

## ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

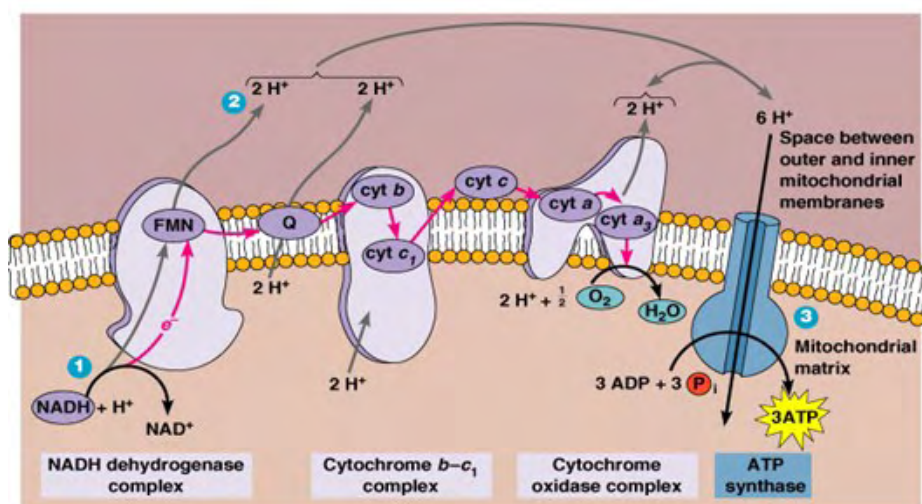
Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών σπουδών του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας

«ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ – ΜΟΡΙΑΚΗ ΓΕΝΕΤΙΚΗ, ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ»

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΙ ΚΑΙ ΣΥΝΕΞΕΛΙΞΗ ΠΥΡΗΝΙΚΩΝ ΚΑΙ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΩΝ  
ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΤΗΣ ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗΣ ΦΩΣΦΟΡΥΛΙΩΣΗΣ (ΟΧΡΗΟΣ) ΣΤΟΝ ΑΝΘΡΩΠΟ

Μαρία Μαρκαντώνη



Λάρισα, 2016

Πολυμορφισμοί και συνεξέλιξη πυρηνικών και μιτοχονδριακών γονιδίων της οξειδωτικής  
φωσφορυλίωσης (OXPHOS) στον άνθρωπο

Polymorphisms and co- evolution of nuclear and mitochondrial genes of oxidative phosphorylation  
(OXPHOS) in humans.

### ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

ΜΑΜΟΥΡΗΣ ΖΗΣΗΣ (ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ)	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
ΨΑΡΡΑ ΑΝΝΑ- ΜΑΡΙΑ	Επίκουρος καθηγήτρια Βιοχημείας του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

## Ευχαριστίες:

Η παρούσα μεταπτυχιακή διατριβή πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Γενετικής, Συγκριτικής και Εξελικτικής Βιολογίας του Τμήματος Βιοχημείας και 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. Μούτου Αικατερίνη και την Επίκουρο Καθηγήτρια Βιοχημείας, κ. Ψαρρά Άννα – Μαρία για τη συμμετοχή τους στην τριμελή επιτροπή. Ακόμη θα ήθελα να ευχαριστήσω τον υποψήφιο Διδάκτορα Θέμη Γιαννούλη για την πολύτιμη βοήθεια του και τις συμβουλές του, καθώς και τον υποψήφιο Διδάκτορα Τσιπουρλιάνο Ανδρέα για τις πολύ χρήσιμες συμβουλές αλλά και την βοήθεια του στην ολοκλήρωση της διατριβής. Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Κώστα Σταμάτη, την Κωνσταντίνα Σαρρή και τα υπόλοιπα μέλη του εργαστηρίου για το ευχάριστο κλίμα.

## Περίληψη

Η παρούσα μελέτη αφορά στους πολυμορφισμούς και την συμπροσαρμογή των πυρηνικών και μιτοχονδριακών γονιδίων της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης στον άνθρωπο με σκοπό να γίνει η μέτρηση της συμπροσαρμογής αλλά και ο ρυθμός εξέλιξης τους. Τα δεδομένα προέκυψαν από αναζήτηση σε βάσεις δεδομένων με μέτρηση των μεταλλάξεων (συνωνύμων και παρανοηματικών) για κάθε ένα γονίδιο αλλά και συνολικά για κάθε υπομονάδα, την εύρεση του ρυθμού εμφάνισης μεταλλάξεων και σύγκριση των ποσοστών αυτών με τα ποσοστά γονιδίων που συμμετέχουν στην γλυκόλυση, στον κύκλο Krebs, καθώς και γονίδια συντήρησης (housekeeping). Βρέθηκε πως σε επίπεδο γονιδίων, υπήρχαν πολλές περισσότερες παρανοηματικές μεταλλάξεις από ότι συνώνυμες και το ίδιο βρέθηκε και σε επίπεδο συνολικά των υπομονάδων, όπως και για όλες τις υπόλοιπες ομάδες γονιδίων που αναλύθηκαν και συμμετέχουν στην γλυκόλυση, στον κύκλο Krebs, αλλά και τα γονίδια συντήρησης (housekeeping). Αυτό ίσως οφείλεται στο ότι τα επιβλαβή αλληλόμορφα (στην περίπτωση μας αλληλόμορφα με παρανοηματικές μεταλλάξεις) έχουν προκύψει σχετικά πρόσφατα στην εξελικτική πορεία και, εφόσον η επιλογή δεν έχει προλάβει να δράσει επάνω τους, είναι περισσότερα από ότι τα μη επιβλαβή (συνώνυμες μεταλλάξεις). Για το σύμπλοκο I πραγματοποιήθηκε περαιτέρω διαχωρισμός των γονιδίων της σε γονίδια πυρήνα/βοηθητικά (core/supernumerary) αλλά και με βάση το βραχίονα (Ia) που βρίσκεται στη μήτρα και τους βραχίονες (Iβ, Iγ) που βρίσκονται στη μεμβράνη. Τα αποτελέσματα έδειξαν πως δεν επιβεβαιώνεται η υπόθεση της συμπροσαρμογής καθώς οι βραχίονες Iβ και Iγ εμφανίζουν μικρότερο ποσοστό εμφάνισης μεταλλάξεων από ότι ο βραχίονας Ia. Ο διαχωρισμός με βάση γονίδια του πυρήνα (core) και βοηθητικών (supernumerary) έδειξε την ύπαρξη μεγαλύτερου ποσοστού μεταλλάξεων στον πυρήνα παρά στα βοηθητικά γονίδια. Αυτό θα μπορούσε να εξηγηθεί καθώς ο πυρήνας του συμπλόκου και τα γονίδια του έχουν εμφανιστεί σε αρχαιότερους εξελικτικά οργανισμούς σε σύγκριση με τα βοηθητικά γονίδια τα οποία έκαναν την εμφάνιση τους πιο πρόσφατα στην εξελικτική πορεία. Τα σύμπλοκα II και III παρουσιάζουν επίσης μεγάλο ποσοστό μεταλλάξεων σε σύγκριση με το αναμενόμενο και ιδιαιτέρως παρανοηματικών καθώς και στα σύμπλοκα IV & V με το V να παρουσιάζει επίσης αυξημένο ποσοστό εμφάνισης παρανοηματικών μεταλλάξεων, αν και χαμηλότερο από τα υπόλοιπα σύμπλοκα. Τέλος, πραγματοποιήθηκε πληθυσμιακή ανάλυση όλων των κοινών (MAF>0,01) σημειακών μεταλλάξεων ανάλογα με την κατανομή τους στους πέντε μεγάλους πληθυσμούς και βρέθηκαν τα SNPs με τη μεγαλύτερη διαφοροποίηση για κάθε σύμπλοκο.

## Abstract

This study contains the analysis of polymorphisms and co-adaptation of nuclear and mitochondrial genes of Oxidative phosphorylation in humans, in order to measure the effect of

their co-adaptation and evolution. All of the data were obtained from databases by counting mutations (synonymous and missense) for each gene and in total for each complex and calculating the mutation incidence rate and comparing those rates with those of genes from the Krebs cycle, glycolysis and housekeeping genes. It was found that in gene level, there were many more missense mutations than synonymous ones and this finding occurred for all complexes and all of the other gene groups analyzed (Krebs, glycolysis, housekeeping). This may be due to that deleterious alleles (in our case alleles with missense mutations) have emerged relatively recently in the evolutionary process and since selection has not had the time to act upon them, are many more than the non-harmful (synonymous mutations). Concerning complex I, a further separation was conducted for its genes, in core and supernumerary genes and also based on the matrix arm ( $I\alpha$ ) and the membrane arms ( $I\beta$ ,  $I\gamma$ ). Results showed that co-adaptation is not confirmed because the membrane arms exhibit a lower mutation incidence rate than the matrix arm. Separation based on the core and supernumerary genes showed the existence of a higher mutation incidence rate in the core genes than in the supernumerary genes. This could be explained because the core of the complex and its genes have appeared in more evolutionarily ancient organisms compared to the supernumerary genes that have appeared more recently in evolution. Complexes II and III also exhibit a higher mutation rate compared to the expected, particularly missense mutations and also complexes IV and V, with complex V exhibiting a high mutation incidence rate, although lower than the other complexes. Finally, a population analysis of all common ( $MAF > 0,01$ ) point mutations was conducted according to their distribution in five large populations and the most diverse SNPs for each complex were found.

## Περιεχόμενα

Εισαγωγή .....	8
Το μιτοχόνδριο .....	8
Το μιτοχονδριακό DNA (mtDNA).....	9
Η οξειδωτική φωσφορυλίωση (ΟΧΡΗΟΣ).....	10
Συν-προσαρμογή .....	15
ΒΑΣΕΙΣ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ .....	18
Το μιτοχονδριακό DNA και η υπογονιμότητα στους άνδρες.....	20
ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	23
ΠΛΗΘΥΣΜΙΑΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ.....	26
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ .....	44
ΣΥΖΗΤΗΣΗ .....	116
Βιβλιογραφία .....	121

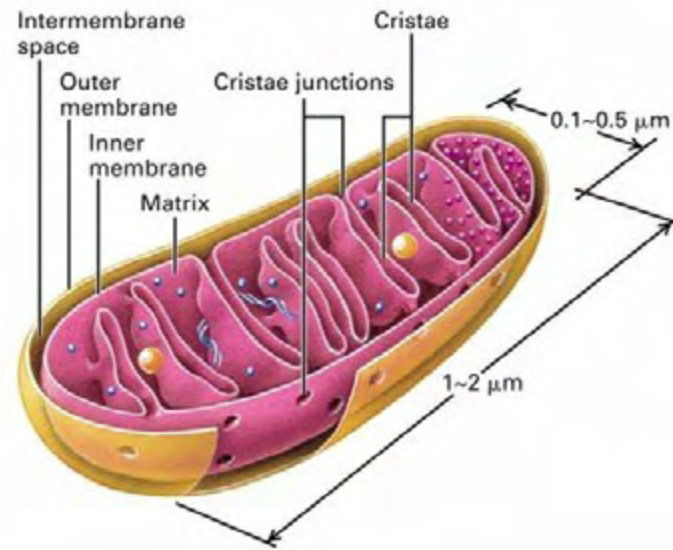
## Εισαγωγή

### Το μιτοχόνδριο

Τα μιτοχόνδρια είναι υποκυτταρικά τα οργανίδια τα οποία παράγουν ενέργεια για τα ευκαρυωτικά κύτταρα με τη μορφή της τριφωσφορικής αδενοσίνης (ATP) . Μέσω μιας διαδικασίας που ονομάζεται οξειδωτική φωσφορυλίωση (OXPHOS). Οι πρώτες αναφορές; όσον αφορά στα μιτοχόνδρια έγιναν το 1840. Το 1894 ο Richard Altmann τα ταυτοποίησε ως κυτταρικά οργανίδια και τα ονόμασε βιοβλάστες ενώ ο όρος μιτοχόνδρια καθιερώθηκε το 1898 από τον Carl Benda (Ernster et al 1981). Η δομή του μιτοχονδρίου έγινε γνωστή σε λεπτομέρεια όμως πολλά χρόνια αργότερα και επέτρεψε την κατανόηση πολλών βιοχημικών μηχανισμών. Τα μιτοχόνδρια δεν έχουν σταθερό σχήμα. Αυτό μπορεί να είναι κυκλικό, ελλειψοειδές, κυλινδρικό ή επίμηκες και φαίνεται να εξαρτάται, όπως και το μέγεθος, από τις λειτουργικές ανάγκες του κυττάρου. Οι διαστάσεις μπορεί να διαφέρουν από 0,3-1μm σε διάμετρο και 1-10μm σε μήκος.

Αποτελούνται από μια εξωτερική μεμβράνη και μια εσωτερική, η οποία διαθέτει πολυάριθμες πτυχώσεις που ονομάζονται ακρολοφίες. Οι δυο μεμβράνες έχουν διαφορετική σύσταση και επιτελούν διαφορετικές λειτουργίες. Η εξωτερική μεμβράνη περιέχει 52% λιπίδια και 48% πρωτεΐνες, παρουσιάζει κρυσταλλική κατανομή των συστατικών της και θεωρείται διαπερατή στα περισσότερα μικρά μόρια ( $MB < 10,000$  Dalton) και ιόντα καθώς φέρει πρωτεΐνες, τις πορίνες που σχηματίζουν υδρόφιλους διαύλους (Μαργαρίτης et al, 2008, Stryer et al, 2007). Η εσωτερική μεμβράνη περιέχει 24% λιπίδια και 76% πρωτεΐνες, περικλείει μια κοκκώδη περιοχή, τη μιτοχονδριακή μήτρα και είναι σχετικά αδιαπέραστη από πολικά μόρια για αυτό μια μεγάλη οικογένεια μεταφορέων προάγει τη μετατόπιση μορίων όπως η ATP, το πυροσταφυλικό και το κιτρικό διαμέσου της μεμβράνης (Stryer, 2007). Στην εσωτερική μεμβράνη έχουν εντοπιστεί ένζυμα του κύκλου του Krebs, της αναπνευστικής αλυσίδας και της σύνθεσης ATP. Το εσωτερικό του μιτοχονδρίου ονομάζεται μήτρα και περιέχει ποικίλα ένζυμα, DNA, RNA και ριβοσώματα. Τα παραγόμενα μόρια ATP (περίπου 10.000.000.000) συμβάλλουν σε πολλές λειτουργίες του κυττάρου, που είναι απαραίτητες για την επιβίωση του, όπως σύνθεση μακρομορίων, μεταφορά ιόντων, ενζυμική κατάλυση κ.ά. (Μαργαρίτης et al. 2008). Τα μιτοχόνδρια είναι ημιαυτόνομα οργανίδια και υπάρχουν σε συμβιωτική σχέση με το κύτταρο. Η ενδοσυμβίωση θεωρητικά συνέβη όταν ένας ελεύθερος οργανισμός ικανός να διεξάγει οξειδωτική φωσφορυλίωση εγκλωπώθηκε από ένα άλλο κύτταρο. Περιέχουν το δικό τους DNA, που κωδικοποιεί για ποικιλία πρωτεϊνών και μορίων RNA, αλλά περιέχουν επίσης και πολλές πρωτεΐνες που κωδικοποιούνται από πυρηνικό DNA. Η δομή των μιτοχονδρίων και η διαδικασία της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης εξαρτώνται και από τις δύο ομάδες γονιδίων (μιτοχονδριακών και πυρηνικών)

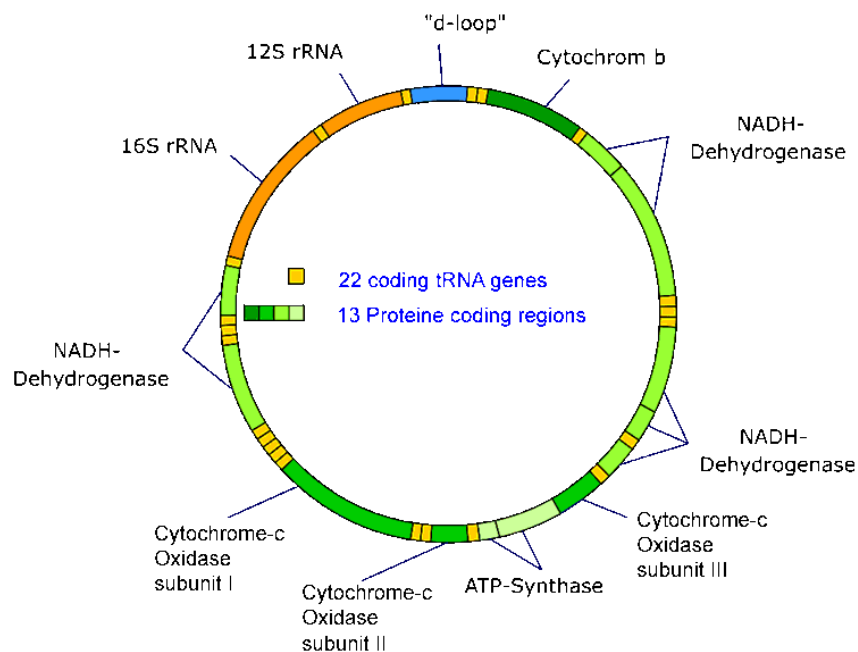




Εικόνα 1. Το μιτοχόνδριο

### Το μιτοχονδριακό DNA (mtDNA)

Τα μιτοχόνδρια διαθέτουν το δικό τους κυκλικό γονιδίωμα το οποίο ποικίλλει σε μέγεθος από 6000 π.χ.) έως και 300000 (π.χ.) ζεύγη βάσεων.



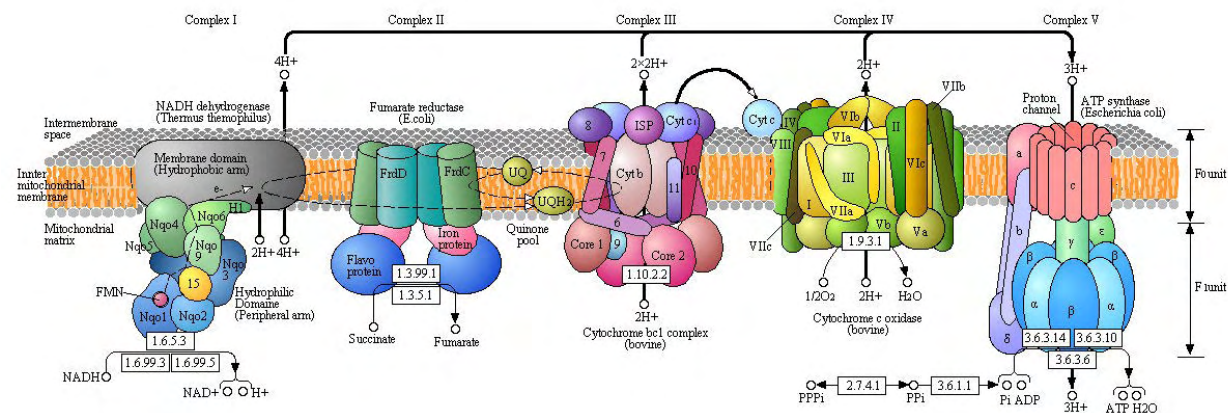
Εικόνα 2. Το μιτοχονδριακό γονιδίωμα

Το mtDNA κληρονομείται, κυρίως, μόνο από τη μητέρα αφού από τους δυο γαμέτες, μόνο τα μιτοχόνδρια του ωαρίου χρησιμοποιούνται κατά την εμβρυογένεση (Alberts et al. 2006). Έχουν καταγραφεί, ωστόσο, και περιπτώσεις πατρικής κληρονομής mtDNA. (M Schwartz et al 2002) Το

mtDNA έχει βρεθεί σε πολλά ίδια αντίγραφα (5 έως 10) σε κάθε μιτοχόνδριο ή ακόμη και σε διαφορετικά μεγέθη. Κωδικοποιεί για 37 γονίδια: 13 για τις υπομονάδες των αναπνευστικών συμπλόκων I, III, IV και V, 22 για το μιτοχονδριακό tRNA και 2 για rRNA (Chan et al 2006). Το μιτοχονδριακό γονιδίωμα δεν επαρκεί για τις λειτουργικές και δομικές ανάγκες των οργανιδίων οπότε τα μιτοχόνδρια δεν διαθέτουν πλήρη αυτονομία. Έτσι, προκειμένου να συνθέσουν όλα τα απαραίτητα συστατικά και να επιτελέσουν το ρόλο τους, χρειάζονται και πληροφορίες που υπάρχουν στο πυρηνικό DNA. Η έλλειψη του γενετικού ανασυνδυασμού στο μιτοχονδριακό DNA το καθιστά μια χρήσιμη πηγή πληροφορίας για τους ερευνητές που ασχολούνται με πληθυσμιακή γενετική και εξελικτική βιολογία. Το μιτοχονδριακό DNA κληρονομείται ως μια μονάδα, ή απλότυπος και έτσι οι σχέσεις μεταξύ του μιτοχονδριακού DNA από διαφορετικά άτομα μπορεί να παρουσιαστεί ως γονιδιακό δένδρο. Το mtDNA έχει μικρό μέγεθος και μεγάλο αριθμό αντικαταστάσεων των βάσεων του, που κυμαίνεται σε περίπου  $6 \times 10^{-8}$  ανά θέση ανά έτος. Αυτός ο ρυθμός είναι δεκαπλάσιος από το μέσο ρυθμό αντικαταστάσεων σε πυρηνικά γονίδια και οφείλεται σε πολλούς παράγοντες. Κάποιοι από αυτούς είναι: η χαμηλή αξιοπιστία του μηχανισμού αντιγραφής του DNA, η έλλειψη μηχανισμών επιδιόρθωσης, η μεγάλη συγκέντρωση μεταλλαξιγόνων όπως πχ οι ελεύθερες ρίζες οξυγόνου στο μιτοχόνδριο, καθώς επίσης και η ασθενέστερη επιλεκτική πίεση της φυσικής επιλογής, η οποία για τα μιτοχόνδρια δεν είναι εξίσου έντονη όσο στον πυρήνα λόγω του πλήθους των αντιγράφων του μιτοχονδριακού γονιδιώματος.

### Η οξειδωτική φωσφορυλίωση (OXPHOS)

Η οξειδωτική φωσφορυλίωση (OXPHOS) είναι η μεταβολική διαδικασία κατά την οποία τα μιτοχόνδρια χρησιμοποιούν τη δομή τους, ένζυμα και ενέργεια η οποία απελευθερώνεται από την οξείδωση θρεπτικών για το τελικό σχηματισμό ATP. Κατά τη διάρκεια της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης, ηλεκτρόνια μεταφέρονται από δότες ηλεκτρονίων, όπως το NADH ή το FADH<sub>2</sub> σε δέκτες όπως το οξυγόνο, μέσω αντιδράσεων οξειδοαναγωγής. Αυτές οι αντιδράσεις απελευθερώνουν ενέργεια η οποία χρησιμοποιείται για να παραχθεί ATP. Στους ευκαρυώτες, αυτές οι αντιδράσεις πραγματοποιούνται από μια σειρά πρωτεϊνικών συμπλόκων στην εσωτερική μεμβράνη του μιτοχονδρίου ενώ στους προκαρυώτες αυτές οι πρωτεΐνες βρίσκονται στο ενδοκυτταρικό διάστημα. Αυτά τα συνδεδεμένα σύνολα πρωτεϊνών ονομάζονται αλυσίδες μεταφοράς ηλεκτρονίων και στους ευκαρυώτες εμπλέκονται 5 τέτοια πρωτεϊνικά σύμπλοκα τα οποία θα αναλυθούν παρακάτω.



Εικόνα 3. Τα σύμπλοκα της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης

Η διαλεύκανση του μηχανισμού της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης υπήρξε μια από τις μεγαλύτερες προκλήσεις της βιοχημείας. Η ροή των ηλεκτρονίων από NADH/FADH<sub>2</sub> στο O<sub>2</sub> μέσω πρωτεϊνικών συμπλόκων στην εσωτερική μεμβράνη, οδηγεί στην άντληση πρωτονίων από τη μήτρα. Η προκύπτουσα ανισοκατανομή πρωτονίων μεταξύ των δύο πλευρών της εσωτερικής μεμβράνης δημιουργεί μια βαθμίδωση pH και μια διαμεμβρανική διαφορά δυναμικού ώστε να παραχθεί μια πρωτονιοκίνητη δύναμη. Η σύνθεση του ATP λαμβάνει χώρα όταν τα πρωτόνια ρέουν προς τη μήτρα δια μέσου ενός ενζυμικού συμπλόκου. Άρα η οξείδωση καύσιμων μορίων και η φωσφορυλίωση του ADP είναι συζευγμένες μέσω μιας βαθμίδωσης συγκέντρωσης πρωτονίων μεταξύ των δύο πλευρών της εσωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης. Πιο συγκεκριμένα, η οξείδωση λιπαρών οξέων και η μετατροπή του πυροσταφυλικού οξέος, προωθούν τη παραγωγή του ακετυλο-συνενζύμου Α το οποίο και εισάγεται στον κύκλο του Krebs και από εκεί σχηματίζονται τρία μόρια NADH, ένα FADH<sub>2</sub> και ένα μόριο GTP. Με τη σειρά τους τα NADH/FADH<sub>2</sub> μεταφέρουν ηλεκτρόνια υψηλής ενέργειας από τα οποία προκύπτει η ηλεκτρονιοκίνητη δύναμη που μετατρέπεται σε πρωτονιοκίνητη και η τελευταία με τη σειρά της σε δυναμικό μεταφοράς φωσφορικής ομάδας. Η μετατροπή της ηλεκτρονιοκίνητης δύναμης σε πρωτονιοκίνητη επιτελείται από τρεις ηλεκτρονιοκίνητες αντλίες, την οξειδοαναγωγάση του ζεύγους NADH- συνενζύμου Q, την οξειδοαναγωγάση του ζεύγους συνενζύμου Q- κυτοχρώματος c και την οξειδάση του κυτοχρώματος c. Η τελική φάση της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης επιτελείται από τη συνθάση του ATP και η σύνθεση ωθείται από τη ροή πρωτονίων πίσω προς τη μιτοχονδριακή μήτρα.

### Τα σύμπλοκα των πρωτεϊνών που παίρνουν μέρος στην ΟΧΡΗΟΣ

#### Σύμπλοκο Ι: Οξειδοαναγωγάση του ζεύγους NADH-Q

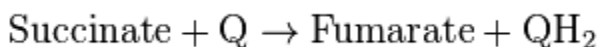
Το σύμπλοκο Ι είναι ένα τεράστιο ένζυμο, με το σύμπλοκο των θηλαστικών να διαθέτει 44 υπομονάδες και μάζα περίπου 1000kDa. Διαθέτει 44 γονίδια, από τα οποία τα 7 είναι μιτοχονδριακής προέλευσης ενώ τα υπόλοιπα 37 πυρηνικής προέλευσης. (Lenaz, et al. (2006). Η αντίδραση που καταλύεται από αυτό το ένζυμο είναι η οξείδωση του NADH από το συνένζυμο Q10 ή ουβικινόνη και η αντίδραση είναι η εξής:



Αρχικά, το NADH προσδένεται στο σύμπλοκο και προσφέρει δύο ηλεκτρόνια τα οποία εισέρχονται στο σύμπλοκο μέσω μιας προσθετικής ομάδας η οποία είναι συνδεδεμένη με το σύμπλοκο, το φλαβινο-μονονουκλεοτιδίο (FMN). Η προσθήκη ηλεκτρονίων στο FMN το ανάγει στη μορφή FMNH<sub>2</sub>. Στη συνέχεια τα ηλεκτρόνια μεταφέρονται μέσω μιας σειράς συμπλόκων σιδήρου-θείου, τα οποία είναι επίσης προσθετικές ομάδες. Καθώς τα ηλεκτρόνια διέρχονται μέσα από το σύμπλοκο, τέσσερα πρωτόνια αντλούνται από τη μήτρα προς το διαμεμβρανικό χώρο μέσω δομικών αλλαγών οι οποίες προκαλούν την πρωτεΐνη να προσδέσει πρωτόνια στην N πλευρά της μεμβράνης και να τα απελευθερώσει στην P πλευρά (Hirst et al 2010). Τέλος, τα ηλεκτρόνια μεταφέρονται από την αλυσίδα συμπλόκων σιδήρου-θείου σε ένα μόριο ουβικινόνης στη μεμβράνη. Η αναγωγή της ουβικινόνης επίσης συνεισφέρει στην δημιουργία μιας βαθμίδωσης πρωτονίων, καθώς δύο πρωτόνια αντλούνται από τη μήτρα για να μετατραπεί στην ανηγμένη μορφή της ουβικινόλης (QH<sub>2</sub>).

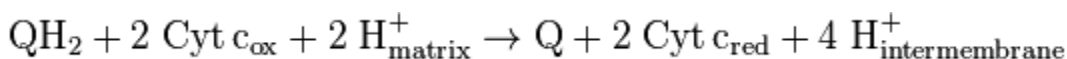
#### Σύμπλοκο II: ηλεκτρική αφυδρογονάση

Η ηλεκτρική αφυδρογονάση είναι το μόνο ένζυμο που είναι μέρος και του κύκλου του κιτρικού οξέως αλλά και της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων. Το δεύτερο σύμπλοκο αποτελείται από 4 υπομονάδες και περιέχει έναν προσδεδεμένο συμπαράγοντα (FAD), σύμπλοκα σιδήρου-θείου, και μία ομάδα αίμης (Yankovskaya V et al 2003). Είναι το μόνο σύμπλοκο της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης το οποίο δεν διαθέτει καθόλου μιτοχονδριακά γονίδια αλλά 4 πυρηνικής προέλευσης. Το σύμπλοκο οξειδώνει το ηλεκτρικό σε φουμαρικό και ανάγει την ουβικινόνη. Αυτή η αντίδραση απελευθερώνει λιγότερη ενέργεια από την οξείδωση του NADH και ως εκ τούτου, το σύμπλοκο II δεν μεταφέρει πρωτόνια κατά μήκος της μεμβράνης και δε συνεισφέρει στη βαθμίδωση πρωτονίων. Η αντίδραση είναι η εξής:



#### Σύμπλοκο III: οξειδοαναγωγή του ζεύγους Q-κυτοχρώματος c

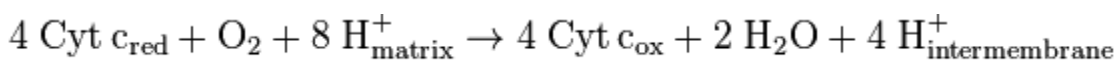
Η δεύτερη από τις τρεις αντλίες πρωτονίων της αναπνευστικής αλυσίδας είναι η οξειδοαναγωγή του ζεύγους Q-κυτοχρώματος c. Το ένζυμο είναι διμερές, με το κάθε κομμάτι να περιέχει 11 πρωτεϊνικές υπομονάδες, ένα σύμπλοκο σιδήρου-θείου και τρία κυτοχρώματα: ένα κυτόχρωμα c<sub>1</sub> και δύο κυτοχρώματα b. Το σύμπλοκο έχει συνολικά 10 γονίδια από τα οποία τα 9 είναι πυρηνικής προέλευσης και ένα μόνο μιτοχονδριακό. Τα κυτοχρώματα είναι πρωτεΐνες μεταφοράς ηλεκτρονίων που περιέχουν τουλάχιστον μια ομάδα αίμης. Η αντίδραση που καταλύεται από το σύμπλοκο III είναι η οξείδωση ενός μορίου ουβικινόλης και η αναγωγή δυο μορίων του κυτοχρώματος c. Αντίθετα με το συνένζυμο Q το οποίο διαθέτει δύο ηλεκτρόνια, το κυτόχρωμα c διαθέτει ένα ηλεκτρόνιο.



Στο πρώτο βήμα της αντίδρασης, το ένζυμο προσδένει τρία υποστρώματα, πρώτον το QH<sub>2</sub> το οποίο στη συνέχεια οξειδώνεται, με το ένα ηλεκτρόνιο να περνάει στο δεύτερο υπόστρωμα, το κυτόχρωμα c. τα δύο πρωτόνια που απελευθερώνονται από το QH<sub>2</sub> περνάνε στο διαμεμβρανικό χώρο. Το τρίτο υπόστρωμα είναι το Q, το οποίο δέχεται το δεύτερο ηλεκτρόνιο από το QH<sub>2</sub> και ανάγεται. Στο δεύτερο βήμα, ένα δεύτερο μόριο QH<sub>2</sub> προσδένεται και ξαναδίνει το πρώτο του ηλεκτρόνιο σε ένα κυτόχρωμα c. Καθώς το συνένζυμο Q ανάγεται σε ουβικινόλη στην εσωτερική πλευρά της μεμβράνης και οξειδώνεται σε ουβικινόνη στο άλλο μέρος της μεμβράνης, συμβαίνει η βαθμίδωση πρωτονίων λόγω μεταφοράς τους κατά μήκος της μεμβράνης (Schultz et al 2001).

#### Σύμπλοκο IV: οξειδάση κυτοχρώματος c

Η κυτοχρωμική οξειδάση είναι το τελευταίο πρωτεϊνικό σύμπλοκο στην αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων (Calhoun et al.1994). Το ένζυμο των θηλαστικών έχει μια πολύ περίπλοκη δομή και περιέχει 19 υπομονάδες, δύο ομάδες αίμης και πολλούς συμπαραγόντες μεταλλικών ιόντων. Από τα 19 γονίδια που διαθέτει, υπάρχουν 3 μιτοχονδριακής προέλευσης και τα υπόλοιπα 16 είναι πυρηνικά. Το ένζυμο πραγματοποιεί την τελευταία αντίδραση στην αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων και μεταφέρει ηλεκτρόνια στο οξυγόνο ενώ αντλεί πρωτόνια κατά μήκος της μεμβράνης (Yoshikawa et al 2006). Ο τελευταίος δέκτης ηλεκτρονίων, το O<sub>2</sub> ανάγεται σε νερό σε αυτό το βήμα. Η άντληση πρωτονίων και η κατανάλωση των πρωτονίων της μήτρας κατά την αναγωγή του οξυγόνου, συνεισφέρουν στην βαθμίδωση πρωτονίων. Η αντίδραση που καταλύεται είναι η οξείδωση του κυτοχρώματος c και η αναγωγή του οξυγόνου.



#### Σύμπλοκο V: ATP συνθάση

Η ATP συνθάση είναι το τελευταίο ένζυμο στο μονοπάτι της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης. Αυτό το ένζυμο βρίσκεται σε όλες τις μορφές ζωής και λειτουργεί με τον ίδιο τρόπο σε προκαρυώτες και ευκαρυώτες (Boyer et al 1997). Διαθέτει 19 γονίδια από τα οποία τα 17 είναι πυρηνικά και τα 2 μιτοχονδριακά. Χρησιμοποιεί την ενέργεια που είναι αποθηκευμένη στη βαθμίδωση πρωτονίων κατά μήκος της μεμβράνης για να οδηγήσει στη σύνθεση ATP από ADP και φωσφορικό (Pi). Η αντίδραση που καταλύεται είναι η εξής:



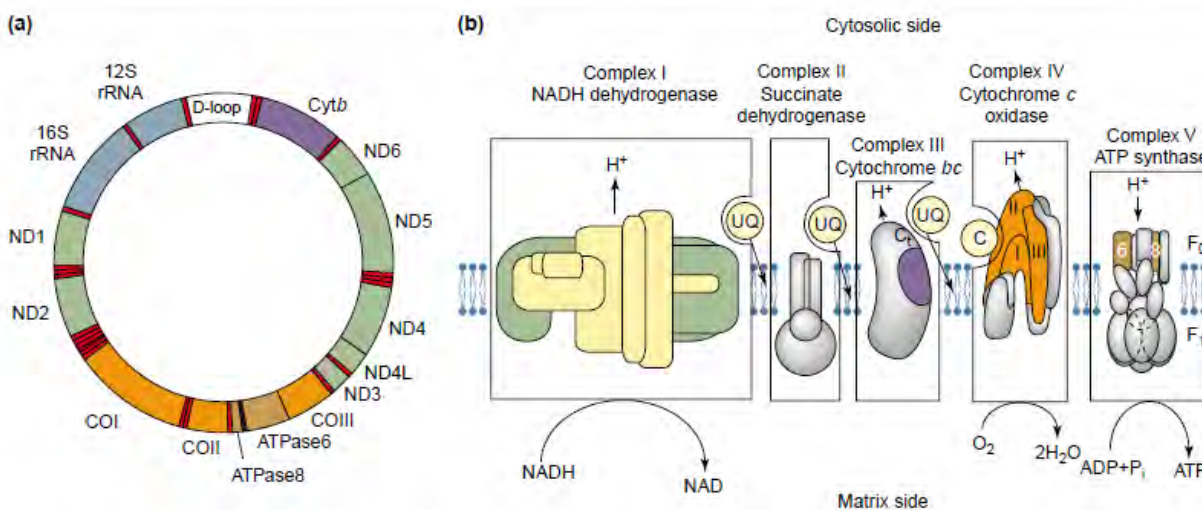
Η ATP συνθάση είναι ένα μεγάλο πρωτεϊνικό σύμπλοκο με σχήμα μανιταριού και περιέχει 19 υπομονάδες. Η περιοχή που βρίσκεται βυθισμένη στη μεμβράνη ονομάζεται Fo και περιέχει ένα δαχτυλίδι υπομονάδων και το κανάλι πρωτονίων. Η σφαίρα στην κορυφή του συμπλόκου ονομάζεται F1 και είναι η περιοχή της σύνθεσης του ATP. Η υπομονάδα F1 περιέχει 6 πρωτεΐνες δυο διαφορετικών

ειδών (τρεις α υπομονάδες και τρεις β υπομονάδες), ενώ η F<sub>o</sub> περιέχει μια πρωτεΐνη, τη γ υπομονάδα. Οι υπομονάδες α και β προσδένουν νουκλεοτίδια αλλά μόνο οι β υπομονάδες καταλύουν την αντίδραση της σύνθεσης ATP. Καθώς πρωτόνια διατρέχουν τη μεμβράνη μέσω του διαύλου στη βάση της συνθάσης, η υπομονάδα F<sub>1</sub> περιστρέφεται και έτσι γίνεται η σύνθεση του ATP. Πιο συγκεκριμένα, η αντίδραση της σύνθεσης του ATP συμπεριλαμβάνει τη συμμετοχή του ενεργού κέντρου μιας υπομονάδας β η οποία υπάρχει σε τρεις καταστάσεις. Στην «ανοιχτή» κατάσταση, το ADP και το φωσφορικό μπαίνουν στο ενεργό κέντρο. Η πρωτεΐνη στη συνέχεια κλείνει γύρω από τα μόρια αυτά και τα προσδένει χαλαρά. Στη συνέχεια το ένζυμο αλλάζει σχήμα ξανά και φέρνει τα μόρια ακόμη πιο κοντά και το ενεργό κέντρο προσδένει το παραγόμενο μόριο ATP με πολύ υψηλή συγγένεια. Τέλος, το ενεργό κέντρο γυρνάει και πάλι στην ανοιχτή κατάσταση, απελευθερώνοντας το ATP και προσδένοντας εκ νέου ADP και φωσφορικά.



## Συν-προσαρμογή

Η συνεργασία μιτοχονδριακού και πυρηνικού γονιδιώματος αντιπροσωπεύει μια από τις πιο αξιόλογες και θεμελιώδεις συμβιώσεις στην ιστορία της ζωής. Μιτοχονδριακά και πυρηνικά γονίδια αλληλεπιδρούν για να σχηματίσουν αρκετά από τα ενζυμικά σύμπλοκα της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης στους ευκαρυώτες. Ουσιαστικά, τα προϊόντα που κωδικοποιούνται από το μιτοχονδριακό γονιδίωμα συμμετέχουν σε μερικές από τις πιο ζωτικές διαδικασίες στους ζωντανούς οργανισμούς. Οι εκτενείς και στενές συσχετίσεις μεταξύ των μιτοχονδριακών και των πυρηνικών κωδικοποιούμενων πρωτεϊνών στην αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων είναι προφανείς.



Πιο αναλυτικά, η φυσική επιλογή θα ευνοεί την εξελικτική συμπροσαρμογή των πρωτεϊνών που αλληλεπιδρούν μεταξύ τους και κωδικοποιούνται από μιτοχονδριακό και πυρηνικό γονιδίωμα είτε για τη βελτίωση φυσιολογικών λειτουργιών ή για τη διατήρηση της αρμοστικότητας μέσω αναγκαστικών αλλαγών αφού μια ήπια βλαπτική μετάλλαξη έχει καθηλωθεί από τη παρέκκλιση. Μια τέτοια υπόθεση θα μπορούσε να οδηγήσει σε συσχετίσεις λειτουργικών ιδιοτήτων. Για παράδειγμα, το κυτόχρωμα c, το οποίο κωδικοποιείται από ένα πυρηνικό γονίδιο, μεταφέρει ηλεκτρόνια μεταξύ του συμπλόκου III και του συμπλόκου IV. Αυτή η λειτουργία απαιτεί από το κυτόχρωμα c να αγκυροβοληθεί σε αυτά τα δυο πρωτεϊνικά σύμπλοκα (Zhen et al. 1999). Ως αποτέλεσμα, αυτές οι δύο πρωτεΐνες πρέπει να είναι αρκετά συν-προσαρμοσμένες.

Έχει βρεθεί πως παιδιά με μεταλλάξεις πυρηνικών γονιδίων στην υπομονάδα I, παρουσιάζουν 40% μείωση της δραστηριότητας της υπομονάδας και ως αποτέλεσμα πάσχουν από γενικευμένη υποτονία, αναπτυξιακές ανωμαλίες και θάνατο (Rubio-Gozalbo et al. 2000). Αυτό σημαίνει πως έστω και εν μέρει μείωση της δραστηριότητας του συμπλόκου I προκαλεί φαινοτυπικές συνέπειες. Αυτά τα ευρήματα υποδηλώνουν περαιτέρω πως τα 5-6 εκατομμύρια χρόνια που μεσολάβησαν από την απόκλιση του γένους *Homo* από τους κοντινούς εξελικτικούς του συγγενείς ήταν αρκετά για να δημιουργηθούν διαφορές στην αλληλουχία που οδηγούν σε λειτουργική ασυμβατότητα του μιτοχονδριακού και πυρηνικού γονιδιώματος. Επιπλέον ευρήματα, αποτελούν και οι περιπτώσεις ερπετών υβριδίων (με ανθρώπινο πυρήνα και μιτοχόνδρια ερπετών) στα οποία παρατηρήθηκε μειωμένη δραστηριότητα των

συμπλόκων I & IV (Dey, et al. 2000, Yamaoka, et al. 2000). Το χρονικό πλαίσιο στο οποίο η συνεξέλιξη συμβαίνει και οδηγεί σε λειτουργική ασυμβατότητα υβριδίων θα μπορούσε να είναι μικρότερο από το χρονικό πλαίσιο διαχωρισμού των ειδών. Σειρά πειραμάτων ζευγαρώματος μεταξύ πληθυσμών σε κωπήποδα (*Tigriopus californicus*) αποκάλυψαν μειωμένη αρμοστικότητα των υβριδίων αλλά και μείωση δραστηριότητας των συμπλόκων της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης, ειδικά στο σύμπλοκο IV (R.S. Burton, et al 2006, C.K. Ellison et al, 2009). Παρόμοια ευρήματα αναφέρθηκαν σε άλλα είδη (M. Gershoni, et al 2009). Επιπρόσθετα, υβρίδια τα οποία διέθεταν συγκεκριμένο πυρηνικό υπόβαθρο αλλά διαφορετικά μιτοχονδριακά DNA από το ίδιο είδος, παρουσίασαν διαταραχή στη μιτοχονδριακή λειτουργία. Όλα αυτά τα ευρήματα σε συνδυασμό με την μειωμένη ικανότητα αναπαραγωγής λόγω ασυμβατότητας μιτοχονδρίου-πυρήνα σε πειράματα ζευγαρώματος σε αδελφά taxa (Ellison et al 2006, Ellison et al 2008), οδήγησαν στο συμπέρασμα πως η ασυμβατότητα μιτοχονδρίου-πυρήνα παίζει ρόλο στην δημιουργία αναπαραγωγικών φραγμών, ένα ουσιαστικό βήμα στην πραγματοποίηση της ειδογένεσης.

