

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ,

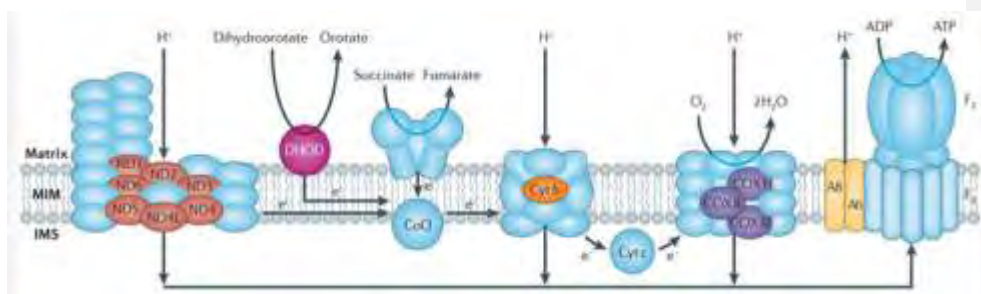
Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών του Τμήματος
Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας

«ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ - ΜΟΡΙΑΚΗ
ΓΕΝΕΤΙΚΗ, ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ»

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΠΥΡΗΝΙΚΑ ΓΟΝΙΔΙΑ ΤΟΥ ΟΧΡΗΟΣ: ΤΙ ΜΑΣ ΛΕΕΙ ΤΟ NEXT
GENERATION SEQUENCING

Ανδρέας Τσιπουρλιάνος



ΛΑΡΙΣΑ, 2015

Πυρηνικά γονίδια του ΟΧΡΗΟΣ: Τι μας λέει το next
generation sequencing

ΟΧΡΗΟΣ nuclear genes: What next generation
sequencing tells us

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

ΜΑΜΟΥΡΗΣ ΖΗΣΗΣ: (ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ)	ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ 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 ANNA- ΜΑΡΙΑ	Επίκουρος Καθηγήτρια Βιοχημείας του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Η παρούσα μεταπτυχιακή πτυχιακή διατριβή πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Γενετικής, Συγκριτικής και Εξελικτικής Βιολογίας του τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, υπό την επίβλεψη του Καθηγητή Γενετικής Ζωικών Πληθυσμών, κ. Ζήση Μαμούρη, τον οποίο θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω την Αναπληρώτρια καθηγήτρια Βιολογίας Σπονδυλωτών, κ. Μούτου Αικατερίνη και την Επίκουρο Καθηγήτρια Βιοχημείας, κ. Ψαρρά Άννα-Μαρία για την συμμετοχή στην τριμελή συμβουλευτική επιτροπή. Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον υποψήφιο διδάκτορα Θέμη Γιαννούλη για την πολύτιμη βοήθειά του και τις χρήσιμες συμβουλές του, καθώς και τον Σταμάτη Κώστα για τη βοήθειά του κατά τη διεξαγωγή των πειραμάτων. Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω τις Γαλλιοπούλου Ελένη, Σαρρή Κωνσταντίνα, Μαργαριτοπούλου Βασιλική καθώς και τα υπόλοιπα μέλη του εργαστηρίου για το ευχάριστο κλίμα συνεργασίας.

Περίληψη

Η μελέτη αυτή αφορά την ανάλυση των εξελικτικών σχέσεων ανάμεσα στις υποομάδες του συμπλόκου I της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης (οξειδοαναγωγή του ζεύγους NADH- Q) στον ευρωπαϊκό λαγό (*Lepus europaeus*). Για τη συγκεκριμένη ανάλυση χρησιμοποιήθηκαν δεδομένα, τα οποία προέκυψαν από αλληλούχηση νέας γενιάς και αλληλούχηση Sanger για τα πυρηνικά και μιτοχονδριακά γονίδια του συμπλόκου I. Συνολικά παρατηρήθηκαν 222 μεταλλάξεις, εκ των οποίων οι 53 μη συνώνυμες, σε 42 πυρηνικά γονίδια (δομικά και συναρμογής) καθώς και 229 μεταλλάξεις, εκ των οποίων 18 μη συνώνυμες, σε 7 μιτοχονδριακά γονίδια. Για τα παραπάνω γονίδια υπολογίστηκαν ο αριθμός μεταλλάξεων ανά νουκλεοτίδιο, καθώς και ο αριθμός μη συνώνυμων μεταλλάξεων ανά νουκλεοτίδιο και λαμβάνοντας υπόψη τη δομή του ενζύμου, την προέλευση των συστατικών του και την λειτουργία τους, ομαδοποιήθηκαν με τρεις διαφορετικούς τρόπους: Α) Δομικά πυρηνικά-συναρμογής-μιτοχονδριακά, Β) Βραχίονας μήτρας(Ια)- βραχίονας μεμβράνης(Ιβ+Ιγ) και Γ) Πυρήνας του συμπλόκου- βοηθητικά. Στην πρώτη ομαδοποίηση παρατηρήθηκε ότι ο μέσος όρος μη συνώνυμων μεταλλάξεων ανά νουκλεοτίδιο είναι σχεδόν ίδιος ανάμεσα στα δομικά και τα συναρμογής, ενώ είναι σχεδόν διπλάσιος στα μιτοχονδριακά. Στη δεύτερη ομαδοποίηση παρατηρήθηκε ότι ο μέσος όρος μη συνώνυμων μεταλλάξεων ανά νουκλεοτίδιο, όσον αφορά τα πυρηνικά των υπομονάδων Ιβ+Ιγ, είναι διπλάσιος σε σχέση με του Ια και τείνει να προσεγγίσει την τιμή των μιτοχονδριακών στο Ιβ+Ιγ, γεγονός το οποίο αποτελεί σημαντική ένδειξη του φαινομένου της συνπροσαρμογής. Στην τρίτη ομαδοποίηση παρατηρήθηκε μία σημαντική αύξηση του μέσου όρου μη συνώνυμων μεταλλάξεων ανά νουκλεοτίδιο στα γονίδια του πυρήνα του συμπλόκου, σε σχέση με τα βοηθητικά γονίδια. Τέλος συζητείται η ύπαρξη του φαινομένου της συνπροσαρμογής στα συστατικά της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης στο είδος *Lepus europaeus*, καθώς και η εμφάνιση του φαινομένου, σε γονίδια τα οποία δεν αποτελούν τμήμα της δομής και λειτουργίας του συμπλόκου, αλλά τις επηρεάζουν με έμμεσο τρόπο και το πως οι επιπτώσεις του φαινομένου επηρεάζουν την προσαρμοστικότητα του οργανισμού.

Abstract

This study concerns the analysis of evolutionary relationships among subgroups of complex I of oxidative phosphorylation (NADH:Q oxidoreductase) in the European hare (*Lepus europaeus*). For this analysis we used data from new-generation sequencing and Sanger sequencing of nuclear and mitochondrial complex I genes. Altogether 222 mutations were observed, of which 53 non-synonymous, in 42 nuclear genes (structural and assembly) and 229 mutations, of which 18 non-synonymous, in 7 mitochondrial genes. For these genes we calculated the number of mutations per nucleotide, and the number of non-synonymous mutations per nucleotide and we grouped them in three different ways, considering the structure of the enzyme, the origin of its components and their function: A) Nuclear structural- nuclear assembly- mitochondrial structural, B) matrix arm (Ia)- membrane arm (Ib+ Iγ), C) core- supernumerary. In the first grouping we observed that the average non-synonymous mutations per nucleotide is almost identical between the structural and assembly and is almost double in the mitochondrial. In the second grouping we observed

that the average non-synonymous mutations per nucleotide, regarding nuclear subunits I β +I γ , is double compared to I α and tends to approach the value of the mitochondrial I β + I γ subunits, which is an important indicator of coadaptation. In the third grouping we observed a significant increase of the average non-synonymous mutations per nucleotide in the core genes, compared to the supernumerary genes. Finally is discussed the existence of coadaptation in the components of the oxidative phosphorylation in *Lepus europaeus*, as well as the occurrence of coadaptation in genes which are not part of the structure and function of the complex, but influence them indirectly, and how coadaptation effects the species fitness.

Περιεχόμενα

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	8
1.1. Μιτοχόνδριο.....	8
1.2. Οξειδωτική φωσφορυλίωση.....	10
1.3. Μηχανισμός οξειδωτικής φωσφορυλίωσης.....	11
1.4. Η αρχιτεκτονική της αναπνευστικής αλυσίδας	12
1.5. Μιτοχονδριακό DNA.....	21
1.6. Ρυθμός εξέλιξης του μιτοχονδριακού DNA.....	22
1.7. Ρόλος του πυρηνικού DNA στην οξειδωτική φωσφορυλίωση.....	23
1.8. Συνπροσαρμογή- συνεξέλιξη.....	23
1.9. Η κατάρα της μητέρας (mother's curse).....	24
1.10. Αντικείμενο μελέτης.....	25
1.11. Ευρωπαϊκός λαγός (<i>Lepus europaeus</i>).....	26
1.12. Μεθοδολογική προσέγγιση.....	27
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	32
2.1. Απομόνωση DNA.....	32
2.2. Προσδιορισμός συνολικής ποσότητας DNA ανά δείγμα.....	34
2.3. Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR).....	34
2.4. Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης.....	36
2.5. Αλληλούχιση.....	37
2.6. Ανάλυση χρωματογραφημάτων αλληλούχισης.....	37
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	38
3.1. Απομόνωση DNA.....	38
3.2. PCR.....	38
3.3. Αλληλούχιση.....	38
3.4. Δεδομένα από NG.....	62
3.5. Ανάλυση δεδομένων.....	63
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	70
5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	74

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1. ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΟ

Για τη διατήρηση της ζωής απαιτείται ενέργεια, η οποία παράγεται και χρησιμοποιείται από τα κύτταρα με τη μορφή της τριφωσφορικής αδενοσίνης (ATP). Η διαδικασία παραγωγής του ATP παρουσία οξυγόνου καλείται αερόβια αναπνοή και στα ευκαρυωτικά κύτταρα λαμβάνει χώρα στα μιτοχόνδρια.

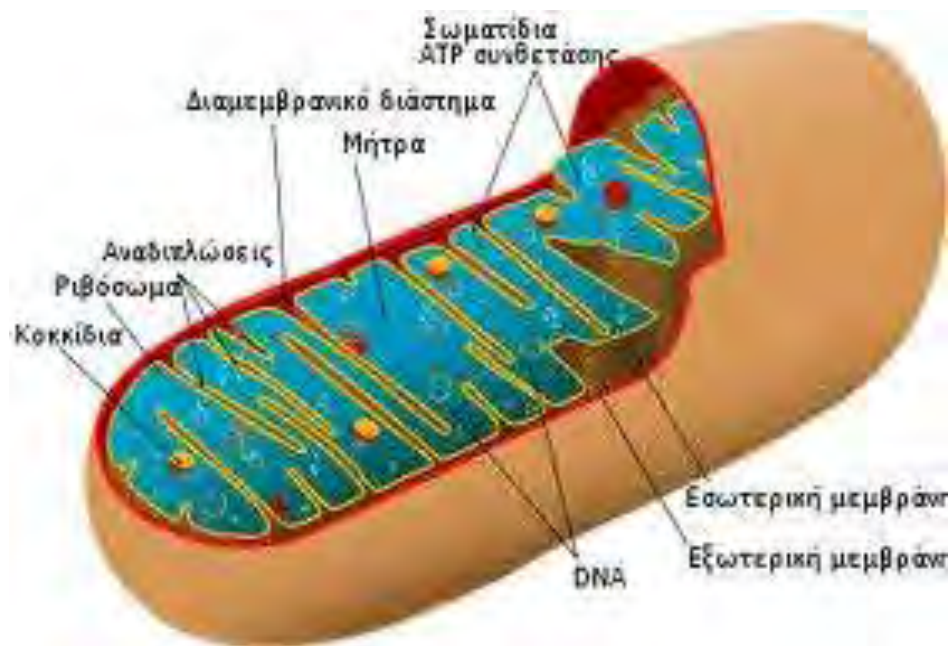
Τα μιτοχόνδρια, ανακαλύφθηκαν ως συστατικά του κυττάρου το 1886 από τον Richard Altmann. Εξαιτίας του μικρού τους μεγέθους, η διερεύνησή τους καθυστέρησε για αρκετά χρόνια. Το 1898 ο Carl Benda εισήγαγε τον όρο «μιτοχόνδριο», το 1904 ο Friedrich Meves περιέγραψε το μιτοχόνδριο στα φυτικά κύτταρα και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



Εικόνα 1: Μιτοχόνδριο

Τα μιτοχόνδρια αποτελούν συνήθως το 18-20% του συνολικού κυτταροπλασματικού όγκου του ευκαρυωτικού κυττάρου. Το σχήμα τους δεν είναι σταθερό (συνήθως είναι επίμηκες) και οι διαστάσεις τους είναι 0,3-1μm σε διάμετρο με 1-10μm σε μήκος (Εικόνα 1). Περιέχουν 66% νερό, 22% πρωτεΐνες, 11% λιπίδια και 1% νουκλεοτίδια και ιόντα. Αποτελούνται από μία εξωτερική μεμβράνη και μία εσωτερική που σχηματίζει πολυάριθμες πτυχωσεις, ο ρυθμός των οποίων αυξάνει καθώς αυξάνει ο ρυθμός οξειδωτικής φωσφορυλίωσης (Εικόνα 2). Η εξωτερική μεμβράνη περιέχει οξειδωτικά ένζυμα και είναι διαπερατή σε μικρά ιόντα και ο διαμεμβρανικός χώρος περιέχει αδενυλική κινάση και άλλα ένζυμα. Η εσωτερική μεμβράνη έχει ιδιαίτερη λιπιδιακή σύσταση, ενώ έχουν εντοπιστεί σε αυτήν αρκετά ένζυμα του κύκλου του Krebs, της αναπνευστικής αλυσίδας και σύνθεσης ATP, με τη συμμετοχή αντλιών F_1F_0 . Το εσωτερικό του μιτοχονδρίου

(χυμός ή μήτρα) είναι κοκκίωδες και περιέχει ένζυμα του κύκλου του Krebs, γλουταμινική αφυδρογονάση, ένζυμα οξειδωσης λιπαρών οξέων, DNA, RNA και ριβοσώματα (Μαργαρίτης et al. 2008).



Εικόνα 2: Δομή μιτοχονδρίου

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

1.2. ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗ ΦΩΣΦΟΡΥΛΙΩΣΗ



Εικόνα 3: Peter D. Mitchell

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

Τη δεκαετία του 1950 πολλοί ερευνητές πίστευαν ότι η οξειδωτική φωσφορυλίωση παράγει ATP περίπου όπως η γλυκόλυση. Κατά τη γλυκόλυση, η φωσφορυλίωση του ATP γίνεται άμεσα από ένα ενδιάμεσο μόριο υψηλής ενέργειας. Την ίδια εποχή ήταν διαδεδομένη η υπόθεση ότι η αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων παρήγαγε ένα ενδιάμεσο μόριο υψηλής ενέργειας, το οποίο θα πρόσδεσε κατευθείαν τη φωσφορική ομάδα στο ATP, όμως ένα τέτοιο ενδιάμεσο μόριο δεν ανακαλύφθηκε. Το 1961 ο Peter Mitchell πρότεινε για πρώτη φορά ότι αυτό το «ενδιάμεσο μόριο υψηλής ενέργειας» ήταν η ηλεκτροχημική βαθμίδωση πρωτονίων. Σύμφωνα με το μοντέλο του, που ονομάστηκε χημειοσμωτική υπόθεση, η ενέργεια για τη βαθμίδωση H^+ που παραγόταν κατά τη δίοδο των ηλεκτρονίων στην αλυσίδα, αξιοποιείται για να προωθήσει τη σύνθεση ATP. Αυτή η υπόθεση σημαίνει ότι η ηλεκτροχημική βαθμίδωση πρωτονίων είναι απαραίτητη για τη σύνθεση ATP και έτσι η δημιουργία μίας τεχνητής βαθμίδωσης θα έπρεπε να διεγείρει την παραγωγή ATP. Αλλά παράμενε το ερώτημα πώς η βαθμίδωση ηλεκτρονίων προωθεί τη σύνθεση του ATP. Το 1974 ο Efraim Racker και ο Walther Stoeckenius απέδειξαν ότι ο συνδυασμός της συνθάσης του ATP με μια βαθμίδωση πρωτονίων οδηγεί σε παραγωγή ATP. Οι δύο επιστήμονες διαπίστωσαν ότι μπορούσαν ν' ανασυνθέσουν ένα πλήρες τεχνητό σύστημα παραγωγής ενέργειας

συνδυάζοντας μια ΑΤΡάση από μιτοχόνδρια της καρδιάς του βοδιού με την κυτταρική μεμβράνη του *Halobacterium halobium*. Η κυτταρική μεμβράνη αυτού του βακτηρίου είναι γεμάτη βακτηριοδοψίνη, μια πρωτεΐνη που αντλεί πρωτόνια προς το εξωτερικό του κυττάρου μετά από έκθεση στο ηλιακό φως. Τοποθετώντας τη βακτηριοδοψίνη σε τεχνητά λιποκυστίδια, οι Racker και Stoeckenius έδειξαν ότι μετά από έκθεση στο φως η πρωτεΐνη αντλούσε πρωτόνια στο εσωτερικό των κυστίδιων. Στη συνέχεια, στα ίδια κυστίδια ενσωματώθηκε μια ΑΤΡάση μιτοχονδριακής προέλευσης. Μετά από έκθεση στο φως, το πειραματικό σύστημα κατέλυε τη σύνθεση ΑΤΡ. Η αφαίρεση της βακτηριοδοψίνης όπως και η προσθήκη παραγόντων αποσύζευξης καταργούσε τη σύνθεση ΑΤΡ. Έτσι, παρόλο που η υπόθεση του Mitchell συνάντησε αρχικά αντίσταση, οι πειραματικές ενδείξεις που την στήριζαν δεν μπορούσαν να αγνοηθούν. Το 1978, ο Mitchell έλαβε το βραβείο Νόμπελ Χημείας (Alberts et al. 2006).

1.3.ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗΣ ΦΩΣΦΟΡΥΛΙΩΣΗΣ

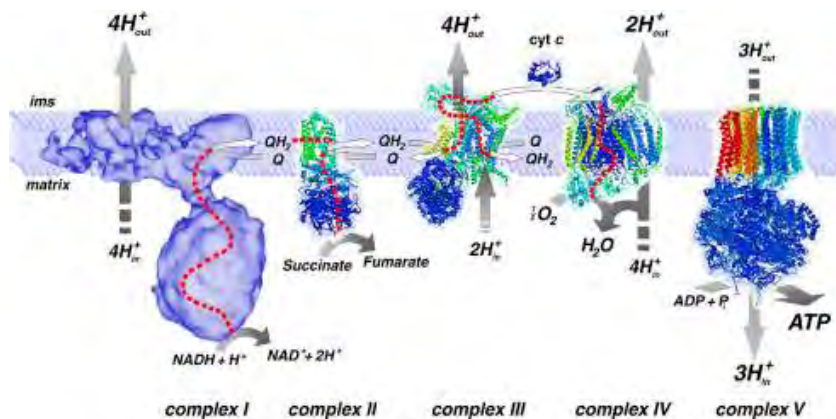
Η οξείδωση των λιπαρών οξέων και η μετατροπή του πυροσταφυλικού οξέος προωθούν του σχηματισμό ακετυλο-συνένζυμου Α (acetyl-CoA), το οποίο εισάγεται στον κύκλο του Krebs και σχηματίζονται τρία μόρια NADH, ένα μόριο FADH₂ και ένα μόριο GTP (Εικόνα 4).

