

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

Πτυχιακή διατριβή

**Συγκριτική ανάλυση του γονιδίου *COXIII* σε όλο
το εύρος κατανομής του είδους *Lepus europaeus***

Ανδρέας Τσιπουρλιάνος



ΛΑΡΙΣΑ, 2013

**Συγκριτική ανάλυση του γονιδίου COXIII σε όλο
το εύρος κατανομής του είδους *Lepus europaeus***

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

| | |
|--------------------------------|--|
| ΜΑΜΟΥΡΗΣ ΖΗΣΗΣ: (ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ) | ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ Καθηγητής Γενετικής Ζωικών Πληθυσμών του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας |
| ΣΑΡΑΦΙΔΟΥ ΘΕΟΛΟΓΙΑ | Λέκτορας Μοριακής Γενετικής Ζωικών Οργανισμών του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας |
| ΨΑΡΡΑ ANNA- ΜΑΡΙΑ | Επίκουρος Καθηγήτρια Βιοχημείας του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας |

Η παρούσα πτυχιακή διατριβή 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. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω την Λέκτορα Μοριακής Γενετικής, κ. Θ.Σαραφίδου και την Επίκουρο Καθηγήτρια Βιοχημείας, κ. Α. Ψαρρά για την συμμετοχή στην τριμελή συμβουλευτική επιτροπή. Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον υποψήφιο διδάκτορα κ. Θέμη Γιαννούλη για την πολύτιμη βοήθειά του και τις χρήσιμες συμβουλές του, καθώς και τους Σταμάτη Κώστα και Σαρρή Κωνσταντίνα για τη βοήθειά τους κατά τη διεξαγωγή των πειραμάτων. Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την Κυριακίδου Πελαγία και όλα τα υπόλοιπα μέλη του εργαστηρίου για τη συνεργασία και το ευχάριστο κλίμα στο εργαστήριο.

Περίληψη

Στην παρούσα μελέτη μελετήθηκε το μιτοχονδριακό γονίδιο COXIII, το οποίο είναι υπεύθυνο για τη σύνθεση της τρίτης υπομονάδας της κυτοχρωμικής οξειδάσης, σε πληθυσμούς *Lepus europaeus* από Τουρκία, Ελλάδα, Κύπρο και Ευρώπη. Πραγματοποιήθηκε αλληλούχιση και νουκλεοτιδική, αμινοξική και φυλογενετική ανάλυση μεταξύ των δειγμάτων, με σκοπό να προσδιοριστούν οι σχέσεις μεταξύ τους και μεταξύ πληθυσμών από διαφορετικές γεωγραφικές περιοχές. Παρατηρήθηκαν αρκετές μεταλλάξεις σημείου, οι περισσότερες από τις οποίες ήταν συνώνυμες, καθώς και έξι μη συνώνυμες. Αξίζει να σημειωθεί ότι σε αρκετές περιπτώσεις, οι μεταλλάξεις εμφάνιζαν σαφή γεωγραφική κατανομή, δηλαδή δείγματα από την ίδια γεωγραφική περιοχή παρουσίαζαν ομοιότητες στις μεταλλάξεις που βρέθηκαν και διαφορές σε σχέση με τα δείγματα ατόμων διαφορετικής γεωγραφικής περιοχής. Τα δεδομένα που προέκυψαν από τη μελέτη του COXIII, όσον αφορά τις γενετικές αποστάσεις, μέσα και μεταξύ των ομάδων ήταν τα εξής: 0.1% για την ελληνική, 0.2% για την ευρωπαϊκή και 0.6% για την τούρκικη και μεταξύ ευρωπαϊκών και ελληνικών πληθυσμών 0,5%, μεταξύ ευρωπαϊκών και τούρκικων πληθυσμών 0.9% και μεταξύ ελληνικών και τούρκικων πληθυσμών 1.1%. Τέλος συζητείται ο ρόλος των μιτοχονδριακών μεταλλάξεων στα γονίδια που συμμετέχουν στην οξειδωτική φωσφορυλίωση ως προς τη διαμόρφωση της φυλογεωγραφίας του είδους

Abstract

The present study investigated the mitochondrial gene COXIII, which is responsible for the synthesis of the third subunit of cytochrome c oxidase. Samples were collected from populations of *Lepus europaeus* in Turkey, Greece, Cyprus and central Europe. To establish the relationships between samples and between populations of different geographic locations, we performed sequencing and nucleotide, amino acid and phylogenetic analysis of the samples. Several mutations were observed, most of which were synonymous, and six non-synonymous. It is worth noting that in several cases, mutations showed a clear geographic distribution, ie samples from the same geographic area presented similarities in mutations between them and differences between samples from different geographic area. The results of the study of COXIII, regarding the genetic distances within and between groups, were as follows: 0.1% for Greek, 0.2% for Europe and 0.6% for Turkish and between European and Greek populations 0, 5% between European and Turkish populations 0.9%, and between Greek and Turkish populations 1.1%. Finally, the role of mitochondrial mutations of the genes that participate in oxidative phosphorylation in shaping phylogeography is discussed

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

| | |
|--|-----------|
| 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ..... | 7 |
| 1.1. Μιτοχόνδριο..... | 7 |
| 1.2. Οξειδωτική φωσφορυλίωση..... | 9 |
| 1.3. Μηχανισμός οξειδωτικής φωσφορυλίωσης..... | 10 |
| 1.4. Μιτοχονδριακό DNA..... | 12 |
| 1.5. Ροή πληροφοριών- Μεταγραφή και Μετάφραση..... | 14 |
| 1.6. Ρυθμός εξέλιξης του μιτοχονδριακού DNA..... | 15 |
| 1.7. Φυσική επιλογή και εξέλιξη κωδικοποιημένων από mtDNA πεπτιδίων..... | 16 |
| 1.8. Συν- προσαρμογή μιτοχονδριακών και πυρηνικών γονιδιωμάτων..... | 18 |
| 1.9. Ευρωπαϊκός λαγός (<i>Lepus europaeus</i>)..... | 19 |
| 1.10. Αντικείμενο μελέτης..... | 20 |
| 2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ..... | 21 |
| 2.1. Απομόνωση DNA..... | 21 |
| 2.2. Προσδιορισμός συνολικής ποσότητας DNA ανά δείγμα..... | 22 |
| 2.3. Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR)..... | 23 |
| 2.4. Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης..... | 24 |
| 2.5. Καθαρισμός DNA..... | 25 |
| 3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ..... | 26 |
| 3.1. Απομόνωση DNA..... | 26 |
| 3.2. PCR..... | 26 |
| 3.3. Καθαρισμός DNA..... | 27 |
| 3.4. Αλληλούχιση..... | 28 |
| 3.5. Νουκλεοτιδική ανάλυση..... | 37 |
| 3.6. Αμινοξική ανάλυση..... | 39 |
| 3.7. Φυλογενετική ανάλυση..... | 39 |
| 4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ..... | 41 |
| 5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ..... | 43 |

1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1.ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΟ

Για τη διατήρηση της ζωής απαιτείται ενέργεια, η οποία παράγεται και χρησιμοποιείται από τα κύτταρα με τη μορφή της τριφωσφορικής αδενοσίνης (ATP). Η διαδικασία παραγωγής του ATP παρουσία οξυγόνου καλείται αερόβια αναπνοή και στα ευκαρυωτικά κύτταρα κεντρικό ρόλο σε αυτήν παίζουν τα μιτοχόνδρια (κύκλος του Krebs και οξειδωτική φωσφορυλίωση).

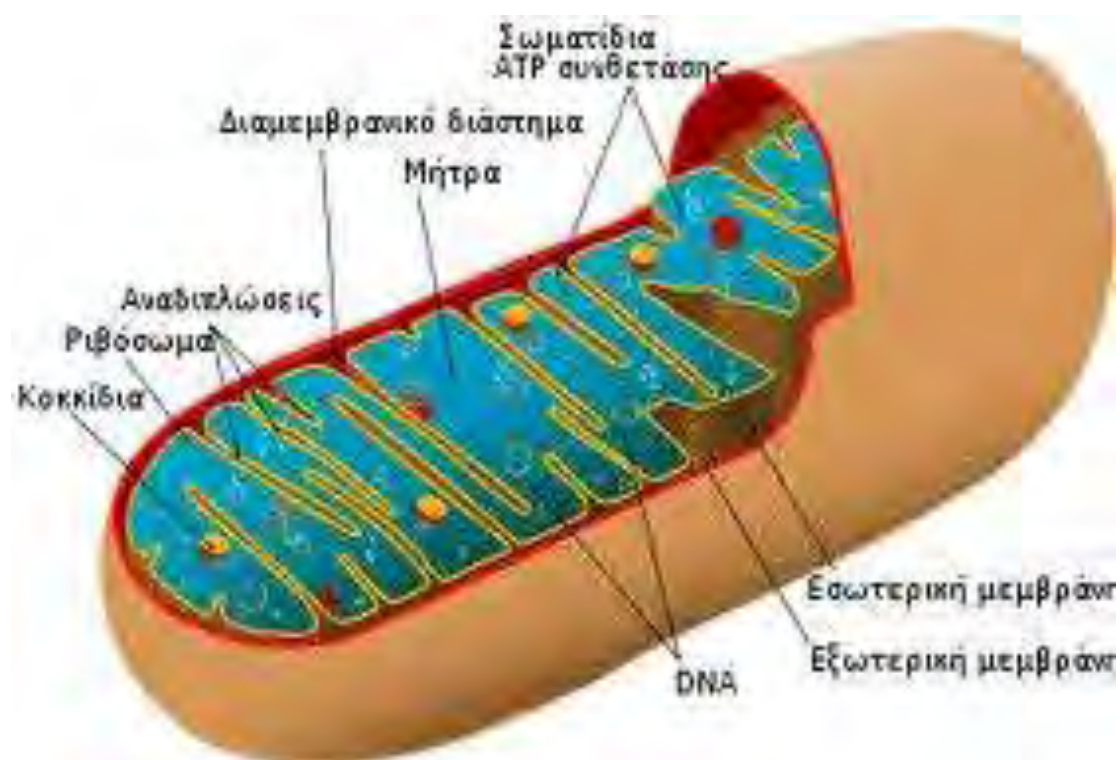
Τα μιτοχόνδρια, ανακαλύφθηκαν ως συστατικά του κυττάρου το 1886 από τον Altmann. Εξαιτίας του μικρού τους μεγέθους, η διερεύνησή τους περιορίστηκε για αρκετά χρόνια. Το 1898 ο Benda εισάγει τον όρο «μιτοχόνδριο», το 1904 ο Meves περιγράφει το μιτοχόνδριο στα φυτικά κύτταρα και το 1934 οι Bensley και Hoerr απομονώνουν τα οργανίδια με υπερφυγοκέντρηση. Η λεπτομερειακή δομή, όμως, έγινε γνωστή αρκετά χρόνια αργότερα και επέτρεψε την κατανόηση των βιοχημικών μηχανισμών και τη συσχέτιση δομής και λειτουργίας του σημαντικότερου κυτταρικού οργανιδίου, χάρη στις πρωτοποριακές έρευνες των G. Palade, K.R. Porter, F. Sjostrand και άλλων.



Εικόνα 1: Μιτοχόνδριο

Τα μιτοχόνδρια αποτελούν συνήθως το 18-20% του συνολικού κυτταροπλασματικού όγκου του ευκαρυωτικού κυττάρου. Το σχήμα τους δεν είναι σταθερό (συνήθως είναι επίμηκες) και οι διαστάσεις τους είναι 0,3-1μm σε διάμετρο με 1-10μm σε μήκος (Εικόνα 1). Περιέχουν 66% νερό, 22% πρωτεΐνες, 11% λιπίδια και 1%

νουκλεοτίδια και ιόντα. Αποτελούνται από μία εξωτερική μεμβράνη και μία εσωτερική που σχηματίζει πολυάριθμες πτυχώσεις (ο ρυθμός των πτυχώσεων αυξάνει καθώς αυξάνει ο ρυθμός οξειδωτικής φωσφορυλίωσης) (Εικόνα 2). Η εξωτερική μεμβράνη περιέχει οξειδωτικά ένζυμα και είναι διαπερατή σε μικρά ιόντα (περιέχει «πρωτεΐνες μεταφορείς»- πορίνες) και ο διαμεμβρανικός χώρος περιέχει αδενυλική κινάση και άλλα ένζυμα. Η εσωτερική μεμβράνη έχει ιδιαίτερα λιπιδιακή σύσταση, ενώ έχουν εντοπιστεί σε αυτήν αρκετά ένζυμα του κύκλου του Krebs, της αναπνευστικής αλυσίδας και σύνθεσης ATP, με τη συμμετοχή «συντελεστών σύζευξης» F_1 , F_0 και άλλων. Η ουσία στο εσωτερικό της μεμβράνης (χυμός ή μήτρα) είναι κοκκιώδης και περικλείει ένζυμα του κύκλου του Krebs, γλουταμινική αφυδρογονάση, ένζυμα οξείδωσης λιπαρών οξέων, DNA, RNA και ριβοσώματα.



