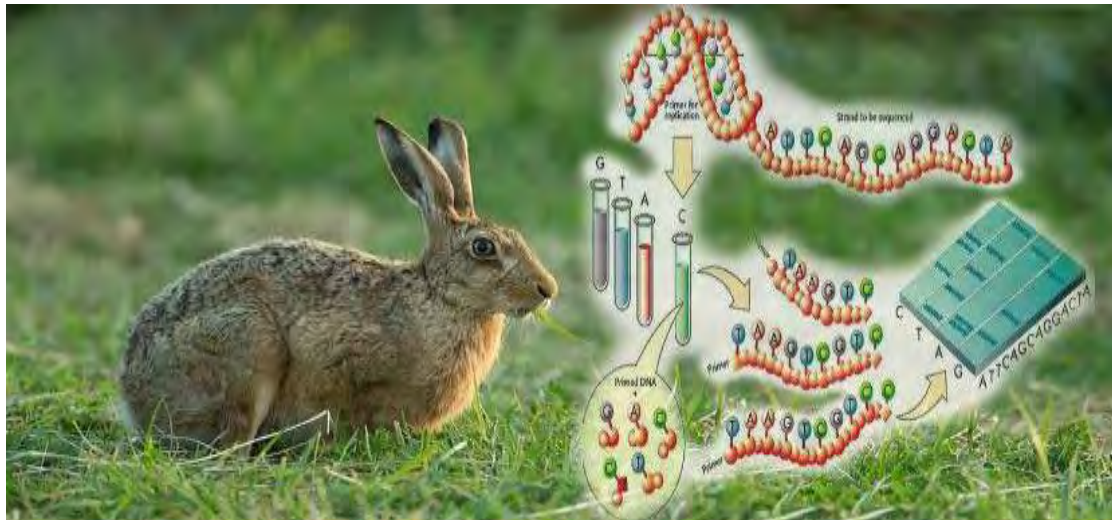




ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

**Ανάλυση του παράγοντα *COX7A1* της
οξειδωτικής φωσφορυλίωσης στο είδος
*Lepus europaeus***



Κυριακίδου Πελαγία

Πτυχιακή εργασία

Λάρισα 2013



UNIVERSITY OF THESSALY

DEPARTMENT OF BIOCHEMISTRY AND BIOTECHNOLOGY

Analysis of factor *COX7A1* of oxidative phosphorylation in *Lepus europaeus*

Kiriakidou Pelagia

Diploma Thesis

Larissa 2013

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Γενετικής, Συγκριτικής και Εξελικτικής Βιολογίας του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας (ΤΒΒ), στο Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Μαμούρης Ζήσης (επιβλέπων) : Καθηγητής Γενετικής Ζωικών Πληθυσμών του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Σαραφίδου Θεολογία : Λέκτορας Μοριακής Γενετικής Ζωικών Οργανισμών του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Ψαρρά Άννα-Μαρία : Επίκουρος Καθηγήτρια Βιοχημείας του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Ευχαριστίες :

Η παρούσα διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Γενετικής, Συγκριτικής και Εξελικτικής Βιολογίας του τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, υπό την επίβλεψη του Καθηγητή Γενετικής Ζωικών Πληθυσμών, κ. Ζήση Μαμούρη, τον οποίο θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα που μου εμπιστεύτηκε την εκτέλεση αυτής της εργασίας και για το χρόνο που διέθεσε για την ολοκλήρωση αυτής. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω την Λέκτορα Μοριακής Γενετικής Ζωικών Οργανισμών ,κ. Σαραφίδου Θεολογία καθώς και την Επίκουρο Καθηγήτρια Βιοχημείας ,κ. Ψαρρά Άννα-Μαρία για την συμμετοχή στην τριμελή συμβουλευτική επιτροπή. Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω τον διδάκτορα Σταμάτη Κωνσταντίνο και την υποψήφια διδάκτορα Σαρρή Κωνσταντίνα για την βοήθειά τους κατά την εκτέλεση των πειραμάτων. Θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα τον υποψήφιο διδάκτορα Γιαννούλη Θεμιστοκλή για την καθοδήγηση, τις χρήσιμες συμβουλές του και το ενδιαφέρον που έδειξε τόσο καθ'ολη τη διάρκεια της εκτέλεσης του πειραματικού μέρους όσο και κατά τη συγγραφή της εργασίας.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω και τα υπόλοιπα μέλη του εργαστηρίου τα οποία ήταν ιδιαίτερα συνεργάσιμα όλο αυτό το διάστημα της πραγματοποίησης των πειραμάτων και ιδιαίτερα την Μαρκαντώνη Μαρία και το Φάσσο Ιωακείμ για την πολύτιμη βοήθειά τους χωρίς να χρειάζεται να την επικαλεστώ.

Τέλος, ευχαριστώ θερμά τις φίλες μου Ευαγγελία, Ιουλιέττα και Ιωάννα για την έμπρακτη καθημερινή τους υποστήριξη συμβάλλοντας με το δικό τους ξεχωριστό τρόπο στην ολοκλήρωση της συγγραφής.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Περίληψη.....	1
Summary.....	3
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	5
1.1 Φυλογεωγραφία.....	5
1.2 Το είδος <i>Lepus europaeus</i> Pallas 1778.....	7
1.2.1 Μορφολογικά χαρακτηριστικά.....	7
1.2.2 Συστηματική κατάταξη.....	7
1.2.3 Φυσική περιγραφή.....	8
1.2.4 Γεωγραφική εξάπλωση.....	8
1.2.5 Ερευνητική σημασία.....	9
1.2.6 Μοριακές πληθυσμιακές μελέτες στην Ευρώπη.....	9
1.3 Μιτοχόνδρια.....	10
1.3.1 Λειτουργία.....	10
1.3.2 Δομή.....	11
1.3.3 Ενδοσυμβιωτική θεωρία προέλευσης.....	13
1.4 Συνεξέλιξη.....	15
1.5 Οξειδωτική φωσφορυλίωση.....	16
1.6 Γονίδιο <i>COX7A1</i> : cytochrome c oxidase subunit VIIa 1.....	19
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	19
2.1 Συλλογή δειγμάτων.....	19
2.2 Προετοιμασία δειγμάτων.....	20
2.3 Ποσοτικοποίηση DNA.....	23

2.4	Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)	24
2.5	Ηλεκτροφόρηση.....	27
2.6	Ηλεκτροφόρηση σε πηκτική αγαρόζη.....	27
2.7	Ανάλυση πολυμορφισμού διαμόρφωσης μονόκλωνης αλυσίδας (Single Strand Conformation Polymorphism)	29
2.7.1	Αποδιάταξη προϊόντων PCR.....	29
2.7.2	Παρασκευή πηκτής πολυακρυλαμίδης.....	30
2.7.3	Χρώση των πηκτών πολυακρυλαμίδης με νιτρικό άργυρο (Silver Staining).....	32
2.8	Αλληλούχηση διαφορετικών προτύπων SSCP.....	34
2.9	Ανάλυση χρωματογραφημάτων αλληλούχησης.....	34
2.10	Σύγκριση αλληλουχιών – Φυλογενετική ανάλυση.....	35
3.	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	36
3.1	Απομόνωση DNA.....	36
3.2	PCR.....	36
3.3	SSCP.....	37
3.4	Αλληλούχηση.....	42
3.5	Επεξεργασία των στοιχισμένων αλληλουχιών.....	46
3.6	Εκτίμηση γενετικών αποστάσεων.....	46
3.7	Αμινοξική ανάλυση.....	48
4.	ΣΥΖΗΤΗΣΗ	49
4.1	Γενικά.....	49
4.2	Πλήθος αλληλομόρφων.....	50
4.3	Περαιτέρω έρευνα.....	51
	<u>Βιβλιογραφία</u>	54

Περίληψη

Ανάλυση του παράγοντα *COX7A1* της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης στο είδος *Lepus europaeus*

Η ανάλυση της γενετικής πληροφορίας που εμπεριέχεται σε ολόκληρο το γονιδίωμα των οργανισμών αποτελεί κομβικό σημείο στη διερεύνηση των εξελικτικών διαδικασιών που έλαβαν χώρα στο παρελθόν και διαμόρφωσαν το σημερινό πρότυπο βιοποικιλότητας. Ωστόσο, αυτός ο τρόπος διερεύνησης και ανίχνευσης των διαδικασιών εξέλιξης θεωρείται προς το παρόν οικονομικά απρόσιτος και ως ένα επίπεδο αδύνατος. Επομένως, αντί της ανάλυσης ολόκληρου του γονιδιώματος πραγματοποιείται αλληλούχηση και μελέτη μικρών τμημάτων του γονιδιώματος σε έναν μεγάλο αριθμό δειγμάτων, κάτι που για την πλειονότητα των ερευνητικών εργαστηρίων είναι οικονομικά ανεκτό. Ωστόσο, υπάρχει ο κίνδυνος τα αποτελέσματα αυτών των μελετών εξέλιξης να είναι λανθασμένα και παραπλανητικά επειδή τα συγκεκριμένα συμπεράσματα εξάγονται με την παραδοχή ότι τα συγκεκριμένα τμήματα του γονιδιώματος που χρησιμοποιούνται είναι αντιπροσωπευτικά όλου του γονιδιώματος, ότι τα δείγματα των οργανισμών είναι αντιπροσωπευτικά ολόκληρου του πληθυσμού και χωρίς να γνωρίζουμε τις διαδικασίες συγκλίνουσας εξέλιξης. Τα τελευταία χρόνια χρησιμοποιείται σε τέτοιου είδους αναλύσεις το μιτοχονδριακό DNA (mtDNA) ως γενετικός δείκτης και λιγότερο συχνά το πυρηνικό DNA. Τα γονίδια του πυρηνικού και του μιτοχονδριακού γονιδιώματος παρουσιάζουν συνήθως διαφορετικές φυλογενέσεις που πιθανώς να οφείλονται στις αποκλίνουσες εξελικτικές πιέσεις στις οποίες υποβάλλονται. Ωστόσο παρατηρείται συνεξέλιξη μεταξύ πυρηνικού και μιτοχονδριακού DNA και συγκεκριμένα στα γονίδια εκείνα του πυρηνικού γονιδιώματος των οποίων τα προϊόντα στοχεύονται στο μιτοχόνδριο και αλληλεπιδρούν με μιτοχονδριακές πρωτεΐνες. Στα πλαίσια αυτά και προκειμένου να ελέγξουμε τις φυλογενετικές σχέσεις διαφόρων πληθυσμών του Ευρωπαϊκού λαγού στη Βαλκανική, πραγματοποιήσαμε αλληλούχηση τμήματος του πυρηνικού γονιδίου *COX7A1* (που κωδικοποιεί την κυτοχρωματική οξειδάση που στοχεύεται στο μιτοχόνδριο), αντιπροσωπευτικών δειγμάτων των υπό μελέτη δειγματοληπτικών περιοχών. Η

λεπτομερής μελέτη της ποικιλότητας που παρουσιάζει το είδος στον ευρύτερο χώρο της Βαλκανικής έχει ως απώτερο στόχο τη διερεύνηση της πρόσφατης εξελικτικής του ιστορίας. Αυτή η περιοχή δειγματοληψίας χαρακτηρίζεται από μια πολύπλοκη γεωλογική και κλιματική ιστορία, η οποία έχει επηρεάσει ή διαμορφώσει τη φυλογένεση και τη βιογεωγραφία πολλών οργανισμών. Συνολικά χρησιμοποιήθηκαν 20 δείγματα από τις περιοχές της Κύπρου, Δανίας, Γαλλίας, Γερμανίας, Ελλάδας και Τουρκίας ενώ ως μοριακοί δείκτες χρησιμοποιήθηκαν τα δύο από τα τρία εξώνια του πυρηνικού γονιδίου *COX2A1* τα οποία πολλαπλασιάστηκαν μέσω της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR). Ακολούθηθηκε αλληλούχηση και βασικές μέθοδοι φυλογενετικής ανάλυσης .

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης, παρατηρείται μια αδυναμία του πυρηνικού δείκτη να διακρίνει τις εξελικτικές γραμμές ενδοειδικά γεγονός που μπορεί να οφείλεται στην ελλιπή δειγματοληψία για τη διατύπωση ολοκληρωμένων συμπερασμάτων σε συνδυασμό με τον τρόπο διασποράς των ατόμων του είδους και της πίεσης της φυσικής επιλογής όσον αφορά τους παράγοντες αναπαραγωγής.

Summary

Analysis of factor *COX7A1* of oxidative phosphorylation in *Lepus europaeus*.

The analysis of genetic information contained in the entire genome of organisms is a key point in investigating the evolutionary processes that occurred in the past and shaped the current pattern of biodiversity. However, this way of investigating and detecting the evolution process is currently considered economically inaccessible and kind of impossible. Therefore, instead of analyzing the whole genome, it is preferable to sequence and study small portions of the genome of a large number of samples, which is economically acceptable for the majority of research laboratories. However, there is a risk that the results of these evolution studies are false and misleading because such conclusions can be drawn with the assumption that the sections of the genome that are used are representative of the whole genome, the specimens organizations are representative of the whole population and without knowing if there are procedures of convergent evolution. In recent years, mitochondrial DNA (mtDNA) is used as a genetic marker more frequently than the nuclear DNA in these evolution studies. The genes of the nuclear and mitochondrial genome typically exhibit different phylogenies that may be due to the divergent evolutionary pressures incurred. However it is observed that there is coevolution between nuclear and mitochondrial DNA genes, namely those of the nuclear genome of which the products are targeted to mitochondria and interact with mitochondrial proteins. In this context and in order to test the phylogenetic relationships of different populations of the European hare in the Balkans, we performed sequencing of the nuclear gene *COX7A1* (which encodes cytochrome oxidase of mitochondria) of representative samples of the studied sample areas. A detailed study of the diversity of *Lepus europaeus* in the wider Balkan region is aiming to investigate the recent evolutionary history. This area is characterized by a complex geological and climatic history that has affected or formed the phylogeny and biogeography of several organisms. In total, 20 specimens were used from Cyprus, Denmark, France, Germany, Greece and Turkey while two of the three exons of the nuclear gene *COX7A1* were chosen as markers which were amplified via the polymerase chain reaction (PCR). Sequencing and basic methods of

phylogenetic analysis were followed. According to the results of the present study, the nuclear-marker phylogeny does not distinguish the evolutionary lineages intraspecific which may be due to incomplete sampling for an integrated findings combined with the dispersal factors and pressure of natural selection.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1. Φυλογεωγραφία

Η φυλογεωγραφία είναι η επιστημονική περιοχή που ασχολείται με τη μελέτη της γεωγραφικής εξάπλωσης των γενεαλογικών γραμμών εντός ενός είδους ή μεταξύ στενά συγγενικών ειδών. Λαμβάνει υπόψη το σύνολο των ιστορικών και φυλογενετικών παραγόντων της χωρικής κατανομής των γονιδιακών γενεαλογικών γραμμών ώστε να αναδειχθεί η εξελικτική προέλευση και η βιογεωγραφική ιστορία των μελετώμενων πληθυσμών, υποειδών ή ειδών (Avisé 2000).