Τα μόρια NADH και FADH₂ είναι ενεργοποιημένα μόρια-μεταφορείς που μεταφέρουν ηλεκτρόνια υψηλής ενέργειας και τα παραδίνουν στα συμπλέγματα του συστήματος μεταφοράς ηλεκτρονίων της εσωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης. Το NADH μεταφέρει τα ηλεκτρόνια στο πρώτο σύμπλεγμα του συστήματος μεταφοράς ηλεκτρονίων, τη NADH-αναγωγάση του συνενζύμου Q. Εκεί οξειδώνεται το NADH προς NAD⁺. Το FADH₂ είναι ένας λιγότερος δυνατός μεταφορέας ηλεκτρονίων και μεταφέρει ηλεκτρόνια στο δεύτερο σύμπλεγμα ηλεκτρονίων, την ηλεκτρο-αναγωγάση του συνενζύμου Q.

Όταν το NADH φτάσει στην αλυσίδα, ένα ιόν υδριδίου (H⁻) αφαιρείται από αυτό και μετατρέπεται σε ένα πρωτόνιο και δύο ηλεκτρόνια υψηλής ενέργειας. Η αντίδραση αυτή καταλύεται από το πρώτο σύμπλοκο, την NADH-αναγωγάση του συνενζύμου Q, η οποία παραλαμβάνει τα ηλεκτρόνια. Στη συνέχεια, τα ηλεκτρόνια μεταφέρονται κατά μήκος της αλυσίδας. Αυτή η μεταφορά είναι ενεργειακά συμφέρουσα, αφού τα αρχικά υψηλής ενέργειας ηλεκτρόνια χάνουν ενέργεια καθώς μετακινούνται κατά μήκος της αλυσίδας (το ζεύγος NADH/NAD έχει μέσο δυναμικό οξειδοαναγωγής -320mV ενώ το ζεύγος H₂O/O₂+810mV). Η αφυδρογονάση μεταφέρει τα ηλεκτρόνια από το NADH στην ουβικινόνη. Για αυτή τη διαδικασία χρειάζονται δύο ηλεκτρόνια και δύο πρωτόνια. Το ένα πρωτόνιο προέρχεται από το NADH και το άλλο από το περιβάλλον νερό. Τα δύο ηλεκτρόνια μεταφέρονται στην ουβικινόνη, ενώ τα δύο πρωτόνια απελευθερώνονται στο διαμεμβρανικό χώρο. Η ουβικινόνη, με τη σειρά της, προωθεί τα ηλεκτρόνια προς το επόμενο σύμπλοκο, το σύμπλοκο κυτοχρωμάτων c-b1. Αυτό το σύμπλοκο έχει ενεργότητα οξειδοαναγωγής του ζεύγους ουβικινόνη – κυτοχρώματος C. Με την οξείδωση της ουβικινόνης, τα δύο πρωτόνια και τα δύο ηλεκτρόνια που χρειάστηκε για να αναχθεί απελευθερώνονται και τα πρωτόνια απελευθερώνονται στο διαμεμβρανικό χώρο. Τα δύο ηλεκτρόνια από το κυτόχρωμα C μεταβιβάζονται στο

Σχόλιο [u1]: Ελεγγε ότι ΟΛΟΙ οι οροι που χρησιμοποιείεις είναι ομοιομορφοι σε ολο το κειμενο και είναι κατά Stryer

τελευταίο σύμπλοκο, το σύμπλοκο της οξειδάσης του κυτοχρώματος, όπου το οξυγόνο αλληλεπιδρά με τα ηλεκτρόνια και παράγεται νερό. Τα πρωτόνια περνώντας μέσα από την ATPσυνθάση προκαλούν σχηματισμό ATP, το οποίο βγαίνει στο κυτταρόπλασμα για να χρησιμοποιηθεί ως πηγή ενέργειας (Alberts et al. 2006).



Εικόνα 4. Οξειδωτική φωσφορυλίωση

1.4. Η ΑΡΧΙΤΕΚΤΟΝΙΚΗ ΤΗΣ ΑΝΑΠΝΕΥΣΤΙΚΗΣ ΑΛΥΣΙΔΑΣ

Σύμπλοκο I: Οξειδοαναγωγή του ζεύγους NADH-Q

Τα ηλεκτρόνια του NADH εισέρχονται στην αλυσίδα μέσω της οξειδοαναγωγής του ζεύγους NADH-Q (ονομάζεται και αφυδρογονάση του NADH), η οποία είναι ένα πελώριο ένζυμο (850)kd που αποτελείται από τουλάχιστον 34 πολυπεπτιδικές αλυσίδες. Η κατασκευή αυτής της αντλίας πρωτονίων, όπως άλλωστε και των άλλων δυο της αναπνευστικής αλυσίδας, απαιτεί τη συνεργασία γονιδίων που βρίσκονται τόσο στον πυρήνα όσο και στα μιτοχόνδρια. Η οξειδοαναγωγή του ζεύγους NADH-Q έχει σχήμα L, με τον οριζόντιο βραχίονά της να βρίσκεται στο επίπεδο της μεμβράνης, ενώ ο κατακόρυφος προβάλλει προς την μήτρα (Εικόνα 4).

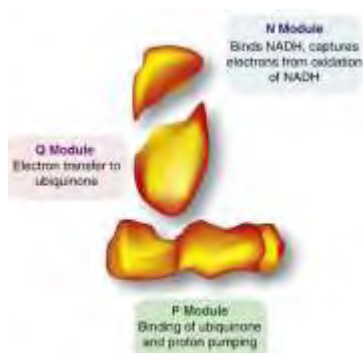
Το αρχικό βήμα είναι η πρόσδεση του NADH και η μεταφορά των δυο ηλεκτρονίων υψηλού δυναμικού στην προσθετική ομάδα του φλαβινομονονουκλεοτιδίου (FMN), για να προκύψει η ανηγμένη μορφή FMNH₂. Τα ηλεκτρόνια μεταφέρονται τότε από το FMNH₂ στη δεύτερη προσθετική ομάδα της οξειδοαναγωγής του ζεύγους NADH-Q, μέσα από μια σειρά από σύμπλοκα σιδήρου-θείου. Η ροή δύο ηλεκτρονίων από το NADH στο συνένζυμο Q μέσω της οξειδοαναγωγής του ζεύγους NADH-Q, προωθεί την άντληση τεσσάρων

πρωτονίων από τη μήτρα του μιτοχονδρίου στο διαμεμβρανικό χώρο. Το NADH προσδέεται σε μια θέση στον κατακόρυφο βραχίονα, μεταφέροντας τα ηλεκτρόνια του στο FMN. Τα ηλεκτρόνια αυτά ρέουν μέσα στον κατακόρυφο βραχίονα σε τρία κέντρα 4Fe-4S και μετά σε ένα προσδεμένο Q. Η αναγωγή του Q σε QH₂ οδηγεί στην άντληση δύο πρωτονίων από τη μήτρα. Το ζεύγος ηλεκτρονίων στην προσδεμένη QH₂ μεταφέρεται σε ένα κέντρο 4Fe-4S και τα πρωτόνια μεταφέρονται προς τον διαμεμβρανικό χώρο. Τελικά αυτά τα ηλεκτρόνια μεταφέρονται σε ένα κινητό μόριο Q στον υδρόφοβο πυρήνα της εσωτερικής μεμβράνης, με αποτέλεσμα την πρόσληψη δύο επιπλέον ηλεκτρονίων από τη μήτρα. Λειτουργικά, διακρίνονται τρία modules:

- το N module αποτελεί το module εισαγωγής, το οποίο μεταφέρει ηλεκτρόνια από το NADH μέσω του FMN σε μία αλυσίδα συμπλόκων σιδήρου-θείου,
- το Q module δέχεται τα ηλεκτρόνια από τα συμπλοκα σιδήρου-θείου του N module και τα μεταφέρει μέσω τριών ακόμα συμπλόκων σιδήρου-θείου στην ουβικινόνη και μαζί με το N module αποτελούν τον περιφερειακό βραχίονα του συμπλόκου I,
- το P module είναι το τμήμα στο οποίο συμβαίνει η άντληση πρωτονίων.

Περιέχοντας 46 διαφορετικές υπομονάδες, το σύμπλοκο I στα θηλαστικά, αποτελεί το πιο πλούσιο, σε επίπεδο υπομονάδων, σύμπλοκο που έχει παρατηρηθεί.

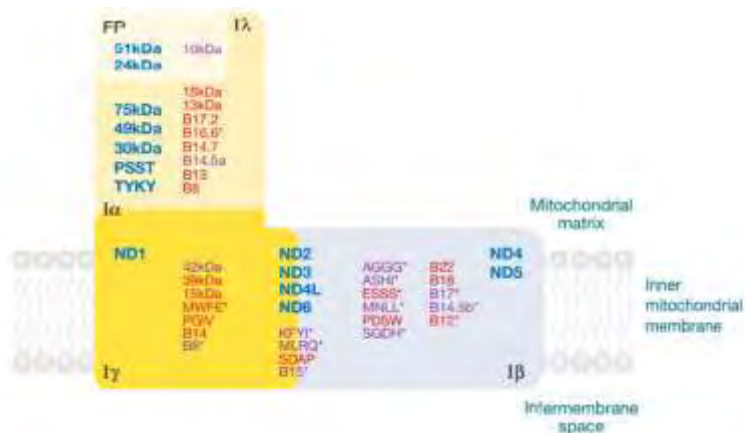
Η ανάλυση αλληλούχισης των 14 κεντρικών υπομονάδων του συμπλόκου I ευκαρυωτικών και προκαρυωτικών κυττάρων (Πίνακας 1), αποκάλυψε ότι αυτές οι πρωτεΐνες μπορούν να χωριστούν σε δύο διαφορετικές κατηγορίες. Επτά υπομονάδες είναι ιδιαίτερα υδρόφοβες και προβλέπεται ότι περιέχουν 52 έως 59 διαμεμβρανικές έλικες. Αντίθετα ούτε ένα διαμεμβρανικό τμήμα δεν προβλέφθηκε για τις άλλες επτά, αλλά περιέχουν όλα τα μοτίβα πρόσδεσης για τις προσθετικές ομάδες της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης και του NADH. Έτσι, οι υδρόφιλες υπομονάδες σχηματίζουν το περιφερειακό τμήμα του συμπλόκου, το οποίο στέκεται κάθετα σε σχέση με το υδρόφοβο συνδεδεμένο με τη μεμβράνη τμήμα. Αυτό οδηγεί σε ένα L σχήμα, το οποίο παρατηρείται τόσο στους ευκαρυωτικούς, όσο και στους προκαρυωτικούς οργανισμούς (Brand, 2006).



Εικόνα 5. Modular design of complex I (Lazarou et al. 2009)

Πίνακας 1. Κεντρικές υπομονάδες του συμπλόκου I

Όνομα υπομονάδων				Θέση γονιδίου
Bos Taurus	SwissProt	Homo Sapiens	Procaryotes	
75 kDa	NUAM	NDUFS1	NUOG/NQO3	nDNA
51 kDa	NUBM	NDUFV1	NUOF/NQO1	
49 kDa	NUSM	NDUFS2	NUOD/NQO4	
30 kDa	NUGM	NDUFS3	NUOC/NQO5	
24 kDa	NUHM	NDUFV2	NUOE/NQO2	
TYKY	NUIM	NDUFS8	NUOI/NQO9	
PSST	NUKM	NDUFS7	NUOB/NQO6	
ND1	NU1M	ND1	NUOH/NQO8	
ND2	NU2M	ND2	NUON/NQO14	
ND3	NU3M	ND3	NUOA/NQO7	
ND4	NU4M	ND4	NUOM/NQO13	
ND4L	NULM	ND4L	NUOK/NQO11	
ND5	NU5M	ND5	NUOL/NQO12	
ND6	NU6M	ND6	NUOJ/NQO10	



Εικόνα 6. Διαγραμματική απεικόνιση του συμπλόκου I και ενδεικτική τοποθέτηση των κυρίων και βοηθητικών υπομονάδων του

Όσον αφορά στις 31 βοηθητικές υπομονάδες (Πίνακας 2), που προέκυψαν από ανάλυση σε καρδιά βοοειδούς, εικάζεται ότι αρκετές από αυτές σχετίζονται με τη βιογένεση του ευκαρυωτικού συμπλόκου I, μια διαδικασία η οποία περιπλέκεται λόγω της διπλής γενετικής προέλευσης των συστατικών που συμμετέχουν.

Πίνακας 2. Βοηθητικές υπομονάδες του συμπλόκου I

Bos Taurus	SwissProt	Homo Sapiens	Θέση γονιδίου	Remarks
39kDa	NUEM	NDUFA9	nDNA	Short-chain dehydrogenase, NADPH
15kDa	NIPM	NDUFS5	nDNA	Cysteine-rich motif
13kDa	NUMM	NDUFS6	nDNA	
AQDQ	NUYM	NDUFS4	nDNA	Phosphorylation
ESSS	NESM	NDUFB11	nDNA	STMD, phosphorylation
MWFE	NIMM	NDUFA1	nDNA	STMD, phosphorylation
PDSW	NIDM	NDUFB10	nDNA	Cysteine-rich motif
PGIV	NUPM	NDUFA8	nDNA	Cysteine-rich motif
SDAP	ACPM	NDUFAB1	nDNA	Acyl-carrier protein, phosphopantetheine
B22	NI2M	NDUFB9	nDNA	
B18	NB8M	NDUFB7	nDNA	Cysteine-rich motif
B17.2	N7BM	DAP13	nDNA	Nitration
B16.6	NB6M	GRIM19	nDNA	STMD, proapoptotic factor
B14.7	NUJM	NDUFA11	nDNA	TIM17/22 family
B14	NB4M	NDUFA6	nDNA	Nitration
B13	NUFM	NDUFA5	nDNA	
B12	NB2M	NDUFB3	nDNA	STMD
B8	NI8M	NDUFA2	nDNA	Thioredoxin fold

Metazoa specific subunits				
42kDa	NUDM	NDUFA10	nDNA	Phosphorylation
10kDa	NUOM	NDUFV3	nDNA	
AGGG	NIGM	NDUFB2	nDNA	STMD
ASHI	NIAM	NDUFB8	nDNA	STMD
KFYI	NIKM	NDUFC1	nDNA	STMD
MLRQ	NUML	NDUFA4	nDNA	STMD
MNLL	NINM	NDUFB1	nDNA	STMD
SGDH	NISM	NDUFB5	nDNA	STMD
B17	NB7M	NDUFB6	nDNA	STMD
B15	NB5M	NDUFB4	nDNA	STMD, nitration
B14.5a	N4AM	NDUFA7	nDNA	
B14.5b	N4BM	NDUFC2	nDNA	STMD
B9	NI9M	NDUFA3	nDNA	STMD

Σύμπλοκο II: Ηλεκτρική αφυδρογονάση

Η ηλεκτρική αφυδρογονάση (σύμπλοκο II) είναι συστατικό της εσωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης και αποτελείται από ομοιοπολικά συνδεδεμένο FAD και κέντρα Fe-S. Αποτελείται από τέσσερα πολυπεπτίδια και δέχεται ηλεκτρόνια από τον κύκλο του κιτρικού οξέος. Αυτά τα ηλεκτρόνια μεταφέρονται σε FADH₂ αντί για NADH και στη συνέχεια στο συνένζυμο Q, ώστε να συνεχιστεί η μεταφορά τους προς τα σύμπλοκα III και IV. Σε αντίθεση με τη μεταφορά ηλεκτρονίων από το NADH στο συνένζυμο Q από το σύμπλοκο I, η μεταφορά από το FADH₂ στο συνένζυμο Q δεν ακολουθείται από άντληση πρωτονίων, κατά συνέπεια αποδίδεται λιγότερο ATP από την οξείδωση του FADH₂ απ' ό,τι του NADH. Τέλος, πρέπει να σημειωθεί ότι το σύμπλοκο II, το οποίο αποτελεί και τμήμα του κύκλου του Krebs, είναι το μόνο σύμπλοκο της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης που αποτελείται αποκλειστικά από πυρηνικά κωδικοποιούμενα πολυπεπτίδια (Cooper, 2000).

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 (σύμπλοκο III, κυτοχρωμική αναγωγή). Τα κυτοχρώματα είναι πρωτεΐνες μεταφοράς ηλεκτρονίων, οι οποίες περιέχουν μια προσθετική ομάδα αίμης. Η λειτουργία της οξειδοαναγωγής του ζεύγους Q-κυτοχρώματος είναι η κατάλυση της μεταφοράς ηλεκτρονίων από την QH₂ προς το οξειδωμένο κυτόχρωμα c και η ταυτόχρονη άντληση πρωτονίων από τη μιτοχονδριακή μήτρα προς το διαμεμβρανικό χώρο.