Εικόνα 2: Δομή μιτοχονδρίου

Τα μιτοχόνδρια είναι υπεύθυνα για την παραγωγή ενέργειας με τη μορφή τριφωσφορικής αδενοσίνης (ATP) και θεωρούνται ως τα σημαντικότερα οργάνδια στην όλη διαδικασία της παραγωγής κυτταρικής ενέργειας. Τα παραγόμενα μόρια ATP (περίπου 10.000.000.000 για κάθε τυπικό ευκαρυωτικό κύτταρο στη διάρκεια της ζωής του) συμβάλλουν στην επίτευξη της βιολογικής τάξης με τη σύνθεση μακρομορίων (πρωτεϊνών, DNA, RNA, πολυσακχαριτών, λιπιδίων κ.ά.), την κίνηση μαστιγίων και βλεφαρίδων, τη σύσπαση μυϊκών κυττάρων, τον πολυμερισμό ινιδίων κυτταρικού σκελετού, την ενεργή μεταφορά ιόντων και ρυθμιστικών μορίων μέσω των μεμβρανών, την ενδοκύτωση και έκκριση, την ενζυμική κατάλυση κ.ά. (Μαργαρίτης, 2008).

1.2. ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗ ΦΩΣΦΟΡΥΛΙΩΣΗ



Εικόνα 3: Hans Krebs

Η διαδικασία που ακολουθείται στα μιτοχόνδρια για την παραγωγή ενέργειας, είναι ο μηχανισμός της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης. Η οξειδωτική φωσφορυλίωση είναι το βασικό στάδιο του μεταβολισμού της γλυκόζης, για τρεις λόγους: [α] στο στάδιο αυτό παράγεται η πλειονότητα του ATP· [β] ενεργοποιείται μόνο παρουσία O_2 , γεγονός που καθιστά την οξειδωτική φωσφορυλίωση αερόβιο διεργασία· [γ] μεγάλες ποσότητες $NADH_2$ και $FADH_2$ μετατρέπονται πάλι σε NAD και FAD, για να επαναχρησιμοποιηθούν, σε προηγούμενα στάδια του μεταβολισμού.

Τη δεκαετία του 1950 πολλοί ερευνητές πίστευαν ότι η οξειδωτική φωσφορυλίωση παράγει ATP περίπου όπως η γλυκόλυση. Κατά τη γλύκωση, η φωσφορυλίωση του ATP γίνεται άμεσα από ένα ενδιάμεσο υψηλής ενέργειας. Την ίδια εποχή ήταν διαδεδομένη υπόθεση ότι η αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων παρήγαγε ένα ενδιάμεσο υψηλής ενέργειας, το οποίο θα πρόσδεσε κατευθείαν τη φωσφορική ομάδα στο ATP, όμως ένα τέτοιο ενδιάμεσο δεν ανακαλύφθηκε. Το 1961 ο Peter Mitchell διατύπωσε για πρώτη φορά ότι αυτό το «ενδιάμεσο υψηλής ενέργειας» ήταν η ηλεκτροχημική βαθμίδωση πρωτονίων. Σύμφωνα με το μοντέλο του, που ονομάστηκε χημειοσμωτική υπόθεση, η ενέργεια βαθμίδωσης H^+ που σχηματίζονται κατά τη δίοδο των ηλεκτρονίων στην αλυσίδα αξιοποιείται για να προωθήσει τη σύνθεση ATP. Αυτή η υπόθεση σημαίνει ότι η ηλεκτροχημική βαθμίδωση πρωτονίων είναι απαραίτητη για τη σύνθεση ATP και έτσι η δημιουργία

μίας τεχνητής βαθμίδωσης θα έπρεπε να διεγείρει την παραγωγή ATP. Αλλά παράμενε το ερώτημα πώς η βαθμίδωση ηλεκτρονίων προωθεί τη σύνθεση του ATP. Το 1974 ο Efraim Racker και ο Walther Stoeckenius απέδειξαν ότι ο συνδυασμός της συνθάσης του ATP με μια βαθμίδωση πρωτονίων οδηγεί σε παραγωγή ATP. Οι δύο επιστήμονες διαπίστωσαν ότι μπορούσαν ν' ανασυνθέσουν ένα πλήρες τεχνητό σύστημα παραγωγής ενέργειας συνδυάζοντας μια ATPάση από μιτοχόνδρια της καρδιάς του βοδιού με την ιώδη μεμβράνη του *Halobacterium halobium*. Η κυτταρική μεμβράνη αυτού του βακτηρίου είναι γεμάτη βακτηριοδοψίνη, μια πρωτεΐνη που αντλεί πρωτόνια προς το εξωτερικό του κυττάρου μετά από έκθεση στο ηλιακό φως. Τοποθετώντας τη βακτηριοδοψίνη σε τεχνητά λιποκυτίδια, οι Racker και Stoeckenius έδειξαν ότι μετά από έκθεση στο φως η πρωτεΐνη αντλούσε πρωτόνια στο εσωτερικό των κυστίδιων. Στη συνέχεια, στα ίδια κυτίδια ενσωματώθηκε μια μιτοχονδριακή ATPάση μιτοχονδριακής προέλευσης. Μετά από έκθεση στο φως, το πειραματικό σύστημα κατέλυε τη σύνθεση ATP. Η αφαίρεση της βακτηριοδοψίνης όπως και η προσθήκη παραγόντων αποσύζευξης καταργούσε τη σύνθεση ATP. Έτσι, παρόλο που η υπόθεση του Mitchell συνάντησε αρχικά αντίσταση, οι πειραματικές ενδείξεις που την στήριζαν δεν μπορούσαν να αγνοηθούν. Το 1978, ο Mitchell έλαβε το βραβείο Νόμπελ Χημείας.

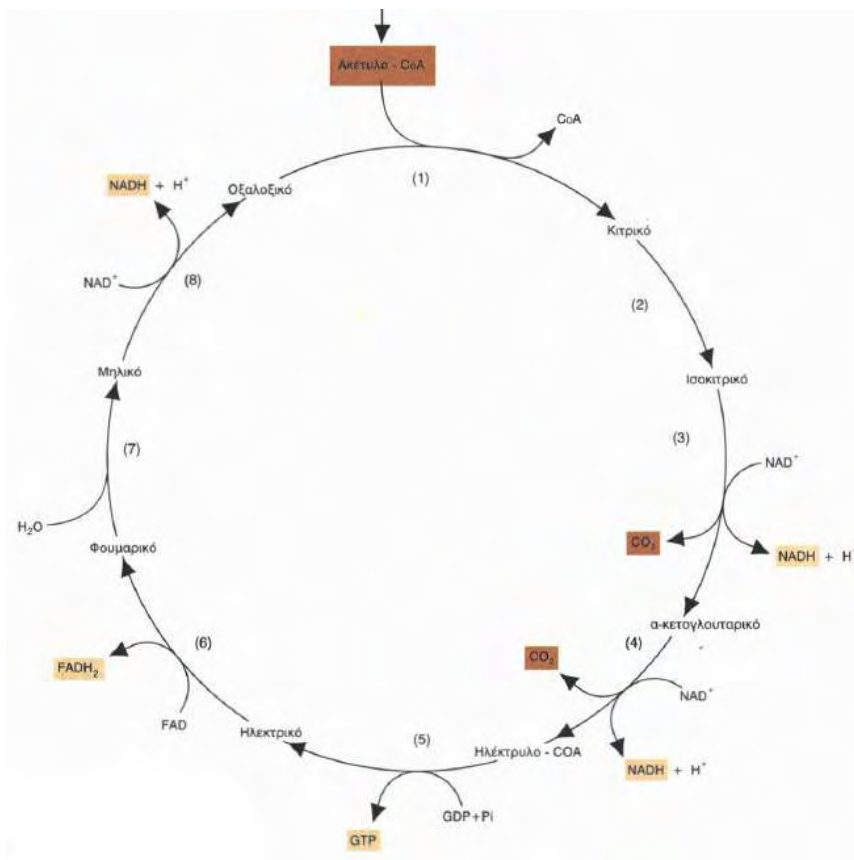
1.3.ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗΣ ΦΩΣΦΟΡΥΛΙΩΣΗΣ

Αρχικά, σχηματίζεται ακετυλο-συνένζυμο Α (acetyl-CoA) από οξείδωση λιπαρών οξέων ή από μετατροπή πυροσταφυλικού οξέος. Στη συνέχεια, το ακετυλο-CoA εισάγεται στον κύκλο του Krebs (Εικόνα 4) (τελικό στάδιο αποδόμησης των υδατανθράκων, των λιπών και των αμινοξέων που προσλαμβάνονται με τη διατροφή) και σχηματίζονται τρία μόρια NADH, ένα μόριο FADH₂ και ένα μόριο GTP (είκοσι χιλιάδες κύκλοι Krebs πραγματοποιούνται κάθε στιγμή σε ένα καρδιακό μιτοχόνδριο).

Τα μόρια NADH και FADH₂ φέρουν ηλεκτρόνια, τα οποία μεταφέρονται στα κυτοχρώματα της εσωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης με ταυτόχρονη έξοδο πρωτονίων από το μιτοχονδριακό χυμό προς τον ενδομεμβρανικό χώρο του μιτοχονδρίου (χημειώσμωση). Το NADH μεταφέρει τα ηλεκτρόνια στο πρώτο φορέα του συστήματος μεταφοράς ηλεκτρονίων, τη NADH αφυδρογονάση. Εκεί οξειδώνεται το NADH προς NAD⁺. Το FADH₂ είναι ένας λιγότερος δυνατός μεταφορέας ηλεκτρονίων και μεταφέρει ηλεκτρόνια στο δεύτερο φορέα ηλεκτρονίων.

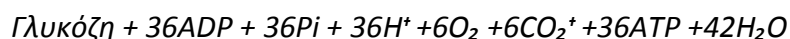
Όταν το NADH φτάσει στην αλυσίδα, ένα ιόν υδριδίου (H⁻) αφαιρείται από αυτό και μετατρέπεται σε ένα πρωτόνιο και δύο ηλεκτρόνια υψηλής ενέργειας. Η αντίδραση

αυτή καταλύεται από το πρώτο σύμπλοκο, την αφυδρογονάση του NADH, η οποία παραλαμβάνει τα ηλεκτρόνια. Στη συνέχεια, τα ηλεκτρόνια μεταφέρονται κατά μήκος της αλυσίδας. Αυτή η μεταφορά είναι ενεργειακά συμφέρουσα, αφού τα αρχικά υψηλής ενέργειας ηλεκτρόνια χάνουν ενέργεια καθώς μετακινούνται κατά μήκος της αλυσίδας (το ζεύγος NADH/NAD έχει μέσο δυναμικό οξειδοαναγωγής -320mV ενώ το ζεύγος H₂O/O₂ +810mV). Η αφυδρογονάση μεταφέρει τα ηλεκτρόνια από το NADH στην ουβικινόνη. Για αυτή τη διαδικασία χρειάζονται δύο ηλεκτρόνια και δύο πρωτόνια. Το ένα πρωτόνιο προέρχεται από το NADH και το άλλο από το περιβάλλον νερό. Τα δύο ηλεκτρόνια μεταφέρονται στην ουβικινόνη, ενώ τα δύο πρωτόνια εκλύονται στη μεσομεμβράνια περιοχή. Η ουβικινόνη, με τη σειρά της, προωθεί τα ηλεκτρόνια προς το δεύτερο σύμπλοκο, το σύμπλοκο κυτοχρωμάτων c-b1. Αυτό το σύμπλοκο έχει ενεργότητα οξειδοαναγωγής του ζεύγους ουβικινόνη – κυτοχρώματος C. Με την οξείδωση της ουβικινόνης, τα δύο πρωτόνια και τα δύο ηλεκτρόνια που χρειάστηκε για να αναχθεί απελευθερώνονται και τα πρωτόνια εκλύονται προς την εξωτερική πλευρά της μεμβράνης. Τα δύο ηλεκτρόνια από το κυτόχρωμα C μεταβιβάζονται στο τελευταίο σύμπλοκο, το σύμπλοκο της οξειδάσης του κυτοχρώματος, όπου το οξυγόνο αλληλεπιδρά με τα ηλεκτρόνια και παράγεται νερό. Τα πρωτόνια περνώντας μέσα από την ATP συνθετάση προκαλούν σχηματισμό ATP, το οποίο βγαίνει στο κυτταρόπλασμα για να χρησιμοποιηθεί ως πηγή ενέργειας.