Τα είδη αποτελούνται από γεωγραφικά δομημένους πληθυσμούς, μερικοί από τους οποίους μπορεί να έχουν μικρή ή καθόλου γενετική επαφή για μεγάλο χρονικό διάστημα. Άλλα είδη πάλι χαρακτηρίζονται από σχετικά πρόσφατη επέκταση της κατανομής τους, με αποτέλεσμα οι πληθυσμοί τους να συνδέονται πολύ στενά μεταξύ τους. Η ιστορική και η σύγχρονη δημογραφία μπορεί να επηρεάσει τη χωρική δομή των πληθυσμών ενός είδους και ως εκ τούτου να επηρεάσει με πολλούς τρόπους την ενδοειδική γενεαλογία (Poulakakis N 2011).

Η φυλογεωγραφία βρίσκεται σε ένα κρίσιμο σταυροδρόμι μεταξύ μικροεξελικτικών και μακροεξελικτικών αρχών, τις οποίες και προσπαθεί να συγκεράσει χρησιμοποιώντας δεδομένα από τη γεωλογία, τη μοριακή και την πληθυσμιακή γενετική, την ηθολογία, τη φυλογένεση, τη δημογραφία, την παλαιοντολογία, τη γεωλογία και την ιστορική γεωγραφία (**Εικόνα 1**). Οι φυλογεωγραφικές μελέτες προσπαθούν να ερμηνεύσουν τον τρόπο και το βαθμό στον οποίο οι διάφορες ιστορικές διαδικασίες που σχετίζονται με τη δημογραφία των πληθυσμών, έχουν αφήσει τα εξελικτικά τους αποτυπώματα στη σύγχρονη γεωγραφική κατανομή των γονιδιακών γραμμών των οργανισμών (Avisé 2000).



Εικόνα 1. Η φυλογεωγραφία εδράζεται σε ένα κρίσιμο σταυροδρόμι μεταξύ πολύ καλά προσδιορισμένων ερευνητικών πεδίων (τροποποιημένο από Avise 2000)

Με δεδομένο ότι η δομή των γενεαλογιών των πληθυσμών επηρεάζεται από τη δημογραφική τους ιστορία, οι φυλογεωγράφοι, με προσεκτική δειγματοληψία και κατάλληλη επιλογή γενετικών δεικτών, μπορούν να διερευνήσουν τις ιστορικές αλλαγές που συντελούνται στο φυσικό περιβάλλον των πληθυσμών, χρησιμοποιώντας τη σημερινή γενετική τους πληροφορία (Beheregaray 2008).

Στην παρούσα μελέτη εξετάζεται η ενδοειδική γενεαλογία του ευρωπαϊκού λαγού (*Lepus europaeus*) σε μια φυλογεωγραφική προσέγγιση με ανάλυση του πυρηνικού γονιδίου *COX7A1* και μελετώντας τις νουκλεοτιδικές διαφορές στα δείγματα.

1.2. Το είδος *Lepus europaeus* Pallas 1778

1.2.1.Μορφολογικά χαρακτηριστικά

Ο Ευρωπαϊκός λαγός (*Lepus europaeus*) προήλθε από τα ανοιχτά λιβάδια στέπας της Ευρασίας και προσαρμόστηκε με μεγάλη επιτυχία σε περιοχές μικτής καλλιέργειας (Frylestam 1980). Το συνολικό μήκος του κυμαίνεται από 60 έως 75 cm και ζυγίζει από 3 έως 5 κιλά (Hall and Keelson 1959). Το χρώμα του είναι καστανόγκριζο έως γκρίζο καφέ , εκτός από την περιοχή της κοιλιάς που είναι γκρι-άσπρη. Το κεφάλι έχει καφέ αποχρώσεις με πιο ανοιχτόχρωμους κύκλους γύρω από τα μάτια. Έχει μακριά αυτιά , τα πίσω πόδια του είναι πιο μακριά από τα μπροστινά , ενώ τα πέλματά του καλύπτονται από παχύ τρίχωμα για να εμποδίζουν την ολίσθηση. Η ουρά , με μήκος συνήθως 7-11 cm , είναι μαύρη στο επάνω μέρος της και άσπρη στο κάτω.

1.2.2.Συστηματική κατάταξη

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

Πίνακας 1. Συστηματική κατάταξη του *Lepus europaeus*

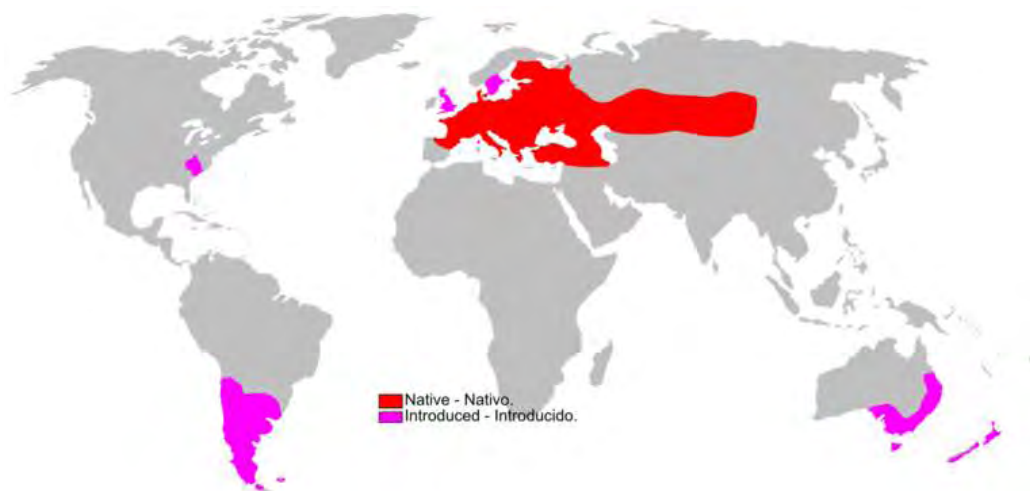
1.2.3. Φυσική περιγραφή



Εικόνα 2. Φυσική περιγραφή *Lepus europaeus*

1.2.4. Γεωγραφική εξάπλωση

Η φυσική κατανομή του Ευρωπαϊκού λαγού καλύπτει το μεγαλύτερο τμήμα της Ευρώπης και της ανατολικής Μ. Ασίας και Κεντρικής Ασίας (Lincoln 1974 , Broekhuizen ,S & Maaskamp ,F.1980 , Caillol 1988). Ωστόσο, εξαιτίας της σημαντικότητάς του ως θηρεύσιμο είδος έχουν παρατηρηθεί επιτυχημένες εισαγωγές πληθυσμών του σε περιοχές της Αμερικής , Αυστραλίας και Νέας Ζηλανδίας (Caillol et al 1988) (**Εικόνα 3**) .



Εικόνα 3. Παγκόσμια κατανομή του *Lepus europaeus*

1.2.5. Ερευνητική σημασία

Ο ευρωπαϊκός λαγός είναι ένα από τα πιο δημοφιλή θηράματα στην Ευρώπη και ιδιαίτερα στη βαλκανική χερσόνησο και την Ελλάδα . Αποτελεί ένα είδος-μοντέλο λόγω της εκτεταμένης κατανομής του και του γεγονότος ότι ανταποκρίνεται ταχύτατα στις αλλαγές ενδιαιτημάτων του. Επομένως, μέσω της μελέτης του μπορούμε να αντλήσουμε σημαντικές πληροφορίες για τη βιολογία και την πληθυσμιακή δομή των άγριων πληθυσμών πολλών θηλαστικών.

1.2.6. Μοριακές πληθυσμιακές μελέτες στην Ευρώπη

Η γνώση της γενετικής ποικιλότητας του ευρωπαϊκού λαγού αποτελεί ένα πολύ σημαντικό εργαλείο για την κατανόηση της πληθυσμιακής δομής και δυναμικής αυτού του είδους υπό διαφορετικές περιβαλλοντικές συνθήκες , Παρόλο που το είδος *L.europeus* είναι αρκετά διαδεδομένο στην Ευρώπη , οι μελέτες που σχετίζονται με την πληθυσμιακή δομή τόσο αυτού του είδους , όσο και άλλων ειδών της οικογένειας Leporidae και βασίζονται σε μοριακούς δείκτες είναι περιορισμένες (Stamatis et al 2011) .

Οι μελέτες αυτές χρησιμοποιούν μοριακούς δείκτες τόσο σε επίπεδο πρωτεϊνών όσο και σε επίπεδο DNA (πυρηνικού και μιτοχονδριακού). Οι μοριακές φυλογενετικές μελέτες στηρίζονται συνήθως στη χρήση μιτοχονδριακών γονιδίων. Παρόλα τα πλεονεκτήματα που παρουσιάζει το μιτοχονδριακό γονιδίωμα ως πηγή μοριακών δεικτών, τα τελευταία χρόνια και οι πυρηνικοί γενετικοί τόποι απολαμβάνουν την ίδια αποδοχή, όπως υποδηλώνει ο ολοένα αυξανόμενος αριθμός μελετών που δημοσιεύονται και χρησιμοποιούν ως φυλογενετικούς δείκτες πυρηνικές αλληλουχίες. Αν και το μιτοχονδριακό γονιδίωμα είναι εύκολο στον πολλαπλασιασμό και εξελίσσεται γρήγορα, ωστόσο επειδή κληρονομείται ως ενιαία μονάδα έχει ως αποτέλεσμα τα γονίδια που περιλαμβάνει να μην θεωρούνται ως ανεξάρτητες πηγές φυλογενετικής πληροφορίας. Αντίθετα, τα πυρηνικά γονίδια περιλαμβάνουν και μη κωδικές περιοχές προσφέροντας έτσι μία πληθώρα ανεξάρτητων δεικτών, οι οποίοι εξελίσσονται με διαφορετικούς ρυθμούς, καθιστώντας το χρήσιμο εργαλείο για τη μελέτη των φυλογενετικών σχέσεων μεταξύ συγγενών ειδών (Harrison 1989).

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιείται το πυρηνικό γονίδιο *COX7A1* για να διαπιστωθεί αν παρατηρούνται τυχόν αλλαγές σε επίπεδο νουκλεοτιδίων ανάμεσα σε δείγματα ευρωπαϊκού λαγού από διαφορετικές γεωγραφικές περιοχές. Το πρωτεϊνικό προϊόν του γονιδίου *COX7A1* είναι απαραίτητο για την οξειδωτική φωσφορυλίωση στα μιτοχόνδρια.

1.3. Μιτοχόνδρια

1.3.1. Λειτουργία

Όλα τα ζωικά κύτταρα προσλαμβάνουν ενέργεια από το περιβάλλον από την οξείδωση των υδατανθράκων, λιπών και πρωτεϊνών, με σύγχρονη παραγωγή διοξειδίου του άνθρακα και νερού. Οι κυριότερες μεταβολικές οδοί για τη μετατροπή της ενέργειας των τροφών σε κυτταρική ενέργεια, δηλαδή για σχηματισμό τριφωσφορικής αδενοσίνης (ATP), είναι ο κύκλος του τρικαρβοξυλικού οξέος και η

οξειδωτική φωσφορυλίωση. Και οι δύο αυτές μεταβολικές οδοί γίνονται στα μιτοχόνδρια των κυττάρων. Τα μιτοχόνδρια υπάρχουν σε όλα τα ευκαρυωτικά κύτταρα (φωτοσυνθετικά και μη) , με εξαίρεση τα ώριμα ερυθρά αιμοσφαίρια. Είναι τα οργανίδια στα οποία γίνεται μετατροπή της ενέργειας σε μορφή που να μπορεί να αξιοποιηθεί για τις διάφορες λειτουργίες του κυττάρου (McBride et al 2006).

1.3.2. Δομή

Το σχήμα των μιτοχονδρίων μπορεί να είναι επίμηκες , σφαιρικό ή ωοειδές. Η περιεκτικότητα του κάθε κυττάρου σε μιτοχόνδρια ποικίλλει και μπορεί να φτάσει μέχρι και το 25% του συνολικού του όγκου, γεγονός που εξαρτάται από τις ενεργειακές του ανάγκες. Γενικώς, κύτταρα που έχουν υψηλές απαιτήσεις σε χημική ενέργεια , όπως τα μυϊκά , έχουν και μεγάλη περιεκτικότητα σε μεγάλα και επιμηκυσμένα μιτοχόνδρια , ενώ κύτταρα με μικρότερες ενεργειακές απαιτήσεις όπως τα λευκά αιμοσφαίρια έχουν μικρότερο αριθμό μιτοχονδρίων.

Το μιτοχόνδριο χωρίζεται σε τέσσερα υπό-διαμερίσματα , δύο μεμβρανικά (εξωτερική και εσωτερική μεμβράνη) και δύο υδατικά (διαμεμβρανικός χώρος, στρώμα ή μήτρα). Κάθε διαμέρισμα του μιτοχονδρίου επιτελεί διαφορετικές λειτουργίες και αποτελείται από μία ξεχωριστή ομάδα πρωτεϊνών.

- Η εξωτερική μεμβράνη (OMM:Outer Mitochondrial Membrane) είναι αρκετά πορώδης και επιτρέπει την είσοδο και έξοδο στα περισσότερα ιόντα και σε μικρά μόρια.

- Η εσωτερική μεμβράνη (IMM:Inner Mitochondrial Membrane) είναι λιγότερο διαπερατή σε σχέση με την εξωτερική. Η μετακίνηση ιόντων δια μέσου αυτής απαιτεί την ύπαρξη πρωτεϊνών-μεταφορέων ή άλλων ειδικών συστημάτων μεταφοράς. Υποστηρίζεται πως ένα συγκεκριμένο φωσφολιπιδίο, η καρδιολιπίνη, που βρίσκεται στην εσωτερική μεμβράνη παίζει σημαντικό ρόλο στην μείωση της διαπερατότητας της από τα περισσότερα μικρομόρια που κατάφεραν να διαπεράσουν την εξωτερική μεμβράνη και βρίσκονται στο διαμεμβρανικό διάστημα (McMillin and Dowhan 2002).

