

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

Πτυχιακή διατριβή

Μελέτη πολυμορφισμών σε μιτοχονδριακά γονίδια tRNA σε  
πληθυσμούς του είδους *Lepus europaeus*

Ευαγγελία Ζιώγα



ΛΑΡΙΣΑ, 2014

**Μελέτη πολυμορφισμών σε μιτοχονδριακά γονίδια tRNA σε  
πληθυσμούς του είδους *Lepus europaeus***

**Population analysis of mitochondrial tRNA genes in species  
*Lepus europaeus***

## ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

ΜΑΜΟΥΡΗΣ ΖΗΣΗΣ: (ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ)	<b>ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ</b>  Καθηγητής Γενετικής Ζωικών Πληθυσμών του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας
ΜΟΥΤΟΥ ΑΙΚΑΤΕΡΙΝΗ	Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιολογίας Σπονδυλωτών του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας
ΣΑΡΑΦΙΔΟΥ ΘΕΟΛΟΓΙΑ	Επίκουρος Καθηγήτρια Μοριακής Γενετικής Ζωικών Πληθυσμών 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 Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιολογίας Σπονδυλωτών, κ. Αικ. Μούτου και την Επίκουρο Καθηγήτρια Μοριακής Γενετικής, κ. Θ. Σαραφίδου για την συμμετοχή τους στην τριμελή συμβουλευτική επιτροπή. Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον διδάκτορα Κώστα Σταμάτη για την πολύτιμη βοήθειά του και τις χρήσιμες συμβουλές του, καθώς και τους υποψήφιους διδάκτορες Γιαννούλη Θέμη και Σαρρή Κωνσταντίνα για την πολύτιμη βοήθεια τους κατά την εκτέλεση των πειραμάτων και τις ιδιαίτερα χρήσιμες συμβουλές τους, αλλά και για το ευχάριστο κλίμα συνεργασίας που υπήρχε μέσα στο εργαστήριο.

## Περίληψη

Το μιτοχονδριακό DNA (mtDNA) είναι ένας εξαιρετος δείκτης πληθυσμιακής γενετικής. Μέχρι πρόσφατα οι επιστήμονες πίστευαν ότι το mtDNA ήταν επιλεκτικά ουδέτερο, γι' αυτό το λόγο είχαν στραμμένη την προσοχή τους στο πυρηνικό DNA στις μελέτες που αφορούσαν την αναπαραγωγική απομόνωση και την ειδογένεση. Πρόσφατες μελέτες υπέδειξαν το μιτοχονδριακό DNA ως χρήσιμο εργαλείο για την διερεύνηση της τοπικής προσαρμογής και της αναπαραγωγικής επιτυχίας, ιδιαίτερα μεταξύ απομακρυσμένων πληθυσμών ενός είδους. Επίσης, έχει αποκαλυφθεί συνεργασία του πυρηνικού και του μιτοχονδριακού γονιδιώματος σε πολλά επίπεδα και ένα από αυτά είναι στην πρωτεϊνοσύνθεση του μιτοχονδρίου. Κατά την μετάφραση, συνεργάζονται μιτοχονδριακά κωδικοποιούμενα tRNA και αμινο-άκυλο-tRNA συνθετάσες που κωδικοποιούνται από το πυρηνικό γονιδίωμα ώστε να επιτευχθεί η ομαλή λειτουργία της πρωτεϊνοσύνθεσης. Στην παρούσα μελέτη, αναλύθηκε τμήμα του μιτοχονδριακού γονιδιώματος, το οποίο περιλαμβάνει 3 γονίδια tRNA και 2 τμήματα γονιδίων ND1 και ND2, σε πληθυσμούς του είδους *Lepus eurosaesus* από Ελλάδα, Τουρκία, Κύπρο και Ευρώπη. Ύστερα από ανάλυση πολυμορφισμών μονόκλωνης αλυσίδας (SSCP) αποκαλύφθηκαν 9 διαφορετικά πρότυπα. Πραγματοποιήθηκε αλληλούχηση των 9 προτύπων από διαφορετικές γεωγραφικές περιοχές. Η ανάλυση των αποτελεσμάτων δεν έδειξε κάποια μετάλλαξη στα γονίδια tRNA της μεθειονίνης και της ισολευκίνης. Ωστόσο παρατηρήθηκαν δυο μεταλλάξεις στο γονίδιο tRNA της γλουταμίνης, ενώ στα άλλα 2 τμήματα εμφανίστηκαν αρκετές σημειακές μεταλλάξεις. Για να αποκτήσουμε ολοκληρωμένη εικόνα για τους ρυθμούς εξέλιξης των γονιδίων που συμμετέχουν στην πρωτεϊνοσύνθεση, προτείνεται περαιτέρω μελέτη πολυμορφισμών στα μιτοχονδριακά tRNA και στις αντίστοιχες συνθετάσες των αμινοάκυλο-tRNA.

## **Abstract**

Mitochondrial DNA (mtDNA) has been proven to be an excellent marker of population genetics. Until recently, it was thought that mtDNA was neutral due to selection, so the scientists focused on nuclear genome to study processes like reproductive isolation and speciation. Recent studies have shown that mtDNA is a useful tool to study local adaptation as well as reproductive success among individuals, especially between geographically isolated populations of a species. It has been found that mtDNA cooperates with nuclear DNA in many aspects, including mitochondrial translation. During translation, mitochondrial tRNAs are recognized by nuclear encoded amino-acyl-tRNA synthetases (aaRS) and get bound with the right amino acid. In this study, we analysed a partial mitochondrial sequence, that includes 3 tRNA genes (Ile, Met, Gln) and partial sequences of ND1 and ND2 genes of respiratory complex, in isolated populations of *Lepus europaeus* from Greece, Turkey, Cyprus and Central Europe. The PCR-SSCP analysis has revealed 9 different patterns of grouping. One sample of each pattern was sequenced in order to reveal the single nucleotide polymorphisms of these genes. In tRNA genes, two point mutations were detected in tRNA-Gln and the other two were found monomorphic. In ND1 and ND2 genes, we detected several mutations. Nevertheless, the partial sequence of these genes was short compared to gene length (less than 10% of the whole gene), so there is a need to analyse the whole gene sequence to exclude better conclusions about evolutionary processes. Also, we recommend the analysis of the whole set of mitochondrial tRNAs as long as the genes that code for mitochondrial aaRS.

# Περιεχόμενα

ΕΙΣΑΓΩΓΗ .....	8
1.1 Μιτοχόνδριο .....	8
1.2 Μιτοχονδριακό DNA (mtDNA).....	10
1.3 Συν-προσαρμογή μιτοχονδριακών και πυρηνικών γονιδιωμάτων .....	12
1.4 Η ροή της γενετικής πληροφορίας: αντιγραφή, μεταγραφή, μετάφραση .....	12
1.5 Μεταφορικό RNA.....	14
1.6 Συνθετάσες των αμινοακυλο-tRNA.....	15
1.7 Ρυθμός εξέλιξης του mtDNA .....	16
1.8 Φυσική επιλογή και εξέλιξη κωδικοποιημένων πεπτιδίων από mtDNA.....	17
1.9 Συσχέτιση mtDNA και ανδρικής γονιμότητας .....	18
1.10 ΕΥΡΩΠΑΪΚΟΣ ΛΑΓΟΣ (Lepus Europaeus).....	19
1.11 Αντικείμενο μελέτης.....	20
ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	23
2.1 Απομόνωση DNA .....	23
2.2 Προσδιορισμός της συνολικής ποσότητας στο δείγμα.....	25
2.3 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR).....	26
2.4 Ηλεκτροφόρηση σε πηκτική αγαρόζη .....	28
2.5 Ανάλυση πολυμορφισμού διαμόρφωσης μονόκλωνης αλυσίδας (Single Strand Conformation Polymorphism) .....	28
2.6 Αλληλούχηση διαφορετικών προτύπων SSCP .....	31
2.7 Ανάλυση χρωματογραφημάτων αλληλούχησης.....	32
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	33
3.1 Απομόνωση DNA .....	33
3.2 PCR .....	33
3.3 SSCP .....	34
3.4. Αλληλούχηση.....	36
ΣΥΖΗΤΗΣΗ .....	39
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ .....	41

# 1<sup>ο</sup> ΚΕΦΑΛΑΙΟ

## ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Στο βιβλίο του «Η προέλευση των ειδών», ο Δαρβίνος (Darwin,1859) πρότεινε ότι όλοι οι οργανισμοί της Γης εξελίχθηκαν από ένα μοναδικό αρχέγονο οργανισμό με τροποποιήσεις. Επίσης, πρότεινε ότι η κύρια δύναμη της εξέλιξης είναι η φυσική επιλογή. Οι περισσότεροι βιολόγοι αποδέχθηκαν την πρώτη πρόταση αλλά η δεύτερη ήταν αμφιλεγόμενη και κρίθηκε από πολλούς βιολόγους, Προτάθηκαν διάφοροι εναλλακτικοί μηχανισμοί εξέλιξης, όπως η θεωρία της μεταστοιχείωσης, ο Λαμαρκισμός, η γεωγραφική απομόνωση και η μη προσαρμοστική εξέλιξη. Εξαιτίας αυτής της κριτικής, ο Δαρβίνος αργότερα άλλαξε τη θεωρία σχετικά με το μηχανισμό της εξέλιξης σε κάποιο βαθμό. Ήταν ένας πλουραλιστής άνθρωπος και δέχθηκε μια ταλαντευόμενη μορφή του Λαμαρκισμού και της μη προσαρμοστικής εξέλιξης. Ωστόσο, διατήρησε την άποψη ότι η φυσική επιλογή που δρα στην υπάρχουσα ποικιλομορφία είναι ο πρωταρχικός παράγοντας της εξέλιξης. Το κύριο ενδιαφέρον του ήταν οι εξελικτικές αλλαγές σε μορφολογικά ή φυσιολογικά χαρακτηριστικά και η ειδογένεση. Δεκαετίες μετά από αυτή την θεωρία του, δεν έχει καταστεί ακόμα σαφής η γενετική βάση της ειδογένεσης και δεν έχουν προσδιοριστεί τα υπεύθυνα γονίδια που είναι ικανά να οδηγήσουν στη διαδικασία αυτή. Οι επιστήμονες όλα αυτά τα χρόνια έριχναν το βάρος της μελέτης αποκλειστικά στο πυρηνικό DNA, θεωρώντας το μιτοχονδριακό DNA επιλεκτικά ουδέτερο και ότι δεν έπαιζε ρόλο στην προσαρμογή. Με βάση τα τελευταία δεδομένα όμως, η συμβολή του μιτοχονδριακού DNA στις διεργασίες αυτές επαναπροσδιορίζεται, καθώς φαίνεται να επηρεάζει τόσο την βιωσιμότητα και την προσαρμογή, όσο και την αναπαραγωγική απομόνωση που οδηγεί στην ειδογένεση. (Ellison et al., (2007) Zhang et al., (2013), Meiklejohn et al., (2013), Barreto et al. (2013)).