Εικόνα 4: Κύκλος κιτρικού οξέος

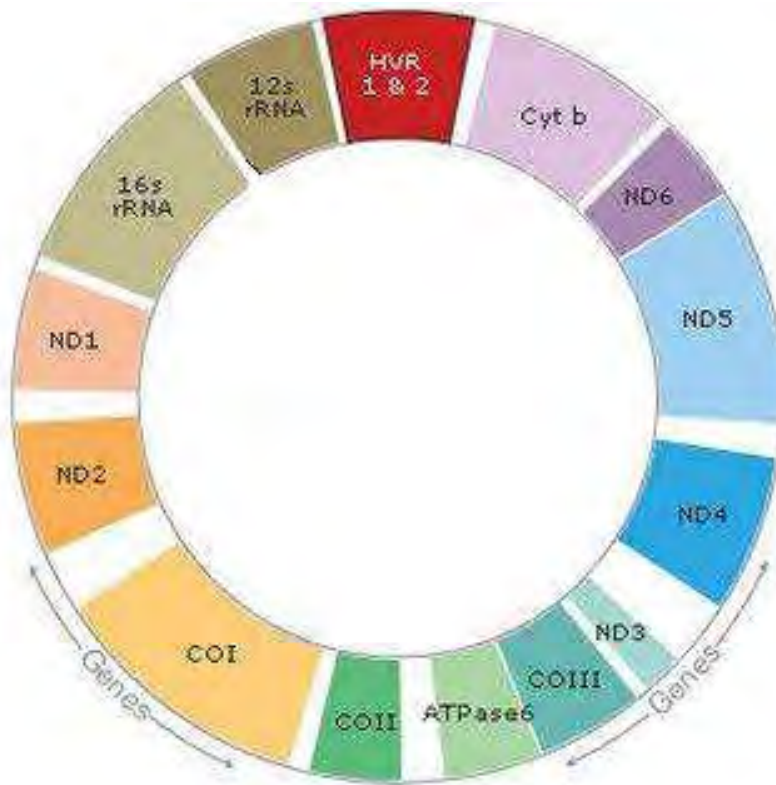
Στα μιτοχόνδρια ο μεταβολισμός των σακχάρων και των λιπαρών οξέων ολοκληρώνεται με της αντιδράσεις της αναπνευστικής αλυσίδας, δηλαδή την οξείδωσή τους από μοριακό οξυγόνο με προϊόντα CO₂ και H₂O. τα μόρια της γλυκόζης διασπώνται σε πυροσταφυλικό οξύ, το οποίο μπαίνει στα μιτοχόνδρια για να γίνει ακετυλο-CoA. Η διάσπαση ενός μορίου γλυκόζης, μέσω της γλυκόλυσης, του κύκλου του Krebs και της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή συνολικά 36 μορίων ATP.



Το καθαρό ενεργειακό κέρδος είναι περίπου 30 μόρια ATP δεδομένης της ενεργειακής απώλειας για τη μεταφορά των μορίων ATP από το μιτοχόνδριο στο κυτταρόπλασμα (Alberts et al. 2006).

1.4. ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΟ DNA (mtDNA)

Τα μιτοχόνδρια έχουν το δικό τους μικρό κυκλικό γονιδίωμα, το οποίο ποικίλει σε μέγεθος από 6.000 ζεύγη βάσεων (μιτοχόνδρια του πρωτοζώου *Plasmodium falciparum*) μέχρι 300.000bp για τα μιτοχόνδρια μερικών φυτικών κυττάρων. Το γονιδίωμα του μιτοχονδρίου περιλαμβάνει 37 γονίδια που κωδικοποιούν 13 πολυπεπτίδια (υπομονάδες του συστήματος παραγωγής ενέργειας: επτά υπομονάδες NADH αφυδρογονάσης, τρεις υπομονάδες κυτοχρωμικής οξειδάσης, δύο υπομονάδες ATP-συνθετάσης και κυτόχρωμα b) δύο γονίδια rRNA και 22 γονίδια tRNA ως μέρος του μιτοχονδριακού συστήματος μετάφρασης (Εικόνα 5), τα οποία συνεργάζονται με 1500 γονίδια που κωδικοποιούνται από το πυρηνικό γονιδίωμα (nDNA). Η ύπαρξη πρωτεϊνοσύνθεσης στα μιτοχόνδρια αποκαλύφθηκε από τον Simpson και τους συνεργάτες του το 1955.



Εικόνα 5 : Μιτοχονδριακό DNA (mtDNA)

Το mtDNA έχει βρεθεί σε πολλά ίδια αντίγραφα (5-10) σε κάθε μιτοχόνδριο ή ακόμα σε διαφορετικά μεγέθη. Σε μερικά Πρωτόζωα (π.χ. *Paramecium* και *Tetrahymena*) το DNA είναι γραμμικό, χωρίς ακόμα να υπάρχει λογική εξήγηση για την ιδιομορφία αυτή. Με το mtDNA έχει βρεθεί ότι σχετίζονται τουλάχιστον 29 πρωτεΐνες που δημιουργούν τα μιτοχονδριακά νουκλεοειδή (mt-nucleoid). Στα μιτοχόνδρια του *Saccharomyces cerevisiae* έχει βρεθεί ότι υπάρχουν δύο πληθυσμοί νουκλεοειδών που συνδέονται μέσω πρωτεϊνικών συμπλεγμάτων (TMS) με τη μιτοχονδριακή μεμβράνη (εξωτερική και εσωτερική). Οι πρωτεΐνες αυτές σταθεροποιούν τα νουκλεοειδή και κατευθύνουν την αντιγραφή του mtDNA.

Για τα ανώτερα ζώα και τον άνθρωπο το mtDNA κληρονομείται, εκτός εξαιρέσεων, μόνο από τη μητέρα, αφού από τα δύο γεννητικά κύτταρα, μόνο τα μιτοχόνδρια του ωαρίου χρησιμοποιούνται κατά την εμβρυογένεση (αυτό συμβαίνει επειδή το μαστίγιο του σπερματοζωαρίου, το οποίο φέρει τη συντριπτική πλειονότητα των μιτοχονδρίων του, δεν εισέρχεται στο ωάριο κατά τη γονιμοποίηση) (Alberts et al. 2006).

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

Το nDNA και το mtDNA, πιστεύεται, ότι έχουν ξεχωριστή εξελικτική προέλευση, με το mtDNA να προέρχεται από τα κυκλικά γονιδιώματα βακτηρίων που είχαν καταπιεί οι πρώτοι πρόγονοι των σημερινών ευκαρυωτικών κυττάρων. Αυτή η θεωρία ονομάζεται ενδοσυμβιωτική θεωρία. Στα κύτταρα των υπάρχοντων οργανισμών, η μεγάλη πλειοψηφία των πρωτεϊνών που υπάρχουν στα μιτοχόνδρια κωδικοποιούνται από nDNA, αλλά τα γονίδια για ορισμένες από αυτές (αν όχι για τις περισσότερες) πιστεύεται ότι αρχικά ήταν βακτηριακής προέλευσης, δεδομένου ότι είχαν μεταφερθεί στον ευκαρυωτικό πυρήνα κατά τη διάρκεια της εξέλιξης (Μαργαρίτης, 2008).

1.5. ΡΟΗ ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΩΝ- ΜΕΤΑΓΡΑΦΗ ΚΑΙ ΜΕΤΑΦΡΑΣΗ

Η μιτοχονδριακή πρωτεϊνοσυνθετική μηχανή διαφέρει από την κυτταροπλασματική. Όπως είναι γνωστό, ο γενετικός κώδικας των μιτοχονδρίων (Εικόνα 6) διαφέρει από τον συνηθισμένο γενετικό κώδικα των πυρηνικών γονιδίων. Πιο συγκεκριμένα, η τριπλέτα UGA που είναι κωδικόνιο λήξης στο κυτταρόπλασμα, χρησιμεύει για κωδικοποίηση τρυπτοφάνης στα μιτοχόνδρια, οι τριπλέτες AGA και AGG, που στο κυτταρόπλασμα κωδικοποιούν την αργινίνη, στα μιτοχόνδρια των θηλαστικών αποτελούν κωδικόνια λήξης, η τριπλέτα AUA που κωδικοποιεί για ισολευκίνη στο κυτταρόπλασμα, χρησιμοποιείται για την έναρξη της μετάφρασης και κωδικοποιεί για μεθειονίνη στα μιτοχόνδρια των ζωικών κυττάρων. Τα 22 μιτοχονδριακά tRNAs αναγνωρίζουν τέσσερα διαφορετικά κωδικόνια, που έχουν κοινά τα δύο πρώτα νουκλεοτίδια. Τέλος, η έναρξη της μετάφρασης στα ευκαρυωτικά οργανίδια περιλαμβάνει το φορμυλ-μεθειονυλ-tRNA. (Μαργαρίτης, 2008).

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

Εικόνα 6: Μιτοχονδριακός γενετικός κώδικας

1.6. ΡΥΘΜΟΣ ΕΞΕΛΙΞΗΣ ΤΟΥ mtDNA

Τα γονιδιώματα των οργανιδίων αντιγράφονται και κληρονομούνται με διαφορετικό τρόπο απ' ότi τα γονίδια του πυρήνα και ως εκ τούτου η δυναμική των αντικαταστάσεων τους είναι πολύ διαφορετική. Το μικρό μέγεθος του mtDNA και ο εξαιρετικά υψηλός ρυθμός αντικαταστάσεων των βάσεων του έχουν εγείρει μεγάλο ενδιαφέρον σχετικά με την εξέλιξη του. Ο μέσος ρυθμός συνώνυμων αντικαταστάσεων στα μιτοχονδριακά γονίδια των θηλαστικών είναι περίπου $5,7 \times 10^{-8}$ ανά θέση ανά έτος, είναι δηλαδή περίπου δεκαπλάσιος από το μέσο ρυθμό συνώνυμων μεταλλάξεων των γονιδίων του πυρήνα. Ο ρυθμός μη συνώνυμων αντικαταστάσεων ποικίλλει σημαντικά μεταξύ των γονιδίων του μιτοχονδρίου αλλά σε κάθε περίπτωση είναι σημαντικά υψηλότερος από το μέσο ρυθμό συνώνυμων αντικαταστάσεων που παρατηρείται στα πυρηνικά γονίδια. Αυτό είναι πιθανό να σχετίζεται με την χαμηλότερη αξιοπιστία του μηχανισμού αντιγραφής DNA και επομένως με υψηλότερο ρυθμό εισαγωγής σφαλμάτων κατά την αντιγραφή και την επιδιόρθωση του mtDNA. Σε αντίθεση με τις πολυμεράσες DNA του πυρήνα, οι DNA πολυμεράσες του μιτοχονδρίου δεν έχουν ικανότητα διορθωτικού ελέγχου. Οι υψηλότερες συγκεντρώσεις μεταλλαξιόνων, όπως οι ελεύθερες ρίζες οξυγόνου, οι οποίες προκύπτουν από μεταβολικές διεργασίες που διεξάγονται στα μιτοχόνδρια,

μπορεί επίσης να παίζουν κάποιο ρόλο στους υψηλότερους ρυθμούς αντικαταστάσεων. Επιπλέον, μπορεί η πίεση της φυσικής επιλογής που φυσιολογικά εξαλείφει πολλές μεταλλαγές στα γονίδια του πυρήνα να είναι λιγότερο έντονη στα μιτοχόνδρια, επειδή τα περισσότερα κύτταρα περιέχουν πολλές δεκάδες μιτοχόνδρια καθένα από τα οποία περιέχει μέχρι και δώδεκα αντίγραφα του μιτοχονδριακού γονιδιώματος. Τέλος, οι μεταλλαγές στις πρωτεΐνες, στα tRNA και στα rRNA που κωδικοποιούνται από το μιτοχονδριακό γονιδίωμα φαίνεται να μην επηρεάζουν τόσο αρνητικά την προσαρμοστικότητα του ατόμου όσο οι αντίστοιχες μεταλλαγές στα προϊόντα των πυρηνικών γονιδίων.