Η εσωτερική μεμβράνη παρουσιάζει αναδιπλώσεις-εγκολπώσεις προς το εσωτερικό του μιτοχονδρίου, που ονομάζονται ακρολόφια - πτυχές, για τη μεγαλύτερη δυνατή αύξηση της λειτουργικής της επιφάνειας. Στις πτυχές αυτές εντοπίζονται διάφορα ένζυμα όπως μεταφορείς, δεϋδρογονάσες, πρωτεΐνες και ένζυμα απαραίτητα για την οξειδωτική φωσφορυλίωση. Η εσωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων έχει τη μεγαλύτερη πυκνότητα πρωτεϊνών από οποιαδήποτε άλλο μεμβρανικό σύστημα.

Ένα από τα υδατικά υπό-διαμερίσματα των μιτοχονδρίων είναι αυτό του διαμεμβρανικού-διάμεσου χώρου. Πρόκειται για τον χώρο που δημιουργείται μεταξύ εξωτερικής και εσωτερικής μεμβράνης και διαθέτει 2 ένζυμα που παίζουν καθοριστικό ρόλο για το μεταβολισμό: την αδενυλική κινάση και τη νουκλεοσιδική-διφωσφορική κινάση. Επιτρέπουν την αμφίδρομη μετατροπή όλων των νουκλεοτιδίων της αδενοσίνης. Το αν θα σχηματιστεί το ένα ή το άλλο μόριο, εξαρτάται από τη σχετική πυκνότητα του καθενός από αυτά. Μια από τις κυριότερες λειτουργίες των μιτοχονδρίων που είναι η παραγωγή ενέργειας με τη μορφή ATP που γίνεται μέσω του κύκλου του Krebs και την αναπνευστικής αλυσίδας πραγματοποιείται στην εσωτερική μεμβράνη και την μήτρα.

Η μήτρα είναι το δεύτερο υδατικό υπό-διαμέρισμα των μιτοχονδρίων και είναι η ρευστή μάζα που βρίσκεται μέσα από την εσωτερική μεμβράνη. Στη μήτρα λαμβάνει χώρα και η βιοσύνθεση των συμπλόκων σιδήρου-θείου, μία διαδικασία απαραίτητη για την επιβίωση του οργανισμού.

1.3.3. Ενδοσυμβιωτική θεωρία προέλευσης

Τα μιτοχόνδρια έχουν δικό τους DNA που τους εξασφαλίζει σχετική γενετική αυτοδυναμία και διαθέτουν ανεξάρτητο κύκλο αναπαραγωγής και γι αυτό χαρακτηρίζονται ως ημιαυτόνομα. Χάρη σε αυτό το μηχανισμό μπορούν να παράγουν ορισμένες πρωτεΐνες και να διπλασιάζονται ανεξάρτητα από το διπλασιασμό-διαίρεση του κυττάρου.

Η σχετική αυτοδυναμία που διαθέτουν τα μιτοχόνδρια κάνει τους επιστήμονες να υποθέτουν πως προέρχονται από προκαρυωτικούς οργανισμούς οι οποίοι ενσωματώθηκαν σε ευκαρυωτικά κύτταρα συμβιώνοντας με αυτά (θεωρία ενδοσυμβίωσης).

Η πιο ευρέως αποδεκτή θεωρία για την προέλευση των μιτοχονδρίων (καθώς και άλλων ενδοκυτταρικών οργανιδίων όπως οι χλωροπλάστες) είναι η ενδοσυμβιωτική θεωρία. Σύμφωνα με τη θεωρία της ενδοσυμβίωσης, τα μιτοχόνδρια πιθανότατα έχουν προέλθει από ένα α-πρωτεοβακτήριο που εισέβαλλε σε ένα ευκαρυωτικό κύτταρο περίπου πριν από ενάμιση δισεκατομμύριο χρόνια (Esser 2007).

Πιο συγκεκριμένα, πιστεύεται ότι τα μιτοχόνδρια ήταν αρχικά ανεξάρτητοι προκαρυωτικοί οργανισμοί (πιθανώς απόγονοι βακτηρίων) τα οποία παγιδεύτηκαν στο κυτταρόπλασμα αναερόβιων ευκαρυωτικών κυττάρων παρέχοντας στα κύτταρα ενέργεια με αντάλλαγμα ένα πιο ασφαλές περιβάλλον και την παροχή θρεπτικών στοιχείων (Sagan 1967).

Η εξωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων πιθανότατα προέρχεται από την εξωτερική μεμβράνη των ευκαρυωτικών κυττάρων με τα οποία συμβίωναν ενώ η εσωτερική μεμβράνη από την αρχική μεμβράνη των παγιδευμένων βακτηρίων.

Η ενδοσυμβιωτική θεωρία προέλευσης των μιτοχονδρίων υποστηρίζεται και ισχυροποιείται από τα εξής:

- Οι 2 μεμβράνες των μιτοχονδρίων έχουν διαφορετική σύσταση και αναλογία φωσφολιπιδίων/πρωτεϊνών με τη σύσταση της εσωτερικής μεμβράνης των μιτοχονδρίων να είναι παρόμοια με εκείνη των προκαρυωτικών κυττάρων, γεγονός που επιβεβαιώνει το ότι τα μιτοχόνδρια ήταν απόγονοι βακτηρίων. Επίσης έχουν παρόμοιο μέγεθος με τα βακτήρια.
- Το μιτοχονδριακό DNA είναι κυκλικό (με τη μορφή πλασμιδίου) , όπως και αυτό των βακτηρίων , σε αντίθεση με το γενετικό υλικό του πυρήνα που είναι οργανωμένο και πακεταρισμένο σε χρωμοσώματα.
- Τα ριβοσώματα των μιτοχονδρίων έχουν παρόμοια δομή με τα αντίστοιχα των βακτηρίων.
- Μιτοχόνδρια και βακτήρια αναπαράγονται με τον ίδιο τρόπο , με διχοτόμηση.

Σύμφωνα με την ενδοσυμβιωτική θεωρία εξηγείται και η ύπαρξη γενετικού υλικού στα μιτοχόνδρια. Τα μιτοχόνδρια είναι ημιαυτόνομα οργανίδια γιατί διαθέτουν το δικό τους γενετικό υλικό έτσι ώστε να μπορούν να αναπαράγονται χωρίς να χρειάζεται να διαιρεθεί το κύτταρο. Παρόλα αυτά μόνο το 1% των μιτοχονδριακών πρωτεϊνών μεταφράζεται από το mtDNA ενώ το υπόλοιπο 99% κωδικοποιείται στον πυρήνα, εκφράζεται στο κυτταρόπλασμα και κατευθύνεται στο μιτοχόνδριο μέσω ειδικών σηματοδοτικών αλληλουχιών. Η θεωρία ενδοσυμβίωσης υποστηρίζει ότι κατά τη διάρκεια της συμβίωσης βακτηρίων-μιτοχονδρίων και ευκαρυωτικού κυττάρου ένα μέρος του γενετικού υλικού των παγιδευμένων βακτηρίων μεταφέρθηκε και ενσωματώθηκε στο πυρηνικό γενετικό υλικό πιθανώς είτε λόγω της ανάγκης απομάκρυνσης του DNA από την περιοχή δημιουργίας ROS που προκαλούν μεταλλάξεις στο γονιδίωμα είτε οδηγήθηκε από το πιο εξελιγμένο ευκαρυωτικό σύστημα ελέγχου γονιδιακής έκφρασης. Ωστόσο γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες αρκετά υδρόφοβες για να περάσουν από το κυτταρόπλασμα στο εσωτερικό του μιτοχονδρίου παρέμειναν αναγκαστικά στο βακτηριακό - μιτοχονδριακό κυκλικό πλασμίδιο (Oca-Cossio 2003).

Μια άλλη πιθανή εξήγηση είναι, ότι εξαιτίας των αλλαγών που συνέβησαν στον γενετικό κώδικα των μιτοχονδρίων, τα μιτοχονδριακά mRNAs δεν μπορούσαν να μεταφραστούν από τα κυτταροπλασματικά ριβοσώματα και το αντίστροφο. Έτσι η μεταφορά γονιδίων από το μιτοχόνδριο στον πυρήνα σταμάτησε, περισσότερο ως αποτέλεσμα οργανικής προσαρμογής σε επιλογικές πιέσεις που ασκήθηκαν παρά ως προσπάθεια του μιτοχονδρίου να διατηρήσει τον ημιαυτόνομο ρόλο του.

Μία άλλη θεωρία προέλευσης των μιτοχονδρίων, λιγότερο αποδεκτή, είναι αυτή της θυγατροποίησης. Σύμφωνα με τη θεωρία αυτή τα αρχέγονα πρωτοευκαρυωτικά κύτταρα είχαν αναπτύξει ήδη το δικό τους αναπνευστικό σύστημα. Η θέση του αναπνευστικού αυτού συστήματος ήταν στις επιφανειακές τους μεμβράνες οι οποίες με την πάροδο του χρόνου δημιούργησαν εγκολπώσεις περιορίζοντας με αυτό τον τρόπο τα σύμπλοκα που έπαιρναν μέρος στην αναπνοή σε συγκεκριμένους κλειστούς χώρους μέσα στο κύτταρο. Η εξέλιξη αυτών των περιοχών οδήγησε στο σχηματισμό των μιτοχονδρίων και των χλωροπλάστων. Η θεωρία της θυγατροποίησης δικαιολογεί την ύπαρξη γενετικού υλικού στα μιτοχόνδρια και στους χλωροπλάστες ότι προέκυψε από την παγίδευση DNA κατά τη διαδικασία δημιουργίας πτυχών στις μεμβράνες (Raff Mahler 1972).

1.4. Συνεξέλιξη πυρηνικού και μιτοχονδριακού γονιδιώματος

Ο ρυθμός εξέλιξης του μιτοχονδριακού γονιδιώματος είναι περίπου 10 φορές μεγαλύτερος από αυτόν του πυρηνικού. Ωστόσο, τα πρωτεϊνικά σύμπλοκα που εμπλέκονται στην οξειδωτική φωσφορυλίωση είναι προϊόντα αλληλεπίδρασης πρωτεϊνών που είτε κατασκευάζονται, είτε οδηγούνται στο μιτοχόνδριο (με εξαίρεση το σύμπλοκο II). Η μεταβολική αυτή εξάρτηση του mtDNA από τον πυρήνα, καθώς επίσης και το γεγονός ότι τα γονιδιακά προϊόντα του μιτοχονδρίου και του πυρήνα τα οποία συνεργάζονται για να σχηματιστούν λειτουργικές πρωτεϊνικές μονάδες, εμφανίζουν παρόμοιο εξελικτικό ρυθμό, ενισχύουν την άποψη για τη συνεξέλιξη των δύο γονιδιωμάτων (Moritz C et al 1987).

1.5. Οξειδωτική φωσφορυλίωση

Μία από τις σημαντικότερες λειτουργίες των μιτοχονδρίων είναι η παραγωγή ενέργειας-ATP μέσω της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης και της αναπνοής. Η οξειδωτική φωσφορυλίωση είναι η κύρια οδός μέσω της οποίας σχηματίζεται ATP από ADP και πραγματοποιείται στο μιτοχόνδριο του κυττάρου (Georgatsos 2005). Η οξειδωτική φωσφορυλίωση αποτελεί το επιστέγασμα μιας σειράς ενεργειακών μετασχηματισμών οι οποίοι ονομάζονται στο σύνολό τους κυτταρική αναπνοή. Επίσης, ο κύκλος του κιτρικού οξέος συνδέεται άμεσα με την οξειδωτική φωσφορυλίωση διότι τα ενδιάμεσα προϊόντα του κύκλου λειτουργούν ως συνένζυμα ή υποστρώματα στις αντιδράσεις της αναπνευστικής αλυσίδας για την σύνθεση ATP και παραγωγή ενέργειας. Συγκεκριμένα, η οξείδωση των καύσιμων οργανικών μορίων του κυττάρου μέσω του κύκλου του κιτρικού οξέος οδηγεί στην δημιουργία ηλεκτρονίων με υψηλό δυναμικό μεταφοράς. Στην συνέχεια αυτή η ηλεκτρονιοκίνητη δύναμη μετατρέπεται σε πρωτονιοκίνητη δύναμη και η τελευταία με τη σειρά της σε δυναμικό μεταφοράς φωσφορικής ομάδας. Η μετατροπή της ηλεκτρονιοκίνητης δύναμης σε πρωτονιοκίνητη δύναμη επιτελείται από τρεις ηλεκτρονιοκίνητες αντλίες πρωτονίων (την οξειδοαναγωγή του ζεύγους NADH-συνένζυμου Q, την οξειδοαναγωγή του ζεύγους συνένζυμου Q –κυτοχρώματος c και την οξειδάση του κυτοχρώματος c). Η τελική φάση της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης επιτελείται από τη συνθήση της ATP με την εκμετάλλευση της ενέργειας της ροής των πρωτονίων από τον διαμεμβρανικό χώρο στο εσωτερικό του μιτοχονδρίου –μήτρα (Stryer 1997).

Τα μιτοχόνδρια διαθέτουν δικό τους γενετικό υλικό με το οποίο μπορούν να δημιουργήσουν μερικές από τις πρωτεΐνες που τους είναι απαραίτητες για την επιβίωση και αναπαραγωγή τους. Ωστόσο από τις ~100 πρωτεΐνες που χρειάζονται για την οξειδωτική φωσφορυλίωση μόνο 13 από αυτές κωδικοποιούνται από το δικό τους γενετικό υλικό (7 υπομονάδες του συμπλόκου I (ND1-6, ND4L) 1 υπομονάδα του συμπλόκου III (κυτόχρωμα b), 3 υπομονάδες του συμπλόκου IV (οξειδάση του

κυτοχρώματος c (COX) 1-3 και 2 υπομονάδες από το σύμπλοκο V (ATP6 και 8)) ενώ οι υπόλοιπες (~70) κωδικοποιούνται από το DNA του πυρήνα.

