Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
Σχολή Επιστημών Υγείας
Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας

Διδακτορική διατριβή

Η συμβολή του μιτοχονδριακού mtDNA στην εξέλιξη: παραδείγματα απο άγρια και οικόσιτα ζώα

Θεμιστοκλής Γιαννούλης
Βιοχημικός Βιοτεχνολόγος

Λάρισα 2018

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/06/2024 15:10:58 EEST - 3.135.219.133

“Η συμβολή του μιτοχονδριακού mtDNA στην εξέλιξη: παραδείγματα από άγρια και οικόσιτα ζώα”

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/06/2024 15:10:58 EEST - 3.135.219.133

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή

Μαμούρης Ζήσης, Καθηγητής Γενετικής Ζωικών Πληθυσμών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Σαραφίδου Θεολογία, Επίκουρος Καθηγήτρια Μοριακής Γενετικής Ζωικών Οργανισμών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Ψαρρά Άννα Μαρία, Επίκουρος Καθηγήτρια Βιοχημείας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Μέλη Εφταμελούς Εξεταστικής Επιτροπής

Μούτου Αικατερίνη, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιολογίας Σπονδυλωτών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Μπάγκος Παντελής, Αναπληρωτής Καθηγητής Βιοπληροφορικής και Βιοστατιστικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Μπιλλίνης Χαράλαμπος, Καθηγητής Ιολογίας και Λοιμωδών Νοσημάτων, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Σκούρας Ζαχαρίας, Καθηγητής Γενετικής, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/06/2024 15:10:58 EEST - 3.135.219.133

Θεμιστοκλής Γιαννούλης

“Η συμβολή του μιτοχονδριακού mtDNA στην εξέλιξη: παραδείγματα από άγρια και οικόσιτα ζώα”

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/06/2024 15:10:58 EEST - 3.135.219.133

Θεμιστοκλής Γιαννούλης

2018

“Η συμβολή του μιτοχονδριακού mtDNA στην εξέλιξη: παραδείγματα από άγρια και οικόσιτα ζώα”

“Διδακτορική Διατριβή, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας”

Αριθμός προκαταρκτικών σελίδων: 10

Συνολικός Αριθμός Σελίδων: 262

Αριθμός Πινάκων: 1

Αριθμός Εικόνων: 13

Αριθμός Παραρτημάτων: 0

Αριθμός Βιβλιογραφικών Παραπομπών: 708

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/06/2024 15:10:58 EEST - 3.135.219.133

Περίληψη

Το μιτοχόνδριο είναι ένα ημιαυτόνομο οργανίδιο του οποίου η κύρια λειτουργία είναι η παραγωγή ATP μέσω της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης (OXPHOS), χρησιμοποιώντας την ηλεκτροχημική βαθμίδωση των πρωτονίων στις δυο πλευρές της μεμβράνης. Η οξειδωτική φωσφορυλίωση πραγματοποιείται από πέντε ενζυμικά σύμπλοκα: οξειδοαναγωγαση του NADH, aναγωγάση του ηλεκτρικού, οξειδοαναγωγάση του κυτοχρώματος c, οξειδάση του κυτοχρώματος c και ATP συνθάση. Όλα τα ενζυμικά σύμπλοκα αποτελούνται από υπομονάδες που κωδικοποιούνται τόσο από το μιτοχονδριακό όσο και από το πυρηνικό DNA, εκτός από το σύμπλοκο II το οποίο αποτελείται εξ ολοκλήρου από πρωτεΐνες που κωδικοποιούνται από πυρηνικά γονίδια. Η καλή συνεργασία των πρωτεϊνών που προέρχονται από τα δυο αυτά διαφορετικά γονιδιώματα είναι ζωτικής σημασίας για την παραγωγή ενέργειας και την επιβίωση του κυττάρου. Η συνεργασια, λοιπόν, των δύο ξεχωριστών γονιδιωμάτων φαίνεται να είναι ζωτικής σημασίας για το κύτταρο. Το μιτοχονδριακό DNA κατέχει μερικά μοναδικά χαρακτηριστικά τα οποία το κάνουν να διαφέρει από το πυρηνικό γονιδίωμα. Παρουσιάζει αποκλειστικά μητρική κληρονόμηση, απουσιάζουν οι επιδιορθωτικοί μηχανισμοί όπως και ο ομόλογος ανασυνδυασμός, αντιγράφεται αυτόνομα και είναι εκτεθιμένο σε ένα ιδιαίτερα μεταλλαξιγόνο περιβάλλον, το οποίο περιέχει ελεύθερες ρίζες οξυγόνου (ROS). Όλα αυτά τα χαρακτηριστικά συμβάλλουν στο να εμφανίζει ταχύτερη εξέλιξη σε σχέση με το πυρηνικό γονιδίωμα, από 10 έως χιλιάδες φορές σε μερικούς οργανισμούς.Η εμφάνιση, λοιπόν, ολοένα και αυξανόμενων μεταλλάξεων στο mtDNA αυξάνουν και την εμφάνιση μη συνώνυμων μεταλλάξεων στις πρωτεΐνες που κωδικοποιεί, οι οποίες ενδέχεται να επηρεάζουν την τρισδιάστατη διαμόρφωση τους αλλά και την συνεργασία τους με τις υπόλοιπες πρωτεΐνες των συμπλόκων, ιδιαίτερα αν συμβαίνουν στα σημεία αλληλεπίδρασης μεταξύ των πρωτεϊνών. Για την αντιμετώπιση τέτοιων φαινομένων «ασυμβατότητας» στην αλληλεπίδραση των πρωτεϊνών έχει προταθεί το μοντέλο της συμπροσαρμογής. Σύμφωνα με αυτό το μοντέλο, οι πρωτεΐνες που συνεργάζονται και κωδικοποιούνται από τα δυο αυτά διαφορετικά γονιδιώματα φαίνεται να έχουν παρόμοιους εξελικτικούς ρυθμούς.

Μέχρι τα τέλη της προηγούμενης δεκαετίας, το μιτοχονδριακό DNA θεωρούνταν επιλεκτικά ουδέτερο, δηλαδή ότι η φυσική επιλογή δε δρα στους πολυμορφισμούς του mtDNA και επομένως δεν επηρεάζεται η αρμοστικότητα (fitness) του οργανισμού από τις μεταλλάξεις αυτές. Το μιτοχονδριακό DNA δε θεωρείται πλέον επιλεκτικά ουδέτερο, και θεωρείται ότι η επιλογή δρα στις μεταλλάξεις που επηρεάζουν την βιωσιμότητα του οργανισμού. Λόγω της μητρικής κληρονόμησης του, έχει παρατηρηθεί ότι η επιλογή δρα στα θηλυκά άτομα παρά στα αρσενικά, τα οποία δε μεταβιβάζουν το μιτοχονδριακό τους γονιδίωμα στους απογόνους. Έτσι, επιβλαβείς μεταλλάξεις που εμφανίζονται στα αρσενικά άτομα δεν επιλέγονται αρνητικά και επηρεάζουν τόσο τη βιωσιμότητα των αρσενικών ατόμων, όσο και τη γονιμότητα τους, ενώ μεταλλάξεις που επηρεάζουν την παραγωγή ATP στα μιτοχόνδρια φαίνεται να έχουν μεγαλύτερο αντίκτυπο στα σπερματοζωάρια που έχουν σαφώς μεγαλύτερες ενεργειακές ανάγκες από το ωάριο. Η κληρονόμηση και διατήρηση τέτοιων επιβλαβών μεταλλάξεων στα αρσενικά άτομα αναφέρεται στη βιβλιογραφία και ως « το φαινόμενο της κατάρας της μητέρας» (mother’s curse effect). Μέσω της διαδικασίας της φυσικής επιλογής και της γενετικής παρέκλισης, οι αλλοπάτριοι πληθυσμοί φαίνεται να

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/06/2024 15:10:58 EEST - 3.135.219.133

αποκλίνουν γενετικά και να φτάνουν μέχρι την αναπαραγωγική ασυμβατότητα. Λόγω της ταχύτερης εξέλιξης του μιτοχονδριακού γονιδιώματος σε σχέση με το πυρηνικό, ο διαπληθυσμιακός υβριδισμός φαίνεται να αποτυγχάνει λόγω της μιτοχονδριακής δυσλειτουργίας των υβριδίων. Το μοντέλο που έχει προταθεί για να περιγράψει αυτή την μειωμένη βιωσιμότητα των υβριδίων είναι γνωστό και ως το μοντέλο της ασυμβατότητας των Dobzhansky και Muller και περιλαμβάνει πολλαπλούς γενετικούς τόπους. Μέχρι σήμερα, υπάρχουν αρκετές μελέτες που εντοπίζουν στο μιτοχονδριακό γονιδίωμα την ασυμβατότητα μεταξύ απομακρυσμένων πληθυσμών που έχει ως αποτέλεσμα την χαμηλή βιωσιμότητα των υβριδίων.

Στην παρούσα διατριβή, μελετήθηκαν οι επιλεκτικές πιέσεις που ασκούνται στο επίπεδο του μιτοχονδριακού DNA στο είδος του Ευρωπαϊκού λαγού (*Lepus europaeus)* καθώς και σε συγγενικά είδη λαγομόρφων καθώς και τα πρότυπα διαφοροποίησης των μιτοχονδριακών γονιδιωμάτων ανάμεσα στις δυο γενεαλογίες του είδους, της Ευρωπαϊκής και της Ανατολικής. Στη συνέχεια, με τη χρήση δεδομένων από ανάλυση μεταγραφώματος, προσδιορίστηκε η επίδραση της συμπροσαρμογής στη γενετική διαφοροποίηση και των δυο γονιδιωμάτων, του μιτοχονδριακού και του πυρηνικού και ιδιαίτερα στα γονίδια που κωδικοποιούν για τις τρεις βασικές διεργασίες παραγωγής ενέργειας του κυττάρου, την γλυκόλυση, τον κύκλο του Krebs και την οξειδωτική φωσφορυλίωση. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν, τόσο σε διαπληθυσμιακό όσο και σε διαειδικό επίπεδο, συμφωνούν με τα πρότυπα συμπροσαρμογής των αλληλεπιδρόντων γονιδίων που χαρτογραφούνται σε διαφορετικά γονιδιώματα, καθώς τα γονίδια του πυρήνα που κωδικοποιούν για τα σύμπλοκα της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης φαίνεται να εμφανίζουν ιδιαίτερα αυξημένους εξελικτικούς ρυθμούς, οι οποίοι προσεγγίζουν τους αντίστοιχους ρυθμούς των μιτοχονδριακών γονιδίων. Τέλος, χρησιμοποιήθηκαν πυρηνικοί και μιτοχονδριακοί δείκτες για την εκτίμηση της πληθυσμιακής δομής του πληθυσμού της υβριδιακής ζώνης του είδους του Ευρωπαικού λαγού που εντοπίζεται στη Βόρειοανατολική Ελλάδα και τη Βουλγαρία και να προσδιοριστούν οι παράγοντες που επηρεάζουν τα πρότυπα γονιδιακής ροής που εμφανίζονται ανάμεσα στις δύο γενεαλογίες.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/06/2024 15:10:58 EEST - 3.135.219.133

Ευχαριστίες

Το να γράψεις το επιστημονικό κομμάτι ενός διδακτορικού τελικά δεν είναι το πιο δύσκολο κομμάτι. Τα πειράματα τα γνωρίζεις γιατί τα έχεις κάνει, τα αποτελέσματα γιατί όλο και κάπου τα έχεις παρουσιάσει, τη βιβλιογραφία ίσως(?) κάποια στιγμή και να τη διάβασες. Πόσο εύκολο, όμως, είναι να αποτυπώσεις της ανθρώπινες σχέσεις που κρατάνε χρόνια σε μια σελίδα χαρτί?

Για πάμε (λίγο)…

Ήταν Οκτώβριος του 2006 όταν κόντρα στα προγνωστικά επέλεξα το Εργαστήριο Γενετικής για να κάνω την προπτυχιακή μου διατριβή και τώρα, μερικά μόλις χρόνια μετά προσπαθώ να προσθέσω το τρίτο, και τελευταίο, πτυχίο στη συλλογή. Ένα μεγάλο ευχαριστώ στον, Πρύτανη πλέον, Ζήση Μαμούρη, για την υπομονή του, τις συμβουλές του, την καθοδήγηση και την στήριξή του όλα αυτά τα χρόνια. Για όλα όσα ζήσαμε και διαμόρφωσαν το χαρακτήρα μας και το χαρακτήρα του Εργαστηρίου ΜΑΣ. Για όλες τις φορές που είχαμε μια διαφωνία, η οποία πάντα κατέληγε στο να με κάνει καλύτερο, ώστε να μπορώ να ορθώνω το ανάστημα μου, επιστημονικά και όχι. Και για τις μερικές φορές που τα είπαμε εν μέσω τσίπουρων και μουσικοχορευτικών θεαμάτων…

Μαζί με τον Καθηγητή, θα ήθελα να ευχαριστήσω και τους επιστημονικούς του «γονείς», τους Bernard και Anne-Marie Dutrillaux, οι οποίοι έβαλαν το λιθαράκι τους στην επιστημονική μου πορεία.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω: την Επίκουρο Καθηγήτρια, Άννα-Μαρία Ψαρρά, για τη βοήθεια της σε όλη τη διάρκεια του διδακτορικού μου και για τις πολύτιμες συμβουλές που πάντα είχε για μένα. Τον Καθηγητή Χαράλαμπο Μπιλλίνη, για τη συμμετοχή του στην εφταμελή μου επιτροπή καθώς και για τις συνεργασίες που είχαμε όλα αυτά τα χρόνια. Τον Καθηγητή Ζαχαρία Σκούρα, για τη συμμετοχή του στην εφταμελή επιτροπή και για τα χρήσιμα σχόλια και υποδείξεις που θα βελτιώσουν το κείμενο που ακολουθεί. Τον Αναπληρωτή Καθηγητή Παντελή Μπάγκο, που επίσης συμμετέχει στην εφταμελή επιτροπή και κατέχει μια θέση σε ένα αντικείμενο το οποίο με συναρπάζει ιδιαίτερα αλλά είμαι ακόμα στα πρώτα μου βήματα, αυτό της Βιοπληροφορικής. Ευελπιστώ η γνωριμία μας και η συναναστροφή αυτή να μου δώσει την δυνατότητα να γνωρίσω νέα πράγματα ιδιαίτερα χρήσιμα.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες για την Επίκουρο Καθηγήτρια, Θεολογία Σαραφίδου. Η συμμετοχή της στην Τριμελή Επιτροπή είναι το λιγότερο που έχει κάνει για μένα. Η καθημερινή μας επαφή και συνεργασία με βοήθησαν να ξεπεράσω όλα τα εμπόδια, επιστημονικά και μη. Η δυναμική της παρουσία αποτελεί πρότυπο για μένα και ελπίζω να συνεχίσουμε να εκπαιδεύουμε μαζί τις επόμενες γενιές επιστημόνων για αρκετά χρόνια ακόμα.

Τελευταία, but not least, η Αναπληρώτρια Καθηγήτρια και Lab Director πλέον, Κατερίνα Μούτου. Οι συμβουλές της και η στήριξή της όλα αυτά τα χρόνια δεν αποτυπώνεται με λέξεις. Πάντα είχε τον τρόπο να μου δίνει κίνητρο να γνωρίσω τη νέα γνώση και νέες εμπειρίες, ακόμα και αν αυτές αφορούσαν τις δειγματοληψίες σε μέρη κανονικά που δε θα ήθελα να επισκεφτώ, όπως οι Ιχθυοκαλλιέργειες, τις οποίες λατρεύει. Είχε και έχει αυτή την

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/06/2024 15:10:58 EEST - 3.135.219.133

ικανότητα να με κάνει να υπερβαίνω τον εαυτό μου και να μου αποδεικνύει ότι μπορώ να πάω και παραπέρα.

Και τώρα, οι άνθρωποι που ζήσαμε και ζούμε μαζί όλο αυτό το ωραίο ταξίδι:
Ο Κώστας Σταμάτης. Θα μπορούσα να μη γράψω λέξη παραπάνω και οποίος ξέρει και το διαβάσει να καταλάβει τα πάντα. Ο πρώτος φίλος που έκανα στο Εργαστήριο και είχε μια λύση για κάθε πρόβλημα. Θα μπορούσε να κάνει αυτός της εισαγωγή της παρουσίασής μου και να συνεχίσω, γιατί τα διδακτορικά μας είναι αδερφάκια, και περίπου συνομήλικα. Ελπίζω μια μέρα να κατέχω μια παρόμοια θέση με τον Κώστα στην αντίληψη και τις καρδιές όλων.
Ο Παναγιώτης Μαραγκοζίδης. Ήρθαμε μαζί 18 χρονών, άγνωστοι μεταξύ αγνώστων, από την ίδια πόλη και χτίσαμε μια δυνατή φιλία. Ο πρώτος μου φίλος με διδακτορικό, χάραξε το δρόμο. Απλά τον χάραξε μακρινό και φτάνει τώρα στη Στοκχόλμη. Ας είναι…
Η Ντίνα Σαρρή, εξαιρετική φίλη και συνάδελφος. Πάντα είχε την έννοια να κρατάει τα λουριά μου και την ευχαριστώ ιδιαίτερα που ποτέ δε τα κατάφερε. Για όλα τα ωραία που ζήσαμε όλα αυτά τα χρόνια, πριν φύγει για να φτιάξει το δικό της σπιτικό και ευελπιστώ και μερικούς τζούνιορ σύντομα.
Ο Ανδρέας Τσιπουρλιάνος, ο διπλανός μου στο επιστημονικό θρανίο. Φίλος, που ερχόταν στη σχολή μόνο για τις συνελεύσεις, και τώρα φεύγει μόνο για άλλες συνελεύσεις. Για τις ωραίες μέρες που περνάμε κάθε μέρα και γιατί με δίδαξε την ψυχραιμία και την αντιμετώπιση των προβλημάτων με ηρεμία. Τον ευχαριστώ ιδιαίτερα και τον καλοπιάνω για να εξαφανίσει τα καθημερινά ντοκουμέντα που συνέλεξε όλα αυτά τα χρόνια.
Η Μαρία Μαρκαντώνη, που κουβαλάει και αυτή λίγη από την τρέλα μας. Την ευχαριστώ για την υποστήριξη της και την δύναμη που μου δίνει και για την αυτοπεποίθηση που με γεμίζει. Ίσως πιστεύει σε μένα περισσότερο από όσο πιστεύω εγώ στον εαυτό μου.
Η Ελένη Γαλλιοπούλου, παρότι δεν είναι παιδί του τμήματος, την ευχαριστώ για τη συμπαράστασή της και για την εξαιρετική συνεργασία που είχαμε όλα αυτά τα χρόνια. Αν και με τη Ντίνα ακόμα απορούμε που τη βρήκε τόση χαρά όταν είδε εκείνη τη ζώνη στο τζελ με τις πρωτεΐνες…
Ο Ραφαήλ Αγγελακόπουλος, το σουγγάρι μας. Ήρθε για λίγο (νόμιζε), αλλά θα μείνει. Τον ευχαριστώ για τη βοήθεια του σε καθημερινά θέματα (όπως π.χ. Ραφαήλ, τι χρώμα είναι αυτό?) και για τα Ιταλικά που θα μου μάθει κάποια στιγμή. Ελπίζω να συνεχίσει να έχει αυτή τη διάθεση για χρόνια ακόμα.
Η Λαμπρινή Τζιόγκα. Ήρθε, έφυγε, ξαναήρθε. Την ευχαριστώ γιατί είναι εκεί σε ότι χρειαστώ, να μου μαθαίνει την απλότητα. Θα την ευχαριστούσα από κοντά αλλά σπάνια προλαβαίνω να μιλήσω.
Θα μπορούσα να γράφω σελίδες επί σελίδων για όλα τα παιδιά που συνεργαστήκαμε. Θα τους αναφέρω ονομαστικά και θα τους ευχαριστήσω όμως κατ' ιδίαν. Ο Βύρωνας (θητεύσαμε και μαζί), Πλαγεράς, ο Σπυράκος, η Πελαγία, η Άντα, ο Αντώνης, ο Στέλιος, η Αγγελικούλα που θα έρθει να με δει και την αγαπώ, αλλά δεν είναι αυτός ο λόγος, η Λίλα, ο Δημήτρης, η

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/06/2024 15:10:58 EEST - 3.135.219.133

Ελενίτσα, η Εύα, οι Χριστίνες, η Μαρία με την Ισιδώρα (και εδώ μαζί), η Εύη, ο Τάσος, ο Φαράζ, η Στέλλα, η Λία. Από όλους κάτι πήρα και σε όλους ελπίζω κάτι να έδωσα. Εμπνευστήκαμε μαζί με την επιστήμη και όλοι τους βρήκαν ή βρίσκουν το δρόμο τους και συνεχίζουν την επιστημονική τους πορεία.

Σε αυτό το σημείο, θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαιτέρως τους γονείς μου. Η στήριξή τους πάντα απλόχερη και συνεχής και ας μην ήμουν πάντα το πιο ήσυχο παιδί. Πάντα ήταν περήφανοι για μένα και καμάρωναν και θα συνεχίσω να τους δίνω λόγους να το κάνουν για καιρό. Και ας επιμένει η μητέρα μου να μάθει ΑΚΡΙΒΩΣ με τι ασχολούμαι («Να λες Βιολόγος μάνα», της λέω, «δε ξέρει ο κόσμος από συνεξέλιξη γονιδιωμάτων». Και κάπου εκεί ευτυχώς σταματάει η κουβέντα). Η βοήθεια τους ανεκτίμητη και χωρίς αυτούς δε θα είχα καταφέρει τίποτα από όλα αυτά.

Ευχαριστώ και την αδερφή μου, Σταματίνα. Τα χνάρια της ακολούθησα και ήρθα στο τμήμα και τα χνάρια της δεν ακολούθησα (τα προγνωστικά που πήγαμε κόντρα) και δεν έγινα βιοχημικός, ευτυχώς. Για τη βοήθειά της όλα αυτά τα χρόνια, σε όλα τα επίπεδα. Και πιο πολύ την ευχαριστώ για ένα άλλο λόγο που ακούει στο όνομα Βαλέρια, κι ας έχει δυο γιαγιάδες Μαρίες, και έρχεται κάθε φορά και με γεμίζει χαρά και δύναμη. Την αγαπώ και ελπίζω να γίνει η καλύτερη επιστήμονας της οικογένειας.

Τελευταίοι, αλλά πολύ σημαντικοί οι παιδικοί μου φίλοι. Πάντα μου δίνουν δύναμη και πιστεύουν σε μένα αλλά νομίζω το κάνουν για να λένε ότι έχουν φίλο ένα επιστήμονα. Θα δείξει εάν αλλάξω κάποια στιγμή πορεία τι θα πιστεύουν για μένα. Τους ευχαριστώ, γιατί όπου και να βρίσκονται, πάντα καταφέρνουν και εμφανίζονται τις σημ αντικές στιγμές και τις περνάμε μαζί, χαρές κυρίως αλλά και δύσκολες στιγμές (όπως ο στρατός).

Όπως είπα και στην αρχή, δύσκολα αποτυπώνεις όλα αυτά σε μια σελίδα χαρτί, οπότε τώρα που έφτασα τις τρεις μπορώ να σταματήσω.

Σας ευχαριστώ όλους και ελπίζω να συνεχίσετε να μου δίνετε δύναμη να συνεχίζω και να μη τα παρατάω ποτέ και υπόσχομαι να κάνω τις μέρες σας ωραίες και λίγο περίεργες.

ΥΓ. Ένα ευχαριστώ μικρό (σε έκταση) και στους ανθρώπους που δεν είναι συνεργάτες και δε περιορίζονται στην επιστημονική μας ιδιότητα και μας κάνουν, θέλοντας και μη, να σκεφτόμαστε και να εκφραζόμαστε ποιητικά.

Θέμης.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/06/2024 15:10:58 EEST - 3.135.219.133

Περιεχόμενα

Εισαγωγή ***4***

Μιτοχόνδριο – Η ενδοσυμβωτική υπόθεση της προέλευσης **5**

Ενδοσυμβίωση και ξενιστές – Η προέλευση του ευκαρυωτικού κυττάρου **6**

Εξελικτικοί Μηχανισμοί – Προέλευση Ευκαρυωτικού Κυττάρου **10**

Τα στάδια της Ευκαρυογένεσης **13**

- Μία παροδική γενεαλογία αρχαίων 14
- Απώλεια κυτταρικού τοιχώματος 14
- Φαγοκύττωση και οριζόντια μεταφορά γονιδίων 14
- Εξέλιξη πρωτόγονου πυρήνα για την προστασία της γονιδιωματικής σταθερότητας 15
- Ενεργειακά επαγόμενη γενωμική επέκταση και νεωτερισμοί 15

Ενδοσυμβίωση και προέλευση ευκαρυωτικού κυττάρου – Ο ενδοσυμβιώτης **16**

Η εξέλιξη του γονιδιακού περιεχομένου του mtDNA στους ευκαρυώτες **22**

Τα γονίδια των ριβοσωμικών RNAs 22
Τα γονίδια των μεταφορικών RNAs 23
Γονίδια που κωδικοποιούν για πρωτεΐνες (Protein Coding Genes, PCG) 24

Το μιτοχονδριακό γονιδίωμα των μετάζωων **26**

Αντιγραφή του mtDNA **28**

Μεταγραφή του mtDNA **30**

Μετάφραση του mtDNA **31**

Ο μιτοχονδριακός γενετικός κώδικας **36**

Τα σύγχρονα μιτοχόνδρια **37**

Οι μιτοχονδριακές λειτουργίες **38**

1. Η μιτοχονδριακή σηματοδότηση ασβεστίου 39
2. Μιτοχόνδρια και απόπτωση 40
3. Η μιτοχονδριακή βιοενεργητική 42

Συναρμογή των συμπλόκων της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης **46**

Σύμπλοκο I 46
Σύμπλοκο II 47
Σύμπλοκο III 48
Σύμπλοκο IV 48
Σύμπλοκο V 49

Οξειδωτική φωσφορυλίωση και παραγωγή δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS) **50**

Οξειδωτική φωσφορυλίωση: παραγωγή ενέργειας και θερμότητας **51**

Οργάνωση των συμπλόκων του OXPHOS – Τα υπερσύμπλοκα (Super-Complexes, SC) **51**

Μιτοχονδριακές λειτουργίες: Η ανάγκη για γονιδιωματική συνεργασία **53**

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/06/2024 15:10:58 EEST - 3.135.219.133

Γονιδιωματική συνεργασία – Η έννοια της συνεξέλιξης 55

Χρωμοσωμικός εντοπισμός των N-mt γονιδίων και συμμεταβίβαση..... 58

Χρωμοσωμικός εντοπισμός των N-mt γονιδίων και εξέλιξη 59

Συμμεταβίβαση γονιδίων και «γονιδιωματική σύγκρουση»: Το φαινόμενο της κατάρας της μητέρας 59

Συνεξέλιξη γονιδίων: Επιλογή συντρόφου και η επικράτηση της φυλετικής αναπαραγωγής..... 62

Μιτοπυρηνική συνεξέλιξη και προσαρμογή..... 66

Προσαρμογή και ειδογένεση: Η συμβολή της γενετικής διαφοροποίησης του mtDNA 67

Προσαρμογή και ειδογένεση: Η ενδοειδική διαφοροποίηση 69

Προσαρμογή και ειδογένεση: Η διαειδική διαφοροποίηση 72

Γενετική διαφοροποίηση: τοποθετώντας το mtDNA «στον πάγο»..... 76

Υβριδιακές ζώνες και ειδογένεση 77

Μιτοπυρηνική συνεξέλιξη: Το παράδειγμα του Ευρωπαϊκού λαγού (*Lepus europaeus*)78

Σκοπός..... 80

Αποτελέσματα 81

Κεφάλαιο 1: Το μιτοχονδριακό DNA: γενετική διαφοροποίηση και επιλογή 83

Κεφάλαιο 2: Η μιτοπυρηνική..... 101

συμπροσαρμογή των δύο 101

γενεαλογιών του Ευρωπαϊκού λαγού..... 101

Κεφάλαιο 3: Η μιτοπυρηνική συμπροσαρμογή σε διαειδικό επίπεδο 111

Κεφάλαιο 4: Υβριδιακές ζώνες και νησιωτικοί πληθυσμοί: Τα φυσικά εργαστήρια για τη μελέτη της εξέλιξης..... 117