Παρότι είναι γνωστό ότι οι μιτοχονδριακές αλληλουχίες των ζώων εξελίσσονται ταχύτατα, η οργάνωση των γονιδίων φαίνεται να είναι अपαράλλακτη για μεγάλες χρονικές περιόδους της εξελικτικής ιστορίας. Με μερικές εξαιρέσεις, η οργάνωση των γονιδίων είναι σχετικά σταθερή μέσα στις κύριες ομάδες, αλλά διαφέρει μεταξύ αυτών, και η σύγκριση αυτής της οργάνωσης έχει μεγάλες δυνατότητες για την επίλυση προβλημάτων που αφορούν στους βαθύτερους κλάδους της φυλογένειας των μεταζώων. Ο μεγάλος αριθμός των πιθανών γονιδιακών διατάξεων καθιστά αδύνατο σχεδόν το να αποκτούν διαφορετικά taxa το ίδιο μοντέλο οργάνωσης. Η σύγκριση της οργάνωσης των μιτοχονδριακών γονιδίων παρείχε πειστικές φυλογένειες σε αρκετές περιπτώσεις όπου τα υπόλοιπα δεδομένα ήταν αμφίβολα, όπως έγινε με τις περιπτώσεις των μεγάλων ομάδων των εχινόδερμων και των αρθροπόδων.

1.7. ΦΥΣΙΚΗ ΕΠΙΛΟΓΗ ΚΑΙ ΕΞΕΛΙΞΗ ΚΩΔΙΚΟΠΟΙΗΜΕΝΩΝ ΠΕΠΤΙΔΙΩΝ ΑΠΟ mtDNA

Οι παραλλαγές του mtDNA είναι ένα σημαντικό εργαλείο για την εξερεύνηση της γενετικής πληθυσμών στα είδη των ζώων. Πρόσφατα, η αναγνώριση του ρόλου των μεταλλάξεων του mtDNA σε ανθρώπινες ασθένειες, έχει κεντρίσει το ενδιαφέρον στη λειτουργία και στην εξέλιξη του mtDNA και των 13 πολυπεπτιδίων που κωδικοποιεί. Αυτές οι πρωτεΐνες αλληλεπιδρούν με ένα μεγάλο αριθμό πεπτιδίων που κωδικοποιούνται στον πυρήνα, για να αποτελέσουν το μιτοχονδριακό σύστημα μεταφοράς ηλεκτρονίων (ETS). Δεδομένου ότι το ETS είναι το κύριο σύστημα παραγωγής ενέργειας στα αερόβια μετάζωα, η φυσική επιλογή θα αναμενόταν να ευνοεί μεταλλάξεις που ενισχύουν τη λειτουργία του ETS. Τέτοιες μεταλλάξεις θα μπορούσαν να συμβούν είτε στα μιτοχονδριακά είτε στα πυρηνικά γονίδια που κωδικοποιούν ETS πρωτεΐνες και θα οδηγούσαν σε θετικές διαγονιδιακές αλληλεπιδράσεις ή συν- προσαρμογή. Άμεσες αποδείξεις για διαγονιδιακή συν-

προσαρμογή προέρχονται από τις λειτουργικές μελέτες συστημάτων, όπου οι συνδυασμοί mtDNA - nDNA διαφέρουν στη φύση, ή μπορούν να χειραγωγηθούν πειραματικά.

Το mtDNA έχει χρησιμοποιηθεί εκτενώς σε μελέτες της δομής της γενετικής πληθυσμών και σε φυλογενετικές σχέσεις μεταξύ ζώων. Δύο ιδιότητες του mtDNA το κάνουν ιδιαίτερο χρήσιμο σε τέτοιες μελέτες: τα υψηλά ποσοστά υποκατάστασης νουκλεοτιδίων σε σύγκριση με το nDNA και η μητρική κληρονομικότητα που δεν υπόκειται σε ανασυνδυασμό. Αν και οι μελέτες στην εξέλιξη και στη γενετική πληθυσμών συχνά προτείνουν ότι η εξέλιξη του mtDNA είναι ουδέτερη ή σχεδόν ουδέτερη, οι σημαντικοί ρόλοι και των 13 πεπτιδίων που κωδικοποιούνται από mtDNA στην κυτταρική παραγωγή ATP, δείχνουν ότι η μεταβολή του mtDNA θα μπορούσε να έχει σημαντικές μεταβολικές συνέπειες. Πράγματι, οι λειτουργικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ μιτοχονδριακών πρωτεϊνών που κωδικοποιούνται από mtDNA και nDNA θα μπορούσαν να οδηγήσουν σε ισχυρή επιλογή για θετικές διαγονιδιακές αλληλεπιδράσεις, ή συν-προσαρμογή. Ένα σημαντικό πρόβλημα στη συν-προσαρμογή του πυρηνικού και μιτοχονδριακού γονιδιώματος, είναι τα διαφορετικά ποσοστά υποκατάστασης των δύο αυτών γονιδιωμάτων. Τα πεπτίδια που κωδικοποιούνται από mtDNA εμφανίζουν ένα υψηλότερο ποσοστό υποκατάστασης σε σχέση με τα ομόλογά τους που κωδικοποιούνται από nDNA, γεγονός που υποδηλώνει ότι η συν-προσαρμογή θα πρέπει να καθοδηγείται από το μιτοχονδριακό γονιδίωμα (Blair et al. 2001).

1.8. ΣΥΝ- ΠΡΟΣΑΡΜΟΓΗ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΩΝ ΚΑΙ ΠΥΡΗΝΙΚΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΜΑΤΩΝ

Για να διατηρηθεί η φυσιολογική λειτουργία του ETS, η φυσική επιλογή θα ευνοεί συνεχώς την εξελικτική συν-προσαρμογή των αλληλεπιδρώντων πρωτεϊνών που κωδικοποιούνται από το μιτοχονδριακό και το πυρηνικό γονιδίωμα. Ένα τέτοιο σενάριο θα μπορούσε να οδηγήσει σε συσχετισμούς στις λειτουργικές ιδιότητες σε σχέση με το περιβάλλον. Για παράδειγμα, το κυτόχρωμα c, το οποίο κωδικοποιείται από ένα πυρηνικό γονίδιο, μεταφέρει ηλεκτρόνια μεταξύ του συμπλόκου III (κυτόχρωμα bc₁) και του συμπλόκου IV (κυτοχρωμική c οξειδάση). Αυτή η λειτουργία απαιτεί κυτόχρωμα c για να δεθεί με τα δύο αυτά πρωτεϊνικά σύμπλοκα: στη συνέχεια, η μεταφορά ηλεκτρονίων περιλαμβάνει το σχηματισμό πρωτεϊνικών συμπλόκων που καθοδηγείται από ειδικές ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις. Ως εκ τούτου, οι πρωτεΐνες αυτές θα πρέπει να είναι ιδιαίτερα συμπροσαρμοσμένες (Blair et al. 2001).

1.9. ΕΥΡΩΠΑΪΚΟΣ ΛΑΓΟΣ (*Lepus Euroraeus*)

Συστηματική κατάταξη του είδους *Lepus Euroraeus*

Βασίλειο: Ζώα

Φύλο: Χορδωτά

Υπό- φύλο: Σπονδυλωτά

Κλάση: Θηλαστικά

Τάξη: Λαγόμορφα

Οικογένεια: Leporidae

Γένος: *Lepus*

Είδος: *europaicus*

Ο ευρωπαϊκός λαγός (*Lepus europaicus*) είναι είδος ευρέως διαδεδομένο στην Ευρώπη και τη δυτική Ασία. Είναι ένα θηλαστικό προσαρμοσμένο σε περιοχές με εύκρατο κλίμα. Σχετίζεται και είναι παρόμοιος μορφολογικά με το ευρωπαϊκό κουνέλι, το οποίο ανήκει στην ίδια οικογένεια με το λαγό, αλλά σε διαφορετικό γένος. Ο ευρωπαϊκός λαγός έχει συνολικό μήκος που κυμαίνεται από 60 έως 75cm και ζυγίζει από 3 έως 5 κιλά (Hall and Kelson, 1959, Peterson 1966). Το χρώμα του είναι καστανόγκριζο έως γκριζο καφέ, εκτός από την περιοχή της κοιλιάς που είναι γκρι- άσπρη. Το κεφάλι έχει καφέ αποχρώσεις με πιο ανοιχτόχρωμους κύκλους γύρω από τα μάτια. Έχει μακριά αυτιά, τα πίσω πόδια του είναι πιο μακριά από τα μπροστινά, ενώ τα πέλματά του καλύπτονται από παχύ τρίχωμα για να εμποδίζουν την ολίσθηση. Η ουρά, με μήκος συνήθως 7-11cm, είναι μαύρη στο επάνω μέρος της και άσπρη στο κάτω. Η διάρκεια ζωής του φτάνει τα 7-8 χρόνια (Peterson, 1966, Banskfield, 1974). Το χειμώνα το τρίχωμα του ευρωπαϊκού λαγού γίνεται ελαφρώς πιο γκριζο. Επίσης, δεν έχει παρατηρηθεί αξιοσημείωτος διμορφισμός ανάμεσα στα δύο φύλα. Η μοναδική διαφορά που έχει παρατηρηθεί είναι ότι τα αρσενικά έχουν συνήθως πιο παχύ και κοντό λαιμό σε σχέση με τα θηλυκά άτομα (Banskfield, 1974, Dragg, 1974).

Ο ευρωπαϊκός λαγός θεωρείται νυκτόβιο ζώο. Γενικά προτιμά τη μοναχική ζωή αν και έχουν σημειωθεί εμφανίσεις του σε μικρές ομάδες, κατά την περίοδο του ζευγαρώματος. Αυτή η περίοδος διαρκεί αρκετά μεγάλο χρονικό διάστημα, το οποίο κρατά από τον Ιανουάριο μέχρι και τον Αύγουστο. Γενικά τρέφεται με κάθε είδους φυτά, χόρτα, σιτηρά, λαχανικά, φύλλα θάμνων και μικρά κλαδιά. Στους φυσικούς

θηρευτές του, συμπεριλαμβάνονται τα αρπακτικά πτηνά, τα σαρκοφάγα και τα αιλουροειδή.

Με βάση φυλογενετικά δεδομένα του mtDNA και σε συνδυασμό με την ανάλυση του γονιδίου Cytb, προκύπτει η ύπαρξη τριών διαφορετικών απλοομάδων με πολύ καλά προσδιορισμένη κατανομή στην Ευρώπη και την Ανατολία. Πιο συγκεκριμένα, έχουμε την κεντρική ευρωπαϊκή απλοομάδα (Γαλλία, Γερμανία, Ελβετία, Δανία, κλπ), τη νότια ευρωπαϊκή (Ελλάδα, Βουλγαρία) και την ανατολική (Τουρκία, Κύπρος, Ισραήλ), (Stamatis et al.2009).

1.10. ΑΝΤΙΚΕΙΜΕΝΟ ΜΕΛΕΤΗΣ

Στην παρούσα μελέτη μελετήθηκε το μιτοχονδριακό γονίδιο *COXIII*, το οποίο είναι υπεύθυνο για τη σύνθεση της τρίτης υπομονάδας της κυτοχρωμικής οξειδάσης, σε πληθυσμούς *Lepus europaeus* από Τουρκία, Ελλάδα, Κύπρο και Ευρώπη. Πραγματοποιήθηκε αλληλούχιση και νουκλεοτιδική ανάλυση, αμινοξική ανάλυση και φυλογενετική ανάλυση μεταξύ των δειγμάτων, με σκοπό να προσδιοριστούν οι σχέσεις μεταξύ τους και μεταξύ πληθυσμών από διαφορετικές γεωγραφικές περιοχές.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1. Απομόνωση του DNA

Για τη μελέτη των απλοτύπων του μιτοχονδριακού DNA, που χρησιμοποιήθηκαν για την φυλογενετική ανάλυση, είναι απαραίτητο σαν πρώτο βήμα να απομονωθεί από τα κύτταρα το γενετικό υλικό, το οποίο περιλαμβάνει το γενωμικό και το μιτοχονδριακό DNA. Στην παρούσα μελέτη απομονώθηκε DNA σύμφωνα με το πρωτόκολλο TNES-Urea Buffer (Asahida et al. 1996 Fisheries Science 62(5):727-730), με κατάλληλες τροποποιήσεις. Τα διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν είναι τα εξής :

| | Για 200ml | Τελικές Συγκεντρώσεις |
|----------|----------------------|-----------------------|
| Tris | 2 ml of 1M pH 7.5 | 10 mM |
| NaCl | 5 ml of 5 M | 125 mM |
| EDTA-2Na | 2 ml of 0.5 M pH 7.5 | 10 mM |
| SDS | 10 ml of 10% | 0.5% |
| Urea | 48.05 g | 4 M |

Για κάθε απομόνωση χρησιμοποιήθηκαν 50-100 mg ιστού και ακολουθήθηκαν οι εξής πειραματικές διαδικασίες :

1. Τοποθετούμε τον ιστό αρκετά τεμαχισμένο σε σωλήνα eppendorf του 1,5ml και προσθέτουμε 600μl TNES-Urea buffer (6 M urea; 1% SDS), το οποίο χρησιμοποιείται ως ρυθμιστικό διάλυμα.
2. Προσθέτουμε 2μl από 20mg/ml πρωτεϊνάσης K για την πέψη των πρωτεϊνών.
3. Επωάζουμε τα δείγματα στους 37°C για όλο το βράδυ.