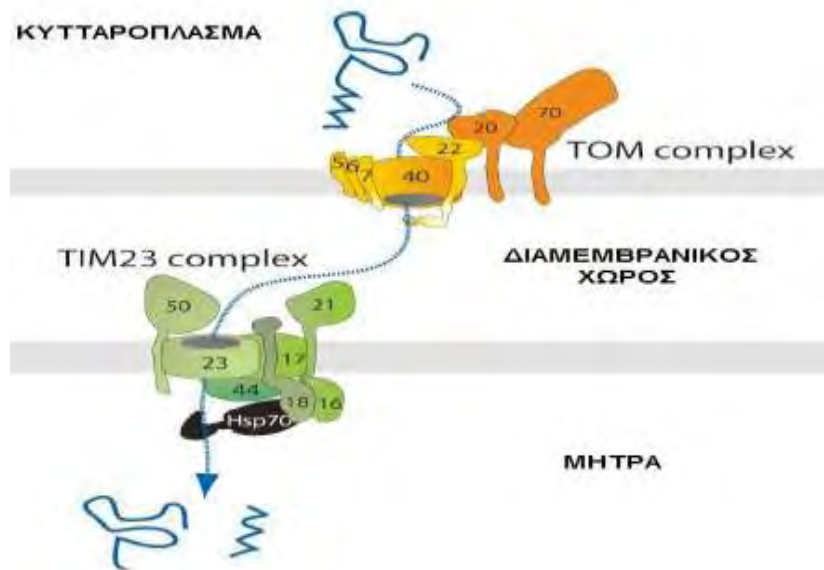
Η εξωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη είναι ημιπερατή , δηλαδή επιτρέπει την μη ειδική διάχυση μορίων με μοριακό βάρος έως και 5 kDa , μέσω των καναλιών που σχηματίζονται από μια οικογένεια διαμεμβρανικών πρωτεϊνών , που ονομάζονται πορίνες (Schirmer 1998).

Ωστόσο , οι πρόδρομες μορφές των μιτοχονδριακών πρωτεϊνών που παράγονται στο κυτταρόπλασμα και προορίζονται για στόχευση και είσοδο στα μιτοχόνδρια είναι στη συντριπτική πλειοψηφία τους μεγαλύτερες από 5 kDa και απαιτούν εξειδικευμένο μονοπάτι εισόδου. Οι προ-πρωτεΐνες που σχηματίζονται στα ριβοσώματα του κυτταροπλάσματος μεταφέρονται και αποδίδονται στο μιτοχόνδριο με τη βοήθεια κυτταροπλασματικών σαπερονών (Komiyama, Rospert et al. 1997) και πριν αναδιπλωθούν προσδέεται μία ειδική N- τελική αλληλουχία την οποία αναγνωρίζουν ειδικά σύμπλοκα που βρίσκονται στα μιτοχόνδρια. Έχει αναφερθεί και η είσοδος των νεοσυντιθέμενων πρωτεϊνικών αλυσίδων από τα ριβοσώματα που βρίσκονται σε άμεση αλληλεπίδραση με την εξωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων χωρίς διαμεσολάβηση σαπερονών.

Οι πρωτεΐνες που θα εισέλθουν στο μιτοχόνδριο πρέπει να περάσουν και τις 2 μεμβράνες(εξωτερική και εσωτερική). Υπάρχουν ειδικά σύμπλοκα που βρίσκονται σταθερά στις μεμβράνες των μιτοχονδρίων και παίρνουν μέρος στην μεταφορά των προ-πρωτεϊνών από το κυτταρόπλασμα στην μιτοχονδριακή μήτρα.

Τα σύμπλοκα αυτά (ή τρανσλοκάσες) είναι το TOM (**translocase of the mitochondrial outer membrane- τρανσλοκάση της εξωτερικής μεμβράνης**) που βρίσκεται στην εξωτερική μεμβράνη και το TIM23 (**translocase of the mitochondrial inner membrane- τρανσλοκάση της εσωτερικής μεμβράνης**) που βρίσκεται στην εσωτερική. Πιο συγκεκριμένα στο κυτταρόπλασμα τα υδρόφοβα πρόδρομα μόρια πρωτεϊνών που θα μεταφερθούν στα μιτοχόνδρια είναι συνδεδεμένα με ειδικές μοριακές σαπερονίνες , τις Hsc70 (heat-shock cognate 70) και Hsp90 (heat-shock protein 90). Οι σαπερονίνες αυτές εκτός από το ρόλο τους για αναδίπλωση των πρωτεϊνών παίζουν σημαντικό ρόλο στην μεταφορά πρωτεϊνών. Οι σαπερονίνες-κυτοσολικές συνοδοί (Hsc70 και Hsc90) αναγνωρίζουν και αλληλεπιδρούν με το σύμπλοκο Tom70 που βρίσκεται στην εξωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων. Το

πεπτιδίο στόχευσης της πρωτεΐνης αλληλεπιδρά με το σύμπλοκο TOM , και μπαίνει στο κανάλι μεταφοράς. Το κατάλληλο πεπτιδίο στόχευσης αφού φτάσει στον διαμεμβρανικό χώρο , μπορεί να αλληλεπιδράσει με το σύμπλοκο TIM23 και να μπει στο κανάλι μεταφοράς προς την μήτρα. Εκεί κόβεται το πεπτιδίο στόχευσης από πρωτεάσες , και η πρωτεΐνη αναδιπλώνεται (**Εικόνα 4**).



Εικόνα 4. Η εισαγωγή μιας πρωτεΐνης στο μιτοχόνδριο. Μία πρωτεΐνη (μπλε) πρώτα μεταφέρεται διαμέσου της εξωτερικής μεμβράνης από το σύμπλοκο TOM και στη συνέχεια μεταφέρεται στη μήτρα μέσω του συμπλόκου TIM23

Ένα από τα πυρηνικά γονίδια που το προϊόν του στοχεύεται και δρα στο εσωτερικό των μιτοχονδρίων και για να εισέλθει σε αυτά πρέπει να περάσει από το ειδικό μηχανισμό μεταφοράς τους είναι και το γονίδιο *COX7A1* που μελετάται στην παρούσα έρευνα.

1.6. Γονίδιο **COX7A1: cytochrome c oxidase subunit VIIa 1**




Η κυτοχρωμική c οξειδάση είναι το τελικό αναπνευστικό ενζυμικό σύμπλοκο το οποίο δεσμεύει και ανάγει το O₂, ενώ ταυτόχρονα αντλεί πρωτόνια κατά μήκος των βιολογικών μεμβρανών δημιουργώντας ένα ηλεκτροχημικό δυναμικό που αποτελεί την κινητήρια δύναμη για τη σύνθεση του ATP. Το σύμπλοκο αυτό αποτελείται από τρεις καταλυτικές υπομονάδες που κωδικοποιούνται από μιτοχονδριακά γονίδια και από πολλαπλές δομικές υπομονάδες που κωδικοποιούνται από πυρηνικά γονίδια. Οι μιτοχονδριακές-κωδικοποιημένες υπομονάδες λειτουργούν στη μεταφορά ηλεκτρονίων και οι πυρηνικά-κωδικοποιημένες υπομονάδες πιθανώς να λειτουργούν στην ρύθμιση και τη συναρμολόγηση του συγκροτήματος.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1. Συλλογή δειγμάτων

Η διαλογή των δειγμάτων του είδους *Lepus europaeus* που χρησιμοποιήσαμε βασίστηκε στην προσπάθεια κάλυψης, με όσο το δυνατόν πιο ομοιόμορφο τρόπο της κατανομής του στον ευρωπαϊκό χώρο. Σκοπός της προσπάθειας αυτής ήταν να μειωθεί στο ελάχιστο η πιθανότητα απώλειας κάποιου προτύπου, κάτι που μπορεί να οδηγούσε σε παραπλανητικά συμπεράσματα. Για την παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν 20 δείγματα του είδους *Lepus europaeus* που ανήκαν σε διαφορετικά αλληλόμορφα, όπως αυτοί ταυτοποιήθηκαν και αναλύθηκαν από προηγούμενη μελέτη (Stamatis K et al 2011). Συγκεκριμένα η προέλευση των δειγμάτων ήταν από: Κύπρο (29), Δανία (5), Γαλλία (6), Γερμανία (5), Ελλάδα (9) και Τουρκία (9).

Προέλευση δειγμάτων	Απλότυπος (σύμφωνα με μελέτη Stamatis K et al 2011)
<ul style="list-style-type: none"> • Κύπρος • Τουρκία 	AMh (Anatolian-Middle East haplotype)
<ul style="list-style-type: none"> • Γερμανία • Γαλλία • Δανία 	EUh (European haplotype)
<ul style="list-style-type: none"> • Ελλάδα 	SEeh (South-Eastern European haplotype)

	AMh (Anatolian-Middle East haplotype)
	EUh (European haplotype)
	SEeh (South-Eastern European haplotype)

Πίνακας 2. Προέλευση δειγμάτων και κατηγοριοποίηση με βάση προηγούμενη μελέτη για το *Lepus europaeus* (Stamatis K et al 2011)

2.2. Προετοιμασία δειγμάτων

Για τις διαδικασίες επεξεργασίας και ανάλυσης DNA που ακολουθήσαμε απαιτείται καταστροφή μικρού τμήματος του δείγματος από το οποίο θα απομονωθεί το DNA. Η διαδικασία αυτή περιλαμβάνει το σπάσιμο των κυττάρων ώστε να απελευθερωθούν τα νουκλεϊκά οξέα και στη συνέχεια ακολουθείται καθαρισμός αυτών από ανεπιθύμητες πρωτεΐνες ή από άλλα μόρια τα οποία μπορούν να συνδεθούν με τα νουκλεϊκά οξέα και να λειτουργήσουν ως αναστολείς στον πολλαπλασιασμό αυτών. Η απομόνωση του DNA έγινε σύμφωνα με το πρωτόκολλο

του Budowle, (1990), με κατάλληλες τροποποιήσεις. Τα διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν είναι τα εξής :

CH₃COONa 0,5M (200ml)

8,20 gr CH₃COONa

ddH₂O μέχρι τα 200 ml

Sodium Dodecyl Sulphate 5% (SDS)

5 gr SDS

ddH₂O μέχρι τα 200 ml

Η ποσότητα ιστού που χρειάζεται για την εξαγωγή επαρκούς ποσότητας DNA για τις διαδικασίες που θα ακολουθήσουν είναι σχετικά μικρή (~ 50-100 mg ιστού). Η διαδικασία που ακολουθήθηκε είναι η εξής:

1. Τοποθετούμε τον ιστό αρκετά τεμαχισμένο σε σωλήνα eppendorf του 1,5ml και προσθέτουμε 0,5ml CH₃COONa 0,5M, 20μl SDS 5% και 10 μl πρωτεΐνωση K 10mg/ml.
2. Επώαζουμε τα δείγματα στους 55° C για μια ώρα.
3. Μετά την επώαση, προσθέτουμε 0,5ml φαινόλη και 0,5ml χλωροφόρμιο/ισοαμυλική αλκοόλη (24:1). Αναδεύουμε έντονα τα δείγματα.
4. Φυγοκεντρούμε στις 13000 rpm για 10 λεπτά
5. Μεταφέρουμε την επάνω υδατική φάση σε νέο σωλήνα eppendorf και προσθέτουμε 0,5ml φαινόλη και 0,5ml χλωροφορμίο/ισοαμυλική αλκοόλη.
6. Αναδεύουμε έντονα.

7. Φυγοκεντρούμε στις 13000 rpm για 10 λεπτά.
8. Μεταφέρουμε την επάνω υδατική φάση σε νέο σωλήνα erpendorf.
9. Προσθέτουμε 1ml χλωροφορμίο/ισοαμυλική αλκοόλη.
10. Φυγοκεντρούμε στις 13000 rpm για 10 λεπτά.
11. Μεταφέρουμε την επάνω υδατική φάση σε νέο σωλήνα erpendorf.
12. Προσθέτουμε 1ml παγωμένη ισοπροπανόλη, αναδεύουμε ήπια.
13. Τοποθετούμε τα δείγματα στους -20°C για 20 λεπτά.
14. Φυγοκεντρούμε στις 13000 rpm για 20 λεπτά.
15. Απομακρύνουμε το υπερκείμενο, προσπαθώντας να διατηρήσουμε ανέπαφο το ίζημα που εμφανίζεται.
16. Προσθέτουμε 1ml αλκοόλη 70%, αναδεύουμε ήπια.
17. Φυγοκεντρούμε στις 13000rpm για 10 λεπτά.
18. Απομακρύνουμε το υπερκείμενο, διατηρώντας ανέπαφο το ίζημα.
19. Τοποθετούμε τα δείγματα στους 37°C , ώστε να ξηραθεί το ίζημα από τυχόν υπολείμματα διαλυμάτων.
20. Επαναδιαλύουμε το ίζημα σε 100μl ddH₂O και τοποθετούμε τα δείγματα είτε στο ψυγείο (4°C) είτε στην κατάψυξη (-20°C).

Το διάλυμα οξικού νατρίου χρησιμοποιείται για την λύση των κυττάρων ρυθμίζοντας την ωσμωτική πίεση του κυττάρου προκαλώντας διάσπαση των κυτταρικών μεμβρανών και ομογενοποίηση του ιστού. Το SDS είναι ένα ιονικό απορρυπαντικό και συμβάλλει στη διάσπαση της πυρηνικής μεμβράνης καθώς επίσης αποδιατάσσει τις πρωτεΐνες, προστατεύοντας έτσι το DNA από τις νουκλεάσες. Η proteinase K προκαλεί την αποικοδόμηση των πρωτεϊνών, καθώς επίσης και αυτή προστατεύει το DNA από τη δράση νουκλεασών. Η φαινόλη χρησιμοποιείται για την αποδιάταξη των πρωτεϊνών και τον διαχωρισμό λιπιδίων, πρωτεϊνών και νουκλεϊκών οξέων. Το διάλυμα φαινόλης που χρησιμοποιείται είναι εξισορροπημένο σε $\text{pH}>7$

ώστε το DNA να κατανέμεται στην επάνω υδάτινη φάση. Η προσθήκη του χλωροφορμίου έχει ως σκοπό τον καλύτερο διαχωρισμό των φάσεων λόγω μεγάλης πυκνότητας. Συμβάλλει επίσης στη μετουσίωση των πρωτεϊνών και στην απομάκρυνση της διαλυμένης φαινόλης από την υδάτινη φάση. Η ισοαμυλική αλκοόλη σταθεροποιεί το χλωροφόρμιο. Η κατακρήμνιση του DNA με ισοπροπανόλη και η ακόλουθη πλύση του με αιθανόλη 70% βασίζεται στο γεγονός ότι το DNA είναι αδιάλυτο στους συγκεκριμένους οργανικούς διαλύτες.

