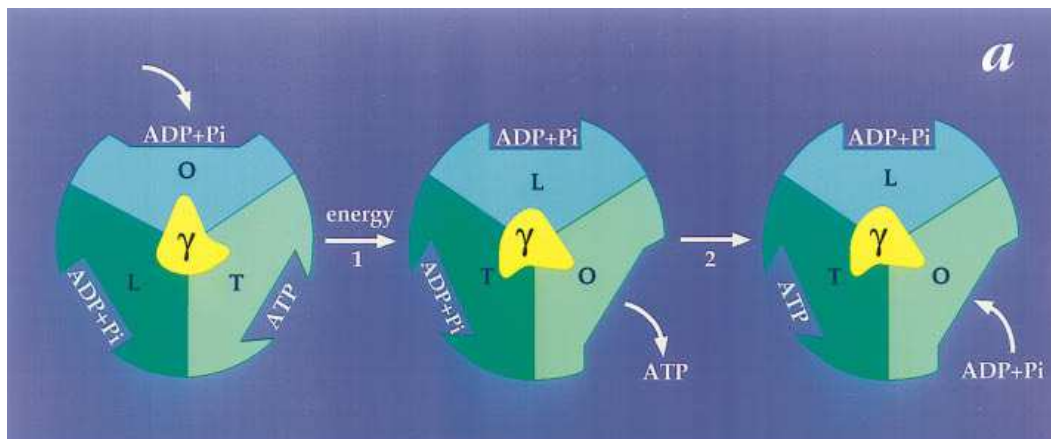
Μέσα από πειράματα ισοτοπικής ανταλλαγής ανακαλύφθηκε ότι συντίθεται ATP συνδεδεμένη στενά στο ένζυμο ακόμη και χωρίς την παρουσία πρωτονιοκίνητης δύναμης. Συγκεκριμένα, στην περίπτωση αυτή ίσες ποσότητες ATP και ADP βρίσκονται σε ισορροπία προσδεμένες στην καταλυτική περιοχή του ενζύμου. Επομένως ο ρόλος της βαθμίδωσης συγκέντρωσης πρωτονίων δεν είναι ουσιαστικά η παραγωγή ATP αλλά η απελευθέρωσή της από το ένζυμο (Stryer et al. 2005, Πανεπιστημιακές εκδόσεις Κρήτης).

Οι τρεις υπομονάδες β έχουν καταλυτική δράση ενώ οι τρεις υπομονάδες α είναι ρυθμιστικές. Υπάρχει μια θέση δέσμευσης υποστρώματος σε κάθε μια από τις υπομονάδες α και β, αλλά μόνο αυτές των υπομονάδων β είναι ενεργές θέσεις, ενώ αυτές των υπομονάδων α είναι ρυθμιστικές. Κατά τη διάρκεια της κατάλυσης από το σύμπλοκο F₁, κάποιες από τις υπομονάδες περιστρέφονται σχετικά με το υπόλοιπο σώμα του ενζύμου, κάνοντας την ATPάση τη μικρότερη φυσική περιστροφική μηχανή που έγινε ποτέ γνωστή. Συνολικά, η ATPάση περιέχει δύο περιστροφικούς μηχανισμούς, έναν στο σύμπλοκο F₁ (υπομονάδες γ και ε) ο οποίος κινείται με υδρόλυση του ATP και έναν στο σύμπλοκο F₀ (υπομονάδα C) ο οποίος κινείται από τη διαβάθμιση των H⁺. Οι δύο περιστροφικοί μηχανισμοί τείνουν να περιστρέφονται προς αντίθετες κατευθύνσεις, όμως συνήθως ο μηχανισμός του συμπλόκου F₀ είναι δυνατότερος, χρησιμοποιώντας τη δύναμη από τη διαβάθμιση H⁺ για να αντιστρέψει την κίνηση του μηχανισμού F₁ ώστε να συνθέσει ATP (Hiroyuki et al. 1997).

Στην *Εικόνα 9* παρουσιάζεται ο μηχανισμός πρόσδεσης-ανταλλαγής ο οποίος προτάθηκε από τον Paul Boyer (1979) και υποστηρίζει ότι η πρωτονιωθούμενη σύνθεση της ATP γίνεται μέσω του μηχανισμού αλλαγής της συγγένειας πρόσδεσης. Σύμφωνα με αυτόν τον μηχανισμό, οι αλλαγές στις ιδιότητες των τριών υπομονάδων β επιτρέπουν τη διαδοχική πρόσδεση των ADP και P_i, τη σύνθεση και την απελευθέρωση της ATP. Όπως αναφέρθηκε, οι τρεις υπομονάδες β είναι διαφορετικές. Η μία μπορεί να βρίσκεται στη στερεοδιάταξη T (tight, σφιχτή) η οποία προσδένει ATP με μεγάλη συγγένεια όμως η περιορισμένη της στερεοδιάταξη δεν της επιτρέπει να την απελευθερώσει (Sabbert et al. 1997). Μια δεύτερη υπομονάδα β βρίσκεται στη στερεοδιάταξη L (loose, χαλαρή) η οποία δεσμεύει ADP και P_i όμως είναι επίσης περιορισμένη ώστε να μην μπορεί να απελευθερώσει νουκλεοτίδια.

Η τελική υπομονάδα είναι στη στερεοδιάταξη O (open, ανοιχτή) στην οποία μπορεί να δεσμεύσει νουκλεοτίδια σε μορφή όμοια με των T και L αλλά και να τα

απελευθερώσει, μετατρέπόμενη σε μια πιο ανοιχτή μορφή. Η αλληλομετατροπή αυτών των τριών μορφών μπορεί να ωθηθεί από την περιστροφή της υπομονάδας γ . Όταν η περιστροφή γίνεται σε φορά αντίθετη εκείνης των δεικτών του ρολογιού οι στερεοδιατάξεις αλλάζουν μετατρέποντας τα ADP και Pi σε ATP (Gresser et al. 1982, Stock et al. 1999).



Εικόνα 9: Απεικόνιση της περιστροφής της γ υπομονάδας (κίτρινο) σχετικά με το δακτύλιο που σχηματίζουν οι α , β υπομονάδες (αποχρώσεις πράσινου-μπλε) η οποία επάγει μια αλλαγή στις συγγένειες πρόσδεσης των αντιδρώντων όπως φαίνεται μια αλλαγή στερεοδιάταξης της θέσης, κάτι που φαίνεται από αριστερά προς τα δεξιά στο διάγραμμα. Στο δεύτερο βήμα η ATP σχηματίζεται αυθόρμητα από τα ισχυρά δεσμευμένα ADP και Pi. Ο μηχανισμός είχε προταθεί πριν γίνει γνωστή η δομή, έτσι η δομή αποτελεί μια επιβεβαίωση της αρχικής υπόθεσης για το μοντέλο. (Duncan et al. 1997)

1.5.3. Υδρόλυση ATP

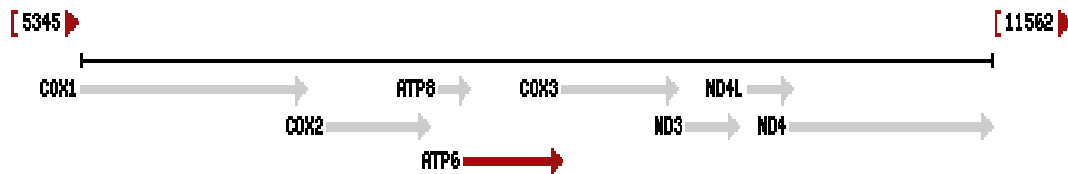
Όπως αναφέρθηκε, η ATP συνθάση μπορεί είτε να παράγει ATP χρησιμοποιώντας την ενέργεια από τη διαβάθμιση πρωτονίων, είτε μπορεί να δράσει αντίστροφα για να δημιουργήσει μια διαβάθμιση από την υδρόλυση του ATP. Η αντίδραση που καταλύεται από την F-ATPάση είναι πλήρως αντιστρεπτή, έτσι που το ATP μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να δημιουργήσει εκ νέου μια διαβάθμιση H^+ , με αντιστροφή της ροής των ιόντων. Σε αυτή την περίπτωση, ο περιστροφικός μηχανισμός της υπομονάδας F1 περιστρέφεται με φορά ίδια με αυτή των δεικτών του ρολογιού για να υδρολυθεί η ATP και να δημιουργηθεί μια διαβάθμιση H^+ . Αυτή η δημιουργία διαβάθμισης συγκέντρωσης των H^+ μπορεί έπειτα να χρησιμοποιηθεί για να διατηρηθεί η ιοντική ισορροπία ή για ενεργό μεταφορά (Stryer et al. 2005, Πανεπιστημιακές εκδόσεις Κρήτης).

1.5.4. Το γονίδιο της συνθάσης ATP στο είδος *Lepus europaeus*

Όπως ήδη αναφέρθηκε, το γονίδιο που κωδικοποιεί για τη μιτοχονδριακή συνθάση ATP εδράζεται στο μιτοχονδριακό γονιδίωμα και πιο συγκεκριμένα στη θέση 7949-8629. Στις *Εικόνες 10* και *11* παρουσιάζεται η σχετική του θέση στο είδος *Lepus europaeus*. Το γονίδιο αυτό συμβολίζεται ATP6 και αποτελεί το ένα από τα δύο υπο μελέτη γονίδια της παρούσας εργασίας.



Εικόνα 10: ATP6, υπομονάδα 6 της συνθάσης ATP F0 στο είδος *L. europaeus* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/805155>)



Εικόνα 11: η σχετική θέση της υπομονάδας ATP6 στο μιτοχονδριακό γονιδίωμα (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/805155>)

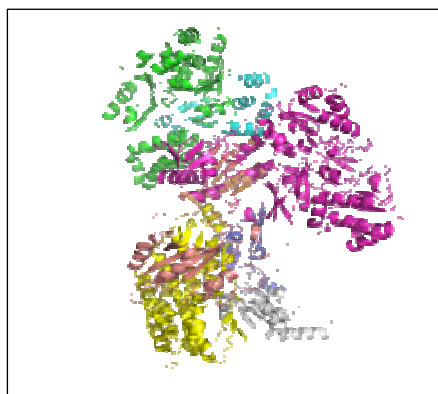
1.6. Οξειδοαναγωγή του ζεύγους NADH-Q

Στην αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων που περιγράφηκε παραπάνω, υπάρχουν 3 συνολικά ένζυμα, τα οποία μετατρέπουν ενέργεια: η οξειδοαναγωγή του ζεύγους NADH-Q (σύμπλοκο I), το σύμπλοκο συνένζυμο Q – αναγωγή του κυτοχρώματος c (σύμπλοκο III) και η οξειδάση του κυτοχρώματος c (σύμπλοκο IV). Η οξειδοαναγωγή του ζεύγους NADH-Q όπως υποδηλώνει το πλήρες όνομά της, καταλύει τη μεταφορά ηλεκτρονίων από το NADH στο συνένζυμο Q (CoQ) ή αλλιώς ουβικινόνη, ξεκινώντας τη διαδικασία της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης (Hirst et al. 2005). Η οξειδοαναγωγή του ζεύγους NADH-Q ονομάζεται αλλιώς δεϋδρογονάση του NADH ή αφυδρογονάση του NADH και είναι το μεγαλύτερο και πιο πολύπλοκο ένζυμο της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων. Είναι περίπου 1000 kD και βρίσκεται στην εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη (Lenaz et al. 2006).

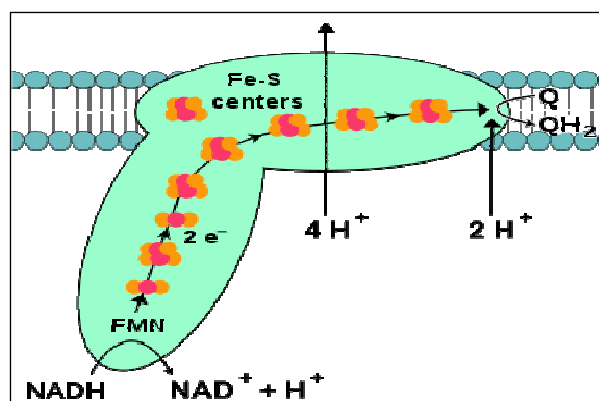
1.6.1. Δομή της οξειδοαναγωγής του ζεύγους NADH-Q

Η δομή του ενζύμου έχει σχήμα "L", με μια μακριά οριζόντια μεμβρανική περιοχή (με περίπου 60 διαμεμβρανικές έλικες) να βρίσκεται στο επίπεδο της μεμβράνης και μια περιφερική υδρόφιλη περιοχή κατακόρυφη να προβάλλει προς τη μήτρα και να περιλαμβάνει όλα τα γνωστά αναγωγικά κέντρα καθώς και το σημείο πρόσδεσης του NADH (Εικόνα 12). Παρ'όλο που η κατανόηση των λεπτομερειών του μηχανισμού λειτουργίας της πιθανώς χρειάζεται δομικές πληροφορίες μεγαλύτερης διακριτικής ικανότητας, μερικές όψεις του μηχανισμού έχουν ήδη καταδειχθεί (Stryer et al. 2005, Πανεπιστημιακές εκδόσεις Κρήτης).

Το ένζυμο αυτό περιέχει ένα μεγάλο αριθμό υπομονάδων, δεκατέσσερις από τις οποίες είναι καλά διατηρημένες ανάμεσα στα διάφορα είδη. Περιλαμβάνει ένα διαμεμβρανικό τμήμα (με 7 διατηρημένες υπομονάδες), το οποίο μεταφέρει ηλεκτρόνια στην ουβικινόνη και ένα κυτταροπλασματικό τμήμα (άλλες 7 υπομονάδες) το οποίο δέχεται ηλεκτρόνια από το NADH. Όλες οι αντιδράσεις οξειδοαναγωγής συμβαίνουν στο εξωμεμβρανικό τμήμα της NADH δεϋδρογονάσης (Εικόνα 13).



Εικόνα 12: Δομή της οξειδοαναγωγής του ζεύγους NADH-Q (http://flaggedrevs.labs.wikimedia.org/wiki/Oxidative_phosphorylation)



Εικόνα 13: Συνοπτική λειτουργία της οξειδοαναγωγής του ζεύγους NADH-Q (http://en.wikipedia.org/wiki/NADH_dehydrogenase)

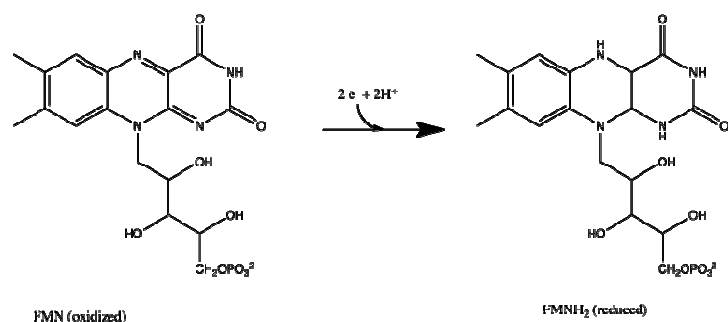
Γενικά στους διάφορους οργανισμούς το ένζυμο αυτό αποτελείται από τουλάχιστον 34 πολυπεπτιδικές αλυσίδες, συγκεκριμένα όμως στα θηλαστικά, το ένζυμο περιέχει 45 διαφορετικές πολυπεπτιδικές αλυσίδες. Από αυτές τις 45 υπομονάδες, οι 7 κωδικοποιούνται από το μιτοχονδριακό γονιδίωμα.

1.6.2. Λειτουργία της οξειδοαναγωγής του ζεύγους NADH-Q

Η οξειδοαναγωγή του ζεύγους NADH-Q είναι μια αντλία πρωτονίων, της οποίας η κατασκευή είναι συνέργεια γονιδίων που βρίσκονται τόσο στον πυρήνα όσο και στα μιτοχόνδρια, όπως ακριβώς συμβαίνει και με τις άλλες δύο αντλίες πρωτονίων της αναπνευστικής αλυσίδας. Η αντίδραση που καταλύει η οξειδοαναγωγή του ζεύγους NADH-Q είναι (Stryer et al. 2005, Πανεπιστημιακές εκδόσεις Κρήτης):

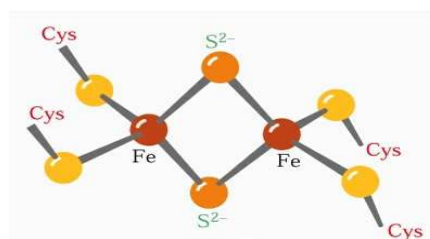


Το NADH αρχικά προσδένεται στο ένζυμο και μεταφέρει 2 ηλεκτρόνια υψηλού δυναμικού στην προσθετική ομάδα του συμπλέγματος I, το φλαβινομονονουκλεοτίδιο (FMN) μετατρέποντάς το στην ανηγμένη του μορφή, το FMNH₂ (Εικόνα 14). Όπως οι κινόνες, έτσι και οι φλαβίνες προσδέκουν ηλεκτρόνια όταν είναι ανηγμένες. Το FMN είναι σε θέση να δεχτεί ένα ηλεκτρόνιο αντί για δύο και αντίστροφα το FMNH₂ είναι σε θέση να δώσει ένα ηλεκτρόνιο με το σχηματισμό μιας ενδιάμεσης ρίζας ημικινόνης. Ο δέκτης ηλεκτρονίων του FMN, ο δακτύλιος ισοαλλοξαζίνης, είναι πανομοιότυπος με εκείνον του FAD. Τα ηλεκτρόνια στη συνέχεια μεταφέρονται από το FMNH₂, σε μια σειρά από σύμπλοκα σιδήρου-θείου τα οποία αποτελούν τη δεύτερη προσθετική ομάδα της οξειδοαναγωγής του ζεύγους NADH-Q (Azanov et al. 2006).



Εικόνα 14: Μετατροπή μορίου FMN σε FMNH₂ από την οξειδοαναγωγή του ζεύγους NADH-Q. (http://en.wikipedia.org/wiki/NADH_dehydrogenase)

Τα σύμπλοκα Fe-S στις πρωτεΐνες σιδήρου – θείου (πρωτεΐνες με μη αιμικό σίδηρο) παίζουν σπουδαίο ρόλο σε μια μεγάλη ομάδα αντιδράσεων αναγωγής στα βιολογικά συστήματα. Είναι γνωστοί πολλοί τύποι τέτοιων συμπλόκων. Στην απλούστερη μορφή τους, ένα μόνο άτομο σιδήρου δημιουργεί τετραεδρική συναρμογή με τις σουλφυδρυλικές ομάδες τεσσάρων καταλοίπων κυστεΐνης της πρωτεΐνης. Στην οξειδοαναγωγή του ζεύγους NADH-Q συναντάμε όμως δύο είδη συμπλόκων λίγο πιο πολύπλοκα, τα οποία συμβολίζονται [2Fe-2S] και [4Fe-4S] (Maxie et al. 2010). Τα σύμπλοκα [2Fe-2S] περιέχουν δύο άτομα σιδήρου και δύο

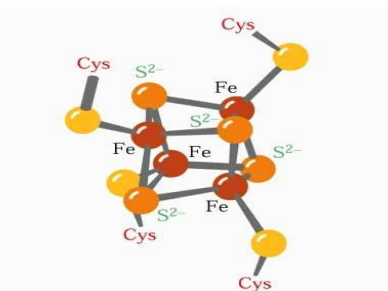


Εικόνα 15: Σύμπλεγμα σιδήρου-θείου [2Fe-2S]. (http://www.mun.ca/biochem/courses/3107/Topics/Folding_etc.html)

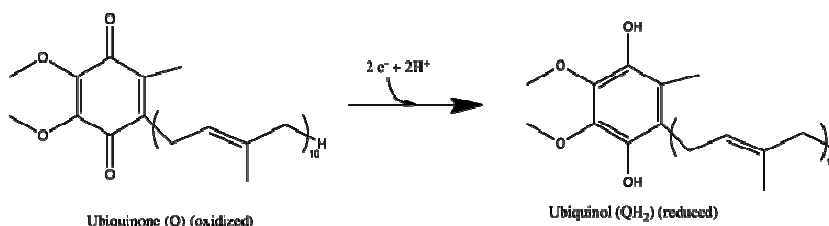
ανόργανα σουλφίδια (Εικόνα 15) ενώ τα [4Fe-4S] διαθέτουν τέσσερα άτομα σιδήρου και τέσσερα ανόργανα σουλφίδια (Εικόνα 16). Συνήθως και οι δύο αυτοί τύποι σχηματίζουν σύμπλοκα συναρμογής με τέσσερα κατάλοιπα κυστεΐνης όπως ο απλούστερος τύπος. Τα ιόντα σιδήρου σε αυτά τα σύμπλοκα Fe-S αλλάζουν το σθένος τους μεταξύ Fe^{+2} (ανηγμένα) και Fe^{+3} (οξειδωμένα). Σε αντίθεση με τις κινόνες και τις φλαβίνες, τα σύμπλοκα Fe-S γενικά υπόκεινται σε αντιδράσεις οξειδοαναγωγής χωρίς να απελευθερώνουν ή να προσδέουν πρωτόνια (Maxie et al. 2010, Stryer et al. 2005, Πανεπιστημιακές εκδόσεις Κρήτης).

Τα ηλεκτρόνια από τα σύμπλοκα σιδήρου-θείου του ενζύμου μεταφέρονται στην ανηγμένη μορφή του συνενζύμου Q η οποία ονομάζεται και ουβικινόνη. Η ουβικινόνη είναι μια υδρόφοβη κινόνη που διαχέεται γρήγορα στην εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη και πήρε το όνομά της διότι είναι μια πανταχού παρούσα (ubiquitous) κινόνη (quinone) στα βιολογικά υγρά. Αυτή η ροή ηλεκτρονίων από τα σύμπλοκα σιδήρου-θείου στην ουβικινόνη, προκαλεί την έξοδο 4 πρωτονίων (ιόντων υδρογόνου) από τη μιτοχονδριακή μήτρα. Οι λεπτομέρειες αυτής της διεργασίας αποτελούν αντικείμενο μεγάλης ερευνητικής προσπάθειας. Ωστόσο οι συζευγμένες αντιδράσεις μεταφοράς πρωτονίων και ηλεκτρονίων του συνενζύμου Q είναι κρίσιμες (Stryer et al. 2005, Πανεπιστημιακές εκδόσεις Κρήτης).