4. Μετά την επώαση προσθέτουμε 3μl RNAάση και διατηρούμε τα δείγματα στους 37°C για 30min.
5. Προσθέτουμε 0,6ml φαινόλη/χλωροφόρμιο/ισοαμυλική αλκοόλη (25:24:1). Αναδεύουμε έντονα τα δείγματα.
6. Φυγοκεντρούμε στις 14.000 rpm για 10 min
7. Η άνω υδατική φάση μεταφέρθηκε σε ένα νέο σωλήνα που ακολουθείται από τη δεύτερη εκχύλιση με την προσθήκη 0.6ml χλωροφορμίου/ισοαμυλικής αλκοόλης (24:1).
8. Φυγοκεντρούμε στις 14.000 rpm για 10 min
9. Μετά τη φυγοκέντρηση, η άνω φάση μεταφέρεται εκ νέου σε καινούργιο σωλήνα erpendorf.
10. Ακολουθεί κατακρήμιση DNA, προσθέτοντας 3M NaOAc, pH 5.3 και 99% αιθανόλη.
11. Αφού ανακινηθεί ελαφρά, αποθηκεύεται στους -20 °C για 1h.
12. Ακολουθεί ξανά φυγοκέντρηση στις 14.000rpm για 10min.
13. Έκπλυση με διάλυμα 70% αιθανόλης.
14. Αναδιάλυση του DNA σε 100μl ddH₂O και επώαση στους 65 ° C για 1h.

2.2. Προσδιορισμός συνολικής ποσότητας DNA ανα δείγμα

Μετά το πέρας της απομόνωσης του DNA ελέγχεται ποιοτικά και ποσοτικά είτε με φωτομέτρηση είτε με 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.

2.3. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Για την ενίσχυση του τμήματος του μιτοχονδριακού γονιδίου της υπομονάδας III της κυτοχρωμικής οξειδάσης (COXIII) πραγματοποιήθηκε αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης. Για την PCR χρησιμοποιήθηκαν οι εξής εκκινητές :

| Εκκινητής | Αλληλουχία |
|-----------|---------------------------|
| COXIII fw | 5'-GCTGTGGCCCTAATTCAAG-3' |
| COXIII rv | 5'-CTGATTGGAAGTATGTAC -3' |

Η σύσταση των διαλυμάτων των αντιδράσεων περιγράφεται στον Πίνακα 2.

Πίνακας 1 : Συστατικά αντίδρασης PCR

| | |
|---------------------------|--------------|
| Εκμαγείο DNA | 1μl |
| dNTPs (10mM each) | 1 μl |
| MgCl ₂ (50mM) | 2 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 | 38,8 μl |
| Συνολικός όγκος | 50 μl |

Οι συνθήκες ενίσχυσης του τμήματος του γονιδίου COXIII είναι

Αρχική αποδιάταξη : 95° C για 4 min

Αποδιάταξη: 95° C για 40 sec

Υβριδοποίηση: 56° C για 1min

Επιμήκυνση: 72° C για 1 min 20sec

} 35 κύκλοι

Τελική επιμήκυνση: 72° C για 10 min

Τα προϊόντα PCR ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή αγαρόζης

2.4. 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.

Η ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης πραγματοποιείται για την ποσοτικοποίηση και τον έλεγχο της ποιότητας των προϊόντων PCR που χρησιμοποιούνται σε περαιτέρω πειράματα για την ανάλυση των πολυμορφισμών.

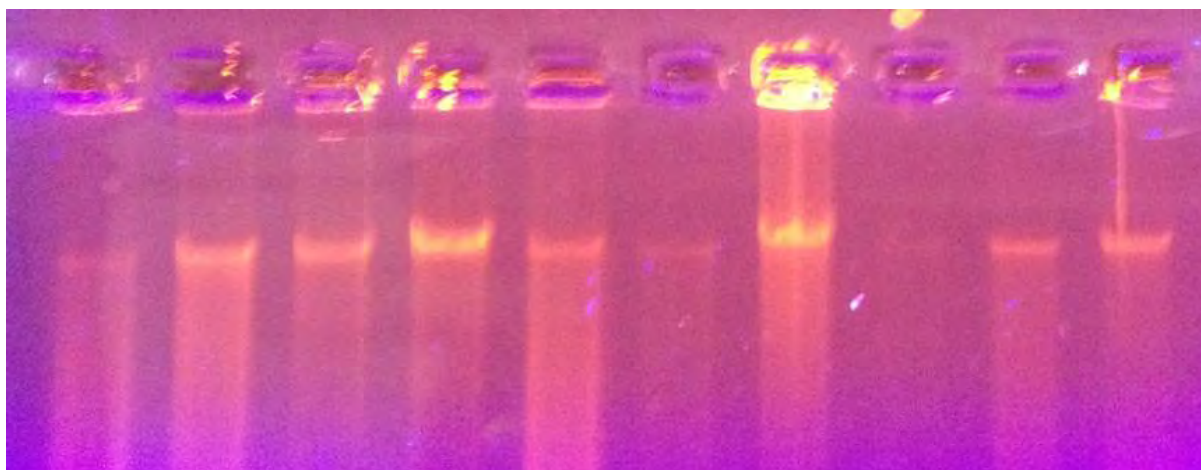
2.5. ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ DNA

Το τμήμα που θέλουμε να ενισχύσουμε, έχει μέγεθος περίπου 1000 βάσεις. Μετά την PCR και την ηλεκτροφόρηση, παρατηρήθηκε παραπροϊόν μεγέθους 300 βάσεων. Προκειμένου να απομονωθεί το επιθυμητό προϊόν, πραγματοποιήθηκε απομόνωση από πηκτή αγαρόζης (gel extraction) με βάση το πρωτόκολλο του kit της Macherey-Nagel (Nucleospin Gel and PCR Clean-up). Μετά τον καθαρισμό ακολουθεί εκ νέου ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 2% για την πιστοποίηση της καθαρότητας του προϊόντος.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1. Απομόνωση DNA

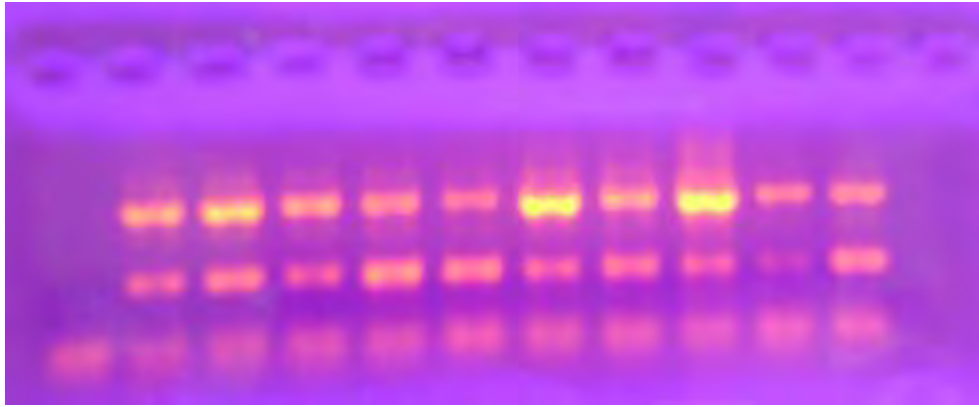
Η απομόνωση DNA παρείχε υψηλής ποιότητας DNA, με τιμές συγκέντρωσης κατά μέσο όρο 300 ng/ul και τιμές A^{260}/A^{280} κοντά στο 1,8. Η ηλεκτροφόρηση του DNA σε πηκτή αγαρόζης 1% εμφάνισε 2 διακριτές ζώνες : η μια ζώνη βρίσκεται ψηλότερα και είναι το πυρηνικό DNA, το οποίο είναι μεγάλου μεγέθους και εμφανίζεται περίπου μέσα στο πηγάδι της πηκτής, και η δεύτερη ζώνη, εμφανίζεται χαμηλότερα και είναι το μιτοχονδριακό DNA, το οποίο είναι περίπου 16 kbp.



Εικόνα 7: Ηλεκτροφόρηση απομονωμένου DNA

3.2 PCR

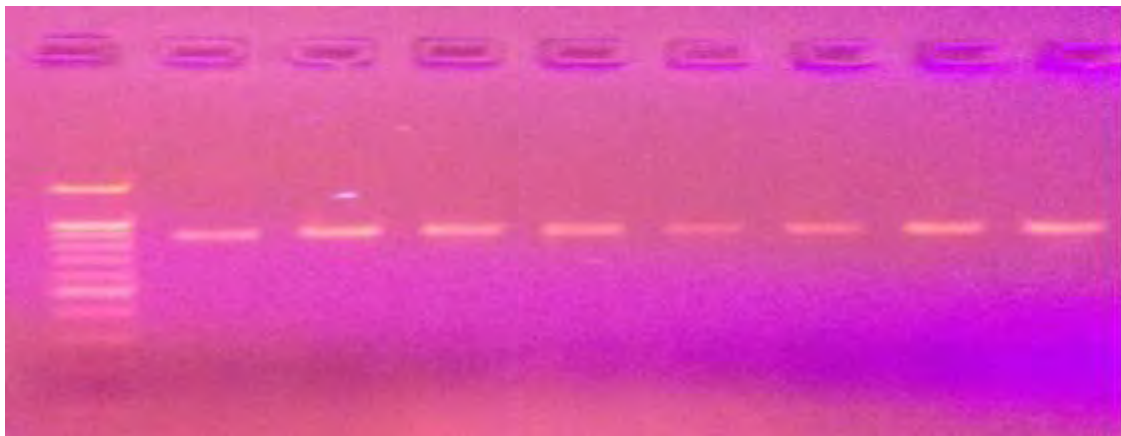
Με τη χρήση των κατάλληλων εκκινήτων, ενισχύθηκε ένα τμήμα του μιτοχονδριακού γονιδίου COXIII. Για την επαλήθευση της επιτυχίας της μεθόδου, πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 2%, στην οποία ηλεκτροφορήθηκαν τα προϊόντα PCR παρουσία ενός μάρτυρα τμημάτων γνωστού μοριακού βάρους (ladder), για να υπολογιστεί το μήκος του τμήματος που ενισχύθηκε. Με βάση το ηλεκτροφορητικό πρότυπο, το τμήμα που ενισχύθηκε είχε μήκος περίπου 1000 ζευγών βάσεων, και φαινόταν να έχει το ίδιο μέγεθος για όλα τα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν στην ανάλυση.



Εικόνα 8: Ηλεκτροφόρηση προϊόντων PCR

3.3. Καθαρισμός DNA

Μετά την PCR και την ηλεκτροφόρηση, παρατηρήθηκε παραπροϊόν μεγέθους 300 βάσεων. Προκειμένου να απομονωθεί το επιθυμητό προϊόν, πραγματοποιήθηκε απομόνωση απο πηκτική αγαρόζης (gel extraction) με βάση το πρωτόκολλο του kit της Macherey-Nagel (Nucleospin Gel and PCR Clean-up). Μετά τον καθαρισμό ακολουθεί εκ νέου ηλεκτροφόρηση σε πηκτική αγαρόζης 2% για την πιστοποίηση της καθαρότητας του προϊόντος.