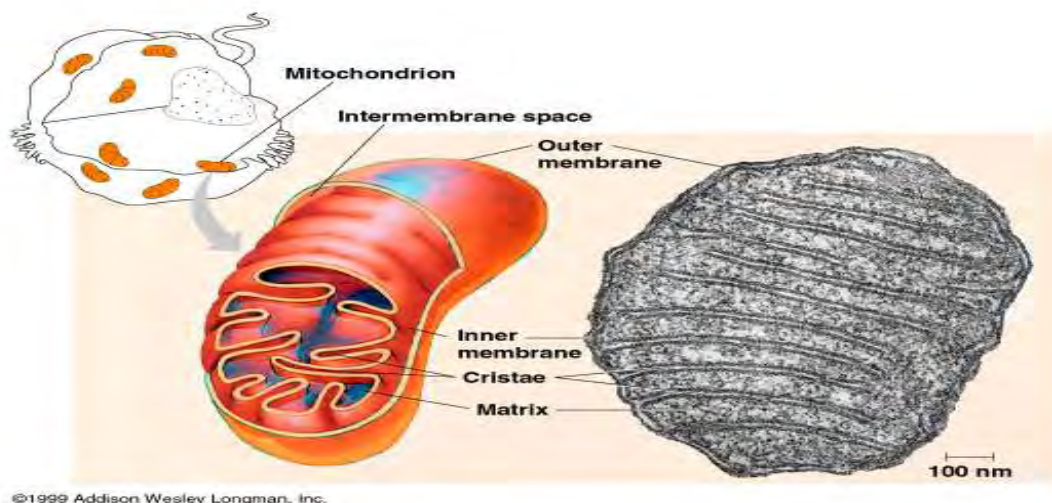


## 1.1 Μιτοχόνδριο

Ο ρόλος των μιτοχονδρίων είναι η εξασφάλιση ενέργειας. Τα μιτοχόνδρια χρησιμοποιούνται από τα κύτταρα για τον μεταβολισμό των βιολογικών μακρομορίων που προσλαμβάνουν οι οργανισμοί με τις τροφές. Έτσι, με τη βοήθεια των μιτοχονδρίων τα κύτταρα διασπών τους υδατάνθρακες και τα λίπη, συνθέτοντας μόρια τριφωσφορικής αδενοσίνης (ATP), μέσω της διαδικασίας της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης.

Τα μιτοχόνδρια σε μεγάλη ποσότητα εμφανίζονται σε κύτταρα με υψηλές απαιτήσεις σε ενέργεια (μυϊκά κύτταρα, νευρικά κύτταρα, κύτταρα των αισθητηρίων οργάνων, ωάρια, κ.λπ.). Στα μυϊκά κύτταρα της καρδιάς, τα μιτοχόνδρια καταλαμβάνουν περίπου το 36% του κυττάρου. Ευκαρυωτικά κύτταρα, που θα χάσουν τα μιτοχόνδριά τους, δεν μπορούν πλέον να αναζωογονηθούν. Ωστόσο, υπάρχουν και ευκαρυωτικά κύτταρα χωρίς μιτοχόνδρια (π.χ. ορισμένα πρωτόζωα).

Τα μιτοχόνδρια έχουν επίμηκες, σφαιρικό ή ωοειδές σχήμα. Περιβάλλονται από δύο μεμβράνες, την εξωτερική και την εσωτερική. Η εξωτερική τους μεμβράνη είναι λεία, έχει κυλινδρικό σχήμα και δεν φέρει οξυσώματα. Η εσωτερική μεμβράνη είναι αναδιπλωμένη, σχηματίζει πολυάριθμες δισκοειδείς ή δακτυλιοειδείς πτυχώσεις και φέρει οξυσώματα που αποτελούνται από πολυενζυμικά συστήματα τα οποία και ευθύνονται για τη φωσφορυλίωση και την αναπνευστική αλυσίδα. Ο ενδιάμεσος χώρος μεταξύ των δύο μεμβρανών ονομάζεται διαμεμβρανικό διάστημα ή μεσομεμβρανικός χώρος του μιτοχονδρίου. Ο χώρος αυτός πληρούται υπό υγρού που χρησιμεύει στη λειτουργική επικοινωνία των δύο μεμβρανών.



Εικόνα 1 : Δομή μιτοχονδρίου

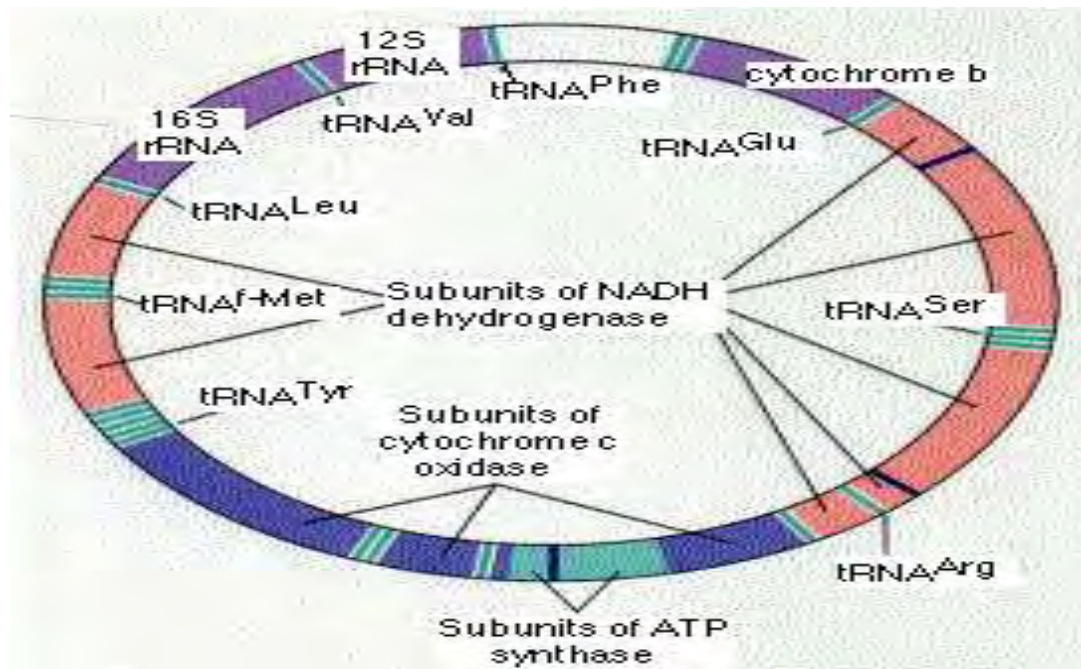
Είναι ημιαυτόνομα οργανίδια και διαθέτουν δικό τους DNA, έτσι ώστε να μπορούν να αναπαράγονται χωρίς να χρειάζεται να διαιρεθεί το κύτταρο. Το DNA των μιτοχονδρίων είναι δίκλωνο κυκλικό και είναι τοποθετημένο στις εσοχές που δημιουργεί η εσωτερική μεμβράνη. Κάθε μιτοχόνδριο περιέχει 2 έως δέκα αντίγραφα του κυκλικού αυτού μορίου DNA.

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

Στα θηλαστικά το μιτοχονδριακό DNA περιλαμβάνει σχετικά λίγα γονίδια. Ο μεγαλύτερος αριθμός των πρωτεϊνών που απαιτούνται για την λειτουργία του οργανιδίου κωδικοποιείται από γονίδια του DNA του πυρήνα. Ωστόσο σοβαρές ασθένειες οφείλονται σε μεταλλάξεις μιτοχονδριακών γονιδίων. Οι ασθένειες αυτές προκαλούν διάφορες μορφές μυϊκής δυστροφίας, αφού το μιτοχόνδριο είναι το κέντρο παραγωγής ATP του κυττάρου.

## **1.2 Μιτοχονδριακό 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 300.000 ζεύγη βάσεων (μιτοχόνδρια μερικών φυτικών κυττάρων). Το γονιδίωμα του μιτοχονδρίου περιλαμβάνει 37 γονίδια που κωδικοποιούν για 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, 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 2:Μιτοχονδριακό DNA

Το mtDNA έχει βρεθεί σε πολλά ίδια αντίγραφα (5-10) σε κάθε μιτοχόνδριο ή ακόμα σε διαφορετικά μεγέθη. 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 μιτοχονδριακό DNA είναι κυκλικό και δεν υπάρχουν ιστόνες άρα δεν οργανώνεται σε νουκλεοσώματα. Επίσης δεν έχουν βρεθεί ιντρόνια και οι μη-κωδικές περιοχές είναι μικρού μήκους. Αποτελεί ένα μικρό ποσοστό του συνόλου του DNA του κυττάρου (1-2% στα ζωικά κύτταρα) ενώ η αντιγραφή του γίνεται σε όλη τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου κι όχι μόνο κατά τη φάση S όπως συμβαίνει στο πυρηνικό DNA. Στα μιτοχόνδρια δεν υπάρχουν συστήματα επιδιόρθωσης DNA άρα ο ρυθμός μεταλλακτικότητας είναι υψηλός και αυτό καθιστά το μιτοχονδριακό DNA πολύτιμο εργαλείο στη μελέτη φυλογενετικών σχέσεων όπως θα αναλυθεί εκτενέστερα στη συνέχεια.