Το NADH προσδέεται σε μια θέση στον κατακόρυφο βραχίονα της οξειδοαναγωγής, μεταφέροντας τα ηλεκτρόνια του στο FMN. Τα ηλεκτρόνια αυτά ρέουν μέσα στον κατακόρυφο βραχίονα σε τρία κέντρα 4Fe-4S και μετά σε μια προσδεμένη Q. Με την πρόσληψη των 2 αυτών ηλεκτρονίων η ουβικινόνη (Q) ανάγεται σε ουβικινόλη (QH_2) (Εικόνα 17) και η αναγωγή αυτή οδηγεί σε άντληση δύο πρωτονίων από τη μιτοχονδριακή μήτρα. Το ζεύγος ηλεκτρονίων στην προσδεμένη QH_2 μεταφέρεται σε ένα κέντρο 4Fe-4S και τα πρωτόνια απελευθερώνονται προς το διαμεμβρανικό χώρο. Τελικά αυτά τα μόρια μεταφέρονται σε ένα κινητό μόριο ουβικινόνης στον υδρόφοβο πυρήνα της εσωτερικής μεμβράνης, με αποτέλεσμα την πρόσληψη δύο επιπλέον πρωτονίων από τη μήτρα (Hirst et al. 2005).



Εικόνα 16: Σύμπλεγμα σιδήρου-θείου [4Fe-4S] (http://www.mun.ca/biochem/courses/3107/Topics/Folding_etc.html)



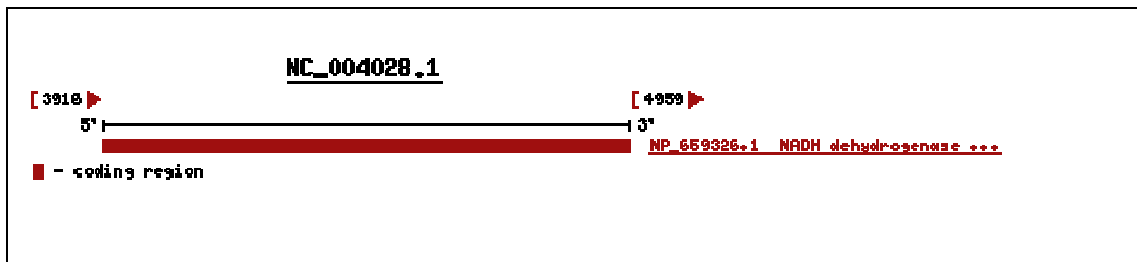
Εικόνα 17: Μετατροπή CoQ σε $CoQH_2$ (http://en.wikipedia.org/wiki/NADH_dehydrogenase)

Έτσι, με τη μετατόπιση τεσσάρων πρωτονίων για κάθε μόριο οξειδωμένου NADH, η διαδικασία αυτή συμβάλλει στη δημιουργία ηλεκτροχημικής διαβάθμισης η οποία στη συνέχεια θα χρησιμοποιηθεί στη δημιουργία ενέργειας (ATP). Πρόκληση αποτελεί ακόμη η αποσαφήνιση των αντιδράσεων πρόσδεσης καθώς και των αλλαγών στη στερεοδιάταξη που επάγονται από τις συγκεκριμένες μεταφορές ηλεκτρονίων, ώστε να κατανοήσουμε τους τρόπους με τους οποίους διευκολύνεται η πρόσληψη και απελευθέρωση πρωτονίων από τις συγκεκριμένες πλευρές της εσωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης. Σε μια πρόσφατη μελέτη των Roessler et al., χρησιμοποιήθηκαν φάσματα παραμαγνητικού συντονισμού ηλεκτρονίων (electron

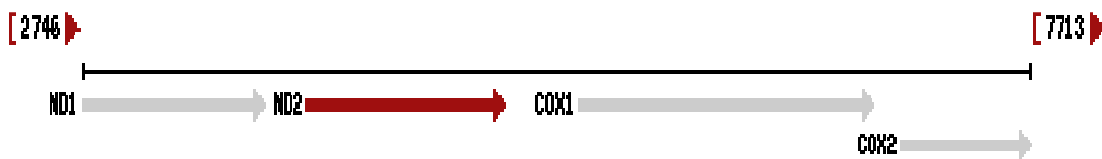
paramagnetic resonance, EPR) για να εξακριβωθεί η δομή της NADH δεϋδρογονάσης και το μονοπάτι μεταφοράς ηλεκτρονίων μέσα από τα συμπλέγματα σιδήρου-θείου, τα οποία βρίσκονται στην υδρόφιλη περιοχή του μορίου (Azanon et al. 2006).

1.6.3. Το γονίδιο της οξειδοαναγωγής του ζεύγους NADH-Q

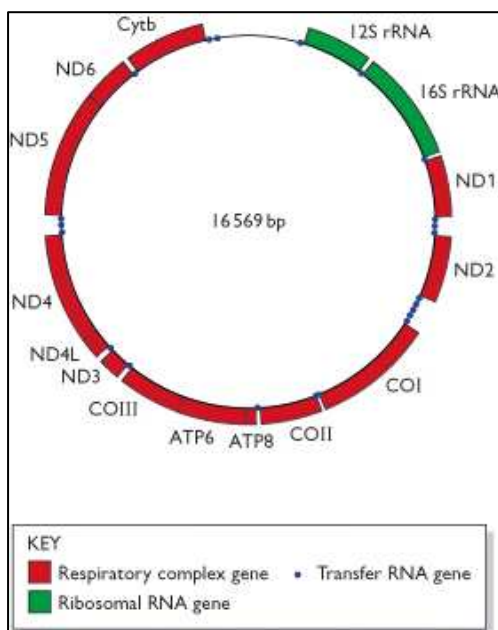
Το γονιδιακό τμήμα που κωδικοποιεί για την υπομονάδα 2 του μιτοχονδριακού ενζύμου οξειδοαναγωγής του ζεύγους NADH-Q, εδράζεται στο μιτοχονδριακό γονιδίωμα, στη θέση 3916-4959 και αποτελεί το δεύτερο γονίδιο το οποίο πραγματεύεται η συγκεκριμένη εργασία. Στις *Εικόνες 18 και 19* παρουσιάζεται η σχετική του θέση στο είδος *Lepus europaeus* και στην *Εικόνα 20* φαίνεται η σχετική θέση των δύο γονιδίων ATP6 και NADH2.



Εικόνα 18: Υπομονάδα 2 της NADH δεϋδρογονάσης στο είδος *L. europaeus* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/805149>)



Εικόνα 19: Σχετική θέση στο γονιδίωμα της υπομονάδας 2 της NADH δεϋδρογονάσης του *L. europaeus* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/805149>)



Εικόνα 20: Συνδυαστική παρουσίαση των σχετικών θέσεων των δύο γονιδιακών τμημάτων ATP6 και NADH2 στο μιτοχονδριακό γονιδίωμα. (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/805149>)

1.7. Μελέτες των πολυμορφισμών στα γονίδια ATP6 και NADH2 σε άλλους οργανισμούς

Μελέτες πολυμορφισμών του γονιδίου που κωδικοποιεί για την υπομονάδα 6 της μιτοχονδριακής ATP συνθάσης έχουν πραγματοποιηθεί σε πολλές ταξινομικές ομάδες, όπως για παράδειγμα σε πτηνά του είδους *Dendroica* για την ταξινόμηση των υπερ-ειδών *D.occidentalis*, *D.townsendi*, *D.virens* και *D.nigrescens* με εφαρμογή της μεθόδου RFLP (Lovette et al. 1999). Επίσης στο γένος *Drosophila* έχει δειχθεί ιδιαίτερα υψηλό ποσοστό μη συνώνυμων μεταλλάξεων στο ATP6 γονίδιο της *D.melanogaster* σε σχέση με τα στενά συγγενικά της είδη *D.simulans*, *D.mauritiana* και *D.yakuba* (Kaneko et al. 1993).

Παράλληλα, πολυμορφισμοί του γονιδίου NADH2 το οποίο κωδικοποιεί για την υπομονάδα 2 της οξειδοαναγωγής του ζεύγους NADH-Q, έχουν διερευνηθεί σε διαφορετικά είδη από σαλαμάνδρες (Weisrock et al. 2005), σε ταξινόμηση ειδών ακριδών (Litzenberger et al. 2001), σε πτηνά του γένους *Icterus* (Omland et al. 1999) αλλά και σε αιλουροειδή του γένους *Panthera* (Yu et al. 2005). Ακόμη, μια συγκριτική μελέτη ανάμεσα σε άνθρωπο και χιμπατζή βασίστηκε στον εντοπισμό πολυμορφισμών του NADH2 γονιδίου με σκοπό να διαπιστωθεί αν οι πολυμορφισμοί αυτοί ακολουθούν ένα ουδέτερο πρότυπο μοριακής εξέλιξης (Wise et al. 1998).

1.8. Πολυμορφισμοί στα μιτοχονδριακά γονίδια που σχετίζονται με την παραγωγή ATP (ATP6, NADH2) και το φαινόμενο μειωμένης γονιμότητας (the mother's curse)

Γενικά, το μιτοχονδριακό DNA χρησιμοποιείται στην πληθυσμιακή γενετική σαν κατ'επιλογή δείκτης για να εντοπιστούν γενετικά πρότυπα και ιστορικές διαδικασίες (Avisé et al. 1987, Zink et al. 2008). Πολλοί ερευνητές ωστόσο επεκτείνουν το λειτουργικό ρόλο του μιτοχονδριακού DNA, ψάχνοντας για μια πιο άμεση εφαρμογή των αποτελεσμάτων που δίνει στους τομείς της οικολογίας και της εξέλιξης (Ballard et al. 2004, Dowling et al. 2007). Και τα 13 γονίδια που κωδικοποιούν για πρωτεΐνες στα μιτοχόνδρια των θηλαστικών, αποτελούν σημαντικά συστατικά του μονοπατιού της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης. Έτσι, αλλαγές στην αμινοξική αλληλουχία οι οποίες επηρεάζουν την αποτελεσματικότητα αυτού του μονοπατιού, θα έχουν και μεγάλο εύρος επιπτώσεων στην προσαρμοστικότητα των οργανισμών (da Fonseca et al. 2008).

Η δύναμη της επιλογής θα απομακρύνει γρήγορα την πλειονότητα των επιβλαβών μεταλλάξεων, όμως στην περίπτωση που οι μεταλλάξεις αυτές επιφέρουν μόνο ελαφρά αρνητικές αλλαγές στην αποτελεσματικότητα της παραγωγής ενέργειας, οι τελευταίες μπορεί να παραμείνουν στον πληθυσμό. Τέτοιες ήπιες αλλαγές είναι πιθανό να επηρεάσουν τα αναπαραγωγικά κύτταρα των αρσενικών σε πολύ μεγαλύτερη έκταση απ' ό,τι θα επηρέαζαν σωματικά ή αναπαραγωγικά κύτταρα θηλυκών, λόγω των δυσανάλογων ενεργειακών τους απαιτήσεων (Cummins et al. 2008, Diez-Sanchez et al. 2003). Έτσι, μεταλλάξεις στο μιτοχονδριακό DNA που θα εμφάνιζαν σχετικά μικρές μειώσεις στην αποτελεσματικότητα του μονοπατιού της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης μπορούν να μειώσουν σημαντικά τη λειτουργία των σπερματοκυττάρων και κατά συνέπεια τη γονιμότητα των αρσενικών ατόμων, δεν έχουν όμως παρά ελάχιστη ή καμία επίδραση στη βιωσιμότητα των ωαρίων λόγω της πολύ μικρότερης ενεργειακής τους απαίτησης. Η γονιμότητα των θηλυκών ως εκ τούτου παραμένει ανεπηρέαστη.

Χάρη στον μητρικό τρόπο κληρονομής του μιτοχονδριακού DNA, ο μεταλλαγμένος απλότυπος μπορεί να διατηρηθεί στον πληθυσμό μέσα από τη θηλυκή

σειρά. Το φαινόμενο αυτό έχει ονομαστεί με τον όρο ‘the mother’s curse’ (Gemmell et al. 2004). Ενδείξεις για το φαινόμενο αυτό έχουν βρεθεί εκτός από το είδος του *Lepus europaeus* (Smith et al. 2010), σε έντομα (Dowling et al. 2007a), όρνιθες (Froman et al. 2005) αλλά και στον άνθρωπο (Holyoake et al. 2001, Ruiz-Pesini et al. 2004). Πέρα από αυτές τις ενδείξεις όμως, παραμένει το ερώτημα γιατί αυτό το τόσο πιθανό θεωρητικά φαινόμενο δεν έχει αναφερθεί πιο συχνά μέχρι σήμερα, δεδομένου μάλιστα των εμφανών του επιπτώσεων στη διατήρηση της ποικιλομορφίας της αρμοστικότητας των αρσενικών, στην εξέλιξη της πολυανδρίας και στη θεωρία του ανταγωνισμού των σπερματοκυττάρων. Έχει προταθεί πως ο μη εντοπισμός του μέχρι σήμερα μπορεί να οφείλεται είτε στην παράβλεψή του από τους επιστήμονες σαν πιθανή εξήγηση της μειωμένης αρμοστικότητας πληθυσμών, είτε στην ύπαρξη αντισταθμιστικών μηχανισμών οι οποίοι ‘καλύπτουν’ ένα τέτοιο, βασισμένο στο μιτοχονδριακό DNA φαινόμενο (Gemmell et al. 2004).

Η ετεροπλασμία του μιτοχονδριακού DNA μέσα στο ίδιο άτομο μπορεί επίσης να παίζει ρόλο στην ‘απόκρυψη’ του φαινομένου (Chinnery et al. 2000). Για να εμφανιστεί η επιβλαβής μετάλλαξη θα πρέπει πρώτα να φτάσει σε μια οριακή συχνότητα σχετικά με τις άλλες μορφές του μιτοχονδριακού DNA μέσα στο άτομο (Gemmell et al. 2004). Ένας άλλος πιθανός μηχανισμός εμπλέκει τη συμπροσαρμογή πυρηνικών γονιδίων τα οποία εμπλέκονται και αυτά στο μονοπάτι της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης. Έτσι ένα τέτοιο φαινόμενο μπορεί να καλυφθεί από αντίστοιχες, αντισταθμιστικές μεταλλάξεις στο πυρηνικό DNA η δράση των οποίων καλύπτει τη δράση των αρχικών μεταλλάξεων, δίνοντας έναν ψευδώς φυσιολογικό φαινότυπο (Chinnery et al. 2000). Στην περίπτωση αυτή, η ανάμιξη διαφορετικών πληθυσμών μεταξύ τους θα μπορούσε να διακόψει τέτοια συμπροσαρμοσμένα γονιδιακά σύμπλοκα και να αποκαλύψει την επίδραση του μιτοχονδριακού DNA στη γονιμότητα των αρσενικών ατόμων (Dowling et al. 2008).

1.9. Σκοπός της πτυχιακής εργασίας

Στην παρούσα πτυχιακή εργασία μελετήθηκαν δείγματα *Lepus europaeus* από διάφορες περιοχές της Ελλάδας, την Ευρώπη και την Ασία. Σκοπός της εργασίας ήταν η διερεύνηση και ο εντοπισμός πιθανών γενετικών πολυμορφισμών σε δύο τμήματα γονιδίων του μιτοχονδριακού DNA τα οποία κωδικοποιούν για δύο υπομονάδες μιτοχονδριακών ενζύμων του *Lepus europaeus*: την υπομονάδα 6 της ATP συνθάσης (γονίδιο ATP6) και την υπομονάδα 2 της οξειδοαναγωγής του ζεύγους NADH-Q (γονίδιο NADH2). Τα δύο αυτά ένζυμα επιτελούν σημαντικότερες λειτουργίες στο μονοπάτι της παραγωγής ενέργειας με τη μορφή ATP και μέσω αυτού μπορούν να εμπλέκονται στη γονιμότητα των αρσενικών ατόμων (Ruiz-Pesini et al. 1998, Holyoake et al. 1999).

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Συνοπτικά η πειραματική διαδικασία που ακολουθήθηκε αποτελείται από τα εξής στάδια:

- Ποιοτικός και ποσοτικός έλεγχος του DNA των δειγμάτων.
- Ενίσχυση επιλεγμένων περιοχών με κατάλληλα ζεύγη εκκινητών μέσω της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης και έλεγχος της απόδοσης της αντίδρασης σε πηκτική αгарόζης 2%.
- Ανάλυση πολυμορφισμού μονόκλωνης διαμόρφωσης (SSCP).
- Καθαρισμός των δειγμάτων που εμφάνισαν διαφορετικό πρότυπο στην πηκτική ακρυλαμίδης με ειδικό kit καθαρισμού της Invitrogen.
- Κυκλική αλληλούχιση για εντοπισμό των διαφορών των βάσεων ανάμεσα στα πρότυπα.
- Επεξεργασία των αποτελεσμάτων με υπολογιστικά προγράμματα βιοπληροφορικής και σύγκριση των αλληλουχιών.

2.1. Συλλογή δειγμάτων

Στη συγκεκριμένη εργασία μελετήθηκαν 106 δείγματα ήδη απομονωμένου DNA *Lepus europaeus* από διάφορες περιοχές της Ελλάδας (Β. Ελλάδα, κεντρική Ελλάδα, νησιά Αιγαίου), την Ευρώπη (Γαλλία, Γερμανία, Αυστρία) και την Ασία (Τουρκία, Β. Ισραήλ, Ν. Ισραήλ). Αρχικό υλικό για την απομόνωση αποτέλεσε τμήμα ήπατος των λαγών.

2.2. Εκτίμηση απόδοσης του πρωτοκόλλου απομόνωσης DNA

Τα δείγματα παραλήφθηκαν με τη μορφή ήδη απομονωμένου DNA. Πριν από οποιαδήποτε εφαρμογή τεχνικής προηγήθηκε η εκτίμηση της απόδοσης του πρωτοκόλλου απομόνωσης του DNA για να επιβεβαιωθεί ότι το γενετικό υλικό που θα χρησιμοποιηθεί στις αναλύσεις είναι ακέραιο.

2.2.1. Ποσοτικός προσδιορισμός

Ο ποσοτικός προσδιορισμός του DNA που απομονώθηκε έγινε με φωτομέτρηση. Χρησιμοποιήθηκε αραιώση 1μl DNA σε 49μl ddH₂O. Το διάλυμα ακολούθως μεταφέρθηκε σε κυψελίδα φωτομέτρησης. Ο λόγος της αραιώσης εισήχθη και στο φωτόμετρο, έτσι ώστε το μηχάνημα να αποδώσει απευθείας τη σωστή ένδειξη που αντιστοιχεί στην ποσότητα του DNA που περιέχεται. Η τεχνική γενικά βασίζεται στην απορρόφηση του DNA στα 260 nm, λόγω της ύπαρξης αρωματικών βάσεων. Επιπλέον, το φωτόμετρο έχει τη δυνατότητα να υπολογίζει και την τιμή του λόγου 260nm/280nm ο οποίος αποτελεί ένδειξη για την καθαρότητα του δείγματος από πρωτεΐνες, καθώς στα 280nm απορροφούν οι πρωτεΐνες και τα λιπιδιακά μόρια.

2.2.2. Ποιοτικός προσδιορισμός

Ο ποιοτικός προσδιορισμός του DNA πραγματοποιήθηκε με ηλεκτροφόρηση σε πηκτική αгарόζης 1%. Με τη διαδικασία αυτή μπορεί να επιβεβαιωθεί τόσο η ύπαρξη DNA στο δείγμα αλλά και η ακεραιότητά του. Τα μικρότερα μόρια μπορούν να περάσουν πιο εύκολα μέσα από την πηκτική και γι'αυτό όταν μεταναστεύουν

διανύουν μεγαλύτερη απόσταση στην πηκτή (Sambrook και Russel 2001). Εάν παρατηρηθούν πολλές ζώνες σημαίνει ότι το DNA έχει σπάσει σχηματίζοντας μικρότερα τμήματα.

Η πηκτή για τον ποιοτικό έλεγχο του DNA κατασκευάστηκε με διάλυση 0,3gr αγαρόζης σε 30ml TAE 1x, μέσα σε γυάλινη κωνική φιάλη. Η φιάλη τοποθετήθηκε σε φούρνο μικροκυμάτων (600W) για να ζεσταθεί και, αφού το περιεχόμενο έβρασε και σχημάτισε διαφανές διάλυμα, η κωνική αφέθηκε για λίγα λεπτά να κρυώσει και προστέθηκαν 2 μl βρωμιούχου αιθιδίου (10μg/ml). Το βρωμιούχο αιθίδιο (EtBr) είναι η πιο ευρέως χρησιμοποιούμενη χρωστική για την ανίχνευση DNA σε ηλεκτροφόρηση. Φθορίζει κόκκινο-πορτοκαλί κάτω από ακτινοβολία UV καθώς έχει την ικανότητα να ενσωματώνεται στο DNA. Το βρωμιούχο αιθίδιο είναι γνωστό μεταλλαξιγόνο γι' αυτό είναι διαθέσιμες και άλλες εναλλακτικές.

Στη συνέχεια, ακολούθησε ανάδευση του διαλύματος και τοποθέτησή του στο ειδικό καλούπι με τα χτενάκια ώστε να πάρει το επιθυμητό σχήμα κατά τη στερεοποίησή του. Τα χτενάκια χρησιμοποιούνται για το σχηματισμό των πηγαδιών της πηκτής, των θέσεων δηλαδή στις οποίες τοποθετούνται στη συνέχεια τα δείγματα. Για την προετοιμασία των δειγμάτων αναμείχθηκαν 3μl διαλύματος φόρτωσης (loading buffer) με 3 μl δείγματος και τοποθετήθηκαν στα πηγάδια της πηκτής αγαρόζης. Το διάλυμα φόρτωσης περιέχει 1 ml κυανό της βρωμοφαινόλης (1% τελική συγκέντρωση v/v), 5ml γλυκερόλη 99% (τελική συγκέντρωση 50% v/v), 0.5ml TBE 20x (τελική συγκέντρωση 1x) και ddH₂O έως τα 10ml. Το διάλυμα αυτό είναι ορατό σε φυσικό φως και μετακινείται καθώς μετακινείται και το DNA. Το κυανό της βρωμοφαινόλης είναι από τις πιο κοινά χρησιμοποιούμενες χρωστικές και κινείται με ταχύτητα ίδια με αυτή τμημάτων DNA που έχουν μέγεθος περίπου 300 ζεύγη βάσεων.