Η οξειδοαναγωγή του ζεύγους Q-κυτοχρώματος c είναι διμερές και το κάθε μονομερές περιέχει 11 υπομονάδες. Περιέχει συνολικά τρία μόρια αίμης, τα οποία βρίσκονται σε δυο υπομονάδες κυτοχρωμάτων: δύο αίμες τύπου b, που ονομάζονται αίμη b_L και αίμη b_H, μέσα στο κυτόχρωμα b και μία αίμη τύπου c στο

κυτόχρωμα c1. Η προσθετική ομάδα των κυτοχρωμάτων b, c1, c είναι μια σιδηροπορφρίνη IX, η ίδια αίμη όπως της μυοσφαιρίνης και της αιμοσφαιρίνης. Επιπλέον των μορίων της αίμης, το ένζυμο περιέχει μια πρωτεΐνη σιδήρου – θείου με ένα κέντρο 2Fe- 2S. Αυτό το κέντρο που ονομάζεται κέντρο Rieske, είναι σπάνιο διότι το ένα ιόν σιδήρου σχηματίζει σύμπλοκο συναρμογής με δυο κατάλοιπα ιστιδίνης, αντί με δυο κατάλοιπα κυστεΐνης. Αυτή η συναρμογή σταθεροποιεί την ανηγμένη μορφή του, αυξάνοντας το αναγωγικό δυναμικό του. Τέλος, η οξειδοαναγωγή του ζεύγους Q-κυτοχρώματος c περιέχει δυο διακριτές θέσεις για πρόσδεση ουβικινόνης που ονομάζοντας Q0 και Qi, με τη θέση Qi να βρίσκεται πιο κοντά στη μήτρα.(Berg et al. 2001)

Πίνακας 3. Πυρηνικά και μιτοχονδριακά κωδικοποιούμενες υπομονάδες του συμπλόκου III

Name	Description	Biological role	Location
UQCRFS1	Cytochrome b-c1 complex subunit Rieske, mitochondrial	Enzyme	nDNA
UQCRFS1	Cytochrome b-c1 complex subunit 11	Unspecified role	nDNA
UQCRC2	Cytochrome b-c1 complex subunit 2, mitochondrial	Unspecified role	nDNA
CYC1	Cytochrome c1, heme protein, mitochondrial	Unspecified role	nDNA
MT-CYB	Cytochrome b	Unspecified role	mtDNA
UQCRB	Cytochrome b-c1 complex subunit 7	Unspecified role	nDNA
UQCRH	Cytochrome b-c1 complex subunit 6, mitochondrial	Unspecified role	nDNA
UQCR11	Cytochrome b-c1 complex subunit 10	Unspecified role	nDNA
UQCRQ	Cytochrome b-c1 complex subunit 8	Unspecified role	nDNA
UQCRC1	Cytochrome b-c1 complex subunit 1, mitochondrial	Unspecified role	nDNA
UQCR10	Cytochrome b-c1 complex subunit 9	Unspecified role	nDNA

(mitochondrial electron transport complex III,EMBLE-EBI)

Σύμπλοκο IV: Οξειδάση του κυτοχρώματος c

Το τελικό στάδιο στην αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων είναι η οξείδωση του ανηγμένου κυτοχρώματος c που έχει παραχθεί από το σύμπλοκο III, η οποία είναι συζευγμένη με την αναγωγή του O₂ σε δυο μόρια H₂O. Η αντίδραση αυτή καταλύεται από την οξειδάση του κυτοχρώματος c (σύμπλοκο VI). Το ένζυμο αποτελείται από 19 υπομονάδες, από τις οποίες οι τρεις κωδικοποιούνται από το

μιτοχονδριακό γονιδίωμα. Η οξειδάση του κυτοχρώματος c περιέχει δυο ομάδες αίμης A, τις α και α3, και τρία ιόντα χαλκού, σε διάταξη δύο κέντρων που ονομάζονται CuA και CuB.

Ο καταλυτικός κύκλος αρχίζει με όλες τις προσθετικές ομάδες στην οξειδωμένη μορφή τους. Ένα ανηγμένο μόριο κυτοχρώματος c προσφέρει ένα ηλεκτρόνιο, το οποίο ανάγει το CuB. Ένα δεύτερο μόριο ανηγμένου κυτοχρώματος c ανάγει το σίδηρο στην αίμη α3. Αυτό το κέντρο δεσμεύει τότε το οξυγόνο. Δύο επιπλέον ηλεκτρόνια μεταφέρονται στο κέντρο αυτό για το σχηματισμό υπεροξειδίου, το οποίο λειτουργεί ως γέφυρα μεταξύ του ιόντος σιδήρου και του CuB. Η προσφορά ενός ακόμα ηλεκτρονίου από τρίτο μόριο ανηγμένου κυτοχρώματος, διασπά το δεσμό O-O και προκαλεί την πρόσληψη ενός πρωτονίου από τη μήτρα. Η είσοδος ενός τελευταίου ηλεκτρονίου και τριών επιπλέον πρωτονίων οδηγεί στην παραγωγή δυο μορίων ύδατος, τα οποία απελευθερώνονται στη συνέχεια από το ένζυμο για να προκύψει η αρχική του κατάσταση. Τέλος, τα τέσσερα πρωτόνια που βρίσκονται στα μόρια ύδατος έχουν προκύψει αποκλειστικά από τη μήτρα, με αποτέλεσμα η άντλησή τους να συνεισφέρει άμεσα στη βαθμίδωση συγκέντρωσης πρωτονίων μεταξύ των δύο πλευρών της εσωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης.

Είναι αξιοσημείωτο, ότι η οξειδάση του κυτοχρώματος c έχει εξελιχτεί ώστε να αντλεί τέσσερα επιπλέον πρωτόνια από τη μήτρα στο διαμεμβρανικό χώρο κατά τη διάρκεια κάθε κύκλου της παραπάνω αντίδρασης. Άρα, αντλούνται συνολικά οκτώ πρωτόνια από τη μήτρα σε κάθε κύκλο. Οι λεπτομέρειες σχετικά με το μηχανισμό άντλησης πρωτονίων δια μέσου της πρωτεΐνης είναι ακόμη υπό μελέτη (Berg et al. 2001).

Πίνακας 4. Πυρηνικά και μιτοχονδριακά κωδικοποιούμενες υπομονάδες του συμπλόκου IV

Σύμβολο	Όνομα	Θέση
COX4I1	cytochrome c oxidase subunit IV isoform 1	nDNA
COX4I2	cytochrome c oxidase subunit IV isoform 2 (lung)	nDNA
COX5A	cytochrome c oxidase subunit Va	nDNA
COX5B	cytochrome c oxidase subunit Vb	nDNA
COX6A1	cytochrome c oxidase subunit VIa polypeptide 1	nDNA
COX6A2	cytochrome c oxidase subunit VIa polypeptide 2	nDNA
COX6B1	cytochrome c oxidase subunit VIb polypeptide 1 (ubiquitous)	nDNA
COX6B2	cytochrome c oxidase subunit VIb polypeptide 2 (testis)	nDNA
COX6C	cytochrome c oxidase subunit Vic	nDNA
COX7A1	cytochrome c oxidase subunit VIIa polypeptide 1 (muscle)	nDNA
COX7A2	cytochrome c oxidase subunit VIIa polypeptide 2 (liver)	nDNA
COX7B	cytochrome c oxidase subunit VIIb	nDNA
COX7B2	cytochrome c oxidase subunit VIIb2	nDNA
COX7C	cytochrome c oxidase subunit VIIc	nDNA

COX8A	cytochrome c oxidase subunit VIIIA (ubiquitous)	nDNA
COX8C	cytochrome c oxidase subunit VIIC	nDNA
MT-CO1	mitochondrially encoded cytochrome c oxidase I	mtDNA
MT-CO2	mitochondrially encoded cytochrome c oxidase II	mtDNA
MT-CO3	mitochondrially encoded cytochrome c oxidase III	mtDNA

Σύμπλοκο V: ATPσυνθάση

Επειδή η φωσφολιπιδιακή διπλοστοιβάδα είναι αδιαπέραστη σε ιόντα, τα πρωτόνια μπορούν να διασχίζουν τη μεμβράνη μόνο μέσω ενός πρωτεϊνικού καναλιού. Ο περιορισμός αυτός επιτρέπει τη χρησιμοποίηση της ενέργειας, που προκύπτει από την ηλεκτροχημική βαθμίδωση, για την παραγωγή ATP ως αποτέλεσμα της δράσης του πέμπτου συμπλόκου της οξειδωτικής φωσφορύλιωσης, σύμπλοκο V, ή ATP συνθάση. Η συνθάση του ATP είναι οργανωμένη σε δύο δομικά διαφορετικά συστατικά, F₀ και F₁, τα οποία συνδέονται με ένα λεπτό μίσχο. Το τμήμα F₀ εκτείνεται στην εσωτερική μεμβράνη και δημιουργεί ένα κανάλι μέσω του οποίου τα πρωτόνια είναι σε θέση να μεταφέρονται πίσω από το διαμεμβρανικό χώρο στη μήτρα. Η ενεργειακά ευνοούμενη μεταφορά πρωτονίων στη μήτρα, οδηγεί στη σύνθεση ATP από την υπομονάδα F₁, η οποία καταλύει τη σύνθεση ATP από ADP και ιόντα φωσφόρου (P_i). Πιο συγκεκριμένα, η ροή πρωτονίων διαμέσου της υπομονάδας F₀ οδηγεί την περιστροφή της υπομονάδας F₁, η οποία λειτουργεί ως ένας περιστροφικός κινητήρας και οδηγεί στη σύνθεση ATP (Cooper, 2000).

Η ATPσυνθάση είναι ένα μεγάλο ενζυμικό σύμπλοκο, βυθισμένο στη μιτοχονδριακή μεμβράνη, που μοιάζει με σφαίρα επάνω σε ράβδο. Η σφαίρα, η οποία ονομάζεται υπομονάδα F₁, προβάλλει στη μήτρα των μιτοχονδρίων και παρουσιάζει την καταλυτική δραστηριότητα της συνθάσης. Η υπομονάδα F₁ περιέχει πέντε τύπους πολυπεπτιδικών αλυσίδων με στοιχειομετρία (α₃β₃γδε). Οι υπομονάδες α και β, που αποτελούν το μεγαλύτερο μέρος της F₁, είναι χωροθετημένες εναλλάξ ως ένας εξαμερής δακτύλιος. Οι αλυσίδες είναι μεταξύ τους ομόλογες και ανήκουν στην οικογένεια NTPάσης με θηλιά P. Προσδένουν και οι δυο νουκλεοτίδια, αλλά μόνο οι υπομονάδες β συμμετέχουν άμεσα στην κατάλυση. Ο κεντρικός μίσχος αποτελείται από δυο πρωτεΐνες, τις γ και ε. Η υπομονάδα γ περιέχει ένα μακρύ α-ελικωμένο σπείραμα, το οποίο προεκτείνεται μέσα στο κέντρο του εξαμερούς α₃β₃. Η υπομονάδα γ αναιρεί την συμμετρία του εξαμερούς α₃β₃, διότι κάθε μια από τις υπομονάδες β είναι διακριτή λόγω της αλληλεπίδρασης της με διαφορετική όψη της γ. Η διάκριση μεταξύ των τριών υπομονάδων β είναι κρίσιμη για το μηχανισμό σύνθεσης της ATP. Η υπομονάδα F₀ είναι ένα υδρόφοβο τμήμα που διασχίζει την εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη. Η F₀ είναι ο δίαυλος πρωτονίων αυτού του συμπλόκου. Ο δίαυλος αυτός αποτελείται από ένα δακτύλιο, ο οποίος έχει από 10 έως 14 υπομονάδες c που είναι βυθισμένες στη μεμβράνη. Μία μοναδική υπομονάδα a προσδέεται στο εξωτερικό αυτού του δακτυλίου. Ο δίαυλος πρωτονίων εξαρτάται από την υπομονάδα a και το δακτύλιο c. Οι υπομονάδες F₁ και F₀ συνδέονται με δυο τρόπους με τον κεντρικό μίσχο γε και με μια εξωτερική στήλη. Η τελευταία αποτελείται από μια υπομονάδα

Σχόλιο [u2]: Συνθάση ή συνθεάση??

a, δυο υπομονάδες b και μία υπομονάδα δ. Μπορούμε να θεωρήσουμε ότι το ενζυμο έχει δύο λειτουργικές συνιστώσες: (1) μια κινούμενη μονάδα (rotor), που αποτελείται από το δακτύλιο c και το μίσχο γε, και (2) μια στατική μονάδα (stator), που αποτελείται από το υπόλοιπο μόριο (Berg et al. 2001).

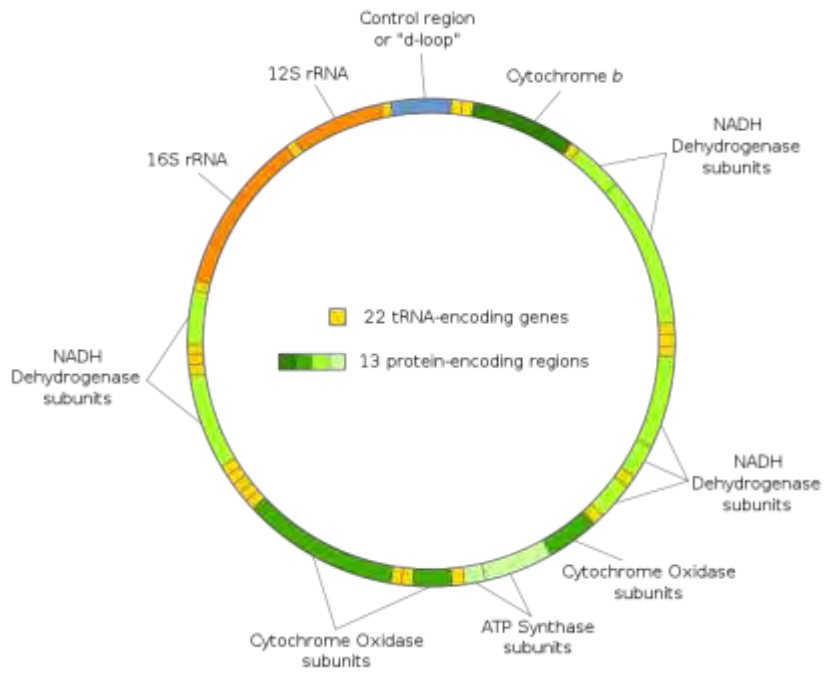
Πίνακας 5. Πυρηνικά και μιτοχονδριακά κωδικοποιούμενες υπομονάδες του συμπλόκου V

Σύμβολο	Όνομα	Θέση
ATP5A1	ATP synthase, H ⁺ transporting, mitochondrial F1 complex, alpha subunit 1, cardiac muscle	nDNA
ATP5B	ATP synthase, H ⁺ transporting, mitochondrial F1 complex, beta polypeptide	nDNA
ATP5C1	ATP synthase, H ⁺ transporting, mitochondrial F1 complex, gamma polypeptide 1	nDNA
ATP5D	ATP synthase, H ⁺ transporting, mitochondrial F1 complex, delta subunit	nDNA
ATP5E	ATP synthase, H ⁺ transporting, mitochondrial F1 complex, epsilon subunit	nDNA
ATP5F1	ATP synthase, H ⁺ transporting, mitochondrial Fo complex, subunit B1	nDNA
ATP5G1	ATP synthase, H ⁺ transporting, mitochondrial Fo complex, subunit C1 (subunit 9)	nDNA
ATP5G2	ATP synthase, H ⁺ transporting, mitochondrial Fo complex, subunit C2 (subunit 9)	nDNA
ATP5G3	ATP synthase, H ⁺ transporting, mitochondrial Fo complex, subunit C3 (subunit 9)	nDNA
ATP5H	ATP synthase, H ⁺ transporting, mitochondrial Fo complex, subunit d	nDNA
ATP5I	ATP synthase, H ⁺ transporting, mitochondrial Fo complex, subunit E	nDNA
ATP5J	ATP synthase, H ⁺ transporting, mitochondrial Fo complex, subunit F6	nDNA
ATP5J2	ATP synthase, H ⁺ transporting, mitochondrial Fo complex, subunit F2	nDNA
ATP5L	ATP synthase, H ⁺ transporting, mitochondrial Fo complex, subunit G	nDNA
ATP5L2	ATP synthase, H ⁺ transporting, mitochondrial Fo complex, subunit G2	nDNA
ATP5O	ATP synthase, H ⁺ transporting, mitochondrial F1 complex, O subunit	nDNA
ATPIF1	ATPaseinhibitoryfactor 1	nDNA
MTATP6	mitochondriallyencoded ATP synthase 6	mtDNA

MT-ATP8	mitochondrially encoded ATP synthase 8	mtDNA
---------	--	-------

1.5. ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΟ DNA (mtDNA)

Τα μιτοχόνδρια έχουν το δικό τους μικρό κυκλικό γονιδίωμα, το οποίο ποικίλει σε μέγεθος από 6.000 ζεύγη βάσεων (μιτοχόνδρια του πρωτόζωου *Plasmodium falciparum*) μέχρι 300.000 ζεύγη βάσεων για τα μιτοχόνδρια μερικών φυτικών κυττάρων.



Εικόνα 7: Μιτοχονδριακό DNA (mtDNA)

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

Για τα ανώτερα ζώα και τον άνθρωπο το mtDNA κληρονομείται, εκτός εξαιρέσεων, μόνο από τη μητέρα, αφού από τα δύο γαμετικά κύτταρα, μόνο τα μιτοχόνδρια του ωαρίου χρησιμοποιούνται κατά την εμβρυογένεση (Alberts et al. 2006).

Το γονιδίωμα του μιτοχονδρίου (Εικόνα 5) περιλαμβάνει γονίδια που κωδικοποιούν δύο γονίδια rRNA και 22 γονίδια tRNA ως μέρος του

μιτοχονδριακού συστήματος μετάφρασης. Όμως η σύνθεση αυτή δεν επαρκεί για τις λειτουργικές και δομικές ανάγκες των οργανιδίων και κατά συνέπεια τα μιτοχόνδρια δεν έχουν πλήρη αυτονομία. Τα μιτοχόνδρια όντας ημιαυτόνομα, προκειμένου να συνθέσουν όλα τα απαραίτητα συστατικά (ένζυμα, ρυθμιστικές και ριβοσωμικές πρωτεΐνες κλπ.), χρειάζονται πληροφορίες που περιέχονται στο nDNA. Επιπλέον, το μιτοχονδριακό γονιδίωμα κωδικοποιεί 13 πολυπεπτίδια-υπομονάδες του συστήματος παραγωγής ενέργειας: επτά υπομονάδες NADH αφυδρογονάσης, τρεις υπομονάδες κυτοχρωμικής οξειδάσης, μια υπομονάδα ATP-συνθάσης, μία υπομονάδα κυτοχρώματος b, τα οποία συνεργάζονται με 1500 γονίδια που κωδικοποιούνται από το πυρηνικό γονιδίωμα (nDNA).

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

1.6. ΡΥΘΜΟΣ ΕΞΕΛΙΞΗΣ ΤΟΥ mtDNA

Τα γονιδιώματα των οργανιδίων αντιγράφονται και κληρονομούνται με διαφορετικό τρόπο απ' ότι τα γονίδια του πυρήνα και ως εκ τούτου η δυναμική των αντικαταστάσεων τους είναι πολύ διαφορετική. Το μικρό μέγεθος του mtDNA και ο εξαιρετικά υψηλός ρυθμός αντικαταστάσεων των βάσεων του έχουν εγείρει μεγάλο ενδιαφέρον σχετικά με την εξέλιξη του. Ο μέσος ρυθμός συνώνυμων αντικαταστάσεων στα μιτοχονδριακά γονίδια των θηλαστικών είναι περίπου $5,7 \times 10^{-8}$ ανά θέση ανά έτος, είναι δηλαδή περίπου δεκαπλάσιος από το μέσο ρυθμό συνώνυμων μεταλλάξεων των γονιδίων του πυρήνα. Ο ρυθμός μη συνώνυμων αντικαταστάσεων ποικίλλει σημαντικά μεταξύ των γονιδίων του μιτοχονδρίου αλλά σε κάθε περίπτωση είναι σημαντικά υψηλότερος από το μέσο ρυθμό συνώνυμων αντικαταστάσεων που παρατηρείται στα πυρηνικά γονίδια. Αυτό είναι πιθανό να σχετίζεται με την χαμηλότερη αξιοπιστία του μηχανισμού αντιγραφής DNA και επομένως με υψηλότερο ρυθμό εισαγωγής σφαλμάτων κατά την αντιγραφή και την επιδιόρθωση του mtDNA. Σε αντίθεση με τις πολυμεράσες DNA του πυρήνα, οι DNA πολυμεράσες του μιτοχονδρίου δεν έχουν ικανότητα διορθωτικού ελέγχου. Οι υψηλότερες συγκεντρώσεις μεταλλαξιόνων, όπως οι ελεύθερες ρίζες οξυγόνου, οι οποίες προκύπτουν από μεταβολικές διεργασίες που διεξάγονται στα μιτοχόνδρια, μπορεί επίσης να παίζουν κάποιο ρόλο στους υψηλότερους ρυθμούς αντικαταστάσεων. Επιπλέον, η πίεση της φυσικής επιλογής που φυσιολογικά εξαλείφει πολλές μεταλλαγές στα γονίδια του πυρήνα μπορεί να είναι λιγότερο έντονη στα μιτοχόνδρια, επειδή τα περισσότερα κύτταρα περιέχουν πολλές δεκάδες μιτοχόνδρια, καθένα από τα οποία περιέχει μέχρι και δώδεκα αντίγραφα του μιτοχονδριακού γονιδιώματος. Τέλος, οι μεταλλαγές στις πρωτεΐνες, στα tRNA και στα rRNA που κωδικοποιούνται από το μιτοχονδριακό γονιδίωμα φαίνεται να μην

επηρεάζουν τόσο αρνητικά την προσαρμοστικότητα του ατόμου όσο οι αντίστοιχες μεταλλαγές στα προϊόντα των πυρηνικών γονιδίων.