Με βάση τη θεωρία της ενδοσυμβίωσης, το μιτοχονδριακό γονιδίωμα κάποτε διέθετε όλα τα απαιτούμενα γονίδια για τις λειτουργίες του, συμπεριλαμβανομένων και των γονιδίων της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης τα οποία τώρα μοιράζονται ανάμεσα στα μιτοχόνδρια και τον πυρήνα. Όταν το μιτοχόνδριο ήταν ένας ελεύθερος οργανισμός, τα γονίδια ρυθμίζονταν και μεταγράφονταν ως ένα πολυκιστρονικό RNA μόριο. Παρόλαυτα, επί του παρόντος, τα γονίδια της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης είναι διασκορπισμένα στο ανθρώπινο γονιδίωμα και χαρτογραφούνται σε διαφορετικά χρωμοσώματα και έτσι προκύπτει το θέμα της από κοινού ρύθμισης τους μιας και χρειάζεται να δράσουν συγχρονισμένα ως συμπλέγματα πρωτεϊνών σε πολλούς διαφορετικούς ιστούς. Έτσι λοιπόν είναι γνωστό πως γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεϊνικές υπομονάδες που συμμετέχουν στα ίδια σύμπλοκα της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης τείνουν να συνεκφράζονται (Duborjal et al. 2002, Garbian et al. 2010, van Waveren et al 2008). Η αλληλεπίδραση μεταξύ του μιτοχονδριακού και του πυρηνικού γονιδιώματος έχει διατηρηθεί ανά την εξέλιξη έτσι ώστε να συντηρήσει τις μιτοχονδριακές δραστηριότητες που είναι βασικές και απαιτούμενες για την επιβίωση των οργανισμών. Διαταραχή σε αυτή τη σχέση μπορεί να οδηγήσει σε πρόβλημα στην μιτοχονδριακή λειτουργία και ως αποτέλεσμα την ύπαρξη ασθενειών αλλά και σημαντικών εξελικτικών γεγονότων.

Παλαιότερα, είχε υποτεθεί πως η γενετική ποικιλομορφία στο μιτοχονδριακό γονιδίωμα ήταν επιλεκτικά ουδέτερη (Ballard et al 1995). Παρόλαυτα, η υπόθεση της επιλεκτικής ουδετερότητας του μιτοχονδριακού DNA είναι απλοϊκή διότι η ποικιλομορφία και οι μεταλλάξεις σε μιτοχονδριακά γονίδια που κωδικοποιούν για πρωτεΐνες, τα οποία εμπλέκονται στην οξειδωτική φωσφορυλίωση και σε άλλες σημαντικές διεργασίες, μπορούν να επηρεάσουν τη μεταβολική διαδικασία, να προκαλέσουν εκφυλιστικές ασθένειες αλλά και στειρότητα, όπως αποδείχθηκε πιο πρόσφατα, (Wallace et al 1999).

Τα ενζυμικά σύμπλοκα της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων και της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης είναι ελκυστικά μοντέλα για την ανάλυση της συν-προσαρμογής διότι: (α) οι πρωτεΐνες της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης κωδικοποιούνται από πυρηνικά και μιτοχονδριακά γονίδια, (β) υπάρχουν δομικά μοντέλα για τα σύμπλοκα II-V τα οποία αυξάνουν τη δυναμική μοριακών εξελικτικών αναλύσεων και (γ) οι φαινότυποι μπορούν να μελετηθούν με τη χρήση ενζυμικών δοκιμασιών. Μια απλή πρόβλεψη της συν-προσαρμογής είναι ότι μια πειραματική «μεταμόσχευση» αλληλεπιδρώντων στοιχείων θα



οδηγήσει σε μειωμένη απόδοση και αυτή η διαταραχή θα αυξάνεται καθώς αυξάνεται και το επίπεδο της εξελικτικής απόστασης. Σε μοριακό επίπεδο, η συν-προσαρμογή θα πρέπει να είναι ορατή από συντονισμένες αλλαγές αμινοξέων σε αλληλεπιδρώσες πρωτεΐνες της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης όπως για παράδειγμα: οι πυρηνικές υπομονάδες του συμπλόκου I, NFUDC2, NDUFA1 αλληλεπιδρούν με τις μιτοχονδριακές υπομονάδες ND5/ND4 και ND5/ND4/ND1. Επίσης βρέθηκε με τη χρήση του συστήματος Y2S (yeast 2 hybrid) αλληλεπίδραση μεταξύ υπομονάδων NDUFC2 και ND4, NDUFA1/ND1/ND4 αλλά και έλλειψη αλληλεπίδρασης μεταξύ των NDUFC2/ND3/NDUFA1 (Gershoni et al 2010).

## ΒΑΣΕΙΣ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ

Στη παρούσα μελέτη έγινε συλλογή δεδομένων από διάφορες βάσεις δεδομένων για την επιτυχή σύγκριση μεταξύ των δεδομένων αλλά και για μεγαλύτερη ακρίβεια στις αναλύσεις. Οι βάσεις δεδομένων που χρησιμοποιήθηκαν είναι ευρέως διαδεδομένες, πολύ χρήσιμες και βοηθητικές αλλά και με πληθώρα δεδομένων αλλά και εργαλείων για τη διαχείριση τους. Οι βάσεις που χρησιμοποιήθηκαν ήταν οι εξής:

**1000GENOMES:** Ο στόχος της συγκεκριμένης βάσης δεδομένων είναι να βρεθούν οι γενετικοί πολυμορφισμοί με συχνότητα τουλάχιστον 1% στο γενικό πληθυσμό και έτσι να κατασκευαστεί ο μακράν πιο λεπτομερής κατάλογος της ανθρώπινης γενετικής ποικιλομορφίας. Για αυτό το λόγο, πραγματοποιείται μερική αλληλούχιση των γονιδιωμάτων τουλάχιστον 1000 ανθρώπων από διάφορες εθνικές ομάδες μέσα σε 3 χρόνια, στοίχιση και ομαδοποίηση των κομματιών αυτών. Το πρόγραμμα ξεκίνησε το 2008 και συμπεριλαμβάνει αλληλουχίες DNA από άτομα από Δυτική και Νότια Ασία, Αφρική, Ευρώπη, και Αμερική. Ο κύριος και τελικός στόχος του προγράμματος πραγματοποιήθηκε το 2015 με δυο άρθρα στο περιοδικό Nature τα οποία παρουσίαζαν αποτελέσματα και την ολοκλήρωση του προγράμματος και ευκαιρίες για περαιτέρω έρευνα. Πολλές σπάνιες παραλλαγές, περιορισμένες σε στενά συνδεδεμένες ομάδες, ταυτοποιήθηκαν. Παρέχοντας μια επισκόπηση όλης της ανθρώπινης γενετικής ποικιλομορφίας και όχι μόνο ότι είναι βιοιατρικά σχετικό, η κοινοπραξία θα παράγει ένα πολύτιμο εργαλείο για όλα τα πεδία των βιολογικών επιστημών, ειδικά στους κλάδους της γενετικής, ιατρικής, φαρμακολογίας, βιοχημείας και βιοπληροφορικής.

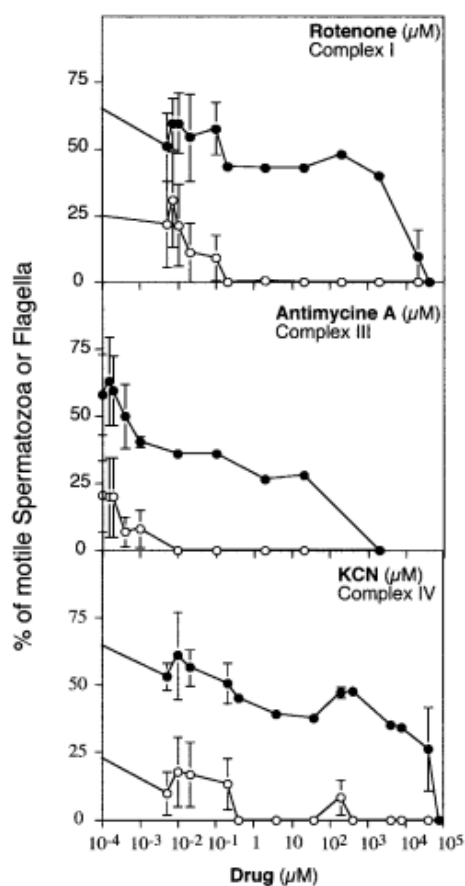
**GRCh37:** Το πρόγραμμα του Ensembl ξεκίνησε το 1999 και ο στόχος ήταν η πλήρης αλληλούχιση του γονιδιώματος και η παροχή όλης αυτής της πληροφορίας στο διαδίκτυο. Η σελίδα δημιουργήθηκε το 2000 και από τότε συνεχώς προστίθενται νέα δείγματα στα ήδη υπάρχοντα για ενίσχυση της εγκυρότητας. Τα δεδομένα που παρέχονται επεκτείνονται με σκοπό τη παροχή ρυθμιστικών δεδομένων, ποικιλομορφίας και συγκριτικής γενετικής. Η βάση δεδομένων GRCh37 αποτελεί μέρος του προγράμματος Ensembl, ένα κοινό επιστημονικό έργο μεταξύ του Ευρωπαϊκού Ινστιτούτου Βιοπληροφορικής και του Wellcome Trust Sanger Institute, το οποίο ξεκίνησε το 1999 ως απάντηση στην επικείμενη ολοκλήρωση του Human Genome Project. Μετά από 17 χρόνια ύπαρξης, ο στόχος του Ensembl παραμένει ο ίδιος, δηλαδή η παροχή μιας κεντρικής πηγής για γενετιστές, μοριακούς βιολόγους και άλλους ερευνητές που μελετούν το γονιδίωμα του είδους μας αλλά και άλλων σπονδυλωτών και οργανισμών μοντέλων. Η Ensembl είναι μια από τις γνωστές βάσεις δεδομένων για ανάκτηση γονιδιωματικών πληροφοριών.

**NCBI & GenBank:** Το NCBI αποτελεί μέρος της Εθνικής Βιβλιοθήκης Ιατρικής των Ηνωμένων Πολιτειών της Αμερικής (NLM), βρίσκεται στο Maryland και ιδρύθηκε το 1988. Το NCBI φιλοξενεί μια σειρά από βάσεις δεδομένων σχετικές με βιοτεχνολογία και βιοιατρική και είναι μια σημαντική πηγή εργαλείων και υπηρεσιών βιοπληροφορικής. Το NCBI είχε την ευθύνη να κάνει διαθέσιμη την βάση δεδομένων αλληλουχιών GenBank από το 1992 η οποία διαθέτει μια σειρά νουκλεοτιδικών αλληλουχιών

διαθέσιμες στο κοινό αλλά και των πρωτεϊνών τους. Η GenBank λαμβάνει αλληλουχίες που παράγονται σε εργαστήρια ανά τον κόσμο, για περισσότερους από 100000 οργανισμούς. Στα περισσότερα από 30 χρόνια ύπαρξης της, η GenBank έχει γίνει η πιο σημαντική και ισχυρή βάση δεδομένων για όλα σχεδόν τα βιολογικά πεδία, της οποίας τα δεδομένα είναι προσβάσιμα και προβάλλονται από εκατομμύρια ερευνητών στον κόσμο. Η GenBank συνεχίζει να μεγαλώνει με εκθετικό ρυθμό και διπλασιάζεται κάθε 18 μήνες.

## Το μιτοχονδριακό DNA και η υπογονιμότητα στους άνδρες

Υπάρχουν πλέον αυξανόμενες ενδείξεις που δείχνουν ότι η κινητικότητα του σπέρματος εξαρτάται ισχυρά από το ATP το οποίο παρέχεται από την οξειδωτική φωσφορυλίωση (Ford et al 1981; Halangk et al. 1985; Pascual et al. 1996; Ruiz-Pesini et al. 1998). Δεδομένου ότι τέσσερα από τα πέντε ενζυμικά σύμπλοκα τα οποία συγκροτούν το σύστημα της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης κωδικοποιούνται μερικώς από μιτοχονδριακό DNA, μεταλλάξεις σε μιτοχονδριακά γονίδια που κωδικοποιούν για πρωτεΐνες μπορεί να προκαλέσουν σοβαρά προβλήματα (Enriquez et al. 1995; Larsson et al; Wallace 1995; Schon et al. 1997; Zeviani et al 1997). Τα σπερματοζώα έχουν ειδικευμένα μιτοχόνδρια τοποθετημένα στη μέση του κυττάρου εκεί όπου εισέρχεται το μαστίγιο. Αυτός ο εντοπισμός υποδηλώνει πως η παραγωγή του ATP από τα μιτοχόνδρια παίζει ρόλο στη κινητικότητα του σπέρματος. Έχει προταθεί πως μεταλλάξεις στο μιτοχονδριακό DNA εφόσον επηρεάζουν την παραγωγή ATP, θα προκαλούν μειωμένη κινητικότητα σπέρματος και ασθενοσπερμία (Følgero et al. 1993; Kao et al. 1995; Frank et al 1996; St. John et al. 1997; Zeviani et al 1997). Επίσης έχει αποδειχτεί πως η αναστολή, μέσω συγκεκριμένων φαρμάκων, της λειτουργίας τριών συμπλόκων οξειδωτικής φωσφορυλίωσης, σταδιακά εξασθενεί την ποιότητα του σπέρματος και την κινητικότητά του και παρεμποδίζει τις κινήσεις του μαστίγιου (Ford et al 1981; Halangk et al. 1985; Pascual et al. 1996; Ruiz-Pesini et al. 1998)



Εικόνα 3. Άμεση εξάρτηση της κίνησης των μαστιγίων των σπερματοζωαρίων από την δραστηριότητα των συμπλόκων της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης. Η δραστηριότητα διαφόρων μιτοχονδριακών συμπλόκων αναστάλη από αυξανόμενες δόσεις φαρμάκων και μετρήθηκε η ικανότητα των σπερματοζωαρίων για κίνηση.

Πιο συγκεκριμένα, σημειακή μετάλλαξη στο γονίδιο ATP6, στο νουκλεοτίδιο 8821 έχει συσχετιστεί με ωρίμανση σπέρματος (Holoake et al., 1999). Ο Folger et al (1993, 1995) έδειξε πως μια σημειακή μετάλλαξη στο νουκλεοτίδιο 3243 στο μιτοχονδριακό γονίδιο tRNA<sup>Leu</sup>(UUR) επηρέαζε την κινητικότητα του σπέρματος και πρόσφατες μελέτες έχουν εστιάσει σε ολόκληρα γονίδια του μιτοχονδριακού γονιδιώματος. Μεγάλα ελλείμματα (5±8000 bp) στο μιτοχονδριακό γονιδίωμα βρέθηκαν σε υπογόνιμους άντρες (Kao et al., 1995, 1998; Cummins et al., 1998). Έχει επίσης βρεθεί, τριπλάσια αύξηση νουκλεοτιδικών αντικαταστάσεων σε άντρες με χαμηλή και κακή ποιότητα σπέρματος σε σύγκριση με φυσιολογικούς άντρες (Ruiz-Pesini et al 2000)

Οι περισσότερες μεταλλάξεις είναι ουδέτερες αλλά και εκείνες που αλλάζουν το αμινοξύ, δεν είναι πιθανό να επηρεάσουν τη λειτουργία της πρωτεΐνης σημαντικά. Παρόλο που αυτές οι αλλαγές δεν επηρεάζουν σημαντικά τη λειτουργία μιτοχονδριακών γονιδίων, το μεταλλαγμένο κωδικόνιο μπορεί να επηρεάσει την αποτελεσματικότητα της μετάφρασης. Αυτό συμβαίνει διότι το μεταφορικό RNA (tRNA) μπορεί να δείξει μια προτίμηση σε ένα συγκεκριμένο αμινοξύ ή τα επίπεδα του tRNA για ένα συγκεκριμένο αμινοξύ να διαφέρουν μέσα στο κύτταρο. Αυτό μπορεί να οδηγήσει σε αλλαγή επιπέδων της πρωτεΐνης που παράγεται και κατά συνέπεια σε απώλεια της αποτελεσματικότητας στη παραγωγή ενέργειας. Στα σωματικά κύτταρα υπάρχουν περίπου 130-140 αντίγραφα μιτοχονδριακού DNA ανά κύτταρο και σε ένα ώριμο ωοκύτταρο 105 αντίγραφα (Cummins, 1998). Ένας τόσο υψηλός αριθμός αντιγράφων μιτοχονδριακού γονιδιώματος μπορεί να αντισταθμίσει τη μικρή απώλεια αποτελεσματικότητας στη παραγωγή πρωτεϊνών. Παρόλαυτα, στο σπερματοζώαριο, υπάρχουν μόνο 20-50 αντίγραφα μιτοχονδριακού DNA. Έτσι, μια αλλαγή στην αποτελεσματικότητα της μετάφρασης θα έχει μεγαλύτερο αντίκτυπο στην σπερματική λειτουργία. Επιπλέον, αναποτελεσματικότητα στην παραγωγή ενέργειας θα επηρεάσει τη σπερματογένεση η οποία είναι πιο κοστοβόρα από άποψη ενεργείας από ότι η ωογένεση. Αυτές οι παρατηρήσεις συνηγορούν στο ότι η αντρική γονιμότητα μπορεί να επηρεάζεται σε μεγαλύτερο βαθμό από προβλήματα παραγωγής ενέργειας από ότι η γυναικεία.

## Αντικείμενο μελέτης

Η παρούσα μελέτη αφορά στη μέτρηση της συνεξέλιξης του γονιδιώματος του ανθρώπου ανάμεσα στο πυρηνικό και στο μιτοχονδριακό του γονιδίωμα αλλά και στην εκτίμηση της εξέλιξης των πυρηνικών γονιδίων που συμμετέχουν στην οξειδωτική φωσφορυλίωση σε σχέση με γονίδια γλυκόλυσης, κύκλου του Krebs και γονίδια συντήρησης (housekeeping). Χρησιμοποιήθηκαν δεδομένα από 3 βάσεις δεδομένων (1000 Genome project, NCBI, GENBANK) και συλλέχθηκαν δεδομένα για όλα τα πυρηνικά και μιτοχονδριακά ανθρώπινα γονίδια που λαμβάνουν μέρος στην οξειδωτική φωσφορυλίωση. Πιο συγκεκριμένα, συλλέχθηκαν οι συνώνυμες και οι παρανοηματικές μεταλλάξεις για τα πυρηνικά και τα μιτοχονδριακά γονίδια και εξάχθηκαν τα ποσοστά μεταλλάξεων για κάθε γονίδιο αλλά και συνολικά, μέσω διαίρεσης του αριθμού των εκάστοτε μεταλλάξεων με το μήκος του κάθε γονιδίου αλλά και συνολικά για όλα τα γονίδια. Όσον αφορά το μιτοχονδριακό γονιδίωμα, λόγω της αυξημένης μεταλλαξιγένεσης που υφίσταται, έγινε συλλογή δεδομένων από 3 διαφορετικές βάσεις δεδομένων για πιο ακριβή αποτύπωση του ποσοστού ύπαρξης μεταλλάξεων. Έτσι έγινε η σύγκριση μεταξύ των δύο γονιδιωμάτων, η εκτίμηση της ύπαρξης συνεξέλιξης αλλά και η σύγκριση με άλλες ομάδες γονιδίων. Επίσης, πραγματοποιήθηκε μια πληθυσμιακή ανάλυση των πιο κοινών σημειακών μεταλλάξεων του πυρηνικού γονιδιώματος στους 5 μεγαλύτερους πληθυσμούς.

## ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Για την ανάλυση των δεδομένων χρησιμοποιήθηκαν οι βάσεις δεδομένων που αναφέρθηκαν παραπάνω και ιδιαίτερα η GRCh37 για τη συλλογή όλων των δεδομένων. Πιο συγκεκριμένα:

Από την αρχική σελίδα της βάσης δεδομένων αναζητούμε για κάθε ένα γονίδιο των συμπλόκων της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης και στη συνέχεια επιλέγουμε το μεγαλύτερο σε μέγεθος μετάγραφο που κωδικοποιεί για πρωτεΐνη όπως φαίνεται στην εικόνα 1 για το γονίδιο NDUFA2.

Summary

Description: NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 alpha subcomplex, 2, 8kDa [Source:HGNC Symbol;Acc:7685]

Synonyms: CIB8, CD14, B8

Location: Chromosome 5:140,018,325-140,027,370 reverse strand. GRCh37:CM000667.1

About this gene: This gene has 4 transcripts (splice variants), 68 orthologues, is a member of 2 Ensembl protein families and is associated with 2 phenotypes.

Transcripts: [Hide transcript table](#)

Name	Transcript ID	bp	Protein	Biotype	CCDS	UniProt	RefSeq	Flags
NDUFA2-001	ENST00000252102	804	99aa	Protein coding	CCDS4234.1	Q43678	NM_001185012 NM_002488 NP_001171941 NP_002479	GENCODE basic
NDUFA2-004	ENST00000512088	627	76aa	Protein coding	CCDS5491.1	Q43678	-	GENCODE basic
NDUFA2-007	ENST00000510680	576	No protein	Processed transcript	-	-	-	
NDUFA2-003	ENST00000502960	721	No protein	Retained intron	-	-	NR_033697	

Summary

Name: NDUFA2 (HGNC Symbol)

CCDS: This gene is a member of the Human CCDS set: CCDS4234.1, CCDS5491.1

UniProtKB: This gene has proteins that correspond to the following Uniprot identifiers: Q43678

RefSeq: Overlapping RefSeq Gene ID 4695 matches and has similar biotype of protein\_coding

Ensembl version: ENSG00000131495.4

Other assemblies: This gene maps to 140,638,740-140,647,785 in GRCh38 coordinates.

Gene type: Known protein coding

Annotation method: Annotation for this gene includes both automatic annotation from Ensembl and Havana manual curation, see article

Database identifiers:

Εικόνα 1: το περιβάλλον εργασίας της βάσης δεδομένων GRCh37, για το γονίδιο NDUFA2 και οι επιλογές που υπάρχουν για περαιτέρω ανάλυση.

Στη συνέχεια, από τον διπλανό πίνακα περιεχομένων επιλέγουμε το Variant table έτσι ώστε να εμφανιστούν όλες οι μεταλλάξεις για αυτό το μετάγραφο. Από τα φίλτρα που παρέχονται, επιλέγουμε να συλλέξουμε μόνο τις παρανοηματικές και τις συνώνυμες μεταλλάξεις για ανάλυση όπως φαίνεται στην εικόνα 2.

### Variant table

Variant table

This table shows known variants for this transcript. Use the 'Consequence Type' filter to view a subset of these.

Filter

Global MAF: All

SIFT: All

PolyPhen: All

Consequences: Missense variant, Syn... (2/26)

Filter Other Columns

Εικόνα 2: από τα φίλτρα που παρουσιάζονται, επιλέγουμε το consequences και στη συνέχεια επιλογή μόνο των παρανοηματικών και συνώνυμων μεταλλάξεων.



Η διαδικασία επαναλαμβάνεται για κάθε ένα γονίδιο των συμπλόκων της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης και στη συνέχεια γίνεται η μέτρηση των μεταλλάξεων και των ποσοστών μεταλλάξεων.

Ο τρόπος που ακολουθήθηκε είναι ο εξής:

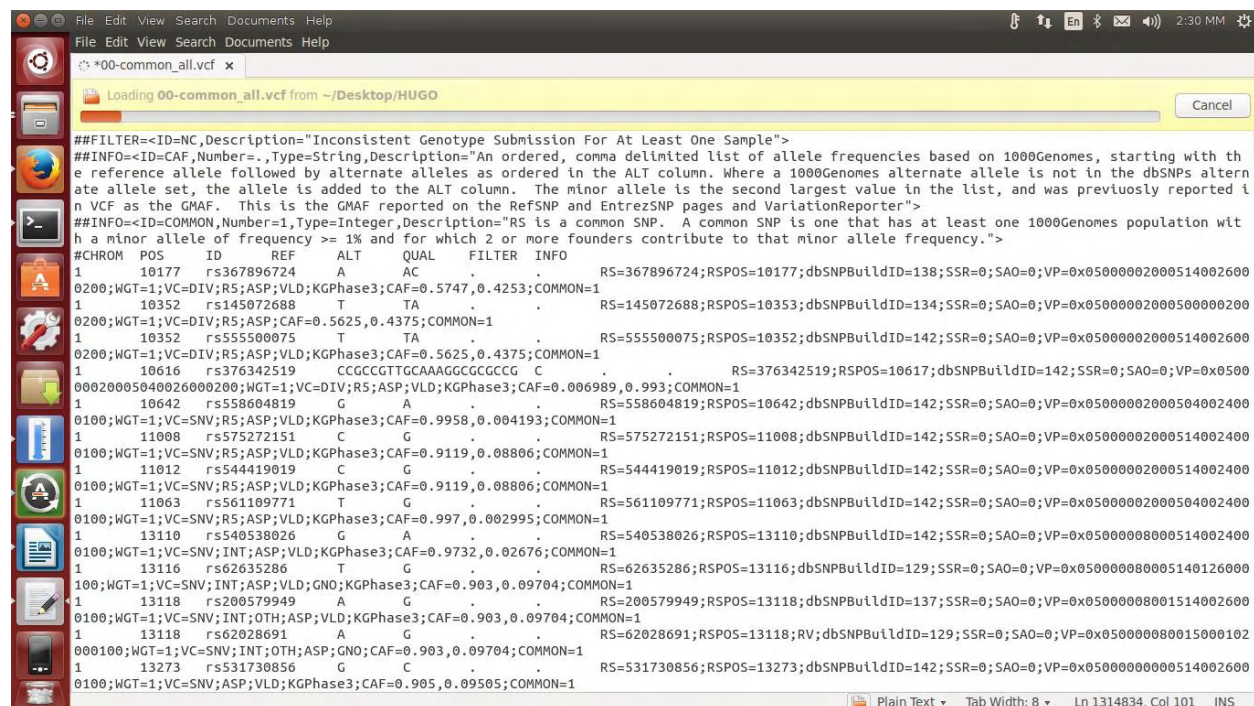
Γίνεται μέτρηση όλων των παρανοηματικών μεταλλάξεων των γονιδίων και το άθροισμα αυτό, διαιρείται με το άθροισμα του μήκους όλων των μεταγράφων των ίδιων γονιδίων. Στη συνέχεια το αποτέλεσμα ανάγεται με το 100 και μας δίνει το αντίστοιχο ποσοστό. Την ίδια διαδικασία ακολουθούμε και για τις συνώνυμες μεταλλάξεις.

Για την εύρεση των SNPs με  $MAF > 0,01$ , δηλαδή των πιο κοινών σημειακών μεταλλάξεων με σκοπό τη πληθυσμιακή ανάλυση τους, ακολουθήθηκε η εξής διαδικασία στο περιβάλλον των Linux για μεγαλύτερη ευκολία σύγκρισης του τόσο μεγάλου όγκου δεδομένων, μεγαλύτερη άνεση στη διαδικασία πραγματοποίησης των εντολών αλλά και ταχύτητας ανάκτησης αποτελεσμάτων. Πιο αναλυτικά:

Από τη βάση δεδομένων του NCBI

([http://www.ncbi.nlm.nih.gov/variation/docs/human\\_variation\\_vcf/#common\\_all](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/variation/docs/human_variation_vcf/#common_all))

Επιλέξαμε το αρχείο με τα πιο κοινά SNPs με  $MAF > 0,01$  αλλά και πιθανό ιατρικό ενδιαφέρον. Από αυτό το αρχείο πήραμε όλα τα rs (διαφορετικό για κάθε SNP) και πήραμε την τρίτη στήλη που έχει τα ονόματα με την εντολή: `cat -f 3 00-common_all.vcf > rs_list_total`. Η συγκεκριμένη εντολή διαλέγει και απομονώνει συγκεκριμένες στήλες από ένα αρχείο με πολλές στήλες και προκύπτει ένα νέο αρχείο το οποίο περιέχει μόνο την εκάστοτε στήλη, στην περίπτωση μας, την τρίτη στήλη. Στην εικόνα 3 φαίνεται η μορφή του αρχείου πριν πάρουμε την τρίτη στήλη που μας ενδιέφερε.



Εικόνα 3: η μορφή του αρχείου των ολικών SNPs πριν αποκτηθεί η στήλη ενδιαφέροντος.



Στη συνέχεια το νέο αρχείο ταξινομήθηκε αλφαβητικά με την εντολή: `sort rs_list_total`.

Έτσι προκύπτει ένα ταξινομημένο αλφαβητικά αρχείο με όλα τα κοινά SNPs. Την ίδια διαδικασία την πραγματοποιούμε για τα SNPs των γονιδίων της κάθε υπομονάδας και έπειτα συγκρίνουμε ανα σύμπλοκο τις δύο λίστες με την εντολή: `comm -1 -2 my_file_1 rs_list_total > complex_x.txt`. Η συγκεκριμένη εντολή συγκρίνει δυο ήδη ταξινομημένα αλφαβητικά αρχεία και ως αποτέλεσμα προκύπτει ένα νέο αρχείο στο οποίο υπάρχουν τα κοινά στοιχεία των δύο αρχείων.

Οι εντολές πραγματοποιήθηκαν στο περιβάλλον των Linux στο λειτουργικό Ubuntu.

Έτσι προκύπτουν τα πιο κοινά SNPs των γονιδίων του OXPHOS και πραγματοποιείται η πληθυσμιακή ανάλυση η οποία γίνεται για κάθε SNP με τον εξής τρόπο:

Από τη βάση δεδομένων του GRCh37, γίνεται αναζήτηση για κάθε ένα SNP που έχουμε βρει και στη συνέχεια επιλέγεται το Population Genetics με πληροφορίες για την πληθυσμιακή κατανομή του κάθε SNP και πληροφορίες για τους 5 μεγάλους πληθυσμούς από τους οποίους έχει γίνει η συλλογή δεδομένων.

Όσον αφορά τα μιτοχονδριακά γονίδια, για αυτά πραγματοποιήθηκε συλλογή δεδομένων και από άλλες δύο βάσεις δεδομένων έτσι ώστε να ελεγχθεί εις βάθος η διαφορά τους με τα πυρηνικά. Τα δεδομένα συλλέχθηκαν από τη βάση του NCBI και της GENBANK με αναζήτηση των SNPs για κάθε ένα μιτοχονδριακό γονίδιο που συμμετέχει στην οξειδωτική φωσφορυλίωση.

## ΠΛΗΘΥΣΜΙΑΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Ακολουθεί μια πληθυσμιακή ανάλυση και των πέντε συμπλόκων, με βάση τα πιο κοινά SNPs τους ( $MAF > 0,01$ ) και παρουσιάζεται η κατανομή τους στα άτομα 5 μεγάλων πληθυσμών. Πιο συγκεκριμένα στους Αφρικανούς (AFR), τους Αμερικάνους (AMR), τους Ασιάτες της Ανατολικής Ασίας (EAS), τους Ευρωπαίους (EUR) και τους Ασιάτες της Νότιας Ασίας (SAS).

### ΣΥΜΠΛΟΚΟ I

Για το σύμπλοκο I παρουσιάστηκαν όλα τα κοινά SNPs και η πληθυσμιακή κατανομή τους σε 5 μεγάλους πληθυσμούς. Από το σύνολο των SNPs υπάρχουν κάποια που παρουσιάζουν υψηλότερη διαφοροποίηση σε σχέση με τα άλλα και αυτά είναι: rs10595, rs1678868, rs2279516, rs2302175, rs31303, rs31304, rs3818263, rs4147790, rs4148972, rs4148973, rs466719, rs4679, rs534418, rs561, rs567848583, rs8875, rs9543. Στον πίνακα παρακάτω γίνεται και η αντιστοίχιση τους με τα γονίδια τα οποία αντιπροσωπεύουν.

SNP	ΓΟΝΙΔΙΟ
rs10595	NDUFV3
rs1678868	NDUFA11
rs2279516	NDUFS4
rs2302175	NDUFB10
rs31303	NDUFS4
rs31304	NDUFS4
rs3818263	NDUFB1
rs4147790	NDUFB5
rs4148972	NDUFV3
rs4148973	NDUFV3
rs466719	NDUFAB1
rs4679	NDUFA8
rs534418	NDUFC2
rs561	NDUFA7
rs567848583	NDUFB5
rs8875	NDUFC2
rs9543	NDUFB7

## ΣΥΜΠΛΟΚΟ II

Στο σύμπλοκο II, τα πιο διαφοροποιημένα SNPs ήταν τα εξής: rs111659413, rs2746462, rs592626, rs76336581, rs9919552, rs10039029, rs1041949, rs1126417, rs1139424, rs2115272, rs35277230, rs6555055, rs6961, rs6962 και rs77210621. Ακολουθεί πίνακας με την αντιστοιχία των γονιδίων τους.

SNPs	ΓΟΝΙΔΙΑ
rs111659413	SDHD
rs2746462	SDHB
rs592626	SDHD
rs76336581	SDHAF1
rs9919552	SDHD
rs10039029	SDHA
rs1041949	SDHA
rs1126417	SDHA
rs1139424	SDHA
rs2115272	SDHA
rs35277230	SDHA
rs6555055	SDHA
rs6961	SDHA
rs6962	SDHA
rs77210621	SDHA

## ΣΥΜΠΛΟΚΟ III

Για το σύμπλοκο III τα πιο διαφοροποιημένα SNPs ήταν τα εξής: rs11541475, rs11666764, rs41292543, rs7282, rs76013375, rs8100724. Ακολουθεί πίνακας αντιστοιχίας με τα γονίδια στα οποία ανήκουν.

SNPs	ΓΟΝΙΔΙΑ
rs11541475	CYC1
rs11666764	UQCRFS1
rs41292543	UQCRH
rs7282	UQCRC2
rs76013375	UQCR10
rs8100724	UQCRFS1

#### ΣΥΜΠΛΟΚΟ IV

Για το σύμπλοκο IV τα πιο διαφοροποιημένα SNPs ήταν τα εξής: rs1130569, rs11557187, rs11907253, rs12240, rs7130187, rs7991. Ακολουθεί και ο πίνακας με τα γονίδια στα οποία ανήκουν.

SNPs	ΓΟΝΙΔΙΑ
rs1130569	COX6C
rs11557187	COX4I1
rs11907253	COX4I2
rs12240	COX6A2
rs7130187	COX8A
rs7991	COX6B1

#### ΣΥΜΠΛΟΚΟ V

Για το σύμπλοκο V τα πιο διαφοροποιημένα SNPs είναι τα εξής: rs113278662, rs41291993, rs4591, rs4842, rs6519327, rs78234759. Ακολουθεί ο πίνακας με τα αντίστοιχα γονίδια στα οποία ανήκουν.

SNPs	ΓΟΝΙΔΙΑ
rs113278662	ATP5A1
rs41291993	ATP5B
rs4591	ATP5O
rs4842	ATP5O
rs6519327	ATP5L2
rs78234759	ATP5O

Συγκεντρωτικά παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα τα πιο διαφοροποιημένα SNPs και τα ποσοστά που εμφανίζουν στους 5 μεγάλους πληθυσμούς.

SNP	ALL	AFR	AMR	EAS	EUR	SAS
<b>ΣΥΜΠΛΟΚΟ I</b>						
rs10595 (A)	53%	73%	35%	34%	59%	53%
rs1678868 (T)	52%	74%	42%	27%	57%	51%
rs2279516 (C)	68%	83%	67%	64%	59%	61%
rs2302175 (C)	88%	85%	96%	69%	98%	96%
rs31303 (G)	80%	86%	82%	79%	76%	76%
rs31304 (C)	94%	97%	97%	87%	96%	94%
rs3818263 (G)	54%	55%	38%	86%	33%	52%
rs4147790 (G)	95%	86%	99%	99%	100%	96%
rs4148972 (G)	90%	95%	94%	83%	94%	85%
rs4148973 (G)	53%	73%	35%	34%	59%	53%
rs466719 (G)	87%	80%	94%	83%	93%	93%
rs4679 (C)	66%	91%	63%	80%	39%	49%
rs534418 (C)	84%	92%	92%	72%	83%	82%
rs561 (G)	86%	97%	73%	79%	81%	93%
rs567848583 (T)	66%	68%	71%	63%	63%	64%
rs8875 (G)	86%	96%	79%	92%	77%	81%
rs9543 (C)	54%	84%	45%	28%	50%	52%
<b>ΣΥΜΠΛΟΚΟ II</b>						
rs111659413 (C)	89%	63%	96%	100%	99%	100%
rs2746462 (T)	96%	88%	98%	100%	97%	99%
rs592626 (G)	95%	81%	98%	100%	100%	100%
rs76336581 (C)	95%	94%	94%	99%	95%	94%
rs9919552 (C)	89%	61%	96%	100%	99%	100%
rs10039029 (G)	75%	37%	76%	94%	89%	92%
rs1041949 (C)	74%	34%	75%	94%	89%	92%
rs1126417 (C)	65%	79%	69%	34%	75%	68%
rs1139424 (A)	76%	40%	77%	94%	89%	92%
rs2115272 (T)	75%	38%	76%	94%	89%	92%
rs35277230 (C)	89%	59%	97%	100%	100%	100%
rs6555055 (A)	75%	38%	76%	94%	89%	92%
rs6961 (G)	66%	36%	69%	77%	77%	85%
rs6962 (G)	82%	63%	80%	94%	89%	92%
rs77210621 (A)	75%	37%	76%	94%	89%	92%
<b>ΣΥΜΠΛΟΚΟ III</b>						

rs11541475 (G)	89%	71%	94%	100%	91%	97%
rs11666764 (C)	95%	94%	93%	100%	92%	98%
rs41292543 (A)	94%	100%	93%	100%	88%	86%
rs7282 (G)	89%	99%	95%	88%	90%	72%
rs76013375 (A)	85%	66%	90%	91%	95%	91%
rs8100724 (C)	95%	94%	93%	100%	92%	98%
<b>ΣΥΜΠΛΟΚΟ IV</b>						
rs1130569 (G)	75%	47%	82%	87%	82%	88%
rs11557187 (G)	87%	88%	92%	69%	95%	92%
rs11907253 (G)	94%	90%	92%	100%	92%	98%
rs12240 (G)	92%	90%	95%	95%	93%	87%
rs7130187 (C)	97%	91%	99%	96%	100%	99%
rs7991 (C)	82%	78%	86%	71%	92%	83%
<b>ΣΥΜΠΛΟΚΟ V</b>						
rs113278662 (T)	99%	100%	96%	99%	100%	100%
rs41291993 (C)	96%	100%	99%	88%	99%	95%
rs4591 (G)	70%	74%	56%	74%	70%	73%
rs4842 (T)	93%	89%	95%	98%	91%	93%
rs6519327 (G)	73%	76%	87%	40%	89%	75%
rs78234759 (A)	97%	100%	96%	100%	94%	95%

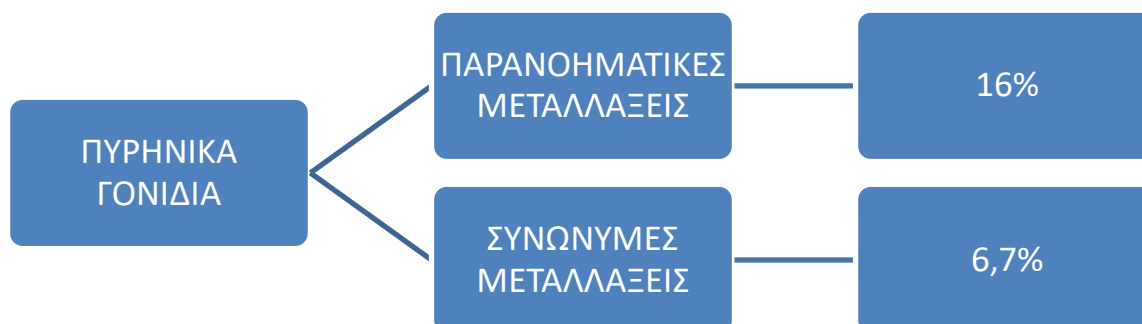
Πραγματοποιήθηκε ανάλυση των μεταλλάξεων όλων των γονιδίων της κάθε υπομονάδας και μέτρηση του ποσοστού ύπαρξης μεταλλάξεων ανά γονίδιο αλλά και συνολικά και σύγκριση των πυρηνικών γονιδίων με τα μιτοχονδριακά. Το ποσοστό βρέθηκε διαιρώντας το πλήθος των σημειακών μεταλλάξεων με το μήκος του μεγαλύτερου transcript του εκάστοτε γονιδίου από τη βάση δεδομένων GRCh37 της Ensembl.