Στη συνέχεια η πηκτή τοποθετήθηκε στο μηχάνημα ηλεκτροφόρησης μαζί με ρυθμιστικό διάλυμα TAE 1x (Brody et al. 2004). Στη συνέχεια, η τάση της ηλεκτροφορητικής συσκευής ρυθμίστηκε περίπου στα 100Volts (180mA). και τα δείγματα ηλεκτροφορήθηκαν για περίπου 25 λεπτά, έως ότου η χρωστική να καλύψει σχεδόν τα 2/3 της απόστασης από το σημείο τοποθέτησης των δειγμάτων. Η πηκτή τοποθετήθηκε σε ειδική συσκευή υπεριώδους (UV) ακτινοβολίας όπου εμφανίστηκαν οι ζώνες του DNA. Το γενωμικό DNA της απομόνωσης αναμένεται να βρίσκεται μέσα ή λίγο πιο κάτω από τα πηγάδια της πηκτής (Patrinos et al. 2008, εκδόσεις Παρισιανού).

2.3. Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης - PCR

Στη μοριακή βιολογία, η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) είναι μια τεχνική ενίσχυσης ενός τμήματος DNA σε πολλές τάξεις μεγέθους, δημιουργώντας χιλιάδες ως εκατομμύρια αντίγραφα μιας συγκεκριμένης αλληλουχίας του DNA. Η PCR χρησιμοποιείται σε ιατρικά και βιολογικά ερευνητικά εργαστήρια για μια ποικιλία εφαρμογών. Αυτές οι εφαρμογές στην πλειονότητά τους περιλαμβάνουν την κλωνοποίηση του DNA για τον προσδιορισμό της αλληλουχίας, τη λειτουργική ανάλυση γονιδίων, τη διάγνωση των κληρονομικών ασθενειών, τον εντοπισμό γενετικών αποτυπωμάτων που χρησιμοποιούνται στην ιατροδικαστική, τους ελέγχους πατρότητας και τη διάγνωση διαφόρων λοιμωδών νόσων (Patrinos et al. 2008, εκδόσεις Παρισιανού).

2.3.1. Η μέθοδος της PCR

Η μέθοδος βασίζεται στη θερμική κυκλοποίηση, αποτελούμενη από κύκλους επαναλαμβανόμενης θέρμανσης και ψύξης της αντίδρασης για αποδιάταξη και ενζυμική αντιγραφή του DNA. Οι εκκινητές αποτελούνται από αλληλουχίες συμπληρωματικές ως προς ένα τμήμα της αλληλουχίας του στόχου και μαζί με μια DNA πολυμεράση είναι τα κύρια στοιχεία που επιτρέπουν την επιλεκτική ενίσχυση. Όπως εξελίσσεται η PCR, το παραγόμενο DNA χρησιμοποιείται εκ νέου ως πρότυπο για την αντιγραφή, θέτοντας σε κίνηση μια αλυσιδωτή αντίδραση με την οποία το πρότυπο DNA ενισχύεται εκθετικά (Saiki et al. 1988).

Σχεδόν όλες οι εφαρμογές PCR αφορούν μια θερμο-σταθερή DNA πολυμεράση, όπως είναι για παράδειγμα η Taq πολυμεράση, ένα ένζυμο που αρχικά απομονώθηκε από το θερμοφίλο βακτήριο *Thermus aquaticus* (Chien et al. 1976). Αυτή η πολυμεράση DNA συνθέτει ενζυμικά μια νέα έλικα του DNA από δομικά στοιχεία, τα νουκλεοτίδια. Χρησιμοποιεί μια μονόκλωνη έλικα DNA ως πρότυπο και εκκινητές DNA για την έναρξη της δράσης της. Η πλειοψηφία των μεθόδων PCR χρησιμοποιεί θερμική κυκλοποίηση απαραίτητη για την αποδιάταξη των δύο ελίκων του DNA σε υψηλή θερμοκρασία. Σε χαμηλότερη θερμοκρασία, κάθε έλικα χρησιμοποιείται ως εκμαγείο για τη σύνθεση του DNA από τη πολυμεράση DNA με αποτέλεσμα την επιλεκτική ενίσχυση του στόχου DNA. Η επιλεκτικότητα της PCR είναι το αποτέλεσμα της χρήσης εκκινητών που είναι συμπληρωματικοί προς την περιοχή του DNA που στοχεύεται για ενίσχυση υπό συγκεκριμένες συνθήκες θερμικής κυκλοποίησης (Patrinos et al. 2008, εκδόσεις Παρισιανού).

2.3.2 Υλικά της PCR

Για την πραγματοποίηση της τεχνικής PCR απαιτούνται τα παρακάτω αντιδραστήρια και εξοπλισμός (Sambrook και Russel 2001):

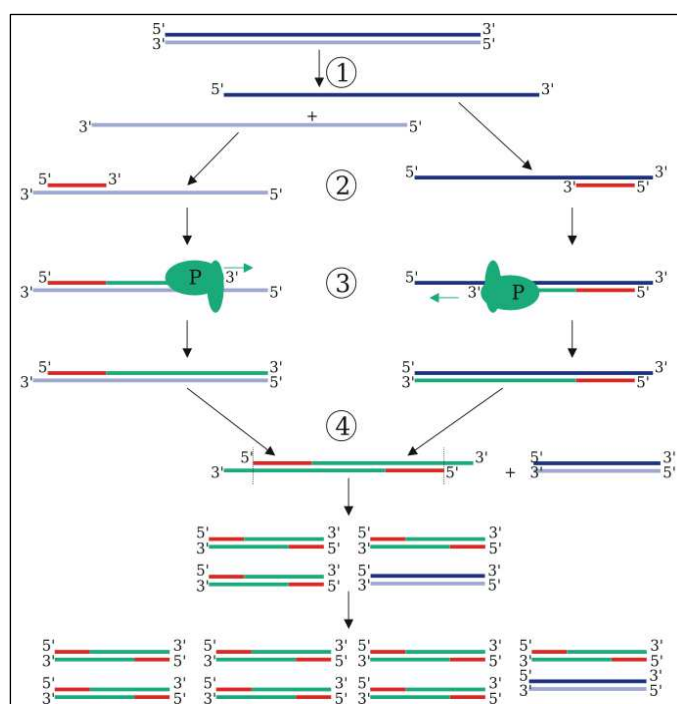
- Θερμικός κυκλοποιητής
- Δείγμα (DNA εκμαγείο που περιέχει την περιοχή-στόχο του DNA που επιθυμούμε να ενισχυθεί)
- Δύο εκκινητές (primers) που σχεδιάζονται έτσι ώστε να συνδέονται βάσει συμπληρωματικότητας στο 5' άκρο ενός τμήματος εκατέρωθεν του DNA στόχου αφήνοντας το 3' άκρο τους ελεύθερο για να δράσει η πολυμεράση. Οι εκκινητές έχουν συνήθως μήκος 18-22 βάσεις και η θερμοκρασία πρόσδεσης εξαρτάται από την περιεκτικότητά τους σε G-C, A-T. Συνήθως περιέχουν περίπου 45-55% GC και δεν θα πρέπει να εμφανίζουν συμπληρωματικότητα μεταξύ τους ή σχηματισμό εσωτερικών δευτεροταγών δομών (π.χ. θηλιές, βρόγχους).
- Πολυμεράση DNA. Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε η Taq πολυμεράση από την εταιρεία Invitrogen.
- Τριφωσφορικά δεοξυνουκλεοτίδια (dNTPs), δηλαδή τα δομικά στοιχεία τα οποία η πολυμεράση DNA θα συνδέσει μεταξύ τους για να συνθέσει μια νέα αλυσίδα DNA.
- Ρυθμιστικό διάλυμα, για να διατηρηθεί το pH σε επίπεδα βέλτιστα για τη δραστηριότητα της πολυμεράσης DNA.
- Δισθενή κατιόντα μαγνησίου (Mg^{++}), τα οποία λειτουργούν σαν συμπράγοντας της πολυμεράσης DNA. Αν η ποσότητα Mg^{++} δεν είναι αρκετή παρατηρείται μειωμένη παραγωγή προϊόντος, ενώ αντίθετα αν είναι αυξημένη εμφανίζονται παραπροϊόντα λόγω μη ειδικής αντίδρασης (Pavlov et al. 2004).

2.3.3. Στάδια της θερμικής κυκλοποίησης

Η PCR αποτελείται συνήθως από μια σειρά 30-40 επαναλαμβανόμενων αλλαγών θερμοκρασίας που ονομάζονται κύκλοι (Εικόνα 21). Στα συγκεκριμένα πειράματα πραγματοποιήθηκαν 35 κύκλοι. Κάθε κύκλος αποτελείται συνήθως από 3 διακριτά στάδια θερμοκρασίας. Πριν την κυκλοποίηση προηγείται συνήθως ένα βήμα σε υψηλή θερμοκρασία ($> 90^{\circ}\text{C}$), και ακολουθείται από μία θερμοκρασία για την επέκταση του τελικού προϊόντος. Οι θερμοκρασίες που χρησιμοποιούνται και το χρονικό διάστημα της εφαρμογής τους σε κάθε κύκλο εξαρτώνται από μια σειρά παραμέτρων. Αυτές οι παράμετροι περιλαμβάνουν το ένζυμο που χρησιμοποιείται για τη σύνθεση του DNA, τη συγκέντρωση των δισθενών ιόντων και των dNTPs στην αντίδραση, καθώς και το μήκος και τη θερμοκρασία τήξης (T_m) των εκκινητών (Rychlik 1990).

Το πρώτο βήμα περιλαμβάνει τη θέρμανση σε θερμοκρασία $94-96^{\circ}\text{C}$, η οποία πραγματοποιείται για 5 λεπτά. Απαιτείται μόνο για DNA πολυμεράσες που απαιτούν ενεργοποίηση μέσω θερμότητας με hot-start PCR. Ακολουθεί το αποδιατακτικό βήμα το οποίο είναι το πρώτο κανονικό γεγονός κυκλοποίησης και αποτελείται από τη θέρμανση της αντίδρασης στους 94 με 98°C για 45 δευτερόλεπτα. Προκαλεί αποδιάταξη του DNA μέσω διάσπασης των δεσμών υδρογόνου μεταξύ συμπληρωματικών βάσεων, παράγοντας μονόκλωνες αλυσίδες DNA. Ακολουθεί η υβριδοποίηση, όπου η θερμοκρασία της αντίδρασης μειώνεται στους 62°C για 45 δευτερόλεπτα, επιτρέποντας την προσκόλληση των εκκινητών στο μονόκλωνο DNA πρότυπο. Συνήθως η θερμοκρασία υβριδοποίησης είναι περίπου $3-5^{\circ}\text{C}$ κάτω από το T_m των εκκινητών. Σταθεροί δεσμοί υδρογόνου σχηματίζονται μόνο όταν η ακολουθία των εκκινητών συνδέεται με μεγάλη συγγένεια με την ακολουθία-πρότυπο. Η πολυμεράση συνδέεται με το υβρίδιο εκκινητή-πρωτύπου και αρχίζει τη σύνθεση DNA.

Στη συνέχεια ακολουθεί επέκταση του DNA, κατά το βήμα επιμήκυνσης. Η θερμοκρασία στη φάση αυτή εξαρτάται από την πολυμεράση DNA που χρησιμοποιείται. Η Taq πολυμεράση για παράδειγμα έχει βέλτιστη δραστηριότητα σε θερμοκρασία 72°C (Lawyer et al. 1993). Σε αυτό το βήμα, η πολυμεράση DNA συνθέτει μια νέα έλικα DNA συμπληρωματική της έλικας του DNA



Εικόνα 21: Σχηματική απεικόνιση των βημάτων της PCR:

1. Αποδιάταξη
2. Επαναδιάταξη.
3. Επιμήκυνση
4. Ολοκλήρωση κύκλου

Σε κάθε κύκλο και οι δύο κλώνοι DNA αποτελούν εκμαγείο για τον επόμενο κύκλο, με αποτέλεσμα να διπλασιάζεται το ποσό του αντιγραφόμενου DNA για κάθε νέο κύκλο (στην εικόνα φαίνεται το συνολικό αποτέλεσμα 3 κύκλων). (http://thunder.biosci.umbc.edu/classes/biol414/spring2007/index.php/Steps_of_PCR)

πρωτύπου με την προσθήκη dNTPs που είναι συμπληρωματικά προς το πρότυπο με κατεύθυνση 5' προς 3'. Ο χρόνος επέκτασης εξαρτάται τόσο από τη χρησιμοποιούμενη DNA πολυμεράση όσο και από το μήκος του DNA που ενισχύεται. Υπό βέλτιστες συνθήκες, δηλαδή εάν δεν υπάρχουν δυσκολίες λόγω περιορισμού υποστρώματος ή αντιδραστηρίων, σε κάθε βήμα επέκτασης, το ποσό του DNA στόχου διπλασιάζεται με αποτέλεσμα την εκθετική ενίσχυσή του. Τέλος, περιστασιακά χρησιμοποιείται η φάση της τελικής επιμήκυνσης, η οποία πραγματοποιείται σε θερμοκρασία 72°C για 10 λεπτά μετά τον τελευταίο κύκλο PCR για να διασφαλιστεί ότι τυχόν εναπομείνουσες μονόκλωνες έλικες DNA θα επεκταθούν πλήρως.

Μετά το πέρας της αντίδρασης το προϊόν της PCR μπορεί να διατηρηθεί στους 4°C, για σχετικά μικρή όμως χρονική διάρκεια (Patrinios et al. 2008, εκδόσεις Παρισιανού). Στον Πίνακα 2 παρουσιάζονται όλα τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν στην εκτέλεση των αντιδράσεων καθώς και οι ποσότητές τους ανά δείγμα.

Πίνακας 2: Σύνοψη των συγκεντρώσεων των αντιδραστηρίων που χρησιμοποιήθηκαν για την εκτέλεση PCR με χρήση Taq πολυμεράσης.

Αντιδραστήρια	ATP6			NADH2		
	Αρχική συγκέντρωση	Τελική συγκέντρωση στο μείγμα	Τελικός όγκος / δείγμα	Αρχική συγκέντρωση	Τελική συγκέντρωση στο μείγμα	Τελικός όγκος / δείγμα
DNA	~200ng/ul	-	1 μl	~200ng/ul	-	1 μl
forward primer	50pmoles	1pmole	1 μl	50pmoles	1pmole	1 μl
reverse primer	50pmoles	1pmole	1 μl	50pmoles	1pmole	1 μl
PCR buffer	10x	1x	5 μl	10x	1x	5 μl
MgCl ₂	50mM	2mM	2 μl	50mM	2mM	2 μl
dNTPs	10mM each	0,2mM each	1 μl	10mM each	0,2mM each	1 μl
Taq polymerase	5u/ml	1unit	0,2 μl	5u/ml	1unit	0,2 μl
dH ₂ O	-	-	38,8 μl	-	-	38,8 μl
Τελικός όγκος	-	-	50 μl	-	-	50 μl

Η συνολική διαδικασία ξεκίνησε με προετοιμασία ενός κύριου μείγμα (mix), το οποίο περιέχει όλα τα αντιδραστήρια - εκτός από το DNA - υπολογισμένα σε ποσότητες που καλύπτουν όλες τις επιμέρους αντιδράσεις. Στη συνέχεια μοιράστηκαν από 49μl από το mix σε κάθε σωλήνα eppendorf. Στη συνέχεια, σε κάθε eppendorf προστέθηκε από 1μl DNA από το εκάστοτε δείγμα, πραγματοποιήθηκε μια ταχύτατη φυγοκέντρηση (spin) και όλα τα eppendorfs τοποθετήθηκαν στο μηχάνημα κυκλοποίησης.

Απαραίτητη για την επιβεβαίωση της εγκυρότητας των αποτελεσμάτων κρίνεται η χρήση ενός αρνητικού μάρτυρα / αρνητικού ελέγχου (negative control). Ποσότητα από το μείγμα προστίθεται πάντα σε ένα eppendorf, χωρίς την ακόλουθη προσθήκη του 1μl DNA. Με αυτό τον τρόπο είναι δυνατόν να διαπιστωθεί η ύπαρξη τυχόν επιμολύνσεων από εξωγενές DNA. Αναγνωρίζεται επιμόλυνση στην περίπτωση που ο αρνητικός έλεγχος δώσει προϊόν στην ηλεκτροφόρηση που πραγματοποιείται σε πηκτή αгарόζης. Οι συνθήκες που εφαρμόστηκαν για τη διαδικασία της κυκλοποίησης ήταν οι ίδιες και για τα δύο γονιδιακά τμήματα και παρουσιάζονται στον Πίνακα 3. Οι αλληλουχίες των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν παρουσιάζονται στον Πίνακα 4.

Πίνακας 3: Συνθήκες PCR για τα γονίδια ATP6 και NADH2

Γονίδιο	Συνθήκες PCR	
ATP6 και NADH2	95°C	4 min
	95°C	40 sec
	52 °C	50 sec
	72 °C	40 sec
	72 °C	10 min
	4 °C	διατήρηση

} 35 κύκλοι

Πίνακας 4: Αλληλουχίες εκκινήτων που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση των γονιδίων ATP6 και NADH2.

Γονίδιο	Εκκινήτης	Αλληλουχία	Μέγεθος προϊόντος
ATP6	Forward	TCC CCC AAA GGA CGA ACC TGG G	428 ζεύγη βάσεων
	Reverse	AGG CTT GAA TTA GGG CCA CAG CA	
NADH2	Forward	TAA GGC CAC ACC ACG ATC AAC AGA	395 ζεύγη βάσεων
	Reverse	TGG GCA ATT GAG GAA TAC GCT AGG A	

Ο forward εκκινήτης του γονιδίου ATP6 δεσμεύεται στις βάσεις 8132-8153 του γονιδίου, ενώ ο reverse εκκινήτης συνδέεται στις βάσεις 4472-4448.

Ο forward και ο reverse εκκινήτης του γονιδίου NADH2 δεσμεύεται στις βάσεις 8132-8153 και 8582-8560, αντίστοιχα.

2.3.4. Έλεγχος προϊόντων PCR

Για να επιβεβαιωθεί η ενίσχυση με PCR του επιθυμητού τμήματος DNA, πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση του PCR προϊόντος σε πηκτή αγαρόζη. Με τον τρόπο αυτό διαχωρίζονται τα προϊόντα της PCR με βάση το μέγεθος και διαπιστώνουμε την τυχόν ύπαρξη παραπροϊόντων. Ο διαχωρισμός αυτός γίνεται υπό την επίδραση ενός ηλεκτρικού πεδίου. Τα αρνητικά φορτισμένα νουκλεϊκά οξέα κινούνται προς το θετικό πόλο της συσκευής ηλεκτροφόρησης (Εικόνα 22), με τα μικρότερα σε μέγεθος μόρια να μεταναστεύουν πιο γρήγορα από τα μεγαλύτερα μόρια. Για να γίνουν ορατές οι ζώνες του DNA χρησιμοποιείται μια συσκευή UV ακτινοβολίας.



Εικόνα 22: Συσκευή ηλεκτροφόρησης (<http://www.topac.com/electrophoresis3.html>)

Αντιδραστήρια:

- Αγαρόζη
- Ρυθμιστικό διάλυμα (Buffer) - TAE 1x
- Διάλυμα φόρτωσης (Loading buffer)
- Βρωμιούχο αιθίδιο (EtBr)

Εξοπλισμός:

- Ζυγός ακριβείας
- Φούρνος μικροκυμάτων
- Ηλεκτροφορητική συσκευή (Εικόνα 22)
- Καλούπι για το σχηματισμό της πηκτής
- Ταινία για το καλούπι
- Χτενάκια
- Συσκευή εκπομπής υπεριώδους ακτινοβολίας (UV)

Γενικά η συγκέντρωση των πηκτωμάτων αγαρόζης μπορεί να κυμαίνεται από 0,7% (καλός διαχωρισμός τμημάτων 5-10 kb) έως 2% (καλός διαχωρισμός μικρών τμημάτων μεγέθους 0,2-1kb). Γενικά, υπάρχει αρκετά μεγάλη ποικιλία ρυθμιστικών διαλυμάτων που χρησιμοποιούνται για την ηλεκτροφόρηση σε αγαρόζη. Τα πιο κοινά από αυτά είναι το Tris/Acetate/EDTA (TAE) και το Tris/Borate/EDTA (TBE). Το TAE έχει τη μικρότερη ρυθμιστική ικανότητα αλλά παρέχει καλύτερη ανάλυση για μεγαλύτερα τμήματα DNA. Αυτό σημαίνει χαμηλότερη τάση ηλεκτροφόρησης, άρα περισσότερος χρόνος ηλεκτροφόρησης αλλά και καλύτερο προϊόν (Scorpio 2000).

2.3.5. Παρασκευή διαλύματος TAE 1x

Για την κατασκευή της πηκτής αγαρόζης καθώς και για το buffer της ηλεκτροφόρησης χρησιμοποιήθηκε ρυθμιστικό διάλυμα TAE 1x το οποίο παρασκευάστηκε με αραιώση 20 ml TAE 50x σε 980 ml dH₂O. Το αρχικό διάλυμα TAE 50x παρασκευάστηκε με διαλυτοποίηση 121 gr Tris base σε 28,5 ml οξικό οξύ, 50 ml EDTA 0,5 M και H₂O μέχρι τελικό όγκο 500 ml (Stellwagen E. και Stellwagen N.C. 2002).