2.3. Ποσοτικοποίηση DNA

Μετά την εξαγωγή DNA πραγματοποιήθηκε ποιοτικός και ποσοτικός έλεγχος αυτού ώστε να επιβεβαιωθεί η σωστή απομόνωση του γενωμικού DNA και ότι αυτό μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως μήτρα για PCR. Οι διαδικασίες που ακολουθούνται είναι είτε φωτομέτρηση είτε ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 1% w/v.

Η φωτομέτρηση πραγματοποιείται μετά από αραιώση 1μl διαλύματος DNA σε 49μl ddH₂O. Οι τιμές της απορρόφησης στα 260nm ανάγονται σε συγκέντρωση DNA η οποία ενδείκνυται να είναι πάνω από 150ng/μl. Ο λόγος της τιμής της απορρόφησης στα 260nm προς την αντίστοιχη τιμή στα 280nm είναι ένας δείκτης καθαρότητας του DNA που αναμένεται να έχει τιμή περίπου 2 σε κατάλληλα για χρήση δείγματα.

Η ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης θα περιγραφεί παρακάτω.

2.4. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Σκοπός της τεχνικής αυτής είναι να πολλαπλασιάσουμε μία συγκεκριμένη αλληλουχία DNA και συγκεκριμένα στην παρούσα μελέτη, την αλληλουχία του πυρηνικού γονιδίου *COX7A1* με στόχο την αλληλούχηση του. Βάσει δημοσιευμένων αλληλουχιών του γονιδίου *COX7A1* διαφόρων ειδών λαγόμορφων και κυρίως του, συγγενικού ως προς τον Ευρωπαϊκό λαγό (*Lepus europaeus*-AJ421471), αγριοκούνελου (*Oryctolagus cuniculus*- AJ001588) έγινε σχεδιασμός κατάλληλων εκκινητών για τον πολλαπλασιασμό των τμημάτων των εξωνίων 2 και 3 του γονιδίου. Δεν επιχειρήθηκε να γίνει πολλαπλασιασμός του εξωνίου 1 γιατί ένα τμήμα του βρισκόταν στην 5' αμετάφραστη περιοχή, γεγονός που θα δυσκόλευε την διαδικασία και θα οδηγούσε σε μη διαχειρίσιμα αποτελέσματα.

Για την PCR χρησιμοποιήθηκαν οι εξής εκκινητές (Simon et al,1994) :

Εκκινητής για exon 2	Αλληλουχία
Forward	5'-TGAGAACCGAGTGGCCGAG-3'
Reverse	5'- GACCGACGTCGAGTCCGGTGTGC- 3'

Πίνακας 3. Αλληλουχίες των εκκινητών (forward και reverse) για το εξώνιο 2

Εκκινητής για exon 3	Αλληλουχία
Forward	5'-GTTTCAGGGTGGCGATTGG-3'
Reverse	5'-TGTCCTCCGGTCTCGGTTCG-3'

Πίνακας 4. Αλληλουχίες των εκκινητών (forward και reverse) για το εξώνιο 3

Για την απόκτηση αλληλουχιών υψηλής ποιότητας, πραγματοποιήθηκε βελτιστοποίηση των συνθηκών της PCR , τόσο ως προς τις συγκεντρώσεις των αντιδραστηρίων που χρησιμοποιούνται, όσο και ως προς τις θερμοκρασίες της αντίδρασης.

Η σύσταση των διαλυμάτων των αντιδράσεων περιγράφεται στον **πίνακα 5**:

Εκμαγείο DNA	1 μl
dNTPs (10mM each)	1 μl
MgCl ₂ (50mM)	1 μl
Buffer 10x	5 μl
Εκκινητής Fw 50pmol/μl	1 μl
Εκκινητής Rv 50pmol/μl	1 μl
Taq DNA Polymerase 5 U/μl	0,2 μl
ddH ₂ O	39,8 μl
Συνολικός όγκος	50 μl

Πίνακας 5. Συστατικά αντίδρασης PCR

Οι συνθήκες ενίσχυσης του τμήματος του γονιδίου *COX7A1* παρουσιάζονται στον **πίνακα 6**:

Γονίδιο	Εξώνιο	Κύκλοι	Χρόνος	°C	Στάδιο	°C	Χρόνος	Κύκλοι	Εξώνιο	Γονίδιο
<i>COX7A1</i>	Exon 2	1	4min	95	Denaturation (αρχικό στάδιο αποδιάταξης-προεπώαση)	95	4min	1	Exon 3	<i>COX7A1</i>
		X 35	40sec	95	Denaturation (στάδιο αποδιάταξης)	95	40sec	X 35		
			40sec	55	Annealing (στάδιο υβριδισμού)	55	40sec			
			40sec	72	Extension (στάδιο επιμήκυνσης)	72	40sec			
		1	10min	72	Extension (τελικό στάδιο επιμήκυνσης)	72	10min	1		
				4	End (στάδιο ολοκλήρωσης της αντίδρασης και διατήρησης των δειγμάτων)	4				

Πίνακας 6. Συνθήκες ενίσχυσης του τμήματος του γονιδίου *COX7A1*

Τα προϊόντα PCR ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτική αгарόζης.

2.5. Ηλεκτροφόρηση

Η ηλεκτροφόρηση DNA μπορεί να γίνει σε πήκτωμα αγαρόζης ή πολυακρυλαμίδης. Η επιλογή του πηκτώματος εξαρτάται από το μέγεθος του DNA που ηλεκτροφορείται όπως και από την διακριτική ικανότητα που επιθυμούμε. Όταν θέλουμε να διακρίνουμε διαφορές στο DNA σε επίπεδο ακόμα και μιας βάσης τότε χρησιμοποιούμε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης όπως χρησιμοποιείται και στη παρούσα μελέτη για τη ανάλυση των προτύπων SSCP , όπου οι διαφορές μεγέθους μεταξύ διαφορετικών αλληλομόρφων ενός γονιδίου είναι μικρές. Αντίθετα για τη διαπίστωση της πετυχημένης ή όχι ενίσχυσης των δειγμάτων με τη διαδικασία της PCR όπου δεν απαιτείται μεγάλη διακριτική ικανότητα χρησιμοποιήθηκε πήκτωμα αγαρόζης.

2.6. Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης

Η ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό τμημάτων DNA ανάλογα με το μέγεθος τους. Το μέγεθος των τμημάτων εκτιμάται με βάση κάποιο μάρτυρα μοριακών μεγεθών τμημάτων DNA (ladder). Τα διαλύματα που χρησιμοποιούνται για την τεχνική αυτή είναι τα εξής:

TAE 50x (500ml)

Tris Base 121gr

Acetic Acid 28,5ml

EDTA 0,5M 50ml

ddH₂O έως τα 500ml

Loading buffer 6x (10ml)

Bromophenol blue 1ml 1% w/v

TBE 20x 0,5ml

Glycerol 5ml

ddH₂O έως τα 10ml

Αρχικά παρασκευάζουμε διάλυμα TAE 1x αραιώνοντας το διάλυμα stock 50x (20ml σε τελικό όγκο 1lt). Για την προετοιμασία της πηκτής διαλύουμε 0,6gr αγαρόζης σε 35ml TAE 1x (τελική συγκέντρωση 2% w/v) με θέρμανση και προσθέτουμε 3μl βρωμιούχου αιθιδίου (EtBr 10mg/ml). Η συγκέντρωση της πηκτής αγαρόζης διαφοροποιείται ανάλογα με το μέγεθος των τμημάτων DNA που πρέπει να διαχωριστούν. Το βρωμιούχο αιθίδιο προστίθεται για να είναι εμφανείς οι ζώνες του DNA κατά την παρατήρηση της πηκτής υπό υπεριώδες φως. Η πηκτή τοποθετείται σε ειδικό καλούπι όπου και πολυμερίζεται. Για την ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων απαιτείται η προσθήκη loading buffer σε αυτά. Σε 5μl PCR προϊόντος προστίθενται 3μl loading buffer.

Μαζί με τα δείγματα ηλεκτροφορείται και ένας μάρτυρας μεγέθους τμημάτων DNA. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται στα 100 volts και ακολουθεί παρατήρηση της πηκτής σε λάμπα υπεριώδους φωτός.

2.7. Ανάλυση πολυμορφισμού διαμόρφωσης μονόκλωνης αλυσίδας (Single Strand Conformation Polymorphism)

Για την ανίχνευση διαφορών μεταξύ αλληλομόρφων χρησιμοποιήθηκε η τεχνική SSCP . Η ανάλυση SSCP βασίζεται στο διαχωρισμό μονόκλωνων τμημάτων DNA βάσει των διαφορών της κινητικότητάς τους στο πήκτωμα και έχει διακριτική ικανότητα ενός νουκλεοτιδίου. Πρόκειται για μια ανάλυση η οποία στηρίζεται στην ιδιότητα της μονόκλωνης αλυσίδας του DNA να λαμβάνει τρισδιάστατη μορφή κατά την ηλεκτροφόρηση . Οι νουκλεοτιδικές διαφορές συνήθως προκαλούν διαφορετική κινητικότητα στη στερεομορφή του DNA κατά την ηλεκτροφόρηση και με τον τρόπο αυτό ανιχνεύονται. Ο λόγος για αυτή την διαταραχή της κινητικότητας θεωρείται ότι είναι οι στερεοδομικές αλλαγές που προκαλούν αυτές οι αλλαγές. Η ανάλυση SSCP αποτελείται από τρία στάδια: την αποδιάταξη των προϊόντων της PCR, την ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμίδης και τη χρώση της πηκτής για την απεικόνιση των αποτελεσμάτων.

2.7.1. Αποδιάταξη προϊόντων PCR

Για την αποδιάταξη των τμημάτων DNA χρησιμοποιήθηκε αποδιατακτικό διάλυμα (denaturation buffer), η σύσταση του οποίου είναι η εξής:

Denaturation buffer

95% formamide

0,05% Bromophenol blue

0,05% Xylene Cyanol

10mM NaOH

Σε 5-7μl προϊόντος PCR (ανάλογα με την συγκέντρωσή του) προστίθενται 10μl denaturation buffer και τα δείγματα επωάζονται για 7 min στους 99°C. Σκοπός

της αποδιάταξης είναι η μετατροπή των δίκλωνων τμημάτων DNA σε μονόκλιωνα. Ακολούθως τα δείγματα τοποθετούνται σε πάγο όπου διατηρούνται σε μονόκλιωνα κατάσταση.

2.7.2. Παρασκευή πηκτής πολυακρυλαμίδης

Για την παρασκευή των πηκτών πολυακρυλαμίδης χρησιμοποιήθηκαν τα ακόλουθα διαλύματα :

Διάλυμα ακρυλαμίδης 38,5% (200ml)

Ακρυλαμίδα 75gr

Bis-acrylamide 2gr

ddH₂O έως τα 200ml

TBE 10x (2lt)

Tris Base 121 gr

Boric acid 81,5gr

EDTA 0,5M 80ml

ddH₂O έως τα 2lt

Glycerol 50% v/v

APS 20% w/v

TEMED

Για την ηλεκτροφόρηση των προϊόντων PCR χρησιμοποιήθηκε πηκτή πολυακρυλαμίδης που είχε πυκνότητα 8% (Πίνακας 7). Όσο μεγαλύτερο είναι το DNA τόσο πιο αραιό πρέπει να είναι το πήκτωμα.

	8%
Διάλυμα ακρυλαμίδης 38,5%	10,6ml
Glycerol 50%	8ml
TBE 10x	5ml
TEMED	50μl
APS 20%	350μl
H ₂ O	Έως τα 50ml
Συνολικός όγκος	50ml

Πίνακας 7. Σύσταση πηκτής πολυακρυλαμίδης 8%

Μετά τον πολυμερισμό της ακρυλαμίδης, τα αποδιατεταγμένα δείγματα ηλεκτροφορούνται με χρήση ρυθμιστικού διαλύματος TBE 0,5x. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται με τάση 220 volts σε θερμοκρασία δωματίου για 20 ώρες περίπου.

2.7.3.Χρώση των πηκτών πολυακρυλαμίδης με νιτρικό άργυρο (Silver Staining)

Για την εμφάνιση των αποτελεσμάτων της ηλεκτροφόρησης γίνεται χρώση των πηκτών με νιτρικό άργυρο. Η μέθοδος αυτή εφαρμόζεται όταν το DNA έχει ηλεκτροφορηθεί σε πήκτωμα ακρυλαμιδίου και χαρακτηρίζεται από μεγάλη ευαισθησία για την οποία επιλέγεται, αντικαθιστώντας την έως σήμερα χρησιμοποιούμενη τεχνική με ραδιενέργεια. Η τεχνική αυτή βασίζεται στο γεγονός ότι ο άργυρος συνδέεται στο DNA και στη συνέχεια αντιδρά με την φορμαλδεΐδη, παρουσία βάσης. Οι ζωνώσεις του DNA εμφανίζονται με καφέ χρώμα σε κίτρινο φόντο (Sambrook et al, 2000). Για τη χρώση χρησιμοποιούνται τα εξής διαλύματα :

Διάλυμα 1 (400ml)

EtOH 8ml

Acetic Acid 0,5ml

ddH₂O ως τα 400ml

Διάλυμα 2 (200ml)

Διάλυμα AgNO₃ 1gr/l

Διάλυμα 3 (200ml)

NaOH 3gr

NaBH₄ 0,01gr

Formaldehyde 1ml

ddH₂O έως τα 200ml

Στο πρώτο στάδιο της χρώσης, οι πηκτές εμβαπτίζονται σε 200ml του διαλύματος 1 και αναδεύονται για 3 min. Το διάλυμα 1 απομακρύνεται και η διαδικασία επαναλαμβάνεται. Ακολουθεί πλύση των πηκτών με απεσταγμένο νερό για 1 min. Στο δεύτερο στάδιο προστίθεται το διάλυμα AgNO₃ και οι πηκτές αναδεύονται για 20min. Στη συνέχεια πραγματοποιούνται 2 πλύσεις με απεσταγμένο νερό, διάρκειας 1min η κάθε μια. Στο τρίτο και τελευταίο στάδιο προστίθεται το διάλυμα 3 και πραγματοποιείται ανάδευση μέχρι την εμφάνιση ορατών ζωνών στις πηκτές. Το πήκτωμα μπορεί να τυλιχθεί με μεμβράνη και να φωτογραφηθεί σε λευκό φόντο. Στη συνέχεια μπορεί να σφραγισθεί στο εσωτερικό της διαφανούς μεμβράνης για να κρατηθεί επ' αόριστον

Μετά την εμφάνιση των ζωνών στο πήκτωμα, συγκρίνονται τα πρότυπα των διαφορετικών ατόμων, ώστε να προσδιοριστούν ποια άτομα φέρουν κοινά πρότυπα και ποια διαφέρουν μεταξύ τους. Η 100% επιβεβαίωση μιας πιθανής μεταλλαγής που υποδεικνύεται από το SSCP προέρχεται από την νουκλεοτιδική ταυτοποίηση (sequencing). Μετά την ομαδοποίηση των ατόμων, επιλέγονται 1 ή 2 αντιπροσωπευτικά άτομα από κάθε πρότυπο, τα οποία θα χρησιμοποιηθούν για τον προσδιορισμό της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας κάθε ομάδας.