#### ΣΥΜΠΛΟΚΟ Ι

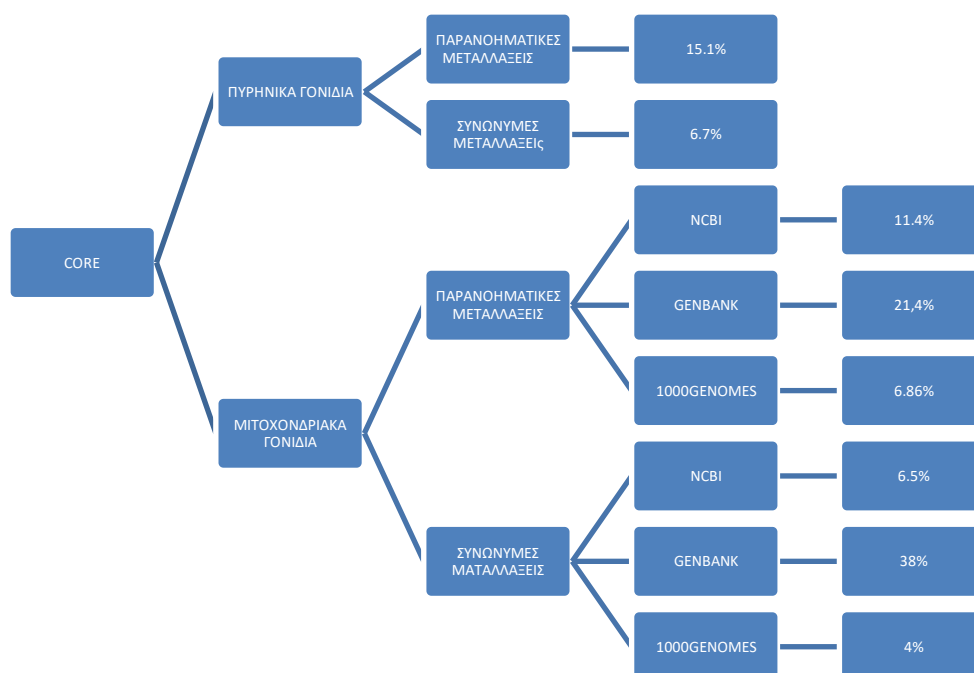
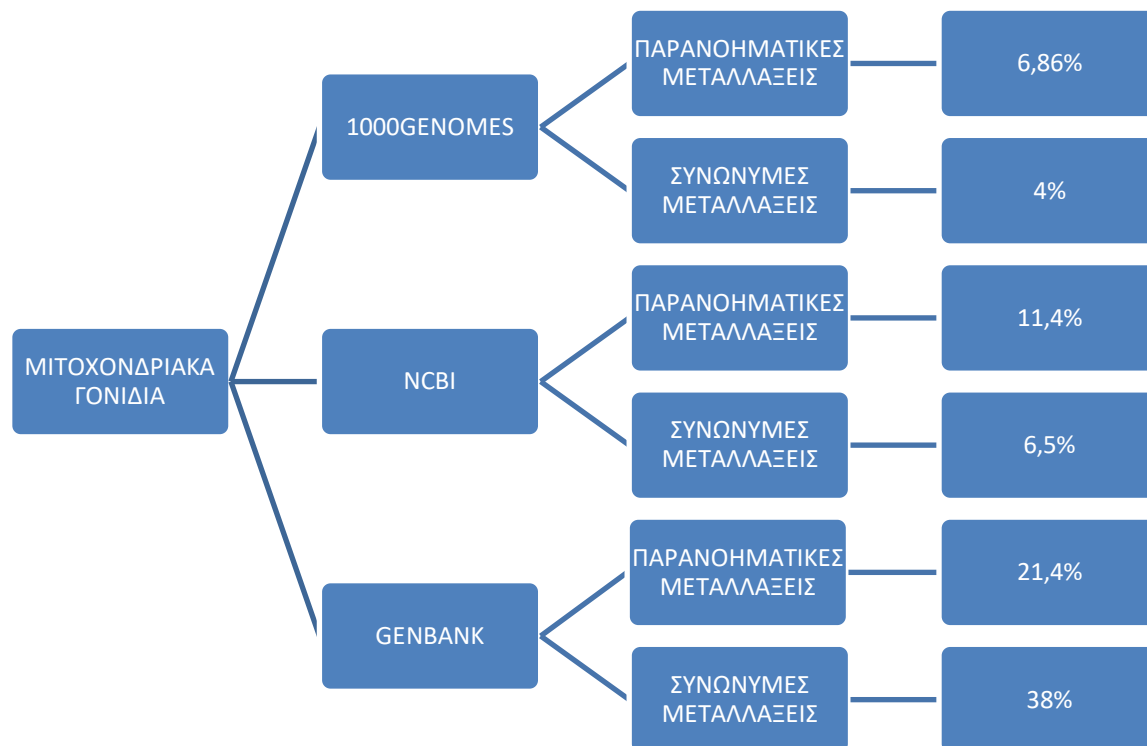
ΓΟΝΙΔΙΟ	ΣΥΝΩΝΥΜΕΣ (%)	ΠΑΡΑΝΟΗΜΑΤΙΚΕΣ (%)
MT-ND1	27,7%	14,7%
MT-ND2	6%	8,1%
MT-ND3	6,6%	13,2%
MT-ND4	8,8%	5,5%
MT-ND4L	6,3%	9,4%
MT-ND5	6,1%	9,7%
MT-ND6	6,8%	8,7%
NDUFS1	5%	15,4%
NDUFS2	6,1%	11,5%
NDUFS3	8,1%	16%
NDUFS7	10,2%	16,4%
NDUFS8	9%	15,3%
NDUFV1	7,8%	17,4%
NDUFV2	4,7%	14,6%
NDUFAB1	6,5%	16%
NDUFA1	5,1%	10,3%
NDUFA2	7,6%	18,6%
NDUFA3	8,6%	18,8%
NDUFA5	5,7%	14,2%
NDUFA6	9%	20,8%
NDUFA7	-	-
NDUFA8	6%	15%
NDUFA9	6,8%	20,9%
NDUFA10	5,7%	14,5%
NDUFA11	5%	9,7%
NDUFA12	6,8%	16%
NDUFA13	7,4%	18,3%
NDUFB1	7%	15%
NDUFB2	5,6%	17,3%
NDUFB3	5,7%	13,8%
NDUFB4	7,1%	18%
NDUFB5	6,7%	18,1%
NDUFB6	7,2%	16%
NDUFB7	8,2%	19,3%
NDUFB8	5,9%	17,8%
NDUFB9	4,8%	11,8%
NDUFB10	6%	20,8%

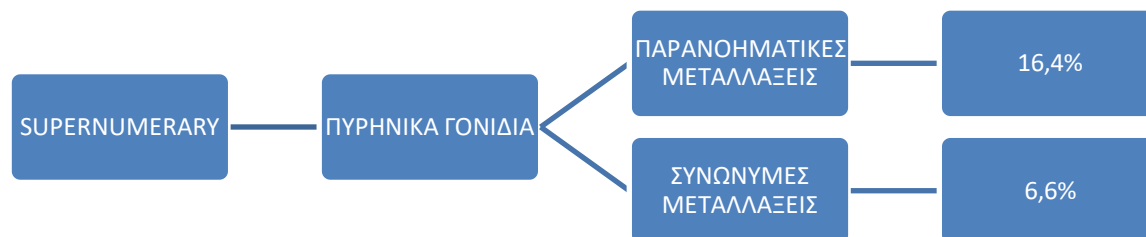
NDUFB11	7,5%	12,8%
NDUFC1	8,2%	15,5%
NDUFC2	7,5%	17,5%
NDUFS4	7,7%	17,8%
NDUFS5	5,6%	20,9%
NDUFS6	7,9%	18,9%
NDUFV3	6,5%	14,5%

Στη συνέχεια, έγινε σύγκριση μεταξύ των συνολικών ποσοστών των πυρηνικών γονιδίων και των μιτοχονδριακών γονιδίων. Για τα μιτοχονδριακά γονίδια, λόγω της αυξημένης μεταλλαξιγένεσης που αυτά υφίστανται, έγινε ανάλυση και σύγκριση σε τρεις βάσεις δεδομένων (1000 Genomes, NCBI, GENBANK) για μεγαλύτερη ακρίβεια. Επίσης ειδικά για την υπομονάδα I έγινε ανάλυση και διάκριση των γονιδίων σε core και supernumerary αλλά και σε βραχίονες Ια, Ιβ, Ιγ και υπολογισμός των ποσοστών.



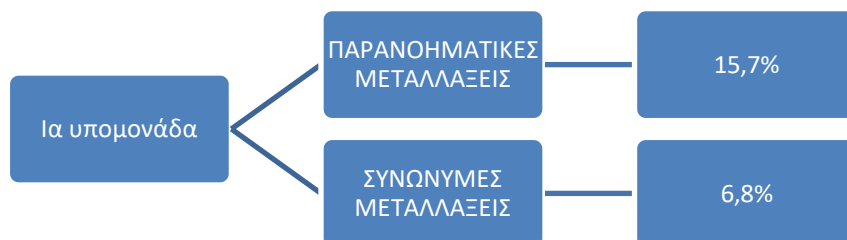


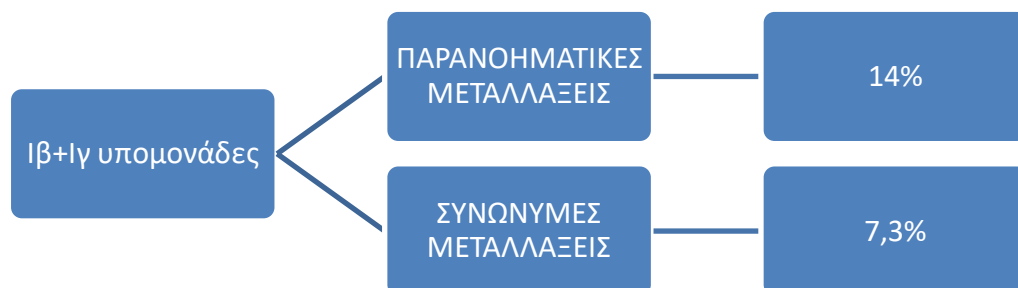




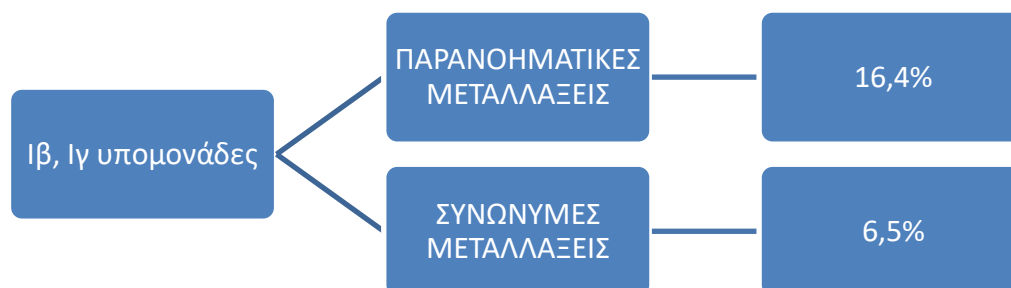
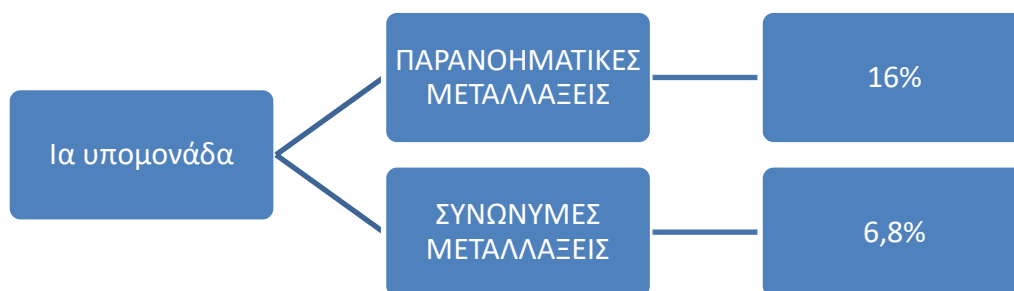
Ο διαχωρισμός με βάση γονίδια του πυρήνα του συμπλόκου και βοηθητικών έδειξε ύπαρξη μεγαλύτερο ποσοστού μεταλλάξεων στον πυρήνα του συμπλόκου παρά στα βοηθητικά γονίδια κάτι που μπορεί να εξηγηθεί καθώς ο πυρήνας του συμπλόκου και τα γονίδια του αποτελούν μέρος αρχαιότερων οργανισμών σε σύγκριση με τα βοηθητικά γονίδια τα οποία έκαναν την εμφάνιση τους πιο νωρίς στην εξελικτική πορεία.

Στη συνέχεια γίνεται ομαδοποίηση των γονιδίων σύμφωνα με τον βραχίονα μήτρας (Iα) και το βραχίονα μεμβράνης (Iβ+Iγ) αρχικά και για πυρηνικά και μιτοχονδριακά γονίδια και στη συνέχεια μόνο για τα πυρηνικά έτσι ώστε να ελεγχθεί εάν υπάρχει σημαντική διαφορά στα ποσοστά όπως θα αναμενόταν λόγω ύπαρξης περισσότερων μιτοχονδριακών γονιδίων στους βραχίονες Iβ και Iγ άρα και μεγαλύτερου ρυθμού εμφάνισης μεταλλάξεων στα πυρηνικά γονίδια των βραχιόνων.





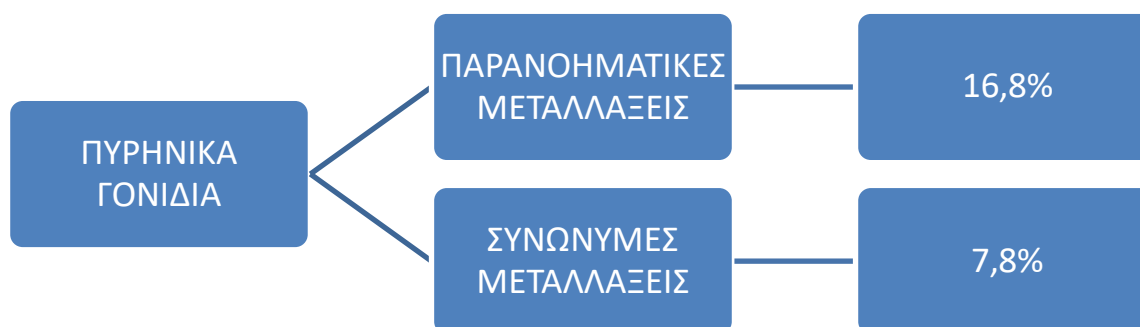
Μόνο πυρηνικά γονίδια



## ΣΥΜΠΛΟΚΟ II

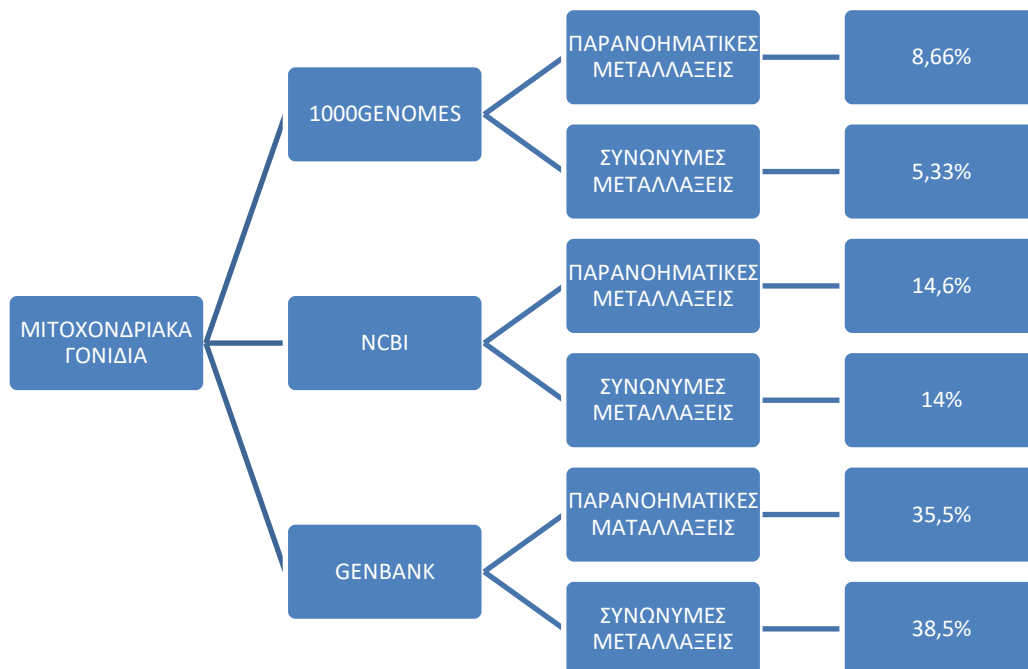
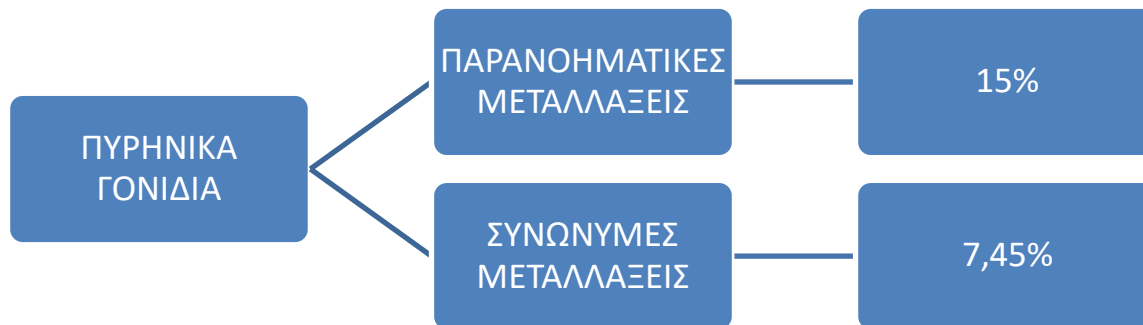
ΓΟΝΙΔΙΟ	ΣΥΝΩΝΥΜΕΣ (%)	ΑΝΤΙΝΟΗΜΑΤΙΚΕΣ (%)
SDHA	9,7%	18%
SDHAF1	7%	10%
SDHAF2	6,7%	16,5%
SDHB	6%	17%
SDHC	6,6%	16%
SDHD	6%	18%

Το σύμπλοκο II δεν έχει μιτοχονδριακά γονίδια οπότε μετρήθηκε μόνο το ποσοστό για τις πυρηνικές μεταλλάξεις.



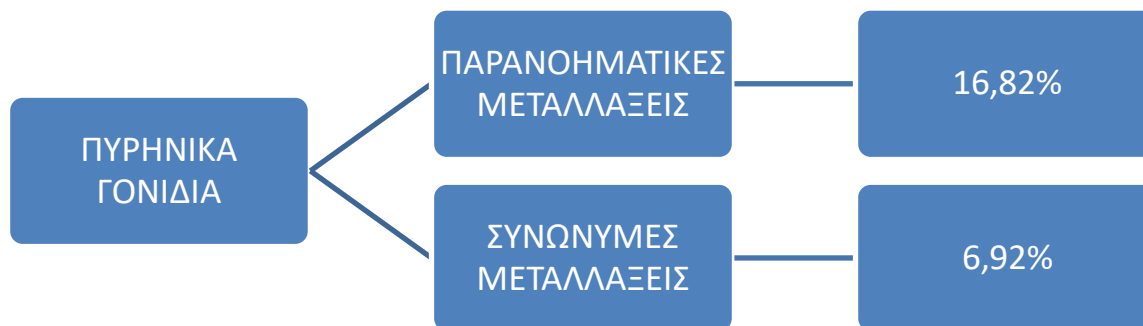
## ΣΥΜΠΛΟΚΟ III

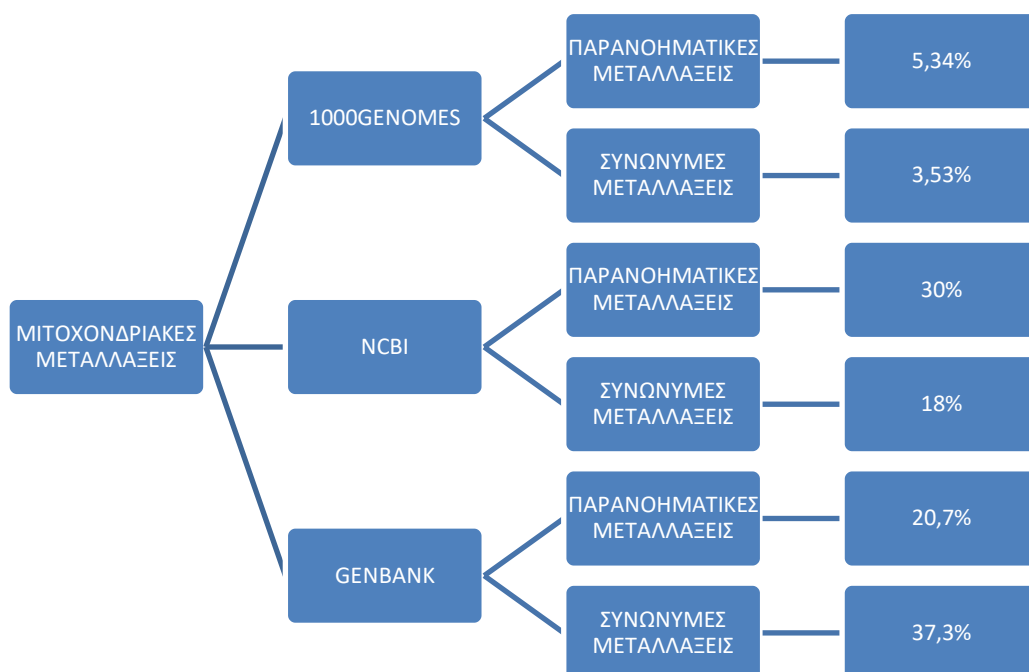
ΓΟΝΙΔΙΑ	ΣΥΝΩΝΥΜΕΣ (%)	ΑΝΤΙΝΟΗΜΑΤΙΚΕΣ
MT-CYB	14%	14,6%
CYC1	9,2%	16,7%
UQCRB	5,7%	12,7%
UQCRC1	7,4%	16,4%
UQCRC2	6,1%	14,5%
UQCRFS1	6,3%	9,2%
UQCRH	7,6%	15,6%
UQCRQ	9,6%	15,2%
UQCR10	11%	24,4%
UQCR11	11,1%	19,9%



#### ΣΥΜΠΛΟΚΟ IV

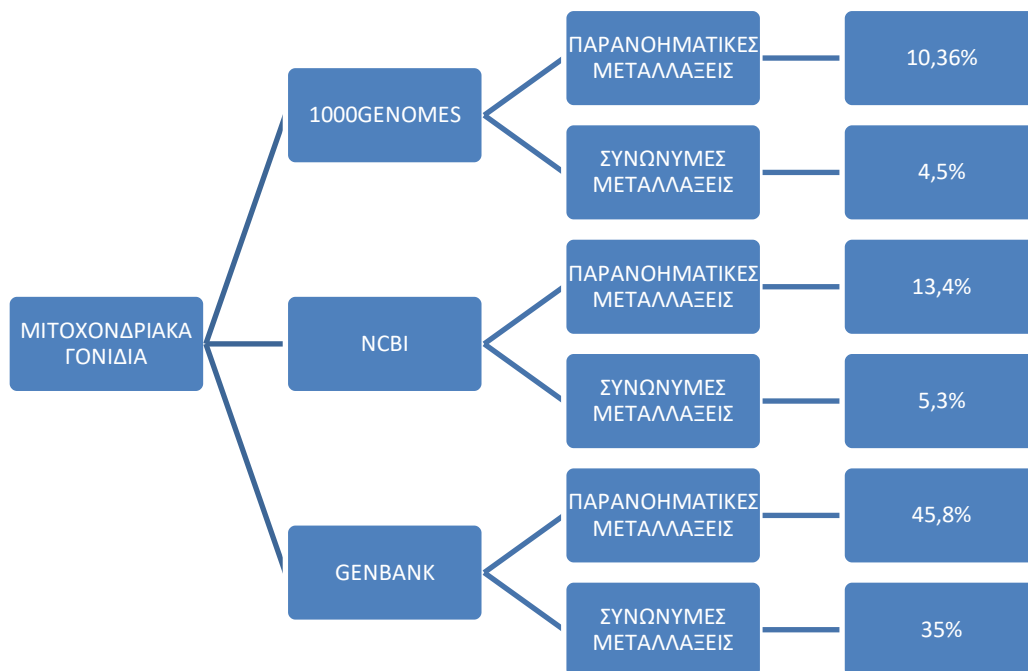
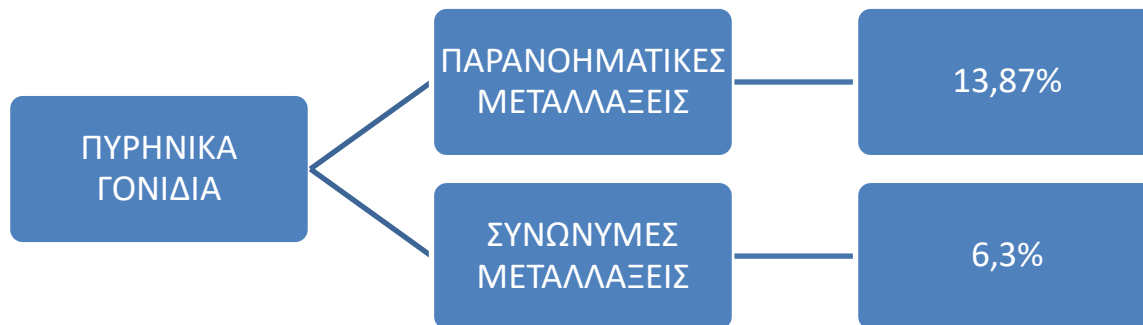
ΓΟΝΙΔΙΑ	ΑΝΤΙΝΟΗΜΑΤΙΚΕΣ (%)	ΣΥΝΩΝΥΜΕΣ (%)
COX4I1	19,6%	10%
COX4I2	16,4%	6,4%
COX5A	12%	4,5%
COX5B	10,5%	4,1%
COX6A1	22,1%	9,4%
COX6A2	16,6%	5,1%
COX6B1	17,6%	6,9%
COX6B2	14,6%	7,5%
COX6C	26,3%	5,2%
COX7A1	14,1%	8%
COX7A2	19%	11,2%
COX7B	12,3%	5%
COX7B2	27,6%	5,2%
COX7C	13,5%	5,7%
COX8A	16,2%	7,1%
COX8C	22%	7,7%
MT-CO1	23,6%	14,1%
MT-CO2	30%	21,5%
MT-CO3	42,6%	23%





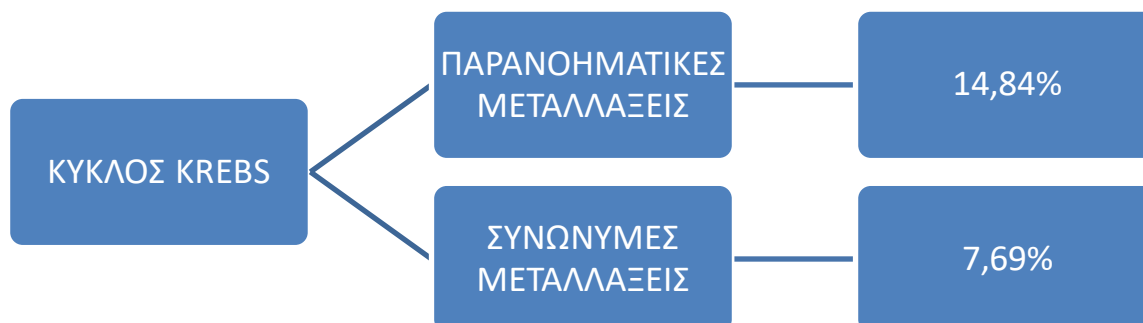
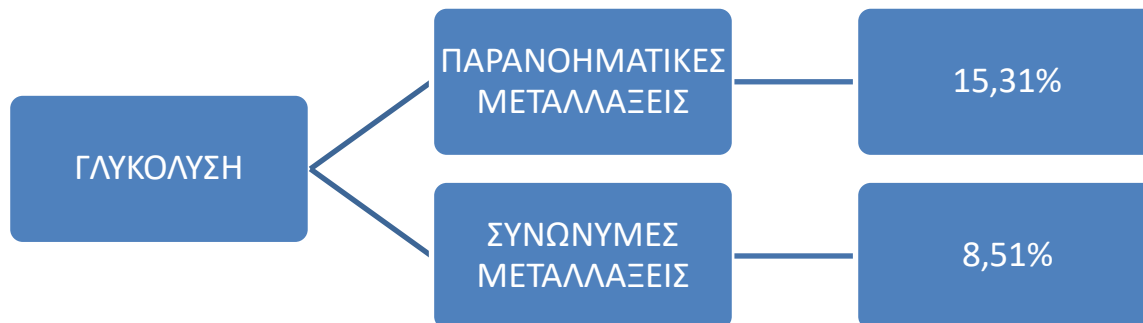
## ΣΥΜΠΛΟΚΟ V

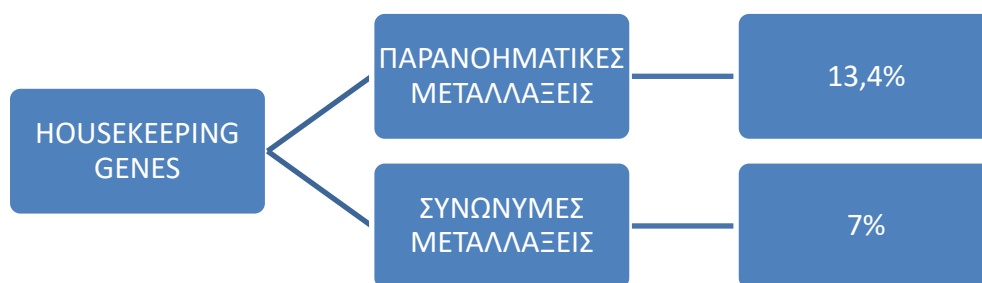
ΓΟΝΙΔΙΑ	ΑΝΤΙΝΟΗΜΑΤΙΚΕΣ (%)	ΣΥΝΩΝΥΜΕΣ (%)
ATP1F1	18%	4,3%
ATP5A1	12,4%	6,4%
ATP5B	9,6%	6,1%
ATP5C1	15,1%	4,7%
ATP5D	13,2%	7,9%
ATP5E	15,3%	8,3%
ATP5F1	16%	6,5%
ATP5G1	12,1%	5,5%
ATP5G2	15,2%	8%
ATP5G3	9,5%	6,7%
ATP5H	11,7%	5,1%
ATP5I	19,5%	8%
ATP5J	18,6%	4,4%
ATP5J2	23,2%	7%
ATP5L	15,3%	8,3%
ATP5L2	18,1%	9%
ATP5O	14,6%	5,1%
MT-ATP6	15,2%	6%
MT-ATP8	7,2%	3,3%





Επίσης πραγματοποιήθηκε μέτρηση παρανοηματικών και συνώνυμων μεταλλάξεων για τα γονίδια του κύκλου του Krebs, της γλυκόλυσης και housekeeping γονιδίων για σύγκριση.





Τα housekeeping γονίδια τα οποία χρησιμοποιήθηκαν για την σύγκριση αλλά κ η λειτουργία του ήταν η εξής:

ΟΝΟΜΑ ΓΟΝΙΔΙΟΥ	ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ
ARL1	ADP-ribosylation factor-like 1
ATF2	Activating transcription factor 2
CHMP2A	Charged multivesicular body protein 2A
AUH	AU RNA binding protein/enoyl-CoA hydratase
BCAT2	Branched chain amino-acid transaminase 2
CASP3	Caspase 3, apoptosis-related cysteine peptidase
CCNH	Cyclin H
DLD	dihydrolipoamide dehydrogenase
DPM1	Dolichyl-phosphate mannosyltransferase polypeptide 1
EEF2	Eukaryotic translation elongation factor 2
EIF2A	Eukaryotic translation initiation factor 2A
FAF1	Fas (TNFRSF6) associated factor 1
LETM1	leucine zipper-EF-hand containing transmembrane protein 1
HAGH	Hydroxyacylglutathione hydrolase
ILF2	Interleukin enhancer binding factor 2
KDSR	3-ketodihydrosphingosine reductase
LAMP1	Lysosomal-associated membrane protein 1
MCU	Mitochondrial calcium uniporter
MPI	Mannose phosphate isomerase
NQO1	NAD(P)H dehydrogenase, quinone 1
OGT	O-linked N-acetylglucosamine (GlcNAc) transferase
PHKB	Phosphorylase kinase, beta
PPID	Peptidylprolyl isomerase D

Συνολικά τα ποσοστά εμφάνισης μεταλλάξεων για τα γονίδια των συμπλόκων της οξειδωτικής φωσφορύλωσης, της γλυκόλυσης, του κύκλου Krebs και των γονιδίων συντήρησης παρουσιάζεται παρακάτω:

	ΠΥΡΗΝΙΚΑ ΓΟΝΙΔΙΑ	
Σύμπλοκα	Παρανοηματικές	Συνώνυμες
I	16%	6,7%
II	16,8%	7,8%
III	15%	7,45%
IV	16,82%	6,92%
V	13,85%	6,3%
Γλυκόλυση	15,31%	8,51%
Krebs	14,84%	7,69%
Housekeeping	13,4%	7%

Και αντίστοιχα για τα μιτοχονδριακά γονίδια

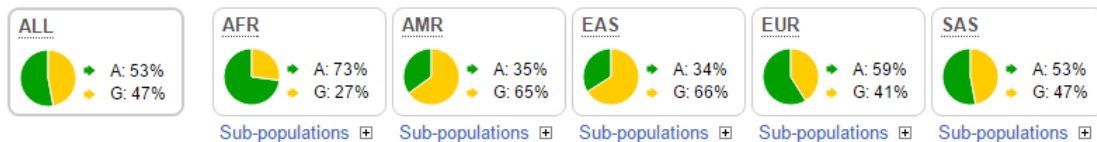
	ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΑ ΓΟΝΙΔΙΑ	
Σύμπλοκα	Παρανοηματικές (1000G/NCBI/GENBANK)	Συνώνυμες (1000G/NCBI/GENBANK)
I	6,86%/11,4%/21,4%	4%/6,5%/38%
II	-	-
III	8,66%/14,6%/35,5%	5,33%/14%/38,5%
IV	5,34%/30%/20,7%	3,53%/18%/37,3%
V	10,36%/13,4%/45,8%	4,5%/5,3%/35%
Γλυκόλυση	-	-
Krebs	-	-
Housekeeping	-	-

# ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

## ΣΥΜΠΛΟΚΟ Ι

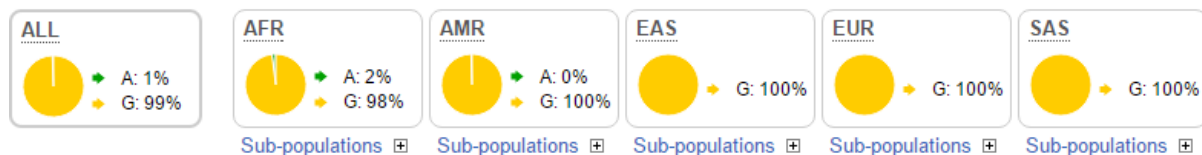
rs10595

### 1000 Genomes Project Phase 3 allele frequencies



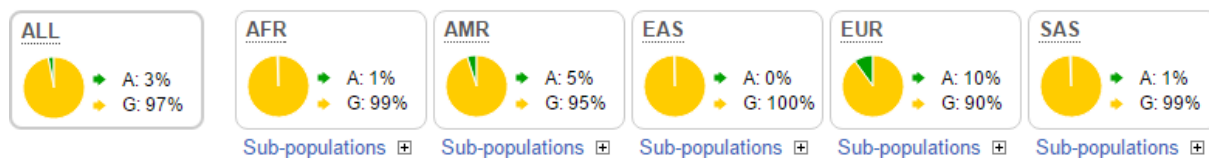
rs114225578

### 1000 Genomes Project Phase 3 allele frequencies



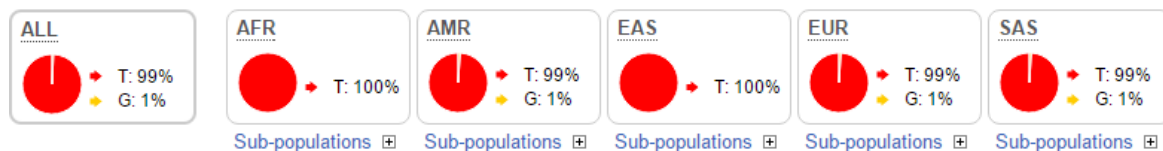
rs12980262

### 1000 Genomes Project Phase 3 allele frequencies



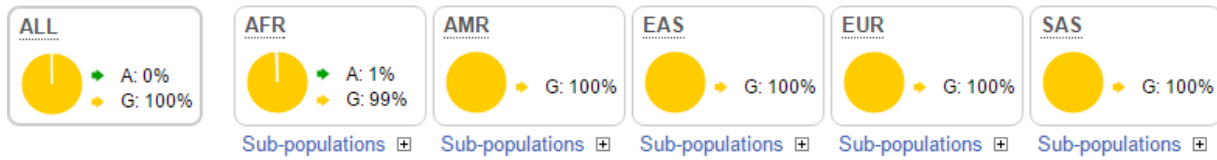
rs12986323

### 1000 Genomes Project Phase 3 allele frequencies



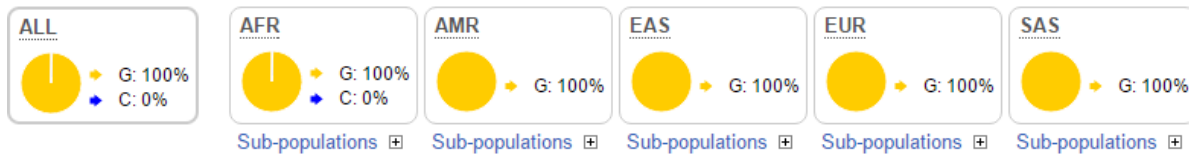
rs138059203

1000 Genomes Project Phase 3 allele frequencies



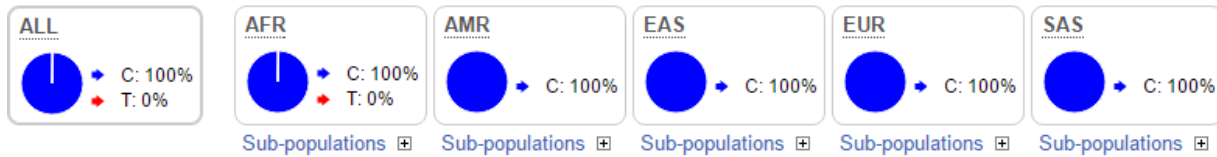
rs138358975

1000 Genomes Project Phase 3 allele frequencies



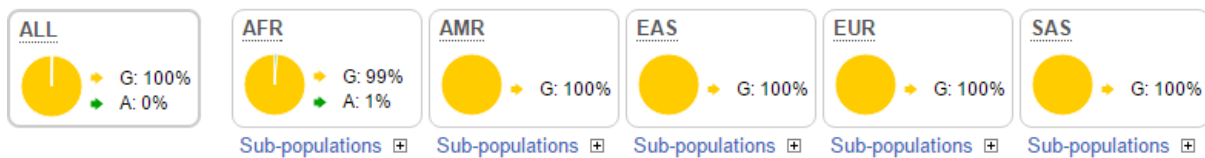
rs138379386

1000 Genomes Project Phase 3 allele frequencies



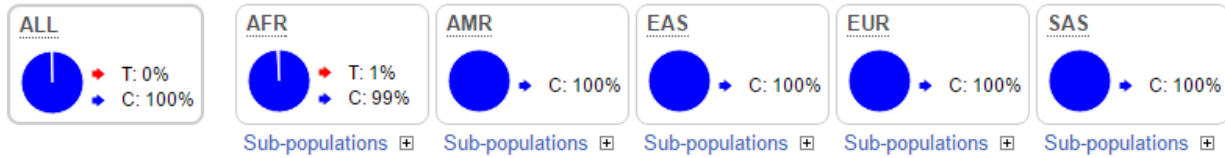
rs138941073

1000 Genomes Project Phase 3 allele frequencies



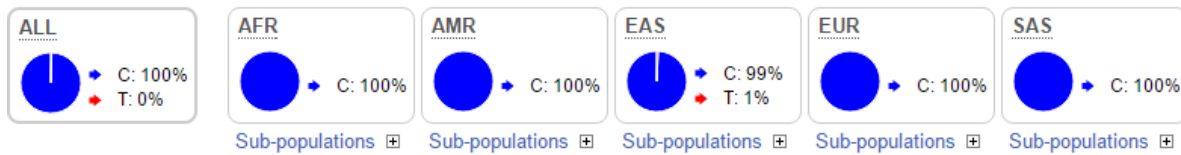
rs139346586

1000 Genomes Project Phase 3 allele frequencies



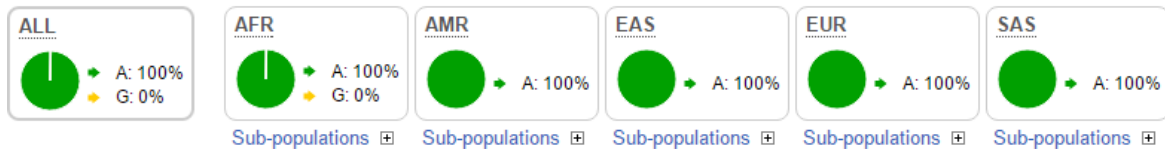
rs139425696

1000 Genomes Project Phase 3 allele frequencies



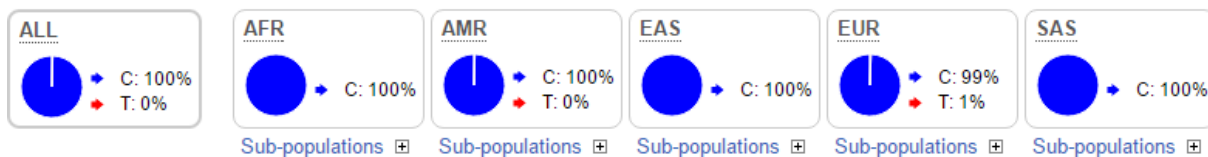
rs139674448

1000 Genomes Project Phase 3 allele frequencies



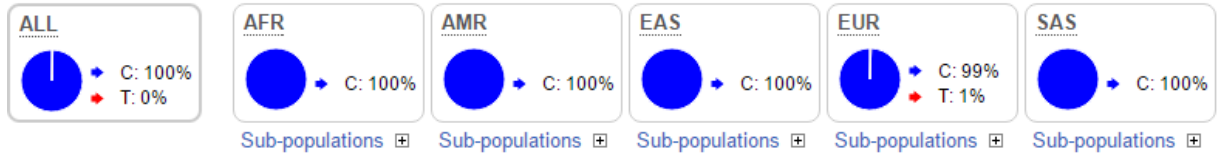
rs139679834

1000 Genomes Project Phase 3 allele frequencies



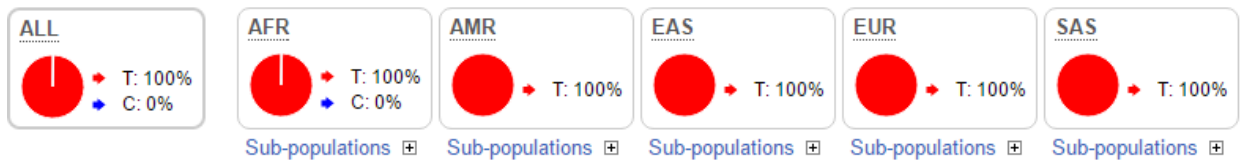
rs139981425

1000 Genomes Project Phase 3 allele frequencies



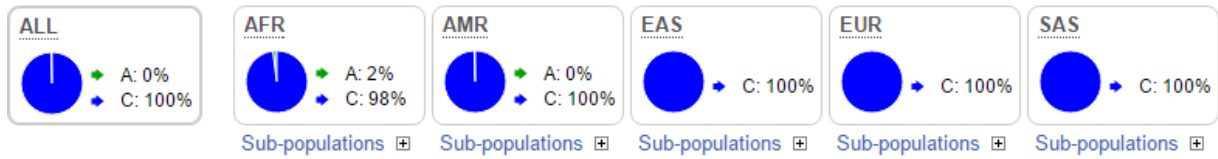
rs140417066

1000 Genomes Project Phase 3 allele frequencies



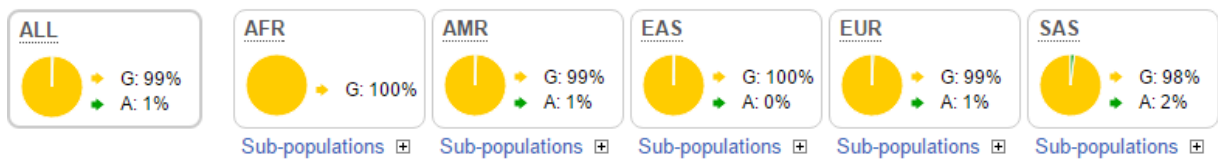
rs140619622

1000 Genomes Project Phase 3 allele frequencies



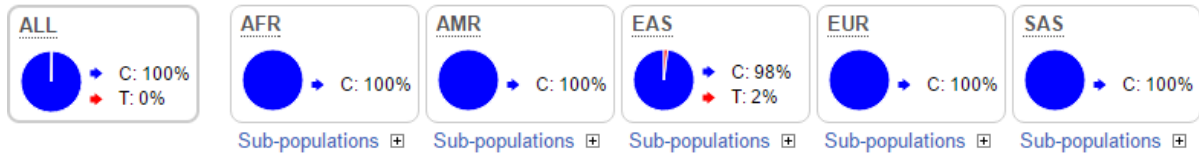
rs141475669

1000 Genomes Project Phase 3 allele frequencies



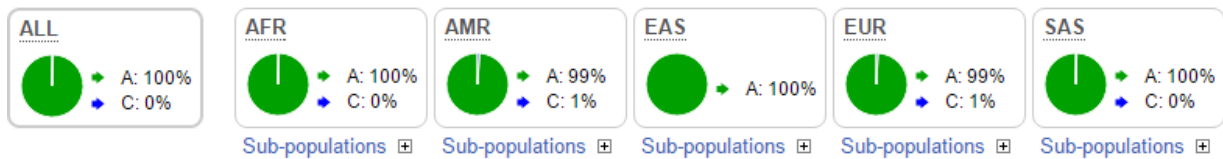
rs141801241

1000 Genomes Project Phase 3 allele frequencies



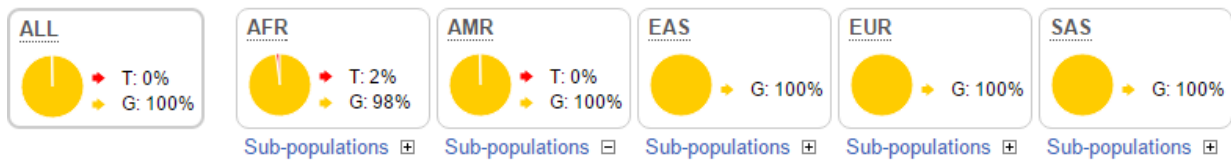
rs141922962

1000 Genomes Project Phase 3 allele frequencies



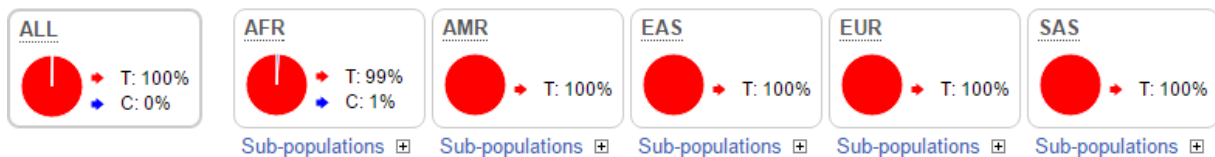
rs142723791

1000 Genomes Project Phase 3 allele frequencies



rs142741532

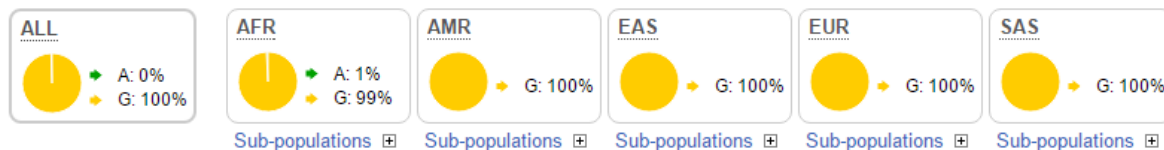
1000 Genomes Project Phase 3 allele frequencies