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

1.7. ΡΟΛΟΣ ΠΥΡΗΝΙΚΟΥ DNA ΣΤΗΝ ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗ ΦΩΣΦΟΡΥΛΙΩΣΗ

Η πλειοψηφία των υπομονάδων των πρωτεϊνικών συμπλόκων που συμμετέχουν στην οξειδωτική φωσφορυλίωση, κωδικοποιούνται από πυρηνικό DNA. Επιπλέον, στον πυρήνα κωδικοποιούνται μια πληθώρα μορίων που παίζουν ρόλο στην συναρμολόγηση και διατήρηση των συμπλοκών της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης και στην αντιγραφή, μετάφραση, μεταγραφή και επιδιόρθωση του μιτοχονδριακού DNA.

1.8. ΣΥΝΠΡΟΣΑΡΜΟΓΗ- ΣΥΝΕΞΕΛΙΞΗ

Στους αερόβιους ευκαρυωτικούς οργανισμούς για την ανάπτυξη, την υψηλή φυσιολογική επίδοση και την αναπαραγωγή είναι απαραίτητη η συντονισμένη έκφραση μιτοχονδριακών και πυρηνικών γονιδίων. Μιτοχονδριακή αντιγραφή, μεταγραφή, μετάφραση και αναπνοή εξαρτώνται από αλληλεπιδράσεις μεταξύ RNA και πρωτεϊνών που κωδικοποιούνται και από τα δυο γονιδιώματα. Επίσης, επιστατικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ μιτοχονδριακών και πυρηνικών πολυμορφισμών, είναι γνωστό ότι συμβάλλουν στη φαινοτυπική και προσαρμοστική ποικιλομορφία εντός των ειδών. Η επίσταση μεταξύ μιτοχονδριακών και πυρηνικών γονιδίων, όσον αφορά την προσαρμοστικότητα, έχει εξακριβωθεί εντός και μεταξύ πληθυσμών και ειδών διαφορετικών taxa, όμως λίγα είναι γνωστά για την γενετική ή μηχανική βάση αυτού του φαινομένου. Αυτό το γεγονός περιορίζει τη γνώση μας όσον αφορά το ποιοι συνδυασμοί αλληλεπιδρώντων γονιδίων σχετίζονται με την μη κανονική αλληλεπίδραση μεταξύ πυρηνικού και μιτοχονδριακού γονιδιώματος και τα αποτελέσματα που μπορεί να έχει αυτό στα μονοπάτια που αυτά κωδικοποιούν. Δεν αποτελεί έκπληξη ότι μιτοχονδριακές-πυρηνικές ασυμβατότητες σχετίζονται με προβλήματα σε αυτή τη βασική λειτουργία του μιτοχονδρίου. Έχει βρεθεί, ότι αλληλεπιδράσεις μεταξύ του πυρηνικά κωδικοποιούμενου κυτοχρώματος c με τη μιτοχονδριακά κωδικοποιούμενη υπομονάδα του συμπλόκου τέσσερα, μειώνουν την δραστικότητα του συμπλόκου σε υβρίδια μεταξύ απομακρυσμένων πληθυσμών του θαλάσσιου κωπήποδου *Tigriopus*. Επίσης, υπάρχουν ενδείξεις ότι παρόμοιες αλληλεπιδράσεις

έχουν οδηγήσει στην μοριακή συνεξέλιξη των πυρηνικά και μιτοχονδριακά κωδικοποιούμενων υπομονάδων του συμπλόκου τέσσερα σε πρωτεύοντα. Οι Osada και Akashi (2012) παρείχαν πειστικές αποδείξεις, ότι ο αυξημένος ρυθμός προσαρμοστικής εξέλιξης στα πυρηνικά γονίδια που κωδικοποιούν για τις υπομονάδες του συμπλόκου τέσσερα οφείλεται στην εγκαθίδρυση αντισταθμιστικών αντικαταστάσεων, που ωθούνται από την παρουσία επιβλαβών μεταλλάξεων στο μιτοχονδριακό γονιδίωμα.

Οι μιτοχονδριακές και πυρηνικές ασυμβατότητες μπορούν επίσης να διαταράζουν τη μεταγραφή και μετάφραση του μιτοχονδριακού γονιδιώματος. Διαπληθυσμιακά υβρίδια του θαλάσσιου κωπήποδου *Tigriopus* έχουν μειωμένη δραστηριότητα όλων των συμπλόκων της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης, εκτός από το σύμπλοκο δύο, το οποίο είναι το μόνο που στερείται μιτοχονδριακά κωδικοποιημένες υπομονάδες. Οι Ellison και Burton (2006) υπέθεσαν ότι αυτή η ασυμβατότητα μπορεί να είναι αποτέλεσμα μιας διαταραχής στην αλληλεπίδραση μεταξύ της πυρηνικά κωδικοποιημένης μιτοχονδριακής RNA πολυμεράσης και της περιοχή ελέγχου του mtDNA. Δεδομένου ότι το ένα τρίτο του μιτοχονδριακού γονιδιώματος και ένα μεγάλο μέρος των πυρηνικών γονιδίων, όπου τα προϊόντα τους δρουν στο μιτοχόνδριο, σχετίζονται με τις λειτουργίες αντιγραφής, μεταγραφής και μετάφρασης του μιτοχονδριακού DNA, αυτές οι συντηρημένες διαδικασίες αποτελούν στόχο για μεταλλάξεις, οι οποίες μπορούν να παράγουν επίσταση μεταξύ μιτοχονδρίου και πυρήνα, η οποία να σχετίζεται με την προσαρμοστικότητα. Αυτές οι ασυμβατότητες, μεταξύ μιτοχονδριακά και πυρηνικά κωδικοποιούμενων μορίων, παρέχουν τις πρώτες ενδείξεις για τις κυτταρικές διεργασίες που διαταράσσονται από αυτές τις αλληλεπιδράσεις σε φυσικούς πληθυσμούς και τα γονίδια στα οποία συμβαίνει συνεξέλιξη μεταξύ των γονιδιωμάτων (Meiklejohn et al. 2013).

1.9. Η ΚΑΤΑΡΑ ΤΗΣ ΜΗΤΕΡΑΣ (MOTHER'S CURSE)

Όλα τα γονίδια που κωδικοποιούν για τις 13 μιτοχονδριακές πρωτεΐνες αποτελούν σημαντικές συνιστώσες της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης (OXPHOS). Συνεπώς αλλαγές στη σύσταση των αμινοξέων αυτών των πρωτεϊνών, επηρεάζουν την οξειδωτική φωσφορυλίωση και κατά συνέπεια τις επιδόσεις του οργανισμού. Παρότι η επιλογή θα αφαιρέσει γρήγορα την πλειοψηφία των επιβλαβών μεταλλαγών, εκείνες που προκαλούν μόνο ελαφρά επιβλαβείς μεταβολές στην αποδοτικότητα της παραγωγής ενέργειας μπορεί να παραμείνουν. Αυτές οι ήπιες αλλαγές είναι πιθανόν να επηρεάσουν τα αρσενικά αναπαραγωγικά κύτταρα σε πολύ μεγαλύτερο βαθμό απ' ό,τι τα σωματικά ή θηλυκά αναπαραγωγικά κύτταρα, γεγονός που οφείλεται στις δυσανάλογες ενεργειακές απαιτήσεις τους. Τα σπερματοζωάρια έχουν υψηλότερο ποσοστό ενεργειακών δαπανών για την κινητικότητα τους, ενώ κατέχουν μόνο ένα κλάσμα του αριθμού των μιτοχονδρίων σε σχέση με τους περισσότερους κυτταρικούς τύπους. Με βάση τα παραπάνω μεταλλάξεις του μιτοχονδριακού DNA, οι οποίες προκαλούν ανεκτές μειώσεις στην αποδοτικότητα της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης μπορεί να μειώσουν σημαντικά τη λειτουργία των σπερματοζωαρίων και ως εκ τούτου την ανδρική γονιμότητα, αλλά δεν έχουν καμία επίδραση στη βιωσιμότητα των ωαρίων λόγω των χαμηλότερων ενεργειακών τους απαιτήσεων. Η γυναικεία γονιμότητα ως εκ τούτου

δεν επηρεάζεται. Λόγω του μητρικού τρόπου κληρονομής του mtDNA, ο μεταλλαγμένος απλότυπος μπορεί να διατηρηθεί στον πληθυσμό μέσω της θηλυκής γραμμής κληρονομής. Αυτό το σενάριο ονομάζεται «φαινόμενο κατάρα της μητέρας» (Gemmell et al. 2004). Αποδεικτικά στοιχεία για το φαινόμενο κατάρα της μητέρας έχουν βρεθεί σε έντομα (Dowling et al. 2007), κοτόπουλα (Froman et al. 2005) και τον άνθρωπο (Holyoake et al. 2001 Ruiz- Pesini et al.2004). Παρόλα αυτά τα λίγα παραδείγματα, το ερώτημα παραμένει γιατί αυτό το θεωρητικά πιθανό φαινόμενο δεν αναφέρεται συχνότερα, δεδομένου τις σαφείς επιπτώσεις του στην εγκαθίδρυση παραλλαγών των αρσενικών επιδόσεων, την εξέλιξη της πολυανδρίας και της θεωρίας του σπερματικού ανταγωνισμού. Οι Gemmell et al. (2004) προτείνουν ότι η έλλειψη ανίχνευσης μπορεί να σχετίζεται με το ότι πολλοί ερευνητές μπορεί να το παραβλέπουν ως μια πιθανή εξήγηση για τις μειωμένες πληθυσμιακές επιδόσεις (reduced population fitness), ή ότι μπορεί να υπάρχουν διάφοροι αντισταθμιστικοί μηχανισμοί οι οποίοι καλύπτουν τα αποτελέσματα του φαινομένου κατάρα της μητέρας. Η ετεροπλασμία του μιτοχονδριακού DNA μέσα σε ένα άτομο μπορεί επίσης να διαδραματίζει κάποιο ρόλο στο τελικό αποτέλεσμα (Chinnery et al., 2000). Η επιβλαβής μετάλλαξη του μιτοχονδριακού DNA, πρέπει πρώτα να φτάσει ένα όριο συχνότητας σε σχέση με άλλες παραλλαγές του mtDNA σε ένα άτομο και να είναι παρούσα στο γαμετικό ιστό προτού να διακυβευθεί η αναπαραγωγική επιτυχία (Gemmell et al. 2004). Ένας άλλος πιθανός μηχανισμός εμπλέκει τη συν-προσαρμογή των πυρηνικά κωδικοποιούμενων γονιδίων, που επίσης εμπλέκονται στο μονοπάτι της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης. Έτσι, το φαινόμενο της κατάρα της μητέρας μπορεί να καλυφθεί από αντισταθμιστικές μεταλλάξεις στο πυρηνικό DNA. Σε αυτή την περίπτωση, η ανάμειξη των πληθυσμών θα μπορούσε να διαταράξει τα συνπροσαρμοσμένα σύμπλοκα και να αποκαλύψει το φαινόμενο όσον αφορά την ανδρική γονιμότητα (Dowling et al. 2008) (Smith et al. 2010).

1.10. ΑΝΤΙΚΕΙΜΕΝΟ ΜΕΛΕΤΗΣ

Η παρούσα μελέτη αφορά την εξελικτική ανάλυση του συμπλόκου I (οξειδοαναγωγή του ζεύγους NADH- Q) της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης, το οποίο ίσως είναι το καλύτερα μελετημένο από άποψη δομής και λειτουργίας από τα πέντε σύμπλοκα μέχρι στιγμής, καθώς και της ανεύρεσης στοιχείων που να συνηγορούν υπέρ ή κατά του φαινομένου της συνπροσαρμογής, ανάμεσα στο πυρηνικό και μιτοχονδριακό γονιδίωμα. Η μελέτη έγινε στο είδος *Lepus europaeus* και χρησιμοποιήθηκαν δεδομένα από RNAseq προηγούμενης έρευνας, καθώς και αλληλουχίες του μιτοχονδριακού γονιδιώματος για τα πυρηνικά και μιτοχονδριακά γονίδια που κωδικοποιούν για το σύμπλοκο I. Ακολούθησε ανάλυση των πολυμορφισμών, οι οποίες βρέθηκαν στα δύο γονιδιώματα, υπολογίστηκαν οι ρυθμοί συνώνυμων – μη συνώνυμων μεταλλάξεων και έγινε αμινοξική ανάλυση για τις μη συνώνυμες. Τέλος συγκρίθηκαν οι συχνότητες μεταλλάξεων ανάμεσα στους δύο βραχίονες του συμπλόκου I, καθώς και ανάμεσα στα πυρηνικά και μιτοχονδριακά γονίδια που κωδικοποιούν για αυτό.

1.11 ΕΥΡΩΠΑΙΚΟΣ ΛΑΓΟΣ (*Lepus europaeus*)

Συστηματική κατάταξη του είδους *Lepus europaeus*

Βασίλειο: Ζώα

Φύλο: Χορδωτά

Υπό- φύλο: Σπονδυλωτά

Κλάση: Θηλαστικά

Τάξη: Λαγόμορφα

Οικογένεια: Leporidae

Γένος: *Lepus*

Είδος: *Lepus europaeus*

Η εκτεταμένη κατανομή του και το γεγονός ότι ανταποκρίνεται ταχύτατα στις αλλαγές των ενδιαιτημάτων του, το καθιστούν ένα είδος-μοντέλο μέσω του οποίου μπορούμε να εξάγουμε χρήσιμα συμπεράσματα για τη συμπεριφορά, τη βιολογία και την πληθυσμιακή δομή των άγριων πληθυσμών πολλών θηλαστικών.

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

Έως τώρα ποτέ δεν είχε παρατηρηθεί ο ευρωπαϊκός μιτοχονδριακός απλότυπος στην Τουρκία και το Ισραήλ, όπως και ο ανατολίτικος στην βορειοδυτική, κεντρική και νότια Ελλάδα, καθώς και στην υπόλοιπη Ευρώπη. Αντίστοιχα ο ελληνικός μιτοχονδριακός απλότυπος δεν έχει εμφανιστεί στην βόρεια-κεντρική Ευρώπη. Ωστόσο, υπάρχει μια μεγάλη ζώνη υβριδισμού με όλους τους απλότυπους στη Βουλγαρία και βορειοανατολική Ελλάδα. Δεδομένου της έλλειψης σοβαρών γεωγραφικών φραγμών, ενδιαφέρον προκαλεί το εάν αυτός ο έντονος διαχωρισμός ανάμεσα στις απλοομάδες είναι αποτέλεσμα πυρηνικής - μιτοχονδριακής ασυμβατότητας στα “υβρίδια ” που προκύπτουν από ζευγάρωμα ανάμεσα στις απλοομάδες.

Επιπροσθέτως, έχει παρατηρηθεί μια ξεκάθαρη συσχέτιση μεταξύ ενός συγκεκριμένου απλότυπου mtDNA και της μειωμένης αναπαραγωγικής ικανότητας στα αρσενικά σε μία αποικία ευρωπαϊκών λαγών υπό αιχμαλωσία. Αυτό είναι ένα από τα λίγα παραδείγματα που αποτελούν ένδειξη για την ύπαρξη του φαινομένου «κατάρτα της μητέρας», πέραν του ανθρώπου. Πιο συγκεκριμένα, μόνο το 47% των αρσενικών της απλοομάδας Β (βόρεια Ιταλία) παρήγαγαν απογόνους, σε αντίθεση με το 90% της απλοομάδας Α (κεντρική Ευρώπη). Επιπλέον, δεν παρατηρήθηκε διαφοροποίηση της αναπαραγωγικής επιτυχίας ανάμεσα στα θηλυκά της απλοομάδας Β και τα υπόλοιπα θηλυκά. Αυτά τα δεδομένα συνδέουν άμεσα μεταλλάξεις στο mtDNA με τη μειωμένη αναπαραγωγική ικανότητα στα αρσενικά. Επομένως, το φαινόμενο «κατάρτα της μητέρας» φαίνεται ιδιαίτερα πιθανό (Smith et al. 2010).

1.12 ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΚΗ ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΗ

A) Αλληλούχηση κατά Sanger

Το 1977 οι Fred Sanger και ο Alan R. Coulson δημοσίευσαν δύο μεθοδολογικά έγγραφα σχετικά με τον ταχύ προσδιορισμό αλληλουχιών DNA, κάτι το οποίο θα μεταμόρφωνε την βιολογία ως σύνολο, παρέχοντας ένα εργαλείο για την πλήρη αποκρυπτογράφηση γονιδίων και αργότερα ολόκληρων γονιδιωμάτων. Η μέθοδος ξεπέρασε δραματικά την προηγούμενη τεχνική προσδιορισμού αλληλουχιών DNA, που αναπτύχθηκε από τους Maxam και Gilbert. Τα προφανή πλεονεκτήματα της μειωμένης χρήσης των τοξικών χημικών ουσιών και των ραδιοϊσοτόπων έκαναν γρήγορα την αλληλούχηση κατά Sanger τη μόνη χρησιμοποιούμενη μέθοδο προσδιορισμού αλληλουχιών DNA για τα επόμενα 30 χρόνια.