Συζήτηση 165

Η βιοενεργητική συνεισφορά των προκαρυωτών στην ευκαρυωτική εξέλιξη 166

Τοπική προσαρμογή και εξέλιξη του μιτοχονδριακού DNA 168

Η «διαμερισματοποίηση» της γενετικής διαφοροποίησης – Η συμβολή του λειτουργικού περιορισμού 171

Εξέλιξη του μιτοχονδριακού DNA – Η επίδραση της βιοενεργητικής στην αναπαραγωγή των ειδών 173

Η συμβολή της συνεξέλιξης στην προσαρμογή 178

Συνεξέλιξη γονιδίων και βιοενεργητική: Πετώντας ψηλά ή ζώντας ζεν 183

Βιοενεργητική και ειδογένεση: Η συμβολή των υβριδίων στους αναπαραγωγικούς φραγμούς..... 186

Συμπεράσματα 190

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/06/2024 15:10:58 EEST - 3.135.219.133

Βιβλιογραφία 198

Κατάλογος εικόνων

Εικόνα 1: Οι σχέσεις ανάμεσα στους ευκαρυώτες και στα αρχαία, όπως προκύπτουν απο τα δύο σενάρια προέλευσης των ευκαρυωτών (από Gribaldo et al, 2010). 8
Εικόνα 2: Ένα τυπικό μόριο mtDNA του είδους Homo sapiens. (εικόνα απο Bellance et al, 2009) 28
Εικόνα 3: Ο κύκλος του Krebs ή κύκλος του κιτρικού οξέος 43
Εικόνα 4: Η οξειδωτική φωσφορυλίωση (OXPHOS) (απο Letts et al 2017) 46
Εικόνα 5:Τα υπερσύμπλοκα της μιτοχονδριακής ETC. (απο Letts et al 2017) 52
Εικόνα 6: Η λειτουργική συνεισφορά γονιδίων του πυρήνα στις μιτοχονδριακές λειτουργίες. Με γαλάζιο συμβολίζονται τα πυρηνικά γονίδια και τα προϊόντα τους που συμμετέχουν στην μιτοχονδριακή λειτουργία. Με πράσινο συμβολίζονται τα προϊόντα των μιτοχονδριακών γονιδίων που συμβάλλουν στην μιτοχονδριακή λειτουργία (από Hill,2017) 55
Εικόνα 7: Η επίδραση του φαινομένου της κατάρας της μητέρας στα αρσενικά άτομα. (απο Gemmell et al, 2004) 61
Εικόνα 8: Οι φυλογενετικές σχέσεις των ειδών που χρησιμοποιήθηκαν στις υβριδικές κυτταρικές σειρές. 73
Εικόνα 9:Η κατανομή του είδους Lepus europaeus. Με κόκκινο χρώμα εμφανίζονται οι περιοχές στις οποίες το είδος είναι γηγενές, ενω με ρόζ οι περιοχές στις οποίες εισήχθη κατά το παρελθόν. 78
Εικόνα 10: Οι φυλογενετικές σχέσεις των ειδών της ανάλυσης 112
Εικόνα 11: Η δομή του συμπλόκου IV στα μιτοχόνδρια των θηλαστικών. Οι τρείς καταλυτικές υπομονάδες κωδικοποιούνται απο το μιτοχονδριακό γονιδίωμα και εμφανίζονται με πράσινο (υπομονάδα I), μωβ (υπομονάδα II) και μπλε (υπομονάδα III). Οι δέκα υπομονάδες που κωδικοποιούνται απο τον πυρήνα εμφανίζονται με γκρι χρώμα (απο Rich, 2017). 172
Εικόνα 12: Η κατανομή των μεταβολικών διεργασιών στο σπερματοζωάριο 175
Εικόνα 13: Η κατανομή των αλληλομόρφων του εξονίου 2 του γονιδίου DQA. (από Koutsogiannouli et al, 2009) 181

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/06/2024 15:10:58 EEST - 3.135.219.133

Εισαγωγή

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/06/2024 15:10:58 EEST - 3.135.219.133

Μιτοχόνδριο – Η ενδοσυμβωτική υπόθεση της προέλευσης

Ήταν το 1967 όταν η Δρ. Lynn Margullis δημοσίευσε την εργασία της με τίτλο "On the origins of the Mitosing Cells" στο Journal of Theoretical Biology (Sagan, 1967), η οποία θεωρείται ως η αφετηρία της σύγχρονης θεώρησης της ενδοσυμβιωτικής θεωρίας της προέλευσης των οργανιδίων. Η πρόταση της Margullis βέβαια δεν ήταν αποδεκτή αρχικά και είναι χαρακτηριστικό ότι απορρίφθηκε από δέκα περιοδικά πριν τελικά δημοσιευτεί (Archibald, 2014). Η θεώρηση αυτή, ωστόσο, δεν ήταν καινούργια· είχε αναφερθεί για πρώτη φορά ως προσέγγιση από τον Ρώσο βιολόγο Constantin Mereschkowsky (1905), ο οποίος στη δημοσίευσή του είχε αναφέρει πως «ορισμένα κύτταρα προκύπτουν από την ένωση δύο διαφορετικών ειδών κυττάρων (ενδοσυμβίωση)». Η άποψη του κατέληγε στα εξής σημεία:

1. Τα πλαστίδια ήταν αδιαμφισβήτητα απομεινάρια κυανοβακτηρίων που είχαν εισαχθεί παλαιότερα στην εξελικτική πορεία μέσα σε ετερότροφους ξενιστές.

2. Οι ξενιστές που εγκόλπωσαν τα πλαστίδια ήταν προϊόντα συμβίωσης μεταξύ ετερότροφων, αμοιβαδοειδών κυττάρων και μικρότερων μικροκοκκικών κυττάρων που οδήγησαν στη δημιουργία του πυρήνα.

Η προώθηση της ιδέας της συμβίωσης και του ρόλου της στην εξέλιξη του ευκαρυωτικού κυττάρου (Margullis, 1970) άνοιξε μία μεγάλη συζήτηση στις δεκαετίες του 1970 και 1980 μεταξύ των υποστηρικτών της ενδογενούς και εξωγενούς προέλευσης των μιτοχονδρίων. Παρότι αρκετοί επιστήμονες απέρριπταν την ενδοσυμβιωτική θεωρία τόσο για τα μιτοχόνδρια όσο και για τους χλωροπλάστες (Uzzel & Spolsky, 1974), η διένεξη κατά αυτή την περίοδο είχε κυρίως επικεντρωθεί γύρω από την προέλευση των μιτοχονδρίων (Raff & Mahler, 1972). Το κύριο σημείο της διαφωνίας το οποίο επισημάνθηκε από τα πρώτα στάδια της θεώρησης αυτής από τον Mahler (1981) ήταν το μιτοχονδριακό γενετικό σύστημα, το οποίο είναι μοναδικό και διαφοροποιημένο τόσο από το ευκαρυωτικό όσο και από το προκαρυωτικό γενετικό σύστημα. Μεταγενέστερες μελέτες, τόσο βιοχημικές όσο και μοριακές, σε συνδυασμό με το χαρακτηρισμό ενός μιτοχονδριακού γονιδιώματος με πλούσιο γονιδιακό περιεχόμενο που προσομοίαζε αρκετά ένα «συμπυκνωμένο»

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/06/2024 15:10:58 EEST - 3.135.219.133

βακτηριακό γονιδίωμα (Burger et al, 2013), οδήγησαν τους ερευνητές να καταλήξουν στην ενδοσυμβιωτική προέλευση του μιτοχονδρίου μέσω της ενσωμάτωσης στα αρχέγονα ευκαρυωτικά κύτταρα ενός α-πρωτεοβακτηρίου (Gray et al 1992, Gray, 2012). Η ενσωμάτωση αυτή σύμφωνα με μελέτες σε απολιθώματα με τη χρήση μοριακών ρολογιών φαίνεται να έγινε περίπου 1600 με 2000 εκατομμύρια έτη πριν (Prasad, 2005, Butterfield, 2014).

Ενδοσυμβίωση και ξενιστές – Η προέλευση του ευκαρυωτικού κυττάρου

Παρά το γεγονός ότι πλέον είναι γενικά αποδεκτή η βακτηριακή προέλευση των οργανιδίων, δεν έχουν αποσαφηνιστεί πλήρως οι λεπτομέρειες που αφορούν το χρόνο που συνέβη η ενδοσυμβίωση καθώς και τον τύπο του ξενιστή ο οποίος ενσωμάτωσε τον βακτηριακό ενδοσυμβιώτη, όπως και ποια γεγονότα οδήγησαν στην ενδοσυμβίωση και την εγκαθίδρυσή της ως της κυρίαρχης ευκαρυωτικής μορφής. Ιδιαίτερα για την περίπτωση των μιτοχονδρίων, δεν έχει αποσαφηνιστεί η διάρκεια κατά την οποία έλαβε χώρα η μετατροπή του βακτηρίου σε οργανίδιο καθώς και ποιοι εξελικτικοί μηχανισμοί οδήγησαν στη μετάβαση από βακτήρια ελεύθερης διαβίωσης (free living bacteria) σε υποχρεωτικά κυτταρικά οργανίδια.

Όσον αφορά τον ξενιστή, αυτός, βάσει της βιβλιογραφίας ορίζεται συνήθως ως ένα αρχέγονο ευκαρυωτικό κύτταρο που ενσωμάτωσε τον προκαρυωτικό οργανισμό μέσω ενδοσυμβίωσης. Άλλες θεωρίες εμφανίζουν τον ξενιστή να είναι ένα δεύτερο προκαρυωτικό κύτταρο που ενσωμάτωσε τον ενδοσυμβιωτικό οργανισμό μέσω φαγοκυττάρωσης, παρότι η φαγοτροφία δεν έχει παρατηρηθεί μέχρι σήμερα σε προκαρυώτες ελεύθερης διαβίωσης. Οι διαφορές των ευκαρυωτών και προκαρυωτών σε κυτταρικό επίπεδο είναι σημαντικές, καθώς τα πρώτα εμφανίζουν διαμερισματοποίηση, οργανίδια, υπεροξεισωμάτια, σύμπλεγμα Golgi, ενδοπλασματικό δίκτυο και φυσικά οργανωμένο πυρήνα τα οποία απουσιάζουν εντελώς από τις προκαρυωτικές γενεαλογίες, καθιστώντας δύσκολη την εκτίμηση για την προέλευση του ευκαρυωτικού κυττάρου (McInerney et al, 2011). Το γεγονός που φαίνεται να δυσχεραίνει ακόμα περισσότερο την κατάσταση είναι η απουσία των συνδετικών κρίκων ή των ενδιάμεσων σταδίων της ευκαρυογένεσις, που θα

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/06/2024 15:10:58 EEST - 3.135.219.133

μπορούσαν να διαφωτίσουν για τις διαδικασίες που οδήγησαν στη δημιουργία του ευκαρυωτικού κυττάρου (Martijn & Ettema, 2013).

Στο άρθρο της το 1967, η Δρ. Margulis πρότεινε ότι το πρώτο βήμα της ευκαρυωτικής προέλευσης σχετίζονταν με την ικανότητα διαβίωσης στην ατμόσφαιρα που εμφάνιζε υψηλά ποσοστά οξυγόνου: ένα αερόβιο προκαρυωτικό κύτταρο (το πρωτομιτοχόνδριο) ενσωματώθηκε στο κυτταρόπλασμα ενός ετερότροφου αναερόβιου οργανισμού. Η ενδοσυμβίωση έτσι κατέστη απαραίτητη και οδήγησε στην εξέλιξη των πρώτων αερόβιων οργανισμών αμοιβαδοειδούς μορφής. Σε μεταγενέστερη μελέτη της (1981), η Δρ. Margulis για να στηρίξει την υπόθεση του προκαρυωτικού ξενιστή αναφέρει ότι «τα πρωτομιτοχόνδρια εισέβαλλαν στους ξενιστές τους όπως τα σύγχρονα αρπακτικά βακτήρια *Bdellovibrio* εισβάλλουν στα βακτήρια-θύματά τους», και πως πρόκειται για μία εξαιρετική περίπτωση συνένωσης δύο προκαρυωτικών κυττάρων χωρίς την μεσολάβηση φαγοκυττάρωσης. Μία πρόσφατη ανακάλυψη, πως το β-πρωτεοβακτήριο *Tremblaya* φαίνεται να εμπεριέχει το ενδοσυμβιωτικό γ-πρωτεοβακτήριο *Moranella*, το οποίο του είναι απολύτως απαραίτητο για να επιτελέσει τις λειτουργίες του και ότι διατηρεί μόλις 120 γονίδια, αποτελεί άλλη μία ένδειξη πως οι προκαρυώτες μπορούν να ενσωματώσουν άλλους προκαρυώτες χωρίς να αναπτύξουν μηχανισμούς φαγοκύτωσης όπως οι ευκαρυώτες (von Dohlen et al, 2001, Husnik et al, 2013).

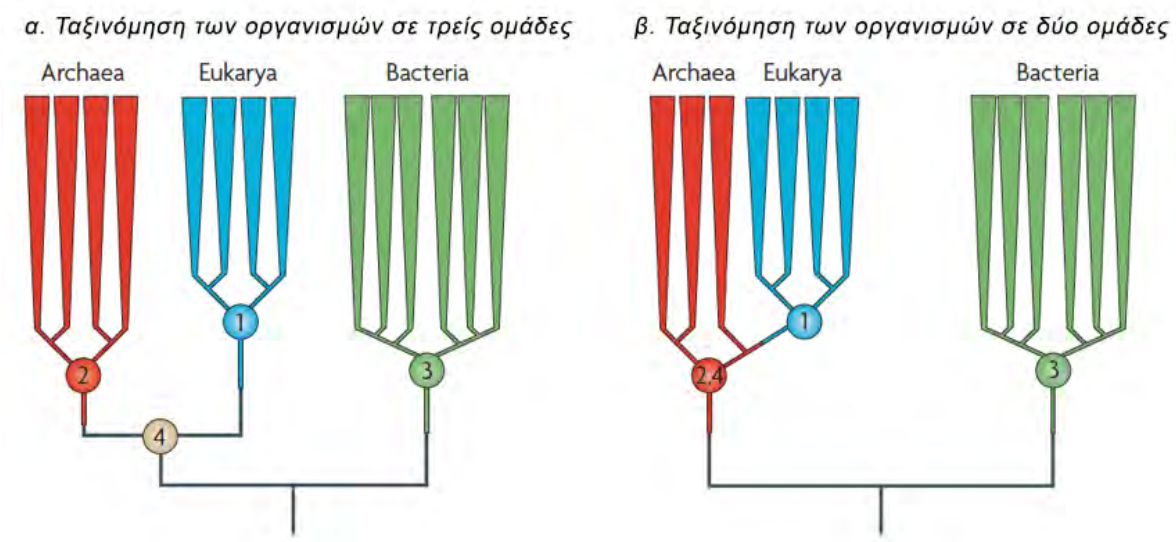
Η φύση του ξενιστή, που αναφέρθηκε ήδη, καθώς και το πότε προέκυψε η ευκαρυωτική πολυπλοκότητα αποτελούν και τη βάση διαχωρισμού των μοντέλων της ευκαρυωτικής προέλευσης και εξέλιξης. Τα μοντέλα αυτά χωρίζονται σε δύο βασικές κατηγορίες (Εικόνα 1):

α. Τα μοντέλα κατά τα οποία πρώτα εξελίχθηκε το ευκαρυωτικό κύτταρο και στη συνέχεια ενσωμάτωσε τον ενδοσυμβιώτη (Αρχεζωικό μοντέλο, Archezoa model) (Cavalier-Smith, 1989). Αυτό το μοντέλο είναι συμβατό με την κλασσική ταξινόμηση της ζωής σε τρείς μεγάλες ομάδες, τα βακτήρια, τα αρχαία και τους ευκαρυώτες. (3-domains tree of life, Woese et al, 1990) (Εικόνα 1α).

β. Τα μοντέλα στα οποία η συμβίωση και η ευκαρυωτική προέλευση συνέβησαν ταυτόχρονα και σύμφωνα με τα οποία η συμβίωση πυροδότησε τελικά την εξέλιξη

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/06/2024 15:10:58 EEST - 3.135.219.133

των μοναδικών χαρακτηριστικών των ευκαρυωτών (Embley et al, 2006, Martin & Muller, 1998). Σύμφωνα με τα μοντέλα αυτά, οι ευκαρυώτες προέκυψαν μέσα απο τη γενεαλογία των αρχαίων, οπότε και προτείνεται το δισδιάστατο «δέντρο της ζωής» (2-domains tree of life, Williams et al, 2013) (Εικόνα 1β).



Εικόνα 1: Οι σχέσεις ανάμεσα στους ευκαρυώτες και στα αρχαία, όπως προκύπτουν απο τα δύο σενάρια προέλευσης των ευκαρυωτών (από Gribaldo et al, 2010).

Σύμφωνα με την πρώτη κατηγορία μοντέλων, η δημιουργία των ευκαρυωτικών κυττάρων και η εμφάνιση των μιτοχονδρίων ήταν δύο ανεξάρτητα εξελικτικά γεγονότα. Παρόλα αυτά, διάφορες μελέτες, πρότειναν πως αυτά τα δύο γεγονότα συνέβησαν ταυτόχρονα. Για παράδειγμα, γνωρίζουμε πλέον πως τα κύτταρα που προηγουμένως θεωρούνταν πως στερούνται μιτοχονδρίων, πρακτικά περιέχουν υπολείμματα μιτοχονδριακής προέλευσης στη μορφή υδρογονοσωμάτων, μιτοσωμάτων ή άλλων μορφών οργανιδίων που μοιάζουν με μιτοχόνδρια (Embley & Martin, 2006, Embley, 2006). Επιπλέον, η απόκτηση των μιτοχονδρίων φαίνεται να απελευθέρωσε τον ευκαρυωτικό πρόγονο από τους ενεργειακούς περιορισμούς στους οποίους «υπακούν» τα προκαρυωτικά κύτταρα, επιτρέποντας έτσι την άμεση επέκταση του αριθμού των γονιδίων και τη δημιουργία της κυτταρικής πολυπλοκότητας (Lane & Martin, 2010).

Πρόσφατα στοιχεία υποστηρίζουν ότι οι ευκαρυώτες σχετίζονται αποκλειστικά με μία ομάδα προσφάτως χαρακτηρισμένων αρχαίων, το υπερ-φύλο των *Asgard* (Spang et al, 2015, Zaremba-Niedzwiedzka et al 2017). Αυτή η ομάδα αρχαίων έχει βρεθεί ότι

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/06/2024 15:10:58 EEST - 3.135.219.133

κωδικοποιεί για μία ομάδα πρωτεϊνών που εμφανίζουν ομολογία μόνο με ευκαρυωτικές πρωτεΐνες, προτείνοντας ότι μία γενεαλογία αρχαίων είχε αναπτύξει ήδη χαρακτηριστικά των ευκαρυωτών, όπως και τη φαγοκύτωση, και ήταν ένας αρκετά καλός ξενιστής για τη μιτοχονδριακή ενδοσυμβίωση. Ανάμεσα στις πρωτεΐνες αυτές περιλαμβάνονται αρχαίες μορφές της ακτίνης (Yutin et al 2009, Bernander et al 2011, Ettema et al 2011), της τουμπουλίνης (Yutin & Koonin 2012), καθώς και μία μεγάλη ποικιλία απο GTPάσες μικρού μοριακού βάρους (Spang et al, 2015), συμπεριλαμβανομένων ορθόλογων μορφών της οικογένειας Gtr/Rag, που συμμετέχουν σε ρυθμιστικές διεργασίες σχηματισμού του κυτταροσκελετού, στη μεταγωγής σήματος όπως και στη μεταφορά μορίων από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα (Kinger et al, 2016, Surkont & Pereira-Leal, 2016) καθώς και πρωτεϊνών που εμπλέκονται στην μεταγραφή και τη μετάφραση (Guy & Ettema 2011). Μάλιστα, φυλογενετικές αναλύσεις που πραγματοποιήθηκαν από την Δρ. Zaremba-Niedzwiedzka και τους συνεργάτες (2017), τοποθέτησαν τους σύγχρονους ευκαρυώτες μέσα στο υπερ-φύλο των Asgard, χρησιμοποιώντας τρεις διαφορετικές ομάδες γονιδίων. Επιπλέον, φυλογενετικές μελέτες με τη χρήση βελτιωμένων μοντέλων εξέλιξης των αλληλουχιών και ευρύτερης δειγματοληψίας υποστήριξαν περαιτέρω την υπόθεση του δισδιάστατου δέντρου της ζωής (Guy & Ettema, 2011, Kelly et al 2011, Williams et al, 2013, Lasek-Nesselquist & Gogarten, 2013, Williams & Embley, 2014, Raymann et al, 2015, Cox et al, 2008, Foster et al, 2009). Αυτές οι παρατηρήσεις για το γονιδιακό περιεχόμενο των *Asgard* είναι ενδεικτικές για την ενσωμάτωση των μιτοχονδρίων που μετά την εξέλιξη μερικών ευκαρυωτικών γνωρισμάτων από την αρχέγονη γενεαλογία έδωσε γένεση στους ευκαρυώτες. Τα ευρήματα αυτά, παρόλο που καταλήγουν στο γεγονός πως το αρχαίο-ξενιστής μπορεί να είχε αναπτύξει απλές μορφές φαγοκυττάρωσης (Koonin, 2015, Yutin et al, 2009, Martin & Ettema 2013, Poole & Gribaldo 2014), επιδέχονται περαιτέρω μελέτης σχετικά με το χρόνο και τον τρόπο της συμβίωσης επιδέχεται περαιτέρω μελέτης (Lopez-Garcia & Moreira, 2015).

Κρίνοντας από την καθολικότητα της εμφάνισης των οργανιδίων και την δυνατότητα των ευκαρυωτών να σχηματίζουν μεγάλους, πολύπλοκους πολυκύτταρους οργανισμούς, η απόκτηση των μιτοχονδρίων πρέπει να θεωρηθεί εκ των υστέρων ως

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/06/2024 15:10:58 EEST - 3.135.219.133

μία εξαιρετική επιτυχία. Λαμβάνοντας υπόψη το ενεργειακό κέρδος που σχετίζεται με την οξειδωτική φωσφορυλίωση (Lane, 2011), φαίνεται λογική η επικράτηση των γενεαλογιών που έφεραν μιτοχόνδρια σε βάρος των ενδιάμεσων σταδίων και μορφών τα οποία εξαφανίστηκαν. Η μελέτη πάντως των σύγχρονων λειτουργιών των μιτοχονδρίων δεν είναι σε θέση να δώσει πληροφορίες για τα γεγονότα που οδήγησαν στην ενδοσυμβίωση. Η προέλευση των γενεαλογιών που φέρουν μιτοχόνδρια έχει σχετιστεί με μία παγκόσμια ατμοσφαιρική αλλαγή η οποία έλαβε χώρα περίπου δύο δισεκατομμύρια χρόνια πριν. Σε αυτή την περίοδο, τα επίπεδα του ατμοσφαιρικού οξυγόνο ξεκίνησαν να αυξάνονται, λόγω της δράσης ωκεάνιων φωτοσυνθετικών βακτηρίων (Holland, 1994). Η αλλαγή αυτή έχει γίνει γνωστή με την ονομασία “Great Oxidation Event” (Bekker, 2004). Πριν από την αλλαγή αυτή, η ατμόσφαιρα της Γης δεν ήταν ιδιαίτερα οξειδωτική και αποτελούνταν κυρίως από CO_2 με ανηγμένες μορφές S, N καθώς και C καθώς και με πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις O_2 (Rubey 1951, Holland 1994). Η συσσώρευση των επιπέδων του O_2 στην ατμόσφαιρα πυροδότησε μία μεγάλη κρίση για τις μορφές ζωής της εποχής. Οι αναερόβιες μορφές ζωής δεν είχαν τη δυνατότητα να προστατευτούν από τα τοξικά επίπεδα O_2 ή να εντοπίσουν ένα αναερόβιο μικροπεριβάλλον και πιθανόν εξαφανίστηκαν. Μία μορφή προστασίας από τα τοξικά επίπεδα του οξυγόνου περιλαμβάνει και την αναγωγή του από μεταβολικές διεργασίες. Για παράδειγμα, στην αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων στα βακτήρια, το οξυγόνο αποτελούσε τον τελικό αποδέκτη ηλεκτρονίων μειώνοντας την τοξικότητα του στο μικροπεριβάλλον του βακτηρίου, με ταυτόχρονη παραγωγή ενέργειας με τη μορφή ATP. Αυτή, λοιπόν, η ταυτόχρονη προστασία από τα τοξικά επίπεδα O_2 με την παροχή ενέργειας φαίνεται να έδωσε το σημαντικό πλεονέκτημα στις γενεαλογίες που ενσωμάτωσαν τον προκαρυωτικό ενδοσυμβιώτη.

Εξελικτικοί Μηχανισμοί – Προέλευση Ευκαρυωτικού Κυττάρου

Παρότι δεν είναι γνωστή η διάρκεια της μετάβασης από το προκαρυωτικό στο ευκαρυωτικό κύτταρο, είναι ξεκάθαρο πως οι εξελικτικές δυνάμεις που έδρασαν για τη μετάβαση αυτή ήταν τρεις: ο γονιδιακός διπλασιασμός, η οριζόντια μεταφορά γονιδίων και η δημιουργία γονιδίων (gene genesis).

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/06/2024 15:10:58 EEST - 3.135.219.133

Ο γονιδιακός διπλασιασμός θεωρείται ως ένας σημαντικός μηχανισμός που οδηγεί σε εξελικτική καινοτομία (Ohno, 1970). Η ύπαρξη ενός μεγάλου αριθμού γονιδίων που παρουσιάζουν παράλογα σε όλους τους ευκαρυώτες αποτελεί ένδειξη πως ο γονιδιακός διπλασιασμός ήταν η κινητήρια δύναμη για την ευκαρυωτική εξέλιξη. Μία λεπτομερής ανακατασκευή του περιεχομένου του ευκαρυωτικού γονιδιώματος κατέληξε σε τρία κύρια ευρήματα: Πρώτον, το προγονικό ευκαρυωτικό γονιδιακό περιεχόμενο φαίνεται να διπλασιάστηκε πριν την ακτινωτή επέκταση των ευκαρυωτών. Δεύτερον, ο γονιδιακός διπλασιασμός φαίνεται να έπαιξε σημαντικό ρόλο στη δημιουργία των ευκαρυωτικών λειτουργιών και τρίτον ένα σημαντικό μέρος των γονιδίων που εμφανίζουν παράλογες μορφές φαίνεται να είναι αποτέλεσμα όψιμης γονιδιακής μεταφοράς, η οποία συνέβη μέσω της ενδοσυμβίωσης που οδήγησε και στη δημιουργία του μιτοχονδρίου. Ένα παράδειγμα για το πώς ο διπλασιασμός έπαιξε ρόλο στη διαμόρφωση του ευκαρυωτικού γονιδιακού περιεχομένου αποτελεί η εξέλιξη της υπεροικογένειας Ras, που είναι μικρές GTPασες, και παίζουν σημαντικό ρόλο στη διαμερισματοποίηση του ευκαρυωτικού κυττάρου (Jekely, 2003, van Dam et al, 2011). Η υπεροικογένεια αυτή χαρακτηρίζεται από διάφορους αρχαίους διπλασιασμούς και μεταφορές γονιδίων. Επίσης, ένα ακόμα παράδειγμα για το πώς η μεταφορά γονιδίων έπαιξε σημαντικό ρόλο αποτελούν οι Rho GTPασες, που φαίνεται να είναι καθολικοί ρυθμιστές της φαγοκύτωσης στους ευκαρυώτες και είναι πολύ πιθανό να έχουν βακτηριακή προέλευση (Yutin et al, 2009).