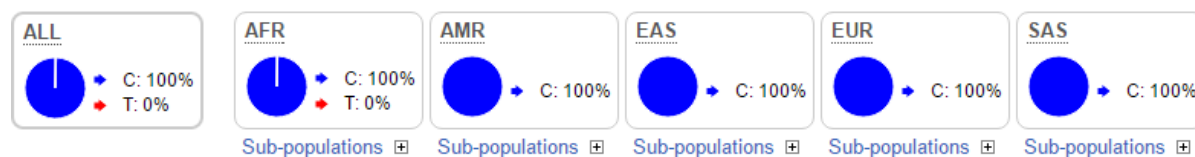
rs142961225

1000 Genomes Project Phase 3 allele frequencies



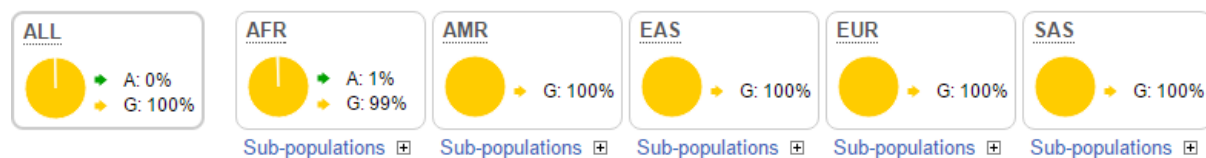
rs143941062

1000 Genomes Project Phase 3 allele frequencies



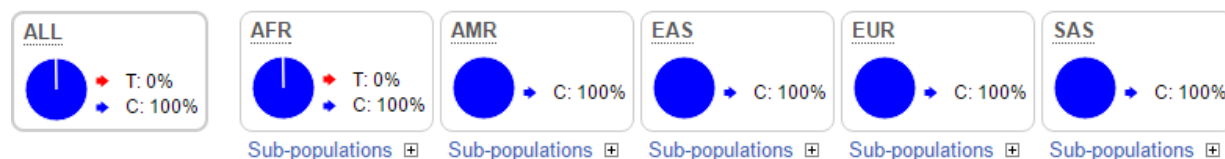
rs145033355

1000 Genomes Project Phase 3 allele frequencies



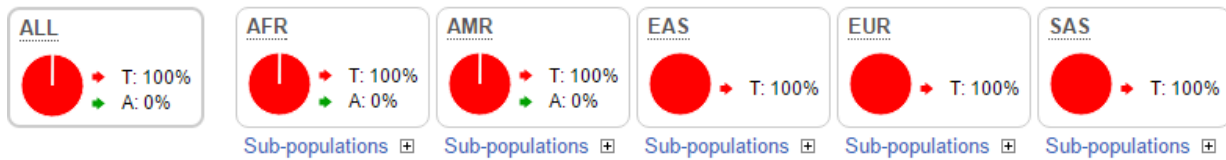
rs145205809

1000 Genomes Project Phase 3 allele frequencies



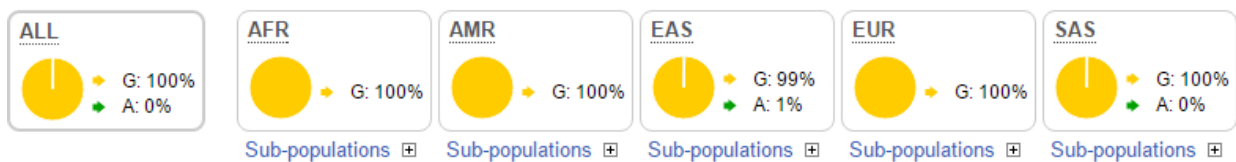
rs145347909

1000 Genomes Project Phase 3 allele frequencies



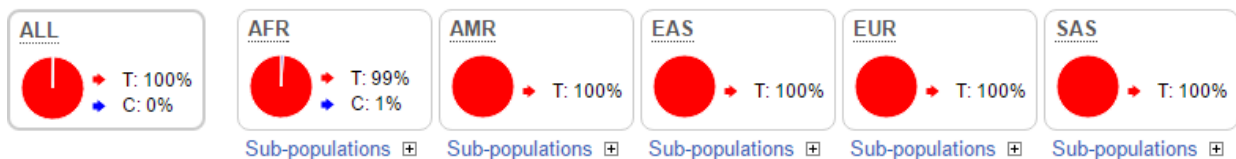
rs146044204

1000 Genomes Project Phase 3 allele frequencies



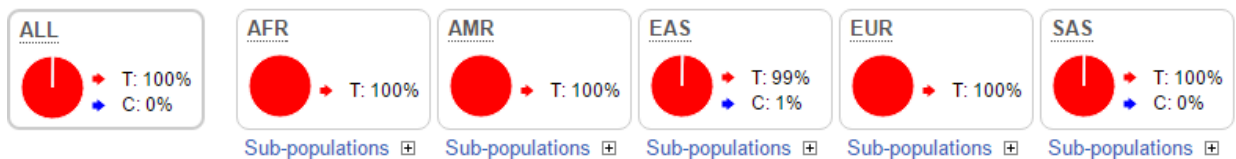
rs146105751

1000 Genomes Project Phase 3 allele frequencies



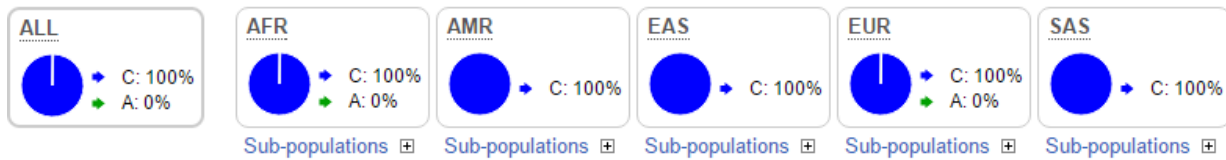
rs146190369

1000 Genomes Project Phase 3 allele frequencies



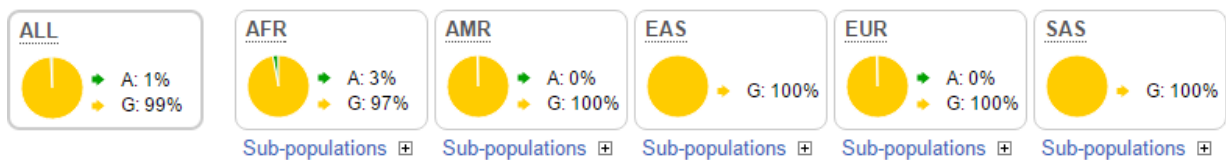
rs146279654

1000 Genomes Project Phase 3 allele frequencies



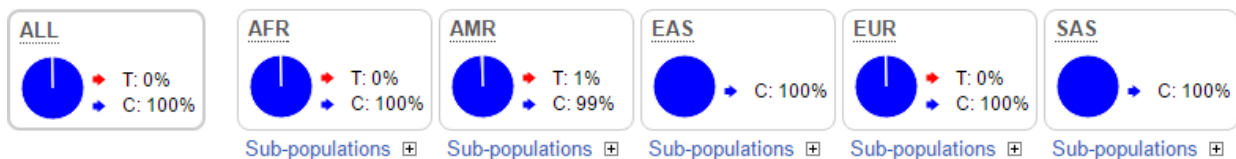
rs146562956

1000 Genomes Project Phase 3 allele frequencies



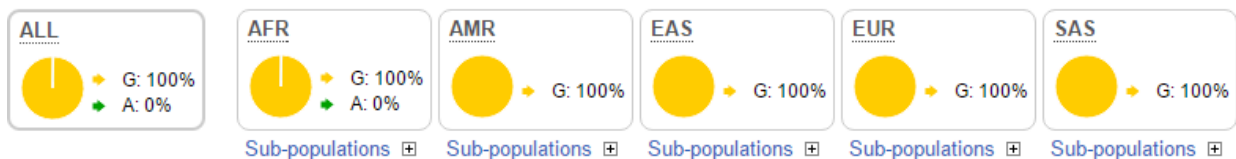
rs147044660

1000 Genomes Project Phase 3 allele frequencies



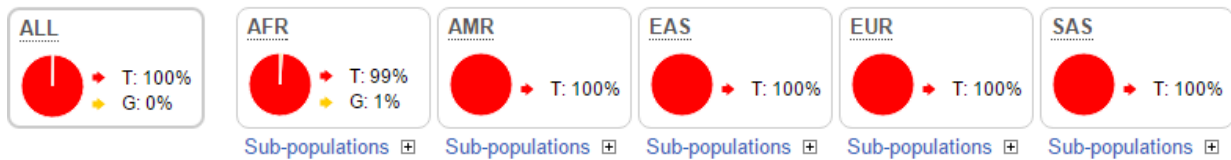
rs147356577

1000 Genomes Project Phase 3 allele frequencies



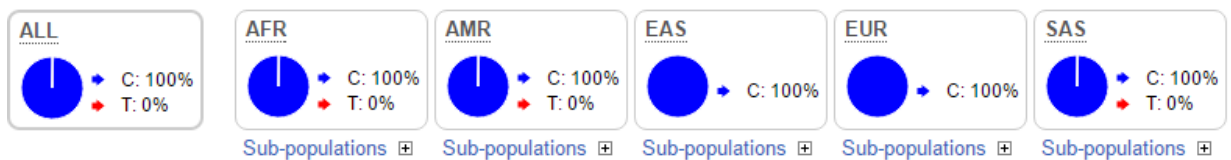
rs147407002

1000 Genomes Project Phase 3 allele frequencies



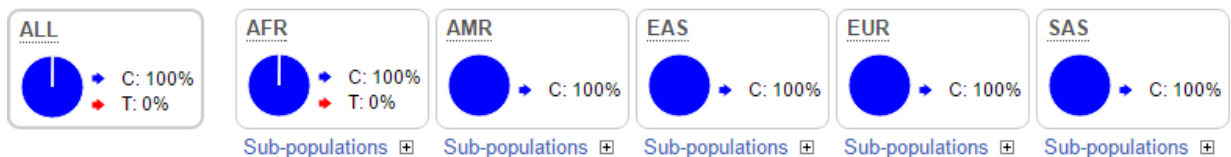
rs147644672

1000 Genomes Project Phase 3 allele frequencies



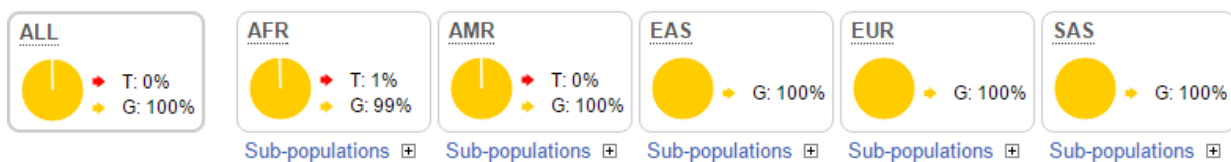
rs148054698

1000 Genomes Project Phase 3 allele frequencies



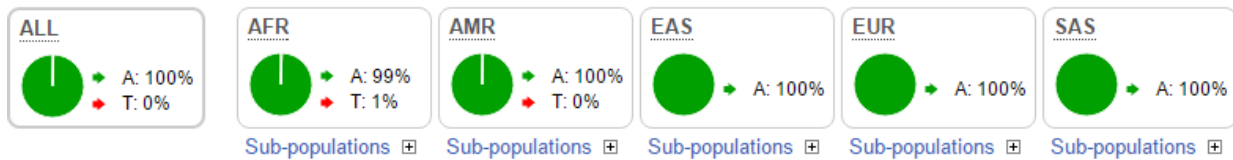
rs148477287

1000 Genomes Project Phase 3 allele frequencies



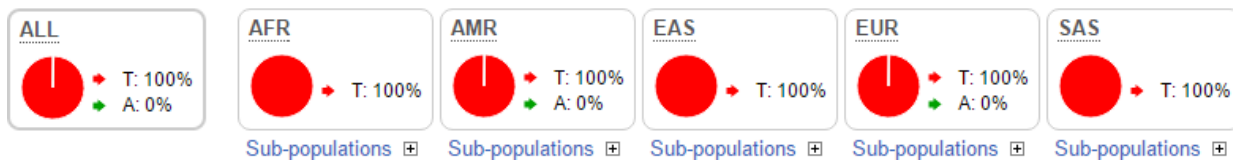
rs148532160

1000 Genomes Project Phase 3 allele frequencies



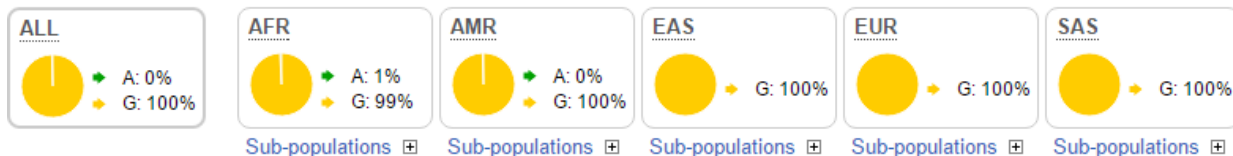
rs149760197

1000 Genomes Project Phase 3 allele frequencies



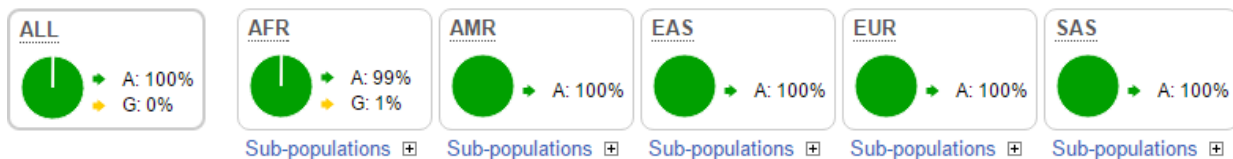
rs149936746

1000 Genomes Project Phase 3 allele frequencies



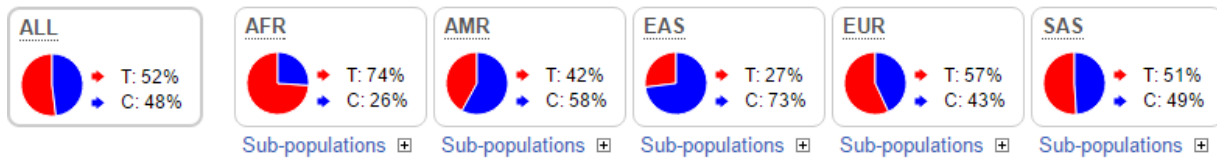
rs150414052

1000 Genomes Project Phase 3 allele frequencies



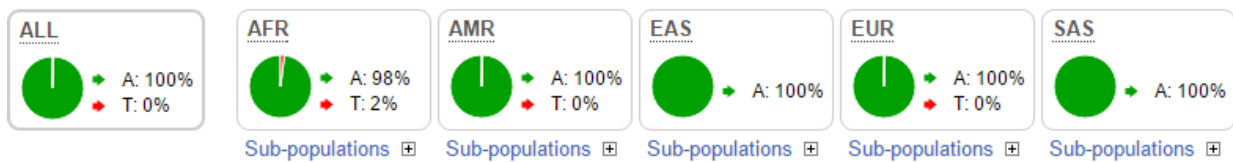
rs1678868

1000 Genomes Project Phase 3 allele frequencies



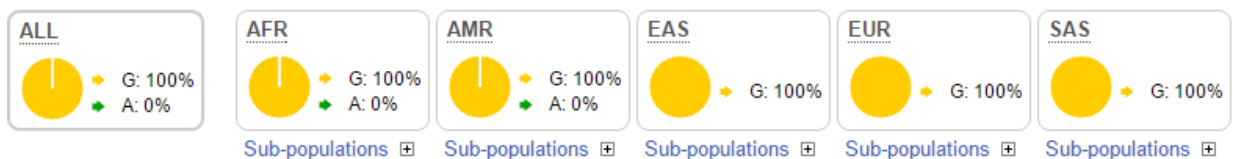
rs1802224

1000 Genomes Project Phase 3 allele frequencies



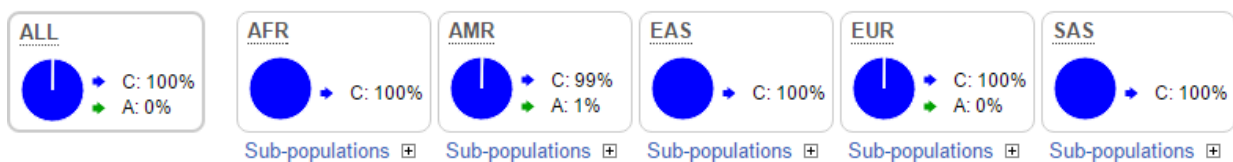
rs180920547

1000 Genomes Project Phase 3 allele frequencies



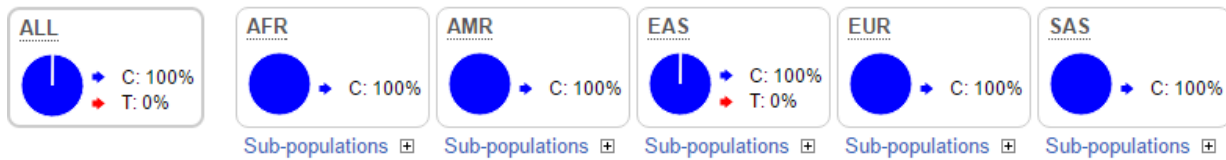
rs183288709

1000 Genomes Project Phase 3 allele frequencies



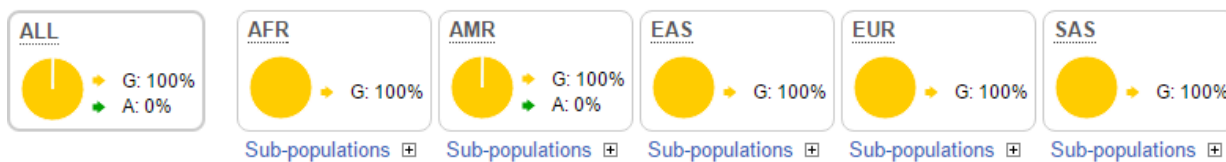
rs183610034

1000 Genomes Project Phase 3 allele frequencies



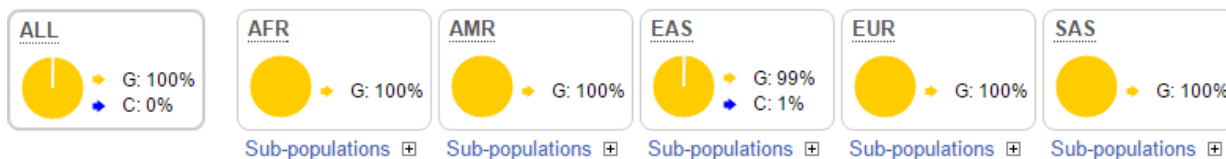
rs185514139

1000 Genomes Project Phase 3 allele frequencies



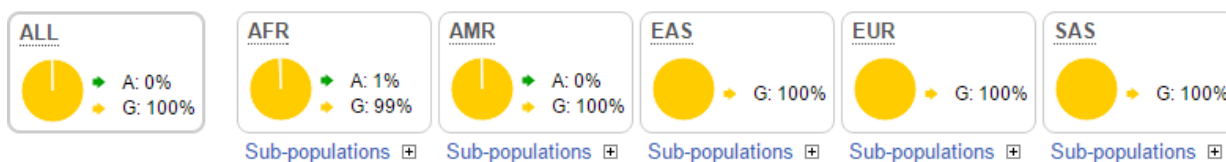
rs185711494

1000 Genomes Project Phase 3 allele frequencies



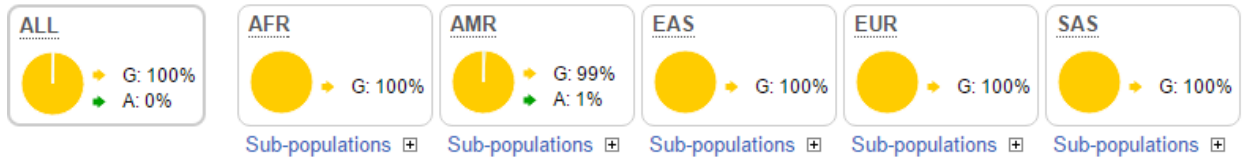
rs187649924

1000 Genomes Project Phase 3 allele frequencies



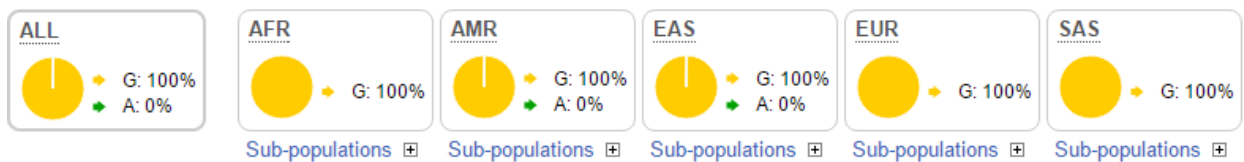
rs188404702

1000 Genomes Project Phase 3 allele frequencies



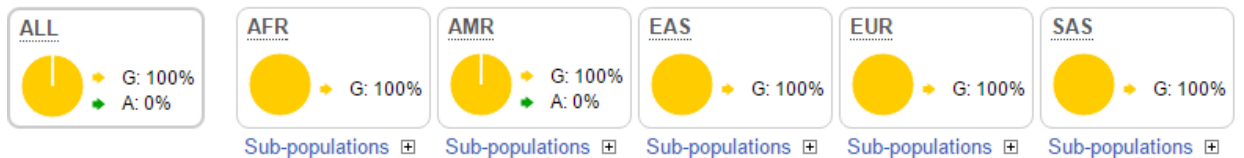
rs188726115

1000 Genomes Project Phase 3 allele frequencies



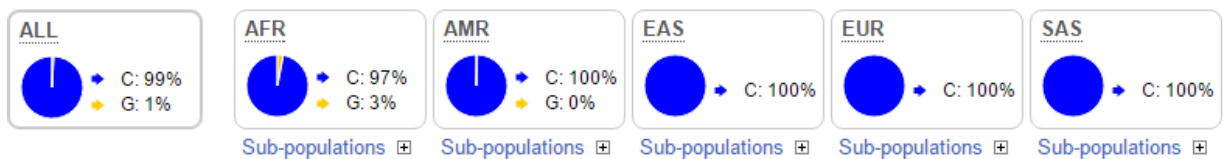
rs190678946

1000 Genomes Project Phase 3 allele frequencies



rs192066309

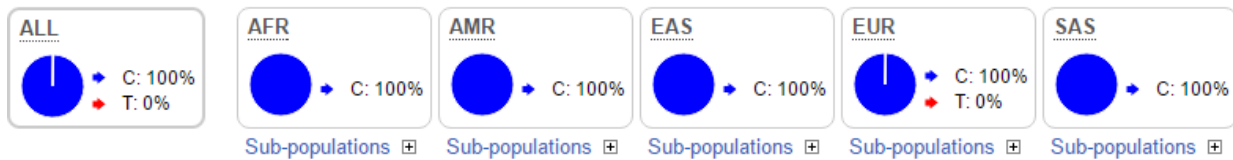
1000 Genomes Project Phase 3 allele frequencies





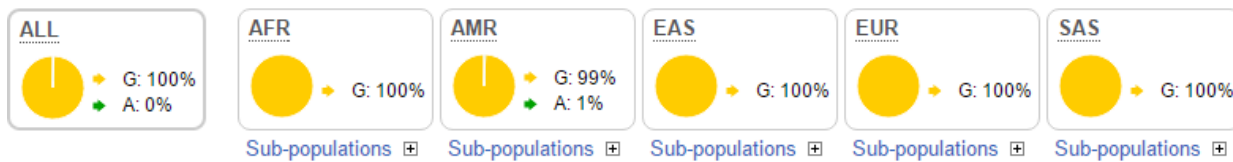
rs192286856

1000 Genomes Project Phase 3 allele frequencies



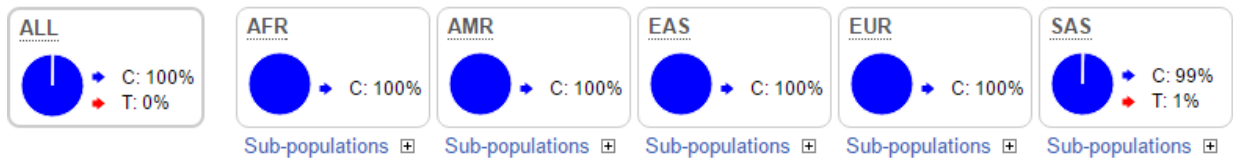
rs192664588

1000 Genomes Project Phase 3 allele frequencies



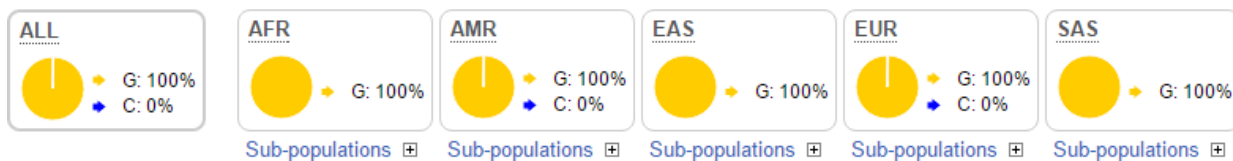
rs199504723

1000 Genomes Project Phase 3 allele frequencies



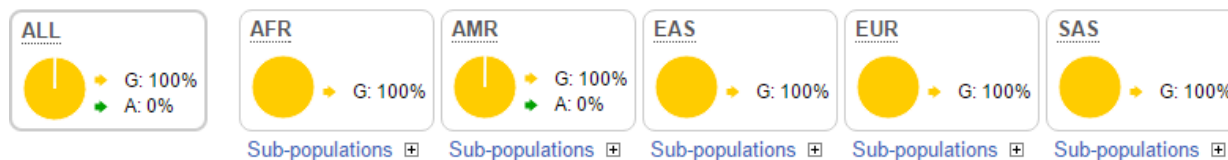
rs199895242

1000 Genomes Project Phase 3 allele frequencies



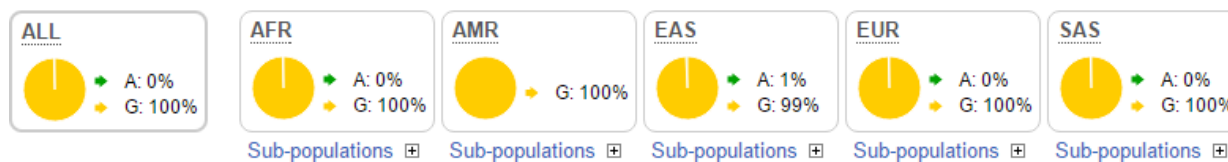
rs200198522

1000 Genomes Project Phase 3 allele frequencies



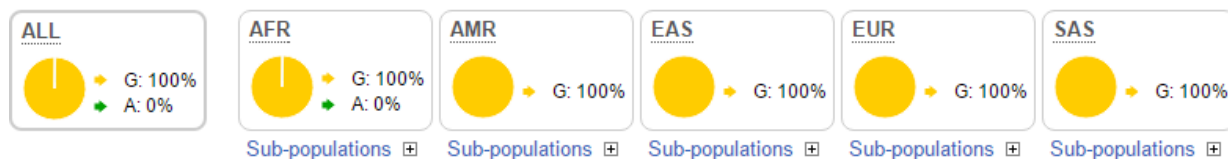
rs200757972

1000 Genomes Project Phase 3 allele frequencies



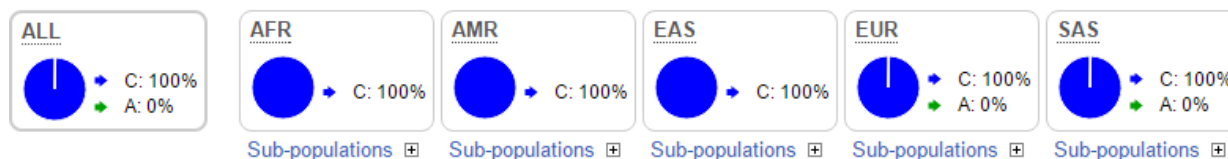
rs200836987

1000 Genomes Project Phase 3 allele frequencies



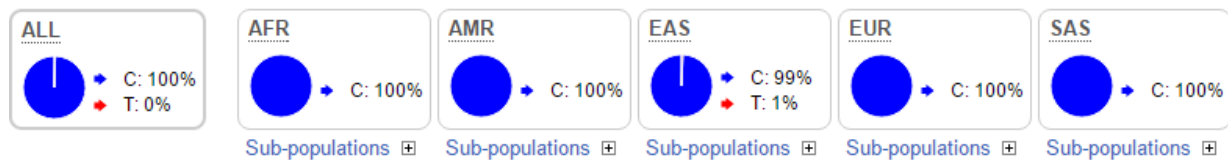
rs200985438

1000 Genomes Project Phase 3 allele frequencies



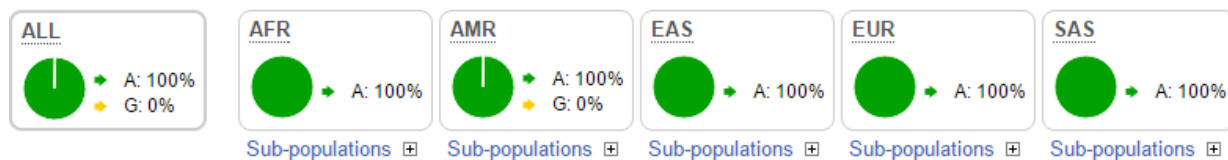
rs201009092

1000 Genomes Project Phase 3 allele frequencies



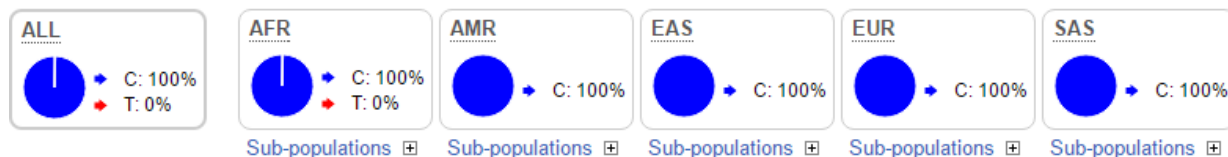
rs201675457

1000 Genomes Project Phase 3 allele frequencies



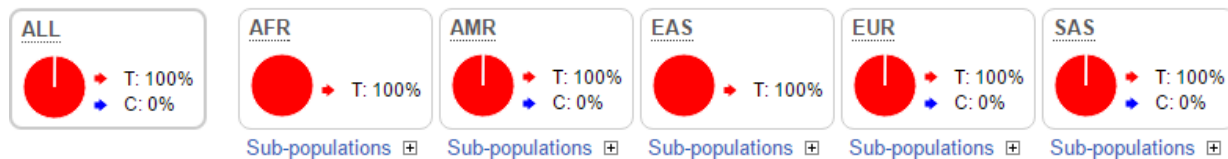
rs201757086

1000 Genomes Project Phase 3 allele frequencies



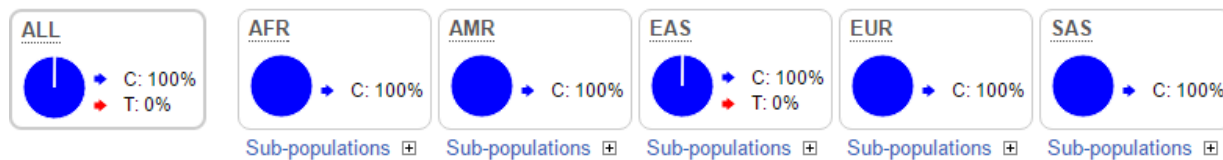
rs2228463

1000 Genomes Project Phase 3 allele frequencies



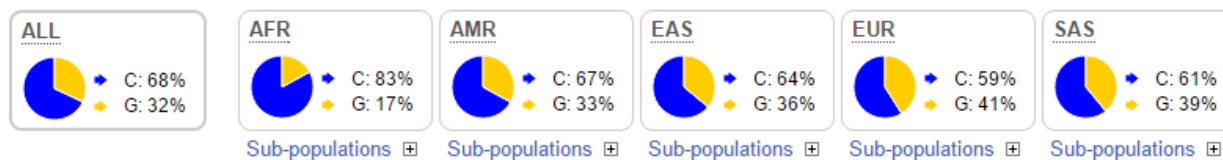
rs2271840

1000 Genomes Project Phase 3 allele frequencies



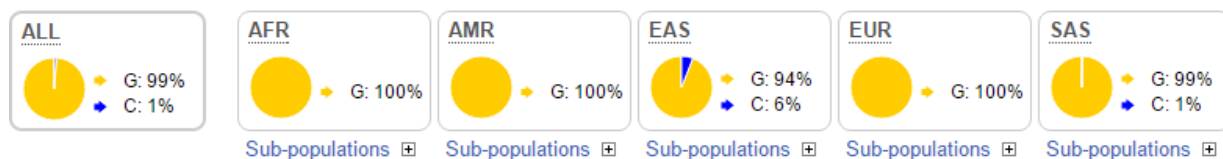
rs2279516

1000 Genomes Project Phase 3 allele frequencies



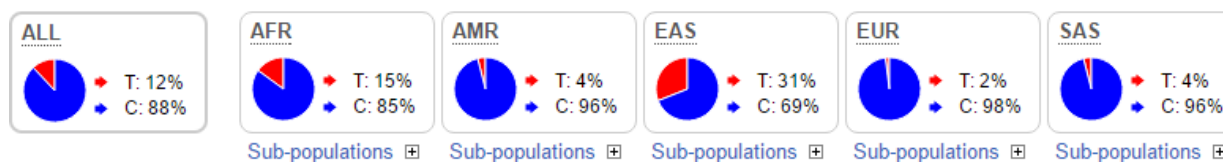
rs2288415

1000 Genomes Project Phase 3 allele frequencies



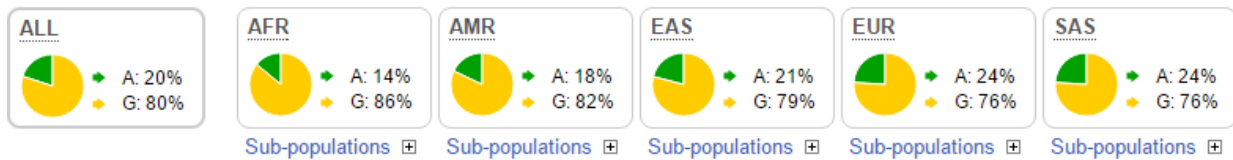
rs2302175

1000 Genomes Project Phase 3 allele frequencies



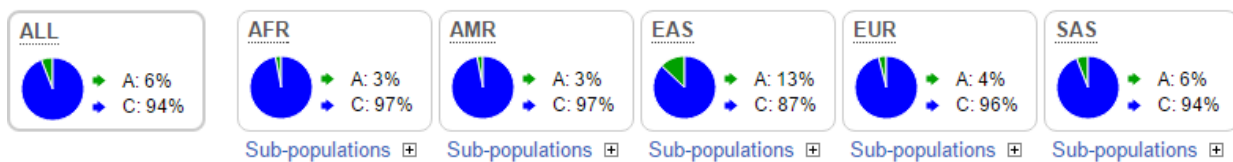
rs31303

1000 Genomes Project Phase 3 allele frequencies



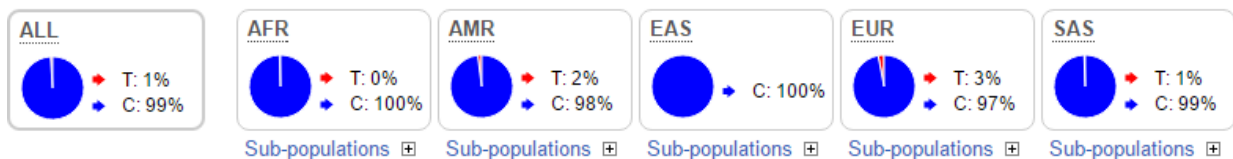
rs31304

1000 Genomes Project Phase 3 allele frequencies



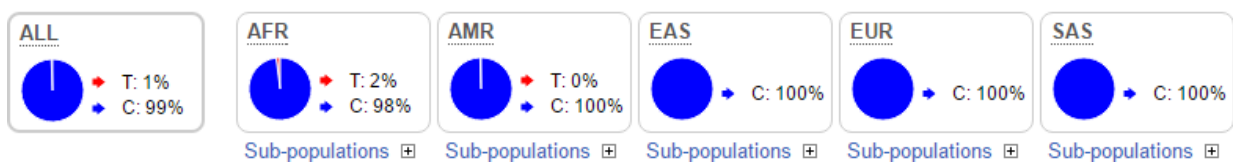
rs34076756

1000 Genomes Project Phase 3 allele frequencies



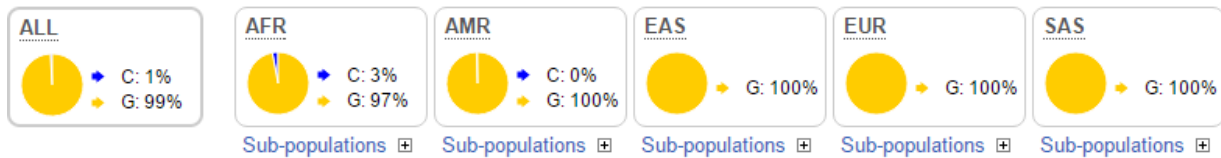
rs35064727

1000 Genomes Project Phase 3 allele frequencies



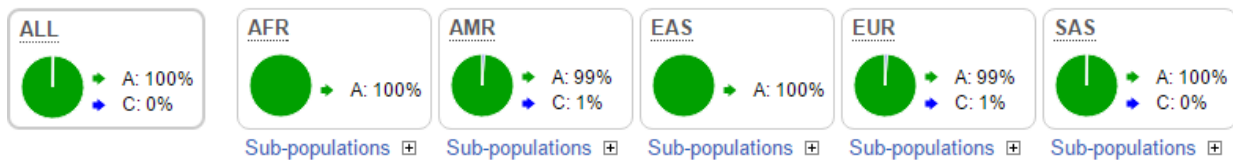
rs35155742

1000 Genomes Project Phase 3 allele frequencies



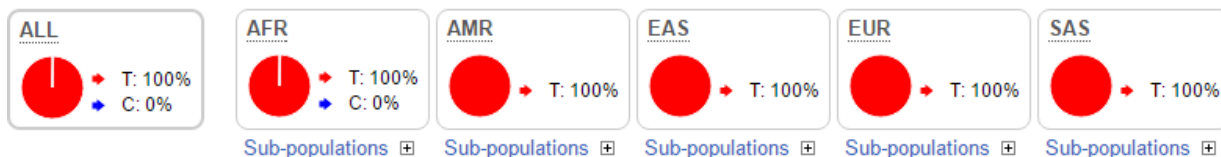
rs35399127

1000 Genomes Project Phase 3 allele frequencies



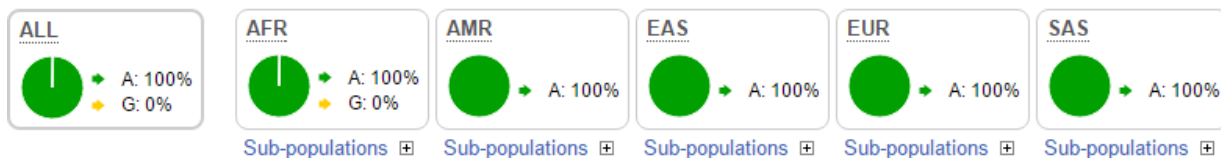
rs374273003

1000 Genomes Project Phase 3 allele frequencies



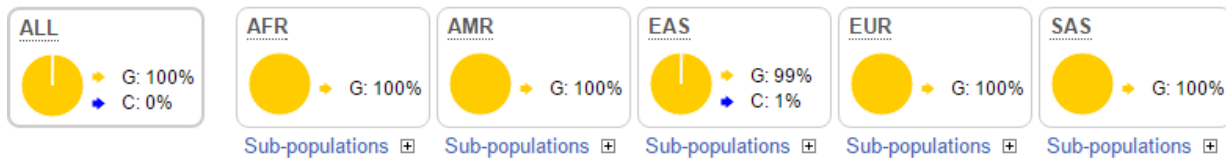
rs375031844

1000 Genomes Project Phase 3 allele frequencies



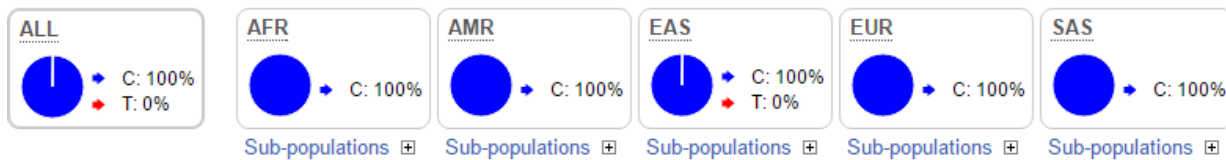
rs3752220

1000 Genomes Project Phase 3 allele frequencies



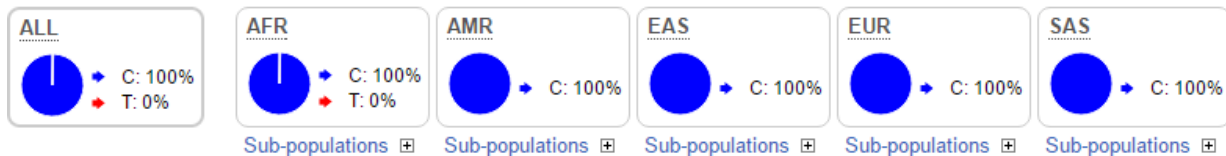
rs376509886

1000 Genomes Project Phase 3 allele frequencies



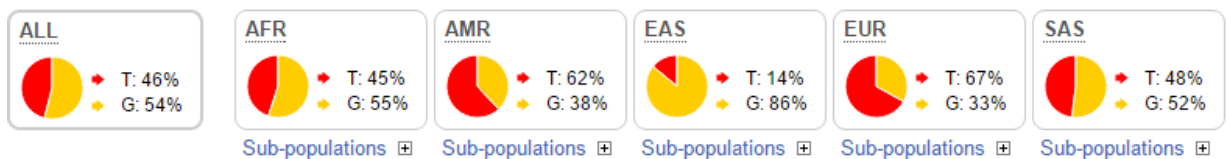
rs376623093

1000 Genomes Project Phase 3 allele frequencies



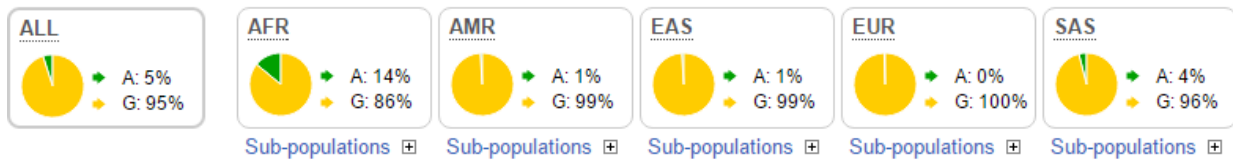
rs3818263

1000 Genomes Project Phase 3 allele frequencies



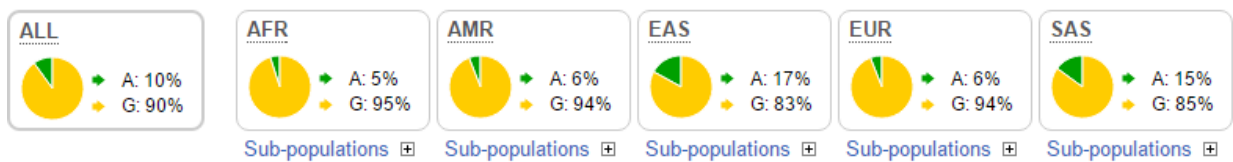
rs4147790

1000 Genomes Project Phase 3 allele frequencies



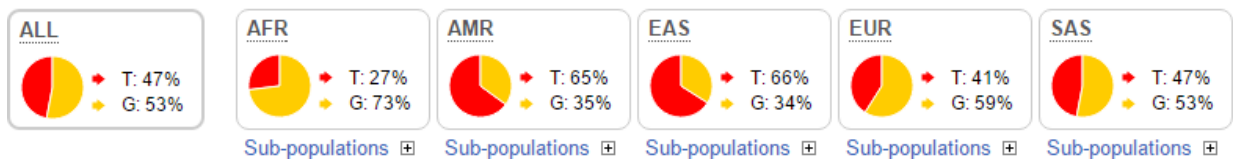
rs4148972

1000 Genomes Project Phase 3 allele frequencies



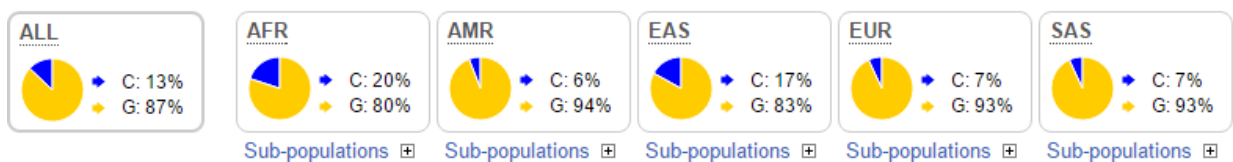
rs4148973

1000 Genomes Project Phase 3 allele frequencies



rs466719

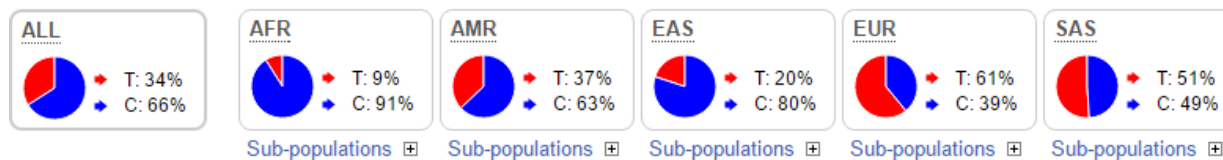
1000 Genomes Project Phase 3 allele frequencies