2.8. Αλληλούχηση διαφορετικών προτύπων SSCP

Η αλληλούχηση είναι η μόνη μέθοδος που επιτρέπει τον ακριβή προσδιορισμό των βάσεων που διαφέρουν μεταξύ των ατόμων χωρίς να αφήνει περιθώρια αμφισβήτησης. Με τη σύγκριση των αλληλουχιών συμπεραίνουμε τις εξελικτικές τους σχέσεις κατασκευάζοντας το αντίστοιχο φυλογενετικό δέντρο. Γι' αυτό το λόγο, τα προϊόντα PCR που επιλέγονται, καθαρίζονται με τη χρήση κατάλληλου kit ώστε να απαλλαγούν από την παρουσία παραπροϊόντων, και στη συνέχεια αποστέλλονται σε εταιρείες που πραγματοποιούν αλληλούχηση. Τα αποτελέσματα λαμβάνονται με τη μορφή χρωματογραφήματος, μέσω του οποίου μπορούμε να εξάγουμε την επιθυμητή αλληλουχία και να ακολουθήσουμε με την περαιτέρω ανάλυση των φυλογενετικών σχέσεων με τη χρήση κατάλληλων προγραμμάτων βιοπληροφορικής.

Η αλληλούχηση των δειγμάτων στη συγκεκριμένη εργασία πραγματοποιήθηκε από την εταιρεία CEMIA που βρίσκεται στην Λάρισα. Μετά από αποστολή των δειγμάτων, καθώς και μιας ποσότητας των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για την PCR, η εταιρεία πραγματοποιεί την αλληλούχηση χρησιμοποιώντας και τα αποτελέσματα αποστέλλονται μέσω ηλεκτρονικού ταχυδρομείου.

2.9. Ανάλυση χρωματογραφημάτων αλληλούχησης

Η ηλεκτρονική μορφή της αλληλουχίας του DNA επεξεργάζεται με τη βοήθεια του προγράμματος BioEdit. Στο γράφημα, απεικονίζονται 4 καμπύλες με διαφορετικά χρώματα, το καθένα από τα οποία αντιστοιχεί και σε διαφορετικό νουκλεοτίδιο. Έτσι, παρατηρώντας το χρώμα της κορυφής της καμπύλης σε κάθε διαφορετική θέση, μπορούμε να συμπεράνουμε ποιο νουκλεοτίδιο βρίσκεται στη θέση αυτή. Πριν την φυλογενετική ανάλυση πρέπει να γίνει έλεγχος των χρωματογραφημάτων ως προς την ποιότητά τους. Χαρακτηριστικό πρόβλημα των αλληλουχιών που παράγονται είναι η χαμηλή ποιότητα των παραγόμενων αλληλουχιών στα πρώτα 40-50 νουκλεοτίδια και η χειροτέρευση της ποιότητάς της μετά τα 600-700 νουκλεοτίδια. Αυτά τα φαινόμενα μπορεί να οφείλονται σε

διάφορους παράγοντες όπως κακής ποιότητας DNA , επιλογή λάθος εκκινητών, λάθη κατά τη διάρκεια της PCR. Τα χρωματογραφήματα που θα χρησιμοποιηθούν στην ανάλυση πρέπει να έχουν το αναμενόμενο μήκος βάσεων και μοναδική, ευδιάκριτη κορυφή για κάθε σημείο της αλληλουχίας. Αυτού του τύπου ο έλεγχος είναι καθαρά εμπειρικός και γίνεται με το μάτι. Η αλληλούχηση γίνεται και για τις δυο αλυσίδες (με διαφορετικό εκκινητή για την κάθε μια) και στη συνέχεια πραγματοποιείται στοίχιση των δύο αλληλουχιών με τη χρήση κατάλληλου προγράμματος βιοπληροφορικής (ClustalX) για την εύρεση τυχών λαθών που προκύπτουν κατά τη διαδικασία αυτή (Thompson et al, 1997). Μετά το τέλος και αυτής της διαδικασίας, έχουμε την πλήρη αλληλουχία του τμήματος που μας ενδιαφέρει.

2.10. Σύγκριση αλληλουχιών – Φυλογενετική ανάλυση

Οι αλληλουχίες που προκύπτουν αντιπροσωπεύουν το καθένα από τα διαφορετικά αλληλόμορφα που προσδιορίσαμε με την ανάλυση SSCP. Οι αλληλουχίες των υπό μελέτη δειγμάτων δεν αναμένεται να είναι πανομοιότυπες αλλά να παρουσιάζουν διαφορές ως προς τις βάσεις ορισμένων νουκλεοτιδικών θέσεων. Για να αποκαλυφθούν οι συγκεκριμένες πολύμορφικές θέσεις, οι αλληλουχίες στοιχίζονται με τη βοήθεια του προγράμματος MEGA (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) (Tamura et al, 2007). Επίσης, με το συγκεκριμένο πρόγραμμα βιοπληροφορικής είναι δυνατή η εύρεση των πολυμορφικών και συντηρημένων θέσεων ανάμεσα στα διαφορετικά αλληλόμορφα, η εύρεση της επί τοις εκατό σύστασης σε νουκλεοτίδια, καθώς και ο προσδιορισμός των αλλαγών στην αμινοξική αλληλουχία, με τη χρήση του κατάλληλου γενετικού κώδικα. Τέλος , το πρόγραμμα προσφέρει την δυνατότητα της κατασκευής φυλογενετικού δέντρου με το επιθυμητό μοντέλο (NJ,UPGMA,ML,MP) , όπως και τον έλεγχο bootstrap για το κατασκευασμένο δέντρο, ο οποίος είναι ενδεικτικός για την αξιοπιστία των δέντρων που προκύπτουν.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1. Απομόνωση DNA

Ο έλεγχος της επιτυχίας της απομόνωσης, της ποσότητας και ποιότητας του εξαγόμενου DNA γινόταν με ηλεκτροφόρηση ζώνης. Η παρουσία DNA σε ικανοποιητική συγκέντρωση , χωρίς προσμίξεις RNA και πρωτεϊνών, δηλωνόταν με την παρουσία μιας μόνο ευκρινούς ζώνης. Συγκεκριμένα , η ηλεκτροφόρηση του DNA σε πηκτή αγαρόζης 1% εμφάνισε 2 διακριτές ζώνες : η μια ζώνη βρίσκεται ψηλότερα και είναι το πυρηνικό DNA , το οποίο είναι μεγάλου μεγέθους και εμφανίζεται περίπου μέσα στο πηγάδι της πηκτής, και η δεύτερη ζώνη, εμφανίζεται χαμηλότερα και είναι το μιτοχονδριακό DNA (**Εικόνα 5**). Επιπρόσθετα, η επιβεβαίωση ότι το DNA που απομονώθηκε ήταν υψηλής ποιότητας έγινε με φωτομέτρηση η οποία έδωσε τιμές συγκέντρωσης κατά μέσο όρο 200ng/μl και τιμές A^{260}/A^{280} κοντά στο 2.



Πυρηνικό
mtDNA

Εικόνα 5. Ηλεκτροφόρηση απομονωμένου DNA

3.2. PCR

Με τη χρήση των κατάλληλων εκκινήτων, ενισχύθηκαν 2 από τα 3 εξώνια του υπό μελέτη γονιδίου *COX7A1* , το εξώνιο 2 και 3. Για την επαλήθευση της επιτυχίας της μεθόδου, πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 2%, στην οποία ηλεκτροφορήθηκαν τα προϊόντα PCR παρουσία ενός μάρτυρα τμημάτων γνωστού

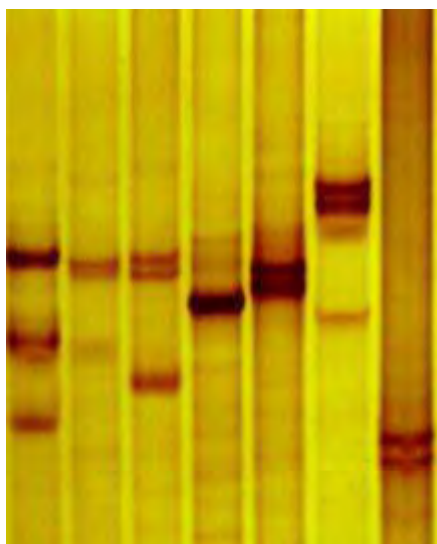
μοριακού βάρους (ladder) , που χρησιμοποιήθηκε για να εκτιμηθεί το μέγεθος, η ποσότητα και η ποιότητα των προϊόντων που ενισχύθηκαν.

3.3. SSCP

Τα προϊόντα PCR, ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή ακρυλαμίδης 8%, σε θερμοκρασία δωματίου για 20 ώρες. Η εμφάνιση των ζωνώσεων με χρώση με νιτρικό άργυρο αποκάλυψε 7 διαφορετικά πρότυπα για το εξόνιο 2 (**Εικόνα 6**) και 3 πρότυπα για το εξόνιο 3 (**Εικόνα 7**). Ο πίνακας περιέχει αναλυτικά τα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν καθώς και το ηλεκτροφορητικό πρότυπο που εμφάνισαν.

- **Exon2:**

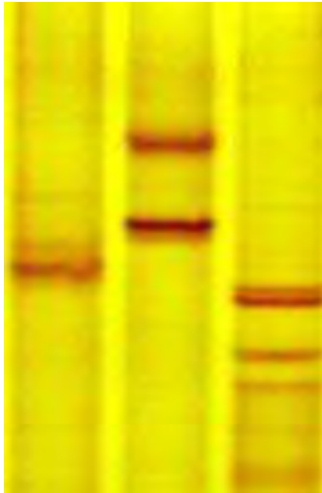
1 2 3 4 5 6 1+7



Εικόνα 6. Ενδεικτικά πρότυπα ανάλυσης SSCP για το εξόνιο 2. Οι διαδρομές 1,2,3,4,5,6,1+7 εμφανίζουν διαφορετικό πρότυπο ζωνώσεων και αντιστοιχούν σε διαφορετικό αλληλόμορφο.

- **Exon3:**

1' 1'+2' 3'



Εικόνα 7. Ενδεικτικά πρότυπα ανάλυσης SSCP για το εξώνιο 3. Οι διαδρομές 1', 1'+2', 3' εμφανίζουν διαφορετικό πρότυπο ζωνώσεων και αντιστοιχούν σε διαφορετικό αλληλόμορφο.

Κωδικός δείγματος	Αλληλόμορφο (exon 2)	Αλληλόμορφο (exon 3)
Cyprus 1	1	3'
Cyprus 2	3	3'
Cyprus 3	3	1'
Cyprus 4	5	1'
Cyprus 5	1	1'
Denmark 1	1+7	
France 1	4	
Germany 1	2	1'+2'
Germany 2	2	1'
Germany 3	4	
Germany 4	1	1'+2'
Greece 1	1	1'+2'
Greece 2	1	1'
Greece 3	1	
Greece 4	2	1'
Greece 5	6	
Greece 6	1	1'+2'
Turkey 1	1	
Turkey 2	3	
Turkey 3	1	3'



AMh (Anatolian-Middle East haplotype)



EUh (European haplotype)



SEeh (South-Eastern European haplotype)

Πίνακας 8. Πρότυπα ανάλυσης SSCP των δειγμάτων

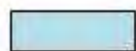
Αλληλόμορφο	Αριθμός ατόμων (N) / Αλληλόμορφο	Άτομα	<i>Lepus europaeus</i> COX2AI - exon 2
1	9	• Cyprus 1	
		• Cyprus 5	
		• Germany 4	
		• Greece 1	
		• Greece 2	
		• Greece 3	
		• Greece 6	
		• Turkey 1	
		• Turkey 3	
1+7	1	• Denmark 1	
2	3	• Germany 1	
		• Germany 2	
		• Greece 4	
3	3	• Cyprus 2	
		• Cyprus 3	
		• Turkey 2	
4	2	• France 1	
		• Germany 3	
5	1	• Cyprus 4	
6	1	• Greece 5	
Σύνολο ατόμων	20		



AMh (Anatolian-Middle East haplotype)



EUh (European haplotype)



SEeh (South-Eastern European haplotype)

Πίνακας 9. Ομαδοποίηση των διαφορετικών αλληλομόρφων των δειγμάτων για το εξόνιο 2

Αλληλόμορφο	Αριθμός ατόμων (N) / Αλληλόμορφο	Άτομα	<i>Lepus europaeus</i> COX7A1 – exon 3
1'	6	• Cyprus 3	
		• Cyprus 4	
		• Cyprus 5	
		• Germany 2	
		• Greece 2	
		• Greece 4	
1'+2'	4	• Germany 1	
		• Germany 4	
		• Greece 1	
		• Greece 6	
3'	3	• Cyprus 1	
		• Cyprus 2	
		• Turkey 3	
Σύνολο ατόμων	13		



AMh (Anatolian-Middle East haplotype)



EUh (European haplotype)



SEeh (South-Eastern European haplotype)

Πίνακας 10. Ομαδοποίηση των διαφορετικών αλληλομόρφων των δειγμάτων για το εξώνιο 3

Στη συνέχεια, επιλέχθηκαν 1 ή 2 αντιπροσωπευτικά άτομα από κάθε πρότυπο για να σταλούν για αλληλούχηση, αφού πρώτα καθαρίστηκαν με τη βοήθεια κατάλληλου kit της Qiagen. Η αλληλούχηση πραγματοποιήθηκε από την εταιρεία CEMIA που εδράζεται στην Λάρισα.