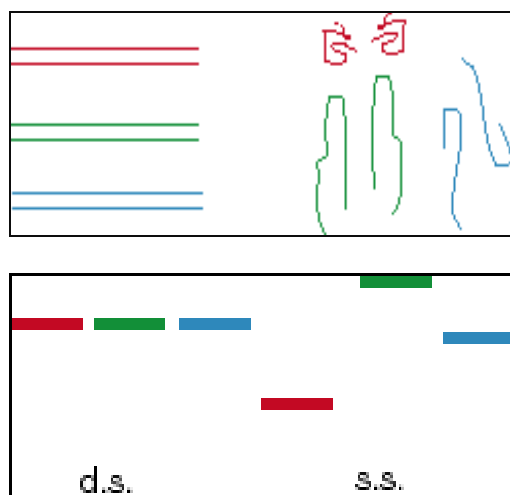
2.3.6. Ηλεκτροφόρηση προϊόντων PCR σε πηκτή αγαρόζης 2%

Η διαδικασία παρασκευής της πηκτής αγαρόζης επαναλαμβάνεται όπως ακριβώς περιγράφηκε στην ενότητα 2.2.2., για τον ποιοτικό έλεγχο του γενωμικού DNA των δειγμάτων, με τη διαφορά ότι για την παρασκευή πηκτής 2% αντί για 1% ζυγίστηκαν 0,6 gr αγαρόζης και προστέθηκαν σε κωνική φιάλη η οποία περιείχε 30 ml διαλύματος TAE 1x. Επίσης προστέθηκαν 4 μl βρωμιούχο αιθίδιο με ταυτόχρονη ανάδευση της κωνικής. Το διάλυμα αφέθηκε για 20 λεπτά περίπου στο ειδικό καλούπι για να στερεοποιηθεί και να σχηματίσει την πηκτή η οποία στη συνέχεια μεταφέρθηκε στην ηλεκτροφορητική συσκευή.

Στη συνέχεια χρησιμοποιήθηκαν 3μl από κάθε προϊόν της PCR αναμειγμένα με 5μl loading buffer τα οποία τοποθετήθηκαν στις ειδικά διαμορφωμένες θέσεις της πηκτής. Η συσκευή ρυθμίστηκε στα 150 V και η πηκτή αφέθηκε για περίπου 15 λεπτά. Με το τέλος της ηλεκτροφόρησης η πηκτή τοποθετήθηκε για παρατήρηση σε συσκευή εκπομπής υπεριώδους ακτινοβολίας, για να διαπιστωθεί η παρουσία ή απουσία ανιχνεύσιμης ποσότητας PCR προϊόντος. Με αυτό τον τρόπο κάθε ζώνη που περιέχει πάνω από 20 ng DNA καθίσταται διακριτή. Εκτός από την παρουσία ή απουσία PCR προϊόντος μπορεί να ανιχνευθεί και η πιθανή ύπαρξη παραπροϊόντος ή επιμόλυνσης με τη μορφή επιπλέον δευτερευόντων ζωνών.

2.4. Ανάλυση πολυμορφισμού μονόκλωνης διαμόρφωσης (SSCP)

Τα δείγματα που ενισχύθηκαν ικανοποιητικά υποβλήθηκαν στη συνέχεια σε ανάλυση Single Strand Conformational Polymorphism ή SSCP (Εικόνα 23). Η τεχνική αυτή βασίζεται στον διαχωρισμό μονόκλωνων νουκλεϊνικών οξέων υπό την επίδραση ηλεκτρικού φορτίου. Ακόμη και ελάχιστες διαφορές στην αλληλουχία (συχνά σε μία μόνο βάση ανάμεσα σε εκατοντάδες) οδηγούν σε διαφορετική δευτεροταγή δομή των κλώνων και κατά συνέπεια σε σημαντική διαφορά στην κινητικότητά τους κατά μήκος της ηλεκτροφόρου. Οι μικρές αλλαγές είναι παρατηρήσιμες λόγω της σχετικά ασταθούς κατάστασης του μονόκλωνου DNA. Όταν η αλυσίδα είναι μονόκλωνη, αναδιπλώνεται στο χώρο και οι μη ζευγαρωμένες βάσεις της σχηματίζουν εσωτερικά ζεύγη που οδηγούν σε τρισδιάστατες θηλιές και πτυχώσεις. Έτσι, η κάθε μονόκλωνη νουκλεϊκή αλυσίδα αποκτά μια τρισδιάστατη δομή μοναδική για τη συγκεκριμένη ακολουθία βάσεων, η οποία είναι πλήρως ανεξάρτητη του μήκους της.



Εικόνα 23: Η διαδικασία της ανάλυσης SSCP:

(επάνω) Τα τρία τμήματα του δίκλωνου DNA με τις αντίστοιχες μονόκλωνες τρισδιάστατες δομές.

(κάτω) Όλα τα τμήματα ηλεκτροφορούνται σε ηλεκτροφόρο.

Τα μονόκλινα μόρια παρουσιάζουν σημαντική διαφορά στην κινητικότητα: το μικρό κόκκινο μόριο κινείται πιο γρήγορα στην ηλεκτροφόρο τόσο από το μπλε όσο και από το μεγάλο πράσινο μόριο. Όσο πιο μακριά είναι οι ζώνες μεταξύ τους, τόσο περισσότερο διαφέρουν οι νουκλεοτιδικές αλληλουχίες.

(<http://www.moleculardetective.org/TutorialProtocols/GelElectrophoresis02>)

Η SSCP είναι μια οικονομική και ευαίσθητη τεχνική. Έχει την ικανότητα να ανιχνεύει πολυμορφισμούς και μεταλλάξεις σε πολλαπλές θέσεις αλλά συνήθως χρησιμοποιείται για την ανίχνευση πολυμορφισμών σε ένα γενετικό τόπο στην διάγνωση ασθενειών. Κάτω από βέλτιστες συνθήκες, η ανάλυση SSCP δύναται να ανιχνεύσει μέχρι και το 97% των πιθανών τροποποιήσεων σε μια αλληλουχία.

Υπάρχουν εντούτοις ορισμένοι παράγοντες που επηρεάζουν την αποτελεσματικότητα της τεχνικής και θα πρέπει να ελέγχονται. Η κινητικότητα των μονόκλωνων αλυσίδων DNA εξαρτάται από τη θερμοκρασία. Για καλύτερα αποτελέσματα η τεχνική θα πρέπει να εφαρμόζεται σε σταθερή θερμοκρασία. Επιπλέον, η ευαισθησία της ανάλυσης SSCP εξαρτάται από τα επίπεδα του pH. Τα δίκλινα μόρια DNA συνήθως αποδιατάσσονται σε βασικές συνθήκες, δηλαδή σε αυξημένες τιμές pH. Για το λόγο αυτό θα πρέπει το buffer ηλεκτροφόρησης (TBE 1x) να διατηρήσει το pH του σε χαμηλά σχετικά επίπεδα, γεγονός που επιτυγχάνεται με την προσθήκη γλυκερόλης στην ηλεκτροφόρο ακρυλαμίδης.

Η προσθήκη γλυκερόλης ελαττώνει την τιμή του pH ρυθμιστικού διαλύματος με αποτέλεσμα να αυξάνεται η ευαισθησία της SSCP ανάλυσης και να λαμβάνονται πιο ευδιάκριτα αποτελέσματα (Kukita et al. 1997). Ακόμη, το μήκος του τμήματος επηρεάζει την ανάλυση SSCP. Για βέλτιστα αποτελέσματα, το μέγεθος των τμημάτων

DNA θα πρέπει να κυμαίνεται μεταξύ 150-300 ζεύγη βάσεων. Επίσης η γλυκερόλη είναι ένας ακόμη παράγοντας του οποίου η παρουσία στην πηκτή μπορεί να διευκολύνει την ανάλυση μεγαλύτερων τμημάτων DNA με επαρκή ευαισθησία (Hu και O'Saughnessy 2001).

2.4.1. Παρασκευή 125 ml πηκτής ακρυλαμίδης 8%

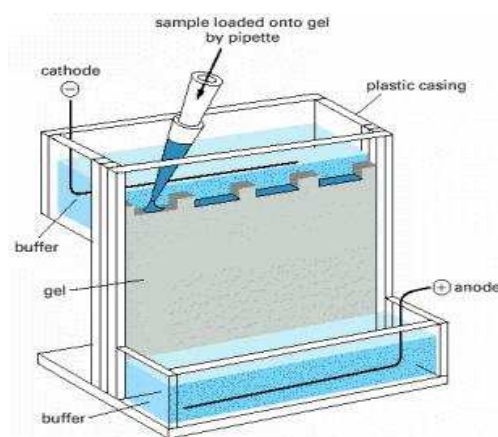
Αντιδραστήρια:

- ακρυλαμίδη
- δις-ακρυλαμίδη
- γλυκερόλη 50%
- TBE 10X
- APS (υπερθεϊκό αμμώνιο, Ammonium Persulfate) 20%
- TEMED (τετραμεθυλεθυλοδιαμίνη, Tetramethylethylenediamine)

Εξοπλισμός:

- ζυγός
- κωνική φιάλη
- ποτήρι ζέσεως
- ογκομετρικός κύλινδρος
- διηθητικό χαρτί
- μαγνήτης
- ηλεκτροφορητική συσκευή για πηκτές ακρυλαμίδης
- αναδευτήρας
- 4 τζάμια
- 4 spacers των 2 χιλιοστών
- βαζελίνη
- συσκευή στήριξης για τα τζάμια

Αρχικά, στην ειδική συσκευή στήριξης, τοποθετήθηκαν τα τέσσερα τζάμια, τα οποία εφάρμοσαν μεταξύ τους ανά δύο με τη βοήθεια δύο spacers 2 χιλιοστών. Τόσο στα spacers όσο και στα σημεία εφαρμογής των τζαμιών με τη συσκευή χρησιμοποιήθηκε επάλειψη με ποσότητα βαζελίνης για την καλύτερη εφαρμογή μεταξύ τους. Κάθε ζευγάρι τζαμιών χρησιμοποιείται για τη δημιουργία μιας πηκτής ακρυλαμίδης. Προετοιμάζοντας την πηκτή ακρυλαμίδης 8%, ζυγίστηκαν στη ζυγαριά 10gr ακρυλαμίδης και 0,25gr δις-ακρυλαμίδης. Τα δύο συστατικά τοποθετήθηκαν σε κωνική φιάλη μαζί με 70ml H₂O, 10ml γλυκερόλη 50% και 7,5ml TBE. Η κωνική φιάλη τοποθετήθηκε στον αναδευτήρα για να ομογενοποιηθεί το περιεχόμενο με τη βοήθεια ενός μικρού μαγνήτη. Μόλις διαλυτοποιήθηκαν πλήρως όλα τα συστατικά, πραγματοποιήθηκε διήθηση με τη βοήθεια διηθητικού χαρτιού σε ογκομετρικό κύλινδρο. Ο ογκομετρικός κύλινδρος συμπληρώθηκε με H₂O μέχρι όγκου 125ml. Το διήθημα μεταφέρθηκε σε κωνική φιάλη και προστίθενται 125μl



Εικόνα 24: Συσκευή ηλεκτροφόρησης πηκτής ακρυλαμίδης, για SSCP ανάλυση (<http://www.moleculardetective.org/TutorialProteomics/GelElectrophoresis02>)

TEMED και 750μl APS 20%. Το TEMED ή αλλιώς τετραμεθυλεθυλοδιαμίνη χρησιμοποιείται μαζί με το APS ή υπερθειικό αμμώνιο, για την κατάλυση του πολυμερισμού της ακρυλαμίδης όταν κατασκευάζονται πηκτές πολυακρυλαμίδης. Το πολυακρυλαμίδιο είναι ένα μεγάλο μόριο που αποτελείται από μεγάλες αλυσίδες μορίων ακρυλαμίδης που ενώνονται μεταξύ τους με μηχανισμό ελευθέρων ριζών. Για να αρχίσει ο πολυμερισμός του πολυακρυλαμιδίου απαιτείται ένας καταλύτης έναρξης όπως το υπερθειικό αμμώνιο (ammonium persulfate, APS) που θα δημιουργήσει τις πρώτες ελεύθερες ρίζες και ένας ενεργοποιητής του καταλύτη όπως το TEMED. Για το σχηματισμό του πηκτώματος απαιτείται επιπλέον ένα μόριο που θα δημιουργήσει πλευρικούς δεσμούς μεταξύ των αλυσίδων πολυακρυλαμιδίου και αυτό είναι η μεθυλενο-δισ-ακρυλαμίδη. Η πηκτή δημιουργήθηκε από την ένωση των μονομερών ακρυλαμίδης ($\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}_2$) σε μακριές αλυσίδες καθώς και από τη δημιουργία εγκάρσιων διακλαδώσεων με N, N μεθυλενο-δισ-ακρυλαμίδη ($\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CO}-\text{CH}-\text{CH}_2$) (Shi 1998).

Ακολούθησε γρήγορη ανάδευση και το διάλυμα χύθηκε με ταχείες κινήσεις ανάμεσα στα τζάμια πριν προλάβει να πήξει. Τοποθετήθηκαν κατάλληλα χτενάκια (ο αριθμός των θέσεων των οποίων ποικίλλει κάθε φορά μεταξύ 20 ή 15 θέσεων, ανάλογα με τον αριθμό των δειγμάτων που θα 'τρέξουν' κάθε φορά) τα οποία θα σχηματίσουν τα 'πηγαδάκια' της πηκτής. Το διάλυμα αφέθηκε για περίπου μισή ώρα ώσπου να πολυμεριστεί.

Μέχρι να σταθεροποιηθεί η πηκτή, πραγματοποιήθηκε η προετοιμασία των δειγμάτων που τοποθετούνται στα 'πηγαδάκια' της πηκτής. Σε καθαρά eppendorfs χωρητικότητας 1,5 ml τοποθετήθηκαν 5μl PCR προϊόντος και 10μl αποδιατακτικού διαλύματος, μια χρωστική που θα προσδώσει στο DNA βάρος ώστε να κατακαθίσει στο κάτω μέρος του 'πηγαδιού'. Τα δείγματα διατηρήθηκαν στο ψυγείο μέχρι να πήξει το διάλυμα και να σχηματιστεί η πηκτή ακρυλαμίδης. Μόλις πραγματοποιήθηκε ο σχηματισμός της πηκτής, τα τζάμια απομακρύνθηκαν από τη συσκευή, αφαιρέθηκαν τα χτενάκια και τα πηγάδια καθαρίστηκαν καταλλήλως για να απομακρυνθούν τυχόν υπολείμματα ακρυλαμίδης επάνω στα τζάμια. Τα τζάμια στερεώθηκαν στη συσκευή ηλεκτροφόρησης κατακόρυφα (Εικόνα 24) και η συσκευή συμπληρώθηκε με ρυθμιστικό διάλυμα TBE 0,5x.

Τα δείγματα που είχαν προηγουμένως τοποθετηθεί στο ψυγείο μετακινήθηκαν στο αποδιατακτικό μηχάνημα ώστε να αποδιαταχτούν οι κλώνοι του DNA μεταξύ τους και να δημιουργηθούν τελικά μονόκλιωνα μόρια DNA. Στη διαδικασία αποδιάταξης πραγματοποιούνται οι εξείς μεταβολές θερμοκρασίας: 95°C για 2 min, 97°C για 2 min και 99°C για 7 min. Η αποδιάταξη τερματίστηκε περίπου ενάμιση λεπτό πριν τελειώσει η αποδιάταξη στους 99°C ώστε να έχει διαχωριστεί το μεγαλύτερο ποσοστό των κλώνων και τα δείγματα τοποθετήθηκαν αμέσως στον πάγο για να μην επανυβριδοποιηθούν οι κλώνοι. Στη συνέχεια τα δείγματα τοποθετήθηκαν με πιπέτα στις ειδικές θέσεις-πηγάδια της πηκτής. Η συσκευή ρυθμίστηκε στα 210V και η πηκτή αφέθηκε στη συσκευή ηλεκτροφόρησης για περίπου 21 ώρες.

2.4.2. Παρασκευή ρυθμιστικού διαλύματος TBE 10x

Αρχικά, παρασκευάστηκε ποσότητα συμπυκνωμένου ρυθμιστικού διαλύματος TBE 10x με ζύγιση 60,5gr Tris base 0,5M και 30,85gr βορικού οξέος (3% w/v), τα οποία διαλυτοποιήθηκαν σε 900mL ddH₂O. Στη συνέχεια προστέθηκαν 40mL EDTA 0,5M και ακολούθως προστέθηκε ddH₂O μέχρι τελικού όγκου 1L. Για την κατασκευή του πηκτής ακρυλαμίδης καθώς και ως ρυθμιστικό διάλυμα της

ηλεκτροφόρησης ακρυλαμίδης χρησιμοποιήθηκαν αραιώσεις του αρχικού διαλύματος TBE, σε συγκεντρώσεις 1x και 0,5x αντίστοιχα.

2.4.3 Χρώση με νιτρικό άργυρο (silver staining)

Η πηκτή ακρυλαμίδης είναι αρχικά διαφανής. Για να γίνουν ορατές οι ζώνες του DNA, η πηκτή πρέπει να υποβληθεί σε χρώση νιτρικού αργύρου. Ο νιτρικός άργυρος έχει την ικανότητα να δεσμεύεται στο DNA και να σχηματίζει αδιάλυτα σύμπλοκα φωσφορικού αργύρου με τις φωσφορικές ομάδες του DNA. Όταν υπόκειται σε κάποιον αναγωγικό παράγοντα, όπως π.χ. την φορμαλδεΐδη (HCHO), παρουσία βάσης, μαυρίζει. Έτσι, οι ζώνες χρωματίζονται σκούρο καφέ, ενώ η υπόλοιπη πηκτή βάφεται κίτρινη.

Με το τέλος της ηλεκτροφόρησης, αφαιρέθηκαν τα τζάμια από τη συσκευή και απομακρύνθηκε η πηκτή αφού πρώτα σημειώθηκε καταλλήλως η κατεύθυνση με την οποία τοποθετήθηκαν τα δείγματα. Η πηκτή στη συνέχεια τοποθετήθηκε σε νάυλον μεμβράνη, μέσα σε ειδικά μεταλλικά σκεύη, στον αναδευτήρα. Για τη συνέχεια στη διαδικασία της χρώσης, προετοιμάστηκαν τρία διαφορετικά διαλύματα:

- Διάλυμα 1

Σε ογκομετρικό κύλινδρο τοποθετήθηκαν 10 ml αιθανόλη 100%, 0,5 ml οξικό οξύ και ddH₂O μέχρι τελικού όγκου 400 ml. Το περιεχόμενο αναδεύτηκε και ρίχθηκαν στην πηκτή τα 200 ml. Ακολούθησε ανάδευση για 3min. Στη συνέχεια αφαιρέθηκε με αναρρόφηση το υγρό και η διαδικασία επαναλήφθηκε με τα υπόλοιπα 200 ml για άλλα 3min. Ακολούθησε μία πλύση με dH₂O για 1 min.

- Διάλυμα 2

Σε ογκομετρικό κύλινδρο τοποθετήθηκε μαγνήτης, 0,2 gr νιτρικού αργύρου και 200ml dH₂O. Το περιεχόμενο αφέθηκε για λίγα λεπτά στον αναδευτήρα για να ομογενοποιηθεί και ρίχθηκε στην πηκτή να αναδευτεί για 15min. Ακολούθησε διπλή πλύση με dH₂O για 1min.

- Διάλυμα 3

Ζυγίστηκαν 3 gr NaOH και 0,01 gr NaBH₄ και τοποθετήθηκαν σε ποτήρι ζέσεως. Προστέθηκαν 200 ml ddH₂O και 1ml φορμαλδεΐδη. Το διάλυμα μεταφέρθηκε στην πηκτή όπου και αναδεύτηκε. Το υγρό αφαιρέθηκε σε 10-15 λεπτά, όταν δηλαδή η πηκτή είχε βαφτεί τόσο όσο να ξεχωρίζουν καθαρά οι καφέ ζώνες του DNA στο κίτρινο φόντο. Ακολούθησε διπλή πλύση της πηκτής με dH₂O για 1 λεπτό περίπου.

Τέλος, αφαιρέθηκε κάθε περίσσεια νερού και η πηκτή τυλίχθηκε σε διαφανή μεμβράνη ώστε να αποτραπεί η γρήγορη αφυδάτωσή της. Στην κατάσταση αυτή, η πηκτή ακρυλαμίδης μπορεί να διατηρηθεί για 6 περίπου μήνες. Τα εμφανιζόμενα πρότυπα ζωνών μετά τη χρώση παρατηρήθηκαν υπό το φως λάμπας.

2.5. Καθαρισμός των PCR προϊόντων

Τα δείγματα που εμφάνισαν διαφορετικό ηλεκτροφορητικό πρότυπο συγκεντρώθηκαν και υποβλήθηκαν εκ νέου σε PCR τελικού όγκου 50μl. Περίπου 2μl από το PCR προϊόν ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή αгарόζης 2% η οποία παρατηρήθηκε σε συσκευή UV για να διαπιστωθεί εάν το επιθυμητό τμήμα έχει

ενισχυθεί αρκετά. Στη συνέχεια, το προϊόν που είχε απομείνει καθαρίστηκε με kit καθαρισμού PCR προϊόντος της Invitrogen με κωδικό K2100-12 για την ανάκτηση καθαρού PCR προϊόντος. Ο καθαρισμός πραγματοποιήθηκε με βάση εγχειρίδιο οδηγιών από τον κατασκευαστή και ο τελικός όγκος καθαρού PCR προϊόντος που απέδωσε ήταν περίπου 50μl ανά δείγμα.

2.5.1. Ποσοτική εκτίμηση του καθαρισμού

Ο ποσοτικός προσδιορισμός του προϊόντος PCR έγινε με φωτομέτρηση στα 260 nm. Χρησιμοποιήθηκε 1 μl από το προϊόν το οποίο αραιώθηκε σε 99 μl ddH₂O. Το διάλυμα τοποθετήθηκε σε κυψελίδα και εισήχθη στο φωτόμετρο η κατάλληλη αραιώση. Η τιμή που έδωσε το φωτόμετρο για κάθε δείγμα αντιστοιχούσε στη συγκέντρωση του DNA στο δείγμα αυτό.