Ο ρόλος της οριζόντιας μεταφοράς γονιδίων στην εξέλιξη των ευκαρυωτών φαίνεται να υπήρξε ιδιαίτερα σημαντικός (Doolittle, 2014), ιδιαίτερα στη μορφή της μεταφοράς γονιδίων ανάμεσα σε μονοκύτταρους οργανισμούς (Andersson, 2009, Soanes & Richards, 2014, Eme et al, 2017, Alsmark et al, 2013). Διάφορες φυλογενετικές μελέτες έχουν ως επίκεντρο το χαρακτηρισμό των γονιδίων προκαρυωτικής προέλευσης στον τελευταίο κοινό ευκαρυωτικό πρόγονο (Last Eukaryotic Common Ancestor, LECA) (Thiegart et al, 2012, Rochette et al, 2014, Ku et al, 2015, Pittis & Gabaldon, 2016). Τα ευρήματά τους προτείνουν πως μόνο ένα μικρό ποσοστό γονιδίων κληρονομήθηκε απο προκαρυωτικές γενεαλογίες, με την πλειονότητα των γονιδίων αυτών να προέρχεται απο βακτήρια (56-71%) (Rochette et

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/06/2024 15:10:58 EEST - 3.135.219.133

al, 2014, Pittis & Gabaldon, 2016) παρά απο αρχαία (18-37%) (Thiegart et al, 2012, Pittis & Gabaldon, 2016). Λαμβάνοντας υπόψη και την πρωτεοβακτηριακή προέλευση των μιτοχονδρίων (Yang et al, 1985, Gray, 1988, Gray, 2012), η πιο κοινή γενεαλογία βακτηρίων με ευκαρυωτικά γονίδια είναι αυτή των πρωτεοβακτηρίων και αντιπροσωπεύει περίπου το 7% των γονιδίων τους (Rochette et al, 2014, Ku et al, 2015). Τα περισσότερα γονίδια βακτηριακής προέλευσης φαίνεται να αποκτήθηκαν από τον πρόγονο των ευκαρυωτών μέσω αρχαίων γεγονότων μεταφοράς γονιδίων και αυτό εξηγεί και το υψηλό ποσοστό γονιδίων βακτηριακής προέλευσης στο υπερ-φύλο των *Asgard* (Spang et al, 2015, Zaremba-Niedzwiedzka et al, 2017)

Μέσω αυτών των μηχανισμών, οι ευκαρυώτες ανέπτυξαν κυτταρικές δομές και συστήματα που απουσιάζουν από τους προκαρυώτες. Οι περισσότερες από τις πρωτεΐνες που συμμετέχουν σε αυτές τις δομές και διεργασίες αναφέρονται ως ESPs (Eukaryote Specific Proteins) (Hartman & Fedorov, 2002) και κωδικοποιούνται περίπου από το ένα τρίτο των ευκαρυωτικών γονιδίων. Παρότι έχει προταθεί η υπόθεση στο παρελθόν πως αυτές οι πρωτεΐνες μπορεί να προέκυψαν από τη συνεισφορά μίας εξαφανισμένης γενεαλογίας (Hartman & Fedorov, 2002) αυτό δε θεωρείται πιθανό καθώς οι πρωτεΐνες αυτές εμπλέκονται σε ένα μεγάλο εύρος ευκαρυωτικών διεργασιών. Επιπλέον, εντοπίζονται συνεχώς ESPs σε προκαρυωτικά γονιδιώματα τα οποία αλληλουχήθηκαν προσφάτως. Οπότε, τα πιο πιθανά σενάρια για τους μοριακούς αυτούς νεωτερισμούς των ESPs είναι τα εξής: α. Η χρήση των προκαρυωτικών πρωτεϊνών και δομών για την ίδια βιοχημική λειτουργία αλλά σε διαφορετικό πλαίσιο β. Η δημιουργία νέων βιοχημικών λειτουργιών και υπεροικογενειών πρωτεϊνών, αλλά με τις υπάρχουσες πρωτεϊνικές διαμορφώσεις και γ. Δομές με νέες διαμορφώσεις που «ανακαλύφθηκαν» κατά τα πρώιμα στάδια της ευκαρυωτικής εξέλιξης (Aravind et al, 2006). Η πρώτη κατηγορία περιλαμβάνει πρωτεΐνες για τις οποίες μπορούν να προσδιοριστούν οι ομόλογες προκαρυωτικές μορφές με τη χρήση ευαίσθητων αλγορίθμων εντοπισμού ομολογίας αλληλουχίας ή δομής και που χαρακτηρίζονται από μία ιδιαίτερα αυξημένη διαφοροποίηση στην αλληλουχία τους. Για την τρίτη κατηγορία, έχει βρεθεί πως αρκετές νέες δομές εμφανίζουν χαρακτηριστικά α-έλικας ή χηλικές δομές μετάλλων. Αυτές οι δομές έχουν το χαρακτηριστικό πως είναι λιγότερο εξαρτημένες από δεσμούς υδρογόνου

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/06/2024 15:10:58 EEST - 3.135.219.133

για τη σταθερότητά τους, οπότε και είναι πιο δεκτικές στην εξέλιξη νέων διαμορφώσεων (Aravind et al, 2006).

Τα στάδια της Ευκαρυογένεσις

Ως ευκαρυογένεσις ορίζεται το σύνολο των εξελικτικών γεγονότων που συνέβησαν για να οδηγήσουν στο ευκαρυωτικό κύτταρο από τους προγονικούς του προκαρυώτες. Επομένως, περιλαμβάνει όλα εκείνα τα στάδια ανάμεσα στον πρώτο ευκαρυωτικό κοινό πρόγονο (first eukaryotic common ancestor, FECA) μέχρι τον τελευταίο πρόγονο (LECA). Είναι σημαντικό να τονιστεί πως όλοι οι σύγχρονοι ευκαρυώτες είναι απόγονοι του LECA, αλλά πολλά γεγονότα μαζικών εξαφανίσεων ειδών έχουν επηρεάσει την βιοποικιλότητα των απογόνων του LECA (Eme et al, 2017). Επίσης, τα είδη τα οποία αντιπροσωπεύουν τους LECA και FECA μεταβάλλονται όσο αυξάνεται το εύρος των οργανισμών που ανακαλύπτονται και αλληλουχούνται με τα *Asgard* να αποτελούν ένα τέτοιο παράδειγμα. Πριν την ανακάλυψη τους, οι ευκαρυώτες εμφανίζονταν να είναι πιο συγγενικοί με το υπερφύλο των αρχαίων TACK, το οποίο περιλαμβάνει τα φύλα των *Thaumarchaeota*, *Aigarchaeota*, *Crenarchaeota* και *Korarchaeota* και παίρνει το όνομα τους από τα αρχικά τους και ο FECA θεωρούνταν ως ο τελευταίος κοινός πρόγονος των TACK και των ευκαρυωτών. Οι *Asgard* πλέον έχουν αντικαταστήσει τους TACK στο μοντέλο αυτό και θεωρείται πως το «εξελικτικό κενό» ανάμεσα στο LECA και τον FECA θα μειώνεται με την ανακάλυψη συγγενικότερων γενεαλογιών αρχαίων με τους ευκαρυώτες (Eme et al, 2017).

Συγκριτικές και φυλογενομικές μελέτες έχουν τοποθετήσει την ύπαρξη του LECA περίπου 2 δισεκατομμύρια χρόνια πριν (Eme et al, 2014). Ο LECA φαίνεται να είχε αναπτύξει μία σειρά ευκαρυωτικών λειτουργιών και δομών που βρίσκονται μόνο στις σύγχρονες ευκαρυωτικές γενεαλογίες (Koumandou et al, 2013, Koonin, 2010). Ανάμεσα σε αυτές φαίνεται να είναι ο πυρήνας, με τους πυρηνικούς πόρους και τον πυρηνικό φάκελο (Koumandou et al, 2013, Koreny & Field, 2016), ο οποίος περιείχε χρωμοσώματα με τελομερή που κωδικοποιούσαν για περίπου 4000 γονίδια (Makarova et al, 2005, Koonin, 2010) τα οποία περιείχαν ιντρόνια (Martin & Koonin, 2006). Επιπλέον, είχε αναπτύξει συστήματα παρεμβολής RNA (RNAi) (Koonin, 2010),

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/06/2024 15:10:58 EEST - 3.135.219.133

και μικρά μη κωδικοποιητικά μόρια RNA (Shabalina & Koonin, 2006) και εμφάνιζε και διάφορα επίπεδα οργάνωσης της χρωματίνης (Koumandou et al, 2013). Τέλος, η μεταγραφή φαίνεται να είχε ανεξαρτητοποιηθεί απο τη μετάφραση και περιελάμβανε εκτεταμένη τροποποίηση του RNA (μάτισμα, 3' καλύπτρα, πολυαδενυλίωση) (Grau-Bove et al, 2015).

Ένα από τα πολλά μοντέλα που έχουν προταθεί για τη δημιουργία και την εξέλιξη του ευκαρυωτικού κυττάρου μέσω μίας γενεαλογίας αρχαίων που έφερε ESPs είναι το ακόλουθο και περιλαμβάνει τα εξής στάδια:

- Μία παροδική γενεαλογία αρχαίων

Η γενεαλογία αυτή φαίνεται να ανέπτυξε την πλήρη συλλογή των ESPs που έχουν βρεθεί στα αρχαία, όπως η ακτίνη, η τουμπουλίνη και πρωτεΐνες της μεταγραφής και της μετάφρασης. Είναι πολύ πιθανό αυτή η γενεαλογία να ήταν παροδική (Koonin, 2011).

- Απώλεια κυτταρικού τοιχώματος

Η παροδική αυτή γενεαλογία φέρεται να απώλεσε το κυτταρικό της τοίχωμα, επιτρέποντας την ανάπτυξη του πιο ευέλικτου κυτταροσκελετού από ακτίνη. Αρχαίοι διπλασιασμοί της γονιδίου της ακτίνης των αρχαίων μπορεί να αποτέλεσαν την βάση για την αλλαγή αυτή, επιτρέποντας τη δημιουργία πολυμερών ακτίνης (Yutin et al, 2009, Bernander et al, 2011).

- Φαγοκύτωση και οριζόντια μεταφορά γονιδίων

Ο σχηματισμένος πλέον κυτταροσκελετός είχε την ικανότητα να λειτουργεί σαν μία πρωτόγονη φαγοκυτταρική μηχανή. Η εγκόλπωση και η πέψη άλλων προκαρυωτικών κυττάρων παρείχε στο φαγοκυτταρικό αρχαίο αυξημένες ποσότητες DNA, το οποίο οδήγησε και σε εκτεταμένη μεταφορά γονιδίων στο γονιδίωμα του, προκαλώντας τη δημιουργία ενός γονιδιακού μωσαϊκού στο γονιδίωμα του ξενιστή. Ο υψηλός ρυθμός ενσωμάτωσης γονιδίων οδήγησε σε αποσταθεροποίηση του γονιδιώματος (Papp et al, 2003) και σε υψηλούς εξελικτικούς ρυθμούς. Αυτοί οι αυξημένοι εξελικτικοί ρυθμοί αποτελούν και την εξήγηση για τη μικρή ομοιότητα

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/06/2024 15:10:58 EEST - 3.135.219.133

μεταξύ των γονιδίων των ευκαρυωτών και των αρχαίων σε σύγκριση με την ομοιότητα ανάμεσα στα πρωτεοβακτήρια και στα μιτοχόνδρια (Pittis & Gabaldon, 2016) τα οποία δεν εκτέθηκαν σε τέτοιους ρυθμούς.

- Εξέλιξη πρωτόγονου πυρήνα για την προστασία της γονιδιωματικής σταθερότητας

Για να προστατευτεί το γονιδίωμα του ξενιστή από περαιτέρω φαγοκυτταρωμένα γενετικά στοιχεία, σχηματίστηκε μία προστατευτική μεμβράνη δημιουργώντας την πρωτόγονη μορφή κυττάρου με πυρήνα. Η μεμβράνη αυτή, αφενός προστατεύει το γονιδίωμα αφετέρου επαναφέρει τους εξελικτικούς ρυθμούς. Η φαγοκυττάρωση έχει πλέον εγκαθιδρυθεί ως διαδικασία και το κύτταρο συνεχίζει να εγκολπώνει προκαρυωτικά κύτταρα. Ένα προκαρυωτικό κύτταρο, πιθανόν α-πρωτεοβακτήριο, φαγοκυτταρώνεται αλλά δεν καταστρέφεται και δημιουργεί μία ενδοσυμβιωτική σχέση με το κύτταρο ξενιστή.

- Ενεργειακά επαγόμενη γενωμική επέκταση και νεωτερισμοί

Τελικά, το α-πρωτεοβακτήριο εξελίχθηκε και μετατράπηκε σε οργανίδιο παραγωγής ATP: το μιτοχόνδριο. Σε αντίθεση με τα γονίδια των κυττάρων που έχουν καταστραφεί, η ενδοσυμβιωτική σχέση επιτρέπει την μεταφορά γονιδίων μεταξύ του οργανιδίου και του ξενιστή. Η παροχή μεγάλων ποσοτήτων ενέργειας επιτρέπει στο κύτταρο ξενιστή να αναπτύξει την κυτταρική του πολυπλοκότητα (Lane & Martin, 2010). Απαλλαγμένο πλέον από τις εξελικτικές πιέσεις για τη διατήρηση μικρών γονιδιωμάτων, το κύτταρο ξενιστής έχει τη δυνατότητα να επεκταθεί. Οι γονιδιακές ανακατατάξεις σε συνδυασμό με ανασυνδυασμούς γονιδίων καθώς και γονιδιακών διπλασιασμών και εμφάνισης νέων γονιδίων επιτρέπει την επέκταση των πρωτεϊνικών οικογενειών και τη δημιουργία νέων δομών. Επιπλέον, με την ενέργεια πλέον να παράγεται στις μιτοχονδριακές μεμβράνες και όχι στις μεμβράνες του κυττάρου, ο όγκος του κυττάρου δε περιορίζεται πλέον στις τυπικές προκαρυωτικές διαστάσεις.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/06/2024 15:10:58 EEST - 3.135.219.133

Τα παραπάνω στάδια αποτελούν το μοντέλο PhAT (Phagocytosing archaeon theory) της ευκαρυωτικής προέλευσης όπως διατυπώθηκε από τους Martin και Ettema (2013).

Ενδοσυμβίωση και προέλευση ευκαρυωτικού κυττάρου – Ο ενδοσυμβιώτης

Πλέον υπάρχουν πολλές ενδείξεις που υποστηρίζουν πως το μιτοχόνδριο προήλθε από βακτηριακές μορφές ζωής και όχι από αρχαία (Gray et al, 1999, Lang et al, 1999, Gray, 1999, Karlin et al, 1999). Η φυλογενετική ανάλυση των γονιδίων του μιτοχονδρίου που κωδικοποιούν για πρωτεΐνες (Gray et al, 1999, Lang et al, 1999) και rRNA (Gray, 1999b) ανέδειξαν το φύλο των α-πρωτεοβακτηρίων ως το πιο συγγενικό φύλο με τα μιτοχόνδρια, και φαίνεται να τοποθετείται εξελικτικά ιδιαίτερα κοντά με την οικογένεια των Rickettsiaceaca (Yang et al, 1985, Olsen et al, 1994, Viale & Arakaki 1994, Gray & Spencer 1996, Sicheritz-Ponten et al, 1998, Karlberg et al, 2000, Kurland & Anderson 2000). Ο μετασχηματισμός του προγονικού α-πρωτεοβακτηρίου στο σύγχρονο μιτοχόνδριο δεν ήταν ακαριαίος. Η απώλεια αλληλουχιών από τα προγονικά γονιδιώματα και η επέκταση των πρωτεομάτων με τη συνεισφορά γονιδίων από τον πυρήνα είναι διαδοχικές διεργασίες που συνέβησαν σε εκατομμύρια χρόνια και δεν φαίνεται να έγινε ταυτόχρονα σε όλους τους προγόνους των σύγχρονων γενεαλογιών (Karlberg et al, 2000). Η έλλειψη συγχρονισμού είναι ένα ιδιαίτερα χρήσιμο εργαλείο για τον εντοπισμό της ιστορίας των οργανιδίων. Δύο μεγάλα προγράμματα αλληλούχησης μιτοχονδριακών γονιδιωμάτων σε πρώτιστα και μύκητες (The Organelle Genome Megasequencing Program (OGMP) και The Fungal Mitochondrial Genome Project (FMGP) αντίστοιχα) κατέληξαν στο συμπέρασμα πως η παραγωγή ATP που συνδέεται με την αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων καθώς και η μετάφραση των μιτοχονδριακών πρωτεϊνών είναι δύο λειτουργίες κοινές σε όλα τα μιτοχονδριακά γονιδιώματα και η προέλευση τους μπορεί να ανιχνευθεί στον πρόγονό τους, τα α-πρωτεοβακτήρια. Τα μιτοχονδριακά γονιδιώματα κωδικοποιούν για μόρια που είναι απαραίτητα και για τις δύο αυτές διαδικασίες (Gray et al, 1999, Lang et al, 1999). Το δεύτερο σημαντικότερο εύρημα των μελετών αυτών είναι το πιο πρωτόγονο μιτοχονδριακό γονιδίωμα που έχει

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/06/2024 15:10:58 EEST - 3.135.219.133

χαρακτηριστεί μέχρι σήμερα, καθώς εμφανίζει τη μεγαλύτερη ομολογία με τα βακτήρια και περιέχει τα περισσότερα γονίδια. Το γονιδίωμα αυτό ανήκει στον οργανισμό *Reclinomonas Americana,* το οποίο είναι ένα μαστιγοφόρο πρώτιστο και έχει μήκος 69 kb (Lang et al, 1997).

Η αλληλούχηση των γονιδιωμάτων που αναφέρθηκε κατέληξε σε ένα ακόμα σημαντικό εύρημα, το οποίο αναφέρεται ως «μειωτική εξέλιξη» (meiotic evolution) και οφείλεται στην αξιοσημείωτη μείωση της ικανότητας των μιτοχονδρίων να φέρουν κωδικοποιητικά γονίδια σε σύγκριση με τους βακτηριακούς τους προγόνους. Η περιεκτικότητα των μιτοχονδριακών γονιδιωμάτων σε γονίδια βρέθηκε να διαφέρει αρκετά ανάμεσα στις γενεαλογίες και κυμαίνεται από τα 67 γονίδια στο *R. americana* μέχρι 3 γονίδια στο μιτοχονδριακό γονιδίωμα των μονοκύτταρων παρασίτων *Apicomplexa* (Gray et al, 1999, Lang et al, 1999). Ακόμα και το μεγαλύτερο μιτοχονδριακό γονιδίωμα που έχει χαρακτηριστεί απέχει αρκετά απο το μικρότερο γνωστό βακτηριακό γονιδίωμα που ανήκει στο *Mycoplasma genitalium,* το οποίο κωδικοποιεί για 470 πρωτεΐνες (Fraser et al, 1995). Η διαφορετική περιεκτικότητα σε γονίδια ανάμεσα στα μιτοχονδριακά γονιδιώματα φαίνεται να είναι αποτέλεσμα τριών κυρίως μηχανισμών. Ο πρώτος μηχανισμός αφορά τη διαφορετική συχνότητα στη μεταφορά γονιδίων ανάμεσα στο μιτοχόνδριο και στον πυρήνα (Gray et al, 1999, Lang et al, 1999, Gray, 1999, Martin & Herrmann, 1998, Berg & Kurland, 2000). Η μεταφορά αυτή πιθανώς έγινε για να αποφευχθούν φαινόμενα συσσώρευσης γονιδιακών προϊόντων και να επιτευχθεί μεγάλη αποτελεσματικότητα στην συντονισμένη έκφραση γονιδίων (Bar-Yaacov et al, 2012). Η μεταφορά γονιδίων από το μιτοχόνδριο στον πυρήνα είναι μία ενεργή διαδικασία στους ευκαρυώτες και μπορεί να διακριθεί σε δύο κατηγορίες: μεταφορά που οδηγεί σε λειτουργικά γονίδια και μεταφορά που οδηγεί σε ψευδογονίδια. Έχουν αναφερθεί πολλές περιπτώσεις στη βιβλιογραφία για την εμφάνιση μιτοχονδριακών ψευδογονιδίων στον πυρήνα ανθρώπινων κυττάρων (Hazkani-Covo et al 2003, Mourier et al 2001, Woischnik & Moraes 2002) καθώς και σε άλλα ζώα και φυτά (Bensasson, 2001, Blanchard & Schmids 1995). Τα ψευδογονίδια αυτά έχουν αρκετές φορές αναφερθεί στη βιβλιογραφία, καθώς ενισχύονται μαζί με τα μιτοχονδριακά γονίδια μέσω της PCR δυσκολεύοντας τις φυλογενετικές μελέτες (Sorenson & Fleischer 1996). Ο μηχανισμός

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/06/2024 15:10:58 EEST - 3.135.219.133

μεταφοράς γονιδίων από το μιτοχόνδριο στον πυρήνα έχει χαρακτηριστεί σε ορισμένα είδη φυτών, όπου η μεταφορά φαίνεται να μεσολαβείται από ένα ενδιάμεσο μόριο RNA, το οποίο μετατρέπεται σε DNA πριν ενσωματωθεί στον πυρήνα (Nugent & Palmer 1991, Covello & Gray 1992, Adams et al, 2000). Η διαδικασία μεταφοράς έχει μελετηθεί επίσης στη ζύμη (Thorsness & Fox 1993), στην οποία υπολογίστηκε πως η μεταφορά απο το μιτοχόνδριο προς τον πυρήνα είναι 10000 φορές πιο συχνή απο την αντίστροφη πορεία. Οι ίδιοι ερευνητές (1990) έδειξαν πως τα λυσοσώματα καταναλώνουν τα μιτοχόνδρια, απελευθερώνοντας μόρια DNA τα οποία ενσωματώνονται στη συνέχεια στον πυρήνα.

Η μεταφορά των γονιδίων από το μιτοχόνδριο στον πυρήνα και η επίδραση της φυσικής επιλογής στη διαδικασία αυτή αποτέλεσε το θέμα της μελέτης αρκετών ερευνών. Μία από τις πιο πολυσυζητημένες θεωρίες που περιλαμβάνει και την έννοια του Muller’s ratchet, αναφέρει ότι οι επιβλαβείς επιδράσεις των μεταλλάξεων στα μιτοχονδριακά γονιδιώματα μετριάζονται όταν τα μιτοχονδριακά γονίδια μεταφέρονται στον πυρήνα (Berg & Kurland, 2000, Blanchard & Lynch, 2000, Kurland & Andersson, 2000, Martin & Herrmann, 1998). Η ύπαρξη του Muller’s ratchet, της συσσώρευσης, δηλαδή, μεταλλάξεων σε γονίδια που μεταβιβάζονται αφυλετικά (όπως το μιτοχονδριακό γονιδίωμα) με συνέπεια να μην είναι δυνατή η επιδιόρθωση μέσω ανασυνδυασμού (Muller, 1932, 1964), μπορεί να είναι ένας παράγοντας που προωθεί τη μεταφορά γονιδίων σε ευκαρυώτες που εμφανίζουν υψηλούς εξελικτικούς ρυθμούς στο μιτοχονδριακό τους γονιδίωμα.

Όταν ένα τέτοιο γονίδιο μεταφέρεται στον πυρήνα, ο ομόλογος ανασυνδυασμός μπορεί να οδηγήσει στην επιδιόρθωση ή στην εγκαθίδρυση μίας μετάλλαξης, εφόσον αυτή είναι ευεργετική για τον οργανισμό, γεγονός που δεν θα μπορούσε να συμβεί στα μιτοχόνδρια. Με αυτό τον τρόπο, η πυρηνική μορφή του γονιδίου μπορεί να εμφανίζει βελτιωμένη λειτουργία σε σχέση με τη μιτοχονδριακή μορφή, προκαλώντας την απώλεια της. Μία άλλη υπόθεση υποστηρίζει πως η μεταφορά στην ουσία “απαλλάσσει” τα γονίδια από τις επιδράσεις των ελευθέρων ριζών που είναι σε αφθονία στα μιτοχόνδρια και προκαλούν βλάβες στο DNA (Allen & Raven, 1996). Συμπερασματικά, σε γενεαλογίες με μικρά μιτοχονδριακά γονιδιώματα και υψηλούς εξελικτικούς ρυθμούς μπορεί να ευνοείται η απώλεια των μιτοχονδριακών

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/06/2024 15:10:58 EEST - 3.135.219.133

γονιδίων, μέσω μεταφοράς προς τον πυρήνα, ενώ σε γενεαλογίες με μεγάλα μιτοχονδριακά γονιδιώματα και μικρούς εξελικτικούς ρυθμούς ο μόνος παράγοντας που ευνοεί τη μεταφορά είναι η δυνατότητα εγκαθίδρυσης των ευεργετικών μεταλλάξεων όπως περιεγράφηκε παραπάνω.

Η απώλεια των γονιδίων μπορεί επίσης να οφείλεται και στη λειτουργική τους αντικατάσταση από γονίδια που κωδικοποιούνται από τον πυρήνα και δεν εμφανίζουν ομολογία με μιτοχονδριακά γονίδια. Ένα παράδειγμα αποτελεί η αντικατάσταση της βακτηριακής μορφής της RNA πολυμεράσης που αποτελούνταν από πολλές υπομονάδες, από την πολυμεράση του βακτηριοφάγου T3/T7, η οποία αποτελείται από μία υπομονάδα και φαίνεται να ρυθμίζει τη μεταγραφή στο σύνολο των ευκαρυωτών (Gray & Lang, 1998). Ένας ακόμα μηχανισμός απώλειας γονιδίων είναι η απώλεια χωρίς να υπάρξει αντικατάσταση της λειτουργίας των απολεσθέντων γονιδίων. Αυτό το γεγονός απώλειας γονιδίων φαίνεται να συνέβη κατά τα αρχικά στάδια της εξέλιξης των ευκαρυωτών, όταν το πρωτο-μιτοχόνδριο έχασε ταχύτατα ένα μεγάλο αριθμό μεταβολικών γονιδίων και γονιδίων με άλλες λειτουργίες (πχ. σύνθεση βακτηριακού κυτταρικού τοιχώματος) τα οποία ήταν απαραίτητα για την ελεύθερη βακτηριακή μορφή μορφή όχι όμως για την ενδοσυμβιωτική. Ένα τέτοιο παράδειγμα αποτελούν τα γονίδια του συμπλόκου I στο σακχαρομύκητα, ο οποίος έχει απωλέσει τα γονίδια αυτά χωρίς να έχει μεταφερθεί η λειτουργία σε αντίστοιχα γονίδια του πυρήνα. Ως αποτέλεσμα, η απώλεια αυτή οδήγησε και στην απώλεια του πρώτου συμπλόκου μεταφοράς ηλεκτρονίων στον οργανισμό αυτό (Kurland & Anderson, 2000).

Όλες αυτές οι διεργασίες μεταφοράς και απώλειας γονιδίων είχαν ως αποτέλεσμα το μιτοχονδριακό πρωτέομα να εμφανίζει μία διττή προέλευση, με κάποιες πρωτεΐνες να έχουν βακτηριακή και άλλες ευκαρυωτική προέλευση. Παρόλα αυτά, οι δύο ομάδες πρωτεϊνών δεν κατανέμονται τυχαία, αλλά κατανέμονται ανάλογα με τις λειτουργίες στις οποίες συμμετέχουν. Πιο συγκεκριμένα, τα γονίδια που εμφανίζουν βακτηριακά ομόλογα σχετίζονται με διεργασίες όπως η μετάφραση, η βιοενεργητική και η βιοσύνθεση μικρών μορίων ενώ οι περισσότερες μεμβρανικές, ρυθμιστικές και μεταφορικές πρωτεΐνες φαίνεται να είναι ευκαρυωτικής προέλευσης (Karlberg et al, 2000, Marcotte et al, 2000). Τα δεδομένα αυτά οδηγούν σε τρία ευρήματα. Αρχικά,

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/06/2024 15:10:58 EEST - 3.135.219.133

πολλές από τις σύγχρονες μιτοχονδριακές λειτουργίες όπως η μετάφραση και η οξειδωτική φωσφορυλίωση φαίνεται να προέρχονται από το προγονικό α-πρωτεοβακτήριο. Επιπλέον, γονίδια από το αρχέγονο α-πρωτεοβακτήριο φαίνεται να έχουν μεταφερθεί στο πυρηνικό γονιδίωμα και τέλος, η παρουσία των γονιδίων αυτών στο μιτοχονδριακό γονιδίωμα του *R. americana* τοποθετεί τη μεταφορά χρονολογικά μετά την απόσχιση τους από τον οργανισμό αυτό. Συμπερασματικά, το αρχαίο ενδοσυμβιωτικό βακτήριο περιείχε μερικές χιλιάδες γονίδια, από τα οποία τα περισσότερα χάθηκαν και ένα μόνο μικρό ποσοστό γονιδίων μεταφέρθηκαν και επιλέχθηκαν ώστε να διατηρηθούν στο πυρηνικό γονιδίωμα του ξενιστή. Μερικές ακόμα εκατοντάδες γονίδια φαίνεται να τροποποιήθηκαν λειτουργικά ώστε να συμμετέχουν στις μιτοχονδριακές λειτουργίες ενώ άλλα εξελίχθηκαν *de novo* στο πυρηνικό γονιδίωμα.