3.4. Αλληλούχηση

Τα χρωματογραφήματα των δειγμάτων αναλύθηκαν με το πρόγραμμα BioEdit, τα αποτελέσματα συγκρίθηκαν με το πρόγραμμα ClustalX και τελικά προέκυψε η τελική αλληλουχία του κάθε δείγματος. Στη συνέχεια, εξαιρέθηκε ένα μέρος του αρχικού και τελικού τμήματος κάθε αλληλουχίας επειδή κατά τη διαδικασία αλληλούχησης παράγονται διαφορετικού μήκους τμήματα λόγω διαφορετικών σημείων έναρξης και λήξης. Μετά το τέλος της παραπάνω διαδικασίας το μέγεθος του τμήματος του εξωνίου 2 ήταν 85 bp και του εξωνίου 3 ήταν 60 bp. Η πιστοποίηση των αλληλουχιών πραγματοποιήθηκε με τον έλεγχο BLAST (Basic Local Alignment Search Tool), ο οποίος αφορά τη σύγκριση κάθε αλληλουχίας με ήδη κατατεθειμένες αλληλουχίες στη διαδικτυακή βάση δεδομένων Genbank του NCBI. Το BLAST επιβεβαίωσε πως οι αλληλουχίες της παρούσας μελέτης προέρχονταν από το ίδιο γένος και απορρίφθηκε η πιθανότητα χρήσης λανθασμένων αλληλουχιών κατά την ανάλυση, ή μόλυνσης των δειγμάτων με ξένο γενετικό υλικό.

Μετά την αλληλούχηση μερικά αλληλόμορφα που φαίνεται να παρουσίαζαν διαφορετικά πρότυπα SSCP τελικά αποδείχθηκε ότι δεν είχαν διαφορές στην νουκλεοτιδική τους αλληλουχία γεγονός που οδήγησε στη μείωση των παρατηρούμενων αλληλομόρφων στους 4 για το εξώνιο 2 και σε αύξηση των αλληλομόρφων στους 4 για το εξώνιο 3. Η μείωση των παρατηρούμενων διαφορετικών αλληλομόρφων ίσως να οφείλεται σε ύπαρξη πολυμορφικών θέσεων




στα 2 ιντρόνια του γονιδίου ενώ η αύξηση σε μη ακριβή ομαδοποίηση των αλληλομόρφων με βάση τα πρότυπα SSCP.

Αλληλόμορφο πριν την αλληλούχηση	Αλληλόμορφο μετά την αλληλούχηση	Αριθμός ατόμων (N) / Αλληλόμορφο	Άτομα	<i>Lepus europaeus</i> COX2AI – exon 2
1	1	9	• Cyprus 1	
			• Cyprus 5	
			• Germany 4	
			• Greece 1	
			• Greece 2	
			• Greece 3	
			• Greece 6	
			• Turkey 1	
			• Turkey 3	
1+7	1+7	1	• Denmark 1	
3	3	3	• Cyprus 2	
			• Cyprus 3	
			• Turkey 2	
2	8	7	• Germany 1	
4			• Germany 2	
5			• Greece 4	
6			• France 1	
			• Germany 3	
			• Cyprus 4	
			• Greece 5	

Πίνακας 11. Ομαδοποίηση των διαφορετικών αλληλομόρφων των δειγμάτων για το εξώνιο 2 μετά την αλληλούχηση

	AMh (Anatolian-Middle East haplotype)
	EUh (European haplotype)
	SEeh (South-Eastern European haplotype)

Αλληλόμορφο πριν την αλληλούχηση	Αλληλόμορφο μετά την αλληλούχηση	Αριθμός ατόμων (N) / Αλληλόμορφο	Άτομα	<i>Lepus europaeus</i> COX2AI – exon 3
1'	α	1	• Cyprus 3	
	β	1	• Cyprus 5	
1'+2'	β	1	• Germany 4	
	γ	1	• Greece 6	
3'	3'	1	• Cyprus 1	

	AMh (Anatolian-Middle East haplotype)
	EUh (European haplotype)
	SEeh (South-Eastern European haplotype)

Πίνακας 12. Ομαδοποίηση των διαφορετικών αλληλομόρφων των δειγμάτων για το εξώνιο 3 μετά την αλληλούχηση

Οι αλληλουχίες που προέκυψαν είναι :

- **Εξώνιο 2:**

	10	20	30	40	50	60	70
Protypo_3_Cyprus_3	GCGGACAACSACCTCCCGGTGCACCTGAAGGGCGGTGGGATGGACAACATCCTCTACCGTCTGACCATGACCCCTGACTC						
Protypo_1_Turkey_1C.....W.S.....						
Protypo_1+7_Denmark_1	.A.....C.....						
Protypo_2_Germany_2C.....						
Protypo_2_Germany_1C.....						
Protypo_4_Germany_4C.....						
Protypo_6_Greece_5C.....						
Protypo_5_Cyprus_4C.....						

Εικόνα 8. Απεικόνιση της διαδικασίας στοίχισης των αλληλουχιών για το εξώνιο 2 στο πρόγραμμα BioEdit

- **Εξώνιο 3:**

	10	20	30	40	50	60
Protypo_3_Cyprus_1	CCAGGCACTGTSTACAGCTTGTACTGCTTCGGCTGGGCCCTCAGTGATCCACAAGAAGTGA					
Protypo_1_Cyprus_3C.....S.....CC.AC.C.C..A...					
Protypo_1_Cyprus_5C.....CT.CCC.....					
Protypo_1+2_Germany_4C.....CT.CCC.....					
Protypo_1+2_Greece_6C.....CT.CCC..G.....					

Εικόνα 9. Απεικόνιση της διαδικασίας στοίχισης των αλληλουχιών για το εξώνιο 3 στο πρόγραμμα BioEdit

3.5. Επεξεργασία των στοιχισμένων αλληλουχιών

Με το πρόγραμμα BioEdit, εκτός από τη στοίχιση των αλληλουχιών, γίνονται εκτιμήσεις σχετικά με τις συντηρητικές περιοχές των αλληλουχιών, όπως για τον αριθμό τους, το μήκος τους και την αλληλουχία τους. Επίσης, προσδιορίστηκαν οι πολυμορφικές θέσεις ανάμεσα στις αλληλουχίες. Συνολικά, βρέθηκαν 4 πολυμορφικές θέσεις για το εξώνιο 2 και 12 για το εξώνιο 3, εκ των οποίων όμως καμία δεν ήταν πληροφοριακή για τη φειδωλότητα. Ως πληροφοριακές θέσεις φειδωλότητας προσμετρούνται οι θέσεις στις οποίες εμφανίζονται τουλάχιστον δύο διαφορετικά νουκλεοτίδια και το καθένα απαντάται τουλάχιστον δύο φορές στο σύνολο των αλληλουχιών που εξετάζονται.

3.6. Εκτίμηση γενετικών αποστάσεων

Οι γενετικές αποστάσεις μεταξύ των υπό εξέταση αλληλουχιών εκτιμήθηκαν με το διπαραμετρικό μοντέλο Kimura. Πρόκειται για ένα απλό μοντέλο, το οποίο επιτρέπει διαφορετικό ρυθμό εμφάνισης των μεταπτώσεων και των μεταστροφών. Ο υπολογισμός των αποστάσεων μεταξύ των αλληλομόρφων, δηλαδή η επί τοις εκατό διαφοροποίηση που εμφανίζουν μεταξύ τους, πραγματοποιήθηκε με το πρόγραμμα MEGA v.5. Στις εικόνες που ακολουθούν (**Εικόνα 10 και 11**) απεικονίζονται οι νουκλεοτιδικές αποκλίσεις μεταξύ των αλληλομόρφων που εξετάστηκαν για τους αντιπροσώπους του είδους *Lepus europaeus*. Η μέση τιμή των αποστάσεων είναι 0,006 για το εξώνιο 2 και 0,125 για το εξώνιο 3.

- **Εξώνιο 2:**

	1	2	3	4	5	6	7	8
1. Protypo 3 Cyprus 3								
2. Protypo 1 Turkey 1	0.012							
3. Protypo 1+7 Denmark 1	0.025	0.012						
4. Protypo 2 Germany 2	0.012	0.000	0.012					
5. Protypo 2 Germany 1	0.012	0.000	0.012	0.000				
6. Protypo 4 Germany 4	0.012	0.000	0.012	0.000	0.000			
7. Protypo 6 Greece 5	0.012	0.000	0.012	0.000	0.000	0.000		
8. Protypo 5 Cyprus 4	0.012	0.000	0.012	0.000	0.000	0.000	0.000	

Εικόνα 10. Γενετικές αποστάσεις για το εξώνιο 2

- **Εξώνιο 3:**

	1	2	3	4	5
1. Protypo 3 Cyprus 1					
2. Protypo 1 Cyprus 3	0.195				
3. Protypo 1 Cyprus 5	0.136	0.196			
4. Protypo 1+2 Germany 4	0.136	0.196	0.000		
5. Protypo 1+2 Greece 6	0.161	0.196	0.017	0.017	

Εικόνα 11. Γενετικές αποστάσεις για το εξώνιο 3

3.7. Αμινοξική ανάλυση

Η μετάφραση των αλληλουχιών με τη χρήση του κατάλληλου γενετικού κώδικα δεν αποκάλυψε κωδικόνιο λήξης στο εξώνιο 2 ενώ στο εξώνιο 3 βρέθηκε κωδικόνιο λήξης στην αναμενόμενη θέση, στο τέλος της αλληλουχίας οπότε πράγματι οι αλληλουχίες μας είναι οι επιθυμητές. Επίσης, εντοπίστηκαν οι πολυμορφικές θέσεις των αμινοξικών αλληλουχιών, οι οποίες ήταν 3 για το εξώνιο 2 και 7 για το εξώνιο 3, εκ των οποίων καμία δεν εμφανίζεται σε περισσότερα από ένα αλληλόμορφα.

- **Εξώνιο 2:**

```
                10          20
.....|.....|.....|.....|.....
Protypo_3_Cyprus_3  ADNXLPVHLKGGGMDNILYRLTMTPLTLGX
Protypo_1_Turkey_1  ...D.....X.....
Protypo_1+7_Denmark_1 E..D.....
Protypo_2_Germany_2 ...D.....
Protypo_2_Germany_1 ...D.....
Protypo_4_Germany_4 ...H.....
Protypo_6_Greece_5  ...D.....
Protypo_5_Cyprus_4  ...D.....
```

Εικόνα 12. Απεικόνιση της διαδικασίας στοίχισης των μεταφρασμένων αλληλουχιών για το εξώνιο 2 στο πρόγραμμα BioEdit

- **Εξώνιο 3:**

```
                10          20
.....|.....|.....|.....|.....
Protypo_3_Cyprus_1  PGTXYSLYCFGWASVIHKK*
Protypo_1_Cyprus_3  ...V.....LX.....PTH.*
Protypo_1_Cyprus_5  ...V.....L.....FP...*
Protypo_1+2_Germany_4 ...V.....L.....FP...*
Protypo_1+2_Greece_6 ...V.....L.....FPR...*
```

Εικόνα 13. Απεικόνιση της διαδικασίας στοίχισης των μεταφρασμένων αλληλουχιών για το εξώνιο 3 στο πρόγραμμα BioEdit

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

4.1. Γενικά

Με την ανάπτυξη των μοριακών μεθόδων, είναι πλέον εφικτό να διερευνηθούν πρότυπα γεωγραφικής ποικιλότητας με τη χρήση μοριακών δεικτών και να συναχθούν ενδοειδικές φυλογεωγραφικές δομές. Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν να αποσαφηνιστούν οι φυλογενετικές σχέσεις μεταξύ των πληθυσμών του *Lepus europaeus*, με τη χρήση μοριακών δεικτών του πυρηνικού DNA, και να προσεγγιστούν βασικά ερωτήματα που αφορούν τόσο στη φυλογένεση και βιογεωγραφία του είδους, όσο και στις διεργασίες που καθόρισαν ή επηρέασαν την εξελικτική και βιογεωγραφική ιστορία.

Ένα από τα αρνητικά της χρήσης μοριακών δεικτών για την κατανόηση φυλογενετικών σχέσεων είναι ότι τα συμπεράσματα που απορρέουν από την ανάλυση ενός γονιδίου ίσως δεν είναι αληθή αλλά παραπλανητικά. Οι φυλογενετικές σχέσεις που προκύπτουν από την μελέτη ενός γονιδίου αποτυπώνουν την εξελικτική πορεία του συγκεκριμένου γονιδίου που πιθανώς να μην ταυτίζεται με την εξελικτική πορεία του οργανισμού. Επομένως, μελετώντας ένα είδος μπορούν να προκύψουν πολλές διαφορετικές εξελικτικές πορείες ανάλογα με το γονίδιο που χρησιμοποιούμε κάθε φορά (Maddison 1997).

Γενικά, η εξαγωγή φυλογενετικών σχέσεων είναι μία εκτιμητική διαδικασία. Πρακτικά, αυτό που γίνεται είναι η διατύπωση μιας υπόθεσης για μια εξελικτική διαδικασία που έγινε στο παρελθόν, χρησιμοποιώντας ένα σχετικά μικρό ποσοστό πληροφορίας, αυτό που εμπεριέχεται στο σύνολο των δεδομένων που χρησιμοποιήθηκαν (Swofford et al 1996). Επιπρόσθετα, η χρήση μοριακών δεδομένων για τη διερεύνηση φυλογενετικών σχέσεων περιλαμβάνει και μια σειρά αδυναμιών που σχετίζονται με την επιλογή των κατάλληλων δεικτών, την ανεπαρκή ή μη αντιπροσωπευτική δειγματοληψία σε επίπεδο πληθυσμών και την πιθανότητα συγκλίνουσας εξέλιξης.