Πλεονεκτήματα – μειονεκτήματα αλληλούχησης κατά Sanger

Η αλληλούχηση κατά Sanger όπως κάθε τεχνική, εκτός από πλεονεκτήματα έχει και περιορισμούς: 1) Ένας σοβαρός περιορισμός της αλληλούχησης κατά Sanger είναι η ανάγκη για δημιουργία πηκτών (gels) ή πολυμερή, ως διαχωριστικούς παράγοντες για τα σημασμένα με φθορισμό τμήματα DNA. 2) Ένας σχετικά μικρός αριθμός δειγμάτων μπορεί να αναλυθεί ταυτόχρονα. 3) Η αυτοματοποίηση της προετοιμασίας του δείγματος είναι δύσκολη. 4) Τα τμήματα DNA πρέπει να κλωνοποιηθούν σε φορείς κλωνοποίησης για μεγαλύτερες αλληλουχίες. 5) Το κόστος αλληλούχησης ανά bp είναι σχετικά υψηλό. 6) Το επίπεδο ευαισθησίας θεωρείται ανεπαρκές για την κλινική ανίχνευση σχετικά χαμηλού επιπέδου μεταλλαγμένων αλληλόμορφων ή οργανισμών. 7) Είναι δύσκολο να προσδιοριστεί ο cis ή trans προσανατολισμός ετερόζυγων θέσεων κατά την ανάλυση των δεδομένων. 8) Δεν είναι εύκολα επεκτάσιμη, ώστε να επιτευχθεί απόδοση ικανή για ανάλυση περίπλοκων διπλοειδών γονιδιωμάτων σε χαμηλό κόστος. 9) Είναι δύσκολη η de novo συναρμολόγηση ενός γονιδιώματος (Ansorge et al. 2009, Hall et al. 2007).

Παρόλα αυτά, η αλληλούχηση κατά Sanger παραμένει αναπόσπαστο κομμάτι της ερευνητικής διαδικασίας διότι: 1) Έχει αρκετά μεγαλύτερη ακρίβεια, αν και σε μικρό όγκο δεδομένων. 2) Παράγει διαβάσματα αλληλουχιών έως χίλια bp σε αντίθεση με τα είκοσι έως εκατό των αλληλουχίσεων νέας γενιάς (New Generation Sequence-NGS) (το μέγεθος των αναγνώσεων παίζει σημαντικό ρόλο στη συναρμολόγηση, γι' αυτό και η αλληλούχηση κατά Sanger χρησιμοποιείται για να καλύψει κενά που προκύπτουν από αλληλουχίσεις με NGS). 3) Η ανάλυση των δεδομένων είναι εύκολη, σε αντίθεση με τα δεδομένα που προκύπτουν από NGS, όπου απαιτείται φιλτράρισμα και κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων μέσω βιοπληροφορικής. 4) Είναι σχετικά απλή και εύχρηστη μέθοδος, όσον αφορά το βαθμό δυσκολίας της. 5) Έχει σχετικά χαμηλό κόστος εξοπλισμού. 6) Έχει χαμηλό κόστος ανάλυσης για μελέτες που αφορούν σχετικά μικρό τμήμα DNA, πχ στη φαρμακογενετική μελέτη, όπου δεν ενδιαφέρει η αλληλούχηση ολόκληρου του γονιδιώματος και η παραγωγή μεγάλου όγκου δεδομένων ώστε να απαντηθεί το βιολογικό ερώτημα.

B) Εφαρμογές τεχνολογιών NGS

Οι τεχνολογίες αλληλούχισης NGS, έχουν πολλά πλεονεκτήματα από την άποψη του κόστους-αποτελεσματικότητας, πρωτοφανή ταχύτητα αλληλούχισης, υψηλή ανάλυση και ακρίβεια στις γονιδιωματικές αναλύσεις. Μέχρι σήμερα, αυτές οι τεχνολογίες αλληλούχισης υψηλής απόδοσης έχουν εφαρμοστεί πλήρως σε μια ποικιλία θεμάτων, όπως την αλληλούχιση πλήρους γονιδιώματος, στοχευμένη αλληλούχιση, προφίλ γονιδιακής έκφρασης, αλληλούχιση ανοσοκατακρήμνισης χρωματίνης, και αλληλούχιση μικρών RNA κλπ (Chien-Yueh Lee et al. 2013).

Οι NGS παρέχουν μια πολύ φθηνότερη και μεγαλύτερης απόδοσης εναλλακτική αλληλούχιση DNA από ότι η αλληλούχιση κατά Sanger. Μικρά γονιδιώματα μπορούν τώρα να αλληλουχισθούν σε μια μέρα και η υψηλής απόδοσης αλληλούχιση του ανθρώπινου γονιδιώματος κάνει δυνατή την ανακάλυψη γονιδίων και ρυθμιστικών παραγόντων που σχετίζονται με ασθένειες. Επίσης, η στοχευμένη αλληλούχιση δίνει την δυνατότητα δημιουργίας διαγνωστικών τεστ, μέσω της αναγνώρισης μεταλλάξεων που σχετίζονται με ασθένειες. Η τεχνολογία RNA-seq δίνει πληροφορίες για ολόκληρο το μεταγράφημα ενός δείγματος χωρίς να είναι αναγκαία οποιαδήποτε προηγούμενη γνώση για την γενετική αλληλουχία του οργανισμού. Ωστόσο, το τεράστιο ποσό των δεδομένων που παράγονται από τις NGS αποτελεί μια μεγάλη πρόκληση.

Γ) RNA-seq

Οι τεχνολογίες αλληλούχισης επόμενης γενιάς μπορούν να αξιοποιηθούν όχι μόνο για αναλύσεις γονιδιωμάτων, αλλά και μεταγραφομάτων, σε μια προσέγγιση που ονομάζεται RNA-seq. Η τεχνολογία RNA-seq επιτρέπει την αλληλούχιση και ποσοτικοποίηση μεταγραφομάτων σε μέγιστη ανάλυση, ανεξάρτητα από το μέγεθος του μεταγράφου και πάνω από όλα χωρίς να χρειάζεται προηγούμενη γνώση για το γονιδίωμα απ' όπου και αν προέρχεται. Η τεχνολογία RNA-seq έχει αρχίσει να αλλάζει τον τρόπο που σκεφτόμαστε για τη μελέτη της πολυπλοκότητας και της δυναμικής των μεταγραφημάτων και τη ρύθμιση του γονιδιώματος. Πρόωρες RNA-seq μελέτες έχουν αποκαλύψει γονιδιώματα με εκτενέστερη έκφραση και πιο πολύπλοκα μεταγραφήματα από ότι αναμενόταν, δίνοντας έτσι τη δυνατότητα πρόβλεψης νέων ρυθμιστικών μηχανισμών. Επίσης, διαπιστώθηκε πλούσια και εκτενής μετα-μεταγραφική ρύθμιση στη δομή και αλληλουχία των μεταγράφων (Marguerat et al. 2010).

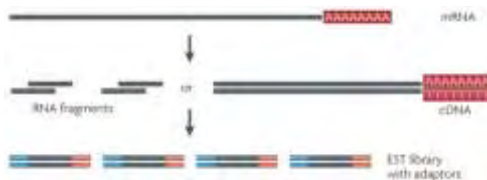
Μέσω της τεχνολογίας RNA-seq, πέρα από την αλληλουχία, μπορούμε να πάρουμε πληροφορίες για διαφορές στα επίπεδα εναλλακτικών μεταγράφων, καθώς επίσης και των προσδιορισμό νέων. Η τεχνολογία RNA-seq ξεπερνά κατά πολύ τις δυνατότητες των μικροσυστοιχιών που χρησιμοποιούνται για αντίστοιχες μελέτες, ξεπερνώντας προβλήματα όπως χαμηλή επαναληψιμότητα, αδυναμία σύγκρισης αποτελεσμάτων από διαφορετικές πλατφόρμες, προϋπόθεση πρότερης γνώσης για το ερώτημα, καθώς και δυσκολία στην ποσοτικοποίηση εναλλακτικών μεταγράφων και ανακάλυψη νέων. (Birtwistle, coursera)

Δ) Illumina RNA-seq

Προετοιμασία δείγματος:

Πριν την αλληλούχιση, τα δείγματα RNA πρέπει να μετατραπούν σε cDNA βιβλιοθήκη. Η βιβλιοθήκη αποτελεί σύνολο των τμημάτων cDNA που θα αλληλουχισθούν.

- Το RNA κόβεται σε τμήματα 200-500 ζευγών βάσεων
- Ένας ειδικός για το μηχάνημα προσαρμογέας, συνδέεται στα άκρα της αλληλουχίας
- Ένας ειδικός για το δείγμα δείκτης μπορεί να συνδεθεί στο κάθε τμήμα. Αυτός ο δείκτης επιτρέπει την παράλληλη αλληλούχιση πολλών δειγμάτων
- Υβριδισμός του RNA με την παραγωγή cDNA
- Τα cDNA δείγματα επιλέγονται με βάση το μέγεθος και ενισχύονται με PCR
- Μέτρηση της συγκέντρωσης της βιβλιοθήκης και της κατανομής του μήκους των cDNA μέσω ποιοτικού ελέγχου

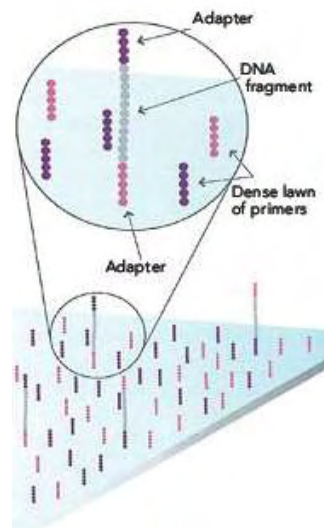


Source: Wang et al, 2009.

Τα μηχανήματα HiSeq και MiSeq της Illumina πραγματοποιούν μαζική- παράλληλη αλληλούχιση σε μία επίπεδη επιφάνεια που ονομάζεται flowcell.

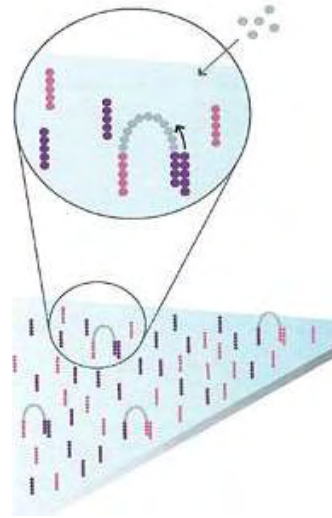
Βήμα 1: Εισαγωγή του cDNA στο flowcell

- Συμπληρωματικές αλληλουχίες προσαρμογής και εκκινήτες συνδέονται στην επιφάνεια του flowcell
- Ο προσαρμογέας του ενός άκρου ενός τμήματος της βιβλιοθήκης υβριδοποιείται με το συμπληρωματικό προσαρμογέα στην επιφάνεια του flowcell



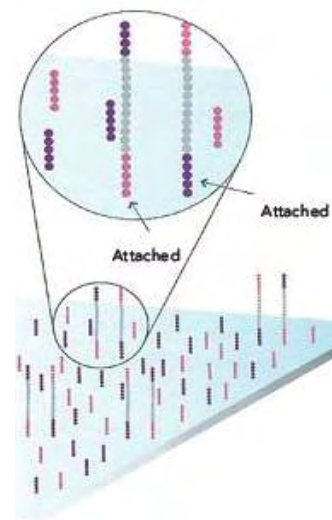
Βήμα 2: Υβριδοποίηση και σύνθεση

- Το αγκυροβολημένο τμήμα στη συνέχεια λυγίζει προς την επιφάνεια και υβριδοποιείται με μία δεύτερη συμπληρωματική αλληλουχία, η οποία περιέχει έναν εκκινητή
- Ο εκκινητής επιτρέπει στη DNA πολυμεράση να αντιγράψει το συγκεκριμένο τμήμα μέσω σύνθεσης DNA



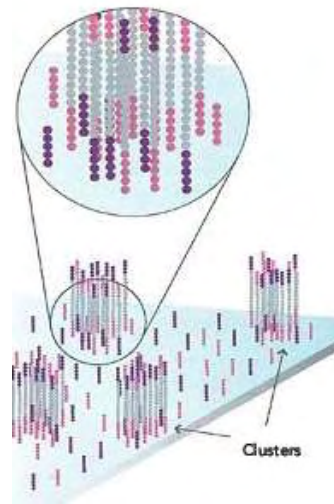
Βήμα 3: Αποδιάταξη

- Το δίκλωνο DNA αποδιάτάσσεται, αφήνοντας τα δύο συμπληρωματικά τμήματα προσδεμένα στην επιφάνεια του flowcell
- Η διαδικασία του υβριδισμού, της σύνθεσης DNA και της αποδιάταξης επαναλαμβάνεται πολλές φορές ώστε να δημιουργηθεί ένα σύμπλεγμα τμημάτων



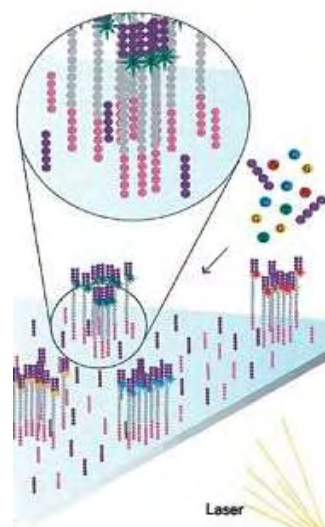
Βήμα 4: Αφαίρεση συμπληρωματικών τμημάτων

- Όλα τα συμπληρωματικά τμήματα (εδώ παρουσιάζονται συνδεδεμένα στο flowcell με μωβ προσαρμογείς) αφαιρούνται από την επιφάνεια
- Τα συμπλέγματα που προκύπτουν αποτελούνται από μονόκλινα πανομοιότυπα αντίγραφα του αρχικού τμήματος αυτής της βιβλιοθήκης και ονομάζεται clonal cluster
- Ένα flowcell μπορεί να περιέχει 40-60 εκατομμύρια clonal clusters τη φορά



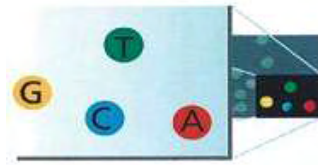
Βήμα 5: Μονονουκλεοτιδική σύνθεση DNA

- Εκκινητές συνδέονται στα ελεύθερα άκρα των τμημάτων του συμπλέγματος
- Επισημασμένα με φθορισμό και συνδεδεμένα με έναν αντιστρεπτό τερματιστή νουκλεοτίδια, τοποθετούνται στην επιφάνεια
- Ένα σημασμένο νουκλεοτίδιο προστίθεται στο σημείο του εκκινητή· η περαιτέρω σύνθεση αποτρέπει από τον τερματιστή
- Μη συνδεδεμένα νουκλεοτίδια απομακρύνονται από το flowcell και ακολουθεί απεικόνιση της επιφάνειας



Βήμα 6: Οπτικοποίηση

- Το χρώμα του φθοροφόρου αποκαλύπτει την ταυτότητα του νουκλεοτιδίου, το οποίο προστέθηκε στο σύμπλεγμα
- Τα clonal clusters ενισχύουν το σήμα που θα παράγονταν από ένα μοναδικό τμήμα μίας βιβλιοθήκης



Στη συνέχεια ο τερματιστής απομακρύνεται από το νουκλεοτίδιο που μόλις προστέθηκε και επανατοποθετούνται σημασμένα με φθορισμό, συνδεδεμένα με αντιστρεπτό τερματιστή νουκλεοτίδια. Αυτή η διαδικασία επαναλαμβάνεται μέχρι να διαβαστεί όλο το τμήμα.

Η διαδικασία αυτή συμβαίνει ταυτόχρονα σε όλους τους κλώνους όλων των συμπλεγμάτων.

Όταν η αλληλούχηση τελειώσει γίνεται ποιοτικός έλεγχος των δεδομένων και ανάλυσή τους.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ DNA

Για τη μελέτη των SNPs των παρακάτω μιτοχονδριακών γονιδίων (ND1, ND2, ND3, ND4, ND4L, ND5, ND6), που χρησιμοποιήθηκαν για τη συγκριτική μελέτη, είναι απαραίτητο σαν πρώτο βήμα να απομονωθεί από τα κύτταρα το γενετικό υλικό, το οποίο περιλαμβάνει το γενωμικό και το μιτοχονδριακό DNA. Στην παρούσα μελέτη απομονώθηκε DNA σύμφωνα με το πρωτόκολλο του Budowle (1990), με κατάλληλες τροποποιήσεις. Τα διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν είναι τα εξής :

CH₃COONa 0,5M (200ml)

- 8,20 gr CH₃COONa

- ddH₂O μέχρι τα 200 ml

Sodium Dodecyl Sulphate 5% (SDS)

- 5 gr SDS
- ddH₂O μέχρι τα 200 ml

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

1. Τοποθετούμε τον ιστό αρκετά τεμαχισμένο σε σωλήνα erpendorf του 1,5ml και προσθέτουμε 0,5ml CH₃COONa 0,5M, 20μl SDS 5% και 10 μl πρωτεΐνάση K 10mg/ml.
2. Επιάζουμε τα δείγματα στους 55°C για μια ώρα.
3. Μετά την επώαση, προσθέτουμε 0,5ml φαινόλη και 0,5ml χλωροφόρμιο/ισοαμυλική αλκοόλη (24:1). Αναδεύουμε έντονα τα δείγματα.
4. Φυγοκεντρούμε στις 13000 rpm για 10 λεπτά
5. Μεταφέρουμε την επάνω υδατική φάση σε νέο σωλήνα erpendorf και προσθέτουμε 0,5ml φαινόλη και 0,5ml χλωροφορμίο/ισοαμυλική αλκοόλη. Αναδεύουμε έντονα.
6. Φυγοκεντρούμε στις 13000 rpm για 10 λεπτά.
7. Μεταφέρουμε την επάνω υδατική φάση σε νέο σωλήνα erpendorf.
8. Προσθέτουμε 1ml χλωροφορμίο/ισοαμυλική αλκοόλη.
9. Φυγοκεντρούμε στις 13000 rpm για 10 λεπτά.
10. Μεταφέρουμε την επάνω υδατική φάση σε νέο σωλήνα erpendorf.
11. Προσθέτουμε 1ml παγωμένη ισοπροπανόλη, αναδεύουμε ήπια.
12. Τοποθετούμε τα δείγματα στους -20°C για 20 λεπτά.
13. Φυγοκεντρούμε στις 13000 rpm για 20 λεπτά.
14. Απομακρύνουμε το υπερκείμενο, προσπαθώντας να διατηρήσουμε ανέπαφο το ίζημα που εμφανίζεται.
15. Προσθέτουμε 1ml αλκοόλη 70%, αναδεύουμε ήπια.
16. Φυγοκεντρούμε στις 13000rpm για 10 λεπτά.
17. Απομακρύνουμε το υπερκείμενο, διατηρώντας ανέπαφο το ίζημα.
18. Τοποθετούμε τα δείγματα στους 37°C, ώστε να ξηρανθεί το ίζημα από τυχόν υπολείμματα διαλυμάτων.
19. Επαναδιαλύουμε το ίζημα σε 100μl ddH₂O και τοποθετούμε τα δείγματα είτε στο ψυγείο (4°C) είτε στην κατάψυξη (-20°C).