Όπως ήδη περιεγράφηκε, υπήρξαν εξελικτικά γεγονότα που ευνόησαν είτε τη μεταφορά γονιδίων (δομικών ή λειτουργικών) στον πυρήνα, είτε την ολοκληρωτική απώλειά τους. Παρόλα αυτά, η γενετική πληροφορία δεν χάθηκε εξ ολοκλήρου από το μιτοχόνδριο, καθότι διατήρησε ένα ημιαυτόνομο γενετικό σύστημα, παρότι απαιτείται η στρατολόγηση ενός μεγάλου αριθμού πρωτεϊνών για την αντιγραφή, τη μεταγραφή και τη μετάφραση του μιτοχονδριακού DNA καθώς και της ρύθμισης όλων αυτών των λειτουργιών. Η διατήρηση των μιτοχονδριακών γονιδίων φαίνεται να είχε τεράστια επίδραση στην εξέλιξη των πολύπλοκων οργανισμών (Lane, 2005), επηρεάζοντας θεμελιώδη χαρακτηριστικά, όπως το φύλο, τον κυτταρικός θάνατος, την επιλογή συντρόφου, την ειδογένεση μέσω αναπαραγωγικής απομόνωσης, την προσαρμογή σε νέα περιβάλλοντα και άλλα. Η διατήρηση αυτών των γονιδίων φαίνεται να είναι σημαντική επειδή υπάρχει κρίσιμη ανάγκη για άμεση μεταγραφική ανταπόκριση στην οξειδοαναγωγική κατάσταση των μιτοχονδρίων (Allen 2003, Lane & Martin 2010, Lane 2011). Εάν όλα τα μιτοχονδριακά γονίδια μεταφέρονταν στον πυρήνα, το μιτοχονδριακό γονιδίωμα και τα πυρηνικά γονίδια που κωδικοποιούν για πρωτεΐνες που εμπλέκονται στις μιτοχονδριακές λειτουργίες θα εξαλείφονταν. Επιπλέον, οι πολύ καλά ρυθμισμένες αλληλεπιδράσεις που ελέγχουν την γονιδιακή έκφραση κυρίως πρωτεϊνών που συμμετέχουν σε πολυπρωτεϊνικά σύμπλοκα που συντίθενται και από τα δύο γονιδιώματα, θα εξαλείφονταν επίσης. Λαμβάνοντας

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/06/2024 15:10:58 EEST - 3.135.219.133

υπόψη τα πιθανά πλεονεκτήματα από την εξάλειψη του μιτοχονδριακού γονιδιώματος, δημιουργείται το ερώτημα γιατί τα μιτοχόνδρια διατηρούν το γονιδιώμά τους. Για την απάντηση του ερωτήματος αυτού έχουν προταθεί διάφορες υποθέσεις.

Μία υπόθεση που εξηγεί την διατήρηση του γονιδιώματος των μιτοχονδρίων είναι ότι αρκετές πρωτεΐνες είναι αρκετά υδρόφοβες και είτε είναι δύσκολο να διασχίσουν τη μιτοχονδριακή μεμβράνη ώστε να δράσουν στο σωστό κυτταρικό διαμέρισμα (Popot & de Vitry, 1990) είτε κατευθύνονται λανθασμένα λόγω υδροφοβικότητας στο ενδοπλασματικό δίκτυο (von Heijne 1986). Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός πως οι δύο πρωτεΐνες κωδικοποιούνται από όλα τα μιτοχονδριακά γονιδιώματα που έχουν αλληλουχηθεί, το κυτόχρωμα β (cytb) και η υπομονάδα 1 της κυτοχρωμικής οξειδάσης (cox1) έχουν τη μεγαλύτερη υδροφοβικότητα μεταξύ των μιτοχονδριακών πρωτεϊνών (Claros et al, 1995). Όταν η πρωτεΐνη cytb συντίθεται στο κυτταρόπλασμα δε μπορεί να εισαχθεί εξ ολοκλήρου στα μιτοχόνδρια αλλά μόνο τμήματα της πρωτεΐνης που περιέχουν 3 ή 4 από τις 8 διαμεμβρανικές περιοχές εισάγονται με επιτυχία (Claros et al, 1995). Μελέτες που αφορούσαν την υπομονάδα ΙΙ της κυτοχρωμικής οξειδάσης έδειξαν πως η υπομονάδα αυτή δε μπορεί να εισαχθεί στα μιτοχόνδρια *in vitro*, εκτός αν αφαιρεθεί η πρώτη διαμεμβρανική της περιοχή ή αν αντικατασταθούν δύο κρίσιμα αμινοξέα αυτής της περιοχής (Daley et al, 2002). Σε περιπτώσεις μεταφοράς γονιδίων, έχει παρατηρηθεί ταυτόχρονη μείωση υδροφοβικότητας των διαμεμβρανικών περιοχών λόγω μεταλλάξεων, όπως συνέβη στα γονίδια COX2,COX3 & ATP6 στον οργανισμό *Chlamydomonas (*Funas et al 2002, Perez-Martinez et al, 2000, 2001).

Μία δεύτερη υπόθεση για τη διατήρηση των μιτοχονδριακών γονιδιωμάτων είναι τα τοξικά αποτελέσματα που εμφανίζονται στο κύτταρο όταν αυτές οι πρωτεΐνες βρεθούν στο κυτταρόπλασμα (Martin & Schnarrenberger, 1997). Μία τρίτη υπόθεση βασίζεται στον κεντρικό ρόλο των μιτοχονδριακών γονιδίων στην αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων και την παραγωγή ενέργειας, οπότε το μιτοχόνδριο θα πρέπει να είναι σε θέση να ρυθμίσει και να εκφράσει αντίστοιχα τα γονίδια σε απόκριση στην οξειδοαναγωγική του κατάσταση (Allen, 1993, Race et al, 1999). Η τελευταία υπόθεση έχει να κάνει με το διαφορετικό γενετικό κώδικα που

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/06/2024 15:10:58 EEST - 3.135.219.133

χρησιμοποιούν τα μιτοχονδριακά γονίδια σε σχέση με τα πυρηνικά. Εάν τα μιτοχονδριακά γονίδια στα ζώα μεταφερθούν και εκφραστούν στον πυρήνα, οι πρωτεΐνες που θα προκύψουν δε θα έχουν τη σωστή αμινοξική αλληλουχία και θα περιέχουν πρώιμα κωδικόνια λήξης και αντινοηματικές μεταλλάξεις. Έτσι, ο μιτοχονδριακός γενετικός κώδικας φαίνεται να είναι ο αποτρεπτικός παράγοντας που δεν επιτρέπει τη μεταφορά των γονιδίων στα ζωικά είδη.

Η εξέλιξη του γονιδιακού περιεχομένου του mtDNA στους ευκαρυώτες

Το μιτοχονδριακό γονιδίωμα εμφανίζει εξαιρετικές διαφορές στα μεγέθη, που κυμαίνονται από 16kb μέχρι πάνω από 500kb σε μερικά είδη φυτών (Hanson & Folkerts 1992, Unseld et al 1997, Gray et al 1998) και οι διαφορές αυτές οφείλονται κυρίως στο διαφορετικό γονιδιακό περιεχόμενο. Η διαφορετική περιεκτικότητα σε γονίδια ανάμεσα στα mtDNA φαίνεται να είναι αποτέλεσμα της διαφορετικής μεταφοράς γονιδίων ανάμεσα στο μιτοχόνδριο και στον πυρήνα, (Gray et al, 1999, Lang et al, 1999, Gray, 1999, Martin & Herrman, 2000, Berg & Kurland, 2000) η οποία φαίνεται να είναι μία ενεργή διαδικασία σε μερικές γενεαλογίες που περιλαμβάνουν ανθοφόρα φυτά (Adams et al, 2000). Ένα τυπικό mtDNA περιέχει γονίδια που χωρίζονται σε τρεις ομάδες: γονίδια που κωδικοποιούν για ριβοσωμικά RNA (rRNAs), γονίδια που κωδικοποιούν για μεταφορικά RNA (tRNAs) και γονίδια που κωδικοποιούν για πρωτεΐνες (protein coding genes, PCG).

Τα γονίδια των ριβοσωμικών RNAs

Τα δύο γονίδια rRNA (12S, 16S) βρίσκονται σε όλα τα χαρακτηρισμένα μιτοχονδριακά γονιδιώματα. Παρά την καθολική τους εμφάνιση, εμφανίζουν ποικιλομορφία στο μέγεθος, ιδιαίτερα σε σύγκριση με τα αντίστοιχα γονίδια των ευβακτηρίων και των χλωροπλαστών. Σε αρκετές περιπτώσεις, τα γονίδια αυτά έχουν κατακερματιστεί σε μικρότερα τμήματα, τα οποία είναι διασκορπισμένα στο mtDNA, μεταγράφονται χωριστά και στη συνέχεια συνενώνονται για να συνθέσουν ένα λειτουργικό μόριο RNA (Gray & Schnare, 1996). Σε αντίθεση με τα δύο γονίδια αυτά, που εμφανίζουν καθολική εμφάνιση, το γονίδιο που κωδικοποιεί για την υπομονάδα

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/06/2024 15:10:58 EEST - 3.135.219.133

5S rRNA εμφανίζει μία ιδιαίτερη κατανομή στην εμφάνιση του, καθώς απουσιάζει από την πλειονότητα των μιτοχονδριακών γονιδιωμάτων και εμφανίζεται μόνο στα φυτά της ξηράς και σε μερικά φύκη (Oudot-Le Secq et al, 2001) καθώς και στα πρώτιστα *Reclinomonas* (Bullerwell et al 2003a, 2003b, Grey et al 1998). Το μοντέλο αυτό της κατανομής είναι ενδεικτικό για τα πολλά ανεξάρτητα γεγονότα απώλειας γονιδίων κατά τη διάρκεια της μιτοχονδριακής εξέλιξης. Το γονίδιο αυτό, πιθανώς να αντικαταστάθηκε λειτουργικά από το αντίστοιχο γονίδιο του πυρήνα, όπως φαίνεται να έχει συμβεί στα ζωικά είδη (Entelis et al 2001, Magalhaes et al 1998) ή να μεταφέρθηκε στον πυρήνα σε κάποιες άλλες γενεαλογίες. Είναι επίσης πιθανό το γονίδιο αυτό να μην ήταν απαραίτητο για το ιδιαίτερα ασύνηθες ριβόσωμα των μιτοχονδρίων.

Τα γονίδια των μεταφορικών RNAs

Ο αριθμός των γονιδίων των tRNAs που χαρτογραφούνται στα mtDNAs διαφέρει έντονα μεταξύ των ευκαρυωτών και κυμαίνεται από μηδέν στα *Apicomplexa* και στο πρώτιστο *Trypanosoma brucei,* μέχρι 22-27 γονίδια στα περισσότερα μιτοχονδριακά γονιδιώματα (Gray et al 1998, Lang et al 1999). Με βάση τα μέχρι τώρα δεδομένα, δε φαίνεται να έχει υπάρξει μεταφορά των απολεσθέντων γονιδίων στον πυρήνα. Αντίθετα, η επικρατέστερη εξήγηση για την απώλεια των γονιδίων αυτών είναι η λειτουργική τους αντικατάσταση από γονίδια του πυρήνα, τα οποία έχουν ευκαρυωτική προέλευση και συχνά διαδραματίζουν δύο ρόλους: συμμετέχουν στην κυτταροπλασματική και μιτοχονδριακή πρωτεϊνοσύνθεση (Alfonzo & Soll 2009). Η εισαγωγή των πυρηνικά κωδικοποιούμενων tRNAs στον πυρήνα έχει εξελιχθεί αρκετές φορές κατά τη διάρκεια την μιτοχονδριακής εξέλιξης (Gray et al 1998).

Δύο περιπτώσεις που σχετίζονται με απώλεια γονιδίων φαίνεται να εμφανίζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον: η πρώτη αφορά το είδος των πόσουμ (Borner et al 1996), όπου μία τροποποίηση στο αντικωδικόνιο ενός μιτοχονδριακώς κωδικοποιούμενου tRNA οδήγησε στη δημιουργία δύο διαφορετικών, λειτουργικά, μορίων που μπορούν να

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/06/2024 15:10:58 EEST - 3.135.219.133

μεταφέρουν γλυκίνη και ασπαραγίνη, επιτρέποντας έτσι την απώλεια του ενός γονιδίου. Η δεύτερη περίπτωση αφορά τα αγγειόσπερμα φυτά, στα οποία τα γονίδια tRNAs τα οποία έχουν χαθεί, αντικαταστάθηκαν λειτουργικά από τα συγγενικά γονίδια των χλωροπλαστών τα οποία μεταφέρονται στο μιτοχόνδριο (Joyce & Gray 1989). Στα μιτοχόνδρια αυτά, εκτός από τα χλωροπλαστικά, εισάγονται και κυτταροπλασματικά tRNAs (Glover et al 2001, Kumar et al 1996), και έτσι η μιτοχονδριακή μεταγραφική μηχανή τους θεωρείται η πιο παγκοσμιοποιημένη, καθώς χρησιμοποιεί σημαντικό αριθμό tRNAs από τρεις διαφορετικές προελεύσεις: την μιτοχονδριακή, την χλωροπλαστική και την κυτταροπλασματική (Small et al, 1999).

Γονίδια που κωδικοποιούν για πρωτεΐνες (Protein Coding Genes, PCG)

Η μεγάλη ποικιλομορφία στον αριθμό των γονιδίων αυτών είναι αντίστοιχη με αυτή των γονιδίων tRNAs ανάμεσα στους ευκαρυώτες. Ο αριθμός των PCG κυμαίνεται από 3 στο πρώτιστο *P. falciparus* και στα άλλα μέλη του φύλου των *Apicomplexa* (Feagin, 1994) μέχρι 67 στο είδος *R. americana* (Lang et al 1997). Φαίνεται να υπάρχει μία συσχέτιση ανάμεσα στον αριθμό γονιδίων των μιτοχονδριακών tRNAs και των PCGs (Lang et al 1999). Η καλύτερη συσχέτιση όσον αφορά το μέγεθος της απώλειας και των δύο ομάδων προέρχεται από τα *Apicomplexa*, τα οποία περιέχουν 3 PCGs και κανένα tRNA και στα είδη άλγης του γένους *Chlamydomonada*, η οποία έχει 7 PCGs και 3 tRNAs. Αυτή η συσχέτιση της μείωσης των δύο ομάδων μπορεί να εξηγηθεί αν ληφθεί υπόψη η σημασία των γονιδίων αυτών στη διαδικασία της μιτοχονδριακής μετάφρασης: ένα μιτοχόνδριο που κωδικοποιεί για λίγες μόνο πρωτεΐνες, μπορεί να χρειάζεται και λιγότερα μόρια tRNAs, τα οποία μπορεί να παρέχονται και από το κυτταρόπλασμα, σε αντίθεση με ένα μιτοχόνδριο που κωδικοποιεί για πολλές πρωτεΐνες. Παρόλα αυτά, οι διαδικασίες απώλειας γονιδίων των δύο ομάδων φαίνεται να ακολούθησαν διαφορετική οδό, με τα tRNAs να αντικαθίστανται από γονίδια του πυρήνα ενώ τα PCG γονίδια φαίνεται να μεταφέρθηκαν στον πυρήνα, οπότε οι δύο διαδικασίες αυτές δε φαίνεται να είναι συνδεδεμένες.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/06/2024 15:10:58 EEST - 3.135.219.133

Όλα τα mtDNA φαίνεται να περιέχουν ένα πολύ μικρό ποσοστό PCG σε σχέση με τα γονιδιώματα των προγονικών τους α-πρωτεοβακτηρίων, και το ποσοστό αυτό αφορά αποκλειστικά γονίδια που εμπλέκονται στη διαδικασία της αναπνοής. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός πως τα 67 γονίδια που κωδικοποιούνται από το mtDNA του *Reclinomonas* περιλαμβάνουν όλα τα διαφορετικά γονίδια που εμφανίζονται κατά περίπτωση σε διαφοροποιημένα mtDNA που έχουν χαρακτηριστεί μέχρι σήμερα. Σύμφωνα με αυτή την παρατήρηση, η απώλεια των γονιδίων του ενδοσυμβιώτη συνέβη λίγο μετά την ενδοσυμβίωση και πριν γίνει η διαφοροποίηση που οδήγησε στις κύριες ευκαρυωτικές γενεαλογίες.

Σύμφωνα με μελέτες (Gray et al 1998, Lang et al 1999), τα γονίδια που κωδικοποιούν για πρωτεΐνες του ριβοσώματος χάνονται πολύ πιο συχνά από τις υπομονάδες της αναπνευστικής αλυσίδας. Η γονιδιακή απώλεια, λοιπόν, εμφανίζει μία ιεραρχία. Από τα 27 γονίδια που κωδικοποιούν για πρωτεΐνες στον Reclinomonas, τα 16 εντοπίζονται συχνά στο mtDNA των ευκαρυωτών, από τα οποία 11 κωδικοποιούν για πρωτεΐνες της μικρής υπομονάδας (από ένα σύνολο 12 γονιδίων) και τα 5 κωδικοποιούν για πρωτεΐνες της μεγάλης υπομονάδας (από ένα σύνολο 15 γονιδίων). Υπάρχουν τέσσερις μεγάλες γενεαλογίες ευκαρυωτών που έχουν απωλέσει τελείως όλα τα γονίδια που κωδικοποιούν για ριβοσωμικές πρωτεΐνες, και η απώλεια φαίνεται να συνέβη ανεξάρτητα σε κάθε γενεαλογία. Αντίθετα, δεν έχει βρεθεί κάποιος οργανισμός του οποίου το mtDNA να έχει απωλέσει όλα τα γονίδια της αναπνευστικής αλυσίδας. Όλα τα μιτοχονδριακά γονιδιώματα περιλαμβάνουν τουλάχιστον τρία γονίδια της αναπνευστικής αλυσίδας, δύο εκ των οποίων εμφανίζονται καθολικά (Cytb, COX1). Υπάρχουν επίσης τρία ακόμα γονίδια με καθολική εμφάνιση, τα ND1,4,5 που φαίνεται να απουσιάζουν από 2 γενεαλογίες, των apicomplexans και των ζυμών. Το γεγονός αυτό μπορεί να εξηγηθεί λόγω της ολοκληρωτικής απώλειας του συμπλόκου I της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων στους οργανισμούς αυτούς. Πρόσφατα, χαρακτηρίστηκαν οργανισμοί που δεν φέρουν μιτοχονδριακό γονιδίωμα. Η παρατήρηση αυτή αντανακλά και το ρόλο του mtDNA στην αερόβια αναπνοή. Λαμβάνοντας υπόψη τη συμμετοχή των μιτοχονδριακών πρωτεϊνών στην αερόβια αναπνοή, δε προκαλεί έκπληξη η απώλεια τους σε οργανισμούς που αναπτύσσονται αναερόβια ή παρασιτικά.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/06/2024 15:10:58 EEST - 3.135.219.133

Το μιτοχονδριακό γονιδίωμα των μετάζωων

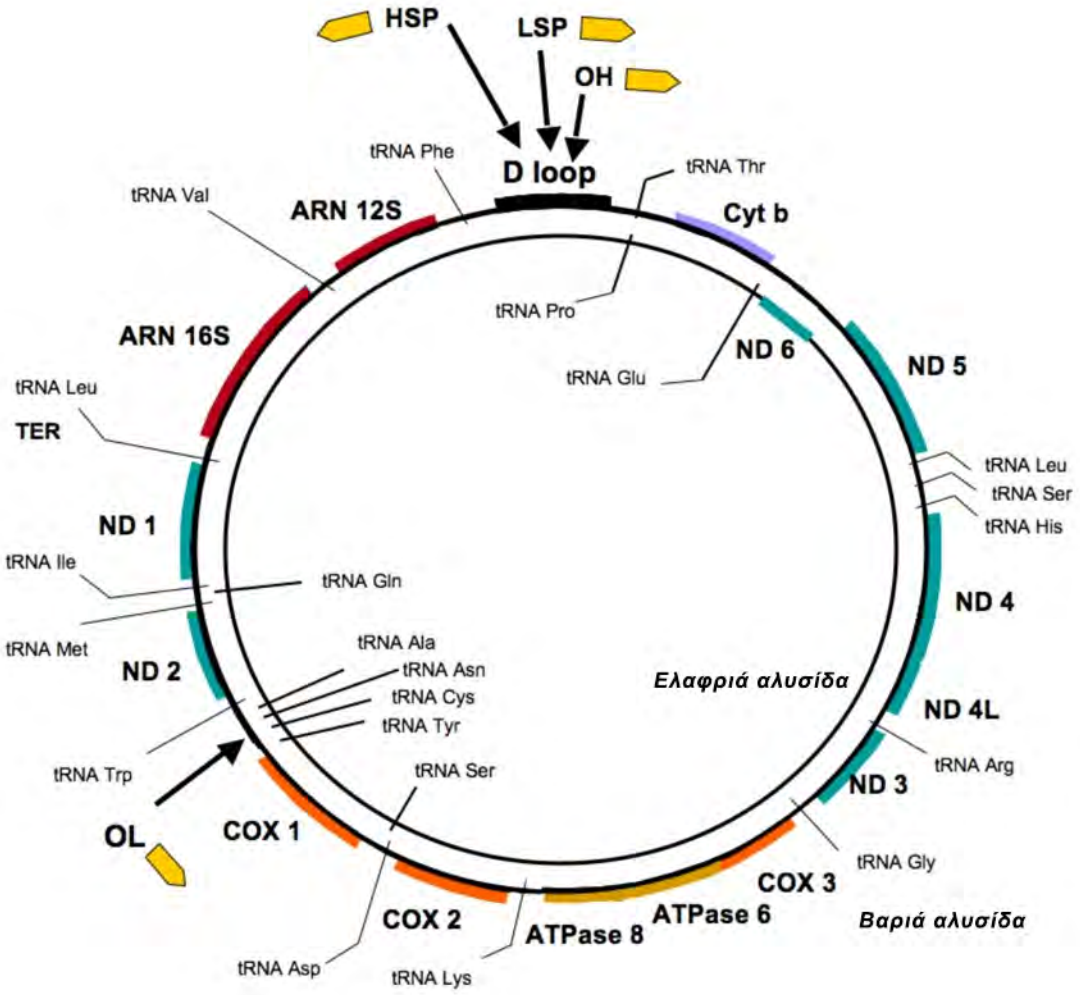
Ένα τυπικό μεταζωικό mtDNA είναι ένα κυκλικό μόριο DNA, με μέγεθος περίπου 17000 βάσεις και περιλαμβάνει 13 γονίδια που κωδικοποιούν για πρωτεΐνες και δεν περιέχουν ιντρόνια, 2 γονίδια για ριβοσωμικά RNAs και 22 γονίδια που κωδικοποιούν για tRNAs, ένα για κάθε αμινοξύ, με εξαίρεση τη σερίνη και τη λευκίνη που έχουν δύο αντίγραφα γονιδίων (Εικόνα 2). Το μεγαλύτερο ποσοστό του πρωτεόματος του μιτοχονδρίου εισέρχεται στο μιτοχόνδριο από τον πυρήνα (Chacinska et al 2009, Szklarczyk & Huynen, 2010). Η ανάλυση του mtDNA στο επίπεδο του μεγέθους, της αρχιτεκτονικής, της σύστασης, της οργάνωσης, του γενετικού κώδικα καθώς και των δευτεροταγών δομών των rRNA και tRNA αποτέλεσε και αποτελεί ένα χρήσιμο εργαλείο για την εξαγωγή συμπερασμάτων σχετικά με τις φυλογενετικές σχέσεις σε διαφορετικά ταξινομικά επίπεδα (Boore, 2006). Επιπλέον, τα PCG φαίνεται να έχουν ισχυρό φυλογενετικό σήμα που βοηθάει στην αποσαφήνιση περίπλοκων σχέσεων τόσο μέσα στα φύλα όσο και μεταξύ τους (Bourlat et al 2008, Zardoya & Meyer 1996).

Οι 13 πρωτεΐνες που κωδικοποιούνται από το mtDNA συμμετέχουν σε τέσσερα από τα 5 σύμπλοκα της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης: εφτά υπομονάδες της αφυδρογονάσης του NADH ή συμπλόκου I (CI) (ND1-6, ND4L), το κυτόχρωμα b στο σύμπλοκο III (CIII), τρεις υπομονάδες της κυτοχρωμικής οξειδάσης ή σύμπλοκο IV (CIV) (COX1-3) και δύο υπομονάδες της ATP συνθάσης ή σύμπλοκο V (CV) (ATP6,ATP8). Στο σύμπλοκο I, οι ND2,4 και 5 φαίνεται να δρουν ως φορείς ηλεκτρονίων ενώ οι ND1 διαδραματίζει ένα σημαντικό δομικό ρόλο ανάμεσα στο μεμβρανικό και τον περιφερικό βραχίονα του συμπλόκου (da Fonseca et al, 2008). Το cytb φαίνεται να έχει μία σημαντική δραστικότητα, την αναγωγή του κυτοχρώματος c. στο σύμπλοκο IV, η πρωτεΐνη COX1 καταλύει τη μεταφορά ηλεκτρονίων στον τελικό αποδέκτη, που είναι το μοριακό οξυγόνο, και μαζί με τις COX2 και COX3 σχηματίζουν το καταλυτικό κέντρο του συμπλόκου. Όσον αφορά την ATP συνθάση, η υπομονάδα ATP6 είναι βασικό στοιχείο του καναλιού πρωτονίων ενώ το ATP8 είναι ρυθμιστής συναρμογής του συμπλόκου (da Fonseca et al, 2008).

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/06/2024 15:10:58 EEST - 3.135.219.133

Επιπλέον, χαρτογραφούνται γονίδια rRNA της μικρής και της μεγάλης ριβοσωμικής υπομονάδας, τα οποία έχουν βακτηριακή προέλευση. Τέλος, χαρτογραφούνται και 22 γονίδια για tRNAs. Παρότι η γενετική σύσταση είναι καλά συντηρημένη στα μετάζωα, υπάρχουν μεγάλες διαφορές που αφορούν την τοποθέτηση των ρυθμιστικών στοιχείων της αντιγραφής και της μετάφρασης. Στα χορδωτά, η κύρια μη κωδική περιοχή είναι η D-Loop που περιλαμβάνει σχεδόν όλες τις ρυθμιστικές αλληλουχίες της αντιγραφής και της μεταγραφής, οι οποίες είναι: ένας υποκινητής της ελαφριάς αλυσίδας (LSP) και δύο της βαριάς αλυσίδας (HSP1/2), καθώς και μία εξελικτικά συντηρημένη αλληλουχία που σχετίζεται με την αντιγραφή του DNA (Shadel, 2008). Μία δεύτερη μη κωδική περιοχή εντοπίζεται σε μία ομάδα γονιδίων tRNA και περιλαμβάνει τη θέση έναρξης της ελαφριάς αλυσίδας του mtDNA (Fernandes Silva et al, 2003). Στα αρθρόποδα και πιθανόν στους νηματώδεις, υπάρχει μία κοινή θέση έναρξης της αντιγραφής και για τις δύο αλυσίδες (Zhang & Hewitt, 1997, Saito et al, 2005).

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/06/2024 15:10:58 EEST - 3.135.219.133



Εικόνα 2: Ένα τυπικό μόριο mtDNA του είδους Homo sapiens. (εικόνα απο Bellance et al, 2009)

HSP,LSP: οι υποκινητές των δύο αλυσίδων

OH,OL: οι θέσεις έναρξης αντιγραφής των δύο αλυσίδων.