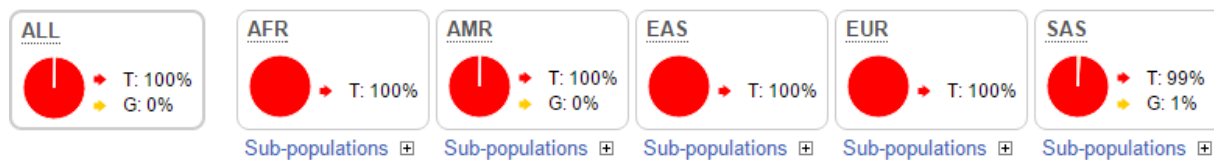
rs4679

1000 Genomes Project Phase 3 allele frequencies



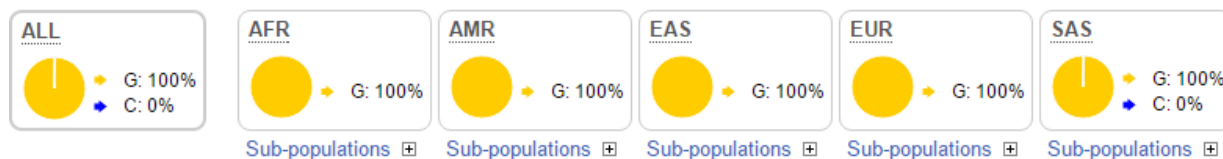
rs527812258

1000 Genomes Project Phase 3 allele frequencies



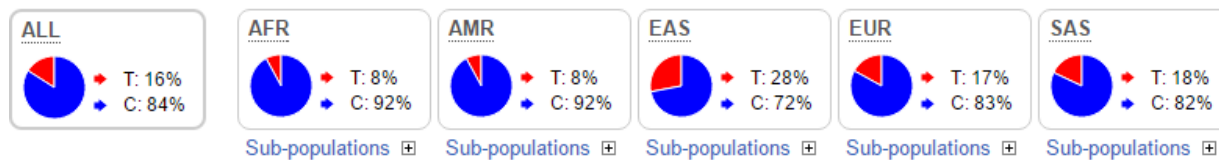
rs534234427

1000 Genomes Project Phase 3 allele frequencies



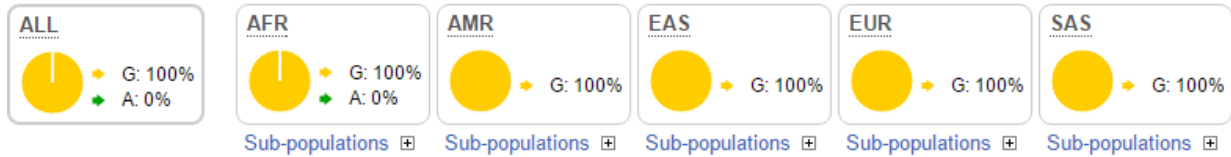
rs534418

1000 Genomes Project Phase 3 allele frequencies



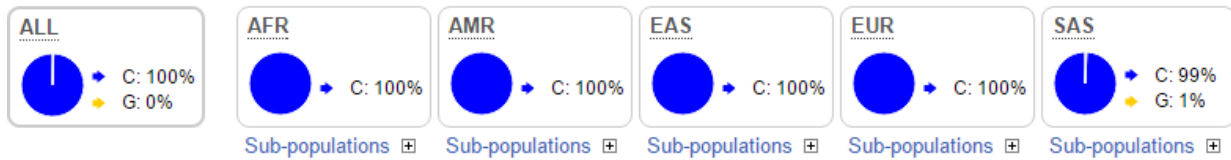
rs536256551

1000 Genomes Project Phase 3 allele frequencies



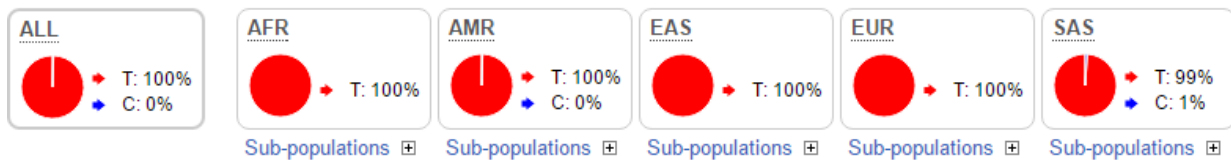
rs541073655

1000 Genomes Project Phase 3 allele frequencies



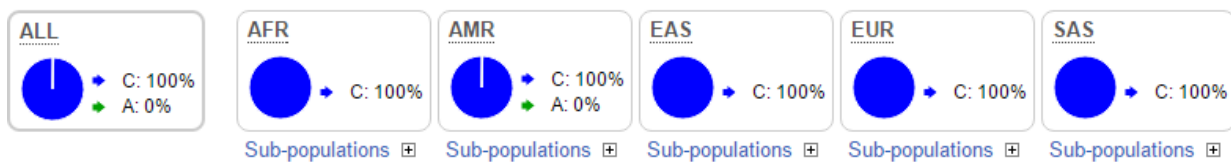
rs549356220

1000 Genomes Project Phase 3 allele frequencies



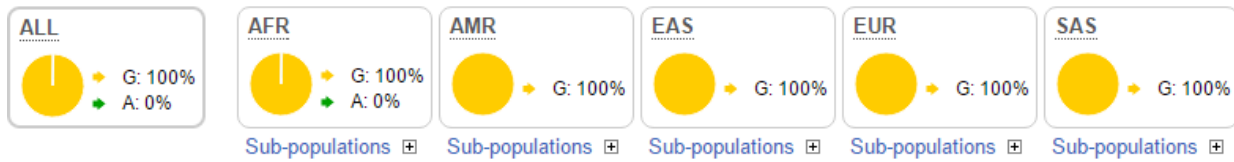
rs549509637

1000 Genomes Project Phase 3 allele frequencies



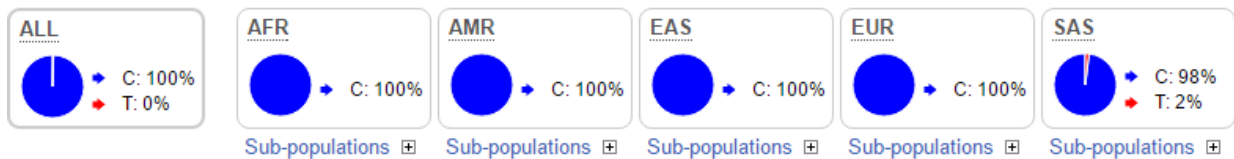
rs554508872

1000 Genomes Project Phase 3 allele frequencies



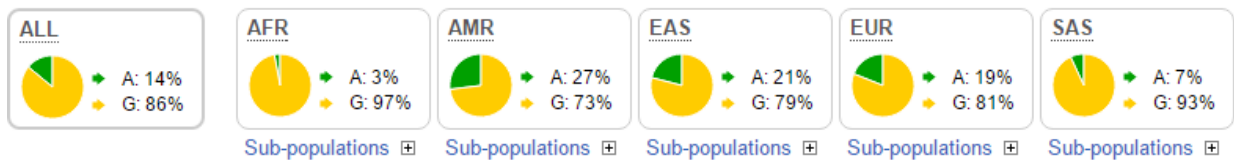
rs557664551

1000 Genomes Project Phase 3 allele frequencies



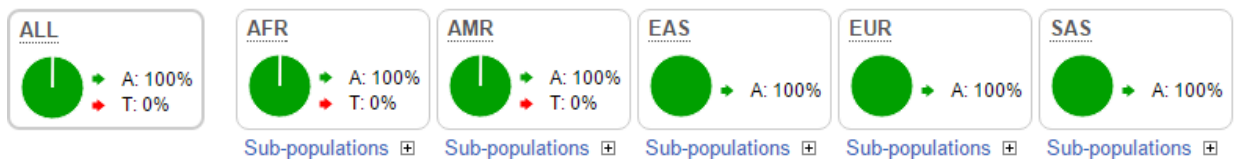
rs561

1000 Genomes Project Phase 3 allele frequencies



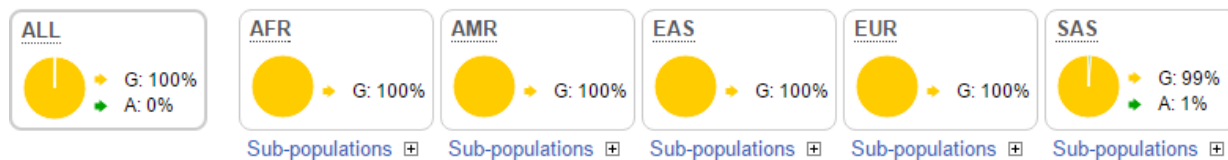
rs563761118

1000 Genomes Project Phase 3 allele frequencies



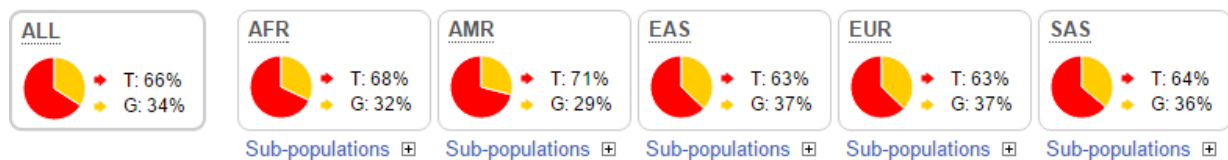
rs567165467

1000 Genomes Project Phase 3 allele frequencies



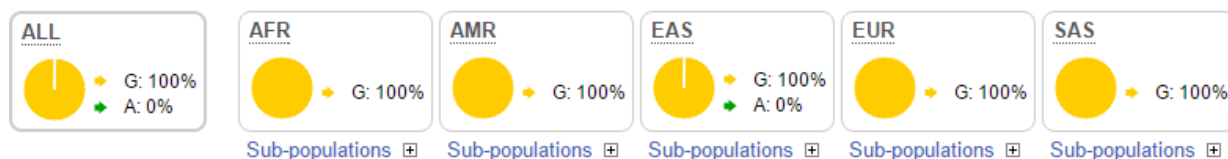
rs567848583

1000 Genomes Project Phase 3 allele frequencies



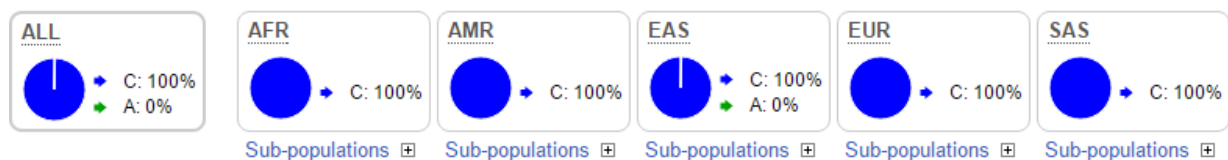
rs567960607

1000 Genomes Project Phase 3 allele frequencies



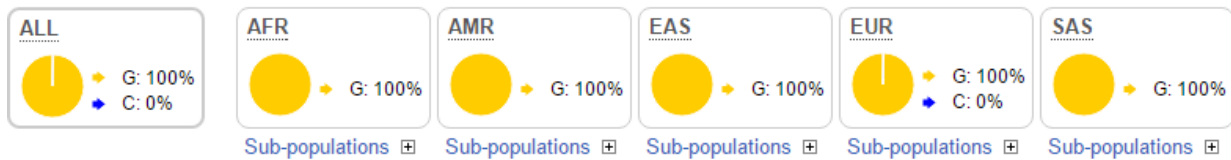
rs574729455

1000 Genomes Project Phase 3 allele frequencies



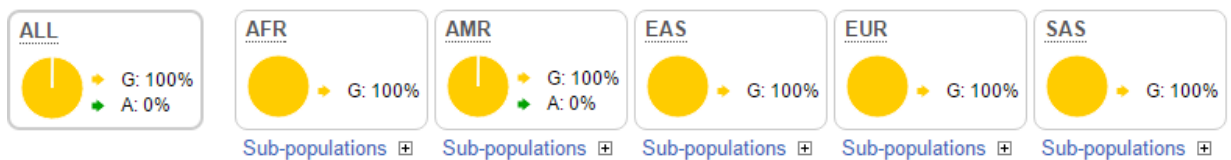
rs575960075

1000 Genomes Project Phase 3 allele frequencies



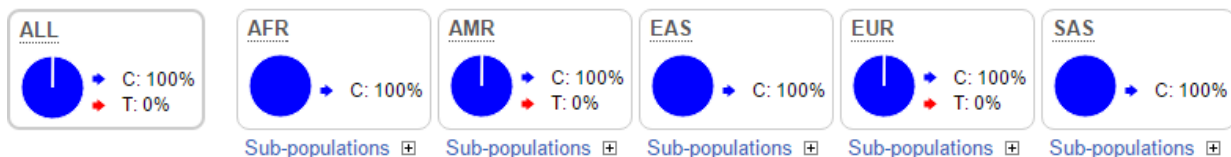
rs576180546

1000 Genomes Project Phase 3 allele frequencies



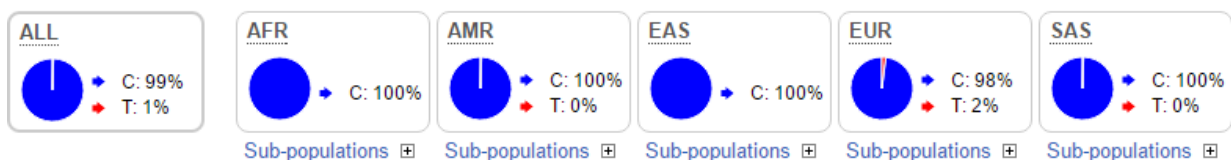
rs577914511

1000 Genomes Project Phase 3 allele frequencies



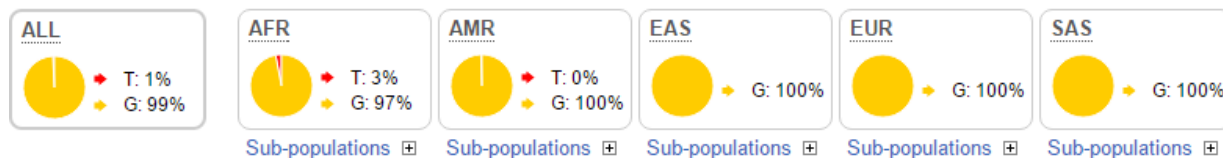
rs61734091

1000 Genomes Project Phase 3 allele frequencies



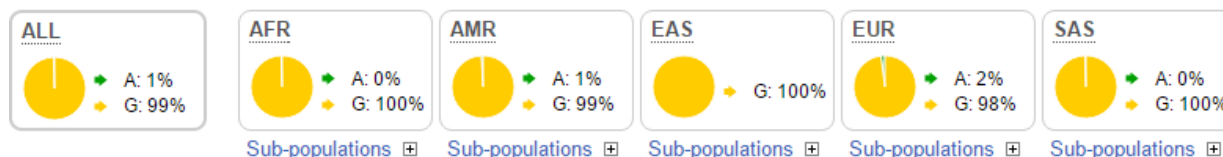
rs61740896

1000 Genomes Project Phase 3 allele frequencies



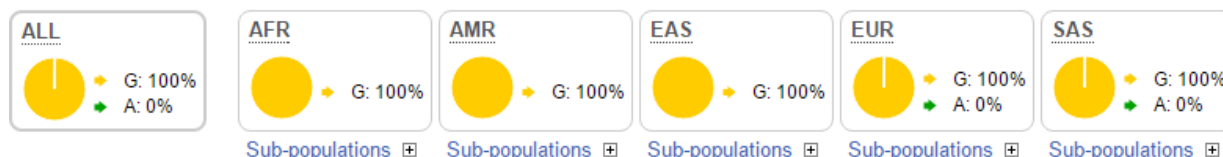
rs61746238

1000 Genomes Project Phase 3 allele frequencies



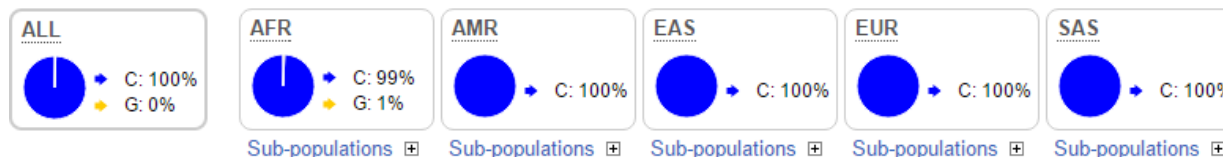
rs62000418

1000 Genomes Project Phase 3 allele frequencies



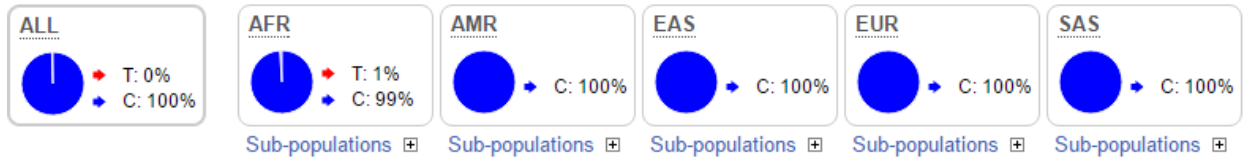
rs72939460

1000 Genomes Project Phase 3 allele frequencies



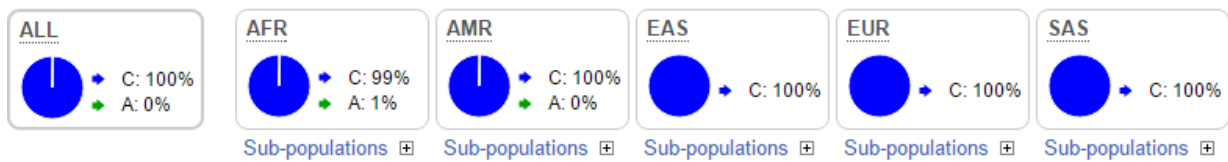
rs73271536

1000 Genomes Project Phase 3 allele frequencies



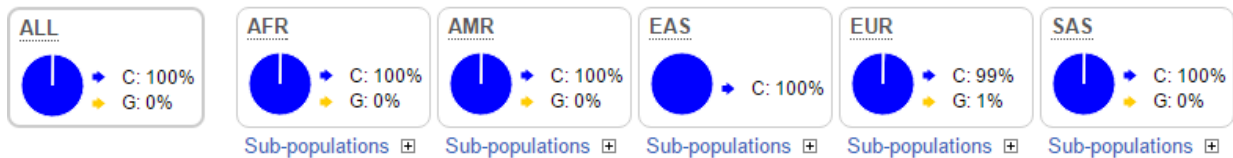
rs73920081

1000 Genomes Project Phase 3 allele frequencies



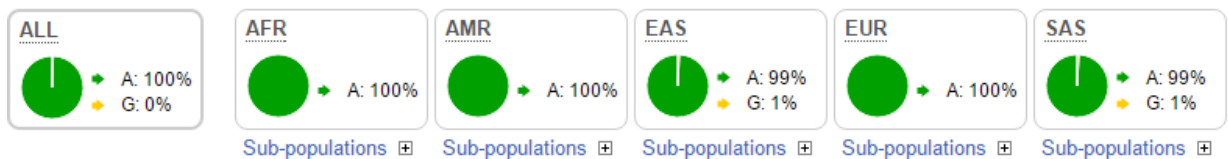
rs77606940

1000 Genomes Project Phase 3 allele frequencies



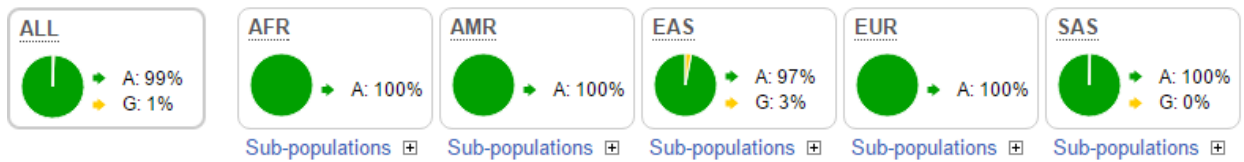
rs77687671

1000 Genomes Project Phase 3 allele frequencies



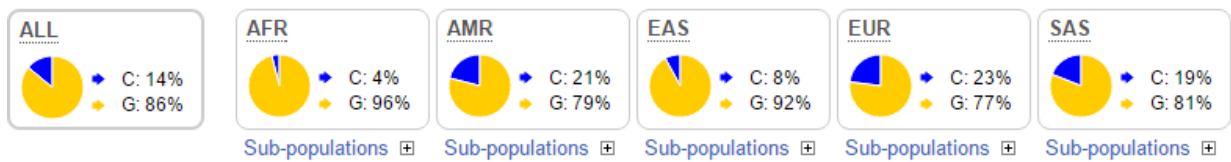
rs78924571

1000 Genomes Project Phase 3 allele frequencies



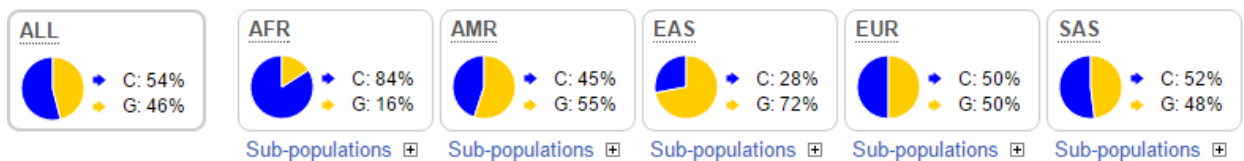
rs8875

1000 Genomes Project Phase 3 allele frequencies



rs9543

1000 Genomes Project Phase 3 allele frequencies

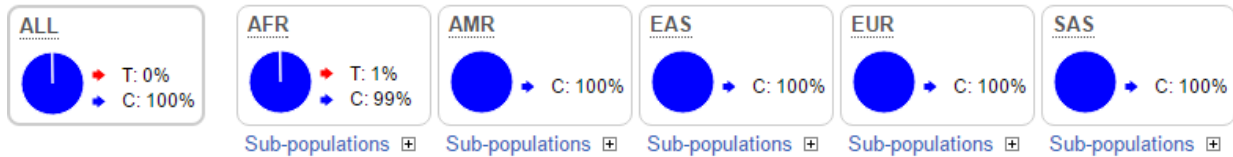




## ΣΥΜΠΛΟΚΟ II

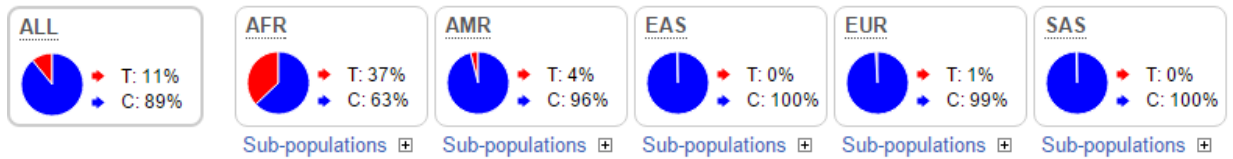
rs111430410

### 1000 Genomes Project Phase 3 allele frequencies



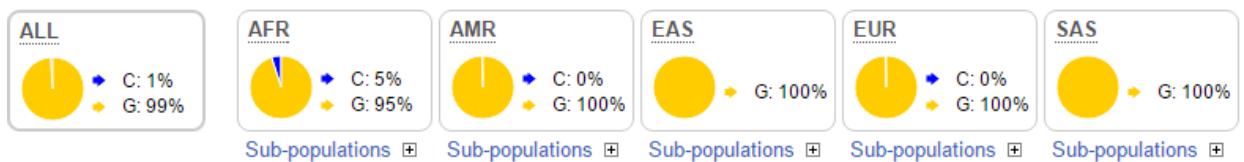
rs111659413

### 1000 Genomes Project Phase 3 allele frequencies



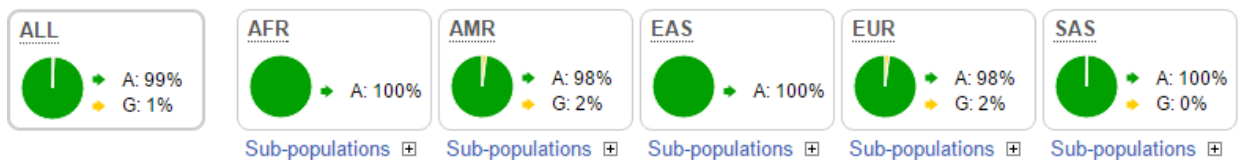
rs11203289

### 1000 Genomes Project Phase 3 allele frequencies



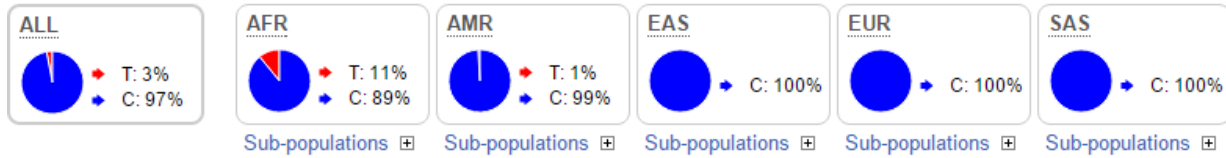
rs11214077

### 1000 Genomes Project Phase 3 allele frequencies



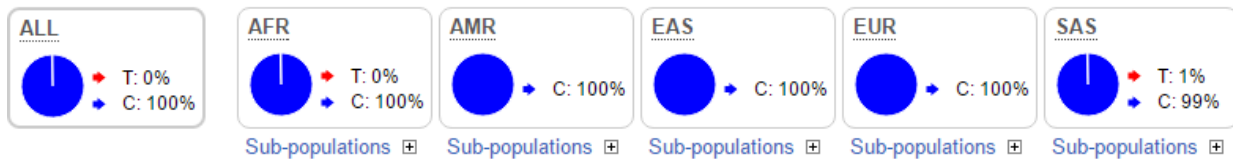
rs113458823

1000 Genomes Project Phase 3 allele frequencies



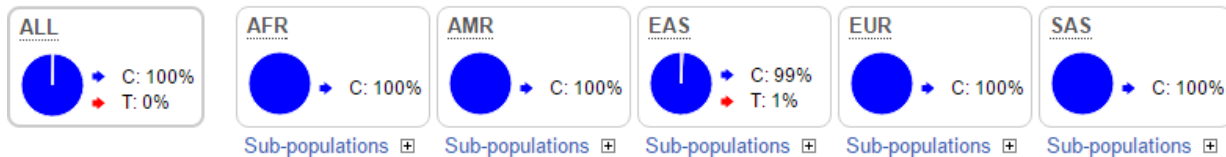
rs143058777

1000 Genomes Project Phase 3 allele frequencies



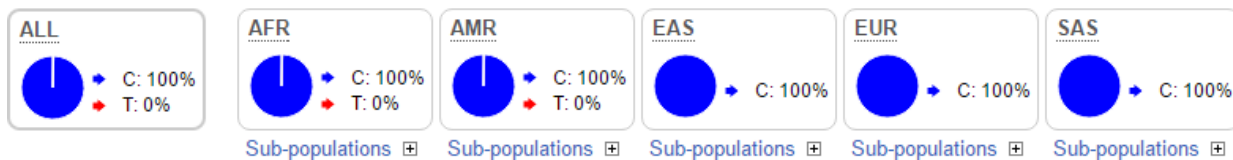
rs144867876

1000 Genomes Project Phase 3 allele frequencies



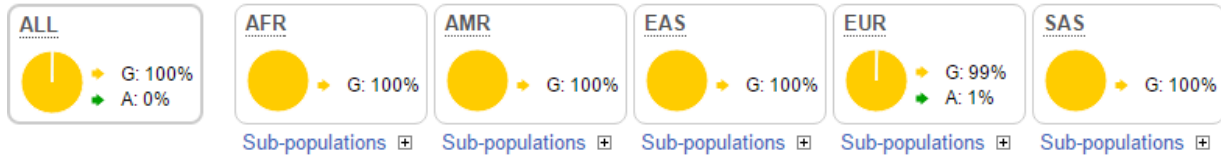
rs148425779

1000 Genomes Project Phase 3 allele frequencies



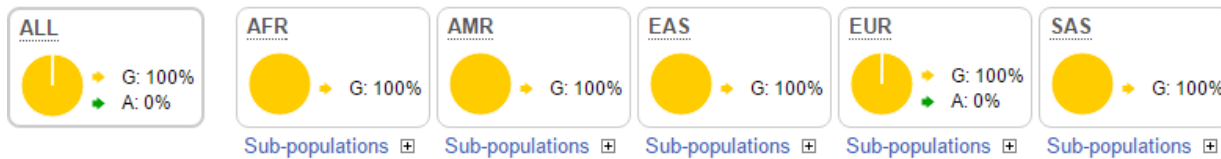
rs148738139

1000 Genomes Project Phase 3 allele frequencies



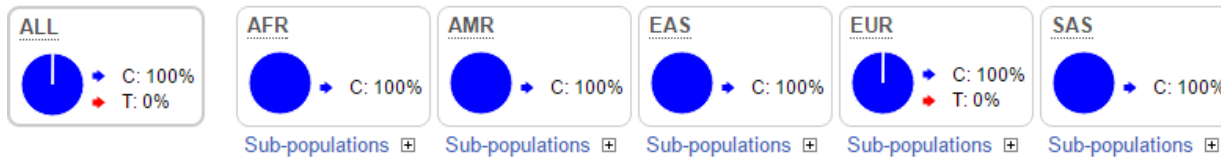
rs182629842

1000 Genomes Project Phase 3 allele frequencies



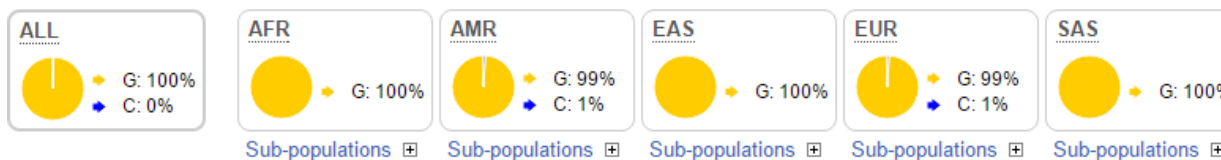
rs184314049

1000 Genomes Project Phase 3 allele frequencies



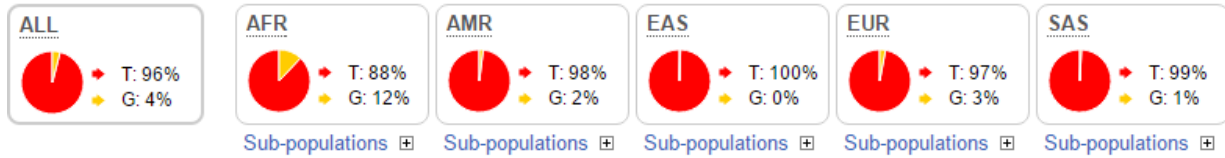
rs201210474

1000 Genomes Project Phase 3 allele frequencies



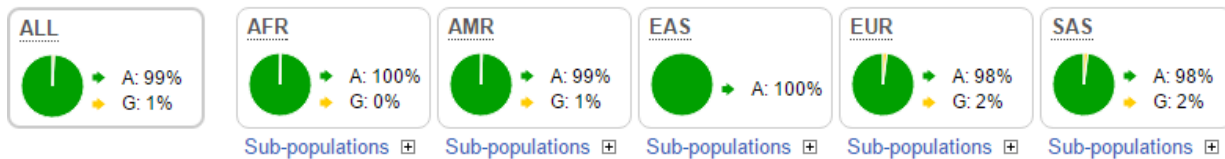
rs2746462

1000 Genomes Project Phase 3 allele frequencies



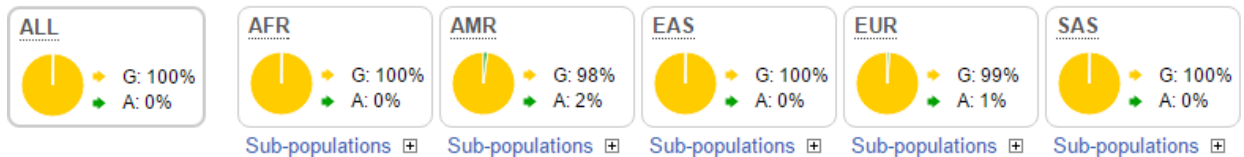
rs33927012

1000 Genomes Project Phase 3 allele frequencies



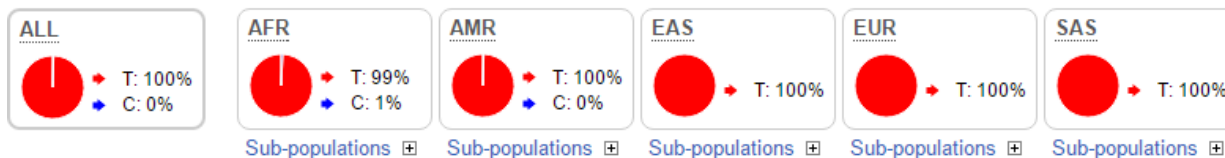
rs34677591

1000 Genomes Project Phase 3 allele frequencies



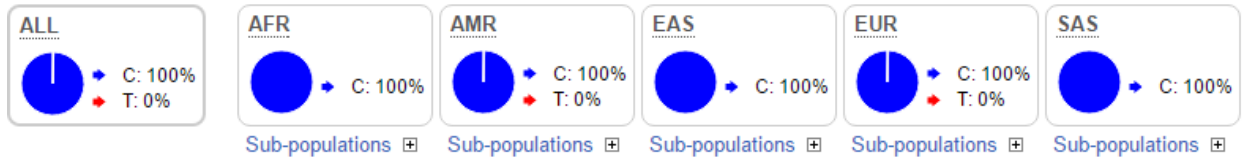
rs35962811

1000 Genomes Project Phase 3 allele frequencies



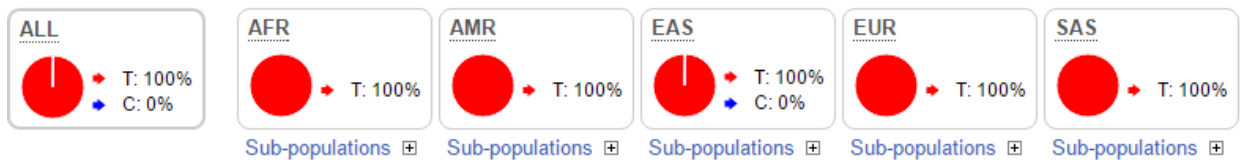
rs543726300

1000 Genomes Project Phase 3 allele frequencies



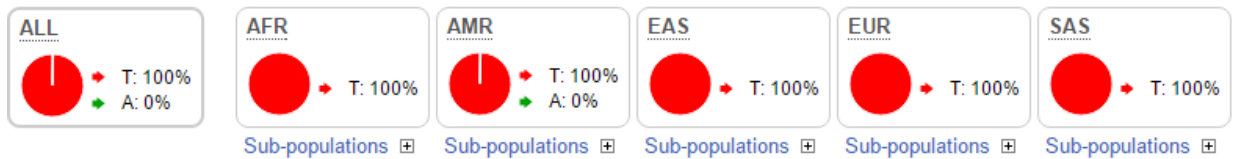
rs559747670

1000 Genomes Project Phase 3 allele frequencies



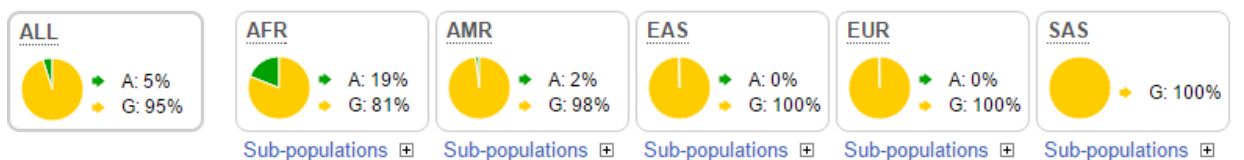
rs572004966

1000 Genomes Project Phase 3 allele frequencies



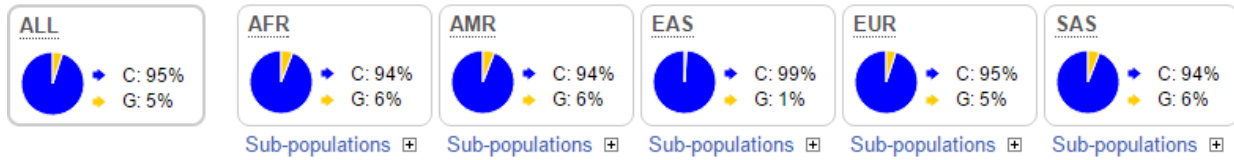
rs592626

1000 Genomes Project Phase 3 allele frequencies



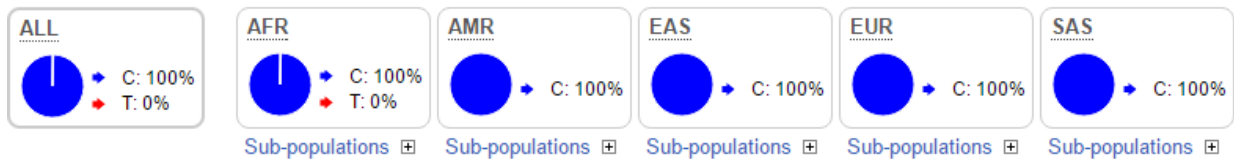
rs76336581

1000 Genomes Project Phase 3 allele frequencies



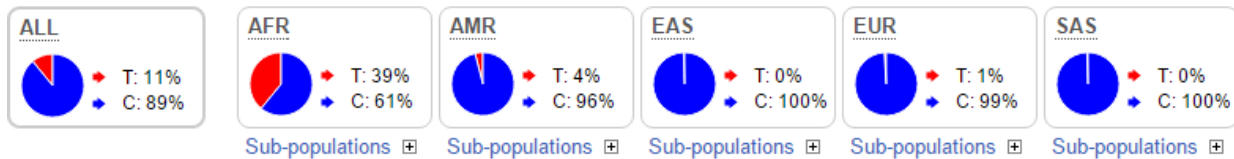
rs78119534

1000 Genomes Project Phase 3 allele frequencies



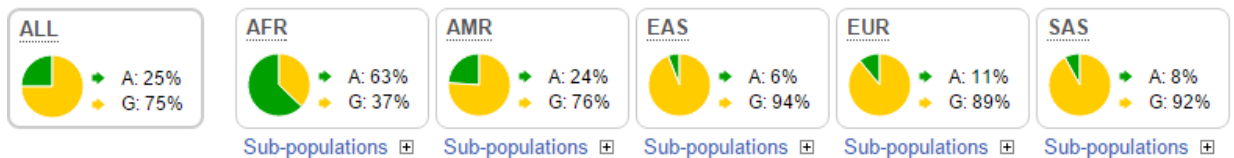
rs9919552

1000 Genomes Project Phase 3 allele frequencies



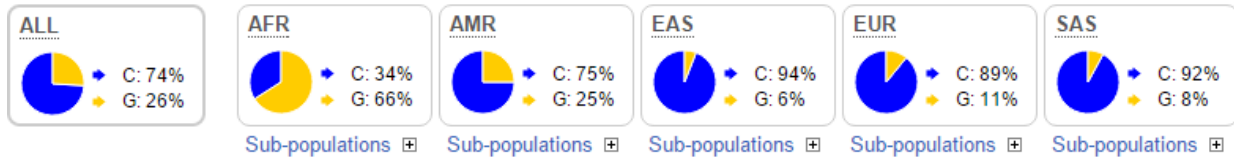
rs10039029

1000 Genomes Project Phase 3 allele frequencies



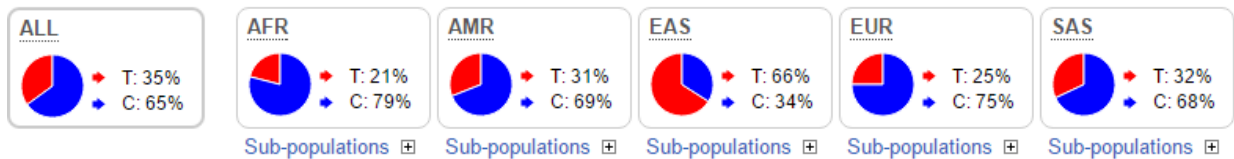
rs1041949

1000 Genomes Project Phase 3 allele frequencies



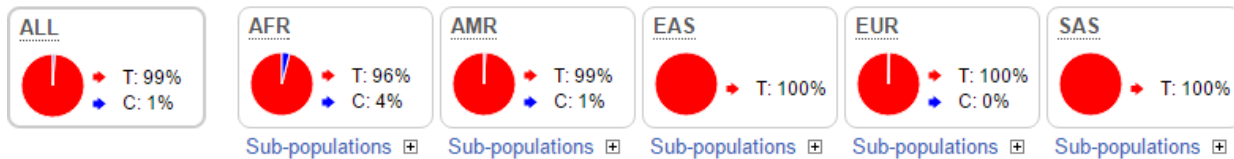
rs1126417

1000 Genomes Project Phase 3 allele frequencies



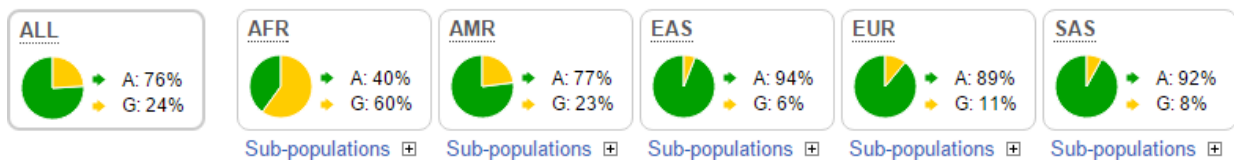
rs1126538

1000 Genomes Project Phase 3 allele frequencies



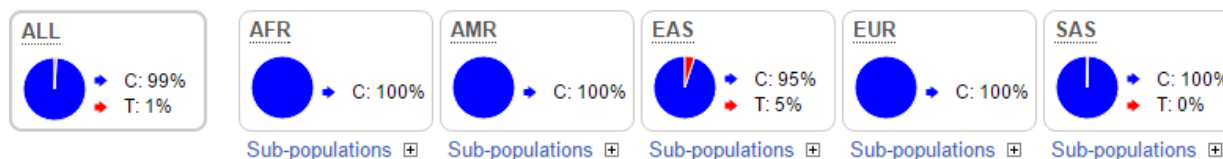
rs1139424

1000 Genomes Project Phase 3 allele frequencies