Το διάλυμα οξικού νατρίου χρησιμοποιείται για την λύση των κυττάρων ρυθμίζοντας την ωσμωτική πίεση του κυττάρου προκαλώντας διάσπαση των κυτταρικών μεμβρανών και ομογενοποίηση του ιστού. Το SDS είναι ένα ιονικό απορρυπαντικό και συμβάλλει στη διάσπαση της πυρηνικής μεμβράνης καθώς επίσης αποδιατάσσει τις πρωτεΐνες, προστατεύοντας έτσι το DNA από τις νουκλεάσες. Η proteinase K προκαλεί την αποικοδόμηση των πρωτεϊνών, καθώς επίσης και αυτή προστατεύει το DNA από τη δράση νουκλεασών. Η φαινόλη χρησιμοποιείται για την αποδιάταξη των πρωτεϊνών και τον διαχωρισμό λιπιδίων, πρωτεϊνών και νουκλεϊκών οξέων. Το διάλυμα φαινόλης που χρησιμοποιείται είναι εξισορροπημένο σε pH>7 ώστε το DNA να κατανέμεται στην επάνω υδάτινη φάση. Η προσθήκη του χλωροφορμίου έχει ως σκοπό τον καλύτερο διαχωρισμό των φάσεων λόγω μεγάλης πυκνότητας. Συμβάλλει επίσης στη μετουσίωση των πρωτεϊνών και στην απομάκρυνση της διαλυμένης φαινόλης από την υδάτινη φάση. Η ισοαμυλική αλκοόλη σταθεροποιεί το χλωροφόρμιο. Η κατακρήμνιση του DNA με ισοπροπανόλη και η ακόλουθη πλύση του με αιθανόλη 70% βασίζεται στο γεγονός ότι το DNA είναι αδιάλυτο στους συγκεκριμένους οργανικούς διαλύτες.

2.2. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΣΥΝΟΛΙΚΗΣ ΠΟΣΟΤΗΤΑΣ DNA ΑΝΑ ΔΕΙΓΜΑ

Μετά το πέρας της απομόνωσης, το DNA ελέγχεται ποιοτικά και ποσοτικά είτε με φωτομέτρηση είτε με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 1% w/v.

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

2.3. ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (PCR)

Για την ενίσχυση των παρακάτω μιτοχονδριακών γονιδίων (ND1, ND2, ND3, ND4, ND4L, ND5, ND6) πραγματοποιήθηκε αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης. Για την PCR χρησιμοποιήθηκαν οι εξής εκκινητές, Πίνακας 6.

Πίνακας 6. Εκκινητές

	FW	tm	RV	tm
ND1	ATAATCAGAGGTTCAACTCC	50°C	TATAGTTCTAGAAATAAGAGG	50°C
ND2	GTCAGCTAAATAAGCTATCG	50°C	TTGAAGGCTCTCGGTCTATG	52°C
ND3	ACTAGTACATCTGACTTCC	50°C	TACCATAGTCTAATGAGTCG	50°C
ND4	TATGGCATAGATTACGTCC	50°C	TATTAGATTCACAATCTAATG	50°C
ND4L	TCGACTCATTAGACTATGG	50°C	TTAGATCATCATACAGTGGG	50°C
ND5	TCCCATGACTAATCTCATGG	50°C	ATTGTCATTGAGATTACTCGTG	50°C
ND5	TGTCTAGGAGCAATTACCAC	50°C	GCTAGGGTGCAGATATGTAG	52°C
ND6	AATCTCCATGCTCTTAGCC	50°C	CATTAGTCATGGTTAGAGTC	50°C

Η σύσταση των διαλυμάτων των αντιδράσεων περιγράφεται στον Πίνακα 7.

Πίνακας 7. Συστατικά αντίδρασης PCR

Εκμαγείο DNA	1 μl
dNTPs (10mM each)	1 μl
MgCl ₂ (50mM)	2 μl
Buffer 10x	5 μl
ΕκκινητήςFw 50pmol/μl	1 μl
ΕκκινητήςRv 50pmol/μl	1 μl
Taq DNA Polymerase 5 U/μl	0,2 μl
ddH ₂ O	38,8 μl
Συνολικός όγκος	50 μl

Οι συνθήκες ενίσχυσης των τμημάτων είναι :

Αρχική αποδιάταξη: 95°C για 4 min

Αποδιάταξη: 95 °C για 20 sec

Υβριδοποίηση: 58°C για 20Sec

Επιμήκυνση: 72 °C για 15 sec

Τελική επιμήκυνση: 72 °C για 10 min

} 35 κύκλοι

Τα προϊόντα PCR ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή αγαρόζης

2.4. ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΣΕ ΠΗΚΤΗ ΑΓΑΡΟΖΗΣ

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

TAE 50x (500ml)

Tris Base 121gr

Acetic Acid 28,5ml

EDTA 0,5M 50ml

ddH₂O έως τα 500ml

Loading buffer 6x (10ml)

Bromophenol blue 1ml 1% w/v

TBE 20x 0,5ml

Glycerol 5ml

ddH₂O έως τα 10ml

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

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

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

2.5. ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΣΗ

Τα προϊόντα PCR που επιλέγονται, καθαρίζονται με τη χρήση κατάλληλου kit της Macherey-Nagel (Nucleo spin Gel and PCR Clean-up), ώστε να απαλλαγθούν από την παρουσία παραπροϊόντων, και στη συνέχεια αποστέλλονται σε εταιρείες που πραγματοποιούν αλληλούχιση. Τα αποτελέσματα λαμβάνονται με τη μορφή χρωματογραφήματος, μέσω του οποίου μπορούμε να εξάγουμε την επιθυμητή αλληλουχία και να ακολουθήσουμε με την περαιτέρω ανάλυση των φυλογενετικών σχέσεων με τη χρήση κατάλληλων προγραμμάτων βιοπληροφορικής.

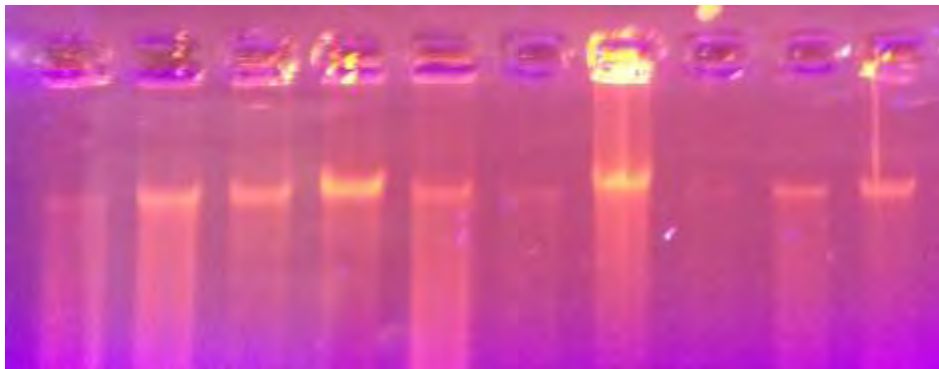
2.6. ΑΝΑΛΥΣΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΗΜΑΤΩΝ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΣΗΣ

Η ανάλυση αυτή πραγματοποιείται με τη χρήση του προγράμματος BioEdit. Στο γράφημα, απεικονίζονται 4 καμπύλες με διαφορετικά χρώματα, το καθένα από τα οποία αντιστοιχεί και σε διαφορετικό νουκλεοτίδιο. Έτσι, παρατηρώντας το χρώμα της κορυφής της καμπύλης σε κάθε διαφορετική θέση, μπορούμε να συμπεράνουμε ποιο νουκλεοτίδιο βρίσκεται στη θέση αυτή. Η αλληλούχιση γίνεται και για τις δυο αλυσίδες (με διαφορετικό εκκινητή για την κάθε μια) και στη συνέχεια οι δυο αλληλουχίες που προκύπτουν ομοπαράτιθενται με τη χρήση κατάλληλου προγράμματος βιοπληροφορικής (ClustalX) για την εύρεση τυχών λαθών που προκύπτουν κατά τη διαδικασία αυτή (Thompson et al. 1997). Μετά το τέλος και αυτής της διαδικασίας, έχουμε την πλήρη αλληλουχία του τμήματος που μας ενδιαφέρει.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ DNA

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



Εικόνα 6. Ηλεκτροφόρηση απομονωμένου DNA

3.2. PCR

Με τη χρήση των κατάλληλων εκκινητών, ενισχύθηκαν τα γονίδια ND1, ND2, ND3, ND4, ND4L, ND5, ND6. Για την επαλήθευση της επιτυχίας της μεθόδου, πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 2%, στην οποία ηλεκτροφορήθηκαν τα προϊόντα PCR παρουσία ενός μάρτυρα τμημάτων γνωστού μοριακού βάρους (ladder), για να υπολογιστεί το μήκος του τμήματος που ενισχύθηκε.

3.3. ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΣΗ

Για τα δείγματα του πίνακα 8 προκειμένου να υπάρχει μεγαλύτερη αξιοπιστία για τα αποτελέσματα της αλληλούχισης, χρησιμοποιήθηκαν και οι δυο εκκινητές για την αντίδραση του sequencing. Τα δυο χρωματογραφήματα που ελήφθησαν για κάθε δείγμα αναλύθηκαν με το πρόγραμμα BioEdit, τα αποτελέσματα συγκρίθηκαν

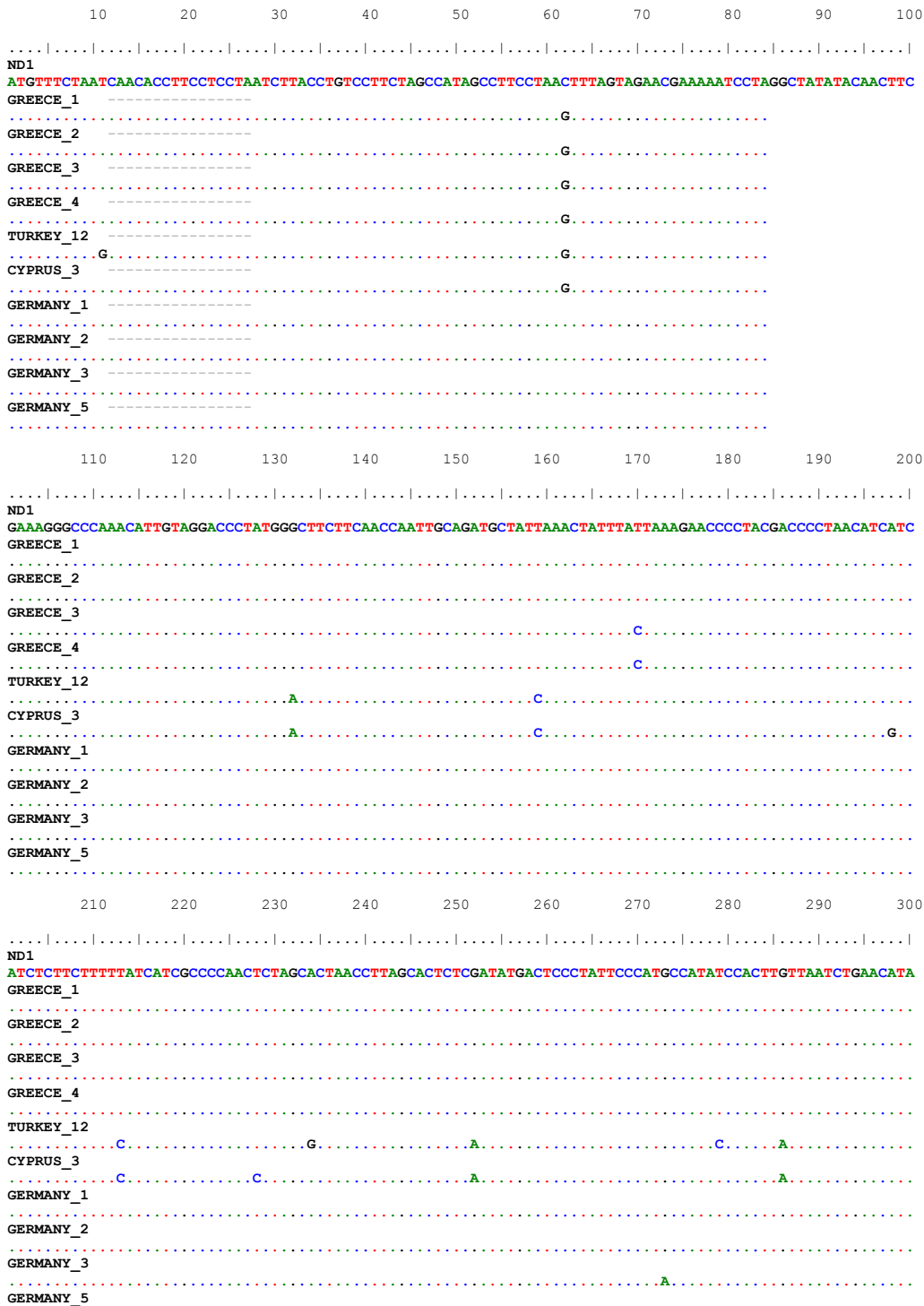
με το πρόγραμμα ClustalX και τελικά προέκυψε η τελική αλληλουχία του κάθε δείγματος.

Πίνακας 8. Δείγματα που αλληλουχίστηκαν

ND1	ND2	ND3	ND4	ND4L	ND5	ND6
Greece 1	Greece 1	Greece 1	Cyprus 3	Greece 1	Greece 1	Greece 1
Greece 2	Greece 2	Greece 2	Cyprus 4	Greece 2	Greece 2	Greece 2
Greece 3	Greece 3	Greece 3	Germany 1	Greece 3	Greece 3	Greece 3
Greece 4	Greece 4	Greece 4	Germany 2	Greece 4	Greece 4	Greece 4
Turkey 12	Turkey 12	Germany 1	Germany 3	Turkey 12	Germany 1	Turkey 12
Cyprus 3	Turkey 13	Germany 2	Germany 5	Turkey 13	Germany 2	Turkey 13
Germany 1	Cyprus 3	Germany 3	Greece 3	Cyprus 3	Germany 3	Cyprus 3
Germany 2	Cyprus 4	Germany 5	Greece 4	Cyprus 4	Turkey 12	Cyprus 4
Germany 3	Germany 1	Turkey 12	Turkey 12	Germany 1	Turkey 13	Germany 1
Germany 5	Germany 2	Turkey 13	Turkey 13	Germany 2	Cyprus 3	Germany 2
	Germany 3	Cyprus 3		Germany 3		Germany 3
	Germany 5			Germany 5		Germany 5

Οι αλληλουχίες που προέκυψαν, είναι οι εξής:

ND1




```

          910      920      930      940      950
ND1      TGCATATGACACATCTCTATGCTATTACTCTCAAGTATCCCCCTCACATATAG
GREECE_1 .....A.....C.....
GREECE_2 .....A.....C.....
GREECE_3 .....A.....C.....
GREECE_4 .....A.....C.....
TURKEY_12 .....A.....
CYPRUS_3 .....A.....
GERMANY_1 .....
GERMANY_2 .....
GERMANY_3 .....
GERMANY_5 .....

```

ND2

```

          10      20      30      40      50      60      70      80      90      100
nd2      ATTAACCCCTAATCTTTCCATCATCCTATTTACCTTATTCCTAGGCACAATAATTACCATATTTAGCTCCCATGGCTAACTATATGAATTGGATTAG
Greece_1 .....
Greece_2 .....
Greece_3 .....
Greece_4 .....
Turkey_12 .....T.....A.....G.....
Turkey_13 .....G.....T.....A.....G.....
Cyprus_3 .....T.....A.....G.....
Cyprus_4 .....T.....A.....G.....
Germany_1 .....
Germany_2 .....
Germany_3 .....
Germany_5 .....

          110      120      130      140      150      160      170      180      190      200
nd2      AAATAAATATGTTAGCTATTATCCCTATCCTAATCAATAAGGCCACACCAGATCAACAGAAGCTGCAACTAAATATTTCTAACACAAGCCACAGCATC
Greece_1 .....
Greece_2 .....
Greece_3 .....
Greece_4 .....
Turkey_12 .....
Turkey_13 .....
Cyprus_3 .....
Cyprus_4 .....
Germany_1 .....
Germany_2 .....
Germany_3 .....

```


Greece_4
 Turkey_12
 Turkey_13
 Cyprus_3
 Cyprus_4
 Germany_1
 Germany_2
 Germany_3
 Germany_5

810 820 830 840 850 860 870 880 890 900

nd2
 TCAGAATTAACAAAAATGGCAACATCATTATATACCCACTATAATAGCTATACTAGCCCTCCTAAACCTTTCTTTTACTTACGTCTAATCTACTCTTCT
 Greece_1
 Greece_2
 Greece_3
 Greece_4
 Turkey_12
 Turkey_13
 Cyprus_3
 Cyprus_4
 Germany_1
 Germany_2
 Germany_3
 Germany_5

910 920 930 940 950 960 970 980 990 1000

nd2
 TCCTAATATATATCCCAACCAACCAACCTAAAAATAAAAATGACAATTTGAATCAATAAAAAGTATAACATTATAGCCCCACTAATCATCTTATCCA
 Greece_1
 Greece_2
 Greece_3
 Greece_4
 Turkey_12
 Turkey_13
 Cyprus_3
 Cyprus_4
 Germany_1
 Germany_2
 Germany_3
 Germany_5


```

410      420      430      440      450      460      470      480      490      500
...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|
nd4
CACGATGAGGTAATCAAAACAGAACGACTAAATGCAGGAACCTACTTTTTATTCTATACCCCTATAGGATCGCTCCCTTACTAGTTGCCCTAATTCATCT
Cyprus_3
.....A.....C.....
Cyprus_4
.....
Germany_1
.....
Germany_2
.....
Germany_3
.....
Germany_5
.....
GREECE_3
.....T.....
Greece_4
.....T.....
Turkey_12
.....A.....C.....
Turkey_13
.....A.....C.....

510      520      530      540      550      560      570      580      590      600
...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|
nd4
TCAAAATTCATAGGGTCTCTTAATTTCTTTTAACTCAAACTCTCTAACGAATCCCTGCTAACATCATGATCTAATTCACATAATGATTAGCATGTATA
Cyprus_3
.....A.....G.....
Cyprus_4
.....G.....
Germany_1
.....G.....
Germany_2
.....G.....
Germany_3
.....G.....
Germany_5
.....G.....
GREECE_3
.....G.....
Greece_4
.....G.....
Turkey_12
.....A.....G.....
Turkey_13
.....C.....A.....G.....

610      620      630      640      650      660      670      680      690      700
...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|
nd4
ATAGCATTTTGTAGTCAAAATACCCCTCTATGGTCTTCTCTCTGACTTCCAAAAGCCCATGTGCGAAGCCCCATTGCAGGTTCTATAGTCTAGCGGCCG
Cyprus_3
.....T.....A.....A.....
Cyprus_4
.....A.....
Germany_1
.....A.....
Germany_2
.....A.....
Germany_3
.....A.....
Germany_5
.....A.....
GREECE_3
.....A.....C.....
Greece_4
.....A.....C.....
Turkey_12
.....A.....A.....
Turkey_13
.....C.....A.....A.....