Αντιγραφή του mtDNA

Το ελάχιστο αντιγραφόσωμα του mtDNA αποτελείται από την DNA πολυμεράση γ, την ελικάση TWINKLE και την μιτοχονδριακή πρωτεΐνη πρόσδεσης σε μονόκλωνες αλυσίδες (Spelbrink et al, 2001, Korhonen et al, 2004, Fan et al, 2006). Η αντιγραφή απαιτεί και άλλους παράγοντες, όπως τη μιτοχονδριακή RNA πολυμεράση που δημιουργεί τα εκκινητικά μόρια (Wanrooij et al, 2008), ο μιτοχονδριακός μεταγραφικός παράγοντας A (TFAM) και άλλα ένζυμα, όπως η DNA λιγάση III καθώς

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/06/2024 15:10:58 EEST - 3.135.219.133

και τοποϊσομεράσες (Simsek et al, 2011). Η ελικάση δημιουργεί τις προϋποθέσεις αντιγραφής του mtDNA οπότε και τα επίπεδά της σχετίζονται με τον αριθμό των αντιγράφων του mtDNA (Tyiinismaa et al, 2004). Ο TFAM αυξάνει το χρόνο ημιζωής του μορίου, αυξάνοντας το βαθμό συσπείρωσης του mtDNA (Larsson et al, 1998, Kaufman et al, 2007, Ylikallio et al, 2010), οπότε αποτελεί παράγοντα ελέγχου του αριθμού των αντιγράφων. Εκτός από τα ένζυμα που απαιτούνται για την αντιγραφή, υπάρχει και ανάγκη για ελεύθερα νουκλεοτίδια. Η δεξαμενή των μιτοχονδριακών νουκλεοτιδίων εξαρτάται άμεσα από τον κυτταροπλασματικό μεταβολισμό των νουκλεοτιδίων, οπότε ποσοτικές αλλαγές ή δυσλειτουργίες του μεταβολισμού αυτού επηρεάζουν αρνητικά την αντιγραφή του DNA. Η αντιγραφή του mtDNA ενισχύεται και από την αύξηση της έκφρασης του PCG1-a μέσω της συνενεργοποίησης του NF1 και NF2 (Campbell et al, 2012).

Οι δύο αλυσίδες του mtDNA έχει βρεθεί ότι διαφέρουν στη νουκλεοτιδική τους σύσταση, καθώς η μία αλυσίδα είναι πλούσια σε κατάλοιπα γουανίνης ενώ η άλλη όχι. Η αλυσίδα που είναι πλούσια σε κατάλοιπα γουανίνης καλείται και βαριά αλυσίδα (Heavy strand, H-strand) ενώ η άλλη καλείται ελαφριά αλυσίδα (Light strand, L-strand). Η αιτία της ασυμμετρίας των αλυσίδων φαίνεται να προκύπτει από τις διαδικασίες που προκαλούν μεταλλάξεις και ευνοούν τις μεταστροφές έναντι των μεταπτώσεων (Hassanin et al 2005, Brown & Simpson 1982). Η πιο πιθανή αιτία είναι η απαμίνωση της αδενίνης και κυτοσίνης της βαριάς αλυσίδας που οδηγούν σε αντικατάσταση από γουανίνη και θυμίνη αντίστοιχα. Έχει παρατηρηθεί πως ο χρόνος κατά τον οποίο οι αλυσίδες του mtDNA παραμένουν σε μονόκλωνη μορφή κατά την αντιγραφή εμφανίζει συσχέτιση με τους ρυθμούς μεταλλαξιγένεσης, που είναι υπεύθυνοι για τις νουκλεοτιδικές συχνότητες των αλυσίδων όπως αναφέρθηκε (Reyes et al 1998, Krishnan et al 2004).

Τα μιτοχονδριακά γονιδιώματα, δέχονται ισχυρές πιέσεις μεταλλάξεων (Brown et al 1979) που σχετίζονται με το ανεπαρκές σύστημα επιδιόρθωσης του mtDNA (Bogenhagen 1999, Gredilla, 2011). Οι λόγοι που συνεισφέρουν σε αυτό είναι η απουσία προστατευτικών πρωτεϊνών, όπως οι ιστόνες, ο μηχανισμός αντιγραφής, που αφήνει εκτεθειμένα τμήματα μονόκλωνου DNA, καθώς και το περιβάλλον του μιτοχονδρίου που είναι πλούσιο σε ελεύθερες ρίζες οξυγόνου (Harman, 1972). Με

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/06/2024 15:10:58 EEST - 3.135.219.133

βάση τα παραπάνω, το mtDNA φαίνεται να είναι επιρρεπές στο φαινόμενο που ονομάζεται “Muller’s ratchet” (Muller, 1964), δηλαδή στη βαθμιαία συσσώρευση μεταλλάξεων που θα οδηγήσουν προοδευτικά στην απώλεια λειτουργίας.

Μεταγραφή του mtDNA

Το mtDNA μεταγράφεται από ένα εξειδικευμένο μηχανισμό που χρησιμοποιεί μία μονομερή RNA πολυμεράση (POLRMT), η οποία αποτελείται από μία υπομονάδα και ανήκει στην οικογένεια των RNA πολυμερασών του βακτηριοφάγου T7 (Masters et al 1987, Tiranti et al 1997) και μεταγραφικούς παράγοντες ειδικούς για το μιτοχόνδριο, όπως ο TFAM (mtTFB1) και το mtTFB2 (Falkenberg et al 2002, Gaspari et al 2004). Πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει πως οι λειτουργίες των δύο μεταγραφικών παραγόντων έχουν διαφοροποιηθεί αρκετά, με τον mtTFB1 να λειτουργεί κυρίως ως μεθυλοτρανσφεράση του 12S rRNA και τον TFB2 να αποτελεί τον κύριο μεταγραφικό παράγοντα. Οι μεταγραφικοί παράγοντες φαίνεται να έχουν εξελιχθεί από την βακτηριακή μεθυλοτρανσφεράση KsgA του προγονικού ενδοσυμβιώτη (McCulloch et al 2002, Cotney & Shadel 2006, Shutt & Gray 2006). Κάθε μία από αυτές τις δύο πρωτεΐνες μπορεί να αντικαταστήσει λειτουργικά την KsgA στο *E. coli* (Seidel Rogol et al 2003, Contey & Shadel 2006).

Τα πρωταρχικά μετάγραφα είναι πολυκιστρονικής μορφής. Στα θηλαστικά, εντοπίζονται δύο εναλλακτικοί υποκινητές για τη βαριά και την ελαφριά αλυσίδα και χαρτογραφούνται στην D-Loop (Cayela & Gustafsson 2007, Scarpulla 2008). Αρχικά, παράγονται τρία πρωταρχικά μετάγραφα. Τα πρωταρχικά μετάγραφα τροποποιούνται ώστε να παραχθούν ώριμα μόρια rRNA και mRNA μέσω αποκοπής των μιτοχονδριακών tRNAs από τα 3’ και 5’ άκρα. Αυτές οι διαδικασίες πραγματοποιούνται από την RNAse P και τις ενδονουκλεάσες tRNAse Z αντίστοιχα (Levinger et al 2004). Σε όλα τα θηλαστικά και στη *Drosophila*, όλα τα ώριμα μιτοχονδριακά mRNAs είναι μονοκιστρονικά, με εξαίρεση τα δικιστρονικά nd4/nd4l και atp8/atp6. Τα mRNAs είναι συνήθως πολυαδενυλιωμένα (Bobrwicz et al 2008) ενώ έχουν εντοπιστεί και μόρια χωρίς πολύ-A ουρές (Mercer et al 2011). Ένα ενδιαφέρον χαρακτηριστικό των μιτοχονδριακών mRNA είναι ότι αρκετά από τα κωδικόνια λήξης σχηματίζονται μέσω της πολυαδενυλίωσης (7 στον άνθρωπο, 6 στο

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/06/2024 15:10:58 EEST - 3.135.219.133

σολωμό, τουλάχιστον 4 στη μύγα) και έτσι στερούνται τελείως 3΄αμετάφραστες περιοχές (Nagaike et al 2005, Stewart & Beckenbach 2009). Οι 5’ αμετάφραστες περιοχές φαίνεται να απουσιάζουν από όλα τα γονίδια. Τα μιτοχονδριακά rRNA επίσης πολυαδενυλιώνονται και, όπως και τα βακτηριακά rRNA, τροποποιούνται μέσω μεθυλίωσης και ψευδο-ουριδιλίωσης σε υψηλά συντηρημένες θέσεις (Ofengand & Bakin 1997). Όλα τα μιτοχονδριακά tRNA απαιτούν την προσθήκη του CCA στο 3’ άκρο τους από την μιτοχονδριακή tRNA νουκλεοτιδυλοτρανσφεράση (Nagaike et al 2001). Στη συνέχεια τροποποιούνται χημικά ώστε να αποκτήσουν τη σωστή διαμόρφωση, και να εξασφαλιστεί η αναγνώριση και η συμπληρωματικότητα των βάσεων (Helm & Attardi 2004, Messmer et al 2009). Οι τροποποιήσεις στη θηλιά του αντικωδικονίου δημιουργούν τις συνθήκες για την αναγνώριση πολλαπλών κωδικονίων από ένα tRNA (Agris et al 2007). Η μετα-μεταγραφική τροποποίηση των rRNA και tRNA είναι σημαντική για τη σωστή λειτουργία τους και υπάρχει ένας μεγάλος αριθμός τροποποιήσεων, τον οποίον υφίστανται κατά τη διάρκεια της ζωής τους (Decatur & Fournier 2002, Gustilo et al 2008). Τροποποιήσεις που περιλαμβάνουν μεθυλίωση και ψευδο-ουριδιλίωση έχουν βρεθεί στα ριβοσώματα σε μιτοχόνδρια θηλαστικών (Ofengand & Bakin 1997, Curgy 1985) και παρότι οι τροποποιήσεις είναι λιγότερες σε σχέσεις με τα βακτήρια, οι θέσεις τροποποίησης είναι αρκετά συντηρημένες, δηλώνοντας τον σημαντικό τους ρόλο (Sirum-Connolly et al 1995). Οι τροποποιήσεις των tRNA είναι σημαντικές για τη σωστή τους διαμόρφωση, αναγνώριση και συμπληρωματικότητα των βάσεων. Ο ρόλος των τροποποιήσεων αυτών μπορεί να είναι ακόμα πιο σημαντικός για τα μιτοχονδριακά tRNA των θηλαστικών που έχουν αναπτύξει ασυνήθη δομικά χαρακτηριστικά (Helm & Attardi 2004). Διάφορες τροποποιήσεις έχουν αναγνωριστεί και στους ανθρώπους (Helm & Attardi 2004, Messmer et al 209, Helm et al 1998, Juhling et al, 2009).

Μετάφραση του mtDNA

Τα μιτοχόνδρια διαθέτουν τη δική τους πρωτεϊνοσυνθετική μηχανή που χρησιμοποιείται για την παραγωγή των 13 υδρόφοβων πρωτεϊνων που κωδικοποιούνται από το mtDNA. Οι πρωτεΐνες αυτές έχουν μεμβρανικό εντοπισμό και εισάγονται στην μεμβράνη μέσω της πρόσδεσής τους στην ινσερτάση OXA1

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/06/2024 15:10:58 EEST - 3.135.219.133

(Wiedemann & Pfaner, 2017). Οι πρωτεΐνες αυτές φαίνεται να δρουν ως πυρήνες για τη συναρμογή των νέων συμπλόκων (Stroud et al, 2016, Timon-Gomez et al, 2018), τα οποία απαιτούν και πυρηνικές υπομονάδες, που εισάγονται και συναρμολογούνται με τη βοήθεια παραγόντων συναρμογής. Η διαδικασία της μετάφρασης έχει πολλές ομοιότητες με την αντίστοιχη των βακτηρίων, με μερικές βασικές διαφορές: τα ριβοσώματα των μιτοχονδρίων στα θηλαστικά έχουν αυξημένα ποσοστά πρωτεϊνών, τα μιτοχονδριακά mRNAs δεν έχουν 5' αμετάφραστη περιοχή, καλύπτρα και αλληλουχία Shine-Dalgarno, και έτσι η διαδικασία έναρξης της μετάφρασης παραμένει μοναδική αλλά ακόμα δεν έχει προσδιοριστεί πλήρως ο μηχανισμός (Ott et al, 2016). Παρομοίως με τα βακτήρια, η έναρξη απαιτεί tRNA της φορμυλο-μεθειονίνης, που διαχωρίζει την εναρκτήρια μεθειονίνη από αυτή που προστίθεται κατά την επιμήκυνση της νεοσυντιθέμενης πρωτεΐνης, καθώς το mtDNA κωδικοποιεί για ένα μοναδικό tRNA-Met. Δυσλειτουργίες στη διαδικασία της φορμυλίωσης οδηγούν σε κλινικούς φαινοτύπους που σχετίζονται με ανεπάρκειες της αναπνευστικής αλυσίδας (Tucker et al, 2011). Τα μιτοχόνδρια επίσης διαθέτουν ένα μοναδικό σετ από 17 άμινο άκυλο tRNA συνθετάσες που δρουν αποκλειστικά στα μιτοχόνδρια (Konovalova & Tyynismaa, 2013). Προσφάτως έχουν αναγνωριστεί επιπλέον πρωτεΐνες που ρυθμίζουν τη μιτοχονδριακή μεταγραφή. Αυτές περιλαμβάνουν τη μιτοχονδριακή ριβοσωμική πρωτεΐνη L12 (MRPL12) (Wang et al, 2007) και μέλη της οικογένειας των MTERF παραγόντων τερματισμού της μεταγραφής (Wenz et al, 2009, Kruse et al, 1989, Roberti et al, 2009). Επιπλέον, υπάρχουν αρκετές αναφορές πως πυρηνικοί μεταγραφικοί παράγοντες εντοπίζονται επίσης στα μιτοχόνδρια, όπου φαίνεται να εμπλέκονται άμεσα με τη μιτοχονδριακή μεταγραφή (Psarra & Sekeris, 2008). Στα μιτοχόνδρια της ζύμης έχουν αναγνωριστεί αρκετές πρωτεΐνες που αλληλεπιδρούν με την RNA πολυμεράση οδηγώντας στη σύζευξη της μεταγραφής με τη μετάφραση (Rodeheffer & Shadel, 2003) χωρίς να έχουν βρεθεί ομόλογες τους στους ανώτερους ευκαρυώτες με βάση την ομοιότητα της αλληλουχίας τους. Οι μελέτες για ανεύρεση παρόμοιων πρωτεϊνών σε ανθρώπινα μιτοχόνδρια με στρατηγικές που βασίζονται στη συγγένεια, οδήγησαν στην αναγνώριση της L12 ως μία πρωτεΐνη που προσδένεται στην πολυμεράση και ενισχύει τη μεταγραφή σε κύτταρα HeLa (Wang et al, 2007). Θεωρείται ότι η πρωτεΐνη αυτή πραγματοποιεί τη σύζευξη μεταξύ μεταγραφής και μετάφρασης μέσω

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/06/2024 15:10:58 EEST - 3.135.219.133

ταυτόχρονης πρόσδεσης της πολυμεράσης και των ριβοσωμάτων ή ενισχύει την μεταγραφική ενεργότητα, προσδενόμενη στην πολυμεράση (Wang et al, 2007).

Τα ριβοσώματα των μιτοχονδρίων συναρμολογούνται στο μιτοχονδριακό στρώμα μέσω μίας πολύπλοκης διαδικασίας, που περιλαμβάνει την επεξεργασία των rRNAs και την ωρίμανσή τους και τη συναρμολόγησή τους με τις ριβοσωμικές πρωτεΐνες στη μικρή και τη μεγάλη υπομονάδα (Fung et al, 2013). Έτσι, οι περίπου 80 ριβοσωμικές πρωτεΐνες κωδικοποιούνται από το πυρηνικό γονιδίωμα και εισάγονται στα μιτοχόνδρια, όπου συναρμολογούνται με τα δύο μιτοχονδριακά rRNA. Αυτό το γεγονός είναι μοναδικό για τη βιογένεση των ριβοσωμάτων των μιτοχονδρίων σε σύγκριση με τα βακτηριακά ή τα κυτταροπλασματικά ριβοσώματα, τα οποία συντίθενται και συναρμολογούνται στο ίδιο διαμέρισμα. Επιπλέον, αυτό το γεγονός απαιτεί τη συντονισμένη έκφραση των πυρηνικών και μιτοχονδριακών γονιδίων. Με βάση αυτά, μπορούμε να θεωρήσουμε τη βιογένεση των μιτοχονδριακών ριβοσωμάτων ως ένα δείκτη της γενικής ομοιόστασης του μιτοχονδρίου, καθώς αυτή η διαδικασία αποτελεί ένδειξη τόσο για την συγχρονισμένη έκφραση των απαραίτητων γονιδίων που χαρτογραφούνται σε δύο χωριστά γονιδιώματα όσο και για την αποτελεσματικότητα της εισόδου των πρωτεϊνών στο μιτοχόνδριο. Η διαδικασία της βιογένεσης των ριβοσωμάτων είναι επίσης μία ιδιαίτερα δαπανηρή διαδικασία από άποψη ενέργειας, οπότε φαίνεται ότι η συναρμογή των ριβοσωμάτων ελέγχεται προσεκτικά από κυτταρικά σηματοδοτικά μονοπάτια, τα οποία είναι σε θέση να εκτιμήσουν την ανάγκη για μιτοχονδριακή βιογένεση.

Αξίζει να σημειωθεί πως μόνο ένα ποσοστό των μιτοχονδριακών ριβοσωμικών πρωτεϊνών έχει ομόλογες αλληλουχίες στα βακτήρια (Sharma et al, 2003). Έτσι, το ριβόσωμα θεωρείται ένα μίγμα παλιών και καινοτόμων συστατικών, που είναι σε θέση να ρυθμίζουν το συντονισμό της μιτοχονδριακής μετάφρασης. Τα ριβοσωμικά rRNAs έχουν περιορισμένο μήκος σε σύγκριση με τα αντίστοιχα βακτηριακά μόρια, ενώ έχουν προστεθεί νέες πρωτεΐνες στο σύμπλοκο του ριβοσώματος, μετατρέποντας το από πλούσιο σε RNA σε πλούσιο σε πρωτεΐνες (O'Brien 2002, 2003). Ένα από τα πιο ακραία παραδείγματα της διαφοροποίησης αυτής είναι το ριβόσωμα των πρωτίστων που περιέχουν κινητοπλάστες, όπως το *Trypanosoma brucei* και *Leishmania tarentolae* (Zikova et al 2008, Sharma et al 2009). Το

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/06/2024 15:10:58 EEST - 3.135.219.133

μιτοχονδριακό ριβόσωμα στο τρυπανόσωμα περιλαμβάνει 56 πρωτεΐνες στη μικρή και 77 πρωτεΐνες στη μεγάλη ριβοσωμική υπομονάδα ενώ το ριβόσωμα του *E. coli* περιλαμβάνει 21 και 34 πρωτεΐνες αντίστοιχα. Επιπρόσθετα με τα βασικά στοιχεία της μικρής και μεγάλης ριβοσωμικής υπομονάδας, πολλοί άλλοι παράγοντες είναι απαραίτητοι για την έναρξη, επιμήκυνση και τερματισμό της μιτοχονδριακής μετάφρασης. Πρόσφατες μελέτες έχουν αναγνωρίσει αρκετές από αυτές τις πρωτεΐνες, και έχουν αποσαφηνίσει το ρόλο τους στη μετάφραση, αναδεικνύοντας και τη συσχέτιση τους με αρκετές ασθένειες. Οι παράγοντες έναρξης της μετάφρασης είναι συντηρημένες πρωτεΐνες που απαιτούνται για τη συναρμολόγηση του ριβοσώματος και την έναρξη της μετάφρασης. Αντίθετα με τα βακτήρια, που απαιτούν τρεις παράγοντες έναρξης (IF1-4), τα μιτοχόνδρια χρησιμοποιούν μόνο δύο τέτοιους παράγοντες (Koc & Spremulli 2002, Ma et al 1995). Αυτή η διαφορά φαίνεται να οφείλεται στο γεγονός ότι ο μιτοχονδριακός παράγοντας έναρξης 2 (IF2mt,MTIF2) μπορεί να αντικαταστήσει λειτουργικά τα IF1 και 2 στο *E.coli*, οπότε θεωρείται ότι εκτελεί το ρόλο και των δύο στα μιτοχόνδρια (Gaur et al 2008). Ο μιτοχονδριακός IF3 (IF3mt, MTIF3) εμπλέκεται στην έναρξη της μεταγραφής μέσω άμεσης πρόσδεσης στο tRNA της φόρμυλο-μεθειονίνης και παίζει ρόλο στην διάσταση του ριβοσώματος στις επιμέρους υπομονάδες (Christian & Spremulli 2009).

Ο παράγοντας επιμήκυνσης Tu (EF-Tu) αναγνωρίζει μόρια tRNA που έχουν υποστεί αμινο-ακυλίωση και τα μεταφέρει στο ριβόσωμα σε σύμπλοκα με GTP που απαιτείται για τη μεταφορά. Ο μιτοχονδριακός EF-Tu αλληλεπιδρά με αμινο-ακυλιωμένα tRNA (Hunter & Spremulli 2004) και είναι σημαντικός για την ταχύτητα της μεταγραφής (Nagao et al 2007). Επιπλέον, ο μιτοχονδριακός EF-Tu φαίνεται να έχει το ρόλο συνοδού μορίου και εμπλέκεται στην πρωτεϊνική αναδίπλωση στα μιτοχόνδρια (Suzuki et al 2007).

Στα βακτήρια, ο παράγοντας επιμήκυνσης G (EF-G) υδρολύει το GTP για να παρέχει την ενέργεια που απαιτείται για το βήμα μετατόπισης της επιμήκυνσης της πρωτεΐνης και παίζει σημαντικό ρόλο στη διάσταση του ριβοσώματος μέσω αλληλεπίδρασης με τον ριβοσωμικό παράγοντα ανακύκλωσης (RRF) (Savelsbergh et al 2009). Στα μιτοχόνδρια, χρησιμοποιούνται δύο ομόλογες πρωτεΐνες του EF-G, ο EF-G1 και ο EF-G2 που χρησιμοποιούνται στη μετατόπιση και την ανακύκλωση των ριβοσωμάτων

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/06/2024 15:10:58 EEST - 3.135.219.133

αντίστοιχα (Valente et al 2007, Coenen et al 2004).

Πριν από είκοσι χρόνια, ο Zhang και οι συνεργάτες του προσδιόρισαν δύο πιθανούς παράγοντες που απαιτούνται για τον τερματισμό της μιτοχονδριακής μετάφρασης: τον παράγοντα απελευθέρωσης των ριβοσωμάτων (mtRRF) και τον παράγοντα απελευθέρωσης της μεταγραφής (mtRF1) (Zhang & Spremulli 1998). Ο χαρακτηρισμός του mtRRF αποκάλυψε τον εντοπισμό του στα μιτοχόνδρια και τη συσχέτιση του με τα ριβοσώματα, ενώ σε knock-down της πρωτεΐνης αυτής προκλήθηκε μειωμένη μιτοχονδριακή μεταγραφή (Rorbach et al 2008). Επιπλέον, ο mtRRF αλληλεπιδρά με τον EF-G2 για να προωθήσει τη μεταγραφή και την διάσταση του ριβοσώματος (Tsuboi et al 2009). Στο μεταξύ, δύο μελέτες μέσω in vitro χαρακτηρισμού της πρωτεΐνης δεν κατάφεραν να επιβεβαιώσουν το ρόλο του mtRF1 (Soleimanoup Lichaet et al 2007, Nozaki et al 2008). Παρόλα αυτά, και οι δύο μελέτες αναγνώρισαν μία ομόλογη πρωτεΐνη, την MTRF1L, και ανέδειξαν την ικανότητά της να τερματίζει τη μετάφραση σε κωδικόνια UAA και UAG. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι 11 από τα 13 μιτοχονδριακά mRNA φέρουν UAA ή UAG για κωδικόνιο ληξης, με τα υπόλοιπα 2 να φέρουν ασυνήθιστα κωδικόνια λήξης AGA και AGG. Θεωρείται ότι ο mtRF1 που εντοπίζεται στα μιτοχόνδρια, έχει εξελιχθεί ώστε να τερματίζει τη μεταγραφή σε αυτά τα δύο ασυνήθιστα κωδικόνια λήξης (Soleimanourp & Plichaei, 2007).

Όπως γίνεται εύκολα κατανοητό, το πρωτέομα των μιτοχονδρίων δεν αποτελείται αποκλειστικά από τις 13 πρωτεΐνες που κωδικοποιούντα από το mtDNA. Η συνδυαστική χρήση πρωτεωμικής, γονιδιωματικής και βιοπληροφορικής έχει δείξει πως το μιτοχονδριακό πρωτέομα αποτελείται από περισσότερες από 1000 πρωτεΐνες, η σύνθεση των οποίων έχει μεγάλη πλαστικότητα και διαφέρει μέσα και ανάμεσα στα είδη ως αποτέλεσμα των κυτταρικών και ιστοειδικών απαιτήσεων των οργανισμών (Pagliarini et al, 2008, Sickmann et al, 2003, Forner et al, 2006). Η προέλευση του πρωτεόματος αποτελεί ένα μίγμα παλιών βακτηριακών και νέων ευκαρυωτικών πρωτεϊνών (Gabaldon & Huynen, 2004, Chacinska et al 2009, Szklarczyk & Huynen, 2010). Για παράδειγμα η αντιγραφή του mtDNA και η μεταγραφή του έχουν εξελικτική προέλευση από τον βακτηριοφάγο T-Odd (Lecrenier et al, 1997, Tiranti et al, 1997, Stumpf & Kopeland, 2011) ενώ η μιτοχονδριακή

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/06/2024 15:10:58 EEST - 3.135.219.133

μετάφραση έχει σαφή βακτηριακή προέλευση (Christian & Spremulli, 2012). Οι μελέτες που αφορούσαν το μιτοχονδριακό πρωτέομα και την προέλευσή του κατέληξαν από κοινού στο συμπέρασμα πως η προέλευση των πρωτεϊνών σχετίζεται και με το λειτουργικό τους ρόλο, με τις πρωτεΐνες προκαρυωτικού τύπου να συμμετέχουν στη βιοσύνθεση, τη βιοενεργητική και την πρωτεϊνοσύνθεση (Sicheritz-Ponten et al 1998, Gray et al 1999, Karlberg et al 2000) ενώ οι πρωτεΐνες ευκαρυωτικού τύπου συμμετέχουν κυρίως ως δομικές πρωτεΐνες και έχουν ρόλο στη ρύθμιση και στη μεταφορά (Cavalier-Smith, 1987). Σύμφωνα με το εύρημα αυτό, πολλές μιτοχονδριακές λειτουργίες, όπως η μετάφραση και το σύστημα αναπνοής, προέρχονται από το προγονικό α-πρωτεοβακτήριο. Παρόλα αυτά, τα ευρήματα πρέπει να αντιμετωπίζονται με ιδιαίτερη προσοχή, καθώς τα κριτήρια που χρησιμοποιήθηκαν για τις μελέτες αυτές ήταν ιδιαίτερα αυστηρά, επομένως και αξιόπιστα. Επομένως, οι μελέτες αυτές αποτελούν το “best case scenario”, όπου οι ομόλογες πρωτεΐνες εμφανίζουν και αυξημένη ομοιότητα στην αλληλουχία τους. Πολλά γονίδια που μεταφέρθηκαν μετά την ενδοσυμβίωση μπορεί να διαφοροποιήθηκαν αρκετά με το πέρασμα του εξελικτικού χρόνου, οπότε δεν είναι δυνατή η αναγνώριση της βακτηριακής τους προέλευσης με αυτή την προσέγγιση. Πιθανώς, το πιο ενδιαφέρον εύρημα των μελετών αυτών να είναι ο μεγάλος αριθμός γονιδίων που φαίνεται να στρατολογήθηκε από το πυρηνικό γονιδίωμα για να συμπληρώσει τα εναπομείναντα γονίδια του βακτηριακού προγόνου (Karlberg et al, 2000), τα οποία οδήγησαν στη μετατροπή των αρχικών πρωτο-μιτοχονδρίων σε ένα υποχρεωτικό κυτταρικό οργανίδιο.

Ο μιτοχονδριακός γενετικός κώδικας

Υπάρχουν αρκετά κωδικόνια που δεν αντιστοιχούν στα συνήθη αμινοξέα σε κάποια ή σε όλα τα μιτοχονδριακά γονιδιώματα. Η διαφοροποίηση αφορά μόνο κωδικόνια για τα οποία οι δύο πρώτες θέσεις δεν καθορίζουν το αμινοξύ και κωδικόνια που φέρουν μία πουρίνη στην τρίτη θέση τους. Η τροποποίηση των κωδικονίων φαίνεται να συνδέεται με τη χημική τροποποίηση των tRNAs (Santos et al 2004). Πράγματι, τα περισσότερα tRNAs που συνδέονται με ασυνήθιστα κωδικόνια φαίνεται να έχουν τροποποιηθεί χημικά, συνήθως στη θέση του αντικωδικονίου. Τα

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/06/2024 15:10:58 EEST - 3.135.219.133

σενάρια για τη σύνδεση της διαφοροποίησης του γενετικού κώδικα με τις τροποποιήσεις των tRNAs παρουσιάζονται εκτενώς στην ανασκόπηση των Watanabe και Yokobori (2011). Στον πίνακα 1 εμφανίζονται όλες οι διαφοροποιήσεις σε σχέση με τον καθολικό γενετικό κώδικα στα μιτοχόνδρια των ζωικών ειδών.