### **1.3 Συν-προσαρμογή μιτοχονδριακών και πυρηνικών γονιδιωμάτων**

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

Τα επίπεδα στα οποία συνεργάζονται τα γονίδια τόσο του πυρηνικού όσο και του μιτοχονδριακού DNA είναι πολλά. Η συνεργασία λαμβάνει χώρα κατά την οξειδωτική φωσφορυλίωση, την αντιγραφή, τη μεταγραφή και τη μετάφραση. Εκτιμάται ότι πάνω από 1000 πυρηνικά γονίδια συμμετέχουν σε μιτοχονδριακές διεργασίες. Στην οξειδωτική φωσφορυλίωση συμμετέχουν πρωτεϊνικά σύμπλοκα τα οποία αποτελούνται από πρωτεϊνικές υπομονάδες, οι οποίες κωδικοποιούνται από γονίδια τόσο του μιτοχονδριακού γονιδιώματος όσο και του πυρηνικού. Πιο συγκεκριμένα όπως προαναφέρθηκε, τα μιτοχονδριακά γονίδια αυτά είναι τα ακόλουθα: 7 γονίδια που κωδικοποιούν για υπομονάδες της αφυδρογονάσης του NADH (ND1, 2, 3, 4, 4L, 5 και 6) 1 υπομονάδα του κυτοχρώματος b, 3 υπομονάδες της οξειδάσης του κυτοχρώματος c (CO I, II, III) και 2 υπομονάδες της μιτοχονδριακής συνθετάσης του ATP (ATPase 6 και 8) (Moritz et al. 1987). Αντίστοιχα, τα πυρηνικά γονίδια για την πρώτη υπομονάδα είναι 37, για την τρίτη υπομονάδα είναι 3, για την τέταρτη είναι 17 και για την πέμπτη 16. Επιπλέον, πυρηνικά γονίδια κωδικοποιούν για πρωτεΐνες που είναι υπεύθυνες για την συναρμολόγηση του συμπλόκου (assembly factors). Σε αντίθεση, το κυτόχρωμα c, το οποίο κωδικοποιείται από ένα πυρηνικό γονίδιο, μεταφέρει ηλεκτρόνια μεταξύ του συμπλόκου III (κυτόχρωμα bc1) και του συμπλόκου IV (κυτοχρωμική c οξειδάση). Γίνεται αντιληπτό ότι η συνεργασία των γονιδίων είναι αναπόφευκτη ώστε να πραγματοποιηθεί η οξειδωτική φωσφορυλίωση.

### **1.4 Η ροή της γενετικής πληροφορίας: αντιγραφή, μεταγραφή, μετάφραση**

Οι δύο αλυσίδες του μιτοχονδριακού DNA χαρακτηρίζονται ως ελαφριά (L) και βαριά (H) και τα ονόματα τους αντικατοπτρίζουν τη διαφορά τους στο ποσοστό γουανίνης και θυμίνης (G+T) που περιέχουν, η οποία αντανακλάται σε διαφορετική συμπεριφορά σε διαβάθμιση πυκνότητας CsCl<sub>2</sub> (Meyer, 1993). Η αντιγραφή γίνεται καθ' όλη τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου. Η μιτοχονδριακή DNA πολυμεράση

προέρχεται από το πυρηνικό DNA. Η αντιγραφή είναι αργή ενώ δεν πραγματοποιείται επιδιόρθωση λαθών.

Αντίστοιχα, κατά την μεταγραφή, η μιτοχονδριακή RNA πολυμεράση προέρχεται από το πυρηνικό γονιδίωμα. Επίσης οι μεταγραφικοί παράγοντες οι οποίοι είναι απαραίτητοι κατά την μεταγραφή κωδικοποιούνται από γονίδια του πυρήνα. Η μιτοχονδριακή πρωτεϊνοσυνθετική μηχανή διαφέρει από την κυτταροπλασματική. Ο γενετικός κώδικας των μιτοχονδρίων 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	
U	UUU } Phe	UCU } Ser	UAU } Tyr	UGU } Cys	U C A G	
	UUC } Phe	UCC } Ser	UAC } Tyr	UGC } Cys		
	UUA } Leu	UCA } Ser	UAA Stop	UGA Trp		
	UUG } Leu	UCG } Ser	UAG Stop	UGG Trp		
C	CUU } Leu	CCU } Pro	CAU } His	CGU } Arg	U C A G	
	CUC } Leu	CCC } Pro	CAC } His	CGC } Arg		
	CUA } Leu	CCA } Pro	CAA } Gln	CGA } Arg		
	CUG } Leu	CCG } Pro	CAG } Gln	CGG } Arg		
A	AUU } Ile	ACU } Thr	AAU } Asn	AGU } Ser	U C A G	
	AUC } Ile	ACC } Thr	AAC } Asn	AGC } Ser		
	AUA } Met	ACA } Thr	AAA } Lys	AGA Stop		
	AUG } Met	ACG } Thr	AAG } Lys	AGG Stop		
G	GUU } Val	GCU } Ala	GAU } Asp	GGU } Gly	U C A G	
	GUC } Val	GCC } Ala	GAC } Asp	GGC } Gly		
	GUA } Val	GCA } Ala	GAA } Glu	GGA } Gly		
	GUG } Val	GCG } Ala	GAG } Glu	GGG } Gly		

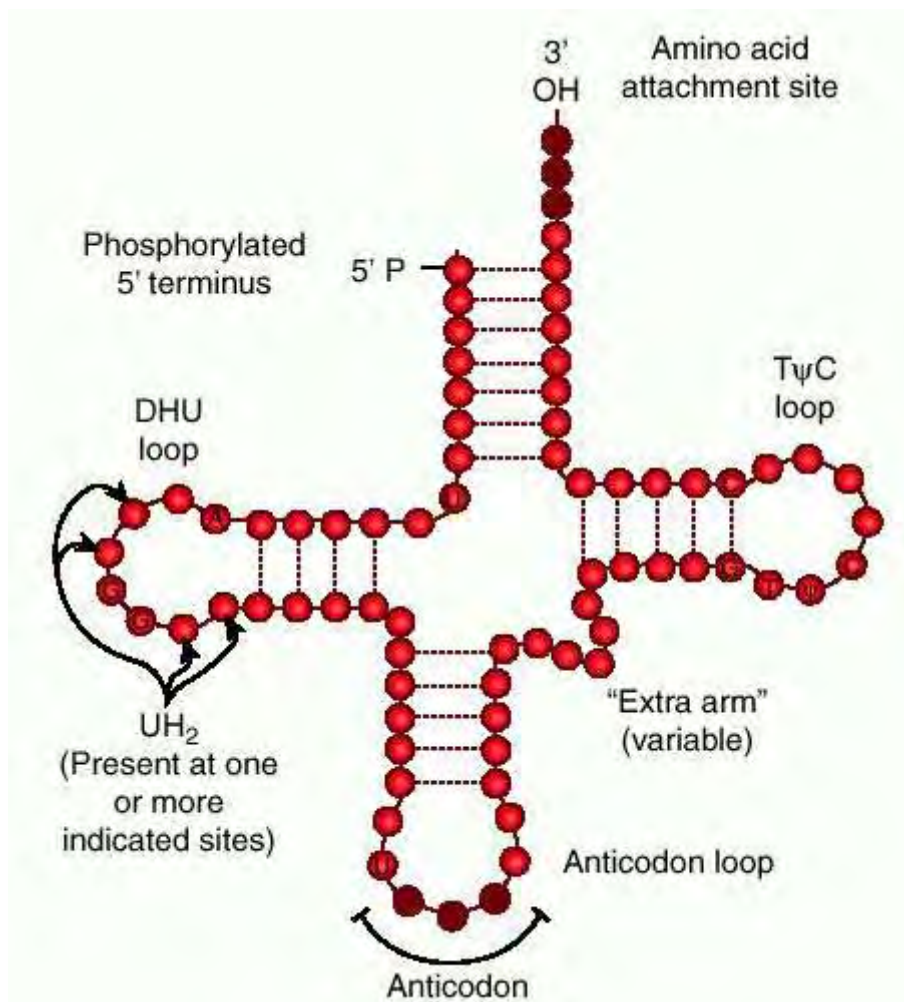
Εικόνα 3:Μιτοχονδριακός γενετικός κώδικας



## 1.5 Μεταφορικό RNA

Το μεταφορικό RNA ή tRNA είναι μικρή αλυσίδα RNA, με μήκος 74-95 νουκλεοτιδίων, που μεταφέρει ειδικά αμινοξέα σε μια επεκτεινόμενη πολυπεπτιδική αλυσίδα στα ριβοσώματα του κυττάρου, με βάση τις οδηγίες του αγγελιαφόρου RNA. Έτσι γίνεται η πρωτεϊνοσύνθεση κατά τη διάρκεια της μετάφρασης στο κύτταρο. Είναι ένας τύπος μη κωδικοποιητικού RNA.