2.5.2. Ποιοτική εκτίμηση του καθαρισμού

Για να επιβεβαιωθεί η αποτελεσματικότητα του καθαρισμού, πραγματοποιήθηκε ποιοτικός προσδιορισμός με ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων σε πηκτή αгарόζης 2%. Αναμίχθηκαν 2μl από το καθαρισμένο PCR προϊόν και 3μl διαλύματος φόρτωσης και ηλεκτροφορήθηκαν αφού τοποθετήθηκαν στις κατάλληλες θέσεις που έχουν σχηματιστεί στην πηκτή από τα χτενάκια. Η συσκευή ηλεκτροφόρησης ρυθμίστηκε στα 180 περίπου Volts και αφέθηκε εκεί την πηκτή για περίπου 15 λεπτά. Τέλος, η πηκτή μετακινήθηκε από τη συσκευή ηλεκτροφόρησης σε συσκευή UV ακτινοβολίας και εκεί έγινε πλέον ορατή η παρουσία ή η απουσία καθαρού PCR προϊόντος, χωρίς άλλα παραπροϊόντα.

2.5.3. Κατακρήμνιση του καθαρού προϊόντος PCR

Αντιδραστήρια:

- παγωμένη αιθανόλη 100%
- CH₃COONa (οξικό νάτριο) 3M

Εξοπλισμός:

- φυγόκεντρος
- φούρνος

Το καθαρό προϊόν υποβλήθηκε σε κατακρήμνιση με προσθήκη 300 μl παγωμένης αιθανόλης 100% και 10 μl οξικού νατρίου συγκέντρωσης 3M. Η αιθανόλη είναι πολύ λιγότερο πολική σε σχέση με το νερό, επομένως αν προστεθεί αρκετή ποσότητα αιθανόλης, η έλξη μεταξύ DNA και κατιόντων που περιέχονται στο διάλυμα γίνεται αρκετά ισχυρή ώστε να σχηματιστούν σταθεροί ιονικοί δεσμοί, γεγονός που οδηγεί στην κατακρήμνιση του DNA. Η αιθανόλη έχει πολύ μικρότερη διηλεκτρική σταθερά (N.Coulomb) από το νερό και επιτρέπει πολύ πιο εύκολα στα αντίθετα φορτισμένα Na⁺ και PO₃⁻ να έρθουν σε επαφή (Zeugin και Barrowclough 1985).

Το CH₃COONa είναι το άλας του οξικού οξέος. Σε διάλυμα, το CH₃COONa διασπάται σε Na⁺ και [CH₃COO]⁻. Το θετικά φορτισμένο ιόν εξουδετερώνει το αρνητικό φορτίο των φωσφορικών ομάδων (PO₃⁻) στα νουκλεϊκά οξέα καθιστώντας το μόριο πολύ λιγότερο υδροφιλικό και άρα πολύ λιγότερο διαλυτό στο νερό. Τα εppendorfs αναδεύτηκαν ελαφρά για να εξαφανιστούν οι υφές και διατηρήθηκαν στην κατάψυξη στους -20°C. Την επόμενη μέρα τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν στις

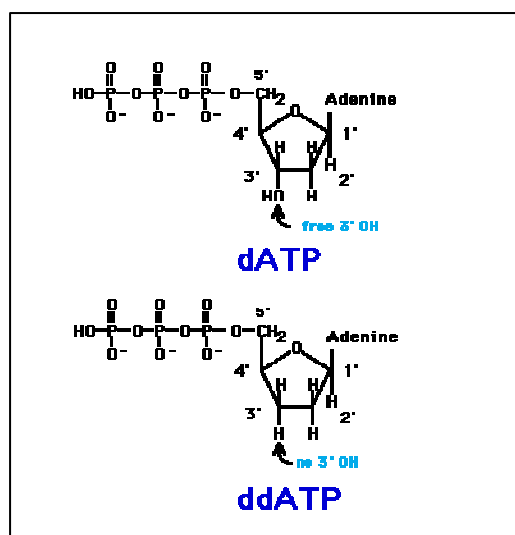
13000 rpm για 15min σε θερμοκρασία 4°C, αφαιρέθηκε το υπερκείμενο και το ίζημα αποξηράνθηκε σε θερμοκρασία 37°C. Τα δείγματα αποθηκεύτηκαν στους -20 °C μέχρι να σταλθούν για αλληλούχηση.

2.6. Προετοιμασία των primers για αλληλούχηση

Παράλληλα με την αποστολή των δειγμάτων για αλληλούχηση, έπρεπε να σταλθούν και οι εκκινητές (primers) που χρησιμοποιήθηκαν, σε συγκεκριμένη συγκέντρωση, 10 pmol/μl. Έτσι, πραγματοποιήθηκε αραιώση 8μl από τον κάθε primer που χρησιμοποιήθηκε στην PCR (C = 50 pmol/μl) σε 32μl ddH₂O. Για αλληλούχηση στάλθηκαν τελικά τα δείγματα που παρουσίασαν διαφορετικό πρότυπο και μαζί οι τέσσερις primers που χρησιμοποιήθηκαν (ATP6 forward & reverse, NADH2 forward & reverse).

2.7. Κυκλική αλληλούχηση

Ο όρος κυκλική αλληλούχηση αναφέρεται στην εκτέλεση των αντιδράσεων της αλληλούχησης, την αποδιάταξη του DNA προς αλληλούχηση και την επανάληψη των αντιδράσεων αλληλούχησης, σε μια κυκλική διαδικασία. Η διαδικασία αυτή στηρίζεται στην αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης για την οποία χρειάζεται το



Εικόνα 25: Επάνω: δεοξυνουκλεοτίδιο για χρήση στην κλασσική PCR. Κάτω: διδεοξυνουκλεοτίδιο (ddNTP) σημασμένο με φθορίζουσα χρωστική για χρήση σε αντίδραση αλληλούχησης. (<http://www.bio.davidson.edu/Courses/Molbio/MolStudents/01licohen/sequencing.html>)

DNA στόχος - μήτρα, εκκινητές, μη σημασμένα dNTPs, σημασμένα με φθορίζουσα χρωστική ddNTPs, Ταq πολυμεράση, ρυθμιστικό διάλυμα και αποστειρωμένο νερό. Επειδή τα διδεοξυνουκλεοτίδια δεν έχουν το 3' OH άκρο ελεύθερο, τίποτα δεν μπορεί να συνδεθεί στη νουκλεοτιδική αλυσίδα μετά από ένα ddNTP (Εικόνα 25). Έτσι, η αλληλούχηση τερματίζεται σε ένα φθορίζον ddNTP. Κάθε βάση έχει σημασθεί με διαφορετική φθορίζουσα χρωστική όπως Cy3, Cy5, 6-FAM, φλουορεσκίνη, TAMRA, Texas Red - X, η οποία μπορεί να απορροφά σε διαφορετικό μήκος κύματος όταν διεγερθεί από μία πηγή ακτινοβολίας laser. Έτσι και οι τέσσερις αντιδράσεις δύνανται για εξοικονόμηση χρόνου να γίνουν στο ίδιο σωληνάριο. Αυτή η κυκλική διαδικασία μπορεί να επαναλαμβάνεται έως ότου ένα από τα αντιδρώντα συστατικά εξαντληθεί. Η αντίδραση συνήθως επαναλαμβάνεται για 25-30 φορές (κύκλοι αντίδρασης) σε ένα θερμικό κυκλοποιητή.

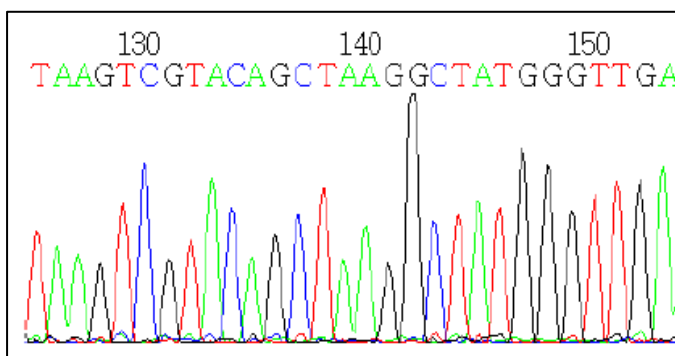
Στη συνέχεια το δείγμα τοποθετείται σε μια αποδιατακτική πηκτή πολυακρυ-λαμίδης σε ένα ειδικό μηχάνημα αλληλούχησης, "DNA sequencer".

Τα τμήματα του DNA μεταναστεύουν βάσει του μήκους τους και τα σημασμένα ddNTPs ανιχνεύονται καθώς διέρχονται προς το κάτω μέρος της πηκτής. Το εκπεμπόμενο χρώμα σε χαρακτηριστικό μήκος κύματος από το κάθε ddNTP καταγράφεται ως αντίστοιχο χρώμα στον υπολογιστή (Εικόνα 26). Τα δεδομένα επεξεργάζονται από το κατάλληλο πρόγραμμα βιοπληροφορικής και τελικά

παρουσιάζονται υπό μορφή ενός χρωματογραφήματος (Εικόνα 27) με έγχρωμες κορυφές (peaks) και τα αντίστοιχα γράμματα της αλληλουχίας των βάσεων (Thomson 1994).



Εικόνα 26: Εξοπλισμός αλληλούχησης, ο οποίος περιλαμβάνει από αριστερά εκτυπωτή για το χρωματογράφημα, μηχάνημα ηλεκτροφόρησης με laser και ηλεκτρονικό υπολογιστή με κατάλληλο πρόγραμμα βιοπληροφορικής. (<http://www.bio.davidson.edu/Courses/Molbio/MolStudents/01licohen/sequencing.html>)



Εικόνα 27: Παράδειγμα ενός χρωματογραφήματος με έγχρωμες κορυφές. Το κάθε χρώμα κορυφής όπως φαίνεται αντιστοιχεί και σε μία διαφορετική βάση

Για αλληλούχηση του ATP₆ γονιδίου στάλθηκαν τα δείγματα 1-7 στα αριστερά και για αλληλούχηση του NADH2 γονιδίου στάλθηκαν τα δείγματα 1-10 στα δεξιά. Η αρίθμηση των δειγμάτων αντιστοιχεί και στο ανάλογο πρότυπο ζωνών που εμφανίστηκε κατά την ανάλυση SSCP, έτσι παραδείγματος χάριν το δείγμα με το όνομα Σπηλιά 32 εμφάνισε το πρότυπο ζωνών 5.

1. North Germany 2
2. Turkey 46
3. Turkey 48
4. Σάμος 31
5. Σπηλιά 32
6. Πύρρα 3
7. Σέρρες 3

1. Turkey 31
2. Turkey 48
3. North Israel 3
4. Turkey 51
5. Italy 4
6. Southwest Germany 4
7. Southwest Germany 5
8. Σάμος 5
9. Γρεβενά 3
10. Χίος 2

2.8. Δενδρογράμματα

Γενικά, για την απεικόνιση προτύπων σχετικότητας χρησιμοποιούνται ευρέως κλαδογράμματα, δηλαδή διαγράμματα που φέρουν διακλαδώσεις (κλάδοι). Τα κλαδογράμματα γενικά μπορούν να κατασκευαστούν βάσει πολλών διαφορετικών τύπων δεδομένων. Με προγράμματα βιοπληροφορικής κατασκευάζονται συνήθως κλαδογράμματα τα οποία απεικονίζουν σχέσεις ανάμεσα σε αλληλουχίες DNA, RNA ή αλληλουχίες αμινοξέων. Τα κλαδογράμματα γενικά μπορεί να έχουν σχεδιαστεί σε κλίμακα –δηλαδή με μήκος κλαδιών- ή όχι. Όταν δεν υπάρχει το μήκος κλαδιών φαίνονται μόνο οι σχέσεις μεταξύ ειδών/αλληλουχιών. Στην περίπτωση όμως του φυλογενετικού δένδρου, ενός συγκεκριμένου τύπου κλαδογράμματος ο οποίος χρησιμοποιείται για την απεικόνιση εξελικτική πορεία διαφορετικών ειδών, οργανισμών ή γονιδίων από έναν κοινό πρόγονο, το μήκος των κλαδιών είναι αντιπροσωπευτικό για το προβλεπόμενο ή για το υποθετικό εξελικτικό διάστημα ανάμεσα σε οργανισμούς ή αλληλουχίες νουκλεοτιδίων. Ο στόχος των φυλογενετικών δένδρων είναι να διευκρινίσει πως μια ομάδα αντικειμένων (συνήθως γονίδια ή οργανισμοί) συνδέονται μεταξύ τους και να οπτικοποιήσει τις εξελικτικές σχέσεις μεταξύ τους.

Τα δενδρογράμματα γενικά μπορεί να σχεδιάζονται άριζα ή έρριζα. Στα έρριζα δενδρογράμματα, η ρίζα του δένδρου αντιπροσωπεύει τον κοινό πρόγονο όλων των ομάδων του δένδρου. Τα έρριζα δένδρα έχουν πάντα μια κατεύθυνση που αντιστοιχεί στον εξελικτικό χρόνο και έτσι επιτρέπουν να οριστούν οι σχέσεις προγόνου-απογόνου. Αντίθετα, τα άριζα δένδρα απεικονίζουν τις σχέσεις μεταξύ των κλαδιών χωρίς όμως να κάνουν παραδοχές για προγονικότητα.

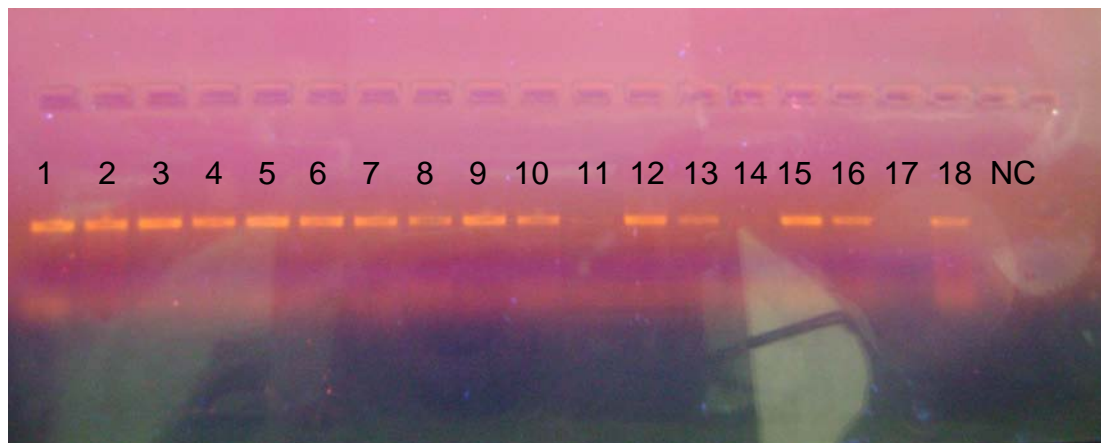
Συχνά στα κλαδογράμματα, δίπλα σε κάθε κόμβο παρατίθεται ένας αριθμός, ο οποίος αντιπροσωπεύει την πιθανότητα να είναι πραγματικός ο συγκεκριμένος κλάδος. Αυτή η εκτίμηση συναντάται με τον όρο ‘Bootstrapping analysis’ και παρέχει τη δυνατότητα επιβεβαίωσης της εγκυρότητας των διαγραμμάτων αυτών (Efron 1996).

Η απεικόνιση με τη μορφή δενδρογραμμάτων είναι χρήσιμη για την διαμόρφωση νέων υποθέσεων, για την ενίσχυση υπάρχοντων δεδομένων ταξινόμησης καθώς και για την οργάνωση δεδομένων βιολογικής ποικιλομορφίας (Baum 2008), όμως δεν μπορούν να θεωρηθούν πλήρως έγκυρες και αληθινές περιγραφές της εξελικτικής ιστορίας των οργανισμών καθώς σε όλα τα κλαδογράμματα υπάρχει ένας αριθμός πιθανών εξελικτικών μονοπατιών τα οποία μπορεί να έχουν οδηγήσει στο συγκεκριμένο πρότυπο σχέσεων το οποίο απεικονίζεται στο κλαδογράμμα. Ουσιαστικά απεικονίζεται η πιθανότητα δύο οργανισμοί ή αλληλουχίες να είναι πιο συγγενικές μεταξύ τους από όσο είναι με μια τρίτη, δεν αποσαφηνίζεται όμως απαραίτητα το μονοπάτι το οποίο δημιούργησε τις υπάρχουσες σχέσεις (Cates 2006). Δενδρογράμματα με χρήση της μεθόδου συσχέτισης μη σταθμισμένων ομάδων ανά ζεύγη με αριθμητικούς μέσους όρους (UPGMA: unweighted pair group method with arithmetic averages) χρησιμοποιήθηκαν και στην παρούσα εργασία για την απεικόνιση των εξελικτικών σχέσεων μεταξύ των προτύπων που ανιχνεύτηκαν με ανάλυση SSCP στα δείγματα *Lepus europaeus*.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ - ΣΥΖΗΤΗΣΗ

3.1. Αποτελέσματα PCR

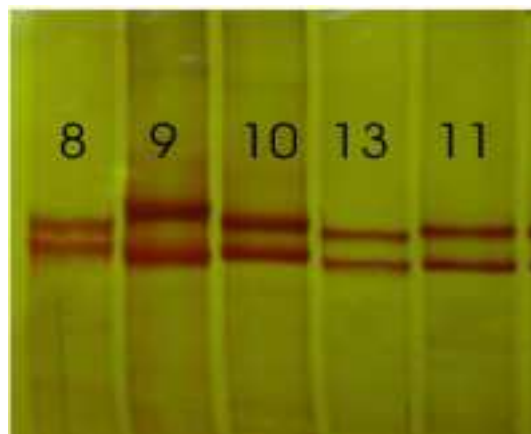
Στις παρακάτω εικόνες παρουσιάζονται δείγματα μετά από πραγματοποίηση PCR και ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης (Εικόνα 28) καθώς και μετά από εφαρμογή SSCP και ηλεκτροφόρηση σε πηκτή ακρυλαμίδης (Εικόνα 29).



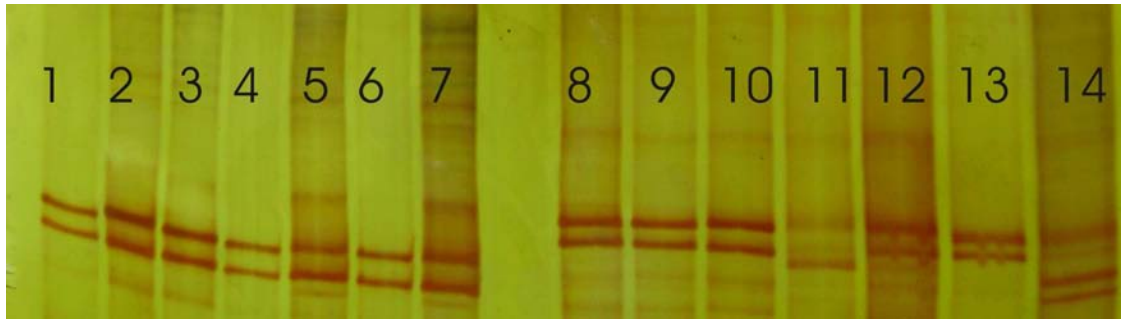
Εικόνα 28: Ηλεκτροφόρηση προϊόντων PCR. Τα δείγματα 1-12 είναι περιοχές της Ασίας, τα δείγματα 12-18 από την Ελλάδα και το τελευταίο πηγαδάκι περιέχει αρνητικό μάρτυρα (NC).

3.2. Αποτελέσματα ανάλυσης SSCP

Τα PCR προϊόντα των δειγμάτων που ενισχύθηκαν αποτελεσματικά υποβλήθηκαν σε ανάλυση SSCP με στόχο την παρατήρηση του προτύπου βάσει διαφορών στην αλληλουχία. Τα δείγματα μετά από περίπου 21 ώρες έδωσαν την Εικόνα 29. Η ανάλυση SSCP εφαρμόστηκε για όλα τα δείγματα τα οποία είχαν υποβληθεί σε ενίσχυση μέσω PCR. Στη συνέχεια έγινε προσπάθεια αντιστοιχίας κάθε δείγματος σε ένα πρότυπο και επιλέχθηκε ένα αντιπροσωπευτικό δείγμα για κάθε πρότυπο, να σταλθεί προς αλληλούχηση. Τα πρότυπα αυτά, που επιλέχθηκαν για αλληλούχηση, παρουσιάζονται στη συγκεντρωτική πηκτή που ακολουθεί, στην Εικόνα 30. Από τη συγκεντρωτική πηκτή επιλέχθηκαν για αλληλούχηση τα δείγματα : 1, 2, 3, 4 και 6 για το γονίδιο ATP₆ και τα δείγματα 8, 9, 10, 11, 13 και 14 για το NADH2.



Εικόνα 29: Πηκτή ακρυλαμίδης μετά από χρώση. Και τα πέντε δείγματα που φαίνονται στην εικόνα παρατηρούμε ότι παρουσιάζουν διαφορετικό πρότυπο.



Εικόνα 30: Συγκεντρωτική πηκτή ακρυλαμίδης για τα δύο γονιδιακά τμήματα ATP6 (αριστερά) και NADH2 (δεξιά).

3.3. Αποτελέσματα αλληλούχησης

Όλα τα δείγματα και των δύο γονιδίων που στάλθηκαν για αλληλούχηση παρουσίασαν διαφορετικές αλληλουχίες, γεγονός που επιβεβαίωσε τον επιτυχημένο διαχωρισμό της ανάλυσης SSCP. Οι αλληλουχίες που προέκυψαν επεξεργάστηκαν με το πρόγραμμα βιοπληροφορικής BioEdit. Για να θεωρηθούν έγκυρες οι αλληλουχίες θα πρέπει να έχουν ίδιο μήκος μεταξύ τους και σε κάθε βάση να αντιστοιχεί μία μοναδική κορυφή του ηλεκτροφοροεγραφήματος. Ο έλεγχος πραγματοποιήθηκε εμπειρικά και όσα δείγματα δεν πληρούσαν τις προϋποθέσεις στάλθηκαν για επαναληπτική αλληλούχηση ώστε να παραληφθούν πιο καθαρά και σαφή αποτελέσματα. Για την ομοπαράθεση των αλληλουχιών χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα ClustalW (Thompson 1994). Οι μέθοδοι Clustal χρησιμοποιούν προοδευτικούς αλγορίθμους κατά τους οποίους οι δυο συνολικά πιο ομόλογες αλληλουχίες στοιχίζονται πρώτες και ακολουθεί μια σειρά από νέες στοιχίσεις προσθέτοντας σε κάθε βήμα την αμέσως συγγενέστερη αλληλουχία προς τις ήδη στοιχισμένες.