Πίνακας 1: Διαφοροποιήσεις απο τον καθολικό γενετικό κώδικα στα ζωικά μιτοχόνδρια

Κωδικόνιο	**Καθολικός γενετικός κώδικας**	**Μιτοχονδριακός γενετικός κώδικας**	**Παραδείγματα**
UGA	STOP	Trp	Μετάζωα
AUA	Ile	Met	Bilateria
AAA	Lys	Asn	Εχινόδερμα
AGA	Arg	Ser	Bilateria
AGA	Arg	Gly	Tunicata
AGA	Arg	STOP	Σπονδυλωτά
AGG	Arg	Ser	Bilateria
AGG	Arg	Ser/Lys	Αρθρόποδα
AGG	Arg	Gly	Tunicata
AGG	Arg	STOP	Σπονδυλωτά
UAA	STOP	Tyr	Νηματώδεις

Τα σύγχρονα μιτοχόνδρια

Μετά την ένωση των δύο πρωταρχικών κυττάρων όπως περιεγράφηκε παραπάνω, υπήρξε μία μεγάλη περίοδος κατά την οποία οι δύο οργανισμοί έπρεπε να συνεργαστούν ώστε να διαμοιραστούν οι κυτταρικές διαδικασίες και να καθιερωθεί τελικά ποιος από τους δύο θα διατηρήσει γονίδια και θα συντονίσει την παραγωγή πρωτεϊνών ώστε να υπάρχει εύρυθμη λειτουργία (Lane, 2011). Το αρχαιοβακτηριακό γονιδίωμα δημιούργησε τον πυρήνα και ανέλαβε όλα τα ρυθμιστικά κυτταρικά μονοπάτια και την πλειονότητα της μεταγραφής και της

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/06/2024 15:10:58 EEST - 3.135.219.133

μετάφρασης. Από την άλλη, το πρωτεοβακτήριο έδωσε γένεση στο μιτοχόνδριο το οποίο εξειδικεύτηκε κυρίως σε μεταβολικές διεργασίες (Cotton & McInerney 2010). Τα μιτοχόνδρια είναι υποκυτταρικά οργανίδια με διάμετρο 1 μm και το μήκος τους καθώς και η μορφολογία τους ποικίλλουν ανάλογα με τον κυτταρικό τύπο. Ο μιτοχονδριακός όγκος αντιπροσωπεύει το 10 με 40% του κυτταρικού όγκου, ανάλογα με τον κυτταρικό τύπο. Η λεπτομερής δομή των μιτοχονδρίων αποκαλύφθηκε με τη χρήση ηλεκτρονικής μικροσκοπίας. Τα μιτοχόνδρια περιβάλλονται από ένα σύστημα δύο μεμβρανών, μίας εξωτερικής και μίας εσωτερικής, οι οποίες διαχωρίζουν το εσωτερικό των μιτοχονδρίων που ονομάζεται μήτρα ή στρώμα (matrix) από το κυτταρόπλασμα. Η εσωτερική μεμβράνη σχηματίζει αναδιπλώσεις που ονομάζονται ακρολοφίες (cristae). Η εξωτερική μεμβράνη είναι διαπερατή από όλα τα μόρια με μικρό μοριακό βάρος (μικρότερο απο 5 kDa) επειδή περιέχει μία μεγάλη πρωτεΐνη, την πορίνη, που σχηματίζει υδρόφιλους διαύλους. Η εσωτερική μεμβράνη αναδιπλώνεται σε πολυάριθμες ακρολοφίες και περιέχει πρωτεΐνες, που διεκπεραιώνουν τις οξειδωτικές αντιδράσεις της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων (Electron transport chain, ETC) και τη σύνθεση του ATP και μεταφορικές πρωτεΐνες (περμεάσες), που επιτρέπουν τη δίοδο μεταβολιτών από και προς τη μήτρα. Το στρώμα περιέχει ένα πολύ πυκνό μίγμα ενζύμων, στα οποία περιλαμβάνονται τα ένζυμα που απαιτούνται για την οξείδωση του πυροσταφυλικού και των λιπαρών οξέων καθώς και ένζυμα του κύκλου του Krebs. Η μήτρα επίσης περιέχει αρκετά αντίγραφα του μιτοχονδριακου DNA, μόρια tRNA και ένζυμα που είναι απαραίτητα για την έκφραση των μιτοχονδριακών γονιδίων. Με λίγες μόνο εξαιρέσεις, τα μιτοχόνδρια μεταβιβάζονται μητρικά ενώ τα πατρικά μιτοχόνδρια δε μεταβιβάζονται ή μεταβιβάζονται ελάχιστα (Birky, 1995).

Οι μιτοχονδριακές λειτουργίες

Τα μιτοχόνδρια συμμετέχουν σε μερικές από τις πιο ζωτικές λειτουργίες του ευκαρυωτικού κυττάρου, όπως η παραγωγή ATP μέσω της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης (Oxidative Phosphorylation, OXPHOS), η ρύθμιση της πρόσληψης του ασβεστίου, η απόπτωση και ο μεταβολισμός απαραίτητων συστατικών (Wallace,

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/06/2024 15:10:58 EEST - 3.135.219.133

2007). Οι πρωτεΐνες του πυρήνα, που αποτελούν το μεγαλύτερο μέρος του μιτοχονδριακού πρωτεόματος, μεταφράζονται από τα κυτταροπλασματικά ριβοσώματα και εισέρχονται στα μιτοχόνδρια μέσω συστημάτων που εξαρτώνται από το ηλεκτροχημικό δυναμικό (Neupert & Herrmann, 2007, Schmidt et al, 2010). Οι μεταγραφικές, μετα-μεταγραφικές και μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις των πρωτεϊνών αυτών συμβαίνουν μέσω της δράσης διάφορων πρωτεϊνών και μονοπατιών. Η μεταγραφική ρύθμιση της μιτοχονδριακής βιογένεσης απαιτεί τη δράση της οικογένειας PCG-1, ως απόκριση στη διαθεσιμότητα θρεπτικών, όπως ο λόγος NAD+/NADH και AMP/ATP, καθώς και ως απόκριση σε περιβαλλοντικά σήματα (Jager et al, 2007, Jeninga et al, 2010). Οι αλληλεπιδράσεις της PCG-1 με μεταγραφικούς παράγοντες (NRF1, NRF2 και ERR) ορίζουν τα κύρια λειτουργικά μονοπάτια των μιτοχονδρίων. Μέσω της επαγωγής των πυρηνικών γονιδίων, που άμεσα σχετίζονται με την διατήρηση του mtDNA, αυτές οι αλληλεπιδράσεις συντονίζουν τη δράση των δύο γονιδιωμάτων (Scarpulla et al, 2012). Οι μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις, όπως η φωσφορυλίωση των πρωτεϊνών εισαγωγής απο κυτταροπλασματικές κινάσες, ρυθμίζουν το πρωτέομα σε απόκριση σε μεταβολικές απαιτήσεις (Schmidt et al, 2011). Έτσι, οι μιτοχονδριακές λειτουργίες και οι κυτταρικές λειτουργίες κατ' επέκταση εξαρτώνται από τον σωστό συντονισμό των αλληλεπιδράσεων μεταξύ των προϊόντων των γονιδίων που προέρχονται από τα δύο γονιδιώματα.

1. Η μιτοχονδριακή σηματοδότηση ασβεστίου

Τα μιτοχόνδρια βρίσκονται σε μία συνεχή επικοινωνία με το κυτταρόπλασμα για να είναι σε θέση να ανταποκριθούν στις ενεργειακές ανάγκες του κυττάρου μέσω της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης. Η επικοινωνία κυρίως επιτυγχάνεται μέσω της σηματοδότησης ασβεστίου μεταξύ του κυτταροπλάσματος και του στρώματος των μιτοχονδρίων. Η κυτταρική σηματοδότηση ασβεστίου είναι σημαντική για τις περισσότερες καταστάσεις ενεργοποίησης του κυττάρου: τα σήματα ασβεστίου διέπουν κυρίως διαδικασίες που σχετίζονται με αυξημένες ενεργειακές ανάγκες, όπως η έκκριση, η συστολή, η κινητικότητα, η ηλεκτρική διεγερσιμότητα και

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/06/2024 15:10:58 EEST - 3.135.219.133

σχετίζονται με αύξηση του κυτταροπλασματικού ασβεστίου. Τα μιτοχόνδρια έχουν ένα μονοπάτι πρόσληψης ασβεστίου, γνωστό ως MCU, το οποίο περιλαμβάνει ένα επιλεκτικό κανάλι ασβεστίου στην εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη (Baughman et al, 2011, De Stefani et al, 2011, Kirichok et al, 2004). Η αύξηση του κυτταροπλασματικού ασβεστίου οδηγεί στην είσοδο ασβεστίου στα μιτοχόνδρια μέσω της ηλεκτροχημικής βαθμίδωσης. Η αύξηση του ασβεστίου στο μιτοχονδριακό στρώμα ενεργοποιεί τρία ένζυμα κλειδιά του κύκλου του Krebs: τις αφυδρογονάσες του πυροσταφυλικού, του α-κετογλουταρικού και του NAD-ισοκιτρικού. Η ATP συνθάση φαίνεται επίσης να επάγεται από την αύξηση του μιτοχονδριακού ασβεστίου. Αυτές οι διαδικασίες συνολικά αυξάνουν τον εφοδιασμό της αναπνευστικής αλυσίδας με NADH, με επακόλουθη αύξηση της κυτταρικής αναπνοής και του ρυθμού σύνθεσης ATP (Duchen, 1992, Jouaville et al, 1999). Έτσι, μέσω αυτών των μονοπατιών το κύτταρο ανταποκρίνεται στις αυξημένες ενεργειακές απαιτήσεις. Η προσαρμογή της παραγωγής ενέργειας στις ενεργειακές ανάγκες δεν συμβαίνει άμεσα, αλλά απαιτείται ένα χρονικό διάστημα. Σχετικό παράδειγμα αποτελεί η προοδευτική αύξηση της μιτοχονδριακής βιογένεσης που προκαλείται από την άσκηση (Ojuka et al, 2002).

2. Μιτοχόνδρια και απόπτωση

Η απόπτωση παίζει σημαντικό ρόλο στα αρχικά αναπτυξιακά στάδια και αργότερα στη ζωή, με το να απομακρύνει τα κύτταρα που εμφανίζουν βλάβες χωρίς τις ενεργειακές απώλειες που προκαλούνται από τον κυτταρικό θάνατο. Η απόπτωση είναι μία διαδικασία που απαιτεί ενέργεια, και είναι μία καλά συντονισμένη διαδικασία σε αντίθεση με τη νέκρωση που συνήθως είναι αποτέλεσμα της μεταβολικής βλάβης, η οποία οδηγεί σε ενεργειακή κατάρρευση, σε βλάβες στα ιοντικά συστατικά και σε δομική αποδιοργάνωση. Ο κύριος μηχανισμός που οδηγεί την κυτταρική νέκρωση είναι το άνοιγμα του μιτοχονδριακού πόρου διαπερατότητας (mitochondrial permeability transition pore,mPTP). Το άνοιγμα του πόρου αυτού οδηγεί σε βλάβες στο δυναμικό της εσωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης, μειωμένη παραγωγή ATP και γρήγορη επαγωγή του κυτταρικού θανάτου. Έχει προταθεί πως ο πόρος σχηματίζεται κατά συνθήκη από πρωτεΐνες που έχουν

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/06/2024 15:10:58 EEST - 3.135.219.133

φυσιολογικά άλλους λειτουργικούς ρόλους στο μιτοχόνδριο. Μία από αυτές τις πρωτεΐνες είναι και η ANT, η οποία εμφανίζει μία ασβεστιο-εξαρτώμενη διαμόρφωση πόρου, το άνοιγμα του οποίου φαίνεται να αποτελεί στόχο ρύθμισης από φάρμακα που στοχεύουν την ANT.

Ο προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος ή απόπτωση συμβαίνει μέσω δύο μονοπατιών σηματοδότησης: 1. Του εξωτερικού μονοπατιού, που εμπλέκει υποδοχείς της κυτταρικής επιφάνειας οι οποίοι οδηγούν στην ενεργοποίηση της κασπάσης 8 και 2. Του εσωτερικού μονοπατιού, που απαιτεί την διαπερατότητα της εξωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης (Li et al, 1997). Ο πολύπλοκος ρόλος των μιτοχονδρίων στον κυτταρικό θάνατο των θηλαστικών έχει δειχθεί σε μία σειρά από μελέτες, στις οποίες προσδιορίστηκε πως συγκεκριμένες μιτοχονδριακές πρωτεΐνες μπορούν να επάγουν τον κυτταρικό θάνατο άμεσα (Susin et al, 1999, Li et al, 1997, Li et al, 2000). Υπό φυσιολογικές συνθήκες, αυτές οι πρωτεΐνες εντοπίζονται στο διαμεμβρανικό χώρο, και σε απόκριση σε σήματα θανάτου απελευθερώνονται στο κυτταρόπλασμα. Οι πρωτεΐνες αυτές επάγουν τον κυτταρικό θάνατο ενεργοποιώντας κασπάσες ή και αναστέλλοντας κυτταροπλασματικούς αναστολείς της απόπτωσης. Το εσωτερικό μονοπάτι λοιπόν εξαρτάται από μία ευαίσθητη ισορροπία ανάμεσα στα μιτοχόνδρια και διάφορους κυτταροπλασματικούς παράγοντες και αυτή η ισορροπία είναι κρίσιμη για την κυτταρική σταθερότητα.

Αποπτογενείς πρωτεΐνες και μιτοχόνδρια

Το κυτόχρωμα c, είναι ένα σημαντικό συστατικό της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων και ξεκινά τη διαδικασία της απόπτωσης όταν απελευθερωθεί από τα μιτοχόνδρια (Li et al, 1999). Με την απελευθέρωσή του, δεσμεύεται στον παράγοντα Apaf1, και το σύμπλοκο αυτό δεσμεύεται στο ATP για τη σταθεροποίηση του, τον ολιγομερισμό του και το σχηματισμό του αποπτοσώματος. Το σύμπλοκο αυτό είναι σε θέση να στρατολογήσει την προκασπάση 9, και να σχηματίσει την ενεργή μορφή του αποπτοσώματος (Rodriguez & Lazebnik, 1999). Η κασπάση 9 με τη σειρά της είναι σε θέση να ενεργοποιήσει την κασπάση 3, που είναι μία κασπάση τελεστής. Σε πειράματα απώλειας λειτουργίας του κυτοχρώματος c σε ποντίκια παρατηρήθηκε εμβρυονική θνησιμότητα, αλλά δεν ήταν δυνατό να εντοπιστεί εάν η θνησιμότητα

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/06/2024 15:10:58 EEST - 3.135.219.133

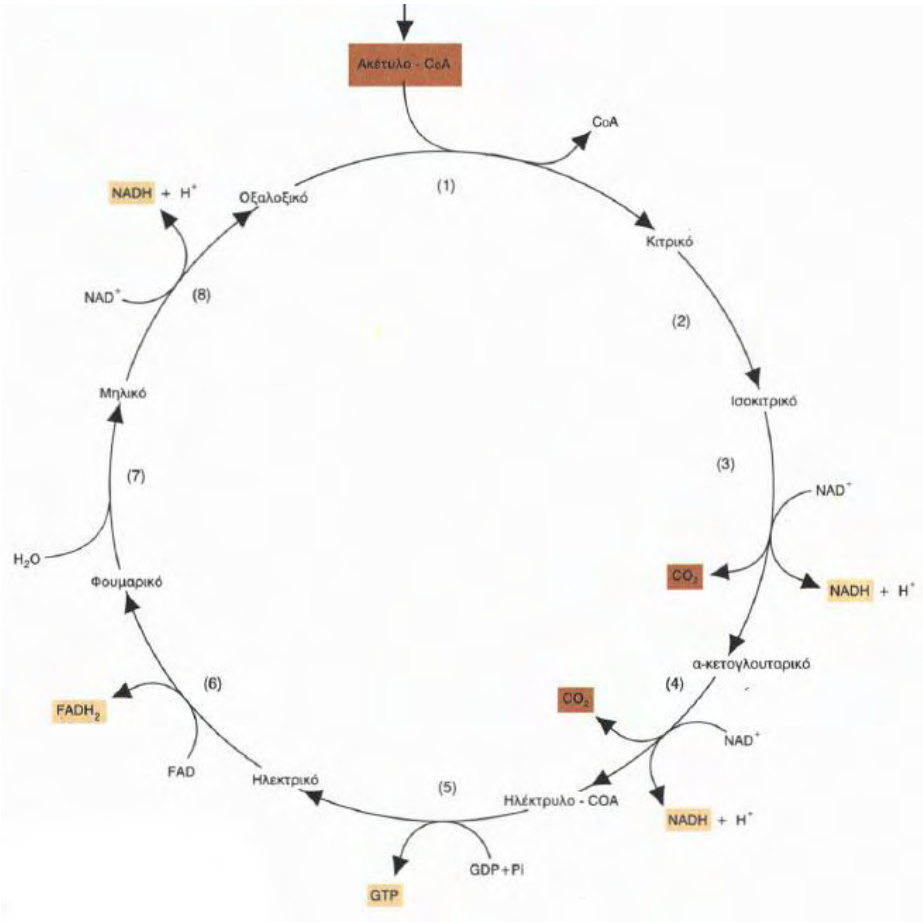
οφείλονταν στο ρόλο της πρωτεΐνης στην οξειδωτική φωσφορυλίωση ή στον κυτταρικό θάνατο (Li et al, 1997). Μελέτες σε εμβρυονικά βλαστοκύτταρα και ινοβλάστες από τα συγκεκριμένα ποντίκια ανέδειξαν τη σημασία του κυτοχρώματος c στην απόκριση σε σήματα θανάτου. Η έκθεση των κυττάρων αυτών σε ακτινοβολία UV, ακτινοβολία γ καθώς και η μεταχείρισή τους με χημειοθεραπευτικά φάρμακα δεν ήταν σε θέση να ενεργοποιήσει τις κασπάσες και έτσι τα κύτταρα εμφάνισαν αντοχή στην απόπτωση (Li et al, 2000).

3. Η μιτοχονδριακή βιοενεργητική

Τα μιτοχόνδρια φιλοξενούν τα κύρια ενζυμικά συστήματα που χρησιμοποιούνται για την οξείδωση των σακχάρων, των λιπιδίων και των πρωτεϊνών με σκοπό την παραγωγή ενέργειας με τη μορφή ATP (Ryan & Hoogenraad, 2007). Κάθε ένα από αυτά τα υποστρώματα μπορεί να καταβολιστεί προς ακέτυλο-CoA, το οποίο εισέρχεται στο πρώτο στάδιο των διεργασιών αυτών: τον κύκλο του κιτρικού οξέος που λαμβάνει χώρα στο μιτοχονδριακό στρώμα. Τα σάκχαρα εισέρχονται στα μιτοχόνδρια ως πυροσταφυλικό οξύ, αφού περάσουν τη διαδικασία της γλυκόλυσης στο κυτταρόπλασμα. Η πυροσταφυλική αφυδρογονάση καταλύει τη μετατροπή του σε ακέτυλο-CoA μέσα στα μιτοχόνδρια, ενώ υπάρχει μία πληθώρα ενζύμων για τη μετατροπή συγκεκριμένων αμινοξέων σε ακέτυλο-CoA, πυροσταφυλικό ή σε ενδιάμεσα μόρια του κύκλου του κιτρικού οξέος (Bartlett & Eaton, 2004, Maechler et al, 2006).

Στον κύκλο του κιτρικού οξέος, η ομάδα ακετυλίου του ακέτυλο-CoA μεταφέρεται στο οξαλοξικό, σχηματίζοντας το κιτρικό οξύ. Στη συνέχεια, ακολουθούν εφτά βήματα, μέσω των οποίων το κιτρικό οξειδώνεται τελικά προς οξαλοξικό, με τα δύο άτομα άνθρακα να μεταφέρονται σε δύο μόρια διοξειδίου του άνθρακα και τα ηλεκτρόνια που αφαιρούνται κατά την όλη διαδικασία μεταφέρονται σε συμπαράγοντες, όπως το NADH και το FADH2. Το οξαλοξικό στη συνέχεια είναι πάλι σε θέση να μπεί στον κύκλο ενώ η ενέργεια που απελευθερώνεται μεταφέρεται μέσω του NADH και του FADH2 στην αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων. Ο κύκλος παρουσιάζεται συνοπτικά στην εικόνα 3.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/06/2024 15:10:58 EEST - 3.135.219.133



Εικόνα 3: Ο κύκλος του Krebs ή κύκλος του κιτρικού οξέος

Η αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων, γνωστή και ως αναπνευστική αλυσίδα, αποτελείται από μία σειρά πολυπρωτεϊνικών συμπλόκων που είναι ενσωματωμένα στην εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη (Εικόνα 4). Τα ηλεκτρόνια που μεταφέρονται στην αλυσίδα από το NADH και το FADH2 χρησιμοποιούνται για να αντληθούν πρωτόνια από το στρώμα στον ενδομεμβρανικό χώρο, δημιουργώντας μία διαφορά δυναμικού κατά μήκος της εσωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης. Αυτή η διαφορά δυναμικού χρησιμοποιείται για την παραγωγή του ATP στο τελικό βήμα της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης.

Το NADH μεταφέρει ελεύθερη ενέργεια στην αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων μέσω της πρόσδεσης του στο μεγαλύτερο σύμπλοκο της αλυσίδας, την αφυδρογονάση του NADH ή σύμπλοκο I. Το σύμπλοκο αυτό, που έχει ένα χαρακτηριστικό σχήμα L, περιέχει μία υδρόφοβη περιοχή τοποθετημένη στην εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη και ένα υδρόφιλο βραχίονα, ο οποίος προβάλει στο μιτοχονδριακό

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/06/2024 15:10:58 EEST - 3.135.219.133

στρώμα, και περιέχει τη θέση σύνδεσης του NADH. Το σύμπλοκο αποτελείται από περισσότερες από 70 πρωτεΐνες και έχει μεγάλο μοριακό βάρος, σχεδόν 1MDa. Το NADH παρέχει δύο ηλεκτρόνια που προέρχονται από τον κύκλο του Krebs, σε μία προσθετική ομάδα φλαβινομονονουκλεοτιδίου που περιέχεται στον υδρόφιλο βραχίονα. Τα ηλεκτρόνια αυτά με τη σειρά τους μεταφέρονται διαμέσω του βραχίονα μέσω ομάδων σιδήρου-θείου στο συνένζυμο Q. Η μεταφορά των ηλεκτρονίων του NADH διαμέσω του συμπλόκου I είναι συνδεδεμένη με την μετακίνηση τεσσάρων πρωτονίων από το στρώμα στην εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη.

Ενώ το NADH πρέπει να συνδεθεί με το σύμπλοκο I για να μεταφέρει τα ηλεκτρόνια του στην αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων, η αφυδρογονάση του ηλεκτρικού, το ένζυμο που καταλύει την αναγωγή του FAD σε FAD2 στον κύκλο του κιτρικού οξέος, αποτελεί κομμάτι της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων και είναι το σύμπλοκο II με βάρος 123kDa. Το σύμπλοκο II εντοπίζεται επίσης στην εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη και περιέχει FAD ως προσθετική ομάδα μαζί με ομάδες σιδήρου-θείου, οι οποίες βοηθούν στη μεταφορά των ηλεκτρονίων στο συνένζυμο Q (Zhou et al, 2011). Το σύμπλοκο αυτό δεν αντλεί πρωτόνια και είναι το μοναδικό που κωδικοποιείται αποκλειστικά από πυρηνικά γονίδια.

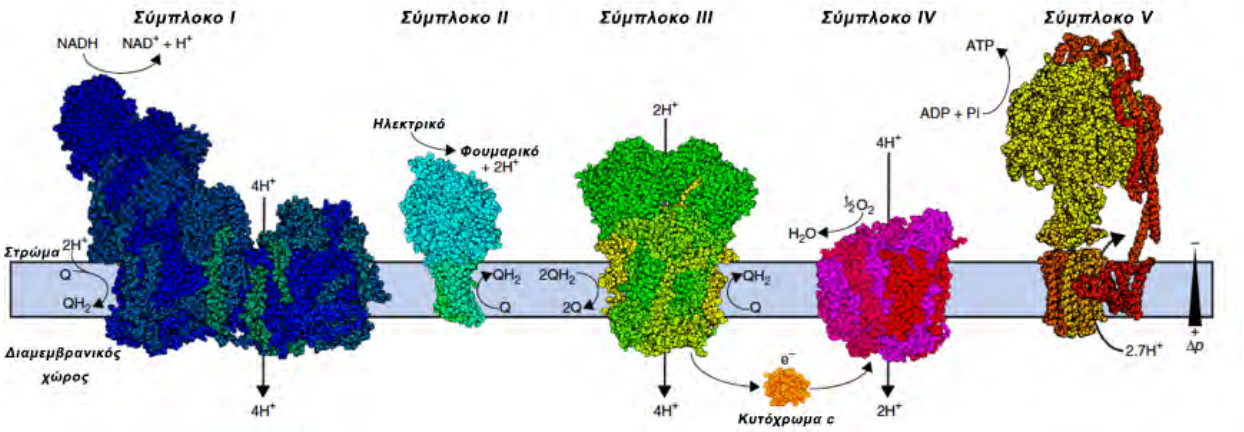
Το συνένζυμο Q, που ανάγεται είτε από το σύμπλοκο I είτε από το σύμπλοκο II, μπορεί να διαχέεται μέσω της εσωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης για να μεταφέρει τα ηλεκτρόνια στο σύμπλοκο III, την αναγωγάση του κυτοχρώματος c. Το ένζυμο αυτό που είναι το μικρότερο της αλυσίδας, οξειδώνει το συνένζυμο Q και μεταφέρει τα ηλεκτρόνια σε δύο μόρια κυτοχρώματος c, το οποίο επίσης παίζει κεντρικό ρόλο και στην απόπτωση (Ow et al, 2008). Τα δύο πρωτόνια που προκύπτουν από την οξείδωση του συνενζύμου Q αποθηκεύονται στον ενδομεμβρανικό χώρο, και δύο επιπλέον πρωτόνια μεταφέρονται από το μιτοχονδριακό στρώμα (Crofts, 2004). Η τελική μοίρα των ηλεκτρονίων που μεταφέρονται κατά μήκος της αλυσίδας είναι να μετατρέψουν το μοριακό οξυγόνο σε νερό. Αυτό συμβαίνει στο σύμπλοκο IV, την οξειδάση του κυτοχρώματος c. Τέσσερα μόρια κυτοχρώματος c μεταφέρουν ένα ηλεκτρόνιο το καθένα σε ένα από τα τέσσερα ενεργά κέντρα σιδήρου/χαλκού του ενζύμου, όπου καταλύεται η μετατροπή ενός μορίου οξυγόνου σε δύο μόρια νερού. Παράλληλα με την αντίδραση

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/06/2024 15:10:58 EEST - 3.135.219.133

αυτή, τέσσερα πρωτόνια αντλούνται από το μιτοχονδριακό στρώμα στην ενδομεμβρανική περιοχή (Liu et al, 2011).