```



```

.....C.....
Germany_1
.....
Germany_2
.....
Germany_3
.....
Turkey_12
.....C.....G.C
Turkey_13
.....C.....C.....G
Cyprus_3
.....C.....C.....
310 320 330 340 350 360 370 380 390 400

```

```

nd5
ATAGAGTTCTCTATATGGTATATACACTCAGATCCTAAAATCAATCAATCTTTAAATACCTACTTATATTCTAATCACCATACTCATTCTAGTCACCG
Greece_1
.....G.....T
Greece_2
.....T
Greece_3
.....T
Greece_4
.....T
Germany_1
.....
Germany_2
.....
Germany_3
.....
Turkey_12
.....A.C.....T
Turkey_13
.....A.....T
Cyprus_3
.....A.....A.C.....T
410 420 430 440 450 460 470 480 490 500

```

```

nd5
CCACCAACCTCTTCAATTGTTTCATCGGGTGAGAGGGAGTAGGAATATATCATTCTTCTTATCGGCTGATGACACGGTCGAAACGGATGCTAATACCGC
Greece_1
.....
Greece_2
.....
Greece_3
.....
Greece_4
.....
Germany_1
.....
Germany_2
.....
Germany_3
.....
Turkey_12
.....
Turkey_13
.....
Cyprus_3
.....
510 520 530 540 550 560 570 580 590 600

```

```

nd5
AGCCCTGCAAGCAATTCATATAACCGCATCGGAGATATTGGCTCATTATGGCTATAGCTTGATTGCTATTAATCTTAACACATGAGAATTCAACAA
Greece_1
.....
Greece_2
.....
Greece_3
.....
Greece_4
.....
Germany_1
.....
Germany_2
.....

```



```

.....T.....T.....C..T.....
Turkey_13
.....T.....T.....C..T.....
Cyprus_3
.....T.....T.....T.....C.....
910      920      930      940      950      960      970      980      990      1000

```

```

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
nd5
ATCGTAGCCTTCTCCACTTCAAGCCAAC TAGGCTTAATAATAGTCACAATTGGAATTAATCAACCTCACCTAGCATTCTACATATCTGCACCCATGCTT
Greece_1
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
Greece_2
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
Greece_3
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
Greece_4
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
Germany_1
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
Germany_2
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
Germany_3
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
Turkey_12
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
Turkey_13
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|T.....
Cyprus_3
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|G.....
1010     1020     1030     1040     1050     1060     1070     1080     1090     1100

```

```

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
nd5
TTTTCAAGCTATACCTTTTATGCTCCGGATCAATTATTCATAGTCTTAACGACGAACAGGACATCCGAAAAATAGGAGGACTTACAAAACCTCC
Greece_1
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|T.....
Greece_2
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|A.....T.....
Greece_3
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|A.....T.....
Greece_4
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|A.....T.....
Germany_1
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|A.....T.....
Germany_2
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
Germany_3
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
Turkey_12
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|C.....A..T.....
Turkey_13
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|A.....
Cyprus_3
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|A.....
1110     1120     1130     1140     1150     1160     1170     1180     1190     1200

```

```

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
nd5
CTTCACATCCTCAGCTCTTACCATTGGCAGCCTAGCCCTTACTGGTATGCCATTCCTAACAGGATTTTATTCAAAGACTTAATCATCGAGTCTGCAAA
Greece_1
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
Greece_2
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
Greece_3
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
Greece_4
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
Germany_1
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
Germany_2
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
Germany_3
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
Turkey_12
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|T.....T.....
Turkey_13
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|T.....T.....
Cyprus_3
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|T.....T.....

```

```

.....T.....T.....
1210 1220 1230 1240 1250 1260 1270 1280 1290 1300
nd5
ACGTCCTTATACCAACGCCTGAGCCCTTATTATTACCCCTCATGCTACCTCCCTTACAGCTGTATATAGTACACGAATTATCTTTTTGCCCTTCCTGGAC
Greece_1
Greece_2
Greece_3
Greece_4
Germany_1
Germany_2
Germany_3
Turkey_12
Turkey_13
Cyprus_3
.....C.....C.....C.....C.....
1310 1320 1330 1340 1350 1360 1370 1380 1390 1400
nd5
AACCTCGCTATCCCTACCCCTTATTATTATTAATGAAAAACAACCCATCATTAAATTAACCTATTAAACGCTCGCACCTTGGAAAGTATTTTTGCAGGCTTCCT
Greece_1
Greece_2
Greece_3
Greece_4
Germany_1
Germany_2
Germany_3
Turkey_12
Turkey_13
Cyprus_3
.....T.....G.....T.....G.....T.....
1410 1420 1430 1440 1450 1460 1470 1480 1490 1500
nd5
TATCTCCAATCTTATTCACCTAATAATGTCCCCAAATAACTATGCCCTTATATATGAAAAATAACCGCCCTATTGTGCACTATTTTAGGCTTTCTATT
Greece_1
Greece_2
Greece_3
Greece_4
Germany_1
Germany_2
Germany_3
Turkey_12
C.....A.....
Turkey_13
C.....A.....
Cyprus_3
.....A.....

```



```

Cyprus_4
.....A.....G.....
210      220      230      240      250      260      270      280      290      300
nd6
TGGGTATACAACGCGATAGCAACTGAGGAATACCCCTGAAACTTGAGGGTCAAATATATAATTCCTTAGTATGCTTGTGTTGGGTGTGTTGTTGGAGGCA
Greece_1
Greece_2
Greece_3
Greece_4
Germany_1
Germany_2
Germany_3
Turkey_12
Turkey_13
Cyprus_3
Cyprus_4
.....A.....T.....
310      320      330      340      350      360      370      380      390      400
nd6
GGATTAGTTATATTTATGGCGGTGAGTGATGAGGTTGAGGTTGTTGGTGAGTTTAAGAAATATAGGTGATTGGGTGTTTTGAAGGGGACCAAGTAGGTT
Greece_1
Greece_2
Greece_3
Greece_4
Germany_1
Germany_2
Germany_3
Turkey_12
Turkey_13
Cyprus_3
Cyprus_4
.....A.....T.....
410      420      430      440      450      460      470      480      490      500
nd6
TAATTCGAGAGGACTCTATAGGGGTGGCAGCATTATATAGTTATGGGAGTTGATTAATAGTGGTTGCTGGTTCATCTTTATTGAGTATTTTTATTGT
Greece_1
Greece_2
Greece_3
Greece_4
Germany_1
Germany_2
Germany_3

```

```

Turkey_12 .....G.
Turkey_13 .....A.....G.
Cyprus_3 .....A.....G.
Cyprus_4 .....G.

```

```

          510      520
nd6      ....|....|....|....|....|
Greece_1 CATTGAGATTACTCGTGGGGTTAG
Greece_2 .....
Greece_3 .....
Greece_4 .....
Germany_1 .....
Germany_2 .....
Germany_3 .....
Turkey_12 G.....
Turkey_13 .....
Cyprus_3 .....
Cyprus_4 .....

```

Πίνακας 9: Μεταλλάξεις στα μιτοχονδριακά γονίδια του συμπλόκου I

gene	mutations	dns	length
ND1	35	1	956
ND2	39	1	1044
ND3	9	2	346
ND4	49	6	1375
ND4L	10	1	297
ND5	67	6	1812
ND6	20	1	525

3.4. ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΑΠΟ NGS

Όσον αφορά την εξελικτική μελέτη των υπομονάδων του συμπλόκου I, χρησιμοποιήθηκαν αλληλουχίες που προέκυψαν από αλληλούχιση νέας γενιάς (Illumina HiSeq 2000), για τα πυρηνικά γονίδια του συμπλόκου I στο είδος *Lepus europaicus* από προηγούμενες μελέτες του εργαστηρίου. Τα δεδομένα που χρησιμοποιήθηκαν φαίνονται στον πίνακα 10. Στον πίνακα αυτό παρουσιάζονται τα γονίδια του συμπλόκου I, στα οποία προσδιορίστηκε ο συνολικός αριθμός μεταλλάξεων, καθώς και ο αριθμός μη συνώνυμων μεταλλάξεων που βρέθηκαν σε κάθε γονίδιο

Πίνακας 10. Μεταλλάξεις στα πυρηνικά γονίδια του συμπλόκου I

gene	mutations	dns	length	gene	mutations	dns	length
NDUFA10	12	1	1068	NDUFS6	4		393
NDUFA12	1		492	NDUFS7	5		846
NDUFA3	1		312	NDUFS8	9	2	690
NDUFA4	4	3	249	NDUFV1	18	1	1395
NDUFA5	5	1	374	NDUFV2	3	2	885
NDUFA6	3		393	NDUFAB1	7	1	546
NDUFA7	4	1	438	NDUFAF1	9	3	987
NDUFA8	8		519	NDUFAF2	7	3	570
NDUFA9	8	2	1170	NDUFAF3	2	1	546
NDUFB10	3	1	603	NDUFAF4	4	1	584
NDUFB2	3		303	NDUFAF5	3		1040
NDUFB3	2		309	NDUFAF6	4	1	534
NDUFB5	5	3	570	NDUFAF7	14	10	1350

NDUFB6	2	2	387		ACAD	13	4	906
NDUFB7	3		414		AIFM	1		1842
NDUFB8	5	3	561		ECSIT	16	4	1296
NDUFB9	2		540		FOXRED1	4		1461
NDUFC2	1	1	363		LACTB	6		1707
NDUFS1	6		2184		LYRM5	1		273
NDUFS2	4		1425		NUBPL	1		903
NDUFS5	3	2	541		PHB	6		819

3.5. ΑΝΑΛΥΣΗ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ

Για τα παραπάνω γονίδια, καθώς και για τα μιτοχονδριακά γονίδια του συμπλόκου I υπολογίστηκε ο συνολικός αριθμός μεταλλάξεων, καθώς και ο αριθμός μη συνώνυμων μεταλλάξεων ανά νουκλεοτίδιο και ομαδοποιήθηκαν με τρεις διαφορετικούς τρόπους.

A) Δομικά πυρηνικά-συναρμογής-μιτοχονδριακά

Η συγκεκριμένη ομαδοποίηση έγινε με σκοπό να προσδιοριστούν οι μικροεξελικτικές σχέσεις ανάμεσα σε αυτές τις τρεις διαφορετικές κατηγορίες γονιδίων, λαμβάνοντας υπόψη τη διαφορετική τους προέλευση (πυρήνας-μιτοχόνδριο) και ρόλο (δομικά- συναρμογής).

Πίνακας 11. Συναρμογής

gene	mutations	dns	Length	mutations/base	dns/base
NDUFAB1	7	1	546	0,012820513	0,001832
NDUFAF1	9	3	987	0,009118541	0,00304
NDUFAF2	7	3	570	0,012280702	0,005263
NDUFAF3	2	1	546	0,003663004	0,001832
NDUFAF4	4	1	584	0,006849315	0,001712
NDUFAF5	3		1040	0,002884615	0
NDUFAF6	4	1	534	0,007490637	0,001873
NDUFAF7	14	10	1350	0,01037037	0,007407
ACAD	13	4	906	0,014348786	0,004415
AIFM	1		1842	0,000542888	0
ECSIT	16	4	1296	0,012345679	0,003086
FOXRED1	4		1461	0,002737851	0

LACTB	6		1707	0,003514938	0
LYRM5	1		273	0,003663004	0
NUBPL	1		903	0,00110742	0
PHB	6		819	0,007326007	0

Πίνακας 12. Δομικά πυρηνικά

gene	mutations	dns	Length	mutations/base	dns/base
NDUFA10	12	1	1068	0,011235955	0,000936
NDUFA12	1		492	0,00203252	0
NDUFA3	1		312	0,003205128	0
NDUFA4	4	3	249	0,016064257	0,012048
NDUFA5	5	1	374	0,013368984	0,002674
NDUFA6	3		393	0,007633588	0
NDUFA7	4	1	438	0,00913242	0,002283
NDUFA8	8		519	0,015414258	0
NDUFA9	8	2	1170	0,006837607	0,001709
NDUFB10	3	1	603	0,004975124	0,001658
NDUFB2	3		303	0,00990099	0
NDUFB3	2		309	0,006472492	0
NDUFB5	5	3	570	0,00877193	0,005263
NDUFB6	2	2	387	0,005167959	0,005168
NDUFB7	3		414	0,007246377	0
NDUFB8	5	3	561	0,008912656	0,005348
NDUFB9	2		540	0,003703704	0
NDUFC2	1	1	363	0,002754821	0,002755
NDUFS1	6		2184	0,002747253	0
NDUFS2	4		1425	0,002807018	0
NDUFS5	3	2	541	0,003696857	0,003697
NDUFS6	4		393	0,010178117	0
NDUFS7	5		846	0,005910165	0
NDUFS8	9	2	690	0,013043478	0,002899
NDUFV1	18	1	1395	0,012903226	0,000717
NDUFV2	3	2	885	0,003389831	0,00226

Πίνακας 13. Μιτοχονδριακά

gene	mutations	dns	length	mutations/b	dns/b
ND1	35	1	956	0,03661088	0,00104603
ND2	39	1	1044	0,03735632	0,00095785
ND3	9	2	346	0,02601156	0,00578035
ND4	49	6	1375	0,03563636	0,00436364
ND4L	10	1	297	0,03367003	0,003367
ND5	67	6	1812	0,03697572	0,00331126
ND6	20	1	525	0,03809524	0,00190476

Πίνακας 14. Συγκεντρωτικά

	gene	mutations	dns	m/b/g	dns/b/g
Δομικά	26	124	25	0,007596	0,001901
Συναρμογής	16	98	28	0,006942	0,001904
Μιτοχονδριακά	7	229	18	0,034908	0,002962

Στον πίνακα 14 παρατηρούμε ότι ο μέσος όρος μη συνώνυμων μεταλλάξεων ανά νουκλεοτίδιο είναι σχεδόν ίδιος ανάμεσα στα δομικά και τα συναρμογής, ενώ είναι σχεδόν διπλάσιος στα μιτοχονδριακά. Αυτή η διαφορά είναι αναμενόμενη, λαμβάνοντας υπόψη τον αυξημένο ρυθμό συσσώρευσης μεταλλάξεων στο μιτοχονδριακό γονιδίωμα.

B) Βραχίονας μήτρας(Iα), βραχίονας μεμβράνης(Iβ+Iγ)

Η συγκεκριμένη ομαδοποίηση έγινε, λαμβάνοντας υπόψη τις διαφορετικές λειτουργίες των δύο βραχιόνων του συμπλόκου I. Η υπομονάδα Iα αποτελεί το βραχίονα προς την πλευρά της μήτρας, ο οποίος αποτελεί το σύστημα μεταφοράς

ηλεκτρονίων, και οι υπομονάδες Ιβ και Ιγ απαρτίζουν το βραχίονα που βρίσκεται στη μεμβράνη, ο οποίος είναι υπεύθυνος για την άντληση πρωτονίων.

Πίνακας 15. Υπομονάδα Ια

gene	mutations	dns	length	mutations/base	dns/base
NDUFS1	6		2184	0,002747253	0
NDUFV1	18	1	1395	0,012903226	0,000717
NDUFS2	4		1425	0,002807018	0
NDUFS3					
NDUFV2	3	2	885	0,003389831	0,00226
NDUFS8	9	2	690	0,013043478	0,002899
NDUFS7	5		846	0,005910165	0
NDUFS4					
NDUFA2					
NDUFS6	4		393	0,010178117	0
NDUFA5	5	1	374	0,013368984	0,002674
NDUFA7	4	1	438	0,00913242	0,002283
NDUFV3					
NDUFA13					
NDUFA12	1		492	0,00203252	0
NDUFA11					
NDUFAB1	7	1	546	0,012820513	0,001832
NDUFA9	8	2	1170	0,006837607	0,001709
NDUFA8	8		519	0,015414258	0
NDUFS5	3	2	541	0,005545	0,003697
NDUFA6	3		393	0,007633588	0
NDUFA1					
NDUFB4					
NDUFA3	1		312	0,003205128	0
NDUFA4	4	3	249	0,016064257	0,012048
ND6	20	1	524	0,038167939	0,001908

Πίνακας 16. Υπομονάδες Ιβ+Ιγ

gene	mutations	dns	length	mutations/base	dns/base
NDUFB2	3		303	0,00990099	0
NDUFB8	5	3	561	0,008912656	0,005348
NDUFB11					

NDUFB1					
NDUFB10	3	1	603	0,004975124	0,001658
NDUFAB1	7	1	546	0,012820513	0,001832
NDUFB5	5	3	570	0,00877193	0,005263
NDUFB9	2		540	0,003703704	0
NDUFB7	3		414	0,007246377	0
NDUFB6	2	2	387	0,005167959	0,005168
NDUFB4					
NDUFC2	1	1	363	0,002754821	0,002755
NDUFB3	2		309	0,006472492	0
ND4	49	6	1374	0,0356623	0,004367
ND5	67	6	1810	0,037016575	0,003315
NDUFA4	4	3	249	0,016064257	0,012048
NDUFC1					
ND1	35	1	956	0,036610879	0,001046
ND2	39	1	1043	0,037392138	0,000958
ND3	9	2	345	0,026086957	0,005797
ND4L	10	1	296	0,033783784	0,003378

Πίνακας 17. Συγκεντρωτικά υπομονάδας Ια

	gene	mutations	dns	m/b/g	dns/b/g
all	24	113	16	0,00755	0,001334
nuc	23	86	15	0,005721	0,001205
mt	1	20	1	0,038168	0,001908

Πίνακας 18. Συγκεντρωτικά υπομονάδων Ιβ και Ιγ

	gene	mutations	dns	m/b/g	dns/b/g
all	21	246	31	0,013969	0,002521
nuc	15	37	14	0,005786	0,002271
mt	6	209	17	0,034425	0,003144

Στους πίνακες 17 και 18 παρατηρούμε ότι ο μέσος όρος μη συνώνυμων μεταλλάξεων ανά νουκλεοτίδιο, όσον αφορά τα πυρηνικά των υπομονάδων Ιβ, Ιγ, είναι σχεδόν διπλάσιος σε σχέση με του Ια και τείνει να προσεγγίσει την τιμή των μιτοχονδριακών στο Ιβ, Ιγ. Αυτή η διαφορά στο ρυθμό εξέλιξης ανάμεσα σε αυτές τις δύο κατηγορίες πυρηνικών γονιδίων, θα μπορούσε να εξηγηθεί από το φαινόμενο της συνπροσαρμογής, όπου η στενή συνεργασία πυρηνικών, μιτοχονδριακών γονιδίων στο βραχίονα Ιβ+Ιγ προωθεί την αύξηση του ρυθμού εξέλιξης στα πυρηνικά, ώστε να προσεγγιστεί αυτός των μιτοχονδριακών.

Γ) Πυρήνας του συμπλόκου, βοηθητικά

Η τελευταία ομαδοποίηση αφορά το διαχωρισμό των γονιδίων ως γονίδια του πυρήνα του συμπλόκου, τα οποία είναι υπεύθυνα για τη μεταφορά ηλεκτρονίων και το rmping, και σε βοηθητικά, τα οποία πλαισιώνουν δομικά τον πυρήνα του συμπλόκου.