Το tRNA διαθέτει ειδικούς υποδοχείς για την πρόσδεση αμινοξέων καθώς και μια περιοχή αντικωδικονίου, για την αναγνώριση του τρέχοντος κωδικονίου στο αγγελιαφόρο RNA. Η αναγνώριση αυτή γίνεται με βάση τη συμπληρωματικότητα των βάσεων. Ένας τύπος tRNA αντιστοιχεί σε πολλά κωδικόνια αλλά μόνο σε ένα αμινοξύ.



Εικόνα 4: Δομή tRNA

## 1.6 Συνθετάσες των αμινοακυλο-tRNA

Για να διαβάσουν το γενετικό κώδικα του DNA τα κύτταρα παρασκευάζουν πολλά διαφορετικά μόρια tRNA. Η αναγνώριση και η σύνδεση με το κατάλληλο αμινοξύ βασίζεται στη λειτουργία ενζύμων που ονομάζονται **συνθετάσες των αμινοακυλο-tRNA (aaRS)**, τα οποία συνδέουν ομοιοπολικά κάθε αμινοξύ με τα ιδιαίτερα και κατάλληλα μόρια **tRNA**. Για κάθε αμινοξύ υπάρχει μια διαφορετική συνθετάση (δηλαδή ,συνολικά ,οι διάφορες συνθετάσες είναι 20): μια από αυτές συνδέει τη γλυκίνη σε όλα τα μόρια tRNA που αναγνωρίζουν κωδικόνια για τη γλυκίνη ,μια άλλη συνδέει την αλανίνη σε όλα τα μόρια tRNA που αναγνωρίζουν κωδικόνια για την αλανίνη κ.ο.κ. Ειδικά νουκλεοτίδια τα οποία εντοπίζονται τόσο στο αντικωδικόνιο όσο και στον βραχίονα αποδέκτη του αμινοξέος βοηθούν κάθε συνθετάση να αναγνωρίσει το κατάλληλο tRNA. Οι συνθετάσες έχουν εξίσου μεγάλη σημασία με το tRNA για τη διεργασία της αποκωδικοποίησης: χάρη στη συνδυασμένη δράση των συνθετασών και των μορίων tRNA, κάθε κωδικόνιο ενός μορίου mRNA σχετίζεται με ένα συγκεκριμένο, ξεχωριστό αμινοξύ.(A. Fender et al., (2012) Y. Wolf et al., (1999) M. Zhao et al.(2005))



Εικόνα 5:Συνθετάση της leu-tRNA

Η αντίδραση κατά την οποία τα αμινοξύ συνδέεται με το 3' άκρο του tRNA, όπως και πολλές άλλες αντιδράσεις του κυττάρου, είναι συζευγμένη με την υδρόλυση του ATP που απελευθερώνει ενέργεια και παράγει ένα δεσμό υψηλής ενέργειας ανάμεσα στο tRNA και το αμινοξύ. Η ενέργεια αυτού του δεσμού χρησιμοποιείται σε ένα μεταγενέστερο στάδιο πρωτεϊνοσύνθεσης για την ομοιοπολική σύνδεση του αμινοξέος στην αυξανόμενη πολυπεπτιδική αλυσίδα.

Οι αμινοακυλ-tRNA συνθετάσες καταλύουν δύο επιμέρους διαδοχικές αντιδράσεις:

A. Τα αμινοξέα ενεργοποιούνται αρχικά με αδενυλίωση

- αμινοξύ + ATP → αμινοακυλο-AMP + PP<sub>i</sub>

Το αμινο-ακυλο αδενυλικό (μικτός ανυδρίτης)

- PP<sub>i</sub> → 2P<sub>i</sub> (η πυροφωσφατάση καθιστά την αντίδραση μη αντιστρεπτή)

Το αμινοακυλο αδενυλικό (μικτός ανυδρίτης) είναι ένα ενεργοποιημένο ενδιάμεσο, μεταβατικό προϊόν

B. Και στη συνέχεια εστεροποιούνται με το tRNA

- αμινοακυλο-AMP + tRNA → αμινοάκυλο-tRNA + AMP

## 1.7 Ρυθμός εξέλιξης του mtDNA

Το μιτοχονδριακό DNA των πολυκύτταρων οργανισμών παρουσιάζει μοναδικά χαρακτηριστικά τα οποία το καθιστούν χρήσιμο εργαλείο για τη μελέτη της μοριακής εξέλιξης των οργανισμών. Τα γονιδιώματα των οργανιδίων αντιγράφονται και κληρονομούνται με διαφορετικό τρόπο απ' ό,τι 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 το καθιστά στο επίκεντρο του ενδιαφέροντος.

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 μεταλλαξιγόνων, 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.

### **1.8 Φυσική επιλογή και εξέλιξη κωδικοποιημένων πεπτιδίων από 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.

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).

### **1.9 Συσχέτιση mtDNA και ανδρικής γονιμότητας**

Όπως προαναφέρθηκε, το μιτοχονδριακό γονιδίωμα θεωρείται γενικά ότι δεν διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην προσαρμοστική εξέλιξη. Ωστόσο, υπάρχουν αυξανόμενες ενδείξεις ότι το μιτοχονδριακό DNA (mtDNA) είναι ένας σημαντικός παράγοντας για τη βιωσιμότητα και την γονιμότητα. Μερικά από αυτά τα στοιχεία είναι πλέον καλά τεκμηριωμένα, με μεταλλάξεις του mtDNA έχει αποδειχθεί ότι διαδραματίζει αιτιολογικό ρόλο στις εκφυλιστικές ασθένειες, τη γήρανση και τον καρκίνο. Πρόσφατες εργασίες σε ανθρώπους και άλλα είδη υποδεικνύουν τώρα ότι μεταλλάξεις στο μιτοχονδριακό DNA διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη λειτουργία του σπέρματος και την ανδρική γονιμότητα. Επιβλαβείς μεταλλάξεις του mtDNA που επηρεάζουν μόνο τους άνδρες, όπως αυτές που βλάπτουν τη λειτουργία του σπέρματος, δεν θα υπόκεινται σε φυσική επιλογή, επειδή τα μιτοχόνδρια γενικά κληρονομούνται από την μητέρα και θα μπορούσαν να φτάσουν σε υψηλές συχνότητες σε πληθυσμούς εάν οι μεταλλάξεις δεν είναι επιβλαβείς στις γυναίκες. Αυτό το φαινόμενο ονομάζεται η κατάρα της μητέρας.

Το φαινόμενο αυτό έχει μελετηθεί στο είδος *Lepus europaeus* από τον Smith και τους συνεργάτες του. Πιο συγκεκριμένα, μελετήθηκαν λαγοί που προερχόντουσαν από διαφορετικές γεωγραφικές περιοχές και διέφεραν στα γονίδια ND2, ATP6 και CR-1 του μιτοχονδρίου. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι δεν είχαν την ίδια αναπαραγωγική επιτυχία σε σχέση με τους λαγούς που δεν διέφεραν στα συγκεκριμένα γονίδια.

## 1.10 Ευρωπαϊκός λαγός (*Lepus europaeus*)

### Συστηματική κατάταξη του είδους *Lepus europaeus*

- **Βασίλειο:** Ζώα
- **Φύλο:** Χορδωτά
- **Υπό- φύλο:** Σπονδυλωτά
- **Κλάση:** Θηλαστικά
- **Τάξη:** Λαγόμορφα
- **Οικογένεια:** Leporidae
- **Γένος:** *Lepus*
- **Είδος:** *europaeus*

Ο ευρωπαϊκός λαγός (*Lepus europaeus*) 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, Bansfield, 1974). Το χειμώνα το τρίχωμα του ευρωπαϊκού λαγού γίνεται ελαφρώς πιο γκριζο. Επίσης, δεν έχει παρατηρηθεί αξιοσημείωτος διμορφισμός ανάμεσα στα δύο φύλα. Η μοναδική διαφορά που έχει παρατηρηθεί είναι ότι τα αρσενικά έχουν συνήθως πιο παχύ και κοντό λαιμό σε σχέση με τα θηλυκά άτομα (Bansfield, 1974, Dragg, 1974).

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 τις εξής 3 απλοομάδες:

1. Κεντρική ευρωπαϊκή απλοομάδα (Eu, Γαλλία, Γερμανία, Ελβετία, Δανία, κλπ)
2. Νότια ευρωπαϊκή (Gr, Ελλάδα, Βουλγαρία)
3. Ανατολική (An, Τουρκία, Κύπρος, Ισραήλ), (Stamatis et al., 2009).