Μετά την πραγματοποίηση του κύκλου του Krebs και της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων, η ενέργεια που έχει αποθηκευτεί στους δεσμούς των υποστρωμάτων πρέπει να μετατραπεί σε ATP, μέσω της σύζευξης του μεμβρανικού δυναμικού με την φωσφορυλίωση της διφωσφορικής αδενοσίνης (ADP) (Rich, 2003). Η σύζευξη αυτή προτάθηκε αρχικά από τον Peter Mitchell το 1961, και για την πρόταση αυτή του απονεμήθηκε το βραβείο Νόμπελ Χημείας το 1978 (Mitchell, 1961). Το τελικό ένζυμο που είναι υπεύθυνο για την οξειδωτική φωσφορυλίωση είναι η ATP συνθάση (σύμπλοκο V), το οποίο αποτελείται από δύο περιοχές, την περιοχή F0 που εκτείνεται στην εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη και την περιοχή F1 που βρίσκεται στο μιτοχονδριακό στρώμα. Λόγω των δύο αυτών περιοχών, το ένζυμο επίσης ονομάζεται και F0-F1 ATPάση. Ο μηχανισμός δράσης της ATP συνθάσης αποκαλύφθηκε από τους Boyer και Walker, στους οποίους απονεμήθηκε το Νόμπελ Χημείας το 1997. Σύμφωνα με το μοντέλο αυτό, η ATP συνθάση δρα σαν μία περιστρεφόμενη μοριακή μηχανή. Ένας επιμηκυμένος περιφερικός βραχίονας αγκυροβολεί την κεφαλή της περιοχής F1 στην εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη για να σχηματιστεί η περιοχή στήριξης. Το διαμεμβρανικό κανάλι πρωτονίων της περιοχής F1 και μία προεκβολή της F0 περιοχής που εισέρχεται μέσα στην κεφαλή της F1 σχηματίζουν την περιστρεφόμενη περιοχή. Η στατική περιοχή της F1 περιέχει τις θέσεις πρόσδεσης για το ADP και τα φωσφορικά. Καθώς τα πρωτόνια, που έχουν εναποτεθεί στην εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη, ρέουν διαμέσω της περιοχής F0, προκαλείται μία περιστροφή, η οποία δημιουργεί δομικές αλλαγές, οι οποίες επάγουν την σύνδεση του ADP με τα φωσφορικά για τη δημιουργία ATP (Nakamoto et al, 2008). Σε κάθε περιστροφή παράγονται τρία μόρια ATP. Ο αριθμός των πρωτονίων που εκτιμάται ότι απαιτούνται για να παραχθεί ένα μόριο ATP ποικίλλει από δύο μέχρι 5 (Ferguson, 2010). Εκτιμάται ότι για κάθε μόριο NADH που εισέρχεται στην αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων παράγονται 3 μόρια ATP ενώ για το FADH2 παράγονται 2 μόρια ATP.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/06/2024 15:10:58 EEST - 3.135.219.133



Εικόνα 4: Η οξειδωτική φωσφορυλίωση (OXPHOS) (απο Letts et al 2017)

Συναρμογή των συμπλόκων της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης

Μελέτες στο ζυμομύκητα *S. cerevisiae* οδήγησαν στην κατανόηση τόσο των βασικών μηχανισμών που διέπουν τη συναρμολόγηση των συμπλόκων III, IV και V αλλά και στην ανακάλυψη πολλών παραγόντων συναρμογής, πολλοί από τους οποίους εμφανίζουν ορθόλογα γονίδια και στον άνθρωπο. Επειδή το σύμπλοκο I απουσιάζει απο τον οργανισμό αυτό, έχουν χρησιμοποιηθεί άλλοι οργανισμοί, όπως οι ασκομύκητες *Neurospora crassa* και *Yarrowia lipolytica*, ή ακόμα και θηλαστικά, όπως ο μόσχος (*Bos taurus*) ως μοντέλα για τη μελέτη της δομής και της διαδικασίας συναρμολόγησης του συμπλόκου I.

Σύμπλοκο I

Το σύμπλοκο I είναι το κύριο σημείο εισόδου των ηλεκτρονίων στην αναπνευστική αλυσίδα και είναι το μεγαλύτερο σύμπλοκο του OXPHOS, με μοριακό βάρος περίπου 980kDa. Αποτελείται απο 45 υπομονάδες, επτά από τις οποίες κωδικοποιούνται από τα μιτοχονδριακά ND γονίδια, ενώ οι υπόλοιπες 38 κωδικοποιούνται από το πυρηνικό DNA. Το σύμπλοκο I έχει μία χαρακτηριστική δομή «L», και αποτελείται από δύο βραχίονες που τοποθετούνται κάθετα ο ένας στον άλλο: (α) τον υδροφοβικό βραχίονα, που εντοπίζεται μέσα στην εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη και περιέχει τις υπομονάδες που κωδικοποιούνται από το mtDNA και (β) τον υδρόφιλο περιφερικό βραχίονα που προεξέχει μέσα στη μιτοχονδριακή μήτρα. Αυτές οι δομές φαίνεται να «προστατεύουν» τα τρία δομικά

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/06/2024 15:10:58 EEST - 3.135.219.133

μοτίβα του συμπλόκου I, των οποίων η σύσταση έχει γίνει γνωστή από πειράματα υποκλασμάτωσης: (1) το μοτίβο της δεϋδρογονάσης, που είναι υπεύθυνο για την οξείδωση του NADH σε NAD+ και περιλαμβάνει τις υπομονάδες NDUFV2,NDUFV1 και NDUFS1, (2) το μοτίβο της υδρογονάσης που είναι υπεύθυνο για τη μεταφορά των ηλεκτρονίων στην ουβικινόνη και περιλαμβάνει τις υπομονάδες NDUFS2,NDUFS2,NDUFS7 και NDUFS8 και (3) το μοτίβο της πρωτονιακής μετατόπισης, που αποτελεί το μεγαλύτερο μέρος του μεμβρανικού βραχίονα και περιλαμβάνει κατ' ελάχιστο τις υπομονάδες που κωδικοποιούνται απο το mtDNA.

Το σύμπλοκο I αποτελεί ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα της ανάγκης επαναθεώρησης της σύστασης των συμπλόκων. Το βακτηριακό σύμπλοκο I αποτελείται από 14 υπομονάδες, οι οποίες επίσης εντοπίζονται και στο αντίστοιχο σύμπλοκο των θηλαστικών, με εφτά από τις υπομονάδες αυτές να κωδικοποιούνται από το μιτοχονδριακό γονιδίωμα. Επιπλέον 18 υπομονάδες του συμπλόκου I στα θηλαστικά φαίνεται να είναι ειδικές προσθήκες στους ευκαρυώτες και να υπάρχουν και στον τελευταίο ευκαρυωτικό κοινό πρόγονο, επειδή εμφανίζονται καθολικά στους ευκαρυώτες αλλά όχι στα βακτήρια. Άλλες δεκατρείς υπομονάδες του συμπλόκου I φαίνεται να εμφανίζουν μία πολύ συγκεκριμένη φυλογενετική κατανομή, έχοντας αναγνωριστεί αρχικά μόνο στα μετάζωα (Brandt 2006).

Σύμπλοκο II

Η κρυσταλλική δομή του συμπλόκου αποκαλύφθηκε από πειράματα κρυσταλλογραφίας σε ανάλυση 2,4 Å (Sun et al 2005). Το σύμπλοκο II αποτελείται από 4 πρωτεΐνες, δύο υδρόφιλες, μία φλαβοπρωτεΐνη και μία πρωτεΐνη σιδήρου-θείου, και από δύο διαμεμβρανικές πρωτεΐνες. Το σύμπλοκο αυτό συμμετέχει επίσης και στον κύκλο του Krebs και οι τέσσερις υπομονάδες που το συνθέτουν κωδικοποιούνται αποκλειστικά από πυρηνικά γονίδια (SDHA-SDHD). Το σύμπλοκο εμφανίζει μεγάλη ομολογία με ένα μεγάλο αριθμό βακτηριακών ενζύμων SQRs (succinate ubiquinone reductases) και ιδιαίτερα με αυτές των α-πρωτεοβακτηρίων που θεωρούνται οι πρόγονοι των μιτοχονδρίων (Andersson et al 1998). Η μικρή συχνότητα των κλινικών φαινοτύπων που σχετίζονται με το σύμπλοκο II, η απουσία ενεργότητας άντλησης πρωτονίων και η απουσία μιτοχονδριακών υπομονάδων είναι

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/06/2024 15:10:58 EEST - 3.135.219.133

υπεύθυνα για τις λίγες διαθέσιμες πληροφορίες σχετικά με τη συναρμογή του συμπλόκου, παρότι είναι το μικρότερο σύμπλοκο της αλυσίδας. Το SDHB φαίνεται να παίζει κεντρικό ρόλο στη σταθεροποίηση του συμπλόκου, καθώς μεταλλάξεις σε κάθε SDH υπομονάδα οδηγούν στην απώλεια του SDHB (van Nederveen et al 2009). Το σύμπλοκο αυτό επίσης περιέχει αρκετές προσθετικές ομάδες, όπως μία ομάδα αίμης, τρία μόρια FAD και τρεις ομάδες Fe-S. Σύμφωνα με διαθέσιμες μελέτες, η προσθετική ομάδα της αίμης έχει κεντρικό ρόλο στην συναρμογή και τη σταθεροποίηση του συμπλόκου (Hagerhall & Hederstedt 1996).

Σύμπλοκο III

Στα θηλαστικά, κάθε μονομερές αποτελείται απο 11 διαφορετικές δομικές υπομονάδες. Οι τρεις από αυτές εμπεριέχουν τα κέντρα που είναι υπεύθυνα για τη μεταφορά των ηλεκτρονίων: το κυτόχρωμα b (mtCYTB), το κυτόχρωμα c1 (CYC1) και η πρωτεΐνη Rieske Fe-S (UQCRFS1 ή RISP). Ο ρόλος των υπολοίπων 8 υπομονάδων παραμένει ακόμα υπό μελέτη. Παρά το γεγονός ότι το σύμπλοκο III των θηλαστικών περιέχει μία επιπρόσθετη υπομονάδα (υπομονάδα 9) σε σύγκριση με τον ζαχαρομύκητα *S. cerevisiae* (Brandt et al, 1993), η δομική ομοιότητα μεταξύ των ενζύμων των ζυμομυκήτων και των θηλαστικών έχει καταστήσει το ένζυμο του ζυμομύκητα ως ένα πολύ χρήσιμο παράδειγμα για την κατανόηση της διαδικασίας συναρμολόγησης του συμπλόκου των θηλαστικών. Στον ζυμομύκητα, η συναρμολόγηση του CIII είναι μία δυναμική, σταδιακή διαδικασία που αρχίζει με το σχηματισμό τριών διαφορετικών υπομονάδων: κυτόχρωμα b, Qcr7p και Qcr8p, κυτόχρωμα c1, Qcr6p και Qcr9p και τέλος το υποσύστημα πρωτεϊνών που έχει το ρόλο του πυρήνα του συμπλόκου και αποτελείται από τις πρωτεΐνες Core1 και Core2. Αυτά τα υπο-σύμπλοκα συναρμολογούνται μαζί για να σχηματίσουν ένα πρώιμο σύμπλοκο του κυτοχρώματος bc1, στο οποίο τελικά προστίθενται η υπομονάδα Rieske Fe-S (RISP) και η Qcr10p (Cruciat et al, 1999, Zara et al, 2004).

Σύμπλοκο IV

Σύμφωνα με τη δομή του ενζύμου του μόσχου (*Bos taurus*), το CIV των θηλαστικών είναι ένα ετερομερές σύμπλοκο, που αποτελείται από 13 διαφορετικές

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/06/2024 15:10:58 EEST - 3.135.219.133

υπομονάδες (Tsukihara et al, 1996, Yoshikawa et al, 1998). Ο καταλυτικός πυρήνας του ενζύμου αποτελείται από τις υπομονάδες CO1 και CO2 που κωδικοποιούνται από το mtDNA και περιέχουν τις δυο ομάδες άιμης A (a και a3) και τα δύο κέντρα χαλκού (CuA και CuB) που είναι υπεύθυνα για τη μεταφορά ηλεκτρονίων. Μία τρίτη υπομονάδα που κωδικοποιείται απο το mtDNA (CO3) είναι μέρος του δομικού πυρήνα και μπορεί να παίζει ένα ρόλο στην άντληση πρωτονίων. Οι υπόλοιπες 10 υπομονάδες (COX4, COX5A, COX5B, COX6A, COX6B, COX6C, COX7A, COX7B, COX7C και COX8) κωδικοποιούνται από το πυρηνικό DNA και πρέπει να εισαχθούν, να υποβληθούν σε επεξεργασία και να συναρμολογηθούν μαζί με τις υπομονάδες που κωδικοποιούνται από το mtDNA. Η λειτουργία των πυρηνικά κωδικοποιημένων υπομονάδων είναι προς το παρόν άγνωστη, αλλά παίζουν ρόλο στη ρύθμιση του συμπλόκου (Arnold & Kadenbach, 1997) και στη σταθεροποίησή του. Στον άνθρωπο, υπάρχουν διαφορετικές ισόμορφες για τα γονίδια COX6A και COX7A σε διαφορετικούς ιστούς: ο τύπος της καρδιάς (H), ο οποίος υπάρχει στον σκελετικό και τον καρδιακό μυ και ο τύπος του ήπατος (L), ο οποίος υπάρχει στους εξω-μυϊκούς ιστούς (Grossman & Lomax, 1997). Έχει προσδιοριστεί επίσης μία εξειδικευμένη για τους όρχεις ισομορφή για το COX6B2, ενώ για το γονίδιο COX4 έχει επίσης προσδιοριστεί μια ισομορφή ειδική για τον πνεύμονα, αναδεικνύοντας έτσι την εντυπωσιακή λειτουργική πλαστικότητα του ενζύμου.

Σύμπλοκο V

Το CV των θηλαστικών είναι ένα σύμπλοκο με πολλές υπομονάδες που αποτελείται από δύο λειτουργικά μοτίβα, το υδρόφιλο F1, που είναι προσανατολισμένο προς την μήτρα και τα υδρόφοβο F0 που είναι ενσωματωμένο στη μεμβράνη. Τα F1 και F0 συνδέονται φυσικά μεταξύ τους μέσω δύο πρωτεϊνών. Το F1 περιέχει πέντε διαφορετικές υπομονάδες (3α, 3β, γ, δ και ε) και δρα ως η καταλυτική περιοχή της συνθετάσης του ATP. Το F0 αποτελείται από οκτώ υπομονάδες (a, b, c, d, e, f, g και A6L). Ο κεντρικός μίσχος περιέχει ένα υποσύνολο υπομονάδων F1 (γ, δ, και ε) και ο περιφερειακός μίσχος αποτελείται από τις υπομονάδες OSCP, F6, b και d (Collinson et al, 1994, Walker et al, 1995, Stock et al, 1999). Οι υπομονάδες α και A6L του F0 κωδικοποιούνται από τα γονίδια MTATP6 και

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/06/2024 15:10:58 EEST - 3.135.219.133

MTATP8 του mtDNA, αντίστοιχα. Από τους διάφορους παράγοντες που είναι γνωστό ότι είναι απαραίτητοι για τη συναρμολόγηση του CV σε ζυμομύκητες, μόνο δύο (ATP11 και ATP12) έχουν ταυτοποιηθεί στους ανθρώπους και έχουν αποδειχθεί ότι είναι λειτουργικοί (De Meirleir et al, 2004, Sperl et al, 2006, Wang et al, 2004). Στον *S. cerevisiae*, οι Atp11p και Atp12p προάγουν την συναρμολόγηση του F1, συνδέοντας τις β και α υπομονάδες, αντιστοίχως, εμποδίζοντας έτσι τον σχηματισμό μεγάλων, μη λειτουργικών συσσωματωμάτων από α και β υπομονάδας (Ackermann & Tzagoloff, 1990, Wang & Ackerman, 2000, Wang et al, 2000). Σε κύτταρα θηλαστικών, δεν έχουν εντοπιστεί ειδικοί παράγοντες στη συναρμολόγηση του F0 (Houstek et al, 2006).

Οξειδωτική φωσφορυλίωση και παραγωγή δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS)

Τα ηλεκτρόνια έχουν τη δυνατότητα να «ξεφύγουν» από τα σύμπλοκα της αλυσίδας μεταφοράς και να έρθουν σε άμεση επαφή με το οξυγόνο, δημιουργώντας υπεροξείδιο του υδρογόνου. Τα υπεροξείδια είναι δραστικές μορφές οξυγόνου και ιδιαίτερα τοξικά για το κύτταρο, προκαλώντας οξειδωτικό στρες. Το οξειδωτικό στρες έχει εμπλακεί σε πολλές παθολογικές καταστάσεις, όπως ο διαβήτης και η αθηροσκλήρωση, σε διάφορες νευροεκφυλιστικές ασθένειες, στον καρκίνο και θεωρείται ότι διαδραματίζει σημαντικό ρόλο και στη γήρανση (Brandt et al, 2004). Υπάρχουν δύο κύρια σημεία στην αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων στα οποία θεωρείται ότι παράγονται οι ROS, και αυτά είναι η θέση FN στο σύμπλοκο I και η θέση Qp στην εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη (Muller et al, 2004, Kussmaul & Hirst, 2006, Murphy, 2009, Pryde & Hirst, 2011). Έχει προταθεί πως η διάσταση του συμπλόκου I από το διμερές του συμπλόκου III οδηγεί σε αυξημένη παραγωγή ROS από το σύμπλοκο I (Lopez-Fabuel et al, 2016). Η διαρροή αυτή των ηλεκτρονίων όχι μόνο αυξάνει τις ROS αλλά μειώνει και την ποσότητα του ATP που παράγεται. Αυτός ο συνδυασμός αυξημένων ROS και μειωμένου ATP αποτελεί ένα κοινό έναυσμα για την απελευθέρωση του κυτοχρώματος c των μιτοχονδρίων, η οποία αποτελεί συνήθως το πρώτο βήμα για τον προγραμματισμένο .κυτταρικό θάνατο (απόπτωση) στα περισσότερα ευκαρυωτικά κύτταρα. Το έναυσμα της απόπτωσης επηρεάζει

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/06/2024 15:10:58 EEST - 3.135.219.133

αρνητικά την ανάπτυξη, οδηγώντας σε χαμηλή αρμοστικότητα, μειωμένη βιωσιμότητα, στειρότητα και σε αναπτυξιακές ανωμαλίες (Ellison & Burton, 2008)

Οξειδωτική φωσφορυλίωση: παραγωγή ενέργειας και θερμότητας

Η οξειδωτική φωσφορυλίωση παράγει τόσο ενέργεια όσο και θερμότητα, με τα επιμέρους ποσοστά να εξαρτώνται από την αποδοτικότητα της σύζευξης της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων με την ATP συνθάση (Lowell & Spiegelman 2000). Η θερμότητα παράγεται στα μιτοχόνδρια με μειωμένη σύζευξη και μπορεί να είναι ευνοϊκή για την προσαρμογή των οργανισμών σε κρύα περιβάλλοντα. Αντίθετα, η παραγωγή θερμότητας μπορεί να είναι επιβλαβής σε θερμότερα περιβάλλοντα, να καθιστά αναγκαία την επιπλέον πρόσληψη τροφής και να σχετίζεται με αυξημένο οξειδωτικό στρες λόγω αυξημένης παραγωγής ROS (Portner et al 1998, Brand 2000, Somero 2002, Fangue et al 2009, Stier et al 2014a, 2014b).

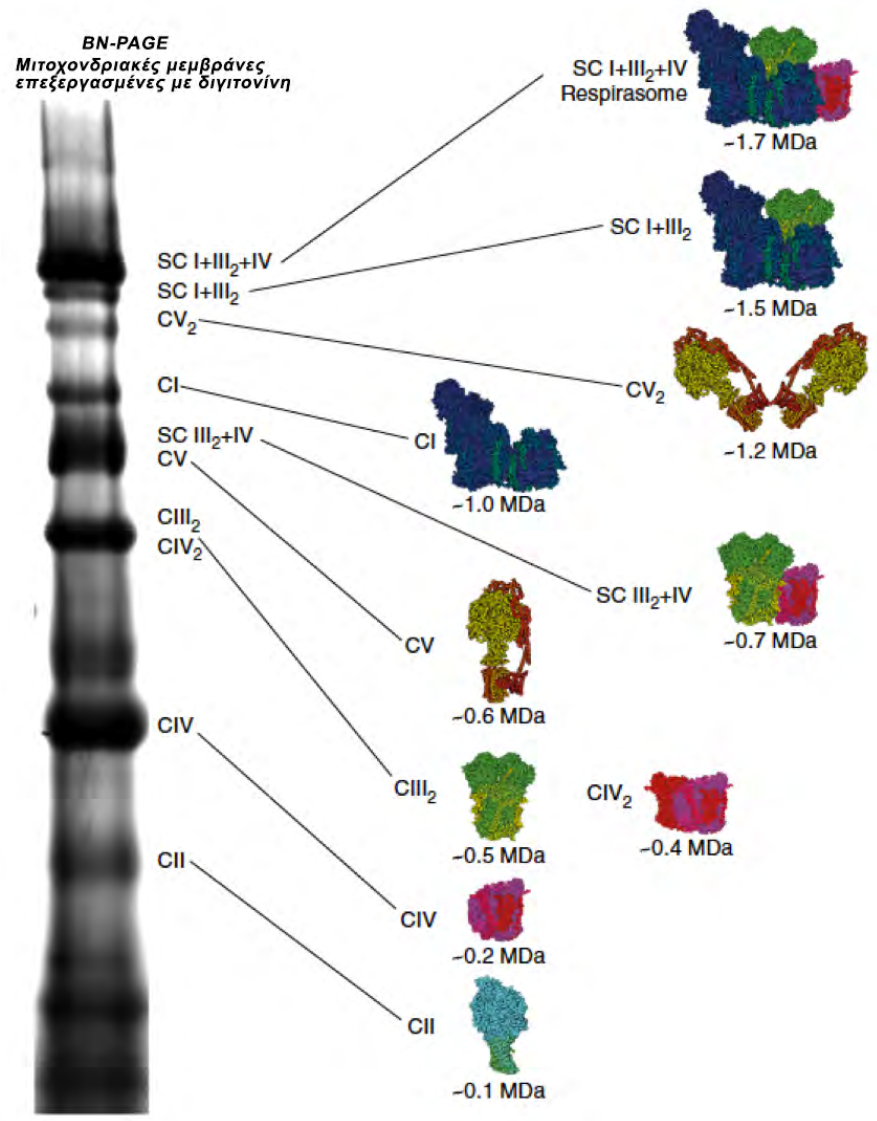
Οργάνωση των συμπλόκων του OXPHOS – Τα υπερσύμπλοκα (Super-Complexes, SC)

Σε παλαιότερες μελέτες, είχε προταθεί η ύπαρξη ενός «οξυσώματος» (oxysome) το οποίο θα περιείχε όλα τα σύμπλοκα του OXPHOS (Chance et al, 1963). Σε μελέτες που ακολούθησαν, χρησιμοποιήθηκε η διγιτονίνη με σκοπό να απομονωθούν τα σύμπλοκα από την εσωτερική μεμβράνη με ανάλυση Blue Native Page (εικόνα 5), και αποκαλύφθηκε η ύπαρξη υπερ-συμπλόκων με συγκεκριμένη στοιχειομετρία (Schagger & Pfeiffer, 2000).

Η πλειονότητα του συμπλόκου I βρίσκεται μαζί με ένα διμερές του συμπλόκου III και ένα του συμπλόκου IV, τα οποία μαζί με τον φορέα ηλεκτρονίων Q και το κυτόχρωμα c, αποτελούν όλα τα συστατικά που απαιτούνται για τη μεταφορά ηλεκτρονίων απο το NADH στο οξυγόνο και για αυτό το λόγο το υπερ-σύμπλοκο αυτό ονομάστηκε “respirasome”. Το υπερσύμπλοκο διαφέρει σαφώς από το προηγούμενο oxysome, καθώς δεν περιλαμβάνει τα σύμπλοκα II και V. ένα μικρότερο ποσοστό του συμπλόκου I βρίσκεται σε μορφή υπερσυμπλόκου με ένα διμερές του συμπλόκου III (Schagger & Pfeiffer, 2001). Επιπλέον, το διμερές αυτό μπορεί να σχηματίσει υπερ-σύμπλοκο και με το σύμπλοκο IV ανεξάρτητα από το σύμπλοκο I (Schagger & Pfeiffer,

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/06/2024 15:10:58 EEST - 3.135.219.133

2000, Iwata et al, 1998). Επίσης, εκτός από το σύμπλοκο III που είναι υποχρεωτικά σε διμερή μορφή (Iwata et al, 1998), τα σύμπλοκα IV και V μπορούν επίσης να σχηματίσουν διμερή (Tsukihara et al, 1996, Davies et al, 2011, Allegretti et al, 2015).



Εικόνα 5:Τα υπερσύμπλοκα της μιτοχονδριακής ETC. (απο Letts et al 2017)

Αξίζει να σημειωθεί πως ο αριθμός και η αναλογία των υπερσυμπλόκων διαφέρει ανάλογα με τον οργανισμό και τον ιστό και μπορεί επίσης να επηρεαστεί και από την απόκριση στις μεταβολικές ανάγκες του κυττάρου (Greggio et al, 2017). Οι λειτουργικοί ρόλοι των υπερσυμπλόκων παραμένουν αδιευκρίνιστοι και αρκετοί ερευνητές αμφισβήτησαν την σημασία των αποτελεσμάτων του BN-PAGE (Enriquez, 2016, Barrientos & Ugalde, 2013). Έχει δειχτεί πως τα απομονωμένα respirasomes

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/06/2024 15:10:58 EEST - 3.135.219.133

μπορούν να μεταφέρουν ηλεκτρόνια από το NADH στο οξυγόνο (η μεταφορά αυτή στην ουσία αποτελεί τη διαδικασία της αναπνοής, Acín-Pérez et al, 2008, Shinzawa-Itoh et al, 2016). Επιπλέον, υπάρχουν δεδομένα που υποστηρίζουν πως το διμερές του συμπλόκου III και το σύμπλοκο IV σταθεροποιούν το σύμπλοκο I στη μεμβράνη (Acin-Perez et al, 2004, Moreno-Lastres et al, 2012, Diaz et al, 2006,2012). Τα υπερσύμπλοκα επίσης μειώνουν την παραγωγή των ROS κατά τη διάρκεια της μεταφοράς ηλεκτρονίων (Maranzana et al, 2013, Lopez-Fabuel et al, 2016). Η ύπαρξη των υπερσυμπλόκων στηρίχτηκε επίσης και από την ανακάλυψη ειδικών παραγόντων συναρμογής (Lapuente-Brun et al, 2013, Chen et al, 2012, Ikeda et al, 2013). Αρχικά, είχε προταθεί πως μία πρωτεΐνη που εμφανίζει ομολογία με μία υπομονάδα του συμπλόκου IV, η SCAF1, ήταν απαραίτητη για τη δημιουργία του respirasome (Lapuente-Brun et al, 2013). Παρόλα αυτά, πρόσφατες μελέτες έδειξαν πως ο SCAF1 απαιτείται για τη σταθεροποίηση του διμερούς του συμπλόκου III και IV αλλά δεν είναι απαραίτητος για τη δημιουργία του respirasome (Mourier et al, 2014, Cogliati et al, 2016, Perez-Perez et al, 2016). Πρόσφατα δεδομένα προτείνουν πως ο σχηματισμός των υπερσυμπλόκων μπορεί να οφείλεται σε προσαρμογές σε αυξημένες ενεργειακές απαιτήσεις του κυττάρου (Greggio et al, 2017). Δεν έχει διευκρινιστεί, ωστόσο, εάν ο σχηματισμός αυτός βελτιώνει την ροή των ηλεκτρονίων στην αλυσίδα μεταφοράς, εάν μειώνει την παραγωγή ROS σε συνθήκες υψηλής απόδοσης στη μεταφορά ηλεκτρονίων (Greggio et al, 2017, Lopez-Fabuel et al, 2016) ή εάν αποτρέπει τη συσσωμάτωση των συμπλόκων που εμφανίζουν υψηλά επίπεδα έκφρασης (Blaza et al, 2014, Milenkovic et al, 2017). Ο σχηματισμός των υπερσυμπλόκων φαίνεται να αυξάνει την αποτελεσματικότητα της ETC μέσω της διοχέτευσης των υποστρωμάτων (Bianchi et al, 2004).