4.2. Πλήθος αλληλομόρφων

Από το σύνολο των 20 ατόμων του είδους *Lepus europaeus*, από τα οποία αντιπροσωπευτικά επιλέχθηκαν μερικά και προσδιορίστηκε η πρωτοταγής τους αλληλουχία για τα εξώνια 2 και 3 του γενετικού τόπου *COX7A1*, προέκυψαν 4 διαφορετικά αλληλόμορφα για το εξώνιο 2 και 4 διαφορετικά αλληλόμορφα για το εξώνιο 3. Οι περισσότεροι πληθυσμοί από τους οποίους χρησιμοποιήθηκαν περισσότερα από ένα άτομα, έδειξαν ότι περιλαμβάνουν περισσότερα από ένα αλληλόμορφα. Από τα αποτελέσματα φαίνονται πληθυσμοί οι οποίοι παρά το ότι είναι πολύ κοντινοί γεωγραφικά εμφανίζουν διαφορές σε νουκλεοτιδικό επίπεδο γεγονός που είναι ενδεικτικό για τη μεγάλη ενδοπληθυσμιακή ποικιλότητα που χαρακτηρίζει τον Ευρωπαϊκό λαγό. Επίσης, ενδιαφέρον παρουσιάζει η ομαδοποίηση ατόμων που ανήκουν σε διαφορετικά ενδοειδικά αλληλόμορφα σύμφωνα με την ισχύουσα ταξινόμηση, που διαχωρίζει τον ευρωπαϊκό λαγό σε 5 πρότυπα, όπως αυτά αναλύθηκαν από προηγούμενη διατριβή (Stamatis K et al 2011). Πιο συγκεκριμένα, παρατηρείται ότι περισσότεροι του ενός αλληλόμορφου παρουσιάζουν το ίδιο αλληλόμορφο. Για παράδειγμα το αλληλόμορφο 1 του εξωνίου 2 εμφανίζεται σε δείγματα που ανήκουν σε πρότυπα AMh, EUh-A και SEEh. Μια άλλη παρατήρηση, η οποία είναι αρκετά ενδιαφέρουσα, είναι το γεγονός ότι υπάρχει πληθώρα πληθυσμών, οι οποίοι μοιράζονται κοινά αλληλόμορφα, γεγονός που αναδεικνύει την περίπλοκη σχέση και σύνδεση που εμφανίζουν οι πληθυσμοί μεταξύ τους ακόμα και όταν βρίσκονται σε γεωγραφική απόσταση. Μάλιστα, στην περίπτωση του εξωνίου 2 του γονιδίου *COX7A1*, ένα αλληλόμορφο (αλληλόμορφο 8) εμφανίζεται σε άτομα από 4 διαφορετικούς πληθυσμούς.

Οι πολυμορφικές θέσεις ανάμεσα στις αλληλουχίες είναι 4 για το εξώνιο 2 και 12 για το εξώνιο 3, χωρίς όμως να είναι καμία από αυτές πληροφοριακή για τη φειδωλότητα. Η παρατήρηση αυτή καταδεικνύει αρκετά χαμηλό βαθμό διαφοροποίησης του εν λόγω γενετικού τόπου.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα που προέκυψαν, μεταξύ των πληθυσμών υπάρχει πολύ μικρή διαφοροποίηση (λίγες πολυμορφικές θέσεις) ενώ δεν υπάρχει σαφής ένδειξη διαχωρισμού ανάμεσα στους πληθυσμούς. Η απουσία καθαρής γεωγραφικής δομής μπορεί εν μέρει να δικαιολογηθεί από την επίδραση της γονιδιακής ροής

ακόμα και σε μεγάλες αποστάσεις. Μια περισσότερο πιθανή εξήγηση ίσως είναι μια σχετικά πρόσφατη εξάπλωση που δεν επέτρεψε στους πληθυσμούς να διαφοροποιηθούν πολύ από τα αρχικά αποθέματα.

4.3. Περαιτέρω έρευνα

Τα αποτελέσματα της παρούσας έρευνας ίσως είναι παραπλανητικά λόγω των δυσκολιών που περιγράφηκαν παραπάνω και αφορούν την φυλογενετική ανάλυση με χρήση ενός μόνο γενετικού τόπου και με μικρό αριθμό δειγμάτων. Για να αποφευχθούν οι αρνητικές αυτές συνιστώσες, που ταυτίζονται με την διερεύνηση εξελικτικών σχέσεων, και για τη διατύπωση έγκυρων και διαχειρίσιμων αποτελεσμάτων για τις φυλογενετικές σχέσεις του *Lepus europaeus* προτείνεται η χρησιμοποίηση μεγάλου αριθμού δειγμάτων που να καλύπτουν ομοιογενώς τον ευρύτερο ευρωπαϊκό χώρο. Επιπρόσθετα, προτείνεται ενδελεχής μορφολογική εξέταση των αντιπροσώπων των πληθυσμών που θα εξετασθούν μοριακά σε μελλοντικές μελέτες προκειμένου να βρεθούν πρόσθετοι μορφολογικοί χαρακτήρες που είτε θα διαχωρίζουν νέες μορφές είτε θα περιγράφουν καλύτερα το είδος αυτό.

Όλα τα προηγούμενα μένει να διερευνηθούν μελλοντικά με τη χρήση επιπρόσθετων μοριακών εργαλείων, π.χ. με την χρήση μιτοχονδριακού DNA, που θα εξετάσουν τα επίπεδα γονιδιακής ροής μεταξύ των πληθυσμών, και πυρηνικών γονιδίων προκειμένου να προσεγγιστεί η φυλογενετική ιστορία και οι εξελικτικές σχέσεις και συνδέσεις των πληθυσμών.

Για ανίχνευση βαθύτερων φυλογεωγραφικών σχέσεων χρειάζονται πιο αργοί μοριακοί δείκτες ενώ από την άλλη πρόσφατα γεγονότα απαιτούνται αλληλουχίες πιο μεταβλητές ή πιο γρήγορα εξελισσόμενες (Emerson & Hewitt 2005).

Οι σχετικά γρήγοροι εξελικτικοί ρυθμοί του mtDNA το καθιστούν κατάλληλο μοριακό δείκτη για την διερεύνηση των ενδοειδικών εξελικτικών σχέσεων του ευρωπαϊκού λαγού που οφείλονται σε σχετικά πρόσφατα γεγονότα. Επίσης, το μιτοχονδριακό DNA διαθέτει μια σειρά από χαρακτηριστικά που το καθιστούν

ιδιαίτερα χρήσιμο σύστημα για την ανίχνευση γενετικών διαφορών. Είναι εύκολη η απομόνωση του σε σχέση με οποιοδήποτε τμήμα του πυρηνικού DNA. Η ευκολία αυτή έγκειται στην ασυνήθιστα μικρή πυκνότητά του σε κλίση CsCl, στο μεγάλο αριθμό αντιγράφων του και στην παρουσία του σ' ένα οργανίδιο διαφορετικό του πυρήνα. Επιπλέον, εξαιτίας του μικρού μεγέθους του και της απουσίας των πολύπλοκων χαρακτηριστικών του πυρηνικού DNA, όπως τα εσόνια, οι επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες, τα μεταθέσιμα στοιχεία, είναι εύκολη η εύρεση γονιδίων και η αλληλούχηση τους. Ο μεγάλος αριθμός μορίων ανά κύτταρο σε σχέση με οποιοδήποτε τμήμα του πυρηνικού DNA αυξάνουν την πιθανότητα εύρεσης τμημάτων του ικανά για ανάλυση αλληλουχίας.

Ωστόσο, το μιτοχondριακό DNA επειδή κληρονομείται μονογονικά αντανακλά μόνο την ιστορία των θηλυκών ατόμων του πληθυσμού και έτσι μπορεί να μην αντιπροσωπεύει την εξελικτική ιστορία όλου του πληθυσμού, όπως για παράδειγμα σε περίπτωση που η διασπορά ή μετακίνηση των ατόμων του είδους γίνεται μόνο από αρσενικά άτομα ενώ τα θηλυκά παραμένουν στάσιμα, τότε οι απλότυποι του μιτοχondριακού DNA θα είναι χαρακτηριστικοί για κάθε πληθυσμό και τα δεδομένα του mtDNA θα μας οδηγήσουν σε λανθασμένα συμπεράσματα σχετικά με τις μετακινήσεις των ατόμων μεταξύ των πληθυσμών. Για αυτό το λόγο χρησιμοποιούνται συνήθως συμπληρωματικά και μελέτες του πυρηνικού DNA ή περιοχή του χρωμοσώματος Y, το οποίο διακρίνεται από πατρική κληρονόμηση (Garrigan D & Hammer M. F. 2006).

Επιπρόσθετα, το μιτοχondριακό DNA συμπεριφέρεται σαν ένας γενετικός τόπος και τα αποτελέσματα που θα προκύψουν από την μελέτη ενός μιτοχondριακού γονιδίου μπορεί να μην συμφωνούν με την εξελικτική ιστορία του υπό εξέταση είδους. Επομένως είναι πιο πιθανή η εξαφάνιση και μη παρατήρηση μερικών απλοτύπων που μπορεί να οδηγήσει τους ερευνητές στην υπεραπλούστευση της πληθυσμιακής ιστορίας ή στην υποεκτίμηση της γενετικής ποικιλότητας. Αντίθετα, το πυρηνικό γονιδίωμα περιλαμβάνει περιοχές που κωδικοποιούν για πρωτεΐνες, RNA, ενώ φέρει και μη κωδικές περιοχές και προσφέρει μια πληθώρα ανεξάρτητων δεικτών, οι οποίοι εξελίσσονται με διαφορετικούς ρυθμούς.

Συμπερασματικά με τη συνδυαστική χρήση τόσο μιτοχονδριακών όσο και πυρηνικών δεικτών θα μειωθούν τα παραπλανητικά συμπεράσματα στα οποία μπορεί να καταλήξει μια έρευνα όταν χρησιμοποιεί μόνο ένα δείκτη.

Όλα αυτά, μαζί με τη συνδρομή της λεπτομερειακής μορφολογικής εξέτασης των αντιπροσώπων και τη χρήση μορφομετρικών μεθόδων, θα βοηθήσουν να προσδιοριστεί με μεγαλύτερη ακρίβεια, λεπτομέρεια και πιστότητα η φυλογεωγραφία του ευρωπαϊκού λαού στον ευρύτερο ευρωπαϊκό χώρο.

Με όλες τις προαναφερθείσες μελέτες θα αναλυθούν οι πιθανές «ζώνες επαφής» ως προς τη γονιδιακή τους ροή, ώστε να εκτιμηθεί το ποσοστό απομόνωσης των πληθυσμών.

5. Βιβλιογραφία

- Avise J. (2000) *Phylogeography: The History and Formation of Species*. President and Fellows of Harvard College.
- Beheregaray L. B. (2008) Twenty years of phylogeography: the state of the field and the challenges for the Southern Hemisphere. *Mol. Ecol.* 17, 3754-3774.
- Broekhuizen, S., Maaskamp, F. (1980) Behaviour of does and leverets of the European hare (*Lepus europaeus*) whilst nursing. *J. Zool. Lond.* 191:487-501
- Caillol M., Meunier M., Mondain-Monval M., Simon P. (1988) Seasonal variations in testis size, testosterone and LH basal levels, and pituitary response to luteinizing hormone releasing hormone in the brown hare, *Lepus europaeus*. *Can. J. Zool.*, 67:1626-1630.
- Emerson B. C., Hewitt G. M. (2005) Phylogeography. *Current Biology* 15: R367-R371
- Esser C., Martin W., Dagan T. (2007) The origin of mitochondria in light of a fluid prokaryotic chromosome model. *Biol Lett* 3(2): 180–184.
- Frylestam B. (1980) Reproduction in the European Hare in Southern Sweden. *Holarctic Ecology* 3, 74-80
- Garrigan D., Hammer M. F. (2006) Reconstructing human origins in the genomic era. *Nat. Rev. Genet.* 7(9):669-80
- Georgatsos J. (2005) Introduction in biochemistry vol:6, Giaxoudi publications
- Hall E., Keelson K. (1959) *The Mammals of North America*, vol. 2. New York: The Ronald Press Company
- Harrison R G (1989) Animal mitochondrial-DNA as a genetic marker in population and evolutionary biology. *Trends Ecol. Evol.* 4, 6–11 e1000602
- Komiyama T., Rospert S., Koehler C., Looser R., Schatz G., Mihara K. (1998) Interaction of mitochondrial targeting signals with acidic receptor domains along the protein import pathway: evidence for the “acid chain” hypothesis. *EMBO J* 17(14): 3886–3898

- Lincoln G. (1974) Reproduction and March madness in the Brown hare, *Lepus europaeus*. *J.Zool. Lond.* 174: 1-14
- Maddison, W.P., 1989. Reconstruction character evolution on polytomous cladograms. *Cladistics*, 5, 365-377
- Maddison W. P. (1997) Gene Trees in Species Trees *Syst Biol* 46 (3): 523-536.doi: 10.1093/sysbio/46.3.523
- Martin W F , Mentel M (2010) The Origin of Mitochondria. *Nature Education* 3(9):58
- McBride H. M., Neuspiel M., Wasiak S. (2006) Mitochondria: more than just a powerhouse. *Current Biology* 16(14): R551-560
- McMillin J B ,Dowhan W (2002) Cardiolipin and apoptosis. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1585(2-3), 97-107
- Moritz C. , Dowlin T. E., Brown W. M. (1987) Evolution of animal mitochondrial DNA: relevance for population biology and systematics. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 18, 269–292.
- Oca-Cossio J., Kenyon L., Hao H., Moraes C. T. (2003) Limitations of Allotopic Expression of Mitochondrial Genes in Mammalian Cells. *Genetics*, 165(2), 707-720
- Poulakakis N. (2011), University of Crete, Notes in evolutionary ecology
- Philippe H., Brinkmann H., Lavrov D.V., Littlewood D.T.J., Manuel M., Wörheide G., Baurain D., 2011. Resolving Difficult Phylogenetic Questions: Why More Sequences Are Not Enough. *PLoS Biol.* 9(3), Raff R., Mahler H. (1972) The non symbiotic origin of mitochondria. *Science* 177(4049):575-82
- Sambrook J. *Molecular Cloning : Laboratory Manual* (third edition) (2000)
- Sagan L., (1967) On the origin of mitosing cells. *Journal of Theoretical Biology*, 14(3), 255-274
- Schirmer T(1998) General and specific Porins from Bacterial Outer Membranes. *Journal of structural biology*, 121(2), 101-109

- Stamatis C., Suchentrunk F., Moutou A. K., Giacometti M., Haerer G., Djan M., Vapa L., Vukovic M., Tvrtković N., Sert H., Alves P. C., Mamuris Z. (2009) Phylogeography of the brown hare (*Lepus europaeus*) in Europe: a legacy of south-eastern Mediterranean refugia? *J. Biogeogr.* 36, 515-528 .
- Stryer L. , Tymoczko J. L. , Berg J. M. *Biochemistry* , 5th edition
- Swofford D., Olsen G., Waddell P. & Hillis D. (1996) *Phylogenetic inference in molecular systematic.* 2nd ed. Sinauer and Associates pp.407-514
- Tamura. K., Dudley, J., Nei, M, Kumar, S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and evolution* (2007) 24:1596
- Thompson, J., Gibson, T., Plewniak, F., Jeanmougin, F., Higgins, D. The CLUSTAL_X windows interface : flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic acid research* (1997) Vol25: 4876