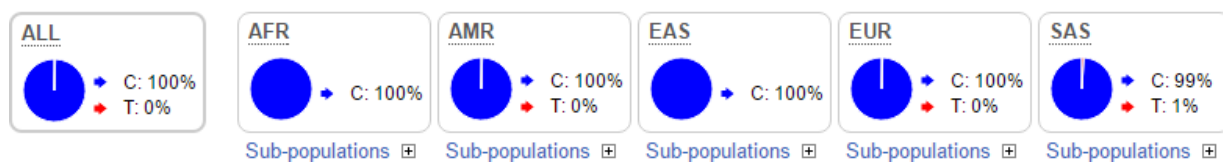
rs11557098

1000 Genomes Project Phase 3 allele frequencies



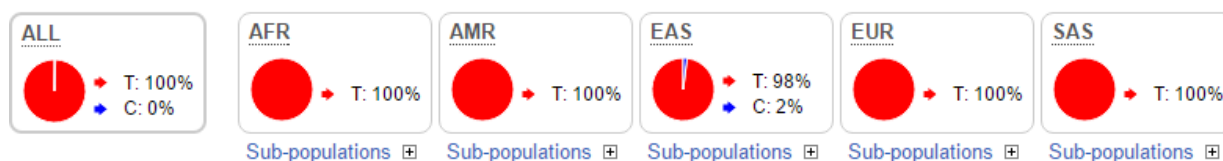
rs142849100

1000 Genomes Project Phase 3 allele frequencies



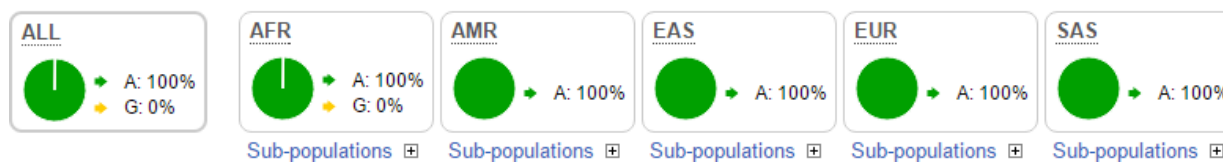
rs142926807

1000 Genomes Project Phase 3 allele frequencies



rs144599870

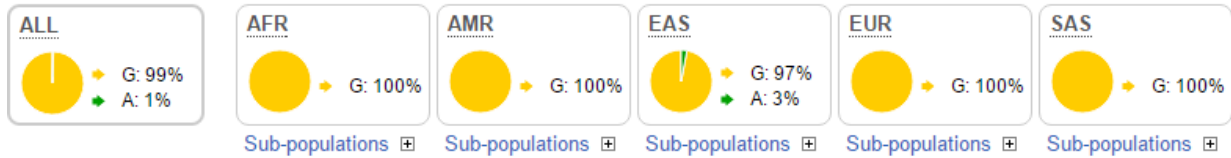
1000 Genomes Project Phase 3 allele frequencies





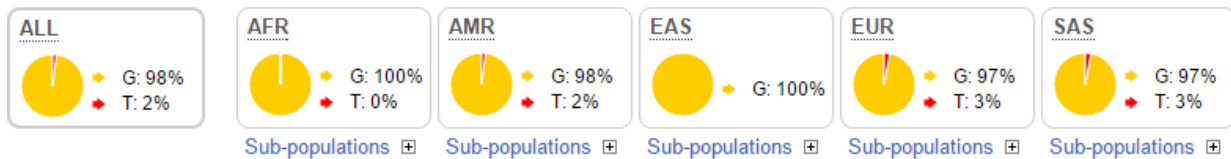
rs148246073

1000 Genomes Project Phase 3 allele frequencies



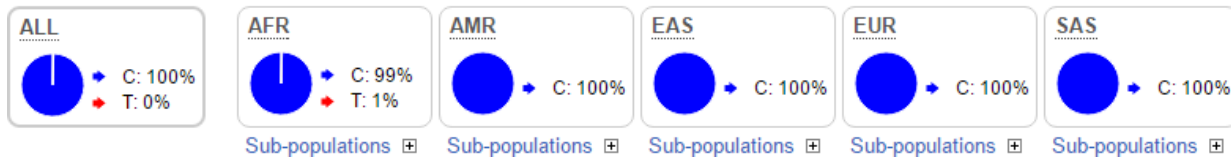
rs150831951

1000 Genomes Project Phase 3 allele frequencies



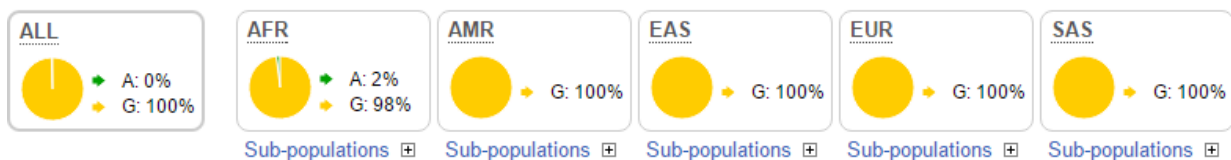
rs151266052

1000 Genomes Project Phase 3 allele frequencies



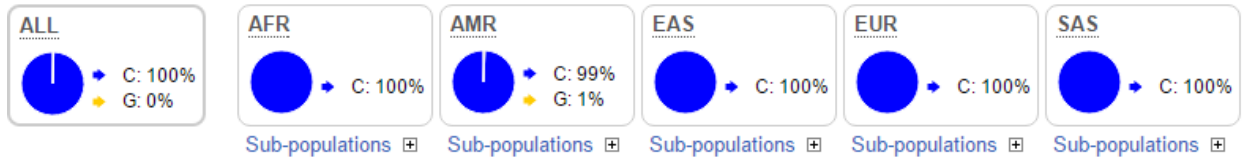
rs187964306

1000 Genomes Project Phase 3 allele frequencies



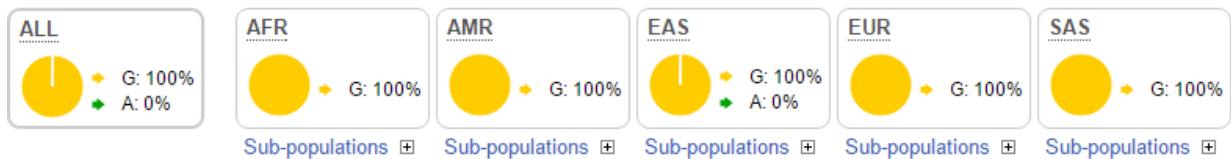
rs191412461

1000 Genomes Project Phase 3 allele frequencies



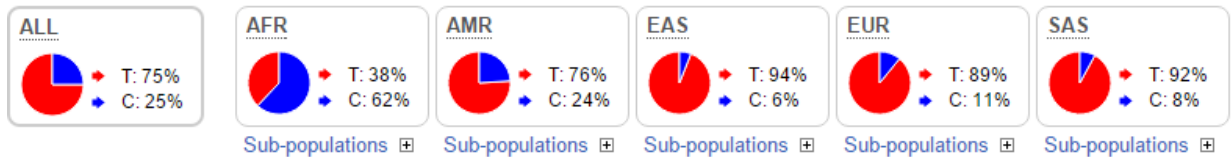
rs200526913

1000 Genomes Project Phase 3 allele frequencies



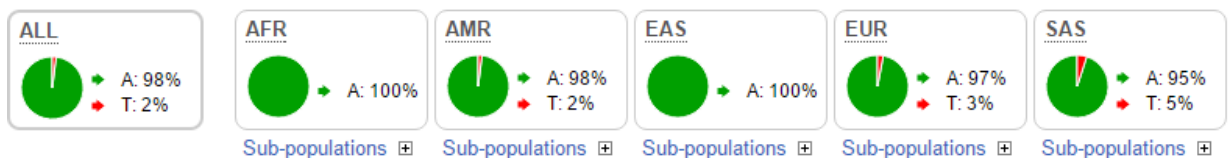
rs2115272

1000 Genomes Project Phase 3 allele frequencies



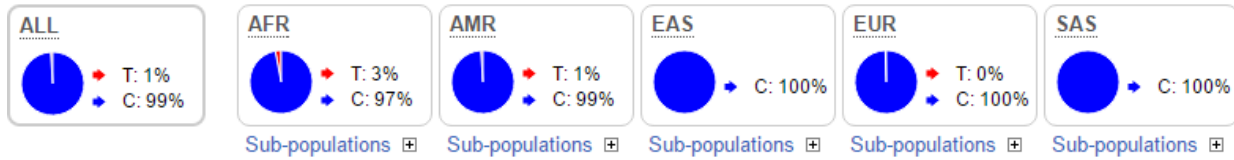
rs34635677

1000 Genomes Project Phase 3 allele frequencies



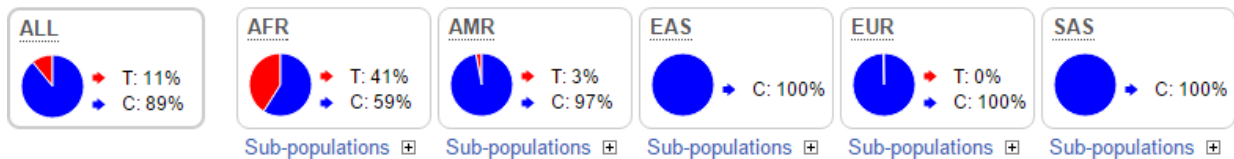
rs34771391

1000 Genomes Project Phase 3 allele frequencies



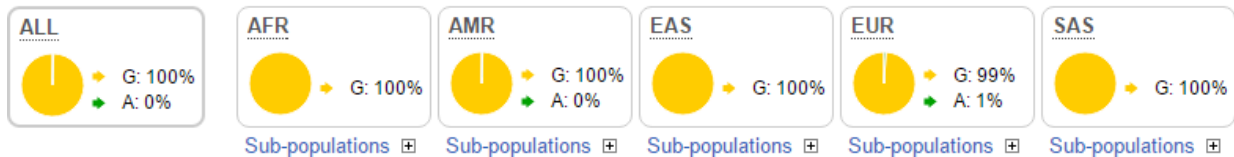
rs35277230

1000 Genomes Project Phase 3 allele frequencies



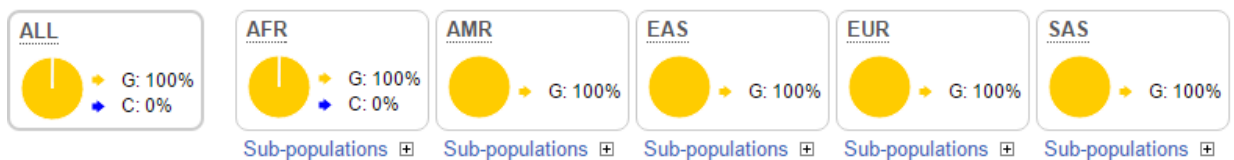
rs35502109

1000 Genomes Project Phase 3 allele frequencies



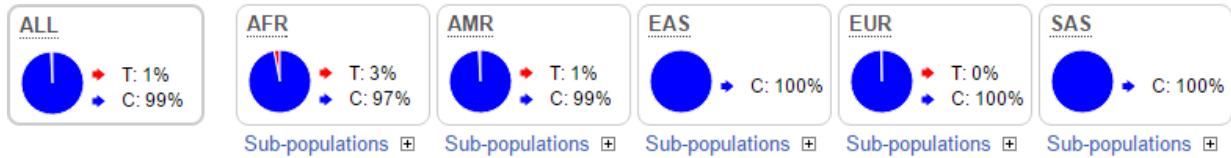
rs370291114

1000 Genomes Project Phase 3 allele frequencies



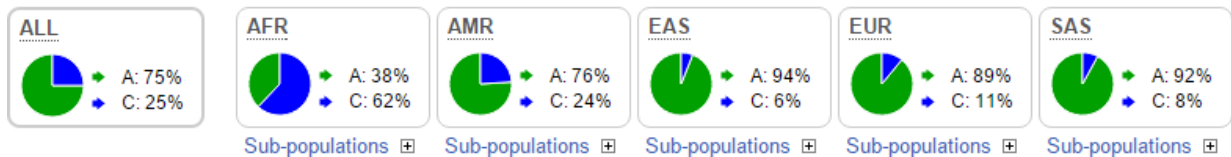
rs61733344

1000 Genomes Project Phase 3 allele frequencies



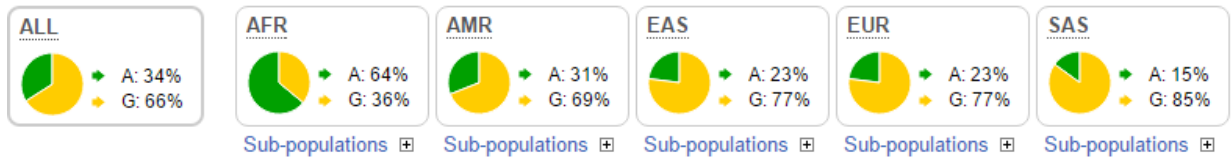
rs6555055

1000 Genomes Project Phase 3 allele frequencies



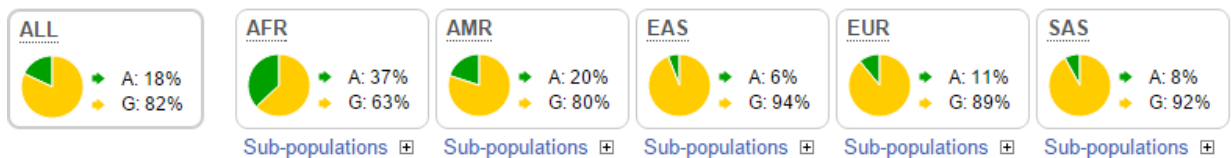
rs6961

1000 Genomes Project Phase 3 allele frequencies



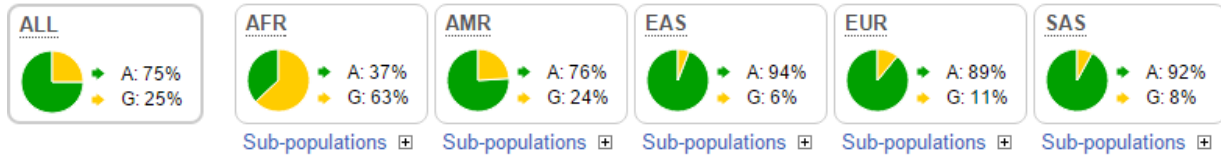
rs6962

1000 Genomes Project Phase 3 allele frequencies



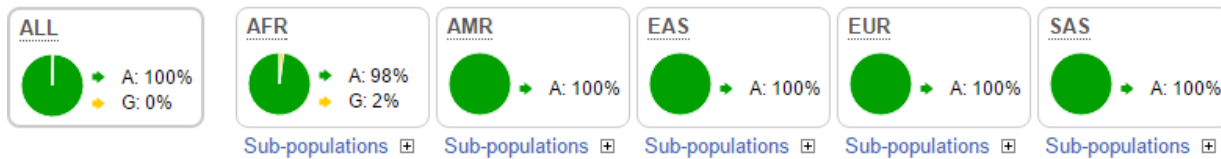
rs77210621

1000 Genomes Project Phase 3 allele frequencies



rs80207011

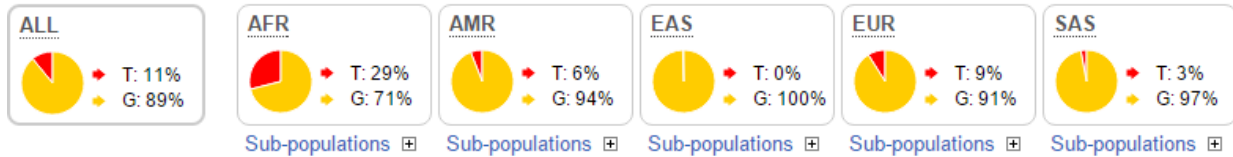
1000 Genomes Project Phase 3 allele frequencies



### ΣΥΜΠΛΟΚΟ III

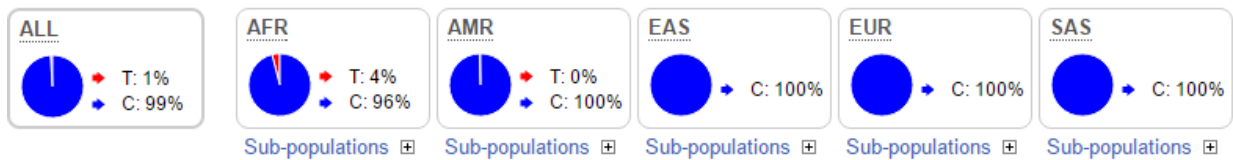
rs11541475

1000 Genomes Project Phase 3 allele frequencies



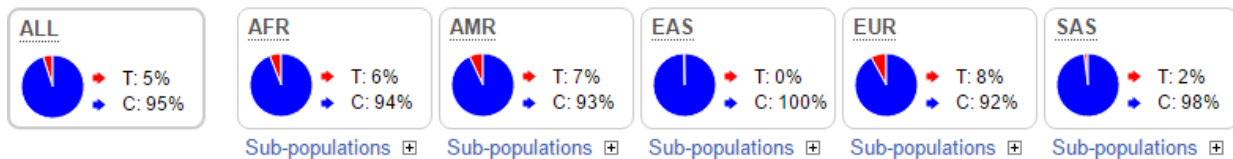
rs11558865

1000 Genomes Project Phase 3 allele frequencies



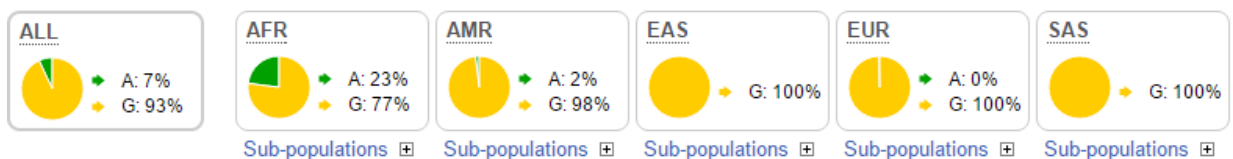
rs11666764

1000 Genomes Project Phase 3 allele frequencies



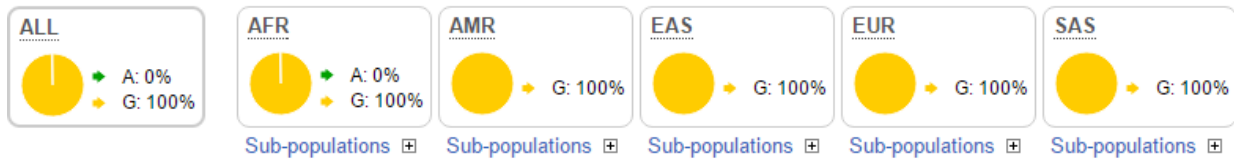
rs11863893

1000 Genomes Project Phase 3 allele frequencies



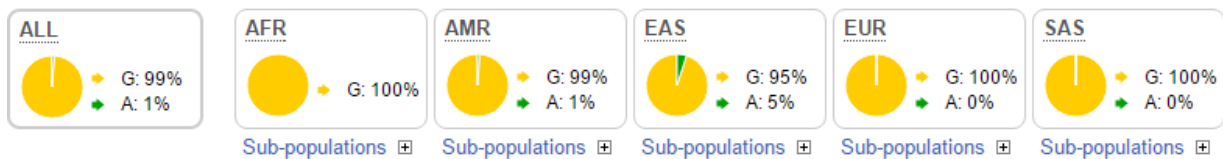
rs137995316

1000 Genomes Project Phase 3 allele frequencies



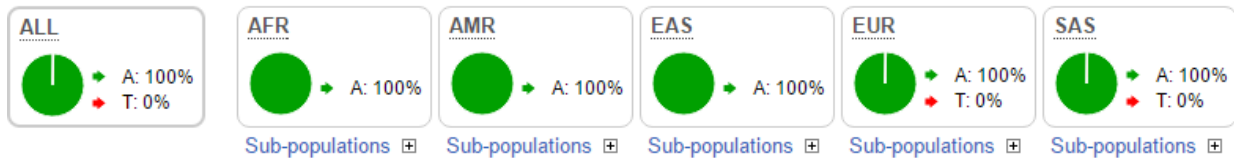
rs139088811

1000 Genomes Project Phase 3 allele frequencies



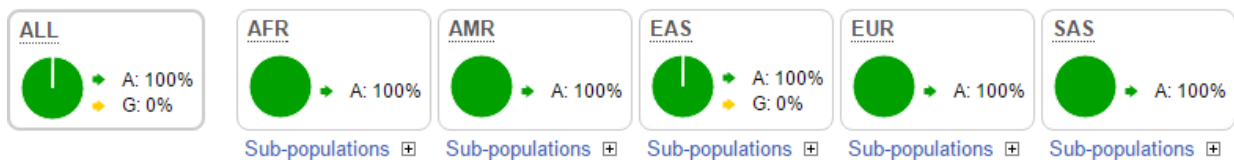
rs139283183

1000 Genomes Project Phase 3 allele frequencies



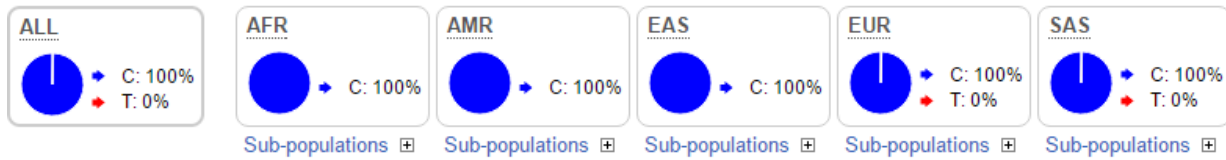
rs139312246

1000 Genomes Project Phase 3 allele frequencies



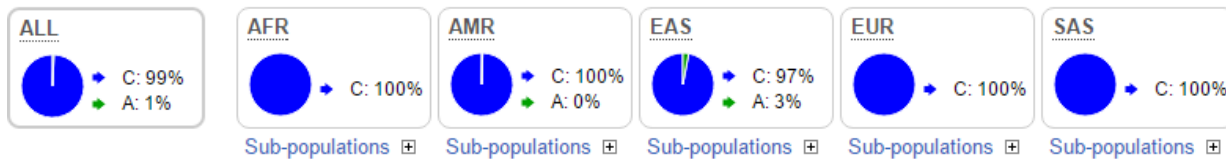
rs139999010

1000 Genomes Project Phase 3 allele frequencies



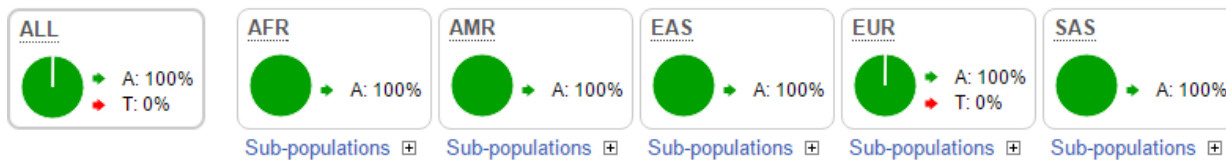
rs140583334

1000 Genomes Project Phase 3 allele frequencies



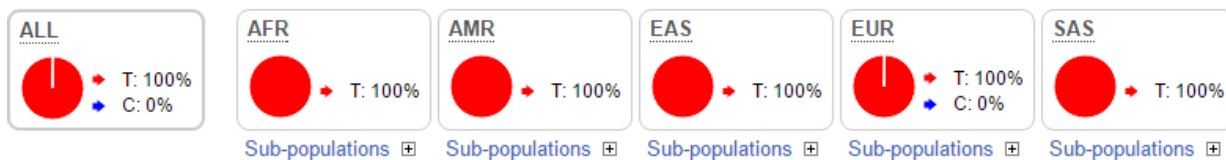
rs143080682

1000 Genomes Project Phase 3 allele frequencies



rs144257411

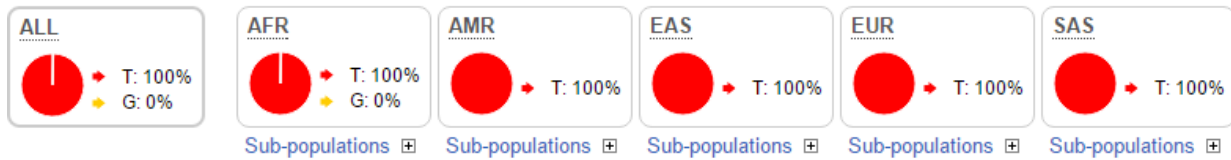
1000 Genomes Project Phase 3 allele frequencies





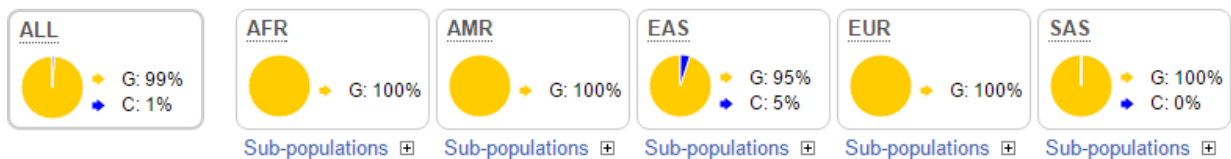
rs145828292

1000 Genomes Project Phase 3 allele frequencies



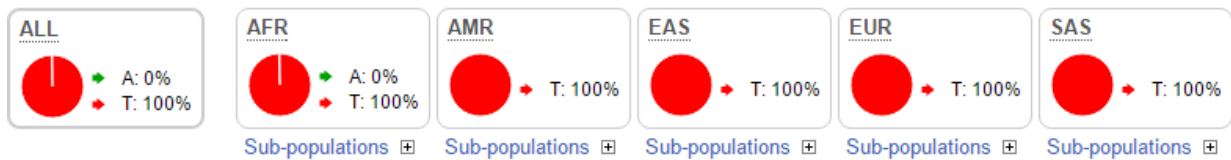
rs149245457

1000 Genomes Project Phase 3 allele frequencies



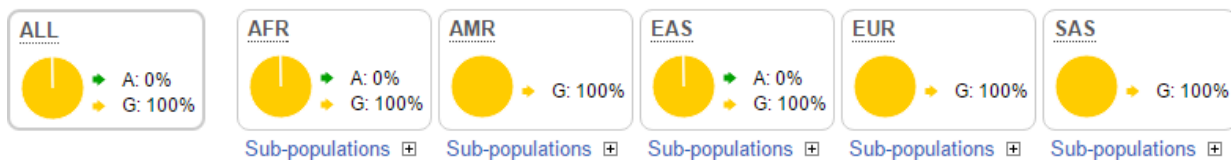
rs149667453

1000 Genomes Project Phase 3 allele frequencies



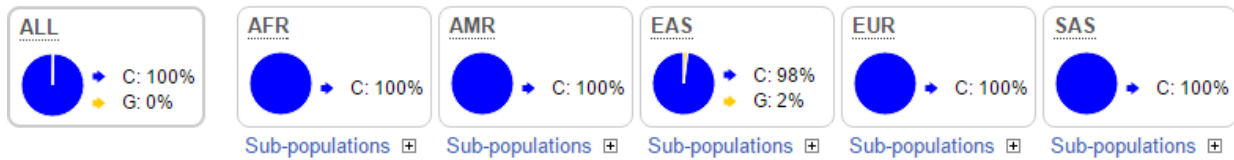
rs151144586

1000 Genomes Project Phase 3 allele frequencies



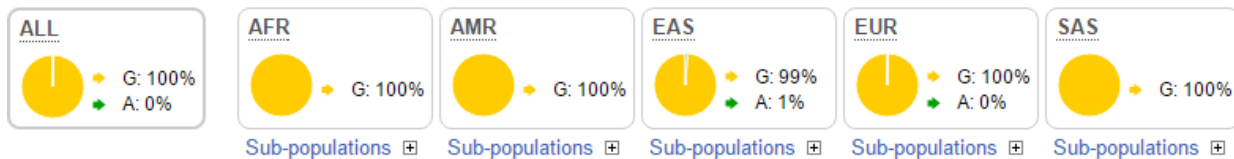
rs17080284

1000 Genomes Project Phase 3 allele frequencies



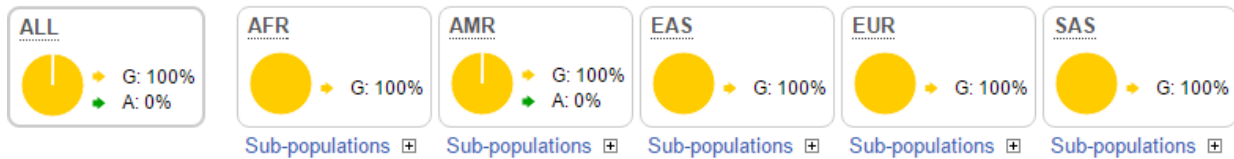
rs182453765

1000 Genomes Project Phase 3 allele frequencies



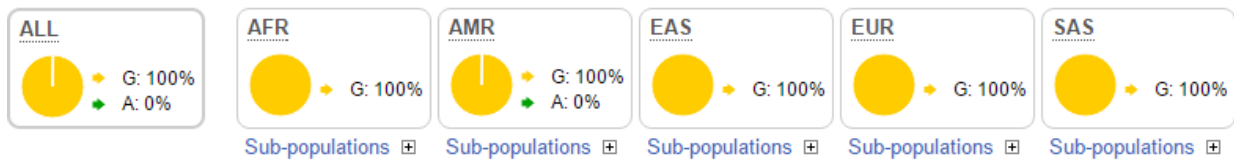
rs185606879

1000 Genomes Project Phase 3 allele frequencies



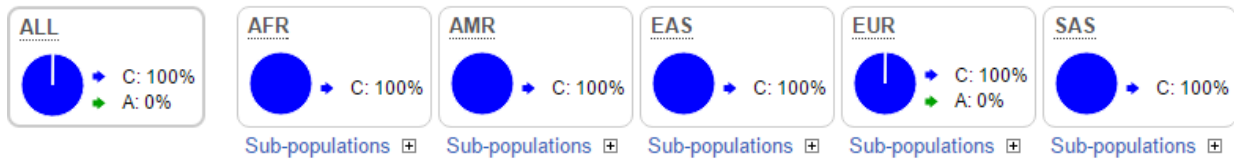
rs189114560

1000 Genomes Project Phase 3 allele frequencies



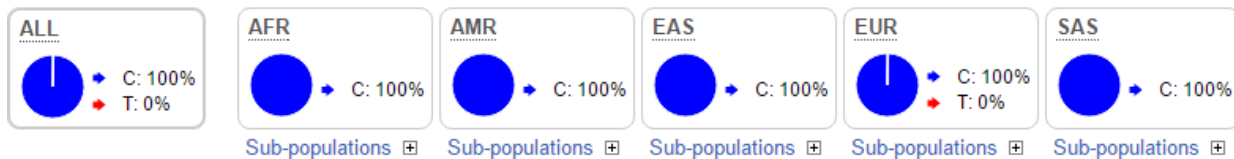
rs199789478

1000 Genomes Project Phase 3 allele frequencies



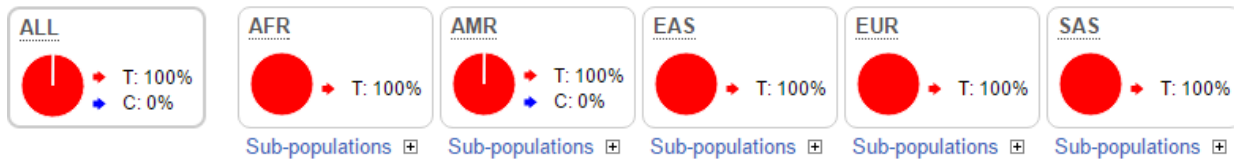
rs200996591

1000 Genomes Project Phase 3 allele frequencies



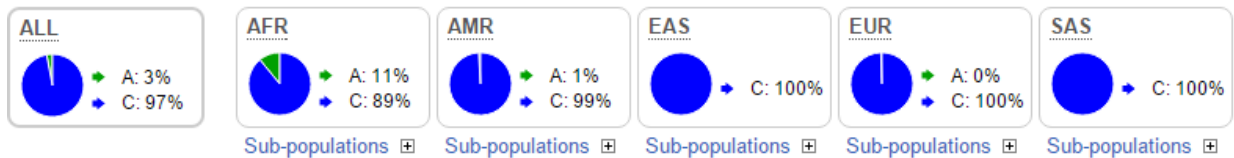
rs201129717

1000 Genomes Project Phase 3 allele frequencies



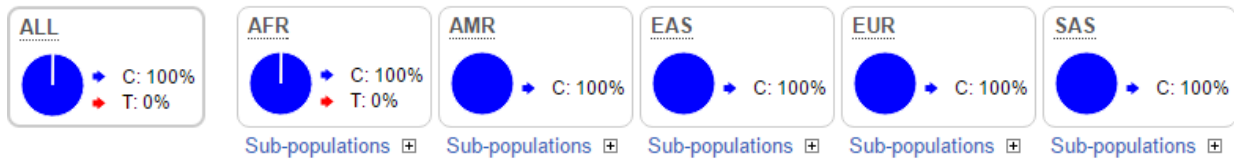
rs2228473

1000 Genomes Project Phase 3 allele frequencies



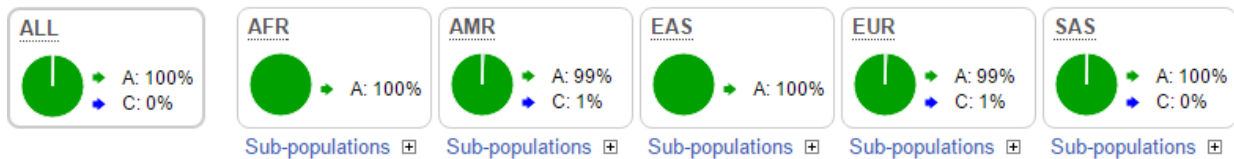
rs34142481

1000 Genomes Project Phase 3 allele frequencies



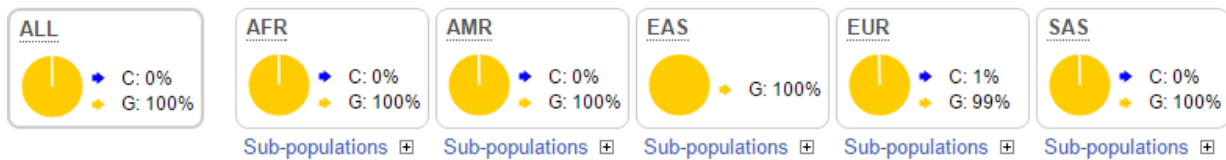
rs35387134

1000 Genomes Project Phase 3 allele frequencies



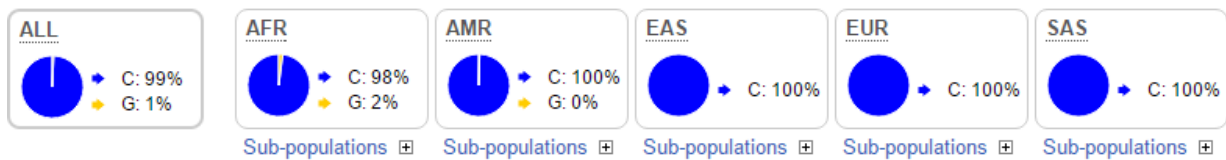
rs35973351

1000 Genomes Project Phase 3 allele frequencies



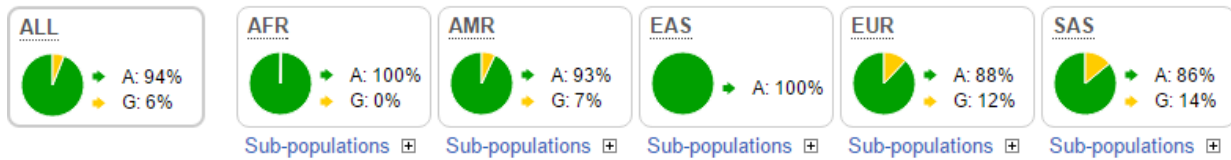
rs36093416

1000 Genomes Project Phase 3 allele frequencies



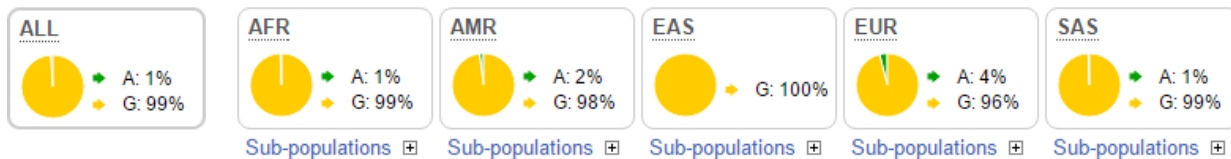
rs41292543

1000 Genomes Project Phase 3 allele frequencies



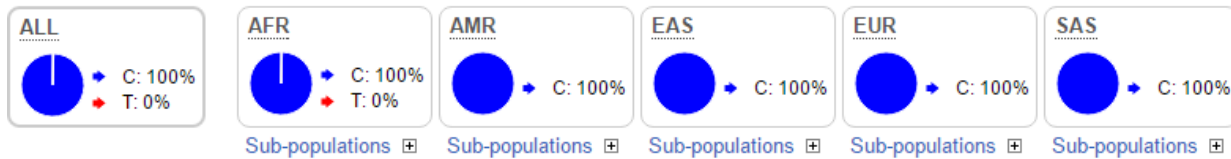
rs4850

1000 Genomes Project Phase 3 allele frequencies



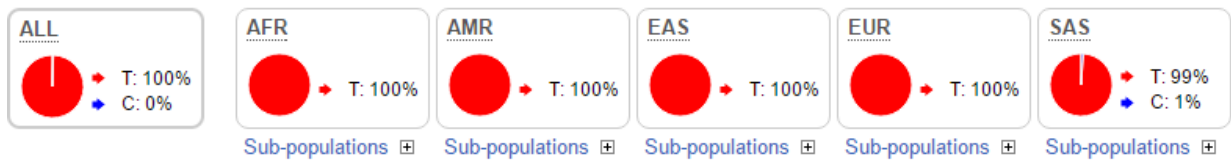
rs532296557

1000 Genomes Project Phase 3 allele frequencies



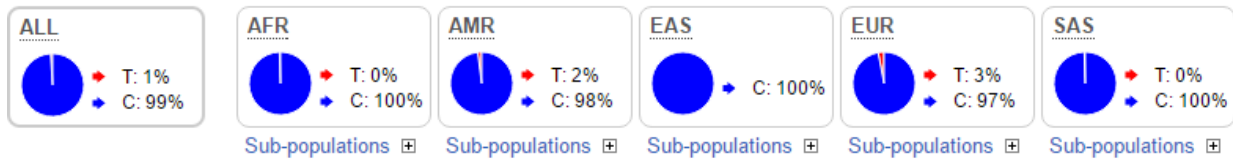
rs557706172

1000 Genomes Project Phase 3 allele frequencies



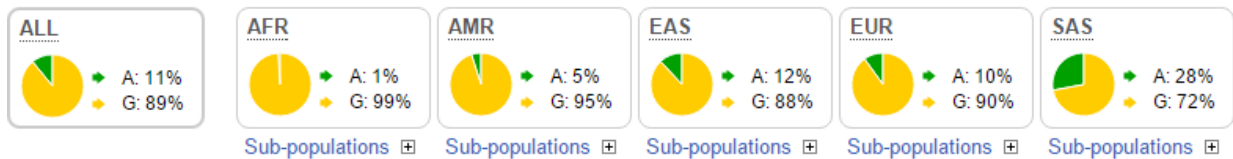
rs62618742

1000 Genomes Project Phase 3 allele frequencies



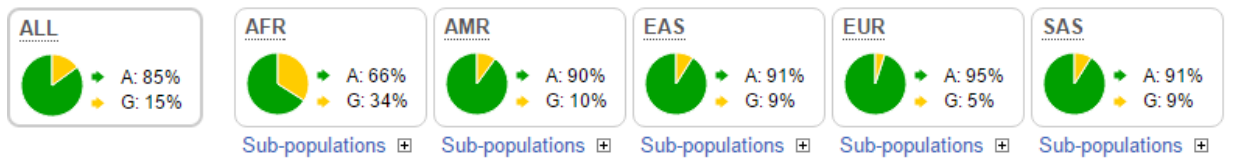
rs7282

1000 Genomes Project Phase 3 allele frequencies



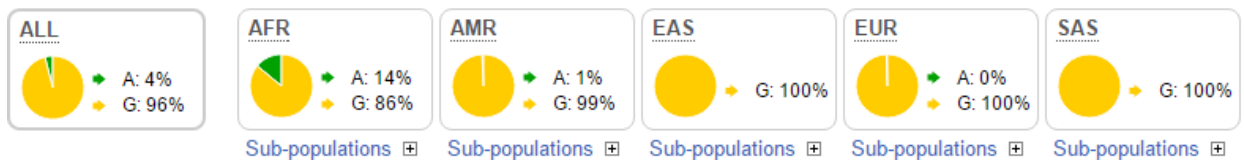
rs76013375

1000 Genomes Project Phase 3 allele frequencies



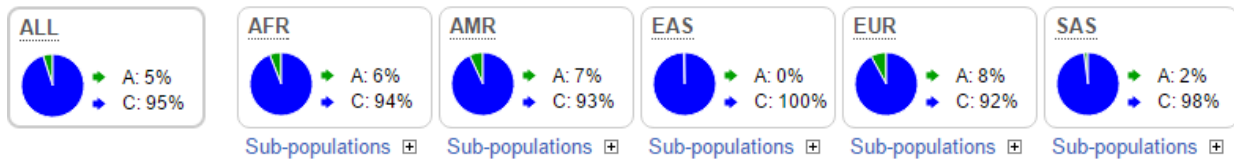
rs7820984

1000 Genomes Project Phase 3 allele frequencies



rs8100724

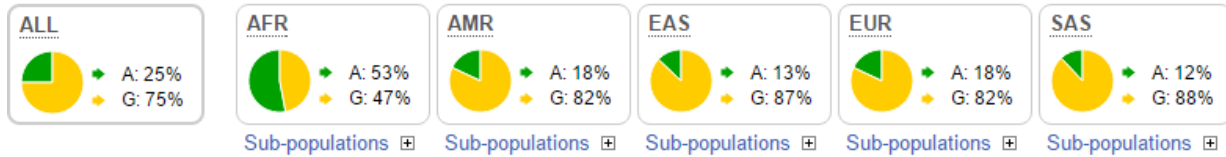
1000 Genomes Project Phase 3 allele frequencies