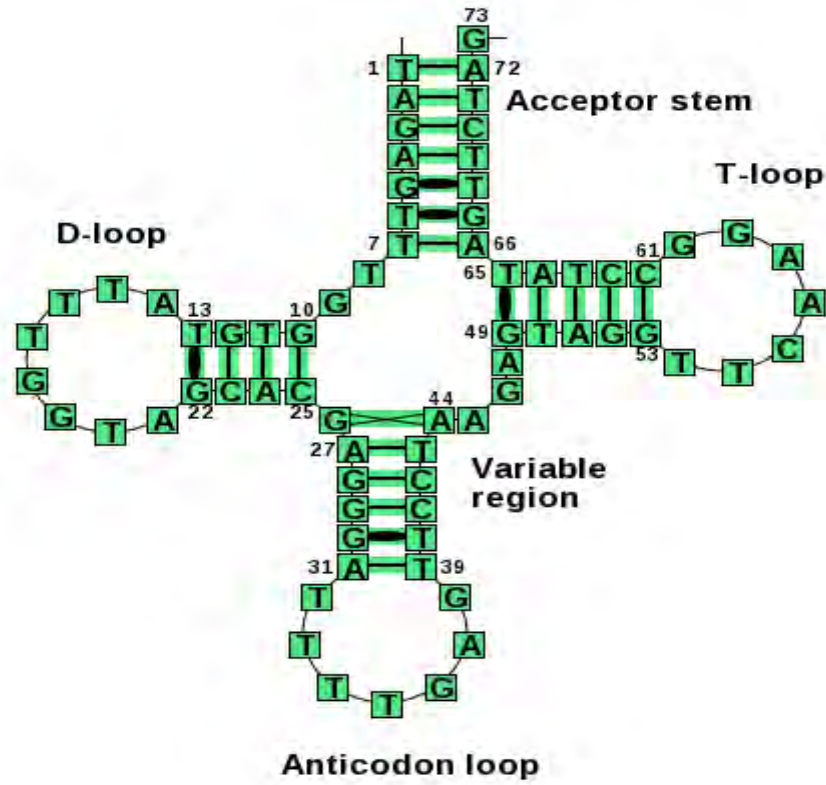
### **1.11 Αντικείμενο μελέτης**

Στην παρούσα μελέτη μελετήθηκε τμήμα του μιτοχονδριακού DNA, συνολικού μεγέθους 400 βάσεων, σε πληθυσμούς *Lepus europeaus*:

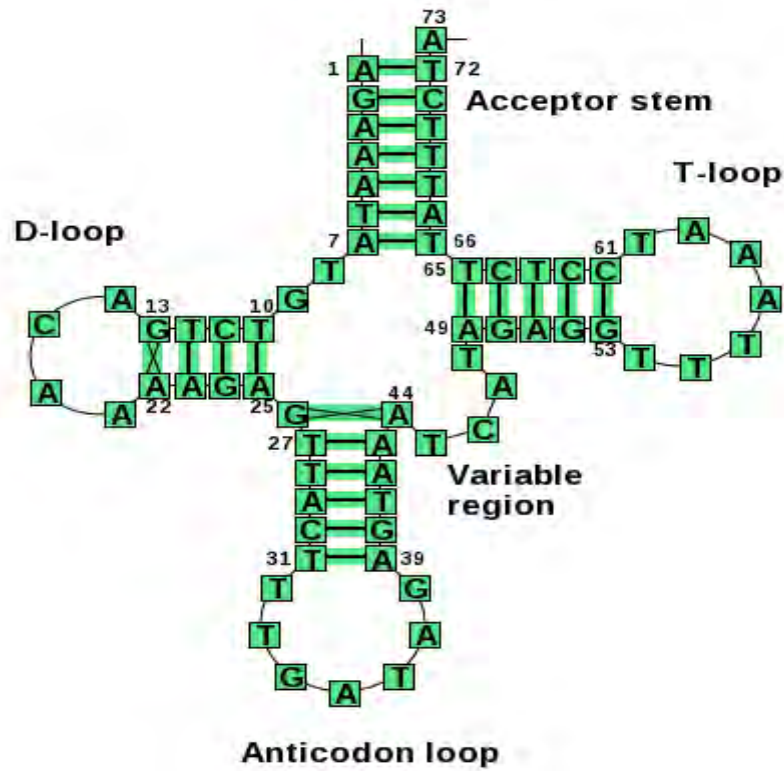
- τμήμα του γονιδίου ND1
- τα γονίδια που κωδικοποιούν για τα εξής tRNA :
  - tRNA ile (εικόνα 8)
  - tRNA Gln(εικόνα 7)
  - tRNA Met(εικόνα 9)
- τμήμα του γονιδίου ND2

Οι πληθυσμοί προέρχονταν από Τουρκία, Ελλάδα, Κύπρο και Ευρώπη.

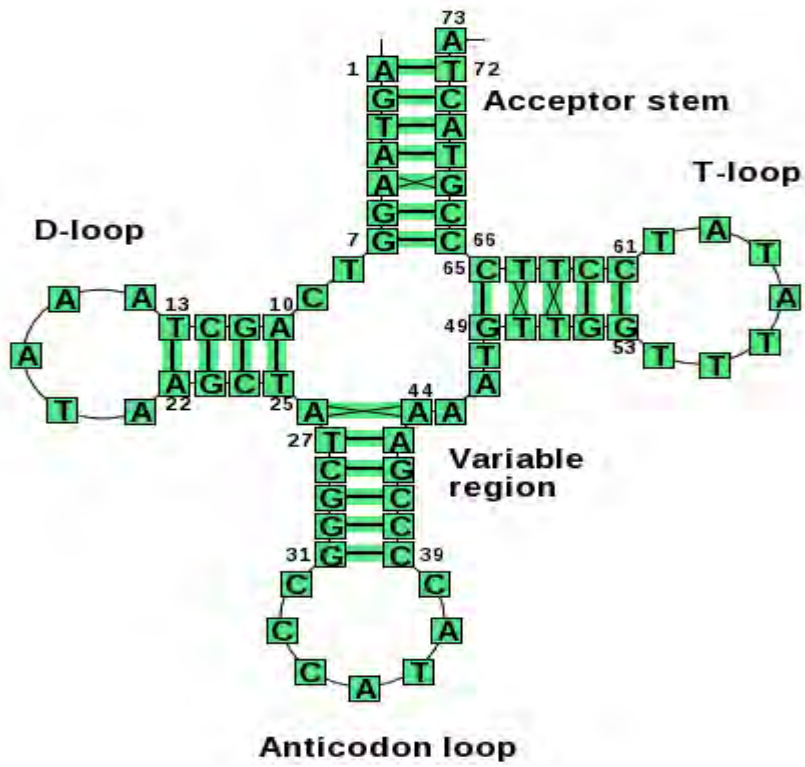
Στόχος της μελέτης ήταν ο προσδιορισμός μεταλλάξεων στα γονίδια που αναφέρθηκαν και η συσχέτιση τους με φαινόμενα συμπροσαρμογής πυρηνικών και μιτοχονδριακών γονιδίων. Πραγματοποιήθηκε αλληλούχηση ώστε να αναγνωριστούν οι πολυμορφισμοί στα t-RNA και αν επηρεάζουν τη σύνδεση των aaRS κατά την πρωτεϊνοσύνθεση στο μιτοχόνδριο.



Εικόνα 6:tRNA-Gln του *Lepus europaeus*



Εικόνα 7:tRNA-Ile του *Lepus europaeus*



Εικόνα 8:tRNA-Met του *Lepus europaeus*

## 2<sup>ο</sup> ΚΕΦΑΛΑΙΟ

### ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

#### 2.1 Απομόνωση DNA

Ως πρώτο βήμα, απαραίτητο είναι να απομονωθεί από τα κύτταρα το γενετικό υλικό, το οποίο περιλαμβάνει το γενωμικό και το μιτοχονδριακό DNA. Συγκεκριμένα χρησιμοποιήθηκε το πρωτόκολλο TNES-Urea Buffer κάνοντας τις απαραίτητες τροποποιήσεις. Τα δείγματα τα οποία απομονώθηκαν παρουσιάζονται στον πίνακα 1.

Πίνακας 1: Δείγματα μελέτης

Δείγμα	Δείγμα
Greece 1	Turkey 4
Greece 2	Denmark 36
Greece 3	Denmark 25
Greece 4	Denmark 88
T2	Denmark 44
Greece 6	Denmark 79
Greece 7	Denmark 23
Greece 8	Turkey 11
Greece 9	Cyprus 28
T1	Cyprus 26
Germany 2	Turkey 9
France 9	Turkey 5
T3	Cyprus 21
Germany 25	Turkey 12
Germany 27	Turkey 14
France 3	Turkey 10
France 1	C3
Germany 4	Cyprus 28
Cyprus 38	Cyprus 20
Cyprus 8	Cyprus 19
Cyprus 26	Turkey 5
Cyprus 12	Cyprus 12
Cyprus 32	Turkey 8
Cyprus 39	Cyprus 29
Cyprus 35	Cyprus 22
Cyprus 36	Cyprus 25
Turkey 3	Cyprus 19
Cyprus 1	Cyprus 38

Για την απομόνωση χρησιμοποιήθηκε 50 έως 100 mg ιστού και η πειραματική διαδικασία που ακολουθήθηκε είναι η εξής:

1. Τοποθετούμε τον ιστό τεμαχισμένο σε σωλήνα erpendorf του 1,5ml και προσθέτουμε 650μl TNES-Urea buffer
2. Προσθέτουμε 10μl πρωτεϊνάσης K ώστε να γίνει η πέψη των πρωτεϊνών
3. Γίνεται επώαση στους 37°C για 24 ώρες
4. Προσθέτουμε 700 nl φαινόλη στα δείγματα και αναδεύουμε με την βοήθεια vortex έντονα
5. Φυγοκεντρούμε στις 13.000 rpm στους 4 °C για 10 min
6. Απομακρύνεται το υπερκείμενο από τα δείγματα και μεταφέρεται σε νέους σωλήνες .Έπειτα προστίθεται 350 nl φαινόλη και 350 nl χλωροφορμίου/ ισοαμλικής αλκοόλης (24:1).
7. Φυγοκεντρούμε στις 13.000 rpm στους 4 °C για 10 min
8. Απομακρύνεται το υπερκείμενο από τα δείγματα και μεταφέρεται σε νέους σωλήνες .Προστίθεται 700 nl χλωροφορμίου/ ισοαμλικής αλκοόλης (24:1).
9. Φυγοκεντρούμε στις 13.000 rpm στους 4 °C για 10 min
10. Απομακρύνεται το υπερκείμενο σε νέα erpendorf.
11. Ακολουθεί κατακρήμνιση DNA, προσθέτοντας (1/10)V CH<sub>3</sub>COONa και 2V 100% αιθανόλη.
12. Αφού ανακινηθεί ελαφρά, αποθηκεύεται στους -20 °C για 1h.
13. Φυγοκεντρούμε στις 13.000 rpm στους 4 °C για 20 min
14. Απομακρύνεται τα υπερκείμενο και έκπλυση με διάλυμα 100% αιθανόλης
15. Φυγοκεντρούμε στις 13.000 rpm στους 4 °C για 5 min
16. Απομακρύνεται η αιθανόλη ,ακολουθεί αναδιάλυση του DNA σε 100μl ddH<sub>2</sub>O και επώαση στους 55 ° C για 1h.