Εικόνα 9: Ηλεκτροφόρηση προϊόντων μετά από καθαρισμό με βάση το πρωτόκολλο του kit της Macherey-Nagel (Nucleospin Gel and PCR Clean-up)

3.4. Αλληλούχηση

Για να υπάρχει μεγαλύτερη αξιοπιστία για τα αποτελέσματα της αλληλούχησης, χρησιμοποιήθηκαν και οι δυο εκκινήτες για την αντίδραση του sequencing. Τα δυο χρωματογραφήματα που λήφθηκαν για κάθε δείγμα αναλύθηκαν με το πρόγραμμα BioEdit, τα αποτελέσματα συγκρίθηκαν με το πρόγραμμα ClustalX και τελικά προέκυψε η τελική αλληλουχία του κάθε δείγματος. Η αλληλουχία που ανακτήθηκε από τα γραφήματα της αλληλούχησης για κάθε δείγμα ήταν περίπου 770bp.

Τα δείγματα που στάλθηκαν για αλληλούχηση ήταν:

Greece 3, Greece 4, Greece 5, Greece 6, Greece 7, Greece 8, Cyprus 22, Cyprus 26, Turkey 11, Turkey 12, Turkey 5, Turkey 6, Anatolia 52, Germany 2, Germany 3, Germany 4, France 2, France 5, France 6.

Οι αλληλουχίες που προέκυψαν ήταν οι εξής:

| | 10 | 20 | 30 | 40 | 50 | 60 | 70 | 80 | 90 | 100 |
|-------------|---|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | | | | | | | | | | |
| COX3 | ATGACCCACCAAACCCACGCCTATCATATAGTTAACCCAAGTCCATGACCACCTTACCGGGGCCCTTATCCGCCCTACTTATAACATCAGGCTTAGCCATAT | | | | | | | | | |
| Greece 3 | | | | | | | | | | |
| Greece 4 | | | | | | | | | | |
| Greece 5 | | | | | | | | | | |
| Greece 6 | | | | | | | | | | |
| Greece 7 | | | | | | | | | | |
| Greece 8 | | | | | | | | | | |
| Cyprus 22 | | | | | | | | | | |
| Cyprus 26 | | | | | | | | | | |
| Turkey 11 | | | | | | | | | | |
| Turkey 12 | | | | | | | | | | |
| Anatolia 52 | | | | | | | | | | |
| Turkey 5 | | | | | | | | | | |
| Turkey 6 | | | | | | | | | | |
| Germany 2 | | | | | | | | | | |
| France 2 | | | | | | | | | | |
| Germany 3 | | | | | | | | | | |
| Germany 4 | | | | | | | | | | |
| France 5 | | | | | | | | | | |
| France 6 | | | | | | | | | | |

| | | | | | | | | | | |
|-------------|--|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | 110 | 120 | 130 | 140 | 150 | 160 | 170 | 180 | 190 | 200 |
| | | | | | | | | | | |
| COX3 | GATTCCACTTTAACTCCCCCTCACTTCTTCTAATTGGCTTGTTAACAAACACACTCACTATATAACCAGTGATGACGAGATATTTGTACGAGAAGGCACATTT | | | | | | | | | |
| Greece 3 | | | | | | | | | | |
| Greece 4 | | | | | | | | | | |
| Greece 5 | | | | | | | | | | |
| Greece 6 | | | | | | | | | | |
| Greece 7 | | | | | | | | | | |
| Greece 8 | | | | | | | | | | |
| Cyprus 22 | | | | | | | | | | |
| Cyprus 26 | | | | | | | | | | |
| Turkey 11 | | | | | | | | | | |
| Turkey 12 |T..... | | | | | | | | | |
| Anatolia 52 |T..... | | | | | | | | | |
| Turkey 5 | | | | | | | | | | |
| Turkey 6 | | | | | | | | | | |
| Germany 2 | | | | | | | | | | |
| France 2 | | | | | | | | | | |
| Germany 3 | | | | | | | | | | |
| Germany 4 | | | | | | | | | | |
| France 5 | | | | | | | | | | |
| France 6 | | | | | | | | | | |

| | 210 | 220 | 230 | 240 | 250 | 260 | 270 | 280 | 290 | 300 |
|-------------|----------------------|---------------------|--------------------|-------------------|-----------------|--------------------|-----------------|------------------|-----------------|-------------------|
| | | | | | | | | | | |
| COX3 | TCAAGGCCACCAT | ACTCCTATTGTT | CAAAAAGGTTT | ACGATATGGA | AATAATCC | TATTTATTGTT | CAGAAGTC | TTTTTCTTT | GCAGGTTT | CTTCTGAGCT |
| Greece 3 | | | | | | | | | | |
| Greece 4 | | | | | | | | | | |
| Greece 5 | | | | | | | | | | |
| Greece 6 | | | | | | | | | | |
| Greece 7 | | | | | | | | | | |
| Greece 8 | | | | | | | | | | |
| Cyprus 22 | | | | | | | | | | |
| Cyprus 26 | | | | | | | | | | |
| Turkey 11 | | | | | | | | | | |
| Turkey 12 | | | | | | | | | | |
| Anatolia 52 | | | | | | | | | | |
| Turkey 5 | | | | | | | | | | |
| Turkey 6 | | | | | | | | | | |
| Germany 2 | | | | | | | | | | |
| France 2 | | | | | | | | | | |
| Germany 3 | | | | | | | | | | |
| Germany 4 | | | | | | | | | | |
| France 5 | | | | | | | | | | |
| France 6 | | | | | | | | | | |

310 320 330 340 350 360 370 380 390 400

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....

COX3 **TTCTACCACTCAAGCCTAGCTCCCACGCCAGAACTAGGGGGCTGCTGGCCTCCTACAGGTATTAACCTCTTAACCCCTTGAAGTTCCCCTACTTAACA**

Greece 3 T.....

Greece 4 T.....

Greece 5 T.....

Greece 6 T.....

Greece 7 T.....

Greece 8 T.....

Cyprus 22 T.....

Cyprus 26 T.....

Turkey 11 T.....C.....

Turkey 12 T.....

Anatolia 52 T.....A.....

Turkey 5 T.....

Turkey 6 T.....

Germany 2

France 2

Germany 3

Germany 4

France 5

France 6

| | 410 | 420 | 430 | 440 | 450 | 460 | 470 | 480 | 490 | 500 |
|-------------|---|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | | | | | | | | | | |
| COX3 | CCTCAGTCCTTCTAGCCTCAGGAGTCTCAATTACCTGAGCTCACCATAGCTTAATAGAAGGAAATCGTAAAAACATGCAACAAGCCTTAGCAATCACTAT | | | | | | | | | |
| Greece 3 | | | T | | | | | | | |
| Greece 4 | | | T | | | | | | | |
| Greece 5 | | | T | | | | | | | |
| Greece 6 | | | T | | | | | | | |
| Greece 7 | | | T | | | | | | | |
| Greece 8 | | | T | | | | | | | |
| Cyprus 22 |G | | | | | | | | | |
| Cyprus 26 |G | | | | | | | | | |
| Turkey 11 |G | | | | | T | | | | |
| Turkey 12 |G | | | | | | | | | |
| Anatolia 52 |G | | | | | | | | | |
| Turkey 5 |G | | | | | T | | | | |
| Turkey 6 |G | | | | | | | | | |
| Germany 2 | | | | | | | | | | |
| France 2 | | | | | | | | | | |
| Germany 3 | | | | | | | | | | |
| Germany 4 | | | | | | | | | | |
| France 5 | | | | | | | | | | |
| France 6 | | | | | | | | | | |

| | 510 | 520 | 530 | 540 | 550 | 560 | 570 | 580 | 590 | 600 |
|-------------|---|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | | | | | | | | | | |
| COX3 | TCTTCTAGGTATTTACTTTCACCCTACTTCAAGCATCAGAATACTATGAAACATCATTACTATCTCAGATGGAGTTTATGGCTCAACATTCTTTATAGCC | | | | | | | | | |
| Greece 3 |C..... | | | | | | | | | |
| Greece 4 |C..... | | | | | | | | | |
| Greece 5 | | | | | | | | | | |
| Greece 6 |C..... | | | | | | | | | |
| Greece 7 |C..... | | | | | | | | | |
| Greece 8 | | | | | | | | | | |
| Cyprus 22 | | | | | | | | | | |
| Cyprus 26 | | | | | | | | | | |
| Turkey 11 | | | | | | | | | | |
| Turkey 12 | | | | | | | | | | |
| Anatolia 52 | | | | | | | | | | |
| Turkey 5 | | | | | | | | | | |
| Turkey 6 | | | | | | | | | | |
| Germany 2 | | | | | | | | | | |
| France 2 | | | | | | | | | | |
| Germany 3 | | | | | | | | | | |
| Germany 4 | | | | | | | | | | |
| France 5 | | | | | | | | | | |
| France 6 | | | | | | | | | | |

| | 610 | 620 | 630 | 640 | 650 | 660 | 670 | 680 | 690 | 700 |
|-------------|------------------|------------------|------------------|-------------------|----------------|------------------|------------------|------------------|-----------------|-------------------|
| | | | | | | | | | | |
| COX3 | ACAGGATTT | CATGGCCTC | CACGTAATT | TATTGGTTCT | ACTTTCC | TTACAGTTT | GCCTTTTAC | GGCAGCTCC | ACTTTTCA | CTTTACATCA |
| Greece 3 | | | | | | | | | | |
| Greece 4 | | | | | | | | | | |
| Greece 5 | | | | | | | | | | |
| Greece 6 | | | | | | | | | | |
| Greece 7 | | | | | | | | | | |
| Greece 8 | | | | | | | | | | |
| Cyprus 22 | | | | | | | | | | |
| Cyprus 26 | | | | | | | | | | |
| Turkey 11 | | | | | | | | | | |
| Turkey 12 | | | | | | | | | | |
| Anatolia 52 | | | | | | | | | | |
| Turkey 5 | | | | | | | | | | |
| Turkey 6 | | | | | | | | | | |
| Germany 2 | | | | | | | | | | |
| France 2 | | | | | | | | | | |
| Germany 3 | | | | | | | | | | |
| Germany 4 | | | | | | | | | | |
| France 5 | | | | | | | | | | |
| France 6 | | | | | | | | | | |

T

| | 710 | 720 | 730 | 740 | 750 | 760 |
|-------------|---|-----|-----|-----|-----|-----|
| | | | | | | |
| COX3 | TTTTGAAGCAGCCGCATGATATTGGCACTTTGTAGATGTTGTCTGACTATTCCTGTATGTATCAATTT | | | | | |
| Greece 3 | G..... | | | | | |
| Greece 4 | G..... | | | | | |
| Greece 5 | G..... | | | | | |
| Greece 6 | G..... | | | | | |
| Greece 7 | G..... | | | | | |
| Greece 8 | G..... | | | | | |
| Cyprus 22 | G..... | | | | | |
| Cyprus 26 | | | | | | |
| Turkey 11 | | | | | | |
| Turkey 12 |G..... | | | | | |
| Anatolia 52 | | | | | | |
| Turkey 5 |G..... | | | | | |
| Turkey 6 | | | | | | |
| Germany 2 | G..... | | | | | |
| France 2 |T..... | | | | | |
| Germany 3 | G..... | | | | | |
| Germany 4 | | | | | | |
| France 5 | G..... | | | | | |
| France 6 | | | | | | |

3.5. Νουκλεοτιδική Ανάλυση

Με τη χρήση του προγράμματος MEGA, ήταν δυνατός ο υπολογισμός του ποσοστού εμφάνισης των τεσσάρων νουκλεοτιδίων στις αλληλουχίες. Το ποσοστό A+T ήταν 58,5% και το G+C ήταν 41,5% κατά μέσο όρο.

Επίσης, προσδιορίστηκαν οι πολυμορφικές θέσεις ανάμεσα στις αλληλουχίες. Συνολικά, βρέθηκαν 21 πολυμορφικές θέσεις, εκ των οποίων οι 10 είναι πληροφοριακές για τη φειδωλότητα, ενώ οι υπόλοιπες 11 βρίσκονταν σε μεμονωμένα δείγματα.