Πίνακας 19. Γονίδια πυρήνα του συμπλόκου

gene	mutations	dns	length	mutations/base	dns/base
ND1	35	1	956	0,036610879	0,001046
ND2	39	1	1043	0,037392138	0,000958
ND3	9	2	345	0,026086957	0,005797
ND4	49	6	1374	0,0356623	0,004367
ND4L	10	1	296	0,033783784	0,003378
ND5	67	6	1810	0,037016575	0,003315
ND6	20	1	524	0,038167939	0,001908
NDUFV1	18	1	1395	0,012903226	0,000717
NDUFV2	3	2	885	0,003389831	0,00226
NDUFS1	6		2184	0,002747253	0
NDUFS2	4		1425	0,002807018	0
NDUFS3					
NDUFS7	5		846	0,005910165	0
NDUFS8	9	2	690	0,013043478	0,002899

Πίνακας 20. Βοηθητικά

gene	mutations	dns	length	mutations/base	dns/base
NDUFV3					
NDUFS4					
NDUFS5	3	2	541	0,005545287	0,003696858
NDUFS6	3		393	0,007633588	0
NDUFA1					

<i>NDUFA2</i>					
NDUFA3	1		312	0,003205128	0
NDUFA4	4	3	249	0,016064257	0,012048193
<i>NDUFA5</i>	3	2	541	0,005545287	0,003696858
NDUFA6	4		393	0,010178117	0
<i>NDUFA7</i>	4	1	438	0,00913242	0,002283105
NDUFA8	8		519	0,015414258	0
NDUFA9	8	2	1170	0,006837607	0,001709402
<i>NDUFA11</i>					
<i>NDUFA12</i>	1		492	0,00203252	0
<i>NDUFA13</i>					
NDUFAB1	7	1	546	0,012820513	0,001831502
NDUFB1					
NDUFB2	3		303	0,00990099	0
NDUFB3	2		309	0,006472492	0
NDUFB4					
NDUFB5	5	3	570	0,00877193	0,005263158
NDUFB6	2	2	387	0,005167959	0,005167959
NDUFB7	3		414	0,007246377	0
NDUFB8	5	3	561	0,008912656	0,005347594
NDUFB9	2		540	0,003703704	0
NDUFB10	3	1	603	0,004975124	0,001658375
NDUFB11					
NDUFC1					
NDUFC2	1	1	363	0,002754821	0,002754821

Πίνακας 21. Συγκεντρωτικά

	gene	mutations	dns	m/b/g	dns/b/g
core	14	274	23	0,020394	0,001903
nuc	7	45	5	0,005829	0,001958
mt	7	229	18	0,03496	0,002967
supernumerary	30	72	21	0,005077	0,001515

Στον πίνακα 21, παρατηρούμε μία σημαντική αύξηση του μέσου όρου εμφανιζόμενων μεταλλάξεων ανά νουκλεοτίδιο στον πυρήνα του συμπλόκου, σε σχέση με τα βοηθητικά. Εδώ πρέπει να λάβουμε υπόψη ότι ο πυρήνας του συμπλόκου αποτελεί αυτούσιος συστατικό αρχαιότερων οργανισμών, κατά συνέπεια η εξελικτική του πορεία είναι πολύ μεγαλύτερη σε σχέση με τα βοηθητικά, τα οποία εμφανίζονται εξελικτικά πολύ αργότερα.

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η μελέτη αυτή αφορά στην ανάλυση και συσχέτιση δεδομένων που προέκυψαν από αλληλούχιση νέας γενιάς και Sanger για τα πυρηνικά και μιτοχονδριακά γονίδια του συμπλόκου I (Οξειδοαναγωγή του ζεύγους NADH-Q) της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης στο είδος *Lepus europaeus*, με σκοπό να μελετηθούν οι εξελικτικές σχέσεις ανάμεσα στις υπομονάδες του. Συνολικά παρατηρήθηκαν 222 μεταλλάξεις, εκ των οποίων οι 53 μη συνώνυμες, σε 42 πυρηνικά γονίδια (δομικά και συναρμογής) καθώς και 229 μεταλλάξεις, εκ των οποίων 18 μη συνώνυμες, σε 7 μιτοχονδριακά γονίδια.

Ο ρόλος του συμπλόκου I στην οξειδωτική φωσφορυλίωση είναι ιδιαίτερα χαρακτηριστικός, διότι πέρα από την άντληση πρωτονίων, το σύμπλοκο I είναι υπεύθυνο για την πρόσληψη των ηλεκτρονίων του NADH. Αυτός ο ιδιαίτερος ρόλος και η χαρακτηριστική του δομή, έχουν οδηγήσει στην εκτεταμένη μελέτη του ενζύμου, η οποία έχει αποδώσει μια ιδιαίτερα λεπτομερή στερεοδιαμόρφωση του ενζύμου, στην οποία είναι καλά χαρακτηρισμένες οι θέσεις των συστατικών του.

Για τα παραπάνω γονίδια υπολογίστηκαν ο αριθμός μεταλλάξεων ανά νουκλεοτίδιο, καθώς και ο αριθμός μη συνώνυμων μεταλλάξεων ανά νουκλεοτίδιο και λαμβάνοντας υπόψη τη δομή του ενζύμου, την προέλευση των συστατικών του και την λειτουργία τους, ομαδοποιήθηκαν με τρεις διαφορετικούς τρόπους: Α) Δομικά πυρηνικά-συναρμογής-μιτοχονδριακά ,Β) Βραχίονας μήτρας(Ια), βραχίονας μεμβράνης(Ιβ+Ιγ) και Γ) Πυρήνας του συμπλόκου, supernumerary.

Στην ομαδοποίηση Γ παρατηρούμε μία σημαντική αύξηση του μέσου όρου μεταλλάξεων ανά νουκλεοτίδιο στον πυρήνα του συμπλόκου, σε σχέση με τα βοηθητικά. Το γεγονός αυτό θα μπορούσε να εξηγηθεί, αν λάβουμε υπόψη ότι ο

πυρήνας του συμπλόκου αποτελεί αυτούσιος συστατικό αρχαιότερων οργανισμών, κατά συνέπεια η εξελικτική του πορεία είναι πολύ μεγαλύτερη σε σχέση με τα βοηθητικά, τα οποία εμφανίζονται εξελικτικά πολύ αργότερα και φαίνεται να διαφοροποιούνται σε μεγάλο βαθμό ανάμεσα σε διαφορετικά είδη.

Στην ομαδοποίηση Β παρατηρούμε ότι ο μέσος όρος μη συνώνυμων μεταλλάξεων ανά νουκλεοτίδιο, όσον αφορά τα πυρηνικά των υπομονάδων Ιβ, Ιγ, είναι σχεδόν διπλάσιος σε σχέση με του Ια και τείνει να προσεγγίσει την τιμή των μιτοχονδριακών στο Ιβ, Ιγ. Αυτή η διαφορά στο ρυθμό εξέλιξης ανάμεσα σε αυτές τις δύο κατηγορίες πυρηνικών γονιδίων, θα μπορούσε να εξηγηθεί από το φαινόμενο της συνπροσαρμογής, όπου η στενή συνεργασία πυρηνικών-μιτοχονδριακών γονιδίων στο βραχίονα Ιβ και Ιγ προωθεί την αύξηση του ρυθμού εξέλιξης στα συγκεκριμένα πυρηνικά γονίδια, ώστε να προσεγγιστεί αυτός των μιτοχονδριακών.

Η οξειδοαναγωγή του ζεύγους NADH-Q είναι ένζυμο που συμμετέχει στην οξειδωτική φωσφορυλίωση (OXPHOS), η οποία είναι υπεύθυνη για την παραγωγή ενέργειας στους οργανισμούς. Δεδομένης λοιπόν της σημαντικότητας της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης, η φυσική επιλογή στα γονίδια που κωδικοποιούν τα ένζυμα που συμμετέχουν σε αυτή είναι ιδιαίτερα έντονη. Δεδομένου επίσης και του πολύ υψηλού ρυθμού μεταλλάξεων του μιτοχονδριακού γονιδιώματος (σε σχέση με το πυρηνικό γονιδίωμα), γίνεται σαφής η σημασία της ανάλυσης των σχέσεων μεταξύ των μιτοχονδριακών γονιδίων με τα πυρηνικά γονίδια, όσον αφορά στις μεταλλάξεις που υφίστανται και πως αυτές επηρεάζουν τη φυσιολογία και την προσαρμογή του οργανισμού.

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

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

αποκαλύψει τις όποιες επιδράσεις των μεταλλάξεων του μιτοχονδριακού DNA (Smith et al. 2010).

Ένα τέτοιο παράδειγμα αποτελεί και η μελέτη του φαινομένου της «κατάρας της μητέρας» (mother's curse effect). Αναφέρθηκε παραπάνω, ότι μεταλλάξεις που προκαλούν μόνο ελαφρώς επιβλαβείς μεταβολές στην απόδοση της παραγωγής ενέργειας, μπορεί να επιμείνουν. Τέτοιες ήπιες αλλαγές είναι πιθανό να επηρεάσουν τα αρσενικά αναπαραγωγικά κύτταρα σε πολύ μεγαλύτερο βαθμό απ' ό,τι τα σωματικά ή τα θηλυκά αναπαραγωγικά κύτταρα, λόγω της δυσαναλογίας τους σε ενεργειακές απαιτήσεις. Τα σπερματοζώαρια έχουν υψηλό ποσοστό ενεργειακών δαπανών για την κινητικότητα, αλλά κατέχουν ένα κλάσμα μόνο των μιτοχονδρίων που είναι παρόντα στα περισσότερα άλλα κύτταρα). Έτσι, οι μεταλλάξεις του mtDNA που προκαλούν σχετικά μικρές μειώσεις στην ΟΧΡΗΟΣ, μπορούν να μειώσουν σημαντικά τη λειτουργία του σπέρματος και συνεπώς τη γονιμότητα του αρσενικού ατόμου, αλλά δεν έχουν καμία επίδραση στη βιωσιμότητα των ωαρίων, καθώς τα ωάρια έχουν χαμηλές ενεργειακές απαιτήσεις. Εξαιτίας του μητρικού τρόπου κληρονομικότητας του mtDNA, ο μεταλλαγμένος απλότυπος μπορεί και διατηρείται μέσα στον πληθυσμό μέσω της μητρικής γραμμής κληρονομικότητας. Αυτό το σενάριο περιγράφεται ως «η κατάρρα της μητέρας» (Smith et al. 2010).

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

Τέλος δεν πρέπει να αγνοηθεί ότι ο μηχανισμός της συνπροσαρμογής μπορεί να επηρεάσει και έμμεσα την απόδοση της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης, είτε μέσω διαταραχής στην αλληλεπίδραση μεταξύ της πυρηνικά κωδικοποιούμενης μιτοχονδριακής RNA πολυμεράσης και της περιοχής ελέγχου του mtDNA, είτε μέσω των μιτοχονδριακών-πυρηνικών αλληλεπιδράσεων που περιλαμβάνουν τα μιτοχονδριακά-κωδικοποιημένα tRNAs και πυρηνικά-κωδικοποιούμενες μιτοχονδριακές αμινοακυλ-tRNA συνθετάσες (mt-aaRSs). Οι mt-aaRSs μεταφράζονται στο κυτταρόπλασμα και εισάγονται στα μιτοχόνδρια, όπου αναγνωρίζουν και ενεργοποιούν και συνδέουν το συγγενικό τους mt-tRNA με το κατάλληλο αμινοξύ κατά την μιτοχονδριακή πρωτεϊνοσύνθεση. Μεταλλάξεις σε

μιτοχονδριακά γονίδια tRNA μπορούν να επηρεάσουν τη σταθερότητα, την επεξεργασία και την αμινοακυλίωση των tRNAs από mt-aaRSs. Υπάρχουν εκατοντάδες μιτοχονδριακές μεταλλάξεις tRNA που σχετίζονται με ανθρώπινες ασθένειες, καθώς και τουλάχιστον 12 γνωστές μεταλλάξεις των mt-aaRSs. Πολλές ασθένειες που σχετίζονται με μεταλλάξεις σε mt-tRNA έχουν πολύπλοκη και μεταβλητή διεισδυτικότητα ακόμη και όταν είναι ομοπλασμικές (homoplasmic). Ενώ υπάρχουν πολλές πιθανές εξηγήσεις για τη μεταβλητή διεισδυτικότητα των mt-tRNA μεταλλάξεων, μία υπόθεση είναι ότι οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ μιτοχονδριακών μεταλλάξεων και παραλλαγών πυρηνικών γονιδίων τροποποιούν την επίδρασή τους στους φαινοτύπους της νόσου (Colin D. Meiklejohn et al. 2013).

Με βάση τα παραπάνω, αναμένεται μελλοντικά να προσδιοριστούν οι εξελικτικές σχέσεις μιτοχονδριακών-πυρηνικών γονιδίων και για τα υπόλοιπα σύμπλοκα, στα οποία υπάρχει συνεργασία. Επίσης, πέρα από το καθαρά δομικό επίπεδο, θα πρέπει να μελετηθεί το φαινόμενο της συνπροσαρμογής σε επίπεδο μεταγραφικών παραγόντων της μιτοχονδριακής RNA πολυμεράσης και των mt-aaRS. Τέλος ιδιαίτερο ενδιαφέρον θα έχει η πληθυσμιακή ανάλυση για τα δεδομένα που θα προκύψουν στο είδος *Lepus euroraeus*, ώστε να διερευνηθεί το τι συμβαίνει, όσον αφορά τους μηχανισμούς που περιγράφηκαν παραπάνω σε πληθυσμιακό πλέον επίπεδο .

5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Alberts, Bray, Hopkin, Johnson, Lewis, Raff, Roberts, Walter (2006) Βασικές αρχές κυτταρικής βιολογίας
- Berg J.M., Tymoczko J.L., Stryer L. Biochemistry(2001)
- Birtwistle M., Deep mRNA sequencing, Systems Biology Coursera
- Cooper G.M., The Cell, 2nd edition A Molecular Approach. 2000
- Harvard University, Informatics and Scientific Applications, Illumina Sequencing Technology. <http://informatics.fas.harvard.edu/test-tutorial-page/>
- Ansorge WJ., New Biotechnol, Next-generation DNA sequencing techniques. 2009; 25:195–203
- Brandt U., Energy Converting NADH:Quinone Oxidoreductase (Complex I) Annu. Rev. Biochem. 2006. 75:69–92
- Chien-Yueh Lee, Yu-Chiao Chiu, Liang-Bo Wang, Yu-Lun Kuo, Eric Y. Chuang, Liang-Chuan Lai, Mong-Hsun Tsai, Common applications of next-generation sequencing technologies in genomic research. Transl Cancer Res 2013;2:33-45
- Chinnery PF, Thorburn DR, Samuels DC et al. (2000) The inheritance of mitochondrial DNA heteroplasmy: random drift, selection or both? Trends in Genetics, 16:500–505.
- Colin D. Meiklejohn, Marissa A. Holmbeck, Mohammad A. Siddiq, Dawn N. Abt, David M. Rand, Kristi L. Montooth An Incompatibility between a Mitochondrial tRNA and Its Nuclear-Encoded tRNA Synthetase Compromises Development and Fitness in Drosophila. PLOS Genetics January 2013, Volume 9, Issue 1, e 1003238
- Dowling DK, Friberg U, Arnqvist G (2007a) A comparison of nuclear and cytoplasmic genetic effects on sperm competitiveness and female remating in a seed beetle. Journal of Evolutionary Biology, 20, 2113–2125.
- Froman DP, Kirby JD (2005) Sperm mobility: phenotype in roosters (*Gallus domesticus*) determined by mitochondrial function. Biology of Reproduction, 72, 562–567.
- Gemmell NJ, Metcalf VJ, Allendorf FW (2004) Mother's curse: the effect of mtDNA on individual fitness and population viability. Trends in Ecology & Evolution, 19, 238.
- Hall N., 2007. Advanced sequencing technologies and their wider impact in microbiology. J. Exp. Biol., 209: 1518-1525. DOI: 10.1242/jeb.001370
- Holyoake AJ, McHugh P, Wu M et al. (2001) High incidence of single nucleotide substitutions in the mitochondrial genome is associated with poor semen parameters in men. International Journal Of Andrology, 24, 175–182.

- Lazarou M., Thorburn D. R., Ryan M. T., McKenzie M., Assembly of mitochondrial complex I and defects in disease. *Biochimica et Biophysica Acta* 1793 (2009) 78–88
- Mamuris Z., Moutou K.A., Stamatis C., Sarafidou T., Suchentrunk F. (2010). Y DNA and Mitochondrial lineage in European and Asian populations of the brown hare (*Lepus europaeus*). *Mammalian Biology* 75: 233- 242
- Mamuris Z., Sfouggaris A.I., Stamatis C. (2001). Genetic structure of Greek brown hare (*Lepus europaeus*) populations as revealed by mtDNA RFLP- PCR analysis: implications for conserving genetic diversity. *Biological Conservation* 101: 187- 196
- Mamuris Z., Sfouggaris A.I., Stamatis C., Suchentrunk F. (2002). Assessment of genetic structure of Greek brown hare (*Lepus europaeus*) populations based on variations in Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD). *Biochemical Genetics* 40: 323- 338
- Marguerat S., Bañhler J., RNA-seq: from technology to biology. *Cell. Mol. Life Sci.* (2010) 67:569–579
- Ruiz-Pesini E, Mishmar D, Brandon M, Procaccio V, Wallace DC (2004) Effects of purifying and adaptive selection on regional variation in human mtDNA. *Science*, 303, 223–226.
- Smith S., Turbill C. and Suchentrunk F., Introducing mother’s curse: low male fertility associated with an imported mtDNA haplotype in a captive colony of brown hares. *Molecular Ecology* (2010) 19, 36–43
- Stamatis C., Giannouli S., Suchentrunk F., Sert H., Stathopoulos C., Mamuris Z. (2008). Recruitment of mitochondrial tRNA genes as auxiliary molecular markers for linked functional genomic and genetic analyses: The paradigm of brown hare (*Lepus europaeus*). *Gene* 410: 154- 164
- Stamatis C., Suchentrunk F., Moutou K.A., Giacometti M., Haerer G., Djan M., Vapa L., Vucovic M., Tvrtkovic. N., Sert H., Alves P., Mamuris Z. (2009). Phylogeography of the Brown Hare, *Lepus europaeus*, in Europe: legacy of southeastern Mediterranean refugia? *Journal of Biogeography* 36:515- 528
- Stamatis C., Suchentrunk F., Sert H., Triantaphyllidis C., Mamuris Z. (2007). Genetic evidence for survival of released captive-bred brown hares *Lepus europaeus* during restocking operations in Greece. *FFI, Oryx*, 41(4), 548–551
- Suchentrunk F., Mamuris Z., Sfouggaris A.I., Stamatis C. (2003). Biochemical genetic variability in brown hares (*Lepus europaeus*) from Greece. *Biochemical Genetics* 41: 127- 140
- Wang Z., Gerstein M., Snyder M., RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nat Rev Genet* 2009, 10: 57–63.
- Zhao QY., Wang Y., Kong YM., Luo D., Li X., Hao P., Optimizing *de novo* transcriptome assembly from short-read RNA-Seq data: a comparative study. *BMC Bioinformatics* 2011, 12(Suppl 14):S2.

- Μαργαρίτης Λ., Βιολογία Κυττάρου (2008)