## **2.2 Προσδιορισμός της συνολικής ποσότητας στο δείγμα**

Μετά την απομόνωση του DNA πρέπει να προσδιοριστεί η ποσότητα του. Πραγματοποιείται είτε μέσω φωτομέτρησης ποσοτικά είτε μέσω ηλεκτροφόρησης σε πηκτή αγαρόζης 1% w/v. Για την φωτομέτρηση πραγματοποιείται αραιώση 1μl διαλύματος DNA σε 49μl ddH<sub>2</sub>O. Οι τιμές της απορρόφησης στα 260nm ανάγονται σε συγκέντρωση DNA η οποία ενδείκνυται να είναι πάνω από 150ng/μl.

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). Η αγαρόζη είναι ένας πολυσακχαρίτης που σχηματίζει πήκτωμα με πόρους που κυμαίνονται από 100 έως 300nm διάμετρο. Το μέγεθος εξαρτάται από τη συγκέντρωση της αγαρόζης στο πήκτωμα. Η συγκέντρωση της αγαρόζης καθορίζει συνεπώς, το εύρος των DNA θραυσμάτων που μπορούν να διαχωριστούν. Για να προετοιμαστεί ένα πήκτωμα αγαρόζης, αναμειγνύεται η κατάλληλη ποσότητα αγαρόζης στο διάλυμα ηλεκτροφόρησης, θερμαίνεται το μίγμα ώστε να διαλυθεί η αγαρόζη και το διάλυμα να γίνει διαυγές. Στη συνέχεια χύνεται σε κατάλληλη πλάκα, με ταινία γύρω-γύρω ώστε να σταθεροποιηθεί. Τοποθετείται χτενάκι ώστε να σχηματιστούν τα πηγαδάκια και να τοποθετηθούν τα δείγματα. Το πήκτωμα κρυώνει και στη συνέχεια γίνεται η ηλεκτροφόρηση μέσα σε buffer. Για να γίνει ορατή η ηλεκτροφόρηση χρησιμοποιείται χρωστική. Στο πείραμα χρησιμοποιείται το βρωμιούχο αιθίδιο το οποίο συνδέεται στο DNA και φωσφορίζει όταν ενεργοποιηθεί με υπεριώδη ακτινοβολία.

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

### Loading buffer 6x (10ml)

Bromophenol blue 1ml 1% w/v

TBE 20x 0,5ml

Glycerol 5ml

Πιο συγκεκριμένα στο πείραμα αρχικά παρασκευάζουμε διάλυμα TAE 1x αραιώνοντας το διάλυμα stock 50x (20ml σε τελικό όγκο 1lt). Ζυγίζουμε 0,3gr αгарόζης σε 35ml TAE 1x (τελική συγκέντρωση 1% w/v) με θέρμανση και προσθέτουμε 4ml βρωμιούχου αιθιδίου (EtBr 10mg/ml). Για την ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων απαιτείται η προσθήκη loading buffer σε αυτά. Σε 3ml δείγματος DNA προστίθενται 3ml loading buffer. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται στα 150 volts και ακολουθεί παρατήρηση της πηκτής σε λάμπα υπεριώδους φωτός. Αυτός είναι ο άλλος τρόπος ποιοτικού προσδιορισμού του DNA σε κάθε δείγμα.

### **2.3 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)**

Το τμήμα το οποίο μελετάμε αποτελείται από 400 βάσεις:

- 100 βάσεις του γονιδίου ND1
- tRNA ile
- tRNA Glu
- tRNA Met
- 100 βάσεις του γονιδίου ND2

Για την ενίσχυση του τμήματος πραγματοποιήθηκε αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης. Για την PCR χρησιμοποιήθηκαν οι παρακάτω ενισχυτές:

Εκκινητής	Αλληλουχία
<i>TMD fw</i>	5'-GCA TCA TAC CCT CGA TTC CG-3'
<i>TMD rv</i>	5'-ATC CAA TTC ATA TAG TTA GCC -3'

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

<i>Εκμαγείο DNA</i>	<i>~300 ng</i>
<i>dNTPs (10mM each)</i>	<i>1 μl</i>
<i>MgCl<sub>2</sub> (50mM)</i>	<i>1 μl</i>
<i>Buffer 10x</i>	<i>5 μl</i>
<i>Εκκινητής Fw 50pmol/μl</i>	<i>0,5 μl</i>
<i>Εκκινητής Rv 50pmol/μl</i>	<i>0,5 μl</i>
<i>Taq DNA Polymerase 5 U/μl</i>	<i>0,2 μl</i>
<i>ddH<sub>2</sub>O</i>	<i>εώς 50</i>
<b>Συνολικός όγκος</b>	<b>50 μl</b>

Οι συνθήκες PCR ώστε να ενισχυθεί το τμήμα του γονιδιώματος είναι :

Αρχική αποδιάταξη : 95° C για 4 min

Αποδιάταξη: 95° C για 15 sec

Υβριδοποίηση: 51° C για 25 sec

Επιμήκυνση: 72° C για 35 sec

Τελική επιμήκυνση: 72° C για 10 min

} 35 κύκλοι

Τα προϊόντα PCR ηλεκτροφορήθηκαν έπειτα σε πηκτή αγαρόζης.

## **2.4 Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης**

Όπως περιγράφηκε και παραπάνω η ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό τμημάτων DNA ανάλογα με το μέγεθος τους. Όταν ηλεκτροφορούνται προϊόντα PCR χρησιμοποιείται πηκτή αγαρόζης 2% w/v. Σε αντίθεση με την ηλεκτροφόρηση με DNA, σε αυτή την περίπτωση παρασκευάζουμε διάλυμα TAE 1x αραιώνοντας το διάλυμα stock 50x (20ml σε τελικό όγκο 1lt) και διαλύουμε 0,6gr αγαρόζης σε 35ml TAE 1x με θέρμανση και προσθέτουμε 4ml βρωμιούχου αιθιδίου (EtBr 10mg/ml). Σε 5μl PCR προϊόντος προστίθενται 3μl loading buffer. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται στα 100 volts και ακολουθεί παρατήρηση της πηκτής σε λάμπα υπεριώδους φωτός.

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

## **2.5 Ανάλυση πολυμορφισμού διαμόρφωσης μονόκλωνης αλυσίδας (Single Strand Conformation Polymorphism)**

Η ανάλυση SSCP βασίζεται στο διαχωρισμό μονόκλωνων τμημάτων DNA βάσει των διαφορών της κινητικότητάς τους στο πήκτωμα και έχει διακριτική ικανότητα ενός νουκλεοτιδίου. Η ανάλυση SSCP αποτελείται από τρία στάδια:

- αποδιάταξη των προϊόντων της PCR
- ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμίδης
- χρώση της πηκτής για την απεικόνιση των αποτελεσμάτων

### **Αποδιάταξη προϊόντων PCR**

Χρησιμοποιείται αποδιατακτικό διάλυμα το οποίο αποτελείται:

Denaturation buffer

95% formamide

0,05% Bromophenol blue

0,05% Xylene Cyanol

10mM NaOH

Σε 5μl προϊόντος PCR προστίθενται 10μl denaturation buffer και τα δείγματα επωάζονται για 7 min στους 99°C. Μετατρέπονται τα δίκλινα τμήματα DNA σε μονόκλινα και τοποθετούνται σε πάγο ώστε να διατηρηθούν σε αυτή την κατάσταση.

### **Παρασκευή πηκτής πολυακρυλαμίδης**

Για την παρασκευή των πηκτών πολυακρυλαμίδης χρησιμοποιήθηκαν τα ακόλουθα διαλύματα :

#### Διάλυμα ακρυλαμίδης 38,5% (200ml)

Ακρυλαμίδα 75gr

Bis-acrylamide 2gr

#### TBE 10x (2lt)

Tris Base 121 gr

Boric acid 81,5gr

EDTA 0,5M 80ml

#### Glycerol 50% v/v

#### APS 20% w/v

#### TEMED

Για την ηλεκτροφόρηση των προϊόντων PCR χρησιμοποιείται πηκτή πολυακρυλαμίδης που έχει πυκνότητα 8%.

Η σύσταση της πηκτής πολυακρυλαμίδης 8% είναι:

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

Μετά τον πολυμερισμό της ακρυλαμίδης, τα αποδιατεταγμένα δείγματα ηλεκτροφορούνται με χρήση ρυθμιστικού διαλύματος TBE 0,5x. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται με τάση 210 volts σε θερμοκρασία δωματίου για 20 ώρες περίπου.

Χρώση της πηκτής της πολυακρυλαμίδης με νιτρικό άργυρο(Silver Staining)

Για την εμφάνιση των αποτελεσμάτων της ηλεκτροφόρησης γίνεται χρώση των πηκτών με νιτρικό άργυρο. 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

ddH<sub>2</sub>O ως τα 400ml

### Διάλυμα 2 (200ml)

Διάλυμα AgNO<sub>3</sub> 1gr/ltr

### Διάλυμα 3 (200ml)

NaOH 3gr

NaBH<sub>4</sub> 0,01gr

Formaldehyde 1ml

ddH<sub>2</sub>O έως τα 200ml

1. 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 1min.
2. Προστίθεται το διάλυμα AgNO<sub>3</sub> και οι πηκτές αναδεύονται για 8min. Στη συνέχεια πραγματοποιούνται 2 πλύσεις με απεσταγμένο νερό, διάρκειας 1min η κάθε μια.
3. Προστίθεται το διάλυμα 3 και πραγματοποιείται ανάδευση μέχρι την εμφάνιση ορατών ζωνών στις πηκτές.