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 |
|-----------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|----|
| 1. COX3 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 2. Greece 3 | 0.005 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 3. Greece 4 | 0.005 | 0.000 | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 4. Greece 5 | 0.005 | 0.003 | 0.003 | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 5. Greece 6 | 0.005 | 0.000 | 0.000 | 0.003 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 6. Greece 7 | 0.005 | 0.000 | 0.000 | 0.003 | 0.000 | | | | | | | | | | | | | | | |
| 7. Greece 8 | 0.005 | 0.003 | 0.003 | 0.000 | 0.003 | 0.003 | | | | | | | | | | | | | | |
| 8. Cyprus 22 | 0.004 | 0.004 | 0.004 | 0.004 | 0.004 | 0.004 | 0.004 | | | | | | | | | | | | | |
| 9. Cyprus 26 | 0.007 | 0.009 | 0.009 | 0.009 | 0.009 | 0.009 | 0.009 | 0.005 | | | | | | | | | | | | |
| 10. Turkey 11 | 0.008 | 0.011 | 0.011 | 0.011 | 0.011 | 0.011 | 0.011 | 0.007 | 0.004 | | | | | | | | | | | |
| 11. Turkey 12 | 0.008 | 0.011 | 0.011 | 0.011 | 0.011 | 0.011 | 0.011 | 0.007 | 0.004 | 0.005 | | | | | | | | | | |
| 12. Anatolia 52 | 0.008 | 0.011 | 0.011 | 0.011 | 0.011 | 0.011 | 0.011 | 0.007 | 0.004 | 0.005 | 0.005 | | | | | | | | | |
| 13. Turkey 5 | 0.009 | 0.012 | 0.012 | 0.012 | 0.012 | 0.012 | 0.012 | 0.008 | 0.005 | 0.007 | 0.004 | 0.007 | | | | | | | | |
| 14. Turkey 6 | 0.010 | 0.013 | 0.013 | 0.013 | 0.013 | 0.013 | 0.013 | 0.009 | 0.004 | 0.008 | 0.008 | 0.008 | 0.009 | | | | | | | |
| 15. Germany 2 | 0.001 | 0.004 | 0.004 | 0.004 | 0.004 | 0.004 | 0.004 | 0.003 | 0.008 | 0.009 | 0.009 | 0.009 | 0.011 | 0.012 | | | | | | |
| 16. France 2 | 0.001 | 0.007 | 0.007 | 0.007 | 0.007 | 0.007 | 0.007 | 0.005 | 0.008 | 0.009 | 0.009 | 0.009 | 0.011 | 0.012 | 0.003 | | | | | |
| 17. Germany 3 | 0.001 | 0.004 | 0.004 | 0.004 | 0.004 | 0.004 | 0.004 | 0.003 | 0.008 | 0.009 | 0.009 | 0.009 | 0.011 | 0.012 | 0.000 | 0.003 | | | | |
| 18. Germany 4 | 0.000 | 0.005 | 0.005 | 0.005 | 0.005 | 0.005 | 0.005 | 0.004 | 0.007 | 0.008 | 0.008 | 0.008 | 0.009 | 0.010 | 0.001 | 0.001 | 0.001 | | | |
| 19. France 5 | 0.001 | 0.004 | 0.004 | 0.004 | 0.004 | 0.004 | 0.004 | 0.003 | 0.008 | 0.009 | 0.009 | 0.009 | 0.011 | 0.012 | 0.000 | 0.003 | 0.000 | 0.001 | | |
| 20. France 6 | 0.000 | 0.005 | 0.005 | 0.005 | 0.005 | 0.005 | 0.005 | 0.004 | 0.007 | 0.008 | 0.008 | 0.008 | 0.009 | 0.010 | 0.001 | 0.001 | 0.001 | 0.000 | 0.001 | |

Εικόνα 10 : Γενετικές Αποστάσεις μεταξύ των δειγμάτων

Με βάση την Εικόνα 10, η μέγιστη γενετική απόσταση που παρατηρείται είναι 1.3% μεταξύ πληθυσμών από διαφορετικές περιοχές, πιο συγκεκριμένα μεταξύ του δείγματος Turkey 6 με τα Greece 4, 5, 6, 7, 8. Αντίστοιχα, η ελάχιστη γενετική απόσταση που παρατηρείται είναι 0.0% δειγμάτων από την ίδια περιοχή, πιο συγκεκριμένα France 6 με Germany 4, France 5 με Germany 3, Germany 3 με Germany 2, Greece 3 με Greece 4, 6 και 7 και Greece 8 με Greece 5.

M5: Within Mean Group Distanc...

File Display Caption Help

(A,B) 0.0 0.00

| | d |
|-------------|-------|
| 1. Greece | 0.001 |
| 2. Europe | 0.002 |
| 3. Anatolia | 0.006 |

d [1,1] (Greece-Greece) / Nucleotide: Maximum

Εικόνα 11: Γενετικές Αποστάσεις μέσα στις ομάδες

Η γενετική απόσταση μέσα στις ομάδες είναι 0.1% για την ελληνική, 0.2% για την ευρωπαϊκή και 0.6% για την τούρκικη (Εικόνα 11).

M5: Between Group Mean Distance (H:\...

File Display Caption Help

(A,B) 0.0 0.00

| | 1 | 2 | 3 |
|-------------|-------|-------|---|
| 1. Greece | | | |
| 2. Europe | 0.005 | | |
| 3. Anatolia | 0.011 | 0.009 | |

[1,1] (Greece-Greece) / Nucleotide: Maximum Comp

Εικόνα 12: Γενετικές Αποστάσεις ανάμεσα στις ομάδες

Με βάση την Εικόνα 12, παρατηρούμε ότι η γενετική απόσταση μεταξύ ευρωπαϊκών και ελληνικών πληθυσμών είναι 0,5%, μεταξύ ευρωπαϊκών και τούρκικων πληθυσμών είναι 0.9% και μεταξύ ελληνικών και τούρκικων πληθυσμών είναι 1.1%

3.6. Αμινοξική Ανάλυση

Η μετάφραση των αλληλουχιών με τη χρήση του κατάλληλου γενετικού κώδικα (μιτοχονδριακός γενετικός κώδικας των σπονδυλωτών) δεν αποκάλυψε κωδικόνιο λήξης σε κάποια αλληλουχία, ούτε κάποια προσθήκη ή αφαίρεση νουκλεοτιδίου (indels) οπότε πράγματι η αλληλουχία μας είναι η λειτουργική μιτοχονδριακή και δεν ενισχύθηκε κάποιο πυρηνικό ψευδογονίδιο. Επίσης, εντοπίστηκαν οι πολυμορφικές θέσεις των αμινοξικών αλληλουχιών, οι οποίες ήταν έξι, εκ των οποίων μόνο οι δύο εμφανίζονται σε περισσότερα από ένα δείγματα, όπως φαίνεται στον Πίνακα 3.

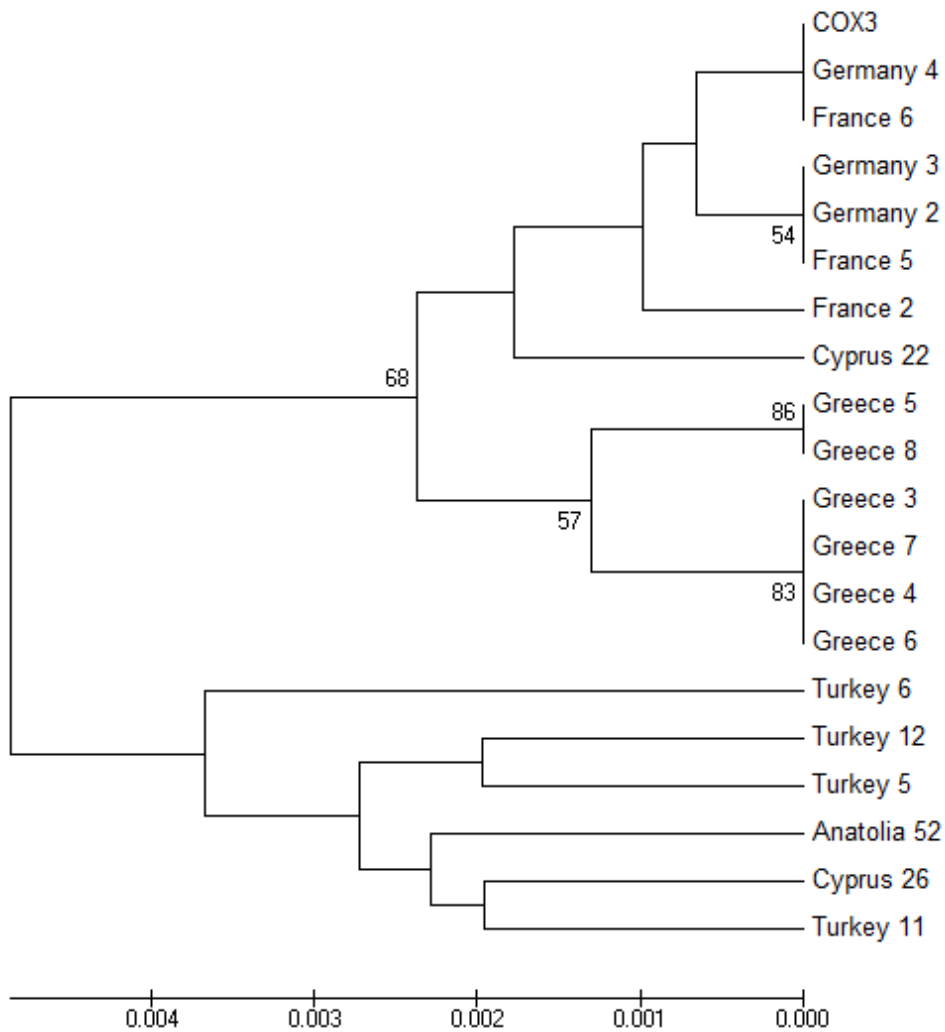
| ΔΕΙΓΜΑ/ ΔΕΙΓΜΑΤΑ | ΑΜΙΝΟΞΕΑ | ΘΕΣΗ |
|--|----------------------------------|------|
| Turkey 6 | Λευκίνη L από Προλίνη P | 13 |
| Turkey 5 | Ισολευκίνη I από Σερίνη S | 14 |
| Turkey 12 | Φαινυλαλανίνη F από Τυροσίνη Y | 55 |
| Greece 3, 4, 5, 6, 7, 8, Cyprus 22, Germany 2, 3, France 5 | Γλυκίνη G από Βαλίνη V | 234 |
| Turkey 12, 5 | Γλυκίνη G από Ασπαραγινικό οξύ D | 240 |
| France 2 | Φαινυλαλανίνη F από Τυροσίνη Y | 254 |

Συγκρίνοντας τα επίπεδα της ποικιλομορφίας των νουκλεοτιδικών και των αμινοξικών αλληλουχιών (21 πολυμορφικές θέσεις έναντι 6), μπορούμε να συμπεράνουμε ότι οι περισσότερες μεταλλάξεις είναι συνώνυμες, δηλαδή τα κωδικόνια που προκύπτουν από τις καινούργιες τριπλέτες κωδικοποιούν για το ίδιο αμινοξύ.

3.7. Φυλογενετική Ανάλυση

Τα δείγματα φαίνεται να διαχωρίζονται με βάση τον τόπο προέλευσής τους. Διακρίνεται μια σαφής διαφοροποίηση ανάμεσα στα κυπριακά και τούρκικα δείγματα, τα οποία έχουν το ασιατικό πρότυπο, και στα ελληνικά, γαλλικά και γερμανικά δείγματα, τα οποία έχουν το ευρωπαϊκό πρότυπο. Ενδιαφέρον

παρουσιάζει το δείγμα Cyp 22, το οποίο έχει το ευρωπαϊκό πρότυπο, σε αντίθεση με τα υπόλοιπα κυπριακά που έχουν το ασιατικό πρότυπο. Δεδομένου ότι οι φυσικές μεταναστεύσεις λαγών από και προς την Κύπρο είναι πρακτικά αδύνατες, ευρωπαϊκά πρότυπα στην Κύπρο θα μπορούσαν να προκύψουν μετά από ανθρωπογενείς παρεμβάσεις, όπως η εισαγωγή τους από την Ευρώπη για λόγους εμπλουτισμού των πληθυσμών.



Εικόνα 13: Φυλογενετικό Δέντρο

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στη μελέτη αυτή, εξετάστηκαν δείγματα ευρωπαϊκού λαγού (*L. europaeus*) και αναλύθηκαν όσων αφορά στη νουκλεοτιδική αλληλουχία του μιτοχονδριακού γονιδίου *COXIII*, το οποίο είναι υπεύθυνο για τη σύνθεση της τρίτης υπομανάδας της κυτοχρωμικής οξειδάσης. Τα δείγματα προέρχονταν από πληθυσμούς λαγών σε Ευρώπη (Γερμανία, Γαλλία), Ελλάδα, Κύπρο και Τουρκία. Από τη νουκλεοτιδική ανάλυση παρατηρήθηκαν αρκετές θέσεις μεταλλάξεων, οι περισσότερες από τις οποίες ήταν συνώνυμες, καθώς και έξι μη συνώνυμες. Αξίζει να σημειωθεί ότι σε αρκετές περιπτώσεις, οι μεταλλάξεις εμφάνιζαν σαφή γεωγραφική κατανομή, δηλαδή δείγματα από την ίδια γεωγραφική περιοχή παρουσίαζαν ομοιότητες στις μεταλλάξεις που βρέθηκαν και διαφορές σε σχέση με τα δείγματα ατόμων διαφορετικής γεωγραφικής περιοχής. Αυτό το γεγονός θα μπορούσε ίσως να χρησιμοποιηθεί σε άλλες μελέτες που θα σχετίζονται με την ταυτοποίηση ατόμων με βάση τις μιτοχονδριακές τους μεταλλάξεις.