## ΣΥΜΠΛΟΚΟ IV

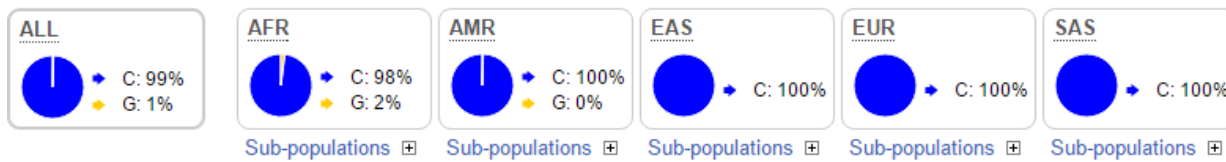
rs1130569

### 1000 Genomes Project Phase 3 allele frequencies



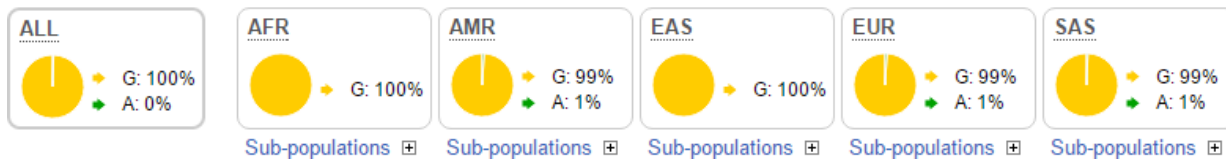
rs113123058

### 1000 Genomes Project Phase 3 allele frequencies



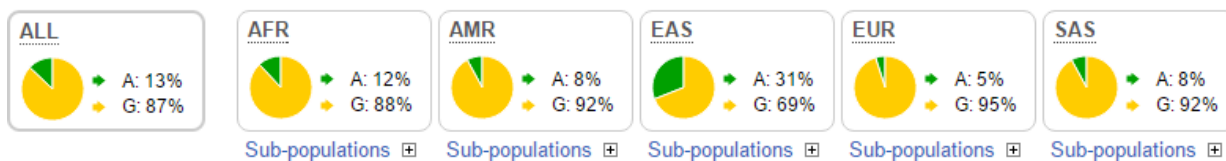
rs11555138

### 1000 Genomes Project Phase 3 allele frequencies



rs11557187

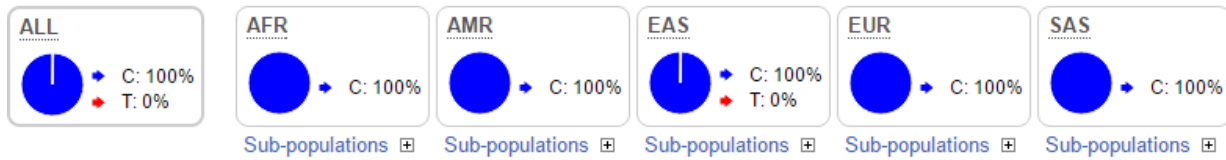
### 1000 Genomes Project Phase 3 allele frequencies





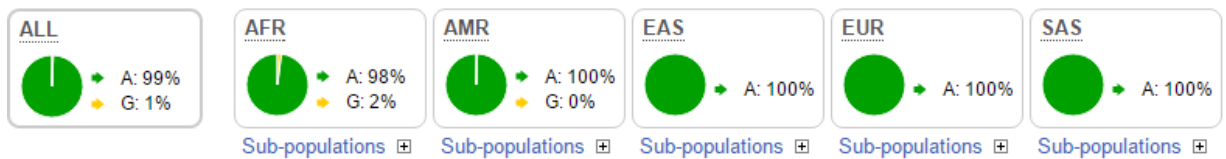
rs115820973

1000 Genomes Project Phase 3 allele frequencies



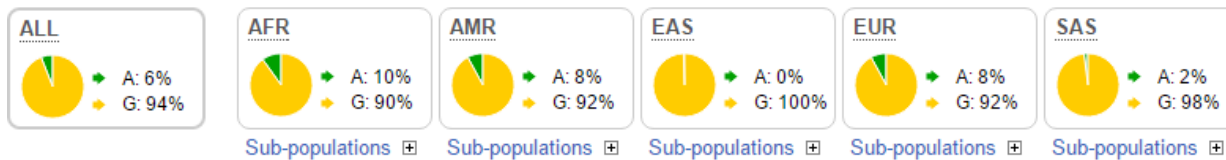
rs116118827

1000 Genomes Project Phase 3 allele frequencies



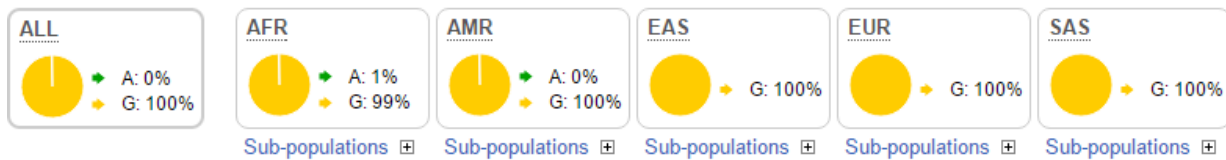
rs11907253

1000 Genomes Project Phase 3 allele frequencies



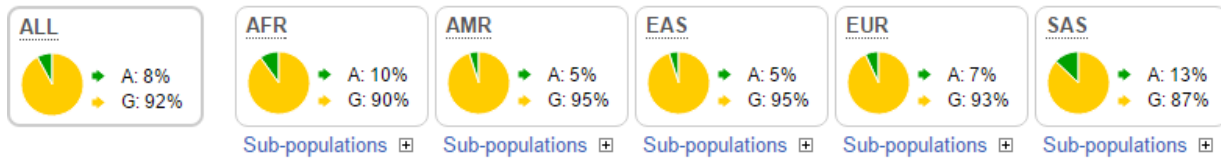
rs119455950

1000 Genomes Project Phase 3 allele frequencies



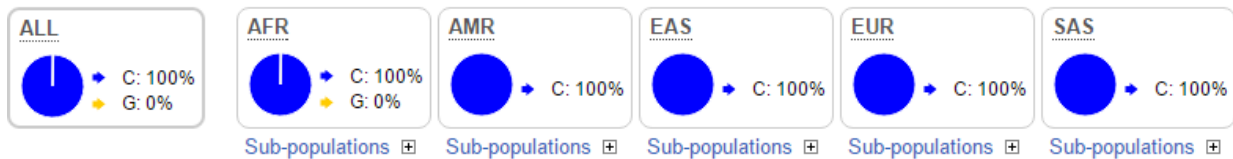
rs12240

1000 Genomes Project Phase 3 allele frequencies



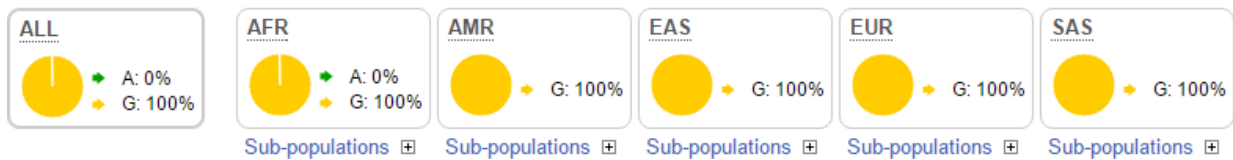
rs139079443

1000 Genomes Project Phase 3 allele frequencies



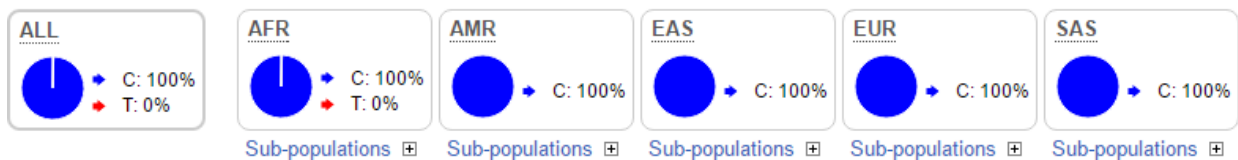
rs140822119

1000 Genomes Project Phase 3 allele frequencies



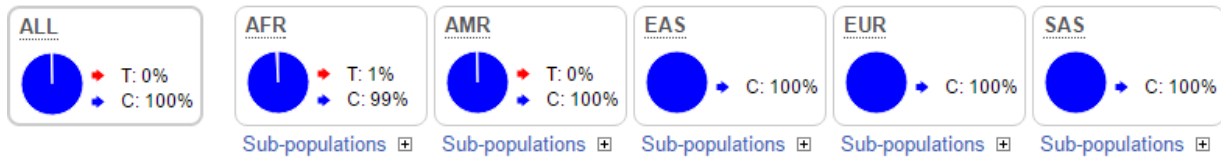
rs143289611

1000 Genomes Project Phase 3 allele frequencies



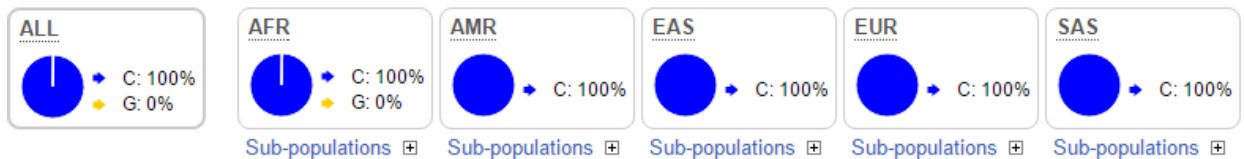
rs144339685

1000 Genomes Project Phase 3 allele frequencies



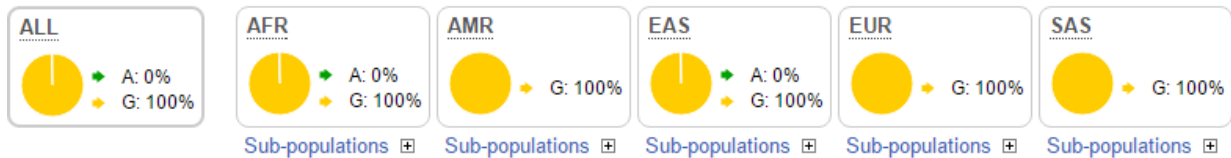
rs145481393

1000 Genomes Project Phase 3 allele frequencies



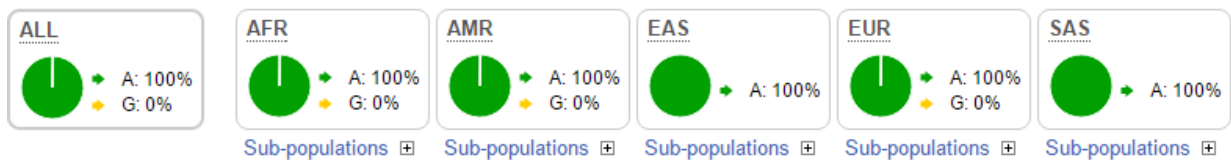
rs150196183

1000 Genomes Project Phase 3 allele frequencies



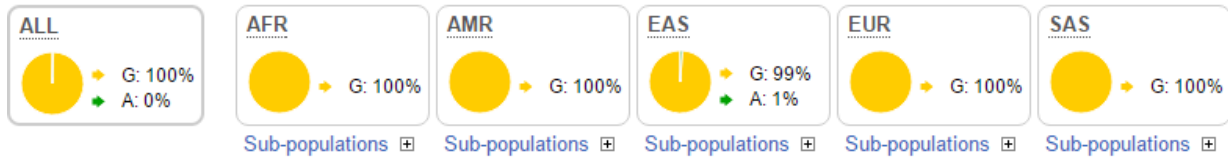
rs1803370

1000 Genomes Project Phase 3 allele frequencies



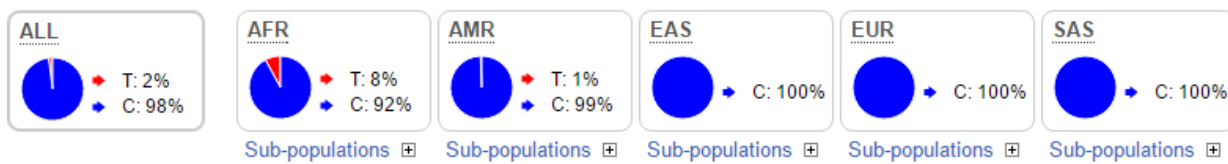
rs184745241

1000 Genomes Project Phase 3 allele frequencies



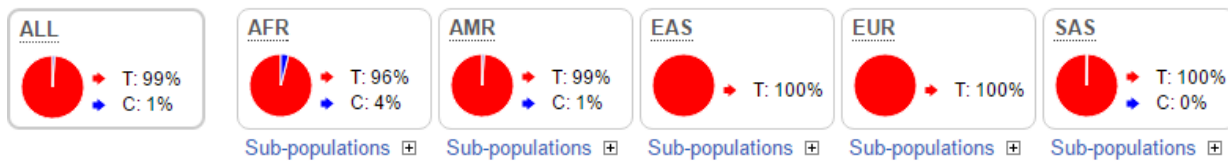
rs2599091

1000 Genomes Project Phase 3 allele frequencies



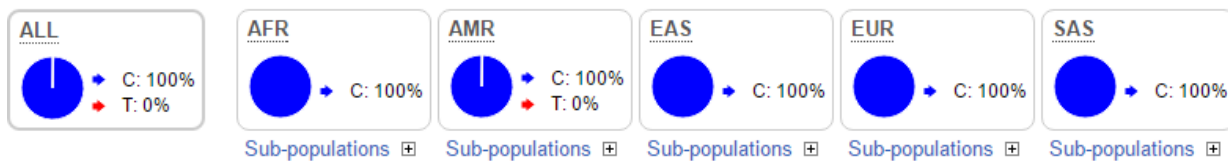
rs4885

1000 Genomes Project Phase 3 allele frequencies



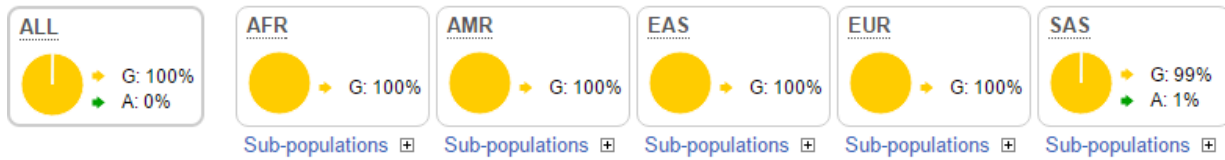
rs528839611

1000 Genomes Project Phase 3 allele frequencies



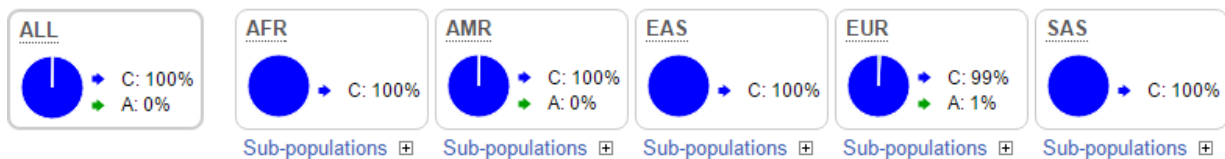
rs540773473

1000 Genomes Project Phase 3 allele frequencies



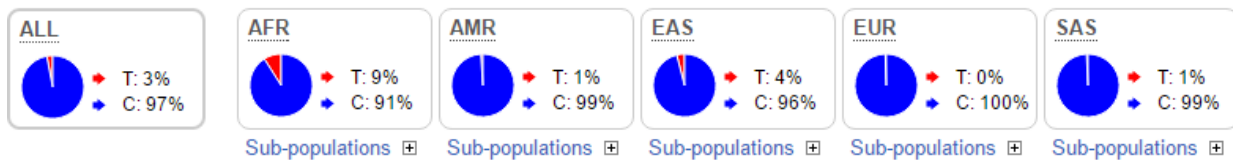
rs61759492

1000 Genomes Project Phase 3 allele frequencies



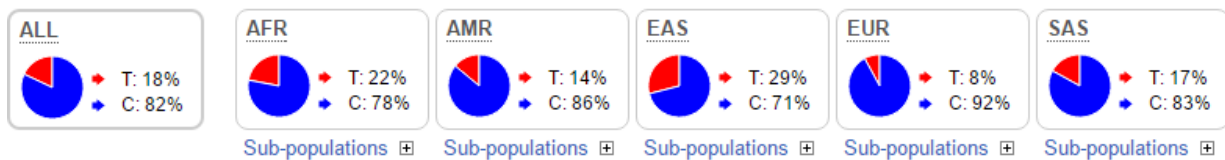
rs7130187

1000 Genomes Project Phase 3 allele frequencies



rs7991

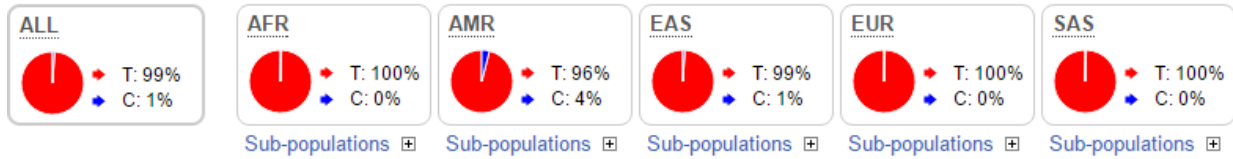
1000 Genomes Project Phase 3 allele frequencies



## ΣΥΜΠΛΟΚΟ V

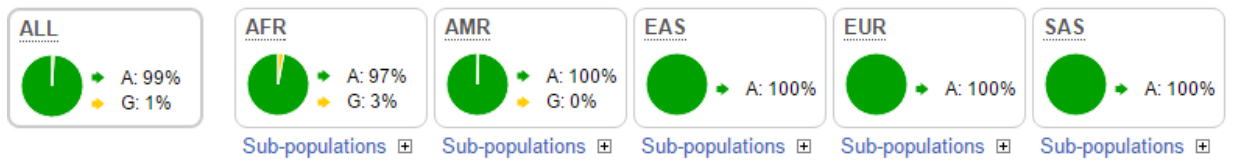
rs113278662

### 1000 Genomes Project Phase 3 allele frequencies



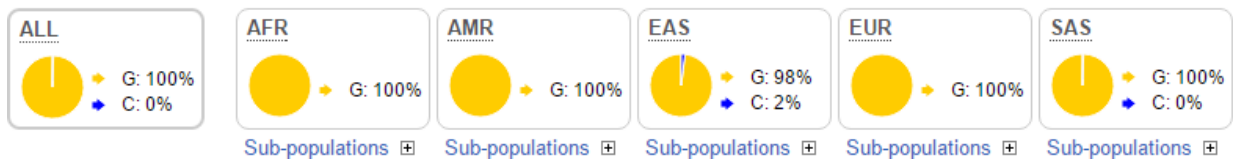
rs115685757

### 1000 Genomes Project Phase 3 allele frequencies



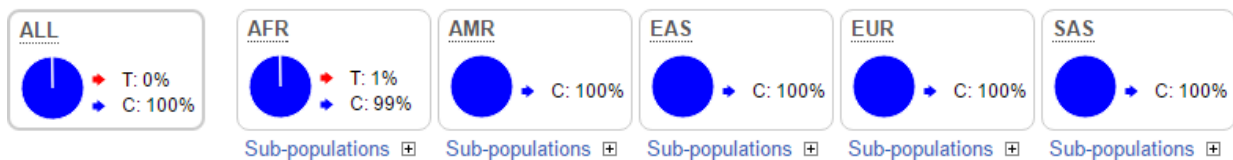
rs12608755

### 1000 Genomes Project Phase 3 allele frequencies



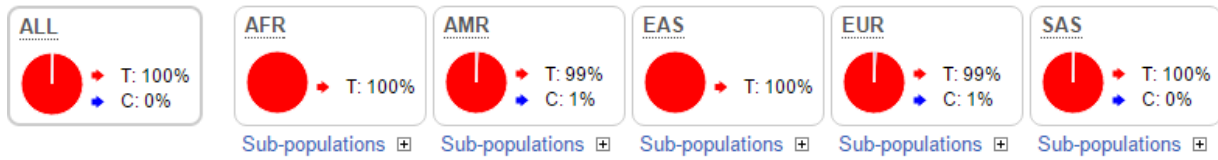
rs1264895

### 1000 Genomes Project Phase 3 allele frequencies



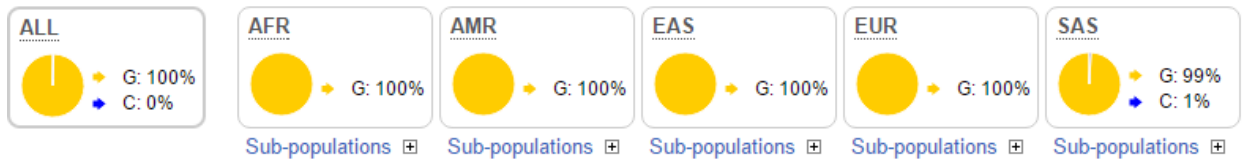
rs140827929

1000 Genomes Project Phase 3 allele frequencies



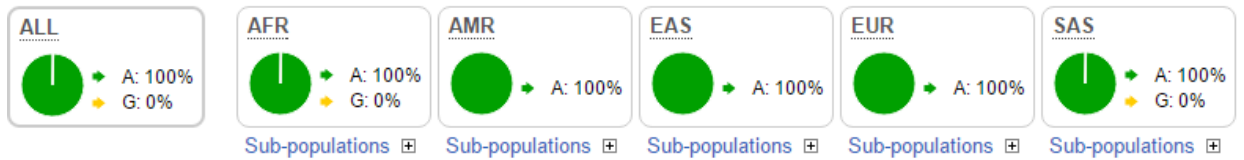
rs140931538

1000 Genomes Project Phase 3 allele frequencies



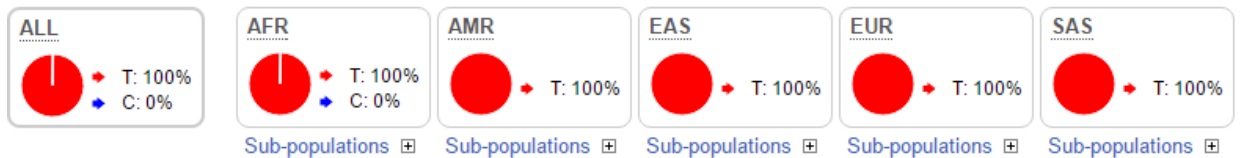
rs141292134

1000 Genomes Project Phase 3 allele frequencies



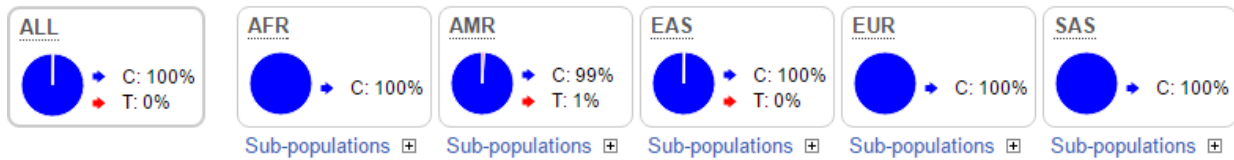
rs141298924

1000 Genomes Project Phase 3 allele frequencies



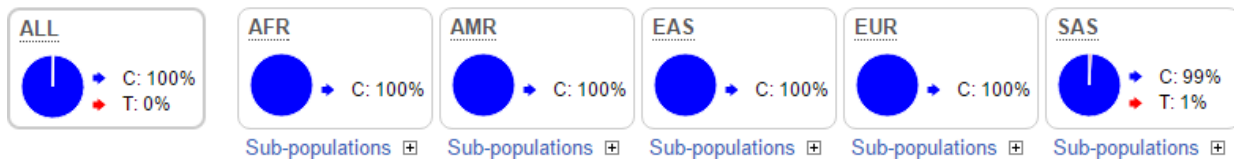
rs141639003

1000 Genomes Project Phase 3 allele frequencies



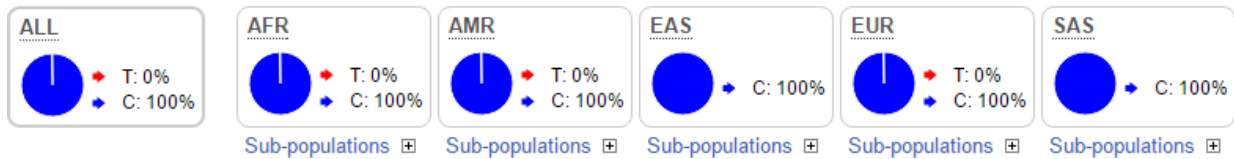
rs143121586

1000 Genomes Project Phase 3 allele frequencies



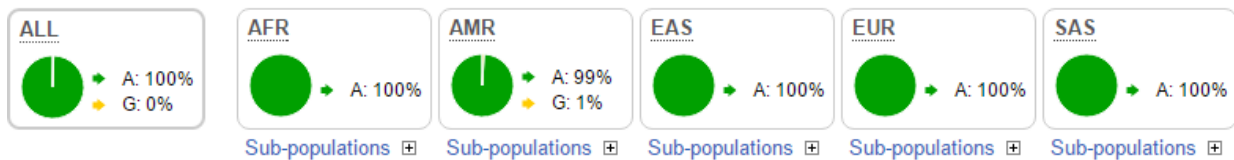
rs144185727

1000 Genomes Project Phase 3 allele frequencies



rs144381807

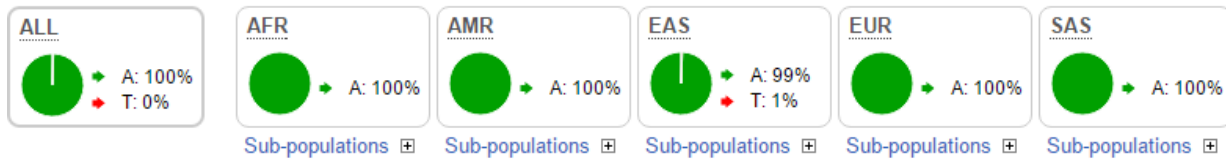
1000 Genomes Project Phase 3 allele frequencies