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. 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.

## ***2.6 Αλληλούχηση διαφορετικών προτύπων SSCP***

Για να κατασκευάσουμε φυλογενετικό δέντρο γονιδίων, είναι απαραίτητο να γνωρίζουμε τις αλληλουχίες των γονιδίων των ατόμων των οποίων ερευνούμε τις φυλογενετικές σχέσεις.

Γι' αυτό το λόγο, τα προϊόντα PCR που επιλέγονται, καθαρίζονται με τη χρήση κατάλληλου kit ώστε να αποφευχθούν παραπροϊόντα, και στη συνέχεια αποστέλλονται σε εταιρείες που πραγματοποιούν αλληλούχηση. Παραλαμβάνεται ένα χρωματογράφημα, μέσω του οποίου μπορούμε να εξάγουμε την επιθυμητή αλληλουχία και με προγράμματα βιοπληροφορικής να οδηγηθούμε σε ανάλυση των φυλογενετικών σχέσεων.

## ***2.7 Ανάλυση χρωματογραφημάτων αλληλούχησης***

Η ανάλυση αυτή πραγματοποιείται με τη χρήση του προγράμματος BioEdit. 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. Η αλληλούχηση γίνεται και για τις δυο αλυσίδες (με διαφορετικό εκκινητή για την κάθε μια) και στη συνέχεια οι δυο αλληλουχίες που προκύπτουν ομοπαρατίθενται με τη χρήση κατάλληλου προγράμματος βιοπληροφορικής (BioEdit) 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.

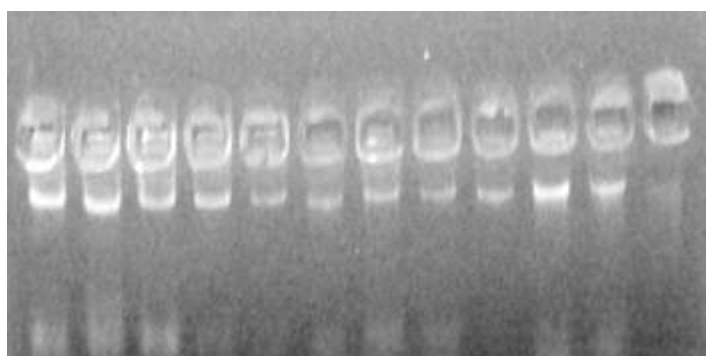


# 3<sup>ο</sup> ΚΕΦΑΛΑΙΟ

## ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

### *3.1 Απομόνωση DNA*

Η απομόνωση DNA παρείχε υψηλής ποιότητας DNA, με τιμές συγκέντρωσης κατά μέσο όρο 200ng/μl και τιμές  $A^{260}/A^{280}$  κοντά στο 2. 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.



Πυρηνικό DNA

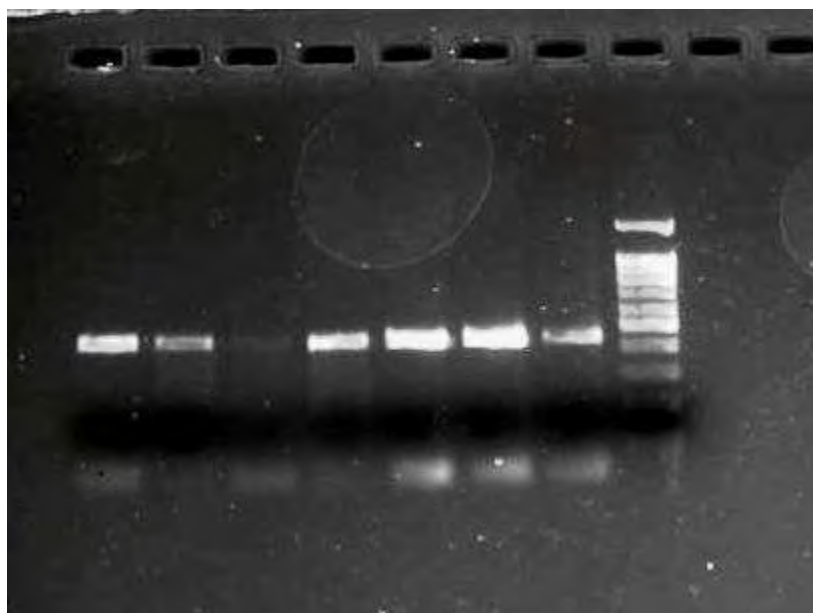
Μιτοχονδριακό DNA

Εικόνα 9: Ηλεκτροφόρηση απομονωμένου DNA

### *3.2 PCR*

Με τη χρήση των κατάλληλων εκκινήτων, ενισχύθηκε ένα τμήμα του μιτοχονδριακού γονιδιώματος. 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 400 ζευγών βάσεων, και φαινόταν να έχει το ίδιο μέγεθος για όλα τα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν στην ανάλυση.



Εικόνα 10: Ηλεκτροφόρηση προϊόντων PCR

### ***3.3 SSCP***

Τα προϊόντα PCR, ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή πολύ-ακρυλαμίδης 8%, σε θερμοκρασία δωματίου για 20 ώρες. Η εμφάνιση των ζωνώσεων με χρώση με νιτρικό άργυρο αποκάλυψε 9 διαφορετικά πρότυπα. Η κατάταξη των δειγμάτων που αναλύθηκαν στα 9 πρότυπα φαίνεται στον πίνακα που ακολουθεί. Δίπλα σε κάθε δείγμα σημειώνεται και η απλοομάδα στην οποία κατατάσσεται σύμφωνα με την κατάταξη των Stamatis et al., 2009.



Εικόνα 11: Ενδεικτικά πρότυπα ανάλυσης PCR-SSCP

Πρότυπα ανάλυσης SSCP των δειγμάτων

Δείγμα	Απλοομάδα	Πρότυπο	Δείγμα	Απλοομάδα	Πρότυπο
Greece 1	Gr	1	Turkey 4	An	8
Greece 2	Gr	1	Denmark 36	Eu	5
Greece 3	Gr	1	Denmark 25	Eu	5
Greece 4	Gr	1	Denmark 88	Eu	5
T2	Gr	1	Denmark 44	Eu	5
Greece 6	Gr	1	Denmark 79	Eu	5
Greece 7	Gr	1	Denmark 23	Eu	5
Greece 8	Gr	1	Turkey 11	An	4
Greece 9	Gr	1	Cyprus 28	An	4
T1	Eu	2	Cyprus 26	An	4
Germany 2	Eu	3	Turkey 9	An	4
France 9	Eu	3	Turkey 5	An	4
T3	Eu	3	Cyprus 21	An	6
Germany 25	Eu	3	Turkey 12	An	9
Germany 27	Eu	3	Turkey 14	An	9
France 3	Eu	3	Turkey 10	An	4
France 1	Eu	3	C3	An	4
Germany 4	Eu	3	Cyprus 28	An	4
Cyprus 38	An	4	Cyprus 20	An	4
Cyprus 8	An	4	Cyprus 19	An	4
Cyprus 26	An	8	Turkey 5	An	4
Cyprus 12	An	8	Cyprus 12	An	4
Cyprus 32	An	8	Turkey 8	An	4
Cyprus 39	An	8	Cyprus 29	An	4
Cyprus 35	An	8	Cyprus 22	An	4
Cyprus 36	An	8	Cyprus 25	An	4
Turkey 3	An	1	Cyprus 19	An	4
Cyprus 1	An	4	Cyprus 38	An	7

Στη συνέχεια, επιλέχθηκε 1 αντιπροσωπευτικό άτομο από κάθε πρότυπο για να σταλούν για αλληλούχηση. 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.

### 3.4. Αλληλούχηση

Για να υπάρχει μεγαλύτερη αξιοπιστία για τα αποτελέσματα της αλληλούχησης, χρησιμοποιήθηκαν και οι δυο εκκινητές 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 400bp.

Τα δείγματα που στάλθηκαν για αλληλούχηση ήταν:

Πρότυπο	Δείγμα
1	Greece 1
2	T2
3	Germany 2
4	C3
5	Denmark 88
6	Cyprus 21
7	Cyprus 38
8	Cyprus 32
9	Turkey 12

Όπως προαναφέρθηκε μελετήθηκε τμήμα του μιτοχονδριακού DNA σε πληθυσμούς *Lepus europeus* που αποτελείται από 400 βάσεις:

- τμήμα του γονιδίου ND1
- τα γονίδια που κωδικοποιούν για τα εξής tRNA :
  - tRNA ile
  - tRNA Glu
  - tRNA Met
- τμήμα του γονιδίου ND2

Οι αλληλουχίες που προέκυψαν από την ανάλυση για τα 5 διαφορετικά γονίδια είναι οι ακόλουθες :

1. tRNA-ile

```

      10      20      30      40      50      60
Germany_2  ATATGCTGTGACAAAAGAGTTACTTTGATAGAGTAAATCATAGAGGTTAAATCCTCTTATTTCTA
Cyprus_21  .....
Denmark_88 .....
Cyprus_32  .....
Cyprus_38  .....
C3        .....
Greece_1  .....
T1        .....
trk12     .....

```

2. tRNA-gln

```

      10      20      30      40      50      60      70
Germany_2  CTAGAACTATAGGCCTTGAACCTACTCTTAGGAACTCAAAATCCCTCGTGCTACCAAATACACCAAACCTTA
Cyprus_21  .....
Denmark_88 .....
Cyprus_32  .....
Cyprus_38  .....GA.....
C3        .....
Greece_1  .....
T1        .....
trk12     .....