Τα δεδομένα αυτά συμφωνούν με τα αποτελέσματα προηγούμενων μελετών που έχουν γίνει στο κυτόχρωμα b (cyt b), από τα οποία προκύπτει η ύπαρξη τριών διαφορετικών απλοομάδων με πολύ καλά προσδιορισμένη κατανομή στην Ευρώπη και την Ανατολία. Πιο συγκεκριμένα, έχουμε την κεντρική ευρωπαϊκή απλοομάδα (Γαλλία, Γερμανία, Ελβετία, Δανία, κλπ) η οποία χωρίζεται σε δύο υποομάδες Euh-A και Euh-B, τη νότια ευρωπαϊκή Seeh (Ελλάδα, Βουλγαρία) και την ανατολική AMh (Τουρκία, Κύπρος, Ισραήλ) (Stamatis et al.2011).

Επίσης, δεδομένα που προέκυψαν από τη μελέτη της περιοχής Control Region 1 (CR-1), όσων αφορά τις γενετικές αποστάσεις από και μεταξύ των απλοομάδων, ήταν τα εξής: μέσα στις ομάδες 1,29% για την νότια ευρωπαϊκή, 3,38% για την ανατολική, 0,70% για την κεντρική ευρωπαϊκή A και 0,77% για την κεντρική ευρωπαϊκή B και ανάμεσα στις ομάδες 1,47%-0,73% μεταξύ της κεντρικής ευρωπαϊκής A και της κεντρικής ευρωπαϊκής B και 7,16%-4,83% μεταξύ της ανατολικής και της κεντρικής ευρωπαϊκής A (Stamatis et al.2011). Οι τιμές αυτές των γενετικών αποστάσεων είναι σημαντικά αυξημένες σε σχέση με αυτές που παρατηρήθηκαν στο γονίδιο *COXIII*, γεγονός όμως που ήταν αναμενόμενο λόγω του ότι η περιοχή CR1 δεν περιέχει γονίδια και άρα οι μεταλλάξεις συσσωρεύονται με μεγαλύτερο ρυθμό, καθώς δεν υπάρχει ισχυρή εξελικτική πίεση

Η κυτοχρωμική οξειδάση είναι ένζυμο που συμμετέχει στην οξειδωτική φωσφορυλίωση (OXPHOS), η οποία είναι υπεύθυνη για την παραγωγή ενέργειας στους οργανισμούς. Δεδομένης λοιπόν της σημαντικότητας της οξειδωτικής

φωσφορυλίωσης, η φυσική επιλογή στα γονίδια που κωδικοποιούν τα ένζυμα που συμμετέχουν σε αυτή είναι ιδιαίτερα έντονη. Δεδομένου επίσης και του πολύ υψηλού ρυθμού μεταλλάξεων του μιτοχονδριακού γονιδιώματος (σε σχέση με το πυρηνικό γονιδίωμα), γίνεται σαφής η σημασία της ανάλυσης των μιτοχονδριακών γονιδίων σε σχέση με τις μεταλλάξεις που υφίστανται και πως αυτές επηρεάζουν τη φυσιολογία και την προσαρμογή του οργανισμού.

Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, η σημαντικότητα της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης καθιστά ιδιαίτερα έντονη τη φυσική επιλογή πάνω στα γονίδια που σχετίζονται με αυτή. Επομένως, οι βαριά επιβλαβείς μεταλλάξεις σε αυτά τα γονίδια θα αφαιρεθούν γρήγορα λόγω φυσικής επιλογής. Όμως, οι μεταλλάξεις οι οποίες προκαλούν μόνο ελαφρώς επιβλαβείς μεταβολές στην απόδοση της παραγωγής ενέργειας, μπορεί να επιμείνουν. Τέτοιες ήπιες μεταλλάξεις έχουν παρατηρηθεί στο μιτοχονδριακό γονιδίωμα (Smith et al. 2010).

Τα ένζυμα της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης κωδικοποιούνται τόσο από μιτοχονδριακά, όσο και από πυρηνικά γονίδια. Σε μεταλλάξεις που λαμβάνουν χώρα στο μιτοχονδριακό γονιδίωμα και επηρεάζουν το μονοπάτι OXPHOS, συχνά δρα ο μηχανισμός της συν- προσαρμογής των πυρηνικά κωδικοποιημένων γονιδίων που επίσης σχετίζονται με το μονοπάτι αυτό. Έτσι, αυτές οι μεταλλάξεις μπορούν να «καμουφλαριστούν» από αντίστοιχες αντισταθμιστικές μεταλλάξεις του πυρηνικού DNA. Σε αυτές τις περιπτώσεις, η ανάμειξη των πληθυσμών θα μπορούσε να διαταράξει αυτή τη συν- προσαρμογή των συμπλεγμάτων γονιδίων και να αποκαλύψει τις όποιες επιδράσεις των μεταλλάξεων του μιτοχονδριακού DNA (Smith et al. 2010).

Ένα τέτοιο παράδειγμα αποτελεί και η μελέτη του φαινομένου της «κατάρας της μητέρας» (mother's curse effect).

Αναφέρθηκε παραπάνω, ότι μεταλλάξεις που προκαλούν μόνο ελαφρώς επιβλαβείς μεταβολές στην απόδοση της παραγωγής ενέργειας, μπορεί να επιμείνουν. Τέτοιες ήπιες αλλαγές είναι πιθανό να επηρεάσουν τα αρσενικά αναπαραγωγικά κύτταρα σε πολύ μεγαλύτερο βαθμό απ' ότι τα σωματικά ή τα θηλυκά αναπαραγωγικά κύτταρα, λόγω της δυσαναλογίας τους σε ενεργειακές απαιτήσεις. Τα σπερματοζώαρια έχουν υψηλό ποσοστό ενεργειακών δαπανών για την κινητικότητα, αλλά κατέχουν ένα κλάσμα μόνο των μιτοχονδρίων που είναι παρόντα στα περισσότερα άλλα κύτταρα.). Έτσι, οι μεταλλάξεις του mt DNA που προκαλούν σχετικά μικρές μειώσεις στην OXPHOS, μπορούν να μειώσουν σημαντικά τη λειτουργία του σπέρματος και συνεπώς τη γονιμότητα του αρσενικού ατόμου, αλλά δεν έχουν καμία επίδραση στη βιωσιμότητα των ωαρίων, καθώς τα ωάρια έχουν χαμηλές ενεργειακές απαιτήσεις. Εξαιτίας του μητρικού τρόπου κληρονομικότητας του mt DNA, ο μεταλλαγμένος απλότυπος μπορεί και διατηρείται μέσα στον

πληθυσμό μέσω της μητρικής γραμμής κληρονομικότητας. Αυτό το σενάριο περιγράφεται ως «η κατάρα της μητέρας» (Smith et al. 2010).

Υπάρχουν μόνοι λίγες μελέτες που αναφέρουν το φαινόμενο mother's curse. Μέχρι σήμερα το mtDNA χρησιμοποιείται ευρέως ως γενετικός δείκτης σε πληθυσμιακές μελέτες ζωικών ειδών και μόνο πρόσφατα παρατηρήθηκαν οι λειτουργικές επιπτώσεις των μεταλλάξεων του mtDNA στις αναπαραγωγικές και λειτουργικές ικανότητες ατόμων και πληθυσμών. Υπάρχουν επομένως, σημαντικά περιθώρια ώστε να ερευνηθούν παρόμοιες επιπτώσεις δυσλειτουργιών του mtDNA σε πληθυσμούς διάφορων ζώων. Ένας άλλος λόγος για το ότι ορισμένες έρευνες δεν αναφέρουν κανένα στοιχείο για τις mtDNA μεταλλάξεις στους άγριους πληθυσμούς, είναι το φαινόμενο της κάλυψης που δημιουργείται από την αλληλεπίδραση των μιτοχονδριακών γονιδίων και πυρηνικών γονιδίων (Smith et al. 2010).

Γι αυτό το λόγο, μελλοντικά αναμένεται να μελετηθούν όλα τα μιτοχονδριακά γονίδια που συμμετέχουν στην οξειδωτική φωσφορυλίωση καθώς και οι αντίστοιχες υπομονάδες που κωδικοποιούνται από πυρηνικά γονίδια, ώστε να διαπιστωθεί αν όντως συμβαίνει αυτό το φαινόμενο της συν-προσαρμογής και στους πληθυσμούς του *Lepus europaeus*.

5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Alberts, Bray, Hopkin, Johnson, Lewis, Raff, Roberts, Walter (2006) Βασικές αρχές κυτταρικής βιολογίας
- Berg J.M., Tymoczko J.L., Stryer L. Biochemistry
- Blier P.U., Dufresne F., Burton R.S. (2001) Natural selection and the evolution of mtDNA-encoded peptides: evidence for intergenomic co-adaptation. Trends in Genetics 17:400-405
- Cummins J.M., Jequier A.M., Kani R. (1994) Molecular Biology of Human Male Infertility: Links With Aging, Mitochondrial Genetics, and Oxidative Stress? MOLECULAR REPRODUCTION AND DEVELOPMENT 37:345-362
- Gershoni M., Templeton A.R., Mishmar D. (2009) Mitochondrial bioenergetics as a major motive force of speciation BioEssays 31:642–650
- Hewitt V., Alcock F., Trevor Lithgow T. (2008) Minor modifications and major adaptations: The evolution of molecular machines driving mitochondrial protein import. The EMBO Journal 27:2648–2655
- Mamuris Z., Moutou K.A., Stamatis C., Sarafidou T., Suchentrunk F. (2010). Y DNA and Mitochondrial lineage in European and Asian populations of the brown hare (*Lepus europaeus*). Mammalian Biology 75: 233- 242

- Mamuris Z., Sfouggaris A.I., Stamatis C. (2001). Genetic structure of Greek brown hare (*Lepus europaeus*) populations as revealed by mtDNA RFLP- PCR analysis: implications for conserving genetic diversity. *Biological Conservation* 101: 187- 196
- Mamuris Z., Sfouggaris A.I., Stamatis C., Suchentrunk F. (2002). Assessment of genetic structure of Greek brown hare (*Lepus europaeus*) populations based on variations in Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD). *Biochemical Genetics* 40: 323- 338
- Pazos F., Valencia A. (2008). Protein co-evolution, co-adaptation and interactions *The EMBO Journal* 27:2648–2655
- Russell P.J. *iGenetics: A Molecular Approach Plus MasteringGenetics*
- Smith S., Turbill C., Suchentrunk F. (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
- Stamatis C., Giannouli S., Suchentrunk F., Sert H., Stathopoulos C., Mamuris Z. (2008). Recruitment of mitochondrial tRNA genes as auxiliary molecular markers for linked functional genomic and genetic analyses: The paradigm of brown hare (*Lepus europaeus*). *Gene* 410: 154- 164
- Stamatis C., Suchentrunk F., Moutou K.A., Giacometti M., Haerer G., Djan M., Vapa L., Vucovic M., Tvrtkovic. N., Sert H., Alves P., Mamuris Z. (2009). Phylogeography of the Brown Hare, *Lepus europaeus*, in Europe: legacy of southeastern Mediterranean refugia? *Journal of Biogeography* 36:515- 528
- Stamatis C., Suchentrunk F., Sert H., Triantaphyllidis C., Mamuris Z. (2007). Genetic evidence for survival of released captive-bred brown hares *Lepus europaeus* during restocking operations in Greece. *FFI, Oryx*, 41(4), 548–551
- Suchentrunk F., Mamuris Z., Sfouggaris A.I., Stamatis C. (2003). Biochemical genetic variability in brown hares (*Lepus europaeus*) from Greece. *Biochemical Genetics* 41: 127- 140
- Αλαχιώτης Σ., Εισαγωγή στην Εξέλιξη (2007)
- Μαργαρίτης Λ., Βιολογία Κυττάρου (2008)