Παρακάτω παρατίθενται πρώτα οι αλληλουχίες των δειγμάτων που στάλθηκαν για αλληλούχηση του γονιδιακού τμήματος ATP6 μαζί με την αλληλουχία του γονιδίου από τη βάση δεδομένων GenBank καθώς και τις αλληλουχίες των απλοτύπων A, D και B από τη βιβλιογραφία για σύγκριση και στη συνέχεια παρατίθενται οι αλληλουχίες του NADH2, επίσης μαζί με την αλληλουχία του γονιδίου από τη βάση δεδομένων GenBank και τις αλληλουχίες των απλοτύπων A, B, C και E από τη βιβλιογραφία (Smith 2010). Οι κουκίδες στις αλληλουχίες συμβολίζουν την ομολογία των βάσεων ως προς την πρώτη αλληλουχία (αλληλουχία γονιδίου από τη βάση δεδομένων GenBank). Οι βάσεις οι οποίες διαφοροποιούνται σε σχέση με την πρώτη αλληλουχία αναγράφονται με το αρχικό τους γράμμα. Το χρώμα είναι διαφορετικό και χαρακτηριστικό για την κάθε βάση.

ATTTTAATAATAGCCATCACACTTAACATCCTTGACTCAGGCCAATGAACACTAATTAACCCACAAAATC
T.....T.....G.....

T.....G.....
T.....G.....
T.....G.....
T.....T.....G.....

T.....G.....
T.....G.....
T.....G.....
G.....

ACTTTACACCAATCATAAATTATACTAGCCCTAATTATTAAGCTAGGAATGGCCCCCTTCCACTTCTGAGT
G.....
G.....

A.....A.....
T.....A.....A.....T.....
A.....A.....
G.....A.....A.....T.....

A.....A.....
A.....A.....
A.....A.....

ACCAGAAGTCACCCAAGGAGTCCCCCTGAAATCGGGTCTTATCCTCCTTACATGACAAAAACTAGCCCCCT
G.....
G.....
G.....
T.....A.....A.....T.....G.....
A.....A.....G.....
A.....A.....T.....G.....
A.....A.....T.....G.....
G.....
A.....A.....T.....G.....
A.....A.....T.....G.....
A.....A.....T.....G.....
A.....G.....

CTATCCATTCTTTATCAGATTTCTTCCTCTATTGACTCAACTATGATAATACTAGTAGCTATTCTCTCAA
A.....
A.....
A.....
C.....A.....
C.....A.....
C.....A.....
C.....A.....
C.....A.....

T.....
C.....A.....
C.....A.....
C.....A.....

TCATAGTTGGTGGCTGAGGAGGACTAAACCAGACTCAACTACGAAAGATCCTAGCG L.europ_complete_mtDNA
 L.europ_haplotype_B
 L.europ_haplotype_A
 L.europ_haplotype_C
 L.europ_haplotype_E
 Turkey_31-NADH2
 Turkey_48-NADH2
 N.Israel_3-NADH2
A..... Turkey_51-NADH2
 Italy_4-NADH2
 S.W.Germany_4-NADH2
 S.W.Germany_5-NADH2
A..... Chios_2-NADH2
 Samos_5-NADH2
A..... Chios_13-NADH2
 Grevena_3-NADH2

Συνοπτικά όλες οι αντικαταστάσεις βάσεων που παρατηρούνται στις παραπάνω αλληλουχίες παρουσιάζονται στους Πίνακες 5 και 6 για τα γονίδια ATP6 και NADH2 αντίστοιχα.

Πίνακας 5: Αντικαταστάσεις βάσεων στο γονίδιο ATP6

Αρχικό αμινοξύ	Αντικαθίσταται με:	Στη θέση:
γουανίνη	αδενίνη	1, 183
κυτοσίνη	αδενίνη	14
θυμίνη	αδενίνη	30, 273
αδενίνη	γουανίνη	45, 352
θυμίνη	κυτοσίνη	55, 177, 304, 314, 345
κυτοσίνη	θυμίνη	66, 141, 150, 180
αδενίνη	θυμίνη	168, 237, 360

Πίνακας 6: Αντικαταστάσεις βάσεων στο γονίδιο NADH2

Αρχικό αμινοξύ	Αντικαθίσταται με:	Στη θέση:
γουανίνη	Αδενίνη	111, 120, 168, 174, 255, 286
κυτοσίνη	Θυμίνη	15, 30, 60, 94, 135, 162, 183, 276
αδενίνη	Γουανίνη	39, 76, 103, 192
θυμίνη	Κυτοσίνη	235

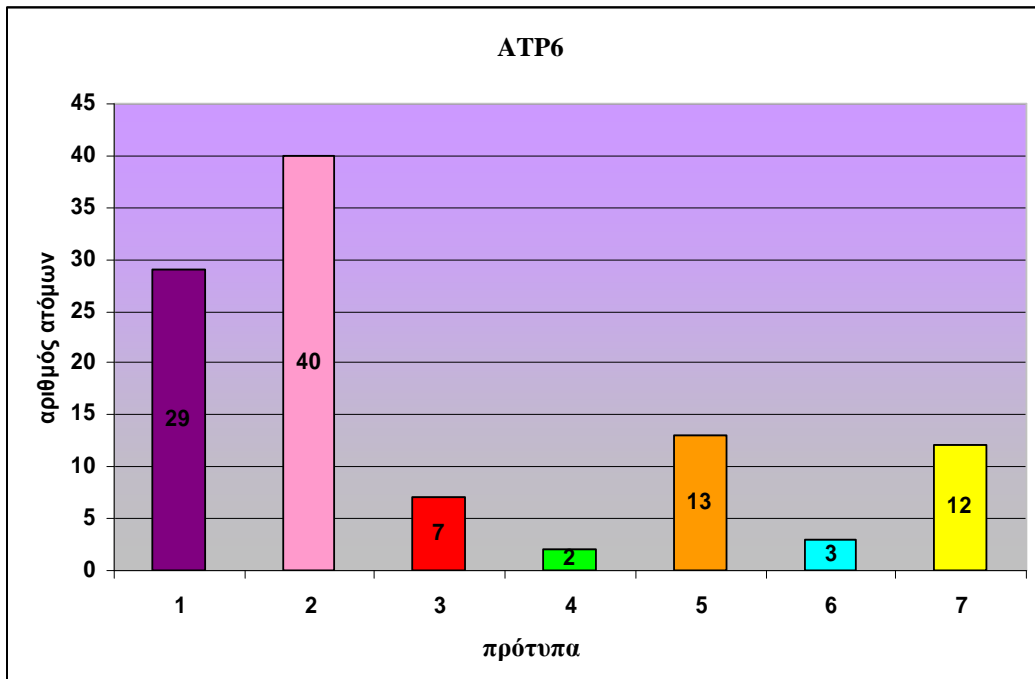
Μετά από την επιβεβαίωση -μέσω αλληλούχησης- της διαφορετικότητας κάθε προτύπου που προέκυψε με την ανάλυση SSCP, κάθε δείγμα *Lepus europaeus* που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη αντιστοιχίστηκε σε ένα πρότυπο (Γραφήματα 1, 2). Η διαδικασία αυτή πραγματοποιήθηκε για όλα τα δείγματα και των δύο γονιδίων. Ο αριθμός των ατόμων *Lepus europaeus* που αντιστοιχούν σε κάθε πρότυπο (7 διαφορετικά πρότυπα για το γονίδιο NADH2 και 10 διαφορετικά πρότυπα για το γονίδιο ATP6) παρουσιάζεται στους πίνακες 7 για το γονίδιο ATP6 και 8 για το γονίδιο NADH2.

Πίνακας 7: Αριθμός ατόμων *L.europraeus* που αντιστοιχούν σε κάθε πρότυπο του γονιδίου ATP6

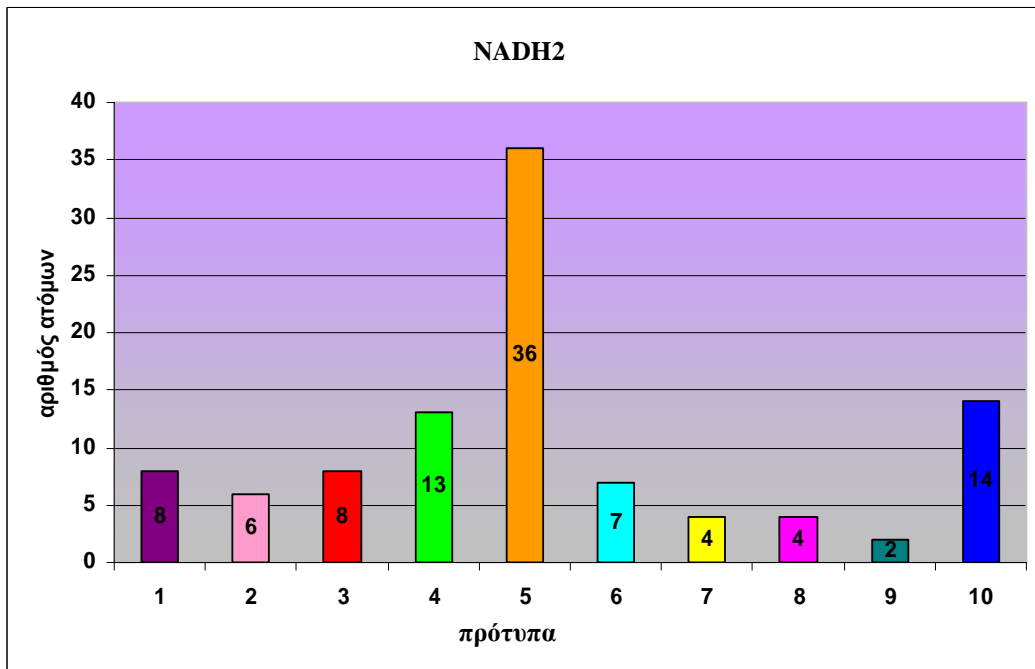
Πρότυπο ATP ₆	Αριθμός ατόμων
1	29
2	40
3	7
4	2
5	13
6	3
7	12
ΣΥΝΟΛΟ:	106

Πίνακας 8: Αριθμός ατόμων *L.europraeus* που αντιστοιχούν σε κάθε πρότυπο του γονιδίου NADH2

Πρότυπο NADH ₂	Αριθμός ατόμων
1	8
2	6
3	8
4	13
5	28
6	6
7	1
8	4
9	2
10	14
ΣΥΝΟΛΟ:	90



*Γράφημα 1: Κατανομή ατόμων *Lepus euroraeus* για κάθε πρότυπο που εμφανίστηκε στο γονίδιο ATP6.*



*Γράφημα 2: Κατανομή ατόμων *Lepus euroraeus* για κάθε πρότυπο που εμφανίστηκε στο γονίδιο NADH2.*

3.4. Αμινοξική ανάλυση πρότυπων αλληλουχιών

Στη συνέχεια, οι πρότυπες αλληλουχίες των δύο γονιδίων ATP6 και NADH2 επεξεργάστηκαν με το ηλεκτρονικό πρόγραμμα βιοπληροφορικής MEGA 4.0 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) για να μετατραπούν σε αμινοξικές αλληλουχίες. Με τη χρήση του συγκεκριμένου προγράμματος, είναι δυνατή η πολλαπλή ομοπαράθεση των αλληλουχιών, η εύρεση των πολυμορφικών και συντηρημένων θέσεων ανάμεσα στους απλότυπους, ο προσδιορισμός των αλλαγών στην αμινοξική αλληλουχία, με αλλά και η κατασκευή δενδρογράμματος με επιλογή του επιθυμητού μοντέλου (NJ, UPGMA, ML, MP), όπως και ο έλεγχος bootstrap για το κατασκευασμένο δέντρο.

Στις αμινοξικές αλληλουχίες του γονιδίου ATP6 παρατηρήθηκαν οι εξής 3 μετατροπές: γλυκίνη σε σερίνη στη θέση 1 της αμινοξικής αλληλουχίας, λευκίνη σε μεθειονίνη στη θέση 5 και ισολευκίνη σε βαλίνη στη θέση 118. Αναλόγως, για το γονίδιο NADH2 παρατηρήθηκαν 3 αμινοξικές μετατροπές: θρεονίνη σε αλανίνη στη θέση 26 της αμινοξικής αλληλουχίας, σερίνη σε προλίνη στη θέση 79 και βαλίνη σε ισολευκίνη στη θέση 106.

Οι αλληλουχίες οι οποίες προέκυψαν μετά την εφαρμογή του ηλεκτρονικού προγράμματος MEGA παρατίθενται ακολούθως μαζί με την αντίστοιχη αλληλουχία του γονιδίου από τη βάση δεδομένων GenBank και τους απλοτύπους που αντιστοιχούν στο κάθε γονίδιο από τη βιβλιογραφία (Smith 2010).

L.europaeus_mtDNA GSTNLLGLLP HSFTPTTQLS MNLGMAIPLW AGTVITGFERY KTKASLAHFL PQGTPVPLIP MLVIETISL FIQPMALAVR
L.europaeus_haplotype_A_ATP6A.....
L.europaeus_haplotype_D_ATP6A.....
L.europaeus_haplotype_B_ATP6A.....
N_GERMANY_2_ATP6A.....
TURKEY_46_ATP6A.....
TURKEY_48_ATP6A.....
SAMOS_31_ATP6A.....
SERRES_3_ATP6 S.....A.....
SPILIA_32_ATP6 ...M.....A.....
PYRRA_3_ATP6A.....

L.europaeus_mtDNA LTANITAGHL LMHLIGGAAL ALISISPTTA LITFIILILL TILEFAVALI QA
L.europaeus_haplotype_A_ATP6
L.europaeus_haplotype_D_ATP6T.....
L.europaeus_haplotype_B_ATP6
N_GERMANY_2_ATP6
TURKEY_46_ATP6
TURKEY_48_ATP6V.....
SAMOS_31_ATP6
SERRES_3_ATP6
SPILIA_32_ATP6
PYRRA_3_ATP6

L.europaeus_complete_mtDNA IIMMAITLNI LDSGQWTLIN PQNHFTPI MIALLIILGM APFHFWPEV TQGVPLKSL ILLTQKLP LSILYQISS
L.europaeus_haplotype_BA.....
L.europaeus_haplotype_A
L.europaeus_haplotype_CV.....
L.europaeus_haplotype_E
Turkey_31-NADH2P.....
Turkey_48-NADH2P.....
N.Israel_3-NADH2P.....
Turkey_51-NADH2P.....
Italy_4-NADH2A.....
S.W.Germany_4-NADH2
S.W.Germany_5-NADH2
Chios_2-NADH2P.....
Samos_5-NADH2P.....
Chios_13-NADH2P.....
Grevena_3-NADH2

L.europaeus_complete_mtDNA IDSTMLVA ILSIMVGGWG GLNQTQLRKI LA
L.europaeus_haplotype_B
L.europaeus_haplotype_A
L.europaeus_haplotype_C
L.europaeus_haplotype_E
Turkey_31-NADH2
Turkey_48-NADH2
N.Israel_3-NADH2
Turkey_51-NADH2I.....
Italy_4-NADH2
S.W.Germany_4-NADH2
S.W.Germany_5-NADH2
Chios_2-NADH2I.....
Samos_5-NADH2
Chios_13-NADH2I.....
Grevena_3-NADH2

Η γενική μορφή δομής που παρουσιάζουν τα αμινοξέα αποτελείται από ένα μόριο α-άνθρακα στο κέντρο το οποίο στα αριστερά φέρει μια αμινομάδα και στα δεξιά φέρει μια καρβοξυλομάδα. Τα αμινοξέα γενικά έχουν τρία κριτήρια διαχωρισμού, σύμφωνα με τα οποία τα αμινοξέα χωρίζονται γενικά σε:

(1) κυκλικά (αρωματικά ή μη) ή αλειφατικά

(2) πολικά ή μη πολικά

(3) όξινα (θετικά φορτισμένα) ή βασικά (αρνητικά φορτισμένα)

Οι χημικές ιδιότητες των αμινοξέων που εμλέκονται στις αντικαταστάσεις που παρατηρήθηκαν στα δύο γονίδια συνοψίζονται στον Πίνακα 9.

Πίνακας 9: Ιδιότητες αμινοξέων τα οποία συμμετέχουν στις παρατηρούμενες μετατροπές της αμινοξικής αλληλουχίας των 2 γονιδίων.

	Πολικό μη φορτισμένο	Μη πολικό αλειφατικό	Πολικό αρωματικό
(L) λευκίνη		+	
(T) θρεονίνη	+		
(I) ισολευκίνη		+	
(V) βαλίνη		+	
(M) μεθειονίνη		+	
(A) αλανίνη		+	
(S) σερίνη	+		
(G) γλυκίνη		+	
(P) προλίνη			+

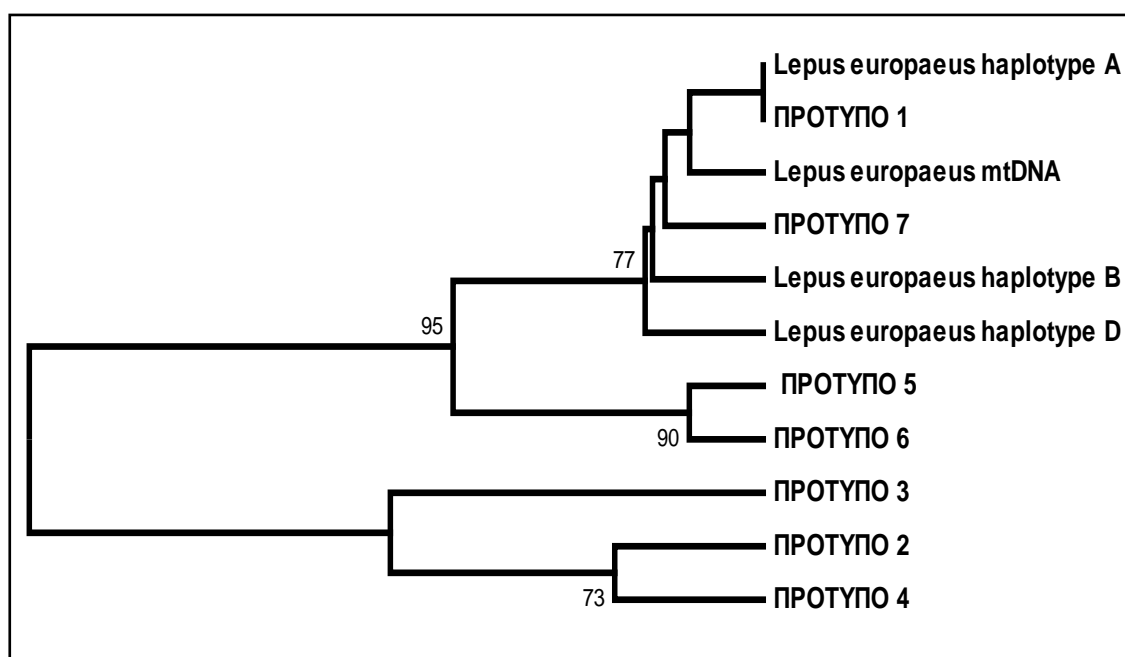
Μια αντικατάσταση ενός αμινοξέος με ένα αμινοξύ διαφορετικού μοριακού βάρους, φορτίου ή πολικότητας μπορεί να επιφέρει μικρές ή μεγάλες μεταβολές στη διαμόρφωση της σχηματιζόμενης πρωτεΐνης καθώς η αλληλουχία των αμινοξέων (πρωτοταγής δομή) μπορεί με τη σειρά της να μεταβάλει τη δευτεροταγή ή τριτοταγή δομή της πρωτεΐνης. Ένα τέτοιο γεγονός μπορεί να επηρεάσει άμεσα τη συνολική λειτουργικότητα της πρωτεΐνης.

3.5. Συγκρίσεις πολυμορφισμών

Παρατηρώντας τις αλληλουχίες του γονιδίου ATP6, μπορεί να διακριθεί μια ομαδοποίηση μεταξύ των προτύπων ζωνών 5 και 6 καθώς εμφανίζουν τρεις κοινούς μεταξύ των δύο αλληλουχιών, πολυμορφισμούς οι οποίοι βρίσκονται στις θέσεις 45 (αδενίνη σε γουανίνη), 141 (κυτοσίνη σε θυμίνη) και 237 (αδενίνη σε θυμίνη). Τα δείγματα *Lepus europaeus* που εμφανίζουν αυτά τα πρότυπα προέρχονται από την Ιταλία και την κεντρική Ελλάδα.

Ομοίως, οι αλληλουχίες των προτύπων 2, 3 και 4 παρουσιάζουν κοινούς πολυμορφισμούς σε 5 θέσεις. Εμφανίζουν μια αντικατάσταση θυμίνης από κυτοσίνη στη θέση 55, μια αντικατάσταση κυτοσίνης από θυμίνη στη θέση 150, μια αντικατάσταση αδενίνης από θυμίνη στη θέση 168, μια αντικατάσταση γουανίνης από αδενίνη στη θέση 183, μια αντικατάσταση θυμίνης από αδενίνη στη θέση 273 και μια αντικατάσταση θυμίνης από κυτοσίνη στη θέση 234. Η ομαδοποίηση των τριών αυτών προτύπων καλύπτει πλήρως όλα τα άτομα *Lepus europaeus* από τα νησιά του Αιγαίου, την Ανατολή (Τουρκία και Ισραήλ) και τη Θράκη.