```

3. tRNA-met

```

      10      20      30      40      50      60      70
Germany_2  TACACAGTAAGGTCAGCTAAATTAAGCTATCGGGCCCATACCCCGAAAAATGTTGGTTTATATCCCTCCCGTACTA
Cyprus_21  .....
Denmark_88 .....
Cyprus_32  .....
Cyprus_38  .....
C3        .....
Greece_1  .....
T1        .....
trk12     .....

```



## 4<sup>ο</sup> ΚΕΦΑΛΑΙΟ

### ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Το μιτοχόνδριο, παράγοντας το 95% της απαιτούμενης ενέργειας του οργανισμού, καθίσταται ως ένα από τα πιο θεμελιώδη οργανίδια του κυττάρου. Ως εκ τούτου, η εύρυθμη λειτουργία του είναι σημαντική για την επιβίωση του οργανισμού και την ικανότητά του να αναπαράγεται επιτυχώς. Ιδιαίτερα στα αρσενικά άτομα, των οποίων τα σπερματοζώαρια έχουν μεγάλες ενεργειακές απαιτήσεις για την κίνηση, η λειτουργία του μιτοχονδρίου είναι ζωτικής σημασίας και γιαυτό επηρεάζονται και περισσότερο από δυσλειτουργίες του μιτοχονδρίου. Όπως προαναφέρθηκε, για τις λειτουργίες αυτές είναι απαραίτητη η συνεργασία πρωτεϊνών και μορίων τόσο του μιτοχονδριακού όσο και του πυρηνικού DNA. Λόγω του γρήγορου ρυθμού εξέλιξης του μιτοχονδριακού DNA, ο οποίος είναι δέκα φορές ταχύτερος από το ρυθμό εξέλιξης του πυρηνικού, δημιουργούνται ταχύτερα μεταλλάξεις οι οποίες μπορεί να διαταράξουν την εύρυθμη συνεργασία τους. Γι' αυτό, έχει προταθεί το μοντέλο της συμπροσαρμογής, σύμφωνα με το οποίο γονίδια που συνεργάζονται τείνουν να εμφανίζουν παρόμοιους εξελικτικούς ρυθμούς.

Στην παρούσα μελέτη, αναλύθηκαν οι πολυμορφισμοί με τη μέθοδο της PCR-SSCP σε 3 μιτοχονδριακά γονίδια tRNA (Gln, Ile, Met) και οι παρακείμενες περιοχές τους που ανήκουν στα μιτοχονδριακά γονίδια ND1 και ND2, σε πληθυσμούς *Lepus europaeus*, που κατανομούνται και στις 3 φυλογεωγραφικές ομάδες κατανομής (Κεντρική Ευρωπαϊκή, Νότια Ανατολική Ευρωπαϊκή και Ανατολική).

Στα tRNA που μελετήθηκαν, βρέθηκε ένας πολυμορφισμός στο tRNA της Gln, ο οποίος εμφανίζεται σε ένα μοναδικό άτομο από την ομάδα της Ανατολής. Η μετάλλαξη που βρέθηκε αφορά την αντικατάσταση 2 βάσεων στις θέσεις 25 και 26 του tRNA (εικόνα 7). Με βάση τη δομή, οι θέσεις αυτές εντοπίζονται στην περιοχή ανάμεσα στο D-loop και τη θηλιά του αντικωδικονίου. Με βάση τη μελέτη των Jahn et al (1991), οι θέσεις του tRNA της γλουταμίνης που επηρεάζουν την αναγνώριση από την άμινο-άκυλο-tRNA συνθετάση της γλουταμίνης εντοπίζονται στη θηλιά του αντικωδικονίου και στο βρόγχο υποδοχής του αμινοξέος. Οπότε, θεωρούμε ότι οι μεταλλάξεις που εντοπίσαμε δεν επηρεάζουν την αναγνώριση του συγκεκριμένου tRNA από την αντίστοιχη συνθετάση. Παρόλα αυτά, η μετάλλαξη στη θέση 25 (25 C→T) δημιουργεί ένα ζεύγος G-T στη δίκλωνη περιοχή, το οποίο δε ταιριάζει με τους κανόνες συμπληρωματικότητας του Crick. Η συγκεκριμένη μετάλλαξη θα μπορούσε να μελετηθεί λειτουργικά, για να διαπιστωθεί αν επηρεάζει τη σταθερότητα του tRNA και την ικανότητα μεταφοράς του αμινοξέος κατά την πρωτεϊνοσύνθεση.

Στο τμήμα του γονιδίου ND1 που μελετήθηκε, εμφανίστηκαν 3 μεταλλάξεις, εκ των οποίων οι 2 εμφανίζουν σαφή γεωγραφική κατανομή (στα δείγματα της Ελλάδας και της Ευρώπης) ενώ η τρίτη δεν εμφανίζει αντίστοιχο πρότυπο. Αντίστοιχα, στο τμήμα του γονιδίου ND2 εμφανίζονται 4 μεταλλάξεις, όλες σε δείγματα που ταξινομούνται στην ανατολική φυλογεωγραφική ομάδα. Δυο εξ αυτών εμφανίζονται σε περισσότερα του ενός άτομα, οπότε θεωρούμε ότι είναι πληροφοριακές μεταλλάξεις. Παρόλα αυτά, τα τμήματα που μελετήθηκαν για τα γονίδια αυτά είναι ιδιαίτερα περιορισμένες σε σχέση με το συνολικό μέγεθος των δυο αυτών γονιδίων (954 ζεύγη βάσεων για το ND1 και 1044 για το ND2 αντίστοιχα) οπότε δεν είναι δυνατή η εξαγωγή συμπερασμάτων για την εξέλιξη και τη διαφοροποίηση αυτών των δυο γονιδίων. Μελλοντικά, ενδείκνυται η μελέτη ολόκληρης της κωδικής περιοχής και των δυο αυτών γονιδίων και η συσχέτιση των μεταλλάξεών τους με αντίστοιχες μεταλλάξεις στα πυρηνικά γονίδια της πρώτης υπομονάδας της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης. Επίσης, μελλοντικός στόχος της μελέτης είναι η ανάλυση όλων των μιτοχονδριακώς κωδικοποιούμενων μορίων tRNA στο εύρος κατανομής του *Lepus europaeus* για τον εντοπισμό μεταλλάξεων οι οποίες θα μπορούσαν να έχουν αντίκτυπο στην εύρυθμη λειτουργία της πρωτεϊνοσυνθετικής μηχανής του μιτοχονδρίου και δη στην βιωσιμότητα του κυττάρου και περαιτέρω του οργανισμού.



# 5<sup>ο</sup> ΚΕΦΑΛΑΙΟ

## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- A. Fender, A. Gaudry, F. Juhling, M. Sissler, C. Florenz (2012). Adaptation of aminoacylation identity rules to mammalian mitochondria. *Biochimie* 94 (2012) 1090-1097.
- Alberts, Bray, Hopkin, Johnson, Lewis, Raff, Roberts, Walter (2006) Βασικές αρχές κυτταρικής βιολογίας
- Berg J.M., Tymoczko J.L., Stryer L. *Biochemistry*
- Benjamin Lewin(2004) *GENES VIII*
- Carl R. Woese, Gary J. Olsen, Michael Ibba and Dieter Soll. Aminoacyl-tRNA Synthetases, the Genetic Code, and the Evolutionary Process. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* Mar. 2000, p. 202–236
- C. Meiklejohn, M Homebeck, M Siddiq, D. Abt, D. Rand, K. Montooth.(2013) An Incompatibility between a Mitochondrial tRNA and Its Nuclear-Encoded tRNA Synthetase Compromises Development and Fitness in *Drosophila*. *PLOS Genetics* ,Volume 9, e1003238
- Christopher K. Ellison and Ronald S. Burton(2007). Interpopulation hybrid breakdown maps to the mitochondrial genome. *Evolution* 2007 doi:10.1111/j.1558-5646.2007.00305.x
- Feifei Zhang and Richard E. Broughton (2013). Mitochondrial–Nuclear Interactions: Compensatory Evolution or Variable Functional Constraint among Vertebrate Oxidative Phosphorylation Genes?. *Genome Biology and Evolution* 5(10):1781–1791.
- Felipe S. Barreto and Ronald S. Burton(2013).Elevated oxidative damage is correlated with reduced fitness in interpopulation hybrids of a marine copepod. *Royal Society Publishing* 280 :20131521
- Martina Jahn , M. John Rogers and Dieter Soll (1991). Anticodon and acceptor stem nucleotides in tRNA-gln are major recognition elements for E.coli glutamyl-tRNA synthetase. *Letters to nature* Vol 352
- 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
- Ming-Wei Zhao<sup>1</sup>, Bin Zhu<sup>1</sup>, Rui Hao<sup>1</sup>, Min-Gang Xu<sup>1</sup>, Gilbert Eriani<sup>2</sup> and En-Duo Wang(2005). Leucyl-tRNA synthetase from the ancestral bacterium *Aquifex aeolicus* contains relics of synthetase evolution. *The EMBO Journal* (2005) 24, 1430–1439.
- Nicholas H. Barton,Denek E.G Briggs ,Jonathann a, Eisen ,David B. Goldstein, Nipam H. Patel.(2013),Εξέλιξη.
- 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
- Steve Smith, Christopher Turbill and Franz Suchentrunk.(2010). Introducing mother’s curse: low male fertility associated with an imported mtDNA haplotype in a captive colony of brown hares. *Molecular ecology* (2010) 19, 36–43
- 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
- Yuri I. Wolf, L. Aravind, Nick V. Grishin, and Eugene V. Koonin(1999). Evolution of Aminoacyl-tRNA Synthetases—Analysis of Unique Domain Architectures and Phylogenetic Trees Reveals a Complex History of Horizontal Gene Transfer Events. *Genome Research* 9:689–710
- Αλαχιώτης Σ., Εισαγωγή στην Εξέλιξη (2007)
- Μαργαρίτης Λ., Βιολογία Κυττάρου (2008)