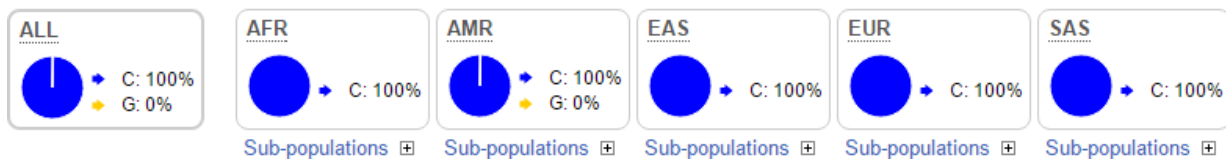
rs144581146

1000 Genomes Project Phase 3 allele frequencies



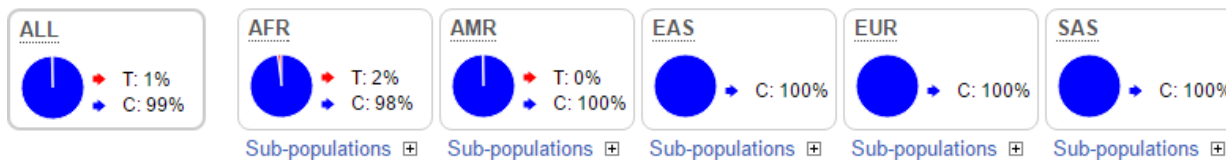
rs145437748

1000 Genomes Project Phase 3 allele frequencies



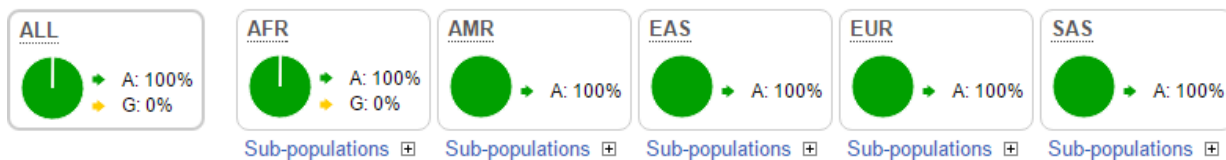
rs148856876

1000 Genomes Project Phase 3 allele frequencies



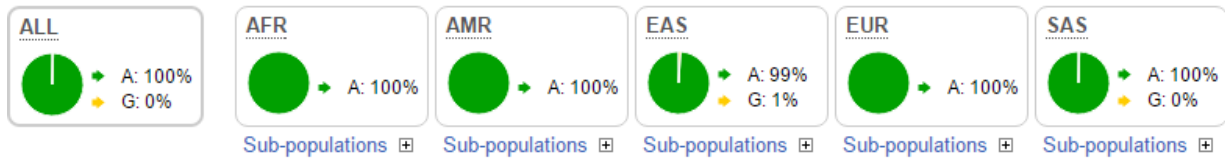
rs149926323

1000 Genomes Project Phase 3 allele frequencies



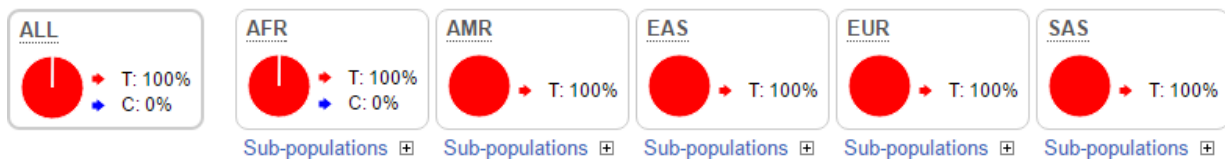
rs150276317

1000 Genomes Project Phase 3 allele frequencies



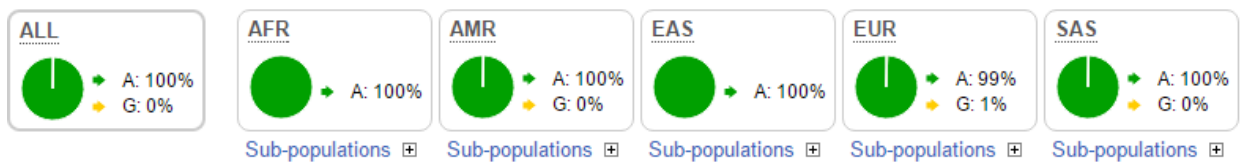
rs151074230

1000 Genomes Project Phase 3 allele frequencies



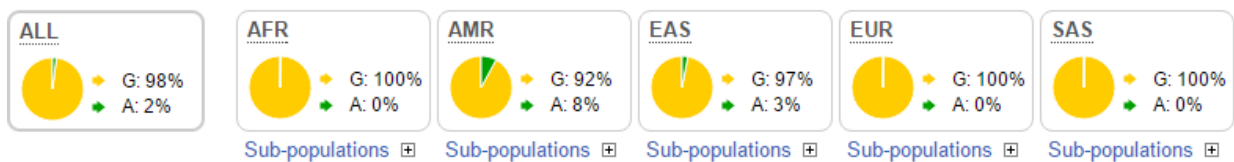
rs151112830

1000 Genomes Project Phase 3 allele frequencies



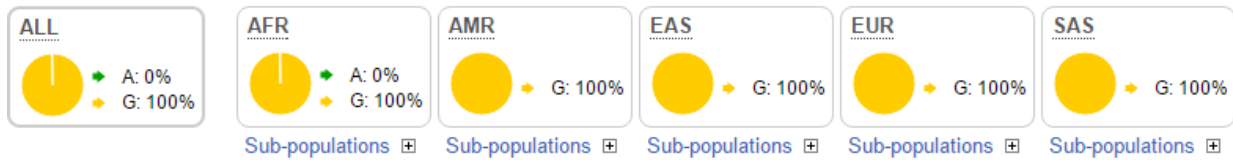
rs17101603

1000 Genomes Project Phase 3 allele frequencies



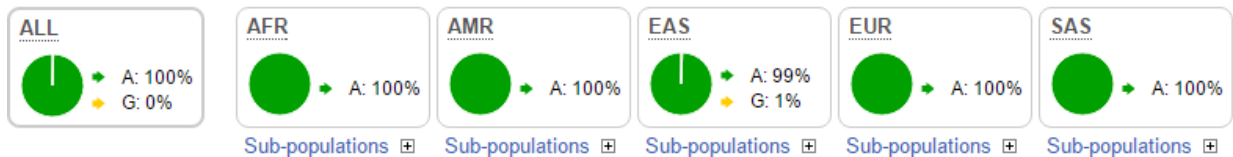
rs182053874

1000 Genomes Project Phase 3 allele frequencies



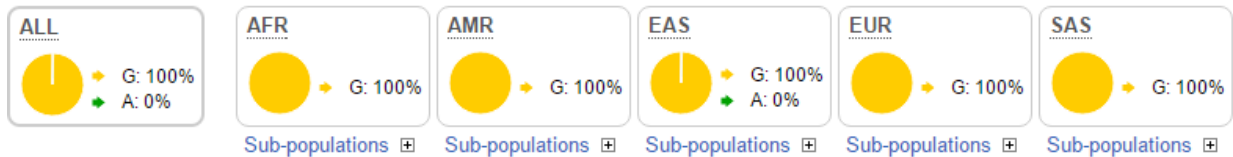
rs182134517

1000 Genomes Project Phase 3 allele frequencies



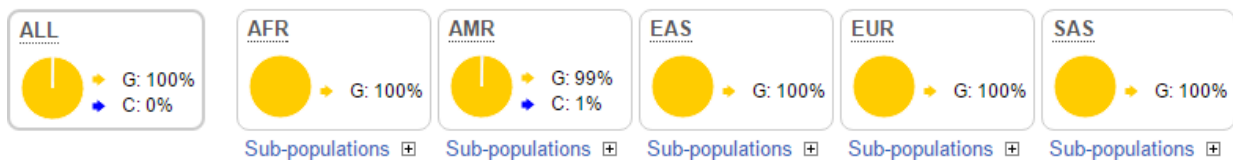
rs183618637

1000 Genomes Project Phase 3 allele frequencies



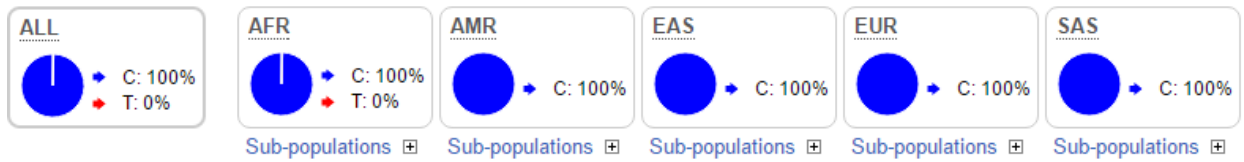
rs190343471

1000 Genomes Project Phase 3 allele frequencies



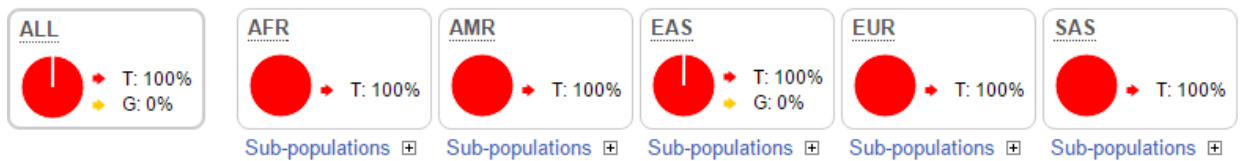
rs199988557

1000 Genomes Project Phase 3 allele frequencies



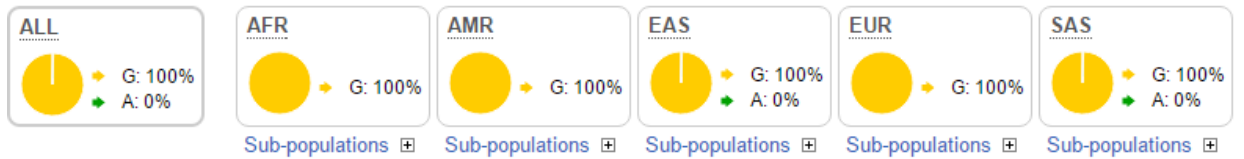
rs200516939

1000 Genomes Project Phase 3 allele frequencies



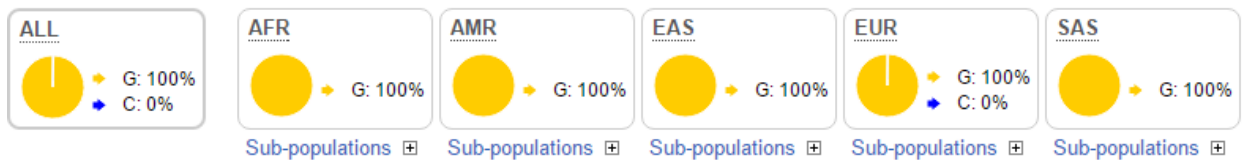
rs200568028

1000 Genomes Project Phase 3 allele frequencies



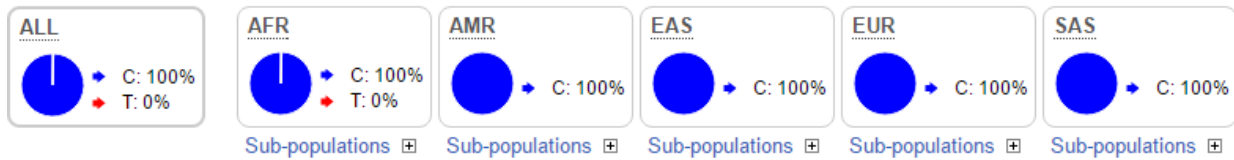
rs201327860

1000 Genomes Project Phase 3 allele frequencies



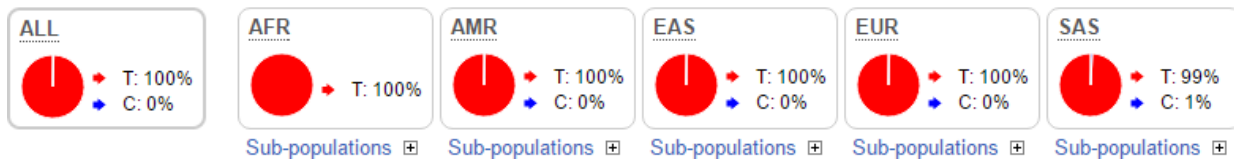
rs201332560

1000 Genomes Project Phase 3 allele frequencies



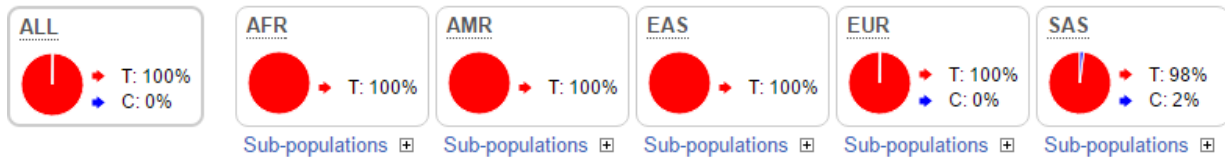
rs36089250

1000 Genomes Project Phase 3 allele frequencies



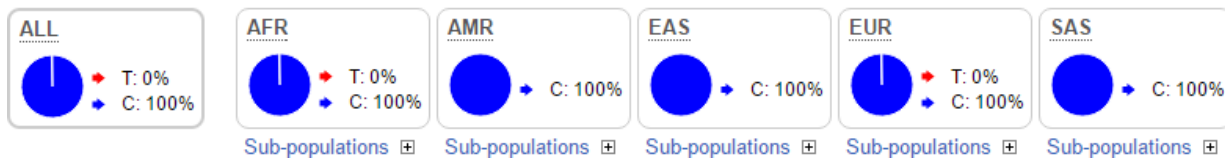
rs372765094

1000 Genomes Project Phase 3 allele frequencies



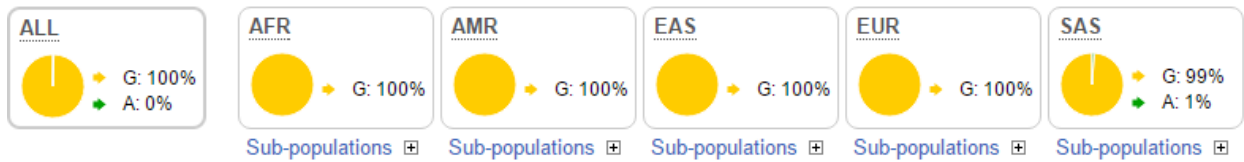
rs374457649

1000 Genomes Project Phase 3 allele frequencies



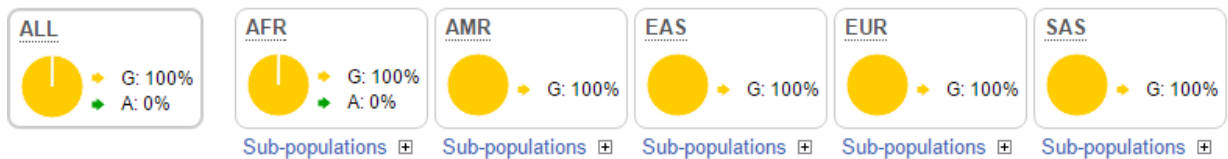
rs375276982

1000 Genomes Project Phase 3 allele frequencies



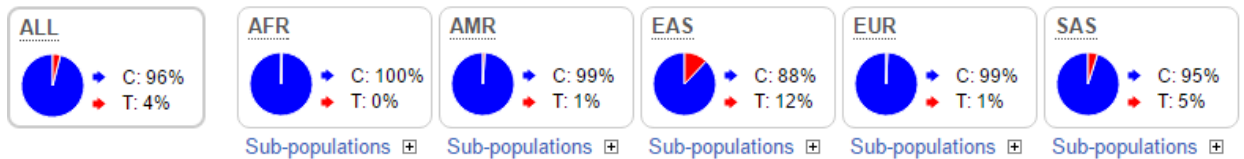
rs376321377

1000 Genomes Project Phase 3 allele frequencies



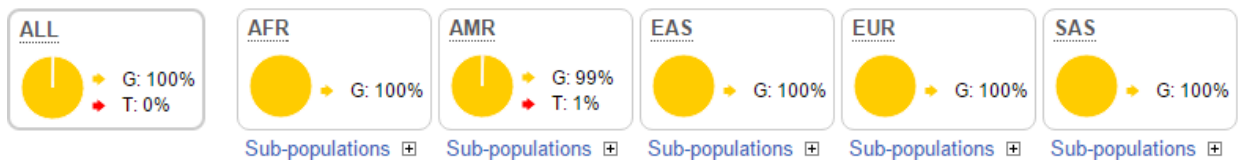
rs41291993

1000 Genomes Project Phase 3 allele frequencies



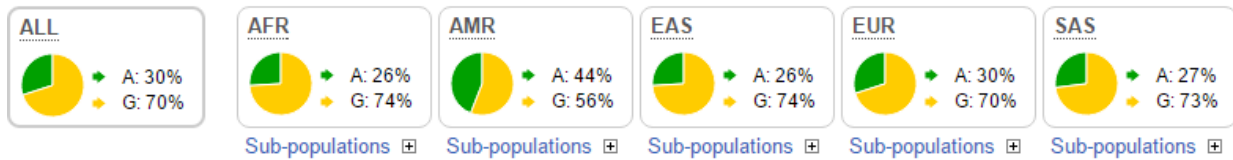
rs41314011

1000 Genomes Project Phase 3 allele frequencies



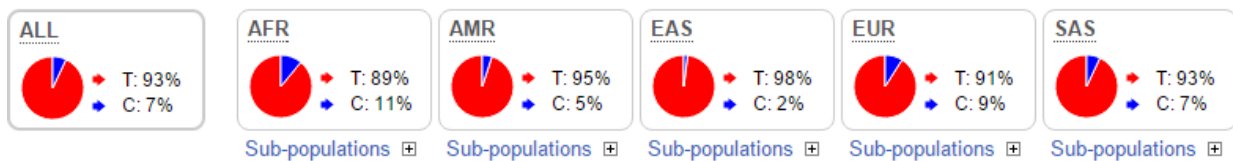
rs4591

1000 Genomes Project Phase 3 allele frequencies



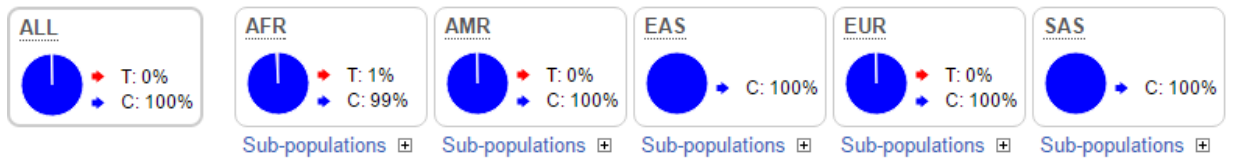
rs4842

1000 Genomes Project Phase 3 allele frequencies



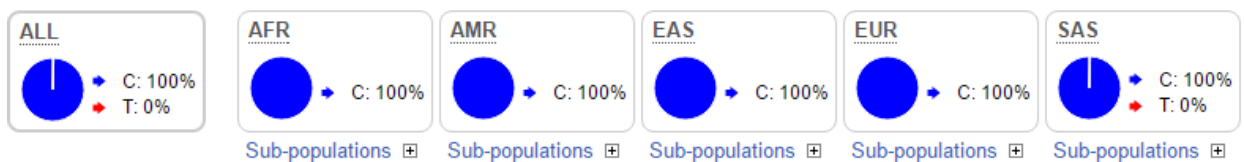
rs531544101

1000 Genomes Project Phase 3 allele frequencies



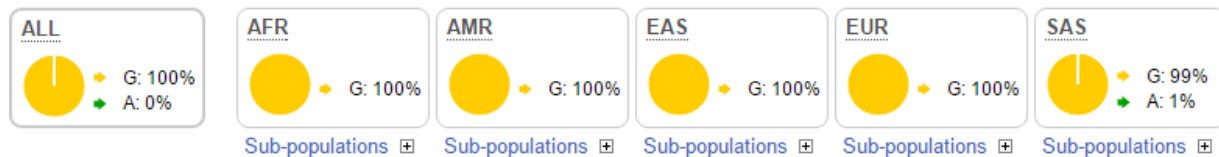
rs537287884

1000 Genomes Project Phase 3 allele frequencies



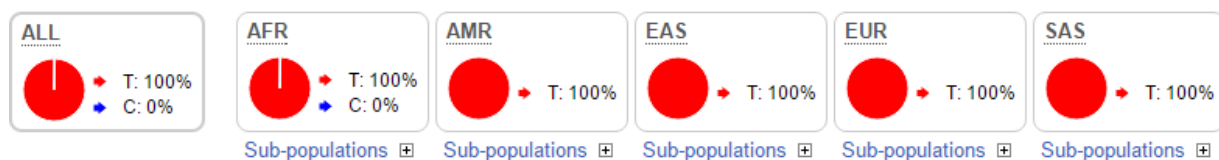
rs550205374

1000 Genomes Project Phase 3 allele frequencies



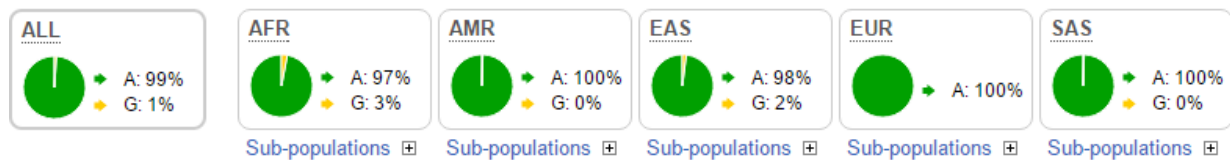
rs573246874

1000 Genomes Project Phase 3 allele frequencies



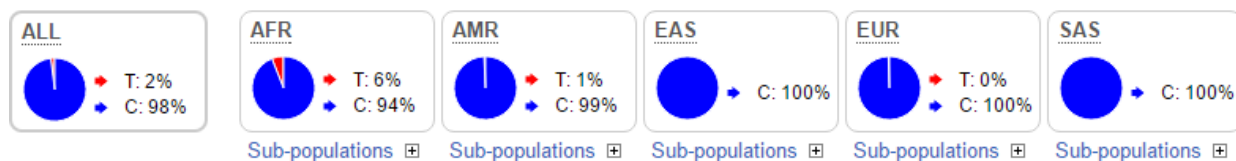
rs57929423

1000 Genomes Project Phase 3 allele frequencies



rs61752543

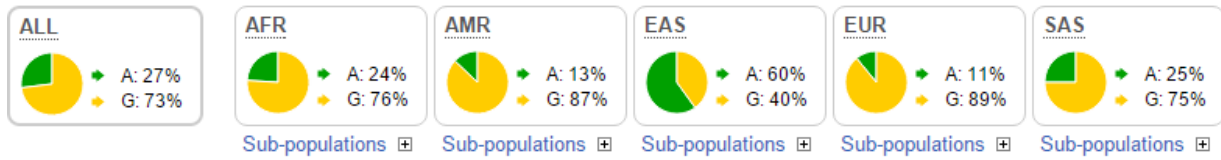
1000 Genomes Project Phase 3 allele frequencies





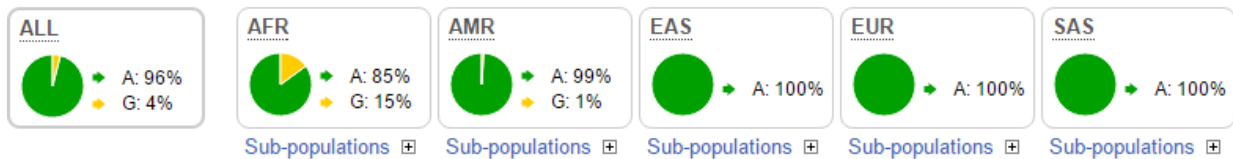
rs6519327

1000 Genomes Project Phase 3 allele frequencies



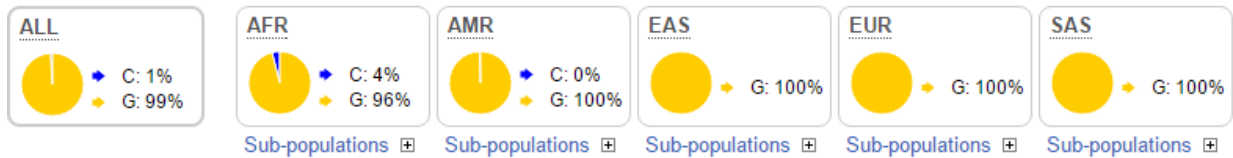
rs6968

1000 Genomes Project Phase 3 allele frequencies



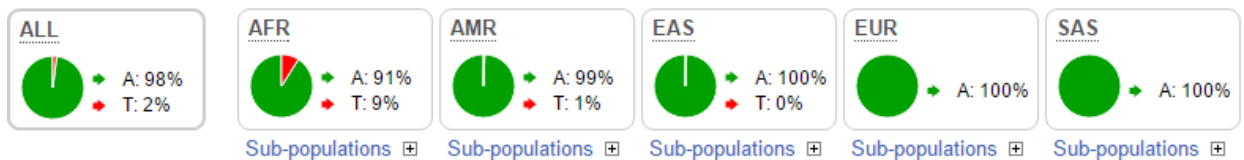
rs73338261

1000 Genomes Project Phase 3 allele frequencies



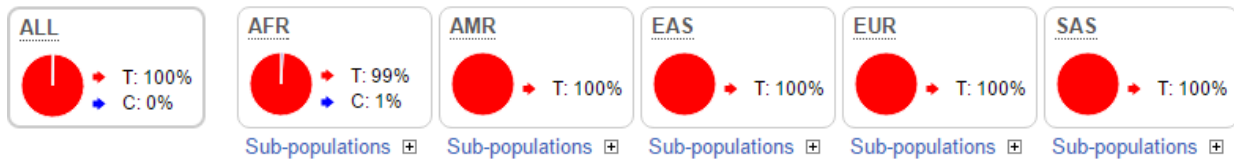
rs73897037

1000 Genomes Project Phase 3 allele frequencies



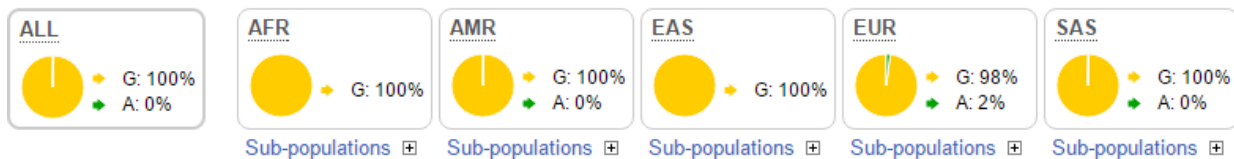
rs75701641

1000 Genomes Project Phase 3 allele frequencies



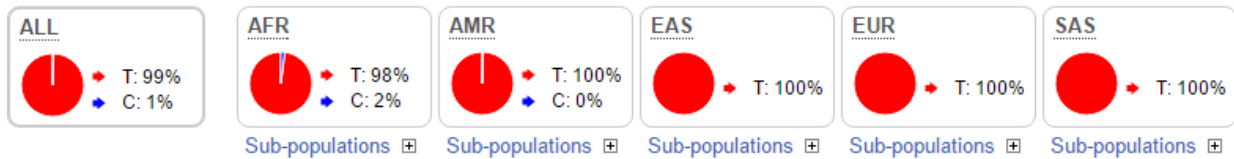
rs76028807

1000 Genomes Project Phase 3 allele frequencies



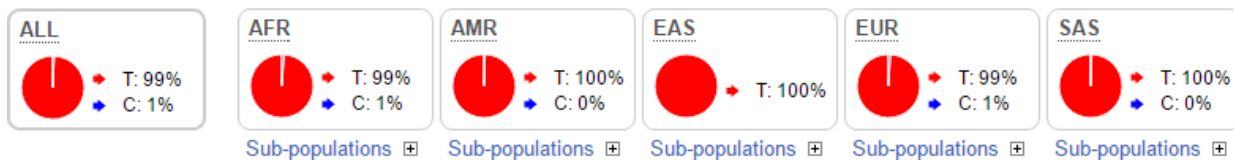
rs76567292

1000 Genomes Project Phase 3 allele frequencies



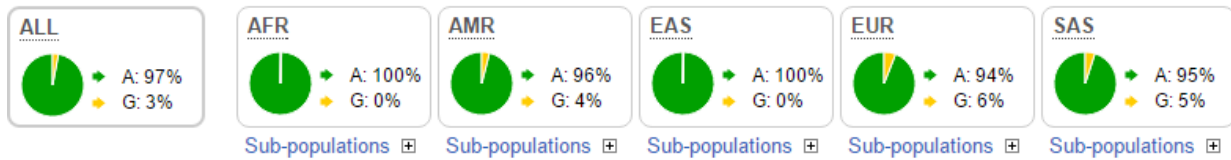
rs77958705

1000 Genomes Project Phase 3 allele frequencies



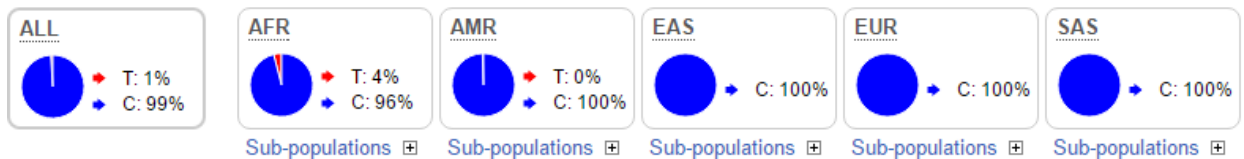
rs78234759

1000 Genomes Project Phase 3 allele frequencies



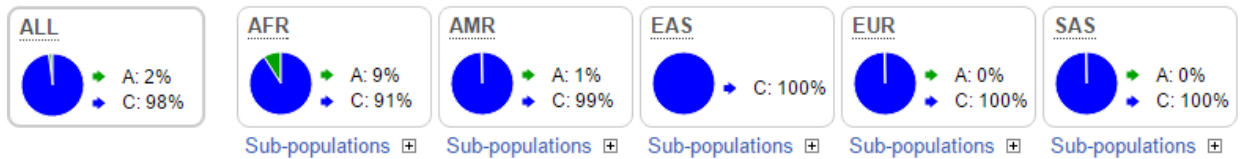
rs78375935

1000 Genomes Project Phase 3 allele frequencies



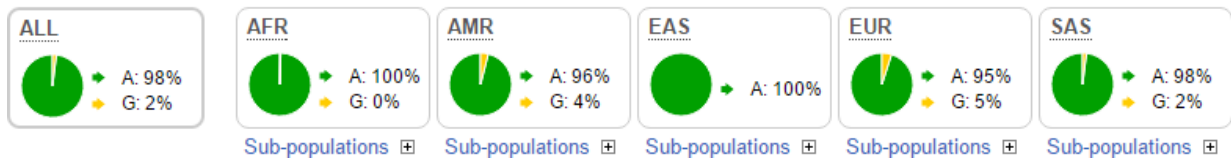
rs79011243

1000 Genomes Project Phase 3 allele frequencies



rs8106

1000 Genomes Project Phase 3 allele frequencies



## ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η φυσική επιλογή θεωρητικά θα τείνει να ευνοήσει την εξελικτική συμπροσαρμογή των πρωτεϊνών που αλληλεπιδρούν μεταξύ τους. Τα ενζυμικά σύμπλοκα της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων και της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης είναι ελκυστικά μοντέλα για την ανάλυση της συν-προσαρμογής καθώς οι πρωτεΐνες της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης κωδικοποιούνται από πυρηνικά και μιτοχονδριακά γονίδια, τα οποία θα πρέπει να συνεργαστούν αρμονικά προκειμένου να εφοδιάσουν το κύτταρο με την απαραίτητη ενέργεια.

Η παρούσα μελέτη αφορά στους πολυμορφισμούς και την συμπροσαρμογή των πυρηνικών και μιτοχονδριακών γονιδίων της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης στον άνθρωπο με σκοπό να γίνει η μέτρηση της συμπροσαρμογής αλλά και ο ρυθμός εξέλιξης τους. Τα δεδομένα προέκυψαν από αναζήτηση σε βάσεις δεδομένων με μέτρηση των μεταλλάξεων (συνωνύμων και παρανοηματικών) για κάθε ένα γονίδιο αλλά και συνολικά για κάθε υπομονάδα, την εύρεση του ρυθμού εμφάνισης μεταλλάξεων και σύγκριση των ποσοστών αυτών με τα ποσοστά γονιδίων που συμμετέχουν στην γλυκόλυση, στον κύκλο Krebs, καθώς και γονίδια συντήρησης (housekeeping).

Τα πυρηνικά γονίδια της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης, καθώς και τα γονίδια της γλυκόλυσης, του κύκλου του Krebs και τα γονίδια συντήρησης αναλύθηκαν όλα από μία βάση (1000G). Τα μιτοχονδριακά γονίδια όλων των υπομονάδων αναλύθηκαν και συγκρίθηκαν από τρεις βάσεις δεδομένων λόγω του υψηλού ποσοστού μεταλλαξιγένεσης που παρουσιάζουν. Οι διαφορές στα ποσοστά μεταξύ των βάσεων δεδομένων, όσον αφορά στα μιτοχονδριακά γονίδια, είναι αρκετά μεγάλες και αυτό οφείλεται στη διαφορά δείγματος μεταξύ τους, καθώς το δείγμα κυμαίνεται από χίλια έως εκατομμύρια άτομα και στις νέες εισαγωγές δειγμάτων στις βάσεις δεδομένων καθημερινά.

Όσον αφορά στα ποσοστά εμφάνισης μεταλλάξεων, βρέθηκε πως, σε επίπεδο γονιδίων, υπήρχαν πολλές περισσότερες παρανοηματικές μεταλλάξεις από ότι συνώνυμες και το ίδιο βρέθηκε και σε επίπεδο συνολικά των υπομονάδων, αλλά και για όλες τις υπόλοιπες ομάδες γονιδίων που αναλύθηκαν και συμμετέχουν στην γλυκόλυση, στον κύκλο Krebs, όπως και τα γονίδια συντήρησης (housekeeping). Αυτό, αν και αρχικά φαίνεται να μην ακολουθεί τον κανόνα, ίσως οφείλεται στο ότι, όπως έχει αποδειχθεί, τα επιβλαβή αλληλόμορφα (στην περίπτωση μας αλληλόμορφα με παρανοηματικές μεταλλάξεις) έχουν προκύψει σχετικά πρόσφατα στην εξελικτική πορεία και, εφόσον η επιλογή δεν έχει προλάβει να δράσει επάνω τους, είναι περισσότερα από ότι τα μη επιβλαβή (συνώνυμες μεταλλάξεις), τουλάχιστον για αλληλόμορφα που εμφανίζονται με μια συγκεκριμένη συχνότητα (στη συγκεκριμένη περίπτωση  $MAF > 0,01$ ) (Adam Kiezun, Sara L. Pulit 2013). Επίσης, είναι γνωστό πως ελαφρώς επιβλαβείς μεταλλάξεις είναι κοινές στο μιτοχονδριακό DNA και συμβάλλουν στον πολυμορφισμό, αλλά με την πάροδο του χρόνου, η επιλογή θα τα απομακρύνει από τους

πληθυσμούς και έτσι δεν αναμένεται να συνεισφέρουν σημαντικά στον διαειδικό πολυμορφισμό στο μιτοχονδριακό DNA (Ballard & Whitlock 2004). Τέλος, θα πρέπει να ληφθεί υπόψη πως ο αριθμός των μη συνώνυμων αντικαταστάσεων αυξάνεται στην παρούσα περίπτωση λόγω της μικρής συχνότητας εμφάνισής τους στους πληθυσμούς, όπως φαίνεται στο παράρτημα.

Το σύμπλοκο I είναι ιδιαιτέρως σημαντικό στην οξειδωτική φωσφορυλίωση διότι είναι υπεύθυνο για την πρόσληψη των ηλεκτρονίων του NADH και αυτός ο ρόλος αλλά και η χαρακτηριστική του δομή έχουν οδηγήσει στην εκτενή του μελέτη. Προέκυψε λοιπόν ο ακριβής χαρακτηρισμός της στερεοδιαμόρφωσης του ενζύμου αλλά και των θέσεων των συστατικών του. Έτσι, για την υπομονάδα I έγινε περαιτέρω διαχωρισμός των γονιδίων της σε γονίδια πυρήνα/βοηθητικά (core/supernumerary) αλλά και με βάση το βραχίονα (Ia) που βρίσκεται στη μήτρα και τους βραχίονες (Iβ, Iγ) που βρίσκονται στη μεμβράνη. Ο βραχίονας Ia διαθέτει ένα μιτοχονδριακό και 23 πυρηνικά γονίδια, ενώ οι βραχίονες Iβ και Iγ διαθέτουν 6 μιτοχονδριακά και 14 πυρηνικά γονίδια. Θα αναμέναμε λοιπόν μεταξύ των βραχιόνων να υπάρχει διαφορά στα ποσοστά εμφάνισης μεταλλάξεων λόγω της υπόθεσης της συμπροσαρμογής και τους αντικειμενικά υψηλότερους ρυθμούς μετάλλαξης του μιτοχονδριακού DNA. Δηλαδή τα πυρηνικά γονίδια των βραχιόνων Iβ και Iγ θα έπρεπε να εμφανίζονται με υψηλότερα ποσοστά μεταλλάξεων, προκειμένου να ακολουθήσουν τους ρυθμούς μετάλλαξης των μιτοχονδριακών γονιδίων των συγκεκριμένων βραχιόνων. Αντίθετα, τα πυρηνικά γονίδια του βραχίονα Ia αναμένεται να εμφανίζουν σχετικά χαμηλότερους ρυθμούς μετάλλαξης εφόσον δεν θα πρέπει να συμπροσαρμοστούν με αντίστοιχα μιτοχονδριακά. Κάτι τέτοιο ωστόσο δεν επιβεβαιώνεται. Σε πολύ πρόσφατη μελέτη του εργαστηρίου (Τσιπουρλιάνος 2015), η ίδια ανάλυση του συμπλόκου I σε ένα άγριο είδος, τον ευρωπαϊκό λαγό (*Lepus europaeus*), έδωσε τα ακριβώς αντίθετα αποτελέσματα. Παρατηρήθηκε ότι ο μέσος όρος μη συνώνυμων μεταλλάξεων ανά νουκλεοτίδιο, όσον αφορά τα πυρηνικά γονίδια των υπομονάδων Iβ, Iγ, είναι διπλάσιος σε σχέση με του Ia και τείνει να προσεγγίσει την τιμή των μιτοχονδριακών στο Iβ, Iγ. Αυτή η διαφορά στο ρυθμό εξέλιξης ανάμεσα σε αυτές τις δύο κατηγορίες πυρηνικών και μιτοχονδριακών γονιδίων, θα μπορούσε να εξηγηθεί από το φαινόμενο της συμπροσαρμογής, όπου η στενή συνεργασία πυρηνικών και μιτοχονδριακών γονιδίων στους βραχίονες Iβ και Iγ προωθεί την αύξηση του ρυθμού εξέλιξης στα συγκεκριμένα πυρηνικά γονίδια, ώστε να προσεγγίσουν αυτόν των μιτοχονδριακών γονιδίων. Η έλλειψη συμπροσαρμογής ανάμεσα στα πυρηνικά και μιτοχονδριακά γονίδια του συμπλόκου I που παρατηρήθηκε στο άνθρωπο θα μπορούσε να οφείλεται στις διαφορετικές εξελικτικές πορείες των δύο ειδών. Είναι πιθανόν, σε πληθυσμούς ειδών, οι οποίοι παραμένουν απομονωμένοι για μεγάλα χρονικά διαστήματα (>10000 χρόνια στην περίπτωση του λαγού), εξαιτίας γεωγραφικών ή άλλων απομονωτικών μηχανισμών και με απουσία γονιδιακής ροής να ευνοείται η ανάπτυξη μηχανισμών συμπροσαρμογής των διαφορετικών γονιδιακών ομάδων. Η έλλειψη γονιδιακής ροής αναγκάζει τα δύο γονιδιώματα να

συνεξελιχθούν και να διαφοροποιηθούν μαζί από αντίστοιχα γονιδιώματα άλλων απομονωμένων πληθυσμών διότι δεν είναι δυνατή η εισροή και ανταλλαγή μεταλλάξεων που θα μπορούσαν να είναι ευνοϊκές και να καθυστερήσουν ή να αλλοιώσουν την συμπροσαρμογή. Αντίθετα, στους ανθρώπινους πληθυσμούς, τουλάχιστον αυτούς που εξετάζονται εδώ, υπάρχει μια συνεχής γονιδιακή ροή, έστω και μικρή, η οποία εισάγει συνεχώς νέες μεταλλάξεις και για τους δύο τύπους γονιδιωμάτων, με αποτέλεσμα να ομογενοποιούν τα γονιδιώματα των διαφόρων πληθυσμών και χαλαρώνουν οι μηχανισμοί της συμπροσαρμογής. Ο μηχανισμός της συμπροσαρμογής των πυρηνικών γονιδίων δρα όταν μεταλλάξεις λαμβάνουν μέρος στα μιτοχονδριακά γονίδια όσον αφορά το μονοπάτι της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης. Έτσι, οι συχνές μεταλλάξεις στο μιτοχονδριακό γονιδίωμα κατά κάποιο τρόπο καμουφλάρονται από αντίστοιχες μεταλλάξεις που συμβαίνουν στα πυρηνικά γονίδια. Όταν αυτές οι μεταλλάξεις «προσφέρονται» από άλλους πληθυσμούς μέσω της γονιδιακής ροής, δεν υπάρχει και έντονη ανάγκη τα δύο γονιδιώματα να συμπροσαρμοστούν.

Ο διαχωρισμός των γονιδίων του συμπλόκου I με βάση γονίδια του πυρήνα (core) και βοηθητικών (supernumerary) έδειξε την ύπαρξη μεγαλύτερου ποσοστού μεταλλάξεων στον πυρήνα παρά στα βοηθητικά γονίδια. Αυτό θα μπορούσε να εξηγηθεί καθώς ο πυρήνας του συμπλόκου και τα γονίδια του έχουν εμφανιστεί σε αρχαιότερους εξελικτικά οργανισμούς σε σύγκριση με τα βοηθητικά γονίδια τα οποία έκαναν την εμφάνιση τους πιο πρόσφατα στην εξελικτική πορεία. Στην περίπτωση αυτή, το ίδιο αποτέλεσμα παρατηρήθηκε και για την ανάλυση του συμπλόκου I στο λαγό, όσον αφορά τις δύο ομάδες γονιδίων (core και supernumerary).

Τα σύμπλοκα II και III παρουσιάζουν επίσης μεγάλο ποσοστό μεταλλάξεων σε σύγκριση με το αναμενόμενο και ιδιαιτέρως παρανοηματικών. Συγκεκριμένα για το σύμπλοκο II, σύμφωνα με τη θεωρία της συμπροσαρμογής, θα αναμενόταν να εμφανίσει μικρότερο ποσοστό εμφάνισης μεταλλάξεων διότι δεν διαθέτει κανένα μιτοχονδριακό γονίδιο και επομένως θα περίμενε κανείς τα ποσοστά των μεταλλάξεων να βρίσκονται στο ίδιο επίπεδο με τα υπόλοιπα πυρηνικά. Το ίδιο αναμένεται και για το σύμπλοκο III δεδομένου ότι διαθέτει μόνο ένα μιτοχονδριακό. Κάτι τέτοιο δεν επιβεβαιώνεται καθώς και η υπομονάδα II εμφανίζει αυξημένα ποσοστά μεταλλάξεων, σε σχεδόν ίδια επίπεδα με τις υπόλοιπες υπομονάδες. Όσον αφορά στο σύμπλοκο II, διαθέτει το γονίδιο SDHA το οποίο συγκεντρώνει ένα μεγάλο αριθμό μεταλλάξεων, οι περισσότερες από τις οποίες προκαλούν καρκίνο.

Το σύμπλοκο IV καταλύει το τελευταίο βήμα στην αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων και θεωρείται ως ένα πολύ σημαντικό ρυθμιστικό στοιχείο για την οξειδωτική φωσφορυλίωση. Μεταλλάξεις σε γονίδια του συμπλόκου αυτού (συγκεκριμένα του COX-IV) έχουν δείξει αδυναμία συναρμολόγησης του συμπλόκου, μειωμένο επίπεδο ATP, αλλά και κύτταρα ευαίσθητα σε απόπτωση (Youfen Li, Jeong-Soon Park, 2006). Η διαταραγμένη λειτουργία του

συμπλόκου λοιπόν οδηγεί σε πολλές διαταραχές στον άνθρωπο και είναι η πιο συχνή αιτία μιτοχονδριακών προβλημάτων. Στην παρούσα μελέτη βρέθηκε αρκετά υψηλό ποσοστό μεταλλάξεων στα πυρηνικά γονίδια του συμπλόκου και ιδιαίτερα των παρανοηματικών. Μένει να αναλυθεί εάν αυτές οι μεταλλάξεις προκαλούν βλαπτικό φαινότυπο και κατά πόσο ο φαινότυπος είναι βαρύς ή πιο ήπιος.

Το σύμπλοκο V αποτελεί το τελευταίο ένζυμο στο μονοπάτι της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης και βρίσκεται σε όλες τις μορφές ζωής και χρησιμοποιεί την ενέργεια της βαθμίδωσης πρωτονίων για να παράγει ATP από ADP. Το σύμπλοκο παρουσιάζει επίσης αυξημένο ποσοστό εμφάνισης παρανοηματικών μεταλλάξεων, αν και χαμηλότερο από τα υπόλοιπα σύμπλοκα, ενώ οι παρανοηματικές μεταλλάξεις, σε σχέση με τις συνώνυμες, εμφανίζουν την μικρότερη διαφορά στο ποσοστό όταν συγκρίνονται με τα υπόλοιπα σύμπλοκα.

Όσον αφορά τα γονίδια που συμμετέχουν στη γλυκόλυση, στον κύκλο Krebs και τα γονίδια συντήρησης, επιλέχθηκαν για σύγκριση με τα γονίδια των συμπλόκων της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης. Παρουσίασαν όλα το ίδιο πρότυπο μεταλλάξεων με υψηλότερο ποσοστό εμφάνισης παρανοηματικών μεταλλάξεων σε σχέση με τις συνώνυμες κάτι που επιβεβαιώνει τη νεότερη εμφάνιση αυτών των μεταλλάξεων στην εξελικτική πορεία όπως έχει ήδη ειπωθεί παραπάνω.

Πραγματοποιήθηκε επίσης πληθυσμιακή ανάλυση όλων των κοινών ( $MAF > 0,01$ ) σημειακών μεταλλάξεων ανάλογα με την κατανομή τους στους πέντε μεγάλους πληθυσμούς, δηλαδή στους Αφρικανούς (AFR), τους Αμερικάνους (AMR), τους Ασιάτες της Ανατολικής Ασίας (EAS), τους Ευρωπαίους (EUR) και τους Ασιάτες της Νότιας Ασίας (SAS). Από αυτή τη πληθυσμιακή ανάλυση προέκυψαν μεταλλάξεις που παρουσιάζουν έντονη διαφοροποίηση για κάθε σύμπλοκο, με το σύμπλοκο I να έχει τις περισσότερες μεταλλάξεις (17) και όλες ανήκουν σε γονίδια της οικογένειας NDUF. Το σύμπλοκο II έχει 15 μεταλλάξεις από τις οποίες οι 10 ανήκουν στο γονίδιο SDHA, κάτι που υποδηλώνει έντονη διαφοροποίηση του στο πληθυσμό. Το σύμπλοκο III έχει 6 μεταλλάξεις όπως και το σύμπλοκο IV. Τέλος το σύμπλοκο V έχει επίσης 6 μεταλλάξεις με τις 3 να ανήκουν στο γονίδιο ATP5O. Συμπερασματικά, τα πιο διαφοροποιημένα γονίδια μεταξύ των πληθυσμών από όλα τα σύμπλοκα είναι τα : NDUFV3, NDUF54, SDHA, COX4I.

Ο μηχανισμός της συμπροσαρμογής των πυρηνικών γονιδίων δρα όταν μεταλλάξεις λαμβάνουν μέρος στα μιτοχονδριακά γονίδια όσον αφορά το μονοπάτι της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης. Έτσι, οι συχνές μεταλλάξεις στο μιτοχονδριακό γονιδίωμα κατά κάποιο τρόπο καμουφλάρονται από αντίστοιχες μεταλλάξεις που συμβαίνουν στα πυρηνικά γονίδια. Ένα ενδιαφέρον φαινόμενο αποτελεί η «κατάρα της μητέρας» καθώς το μιτοχονδριακό

γονιδίωμα κληρονομείται από τη μητέρα μόνο προς τα παιδιά της. Οι μεταλλάξεις που υπάρχουν και δημιουργούνται στο μιτοχονδριακό γονιδίωμα και ιδιαίτερα οι ήπιες θα παραμείνουν στο γονιδίωμα και θα επηρεάσουν τα αρσενικά αναπαραγωγικά κύτταρα όπως έχει ήδη αναφερθεί. Τα σπερματοζωάρια έχουν αυξημένες ενεργειακές ανάγκες, πολύ περισσότερες από ότι τα σωματικά ή τα γυναικεία αναπαραγωγικά κύτταρα. Έτσι οι μεταλλάξεις του μιτοχονδριακού DNA που είναι ήπιες μεν αλλά προκαλούν διαταραχές στην οξειδωτική φωσφορυλίωση μπορούν να μειώσουν τη κινητικότητα του σπέρματος αλλά και τη γονιμότητα του ατόμου. Αυτές οι μεταλλάξεις δεν έχουν αντίκτυπο στα ωάρια καθώς δεν έχουν μεγάλες ενεργειακές απαιτήσεις (Smith et al 2010).



## Βιβλιογραφία

Adam Kiezun, Sara L. Pulit, Laurent C. Francioli, Deleterious Alleles in the Human Genome Are on Average Younger Than Neutral Alleles of the Same Frequency

Alberts, Bray, Hopkin (2006) Βασικές Αρχές Κυτταρικής Βιολογίας

Ballard JW, Kreitman M., Is mitochondrial DNA a strictly neutral marker?

Ballard JW, Whitlock MC., The incomplete natural history of mitochondria.

Boyer PD (1997). "The ATP synthase--a splendid molecular machine". Annu. Rev. Biochem. 66: 717–49.

Burton RS1, Ellison CK, Harrison JS. "The sorry state of F2 hybrids: consequences of rapid mitochondrial DNA evolution in allopatric populations Am Nat. 2006 Dec;168 Suppl 6:S14-24.

Calhoun MW, Thomas JW, Gennis RB (1994). "The cytochrome oxidase superfamily of redox-driven proton pumps". Trends Biochem. Sci. 19 (8): 325–30.

Chan SSL, Longley MJ, Copeland WC. Modulation of the W748S mutation in DNA polymerase {gamma} by the E1143G polymorphism in mitochondrial disorders. Hum Mol Genet. 2006;15:3473–3483.

Corina van Waveren and Carlos T Moraes, Transcriptional co-expression and co-regulation of genes coding for components of the oxidative phosphorylation system

Cummins JM, Jequier AM, Martin R, Mehmet D, Goldblatt J (1998) Semen levels of mitochondrial DNA deletions in men attending an infertility clinic do not correlate with phenotype. Int J Androl 21:47–52

Duborjal Hervé , Réjane Beugnot<sup>1,2</sup>, Bénédicte Mousson de Camaret<sup>3</sup>, and Jean-Paul Issartel<sup>1,4</sup>, Large Functional Range of Steady-State Levels of Nuclear and Mitochondrial Transcripts Coding for the Subunits of the Human Mitochondrial OXPHOS System

Ellison CK, Burton RS. Disruption of mitochondrial function in interpopulation hybrids of *Tigriopus californicus*. Evolution 60: 1382-1391

Ellison CK, Burton RS. Interpopulation hybrid breakdown maps to the mitochondrial genome.

Enriquez JA, Chomyn A, Attardi G (1995) MtDNA mutation in MERRF syndrome causes defective aminoacylation of tRNA(Lys) and premature translation termination. Nat Genet 10:47–55

Ernster, Lars; Schatz, Gottfried (1981). "Mitochondria: a historical review" (PDF). *The Journal of Cell Biology* 91 (3 Pt 2): 227s–255s. doi:10.1083/jcb.91.3.227s.

Følgero T, Bertheussen K, Lindal S, Torbergesen T, Oian P (1993) Mitochondrial Disease and Reduced Sperm Motility. *Hum Reprod* 8:1863–1868

Frank SA, Hurst LD (1996) Mitochondria and male disease.

*Nature* 383:224

Ford WC, Harrison A (1981) The role of oxidative phosphorylation in the generation of ATP in human spermatozoa. *J Reprod Fertil* 63:271–278

Gershoni M, Templeton AR, Mishmar D “Mitochondrial bioenergetics as a major motive force of speciation. *Bioessays*. 2009 Jun;31(6):642-50. doi: 10.1002/bies.200800139.

Gershoni M, et al. Coevolution predicts direct interactions between mtDNA-encoded and nDNA-encoded subunits of oxidative phosphorylation complex I. *J Mol Biol.* 2010;404:158-171.

Halangk W, Bohnensack R, Kunz W (1985) Interdependence of mitochondrial ATP production and extramitochondrial ATP utilization in intact spermatozoa. *Biochim Biophys Acta* 808:316–322

Hirst J (January 2010). "Towards the molecular mechanism of respiratory complex I". *Biochem. J.* 425 (2): 327–39

Holyoake AJ , Sin IL , Benny PS , Sin FY ., Association of a novel human mtDNA ATPase6 mutation with immature sperm cells

Kao SH, Chao HT, Wei YH (1995) Mitochondrial deoxyribonucleic acid 4977-bp deletion is associated with diminished fertility and motility of human sperm. *Biol Reprod* 52: 729–736

Larsson NG, Clayton DA (1995) Molecular genetic aspects of human mitochondrial disorders. *Annu Rev Genet* 29: 151–178

Lenaz G, Fato R, Genova ML, Bergamini C, Bianchi C, Biondi A (2006). "Mitochondrial Complex I: structural and functional aspects". *Biochim. Biophys. Acta* 1757 (9-10): 1406–20

M.E. Rubio-Gozalbo, K.P. Dijkman, L.P. van den Heuvel, R.C. Sengers, U.Wendel, J.A. Smeitink, Clinical differences in patients with mitochondriocytopathies due to nuclear versus mitochondrial DNA mutations, *Hum. Mutat.* 15 (2000) 522–532.

M. Yamaoka, K. Isobe, H. Shitara, H. Yonekawa, S. Miyabayashi, J.I. Hayashi, Complete repopulation of mouse mitochondrial DNA-less cells with rat mitochondrial DNA restores mitochondrial translation but not mitochondrial respiratory function, *Genetics* 155 (2000) 301–307.

Pascual ML, Cebrian-Perez JA, Lopez-Perez MJ, MuinoBlanco T (1996) Short-term inhibition of the energy metabolism affects motility but not surface properties of sperm cells. *Biosci Rep* 16:35–40

R. Dey, A. Barrientos, C.T. Moraes, Functional constraints of nuclear-mitochondrial DNA interactions in xenomitochondrial rodent cell lines, *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 31520–31527.

Ruiz-Pesini E, Diez C, Lapena AC, Perez-Martos A, Montoya J, Alvarez E, Arenas J, Lo´pez-Pe´rez M (1998) Correlation of sperm motility with mitochondrial enzymatic activities. *Clin Chem* 44:1616–1620

Schon EA, Bonilla E, DiMauro S (1997) Mitochondrial DNA mutations and pathogenesis. *J Bioenerg Biomembrane* 29: 131–149

Schultz BE, Chan SI (2001). "Structures and proton-pumping strategies of mitochondrial respiratory enzymes". *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 30: 23–65.

Schwartz M, Vissing J (2002). "Paternal inheritance of mitochondrial DNA". *N. Engl. J. Med.* 347 (8): 576–80. doi:10.1056/NEJMoa020350

Smith S, Turbill C, Suchentrunk F., Introducing mother's curse: low male fertility associated with an imported mtDNA haplotype in a captive colony of brown hares.

Stryer L, *Biochemistry* (2007)

St. John JC, Cooke ID, Barratt CL (1997) Mitochondrial mutations and male infertility. *Nat Med* 3:124–125

Wallace DC; et al. (1999). "Mitochondrial DNA variation in human evolution and disease". NCBI.

Wallace DC (1995) Mitochondrial DNA variation in human evolution, degenerative disease, and aging. *Am J Hum Genet* 57:201–223

Yael Garbian, Ofer Ovadia, Sarah Dadon, Dan Mishmar, Gene Expression Patterns of Oxidative Phosphorylation Complex I Subunits Are Organized in Clusters

Yankovskaya V, Horsefield R, Törnroth S, Luna-Chavez C, Miyoshi H, Léger C, Byrne B, Cecchini G, Iwata S, et al. (2003). "Architecture of succinate dehydrogenase and reactive oxygen species generation". *Science* 299 (5607): 700–4.

Yoshikawa S, Muramoto K, Shinzawa-Itoh K, Aoyama H, Tsukihara T, Shimokata K, Katayama Y, Shimada H (2006). "Proton pumping mechanism of bovine heart cytochrome c oxidase". *Biochim. Biophys. Acta* 1757 (9-10): 1110–6.

Youfen Li, Jeong-Soon Park, Jian-Hong Deng, Cytochrome c Oxidase Subunit IV is Essential for Assembly and Respiratory Function of the Enzyme Complex

Zeviani M, Antozzi C (1997) Mitochondrial disorders. *Mol Hum Reprod* 3:133–148

Zhen, Y. et al. (1999) Definition of the interaction domain for cytochrome c on cytochrome c oxidase. I. Biochemical, spectral, and kinetic characterisation of surface mutants in subunit II of *Rhodobacter sphaeroides* cytochrome aa3. *J. Biol. Chem.* 274, 38032–38041

Μαργαρίτης Λ, Βιολογία Κυττάρου (2008)

Τσιπουρλιάνος Ανδρέας, Πυρηνικά γονίδια του OXPHOS, τι μας λέει το NGS? 2015