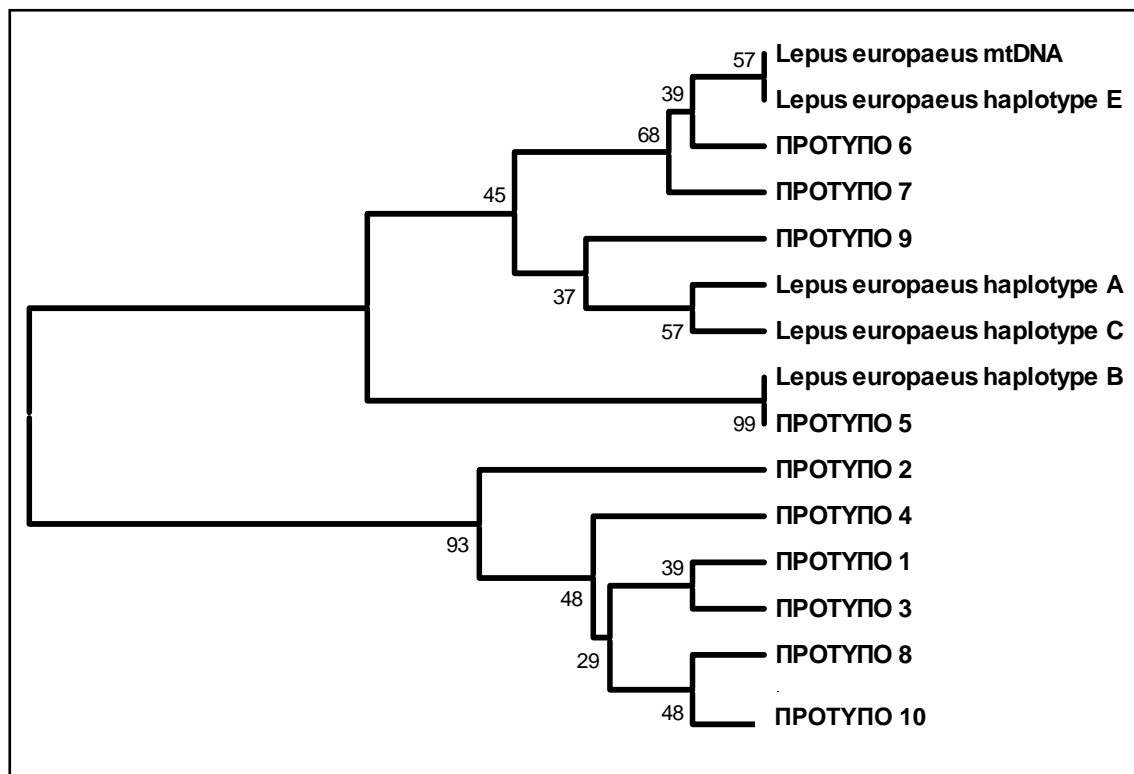
Αντίθετα, για το πρότυπο 1 και το πρότυπο 7, τα οποία περιλαμβάνουν δείγματα από κεντρική Ελλάδα και Ευρώπη, δεν παρατηρήθηκε κάποια δυνατότητα ομαδοποίησης. Οι ομαδοποιήσεις των αλληλουχιών του γονιδίου ATP6 παρουσιάζονται στο διάγραμμα της *Εικόνας 31*.



Εικόνα 31: Στο δενδρόγραμμα γίνεται εμφανής ο διαχωρισμός των *Lepus europaeus* που προέρχονται από την ανατολή και τα νησιά του Αιγαίου (κάτω κλάδος) από τους *Lepus europaeus* της Ελλάδας και της Ευρώπης (επάνω κλάδος), βάσει του γονιδίου ATP6. Από τους πληθυσμούς Ελλάδας και Ευρώπης είναι επίσης εμφανής ο διαχωρισμός των πληθυσμών της Ιταλίας και μέρους της κεντρικής Ελλάδας από τους πληθυσμούς της Ευρώπης και της υπόλοιπης κεντρικής Ελλάδας, οι οποίοι εμφανίζουν μεγαλύτερη ομοιότητα με τους απλοτύπους που προβλέπονται από τη βιβλιογραφία (S.Smith et al. 2010).

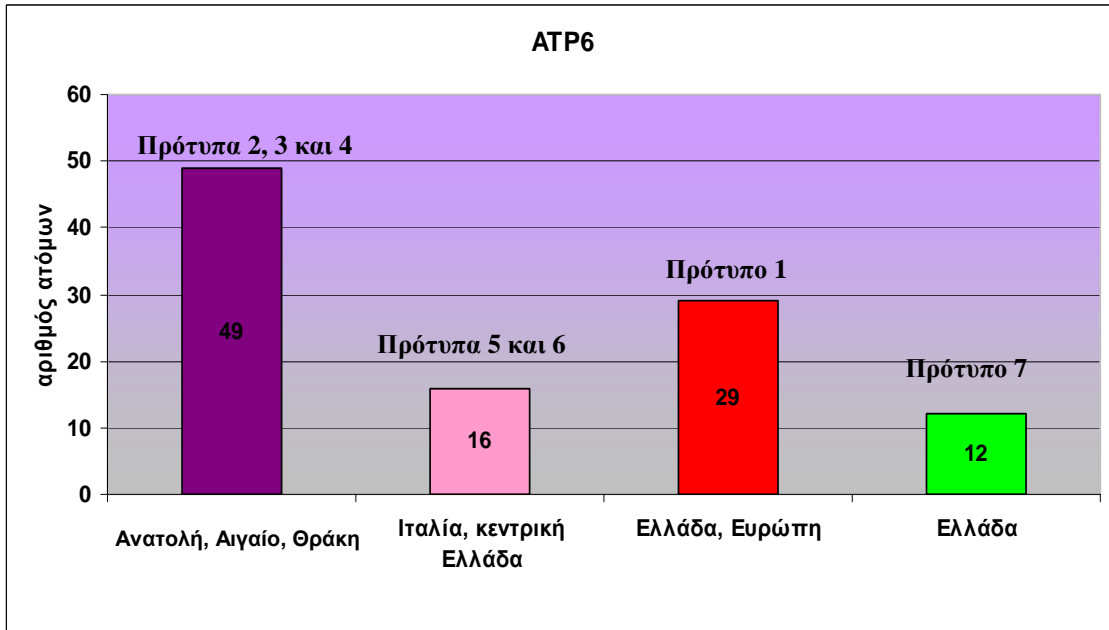
Όσον αφορά το γονίδιο NADH2, κατέστη δυνατή η ομαδοποίηση των προτύπων 1, 2, 3, 4, 8 και 10, καθώς εμφανίζουν κοινούς πολυμορφισμούς σε τέσσερις θέσεις: τρεις αντικαταστάσεις γουανίνης από αδενίνη στις θέσεις 111, 120 και 168 και μια αντικατάσταση θυμίνης από κυτοσίνη στη θέση 235. Η ομαδοποίηση αυτών των προτύπων περιλαμβάνει όλα τα δείγματα *Lepus europaeus* τα οποία προέρχονται από νησιά του Αιγαίου, Θράκη και Ανατολή (Τουρκία, Βόρειο και Νότιο Ισραήλ). Για τα πρότυπα 5, 6, 7 και 9 δεν παρατηρήθηκε κάποια δυνατότητα μεταξύ τους ομαδοποίησης. Στα πρότυπα αυτά περιλαμβάνονται όλα τα δείγματα από Γερμανία, Γαλλία, κεντρική Ελλάδα και Βόρεια Ελλάδα εκτός της περιοχής της Θράκης.

Συγκεκριμένα για το πρότυπο 5 ωστόσο, παρατηρήθηκε μεγάλη ομοιότητα με τον απλότυπο B της βιβλιογραφίας (S.Smith et al. 2010), καθώς παρουσίασαν τρεις ίδιους πολυμορφισμούς: μια αντικατάσταση κυτοσίνης από θυμίνη στη θέση 30 και δύο αντικαταστάσεις αδενίνης από γουανίνη στις θέσεις 39 και 76. Το πρότυπο 5 περιλαμβάνει περιοχές από όλη την Ελλάδα καθώς και όλα τα δείγματα από Γερμανία και Ιταλία. Το αποτέλεσμα αυτό έρχεται σε συμφωνία με τα αποτελέσματα των S.Smith et al. (2010) καθώς ο απλότυπος B συμπεριελάμβανε όλους τους *Lepus europaeus* με προέλευση από τη Νότιο Ιταλία και συσχετιζόταν με μειωμένη αναπαραγωγική ικανότητα των αρσενικών ατόμων αυτών. Η παρουσίαση όλων των παραπάνω ομαδοποιήσεων γίνεται στην *Εικόνα 32*.

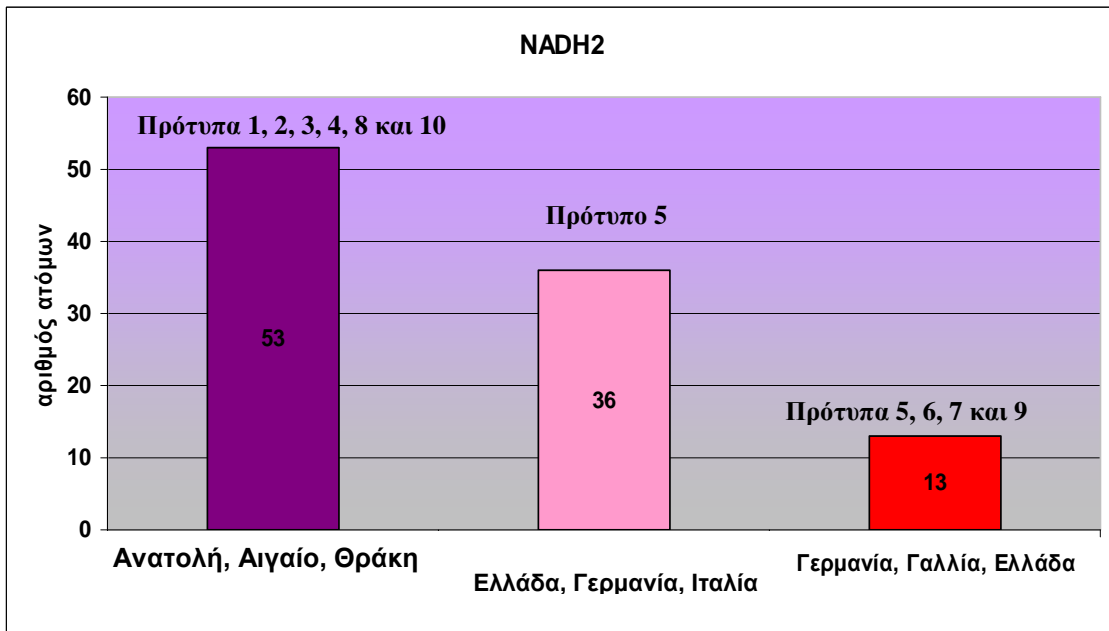


Εικόνα 32: Στο δενδρόγραμμα γίνεται αρχικά εμφανής ο διαχωρισμός των *Lepus europaeus* που προέρχονται από την Ελλάδα και την Ευρώπη (1^{ος} βασικός κλάδος) από τους *Lepus europaeus* της ανατολής, της Θράκης και των νησιών του Αιγαίου (2^{ος} βασικός κλάδος), βάσει του γονιδίου NADH2. Στον 1^ο κλάδο παρατηρείται συμφωνία του απλότυπου B της βιβλιογραφίας με την αλληλουχία του δείγματος Ιταλία 4, η οποία είναι αντιπροσωπευτική για όλα τα δείγματα από Γερμανία και Ιταλία, αλλά συναντάται παράλληλα σε περιοχές από όλη την Ελλάδα.

Η κατανομή των δειγμάτων *Lepus europaeus* στις εν λόγω ομάδες προτύπων που καθορίστηκαν βάσει ομολογίας των αλληλουχιών παρουσιάζεται στο *Γράφημα 3* για το γονίδιο ATP6 και στο *Γράφημα 4* για το γονίδιο NADH2.

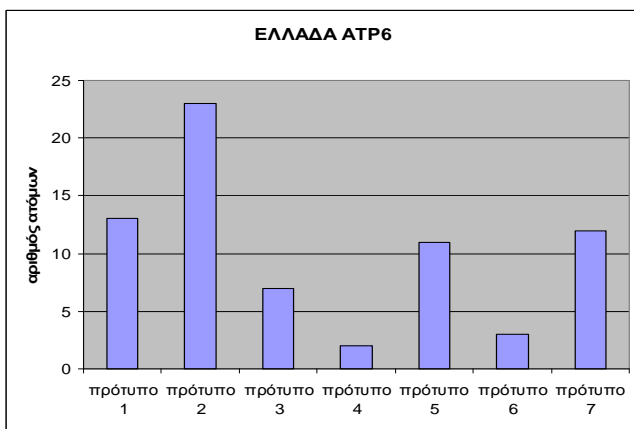


Γράφημα 3: Κατανομή δειγμάτων *Lepus europaeus* ανά ομάδα προτύπων για το γονίδιο ATP6.

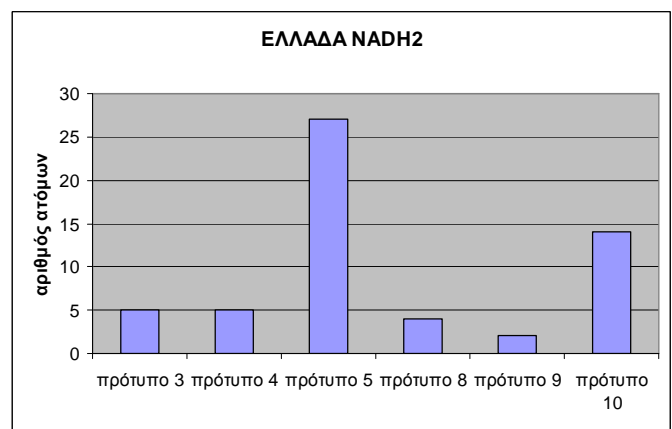


Γράφημα 4: Κατανομή δειγμάτων *Lepus europaeus* ανά ομάδα προτύπων για το γονίδιο NADH2.

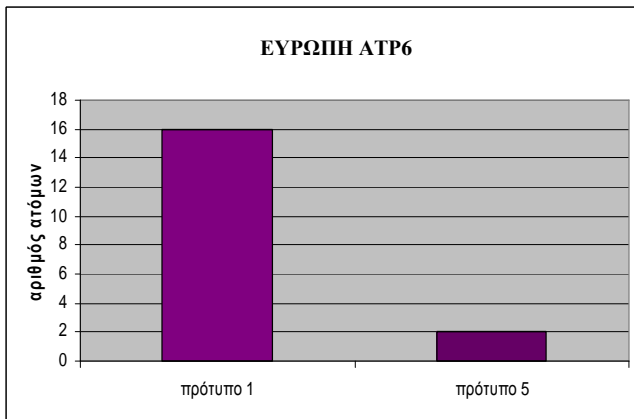
Οι ελληνικοί πληθυσμοί του είδους *Lepus europaeus* εμφάνισαν μεγαλύτερο αριθμό διαφορετικών προτύπων από τους πληθυσμούς της Ευρώπης και της Ανατολής, και στα δύο υπό μελέτη γονίδια, γεγονός που αντικατοπτρίζει πιθανώς μια μεγαλύτερη ενδοειδική ποικιλομορφία των ζώων αυτών στον ελλαδικό χώρο. Η διαφορά αυτή φαίνεται στα ακόλουθα *Γραφήματα 5, 6, 7, 8, 9 και 10*. Πιο συγκεκριμένα, μέσα στα δείγματα των *Lepus europaeus* που προέρχονται από την Ελλάδα εμφανίστηκαν όλα τα πρότυπα του γονιδίου ATP6 (πρότυπα 1 έως 7) καθώς και τα έξι από τα δέκα συνολικά πρότυπα του γονιδίου NADH2 (πρότυπα 3, 4, 5, 8, 9 και 10). Αντιθέτως, στα δείγματα που προέρχονται από την Ευρώπη εμφανίστηκαν τα δύο από τα επτά συνολικά πρότυπα του γονιδίου ATP6 (πρότυπα 1 και 5) και τα τρία από τα δέκα συνολικά πρότυπα του γονιδίου NADH2 (πρότυπα 5, 6 και 7). Τέλος, στα δείγματα του *Lepus europaeus* από την Ανατολή εμφανίστηκαν τα δύο από τα επτά πρότυπα του γονιδίου ATP6 (πρότυπα 2 και 3) και τα τέσσερα από τα δέκα πρότυπα του γονιδίου NADH2 (πρότυπα 1, 2, 3 και 4).



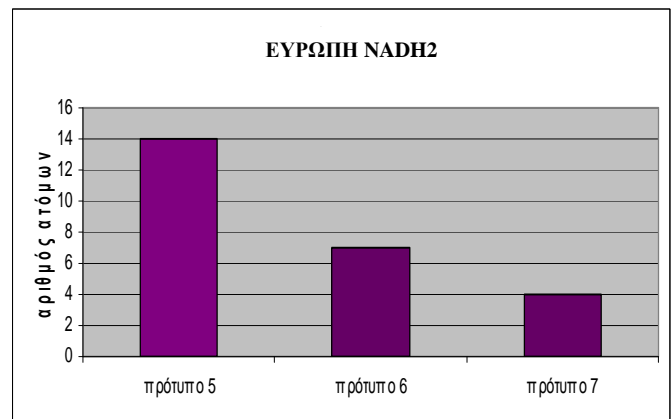
Γράφημα 5: πρότυπα γονιδίου ATP6 στην Ελλάδα



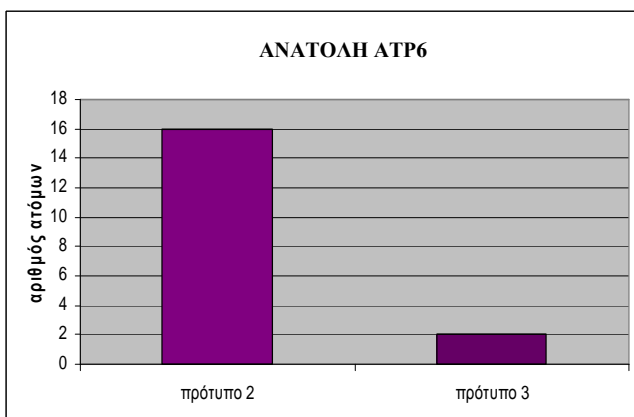
Γράφημα 6: πρότυπα γονιδίου NADH2 στην Ελλάδα



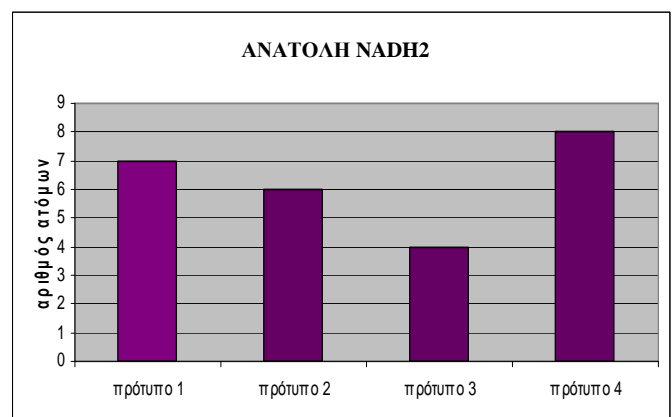
Γράφημα 7: πρότυπα γονιδίου ATP6 στην Ευρώπη



Γράφημα 8: πρότυπα γονιδίου NADH2 στην Ευρώπη



Γράφημα 9: πρότυπα γονιδίου ATP6 στην Ανατολή

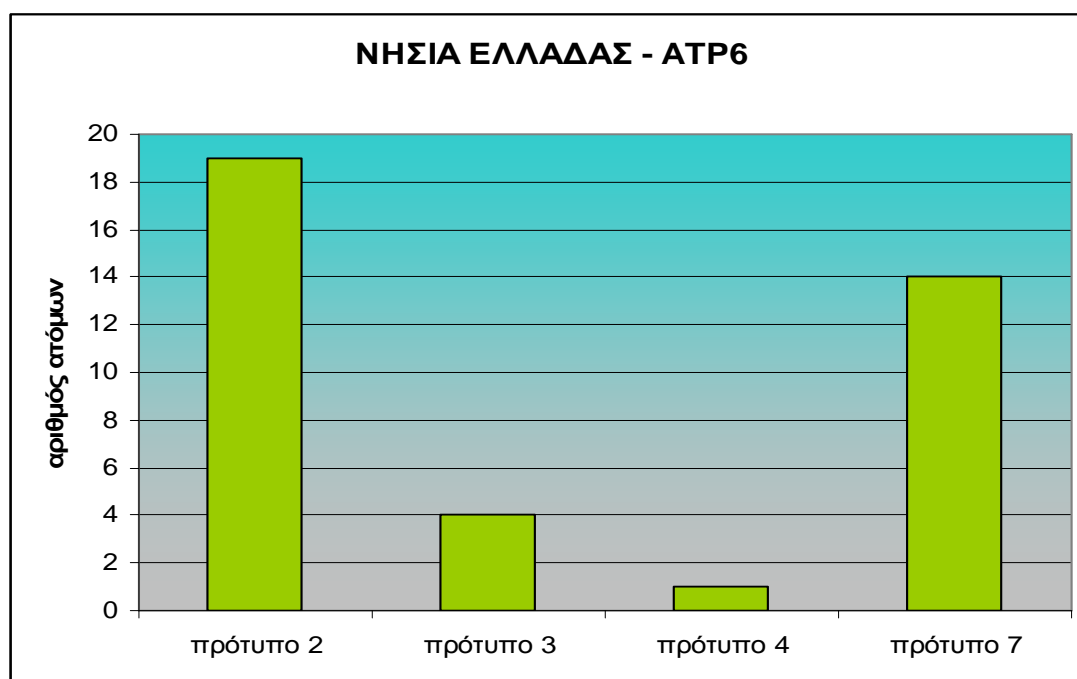


Γράφημα 10: πρότυπα γονιδίου NADH2 στην Ανατολή

Χαρακτηριστικό είναι το γεγονός ότι σε κανένα από τα δύο υπό μελέτη γονίδια δεν παρατηρούνται κοινά πρότυπα μεταξύ των ευρωπαϊκών και των ανατολικών πληθυσμών. Τα πρότυπα τα οποία εμφανίζονται στην ανατολή είναι πλήρως διαχωρισμένα από τα πρότυπα τα οποία εμφανίζονται στην Ευρώπη. Έτσι, όσον αφορά το γονίδιο ATP6, τα πρότυπα 1 και 5 θα ήταν δυνατόν να χαρακτηριστούν ‘δυτικά’ πρότυπα ενώ τα πρότυπα 2 και 3 μπορούν να χαρακτηριστούν ‘ανατολικά’ πρότυπα. Αντίστοιχα, για το γονίδιο NADH2, τα πρότυπα 5, 6 και 7 θα μπορούσαν να χαρακτηριστούν ‘δυτικά’ ενώ τα πρότυπα 1, 2, 3 και 4 μπορούν να θεωρηθούν ‘ανατολικά’ πρότυπα.

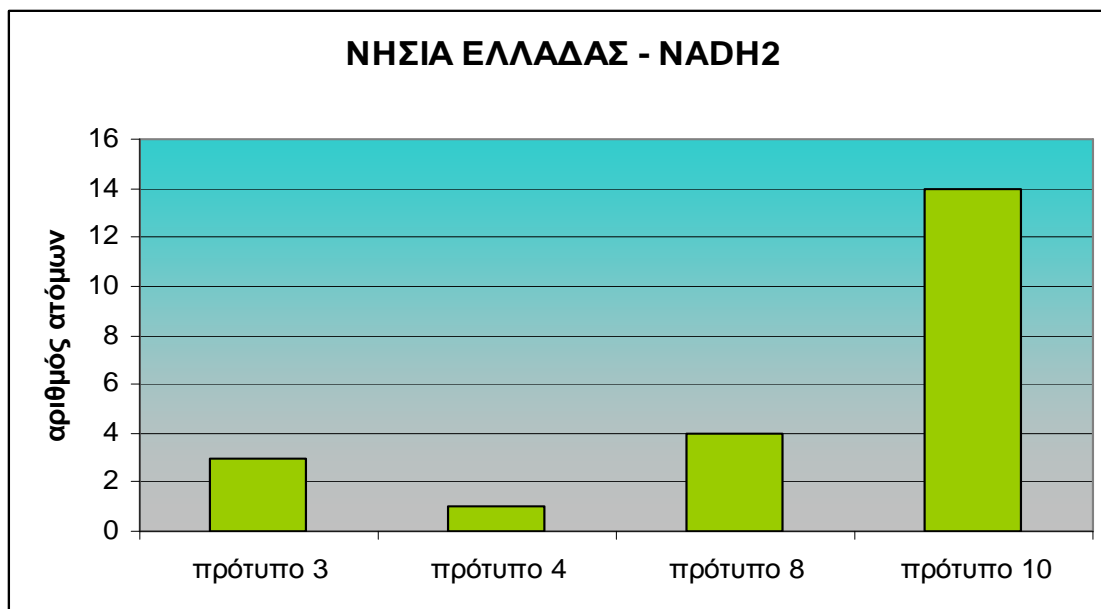
Ωστόσο, στα δείγματα ελληνικής προέλευσης του *Lepus europaeus* παρατηρείται συνδυασμός τόσο ‘ανατολικών’ όσο και ‘δυτικών’ προτύπων των δύο γονιδίων, όπως επίσης παρατηρούνται και πρότυπα τα οποία συναντώνται μόνο σε δείγματα από την Ελλάδα, όπως είναι για παράδειγμα τα πρότυπα 4, 6 και 7 για το γονίδιο ATP6 και τα πρότυπα 8, 9 και 10 για το γονίδιο NADH2.

Πιο συγκεκριμένα, όσον αφορά τα δείγματα ελληνικής προέλευσης, αξίζει να σημειωθεί ότι εκείνα που προέρχονται από νησιά του Αιγαίου (Σάμος, Χίος, Μυτιλήνη, Ρόδος) εμφάνισαν στο γονίδιο ATP6 τα πρότυπα 2, 3, 4 και 7, τα οποία φαίνονται στο *Γράφημα 11*, δηλαδή δύο πρότυπα που συναντώνται μόνο σε ελληνικές περιοχές (πρότυπα 2, 3) και δύο πρότυπα τα οποία συναντώνται και σε Ελλάδα και σε Ανατολή (πρότυπα 4, 7).



Γράφημα 11: Τα πρότυπα του γονιδίου ATP6 που εμφανίζονται στα νησιά του Αιγαίου.

Ομοίως, στο γονίδιο NADH2 τα δείγματα της ανατολικής νησιωτικής Ελλάδας εμφάνισαν τα πρότυπα 3, 4, 8 και 10, όπως φαίνεται στο *Γράφημα 12*, δηλαδή δύο πρότυπα τα οποία συναντώνται και σε Ελλάδα και σε Ανατολή (πρότυπα 3, 4) και δύο πρότυπα που συναντώνται μόνο σε ελληνικές περιοχές (πρότυπα 8, 10).



Γράφημα 12: Τα πρότυπα του γονιδίου NADH2 που εμφανίζονται στα νησιά του Αιγαίου.

Συνολικά, τόσο με τη χρήση πολυμορφισμών του γονιδίου ATP6 όσο και με τη χρήση πολυμορφισμών του γονιδίου NADH2, επιτεύχθηκε σαφής διαχωρισμός των ανατολικών και ελληνικών νησιωτικών πληθυσμών των *Lepus europaicus* από τους ευρωπαϊκούς πληθυσμούς και τους ελληνικούς πληθυσμούς της ηπειρωτικής Ελλάδας, αφού και στα δύο γονίδια οι πρώτοι εμφάνισαν τελείως διαφορετικούς συνδυασμούς πολυμορφισμών από τους δεύτερους. Επιπλέον, τα άτομα *Lepus europaicus* που προέρχονται από τα νησιά του Αιγαίου εμφάνισαν κοινούς πολυμορφισμούς με άτομα που προέρχονται από την υπόλοιπη Ελλάδα και την Ανατολή, δεν παρουσίασαν όμως κανένα πρότυπο από άτομα που προέρχονται από την κεντρική Ευρώπη.

4. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Alberts, Bruce; Alexander Johnson, Julian Lewis, Martin Raff, Keith Roberts, Peter Walter (1994). *Molecular Biology of the Cell*.

Andersson SG, Karlberg O, Canbäck B, Kurland CG (January 2003). "On the origin of mitochondria: a genomics perspective"

Avise JC, Arnold J, Ball RM et al. (1987) Intraspecific phylogeography – the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics.

Awadalla P, Eyre-Walker A, Maynard Smith J (24 December 1999). "Linkage Disequilibrium and Recombination in Hominid Mitochondrial DNA". *Science*. 286 (5449): 2524–2525.

Azanov L.A., Hinchliffe P. (2006) Structure of the hydrophilic domain of respiratory complex I from *Thermus thermophilus*. *Science* 311, 1430–1436

Ballard JWO, Whitlock MC (2004) The incomplete natural history of mitochondria. *Molecular ecology*, 13, 729-744.

Bansfield, A. (1974). *Mammals of Canada*.

Baum David (2008) *Reading a Phylogenetic Tree: The Meaning of Monophyletic Groups*.

Bonino, N., A. Montenegro (1997). Reproduction of the European hare in Pantagonia, Argentina. *Acta Theriologica*, 42(1): 47-54

Boyer, P. D. and Hutton, R. L. (1979) Subunit Interaction during Catalysis. Alternating Site Cooperativity of Mitochondrial Adenosine Triphosphatase

Brody, J.R., Kern, S.E. (2004): History and principles of conductive media for standard DNA electrophoresis. *Anal Biochem*. 333(1):1-13. PMID 15351274 PDF

Campbell, Neil A.; Brad Williamson; Robin J. Heyden (2006). *Biology: Exploring Life*. Boston, Massachusetts: Pearson Prentice Hall.

Cates Susan (2006) *Phylogenetic Trees*

Chan DC (2006). "Mitochondria: Dynamic Organelles in Disease, Aging, and Development". *Cell* 125 (7): 1241–1252. doi 23

Chien A, Edgar DB, Trela JM (1976). "Deoxyribonucleic acid polymerase from the extreme thermophile *Thermus aquaticus*".

Chinnery PF, Thornburn DN, Samuels DC et al. (2000) The inheritance of mitochondrial DNA heteroplasmy: random drift, selection or both? *Trends in genetics*, 16, 500-505.

Chipuk JE, Bouchier-Hayes L, Green DR (2006). "Mitochondrial outer membrane permeabilization during apoptosis: the innocent bystander scenario". *Cell Death and Differentiation*

Cummins J (2008). Mitochondrial DNA in mammalian reproduction. *Review of reproduction*, 3, 172-182.

- da Fonseca RR, Johnson WE, O'Brien SJ, Ramos MJ, Antunes A (2008). The adaptive evolution of the mammalian mitochondrial genome. *BMC genomics*, 9, 119.
- Diez-Sanchez C, Ruiz-Pesini E, Lapena AC et al (2003). Mitochondrial DNA content of human spermatozoa. *Biology of reproduction*, 68, 180-185.
- Doering C., Ermentrout B. and Oster G. (1995) Rotary DNA motors. Center for Nonlinear Studies, Los Alamos National Laboratory, New Mexico 87545, USA.
- Dowling D.K, Nowostawski A. L, Arnkvist G. (2007) Effects of cytoplasmic genes on sperm viability and sperm morphology in a seed beetle: implications for sperm competition theory?
- Dowling DK, Friberg U, Arnkvist G (2007a) A comparison of nuclear and cytoplasmic genetic effects on sperm competitiveness and female remating in a seed beetle. *Journal of evolutionary Biology*, 20, 358-368.
- Dowling DK, Friberg U, Lindell J (2008) Evolutionary implications of non-neutral mitochondrial genetic variation. *Trends in Ecology & Evolution*, 23, 546.
- Dragg, A. (1974) *Mammals of Ontario*. Waterloo, Ontario: Otter Press
- Duncan M. Thomas, Zhou Uantai and Cross L. Richard (1997) Subunit rotation in *Escherichia coli* FoF₁-ATP synthase during oxidative phosphorylation
- Efron Bradley, Halloran Elizabeth, and Holmes Susan (1996) Bootstrap confidence levels for phylogenetic trees.
- Fickel J, Lieckfeldt D, Pitra C (1999) Analysis of genetic diversity and structure in neighboring populations of the European brown hare (*Lepus europaeus*, Pallas 1778). *Zeitschrift für Jagdwissenschaft*, 45, 230–237.
- Froman DP, Kirman JP (2005) Sperm mobility: phenotype in roosters (*Gallus domesticus*) determined by mitochondrial function. *Biology of reproduction*, 72,562-567.
- Garrigan D, Hammer MF (2006). "Reconstructing human origins in the genomic era". *Nat. Rev. Genet.* 7 (9): 669–80.
- Gemmell NJ, Metcalf MJ, Allendorf FW (2004). Mother's curse: the effect of mtDNA on individual fitness and population viability. *Trends in ecology and evolution*, 19, 238.
- Gould SB, Waller RF, McFadden GI (2008). "Plastid evolution".
- Gresser MJ, Myers JA, Boyer PD (25 October 1982). "Catalytic site cooperativity of beef heart mitochondrial F₁ adenosine triphosphatase. Correlations of initial velocity, bound intermediate, and oxygen exchange measurements with an alternating three-site model". *J. Biol. Chem.* 257 (20): 12030–8.
- Hamilton, W., J. Whitaker. (1943) *Mammals of the Eastern United States*. 2nd ed. Ithica, NY: Cornell University Press
- Hasler K, Engelbrecht S, Junge W. (1998) Three-stepped rotation of subunits gamma and epsilon in single molecules of F₁-ATPase revealed by polarized confocal fluorometry. *FEBS Lett.* 426, 301-304.

- Hiroyuki Noji, Ryohei Yasuda, Masasuke Yoshida & Kazuhiko Kinosita Jr. (1997) Direct observation of the rotation of F1-ATPase. *Nature*, 386, 299 - 302.
- Hirst J (2005). "Energy transduction by respiratory complex I — an evaluation of current knowledge" *Biochem. Soc. Trans.* 33 (Pt 3): 525–9.
- Hoffman, Robert S.; Smith, Andrew T. (2005) Order Lagomorpha
- Holyoake AJ, McHugh P, Wu M et al. (2001) High incidence of single nucleotide substitutions in the mitochondrial genome is associated with poor semen parameters in men. *International Journal of Andrology*, 24, 175-182.
- Holyoake AJ, Sin IL, Benny PS, Sin FYT (1999) Association of a novel human mtDNA ATPase6 mutation with immature sperm cells. *Andrologia*, 31, 339-345.
- Hu CT, O'Shaughnessy KM (2001). Glycerol-enhanced mini-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of differentially expressed DNA fragments in cDNA representational difference analysis. *Electrophoresis* (6):1063-8.
- Stryer Lubert, Berg M. Jeremy, Tymoczko L. John, Βιοχημεία I (2005), Πανεπιστημιακές εκδόσεις Κρήτης
- Kaneko, M., Satta, Y., Matsuura, E.T., Chigusa, S.I. *Genet. Res.* (1993) Evolution of the mitochondrial ATPase 6 gene in *Drosophila*: unusually high level of polymorphism in *D. melanogaster*.
- 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 Phylogenetic Evolution*, 34, 55-66.
- Kimball, J.W. (2006) Sexual Reproduction in Humans: Copulation and Fertilization
- Knowles JR (1980). Enzyme-catalyzed phosphoryl transfer reactions. *Annu. Rev. Biochem.* 49: 877–919.
- Kukita, Y., et al. (1997), SSCP Analysis of Long DNA Fragments in Low pH Gel. *Human Mutation* (10): 400-7.
- Laurent O. Martinez, Sébastien Jacquet, Jean-Pierre Esteve, Corinne Rolland, Elena Cabezón, Eric Champagne, Thierry Pineau, Valérie Georgeaud, John E. Walker, François Tercé, Xavier Collet, Bertrand Perret & Ronald Barbaras (2003) Ectopic β -chain of ATP synthase is an apolipoprotein A-I receptor in hepatic HDL endocytosis. *Nature* 421, 75-79
- Lawyer FC, Stoffel S, Saiki RK, Chang SY, Landre PA, Abramson RD, Gelfand DH (1993). High-level expression, purification, and enzymatic characterization of full-length *Thermus aquaticus* DNA polymerase and a truncated form deficient in 5' to 3' exonuclease activity. *PCR Methods Appl.*
- Layne E. Spectrophotometric and Turbidimetric Methods for Measuring Proteins (1957) *Methods in Enzymology* 3: 447-455.
- Lenaz G, Fato R, Genova M, Bergamini C, Bianchi C, Biondi A (2006). "Mitochondrial Complex I: structural and functional aspects".

- Lewin Benjamin, Genes VIII (2003), Ακαδημαϊκές εκδόσεις.
- Lincoln, G. (1974). Reproduction and March madness in the Brown hare, *Lepus europaeus*. J. Zool. Lond., 174: 1-14.
- Litzenberger, G., Chapco, W. *Heredity* (2001) A molecular phylogeographic perspective on a fifty-year-old taxonomic issue in grasshopper systematics.
- Lovette Irby J., Bermingham Eldredge, Rohwer Sievert, Wood Chris (1999) Mitochondrial restriction fragment length polymorphism (RFLP) and sequence variation among closely related avian species and the genetic characterization of hybrid *Dendroica* warblers.
- Mamuris Z., Koutsogiannouli E.A, Moutou K.A., Sarafidou Th., Stamatis C., Spyrou V., (2009) Major histocompatibility complex variation at class II DQA locus 1 in the brown hare (*Lepus europaeus*)
- Mamuris Z., Sfougaris AI., Stamatis C., Suchentrunk F. (2002) Assessment of genetic structure of Greek brown hare (*Lepus europaeus*) populations based on variation in random amplified polymorphic DNA (RAPD). *Biochemical Genetics*, 40, 323-38.
- Maxie M. Roessler, Martin S. King, Alan J. Robinson, Fraser A. Armstrong, Jeffrey Harmer, Judy Hirst (2010) Direct assignment of EPR spectra to structurally defined iron-sulfur clusters in complex I by double electron–electron resonance.
- McBride HM, Neuspiel M, Wasiak S (2006). "Mitochondria: more than just a powerhouse". *Curr. Biol.* 16 (14): R551.
- Mccarty RE (November 1992). "A plant biochemist's view of H⁺-ATPases and ATP synthases". *J. Exp. Biol.* 172 (Pt 1): 431–441.
- Mitchell P, Moyle J (1967). "Chemiosmotic hypothesis of oxidative phosphorylation". *Nature* 213 (5072): 137–9.
- Omland, K.E., Lanyon, S.M., Fritz, S.J. *Mol. Phylogenet. Evol.* (1999) A molecular phylogeny of the New World orioles (*Icterus*): the importance of dense taxon sampling.
- Ozawa T (1995) Mechanism of somatic mitochondrial DNA mutations associated with age and diseases.
- Patrinos P.George, Ansorge Wilhelm, (2008) Μοριακή διαγνωστική, Επιστημονικές Εκδόσεις Παρισιανού
- Pavlov AR, Pavlova NV, Kozyavkin SA, Slesarev AI (2004). "Recent developments in the optimization of thermostable DNA polymerases for efficient applications". *Trends Biotechnol.* 22 (5): 253–260.
- Peterson, R. (1966). *The Mammals of Eastern Canada*. Oxford University Press.
- Poli, A., M. Nigro, D. Gallazi, G. Sironi, A. Lavazza. (1991). Acute hepatitis in the european brown hare (*Lepus europaeus*) in Italy. *Journal of Wildlife Diseases*, 27(4): 621-629.
- Richter C, Park J, Ames BN (1988). "Normal Oxidative Damage to Mitochondrial and Nuclear DNA is Extensive".

- Roellig K, Goeritz F, and Hildebrandt TB (2010) Ultrasonographic characterisation of prenatal development in European brown hares (*Lepus europaeus* PALLAS, 1778): an evolutionary approach.
- Roessler MM, King MS, Robinson AJ, Armstrong FA, Harmer J, Hirst J. (2010). Direct assignment of EPR spectra to structurally defined iron-sulfur clusters in complex I by double electron-electron resonance.
- Ruiz-Pesini E, Diez C, Lapena AC et al. (1998) Correlation of sperm motility with mitochondrial enzymatic activities. *Clinical Chemistry*, 44, 1616-1620.
- Ruiz-Pesini E, Mishmar D, Brandon B, Proccacio V, Wallace DC (2004) Effects of purifying and adaptive selection on regional variation in human mt DNA. *Science*, 303, 223-226.
- Rychlik W, Spencer WJ, Rhoads RE (1990). "Optimization of the annealing temperature for DNA amplification in vitro". *Nucl Acids Res* 18 (21): 6409–6412
- Sabbert D. Junge W. (1997) Stepped versus continuous rotatory motors at the molecular scale. *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.)* 94, 2312-2317.
- Saiki, RK; Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA (1988). "Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase". *Science* 239 (4839): 487–91
- Shi Q & Jackowski G, 1998. One-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis, pp 1–52 in Hames BD (ed) *Gel Electrophoresis of Proteins: A Practical Approach*, 3rd edn.
- Sambrook J, Russel DW (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* 3rd Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, NY.
- Scorpio, R. (2000). *Fundamentals of Acids, Bases, Buffers & Their Application to Biochemical Systems*.
- Sert H, Suchentrunk F, Erdogan A (2005) Genetic diversity in brown hares (*Lepus europaeus* Pallas, 1778) from Anatolia and differentiation among Anatolian and European populations. *Mammalian Biology*, 70, 171–186.
- Slimen Ben H, Suchentrunk F, Stamatis C et al. (2008) Population genetics of cape and brown hares (*Lepus capensis* and *L. europaeus*): A test of Petter's hypothesis of conspecificity. *Biochemical Systematics and Ecology*
- Smith, A.T. & Johnston, C.H. (2008) *Lepus europaeus*. In IUCN: Red List of Threatened Species. Version 2010.3
- Stamatis C, Giannouli S, Suchentrunk F et al. (2008) Recruitment of mitochondrial tRNA genes as auxiliary variability markers for both intra- and inter-species analysis: The paradigm of brown hare (*Lepus europaeus*). *Gene*, 410, 154-164.
- Stamatis C, Suchentrunk F, Moutou KA et al (2009) Phylogeography of the brown hare (*Lepus europaeus*) in Europe: a legacy of south-eastern Mediterranean refugia?, *Journal of Biogeography*, 36, 515-528
- Stellwagen, E., and Stellwagen, N.C. (2002) The free solution mobility of DNA in Tris-acetate-EDTA buffers of different concentrations, with and without added NaCl. *Electrophoresis*.

Steve Smith, Christopher Turbill, Franz Suchentrunk (2010) Introducing mother's curse: low male fertility associated with an imported mtDNA haplotype in a captive colony of brown hares. *Molecular Ecology*, 19, 36-43.

Stock, D., Leslie, A.G.W. and Walker, J.E. (1999) Molecular architecture of the Rotary Motor in ATP synthase. *Science* 286, 1700-1705

Stock Daniela, Gibbons Clyde, Arechaga Ignacio, Leslie Andrew GW and Walker John E (2000) The rotary mechanism of ATP synthase.

Taberlet P, Fumagalli L, Wust-Saucy AG, Cosson JF (1998) Comparative phylogeography and postglacial colonization routes in Europe. *Molecular Ecology* 7, 822 453-64.

Thompson 1994, CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice.

Watson, Caudy, Myers, Ανασυνδυσασμένο DNA: Γονίδια και γονιδιώματα - Μια συνοπτική παρουσίαση (2007) εκδόσεις Ι.Μπάσδρα, 3η αγγλικά έκδοση, 1η ελληνική έκδοση.

Weisrock, D.W., Harmon, L.J., Larson, A. *Syst. Biol.* (2005) Resolving deep phylogenetic relationships in salamanders: analyses of mitochondrial and nuclear genomic data.

Wise Cheryl A., Sraml Michaela and Simon Easteal (1998) Departure from Neutrality at the Mitochondrial NADH Dehydrogenase Subunit 2 Gene in Humans, but Not in Chimpanzees.

Wolfe L. Stephen (1981) *Biology of the Cell*, 2η έκδοση

Yu L., Zhang, Y.P (2005) Phylogenetic studies of pantherine cats (Felidae) based on multiple genes, with novel application of nuclear beta-fibrinogen intron 7 to carnivores.

Zeugin JA, Hartley JL (1985). Ethanol Precipitation of DNA

Zink RM, Barrowclough GF (2008) Mitochondrial DNA under siege in avian phylogeography. *Molecular ecology*, 17, 2107-2121.

Αντωνίου Αγλαΐα, (2008) Διερεύνηση της εξελικτικής ιστορίας του Ευρωπαϊκού λαγού (*Lepus europaeus*) στη βάλκανική, *Πανεπιστήμιο Κρήτης*