Μιτοχονδριακές λειτουργίες: Η ανάγκη για γονιδιωματική συνεργασία

Η πλειονότητα των δομών και των συστατικών των μιτοχονδρίων κωδικοποιείται από πυρηνικά γονίδια (N-mt genes, N- nuclear, mt-mitochondrial) (Calvo & Mootha, 2010). Αυτό έχει σαν συνέπεια, κάθε προϊόν του μιτοχονδριακού γονιδιώματος να πρέπει να λειτουργεί σε συνεργασία με προϊόντα του πυρηνικού γονιδιώματος (Woodson & Chory, 2008, Lane 2011). Η συμβατότητα των προϊόντων; μιτοχονδρίου-

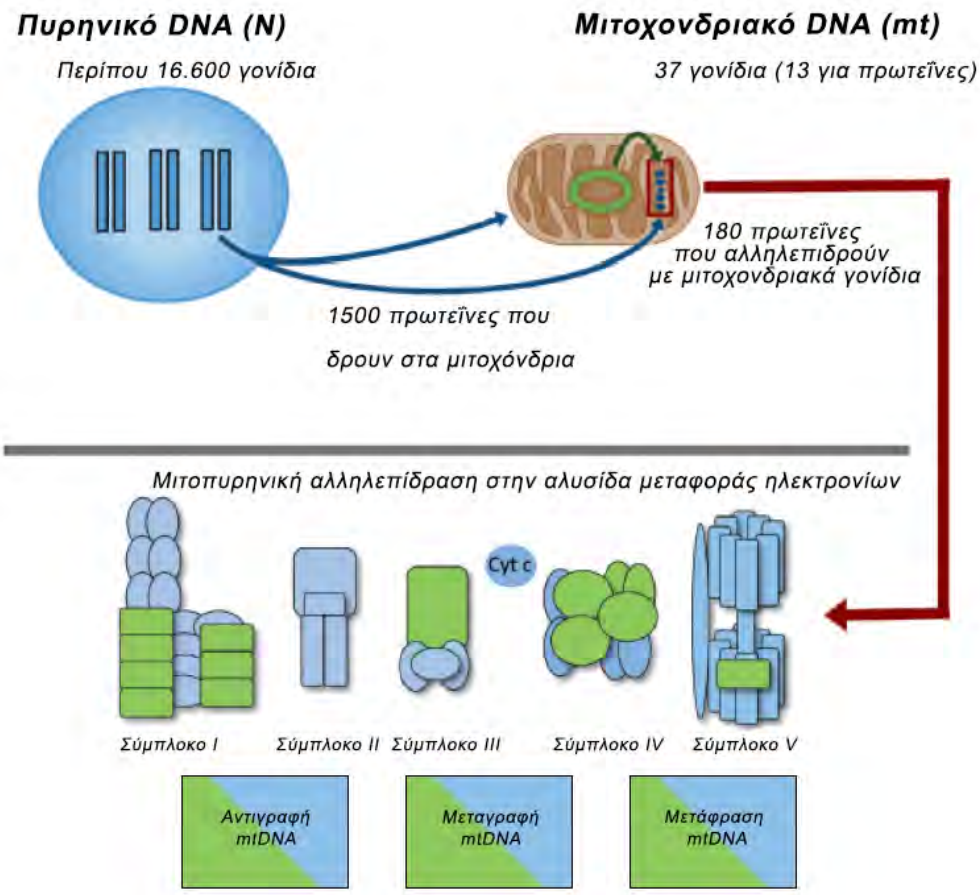
Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/06/2024 15:10:58 EEST - 3.135.219.133

πυρήνα ή μιτοπυρηνική συμβατότητα (mitonuclear compatibility) είναι ενδεικτική της έκτασης στην οποία τα αλληλεπιδρόντα στοιχεία πυρήνα και μιτοχονδρίου φτάνουν στο βέλτιστο λειτουργικό τους δυναμικό (Burton et al, 2013, Meiklejohn et al, 2013). Επειδή τα μιτοχονδριακά γονίδια κωδικοποιούν κυρίως για υπομονάδες των συμπλόκων του OXPHOS, οι συνέπειες της συμβατότητας αντανακλώνται στην κυτταρική αναπνοή, την βασική βιοχημική διεργασία της ευκαρυωτικής ζωής. Τα επίπεδα της συμβατότητας των δύο γονιδιωμάτων αφορούν τέσσερις διαφορετικές κατηγορίες αλληλεπιδράσεων:

1. Η μιτοχονδριακή RNA πολυμεράση - οι μιτοχονδριακοί μεταγραφικοί παράγοντες που κωδικοποιούνται από το πυρηνικό γονιδίωμα και το μιτοχονδριακό DNA στη μεταγραφή των μιτοχονδριακών γονιδίων
2. Αμινοάκυλο-tRNA συνθετάσες του πυρηνικού γονιδιώματος - τα tRNAs του μιτοχονδριακού, στη φόρτωση του σωστού αμινοξέος στο tRNA, που αποτελεί σημείο-κλειδί για τη μιτοχονδριακή μετάφραση
3. Ριβοσωμικές πρωτεΐνες του πυρήνα - οι rRNA υπομονάδες του μιτοχονδρίου για την μετάφραση των μιτοχονδριακών γονιδίων σε πολυπεπτίδια και
4. Οι πυρηνικές - μιτοχονδριακές υπομονάδες που σχηματίζουν τα σύμπλοκα μεταφοράς ηλεκτρονίων και παραγωγής ATP μέσω της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης (Rand et al, 2004, Burton & Barreto, 2012).

Η συνεργασία μιτοχονδρίου-πυρήνα εμφανίζεται σχηματικά στην εικόνα 6.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/06/2024 15:10:58 EEST - 3.135.219.133



Εικόνα 6: Η λειτουργική συνεισφορά γονιδίων του πυρήνα στις μιτοχονδριακές λειτουργίες. *Με γαλάζιο συμβολίζονται τα πυρηνικά γονίδια και τα προϊόντα τους που συμμετέχουν στην μιτοχονδριακή λειτουργία. Με πράσινο συμβολίζονται τα προϊόντα των μιτοχονδριακών γονιδίων που συμβάλλουν στην μιτοχονδριακή λειτουργία (από Hill,2017)*

Γονιδιωματική συνεργασία – Η έννοια της συνεξέλιξης

Η γενετική αρχιτεκτονική (δηλαδή ποια γονίδια συμμετέχουν) και ο γονιδιωματικός εντοπισμός (δηλαδή σε ποιο γονιδίωμα εντοπίζεται κάθε εμπλεκόμενο γονίδιο) των γονιδίων που εμπλέκονται στις διεργασίες αυτές είναι πολύ καλά συντηρημένα ανάμεσα στα μετάζωα (Wolstenholme, 1992). Αυτό που εμφανίζει μεγάλη ετερογένεια είναι τα επίπεδα του γενετικού πολυμορφισμού που παρατηρείται ανάμεσα στα γονίδια που κωδικοποιούν για τις λειτουργίες αυτές, και ιδιαίτερα για το OXPHOS, καθώς είναι η μόνη διεργασία που περιλαμβάνει πρωτεΐνες και από τα δύο γονιδιώματα. Πιο συγκεκριμένα, η διαφοροποίηση στην αλληλουχία του mtDNA είναι γνωστό εδώ και δεκαετίες ότι υπάρχει σε πολλά βιολογικά επίπεδα:

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/06/2024 15:10:58 EEST - 3.135.219.133

ανάμεσα σε είδη του ίδιου γένους, ανάμεσα σε πληθυσμούς ή ακόμα και ανάμεσα σε άτομα. Η διαφοροποίηση αυτή του mtDNA θεωρούνταν πως προέκυπτε από ουδέτερες διαδικασίες και ήταν επιλεκτικά ουδέτερη και πως δεν είχε κάποια εμπλοκή στις εξελικτικές διεργασίες των πληθυσμών. Τις δύο τελευταίες δεκαετίες υπήρξε μία σταδιακή μετατόπιση από αυτή την παραδοσιακή θεώρηση. Αυτή η μετατόπιση βασίστηκε κυρίως σε δεδομένα, από σπονδυλωτά και ασπόνδυλα είδη, που αναδείκνυαν το γεγονός ότι ο γενετικός πολυμορφισμός του mtDNA ήταν στενά συνδεδεμένος με φαινοτυπικές αλλαγές (Blier et al, 2001, Dowling et al, 2008, Rand, 2001, Ballard et al, 2004, Galtier et al, 2009). Τα περισσότερα από αυτά τα δεδομένα προέρχονταν από κλινικές μελέτες, όπου συγκεκριμένες μεταλλάξεις του mtDNA συσχετίζονταν με την εμφάνιση κλινικών φαινοτύπων που περιλάμβαναν δυσλειτουργίες στη μιτοχονδριακή λειτουργία (Wallace, 2010, MITOMAP (http://www.mitomap.org)).

Τα δύο γονιδιώματα, όπως έχει γίνει σαφές, πρέπει να συνεργαστούν για διάφορες μιτοχονδριακές λειτουργίες. Ειδικά στο επίπεδο της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης, η συνεργασία των δύο γονιδιωμάτων είναι εκτεταμένη. Το μιτοχονδριακό γονιδίωμα, όπως ήδη αναφέρθηκε, κωδικοποιεί για 13 υπομονάδες των συμπλόκων. Το πυρηνικό γονιδίωμα είναι υπεύθυνο για τη σύνθεση των υπολοίπων υπομονάδων των συμπλόκων της αναπνευστικής αλυσίδας: περίπου 39 για το σύμπλοκο I, 4 για το σύμπλοκο II, 10 για το σύμπλοκο III, 10 για το σύμπλοκο IV και 15 για το σύμπλοκο IV (Scarpulla, 2008). Στη συνεργασία αυτή, προκύπτει ένα σημαντικό εξελικτικό πρόβλημα: οι ρυθμοί μετάλλαξης του μιτοχονδριακού DNA είναι αρκετά μεγαλύτεροι σε σύγκριση με τους αντίστοιχους ρυθμούς του πυρηνικού DNA (Blier et al, 2001). Οι διαφορές αυτές στους ρυθμούς εξέλιξης απαιτούν μία στενή συνεξέλιξη/συμπροσαρμογή των δύο γονιδιωμάτων (Lane 2011b, Pierron et al 2013). Μία τέτοια συνεξελικτική διαδικασία ρυθμίζεται αυστηρά με σκοπό τη διατήρηση της δραστικότητας των μιτοχονδρίων, η οποία είναι απαραίτητη για τη βιωσιμότητα των κυττάρων, και κατ’ επέκταση και του οργανισμού.

Η θεωρία των συμπροσαρμοσμένων γονιδίων εμφανίστηκε σαν έννοια στα πλαίσια της αλληλεπίδρασης μεταξύ πυρηνικών γονιδίων (Dobzhansky, 1946, Orr 2005a), καθώς είχε δημιουργηθεί η πεποίθηση πως τα γονίδια που αλληλεπιδρούν και

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/06/2024 15:10:58 EEST - 3.135.219.133

αλληλεξαρτώνται πρέπει να συγκληρονομούνται. Υπάρχει μία ολοένα αυξανόμενη βιβλιογραφία που προτείνει πως οι πιο σημαντικές ομάδες συμπροσαρμοσμένων γονιδίων για τους ευκαρυώτες είναι τα μιτοχονδριακά και τα N-mt γονίδια (Lane, 2011, Burton et al, 2013, Foley et al, 2013). Οι συνέπειες της ασυμβατότητες μεταξύ των γονιδίων αυτών αφορούν τη μειωμένη σύζευξη της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων (Brand & Nicholls, 2011) που έχει σαν αποτέλεσμα την μειωμένη παραγωγή ATP και την αυξημένη παραγωγή ROS (Lane 2011, Barreton & Burton 2013). Τα δύο αυτά γεγονότα οδηγούν με τη σειρά τους σε μειωμένη αρμοστικότητα των οργανισμών (Ellison & Burton, 2006). Οι διαφορετικοί βιολογικοί ρυθμοί και απαιτήσεις μπορεί να οδηγήσουν σε επιλογή για στενότερη ή πιο χαλαρή σύζευξη της αναπνευστικής αλυσίδας (Lane 2011, 2014) αλλά η ανάγκη για συντονισμό των γονιδιωμάτων είναι καθολική. Η μειωμένη συμβατότητα των γονιδίων αυτών μπορεί να επηρεάσει αμετάκλητα την μεταγραφή και μετάφραση των μιτοχονδριακών γονιδίων, το οποίο επηρεάζει την κυτταρική αναπνοή (Ellison & Burton, 2008,Burton & Barreto, 2012). Κατά αυτό τον τρόπο οι πληθυσμοί μπορεί να αναπτύξουν μοναδικές αλλαγές στα συνεργαζόμενα αυτά γονίδια, και η συμπροσαρμογή των μιτοχονδριακών και πυρηνικών γονιδίων να σχηματίσει ένα σημαντικό φραγμό στην γονιδιακή ροή μεταξύ των πληθυσμών (Gershoni et al, 2009, Chou & Leu, 2010, Burton & Barreto, 2012).

Για να διατηρηθούν τα συμπροσαρμοσμένα μιτοπυρηνικά σύμπλοκα, τα γονίδια που τα απαρτίζουν πρέπει να συμμεταβιβάζονται από γενιά σε γενιά, στα όρια που αυτό είναι εφικτό όταν εμπλέκονται δύο γονιδιώματα (Rand et al, 2004, Rogell et al, 2014). Τα γονίδια του μιτοχονδρίου μεταβιβάζονται, κατά κανόνα, χωρίς ανασυνδυασμό και από τη μητρική γενεαλογία, και έτσι η συμμεταβίβαση των συμπροσαρμοσμένων γονιδίων συμβαίνει επίσης μέσω της ίδιας γενεαλογίας, μέσω της μεταβίβασης μίας συμβατής χρωμοσωμικής σειράς. Υπάρχουν σημαντικές ενδείξεις που προτείνουν πως ο χρωμοσωμικός εντοπισμός των N-mt γονιδίων παίζει σημαντικό ρόλο στην συμμεταβίβαση των γονιδίων αυτών (Rand et al, 2004, Drown et al, 2012), στην έκταση στην οποία τα γονίδια αυτά μπορούν να συνεξελιχθούν (Rand et al 2004, Hill et al 2014a) στην «γονιδιωματική σύγκρουση» (genomic conflict) μεταξύ των mt και N-mt γονιδίων (Drown et al, 2012, Crespi & Nosil, 2012), στην αποτελεσματικότητα

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/06/2024 15:10:58 EEST - 3.135.219.133

της επιλογής συντρόφου (Hill & Johnson, 2013) και στην επίδραση του υβριδισμού στην βιωσιμότητα των απογόνων (Burton et al, 2006, Foley et al, 2013, Hill & Johnson ,2013).

Χρωμοσωμικός εντοπισμός των N-mt γονιδίων και συμμεταβίβαση

Η σύνδεση των N-mt γονιδίων στα φυλετικά χρωμοσώματα μπορεί να επηρεάσει την πιθανότητα συμμεταβίβασης τους με το μιτοχονδριακό γονιδίωμα επειδή η άνιση κατανομή των φυλετικών χρωμοσωμάτων μεταξύ των δύο φύλων οδηγεί σε μία ενισχυμένη ή μειωμένη συγκληρονόμηση των φυλετικών γονιδίων και των μητρικά κληρονομούμενων μιτοχονδριακών γονιδίων. Η συμμεταβίβαση των γονιδίων διευκολύνεται αν τα N-mt γονίδια χαρτογραφούνται στο χρωμόσωμα X επειδή τα μιτοχονδριακά γονίδια κληρονομούνται μητρικά και το χρωμόσωμα X κληρονομείται κατά 67% επίσης από τη μητέρα. Το γεγονός αυτό έχει ως αποτέλεσμα τα μιτοχονδριακά γονίδια και τα N-mt γονίδια που είναι συνδεδεμένα με το X να συμμεταβιβάζονται από τις μητέρες στους θηλυκούς απογόνους (Drown et al, 2012). Αντίθετα, ο εντοπισμός των γονιδίων σε οποιοδήποτε αυτοσωμικό χρωμόσωμα ούτε διευκολύνει ούτε παρεμποδίζει την συμμεταβίβαση των γονιδίων, επειδή τα αυτοσωμικά και τα μιτοχονδριακά γονίδια μεταβιβάζονται ανεξάρτητα. Έτσι, λαμβάνοντας υπόψη το πλαίσιο της προώθησης της συμμεταβίβασης των συμπροσαρμοσμένων γονιδίων, τα πυρηνικά γονίδια θα ήταν προτιμότερο να χαρτογραφούνται στο χρωμόσωμα X (Rogell et al, 2014). Πάντως, πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει πως ο εντοπισμός των γονιδίων αυτών στο χρωμόσωμα X είναι πιο σπάνιος από ότι θα αναμένονταν λόγω της τυχαίας κατανομής των γονιδίων στα θηλαστικά και στον νηματώδη *C. elegans* αλλά δε διέφερε σημαντικά από το αναμενόμενο σε άλλα είδη που μελετήθηκαν (Drown et al, 2012, Dean et al, 2014).

Στα θηλαστικά, η υπο-εκπροσώπηση των γονιδίων αυτών στο X χρωμόσωμα μπορεί να είναι αποτέλεσμα της χαμηλής εκπροσώπησής τους στα αυτοσωμικά χρωμοσώματα τα οποία εξελίχθηκαν ώστε να δημιουργήσουν τα φυλετικά χρωμοσώματα (Dean et al, 2015). Μέχρι σήμερα, δεν έχουν βρεθεί γονίδια με υπερ-εκπροσώπηση στο X χρωμόσωμα σε κανένα taxon. Το φαινόμενο αυτό φαίνεται να

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/06/2024 15:10:58 EEST - 3.135.219.133

εξηγείται από το γεγονός πως η συμμεταβίβαση των γονιδίων αυτών δεν είναι ο μόνος παράγοντας που επηρεάζει τη χρωμοσωμική αρχιτεκτονική.

Χρωμοσωμικός εντοπισμός των N-mt γονιδίων και εξέλιξη

Η συμμεταβίβαση των N-mt και mt γονιδίων που προκύπτει από την σύνδεση με το χρωμόσωμα X αναγκαστικά συμπεριλαμβάνει και γενετική σύνδεση των γονιδίων αυτών και έτσι περιορίζει την ανεξάρτητη εξέλιξη τους (Rand et al, 2004, Hill, 2014). Η συνεξέλιξη των γονιδίων διευκολύνεται όταν τα αλληλεπιδρόντα γονίδια έχουν την δυνατότητα να εξελιχθούν ανεξάρτητα (Barton & Charlesworth, 1998). Η σύνδεση με το X και η συμμεταβίβασή τους, αναστέλλει τη συνεξέλιξη των αλληλοεπιδρώντων γονιδίων (Hill, 2014). Η συνεξέλιξη των γονιδίων αυτών είναι ζωτικής σημασίας επειδή, στους περισσότερους ευκαρυώτες, τα μιτοχονδριακά γονίδια εμφανίζουν πολύ υψηλότερους ρυθμούς εξέλιξης σε σύγκριση με τα πυρηνικά γονίδια (Lynch 1997). Με τον υψηλό εξελικτικό ρυθμό και την απουσία ανασυνδυασμού, το μιτοχονδριακό γονιδίωμα υπόκειται σε διαρκή γενετική διάβρωση λόγω μεταλλάξεων (Wallace, 2010). Έχει προταθεί πως τα N-mt γονίδια πρέπει διαρκώς να συνεξελίσσονται με τα μιτοχονδριακά γονίδια για να αντισταθμίζουν τις επιβλαβείς μιτοχονδριακές μεταλλάξεις (Osada & Akashi, 2012, Burton & Barreto, 2012, Levin et al, 2014).

Η συνεξέλιξη των γονιδίων μπορεί επίσης να παίζει σημαντικό ρόλο στην προσαρμογή σε νέα περιβάλλοντα (Pierron et al, 2012). Έτσι, τα πλεονεκτήματα της συμμεταβίβασης που προκύπτουν από τον εντοπισμό των γονιδίων στο X χρωμόσωμα φαίνεται να αντισταθμίζονται από την αρνητική επίδραση που έχει το γεγονός αυτό στην συνεξέλιξη των γονιδίων (Drown et al, 2012, Hill, 2014).

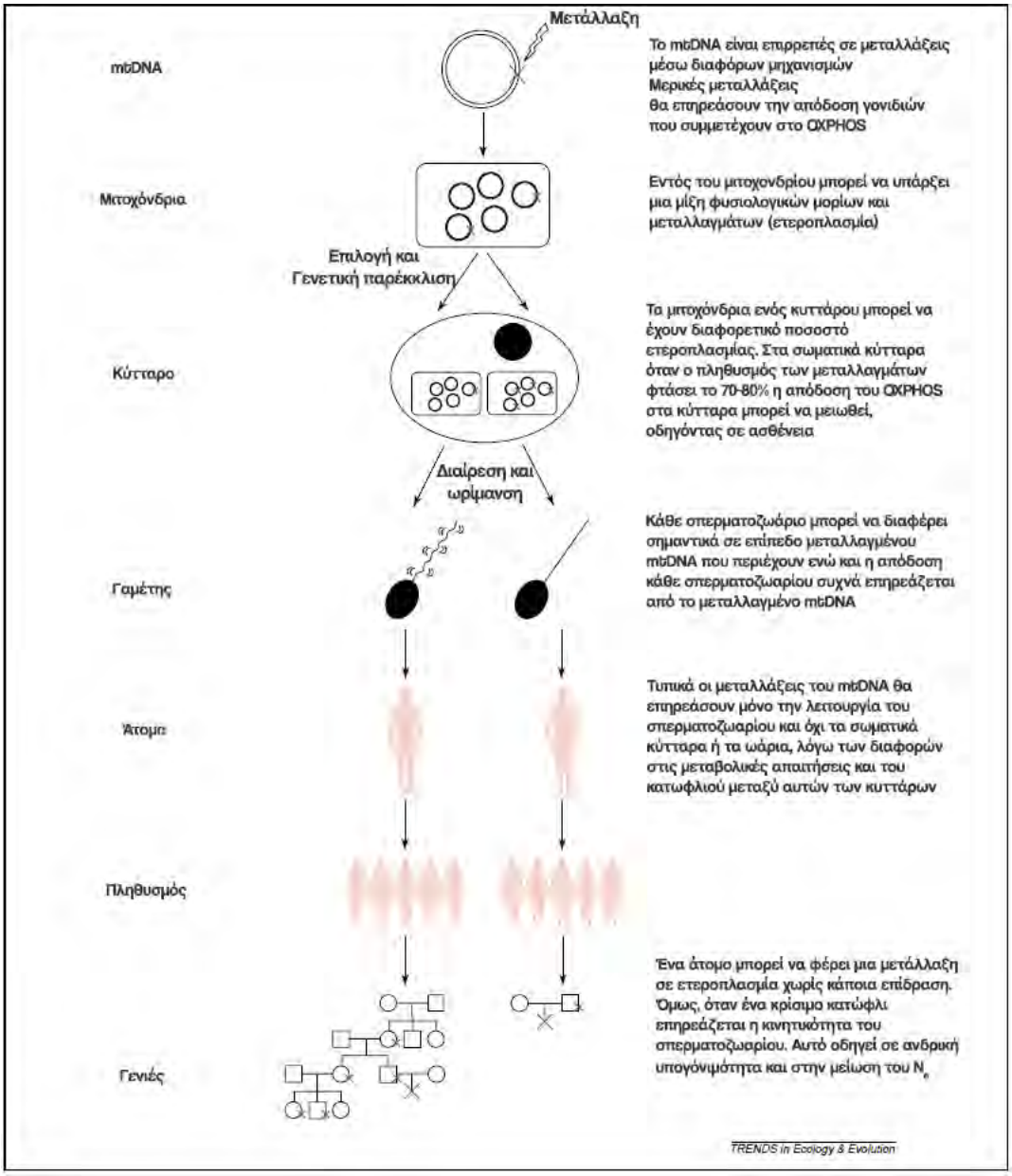
Συμμεταβίβαση γονιδίων και «γονιδιωματική σύγκρουση»: Το φαινόμενο της κατάρας της μητέρας

Μία άλλη αρνητική συνέπεια της συμμεταβίβασης των γονιδίων όταν αυτά χαρτογραφούνται στο χρωμόσωμα X είναι η «γονιδιωματική σύγκρουση» (Drown et al, 2012, Rogell et al, 2014). Η γονιδιωματική αυτή σύγκρουση είναι η αιτία του φαινομένου της “κατάρας της μητέρας” επειδή η μεταβίβαση γενετικών στοιχείων

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/06/2024 15:10:58 EEST - 3.135.219.133

μέσω της μητρικής γενεαλογίας μπορεί να οδηγήσει στην επιλογή μεταλλάξεων που είναι ωφέλιμες στα θηλυκά άτομα, άσχετα με την αρνητική επίδραση που μπορεί να έχουν στα αρσενικά άτομα (Frank, 1996, Gemmell et al, 2004). Η επίδραση του φαινομένου παρουσιάζεται στην εικόνα 7. Ενδείξεις για το φαινόμενο αυτό έχουν βρεθεί σε έντομα (Dowling et al, 2007a), σε όρνιθες(Froman & Kirby, 2005) καθώς και σε ανθρώπους (Holyoake et al, 2001, Ruiz-Pesini et al 2004). Το αποτέλεσμα αυτής της διαδικασίας μπορεί να είναι η συσσώρευση αλληλομόρφων που είναι επιβλαβή για τα αρσενικά άτομα στα μιτοχονδριακά και πυρηνικά γονίδια του Χ. Η δράση της επιλογής που θα οδηγήσει στην αποφυγή του φαινομένου αυτού θα είναι ίσως η επιλογή που ευνοεί την χαρτογράφηση των γονιδίων αυτών σε οποιοδήποτε άλλο χρωμόσωμα από το Χ (Drown et al 2012). Εναλλακτικά, έχει προταθεί πως η συμμεταβίβαση των αρσενικών και θηλυκών μιτοχονδρίων θα μπορούσε να ανακόψει φαινόμενα όπως αυτό της κατάρας της μητέρας (Kuijper et al 2015). Επίσης, η εξάλειψη των μεταλλάξεων αυτών μέσω επιλογής στη μητρική γενεαλογία έχει προταθεί σαν ένας μηχανισμός που θα μπορούσε να περιορίσει τις επιδράσεις του φαινομένου αυτού στα αρσενικά άτομα (Hedrick, 2012, Wade & Brandvain, 2009, Kuijper et al, 2015, Beekman et al, 2014, Dordevic et al, 2017).

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/06/2024 15:10:58 EEST - 3.135.219.133



Εικόνα 7: Η επίδραση του φαινομένου της κατάρας της μητέρας στα αρσενικά άτομα. (απο Gemmell et al, 2004)

Η πατρική κληρονόμηση των μιτοχονδρίων κυμαίνεται από μηδενική σε μερικά ζώα μέχρι άφθονη σε μερικά είδη φυτών (Gyllensten et al, 1991, McCauley, 2013). Η αύξηση της πατρικής κληρονόμησης των μιτοχονδρίων από γενιά σε γενιά αυξάνει την ένταση της επιλογής έναντι επιβλαβών για τα αρσενικά άτομα μεταλλάξεων, και υπάρχουν μοντέλα που δείχνουν ότι η μεταβίβαση των μιτοχονδρίων και των δύο φύλων θα μπορούσε να περιορίσει την εξέλιξη των επιβλαβών αλληλομόρφων για τα αρσενικά άτομα στο μιτοχονδριακό γονιδίωμα (Kuijper et al, 2015). Ο ρόλος της γονιδιωματικής σύγκρουσης στην μιτοπυρηνική συνεξέλιξη είναι ένα θέμα που

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/06/2024 15:10:58 EEST - 3.135.219.133

απασχολεί ολοένα και περισσότερο τον τομέα της εξελικτικής βιολογίας (Wolff et al 2014).

Συνεξέλιξη γονιδίων: Επιλογή συντρόφου και η επικράτηση της φυλετικής αναπαραγωγής

Η φυλετική αναπαραγωγή απαιτεί δύο συμμετέχοντες που συνεισφέρουν τα γενετικά τους στοιχεία, αυτό ωστόσο δεν απαιτεί και την ύπαρξη μόνο δύο αναπαραγωγικών τύπων. Παρότι το σύστημα με τους δύο αναπαραγωγικούς τύπους είναι αυτό που παρατηρείται σε όλους τους φυλετικά αναπαραγόμενους οργανισμούς, εμφανίζει συγκεκριμένα μειονεκτήματα. Με την ύπαρξη δύο φύλων, τα μισά άτομα του πληθυσμού αποκλείονται ως σύντροφοι (Lane, 2005). Στο σύστημα των δύο αναπαραγωγικών τύπων, εάν εμφανιστεί ένας τρίτος τύπος που είναι συμβατός και με τους δύο άλλους τύπους, τότε θα διατηρηθεί και θα εξαπλωθεί στον πληθυσμό (Fischer, 1958). Αντίστοιχα, μπορούν να εξελιχθούν και ένας τέταρτος τύπος, ένας πέμπτος και ούτω καθεξής δημιουργώντας διάφορα μοντέλα αναπαραγωγικών τύπων. Οπότε το ερώτημα που εύλογα δημιουργείται είναι γιατί το σύστημα με τους δύο τύπους επικράτησε ανάμεσα στους ευκαρυώτες;

Η απάντηση στο ερώτημα αυτό φαίνεται να είναι πως το συγκεκριμένο σύστημα είναι αυτό που εξασφαλίζει σε μεγαλύτερο βαθμό την μονογονεική κληρονόμηση των μιτοχονδριακών γονιδίων (Hoekstra, 2000). Η ενδεχόμενη γονιδιωματική σύγκρουση υπάρχει ήδη όταν ένα πυρηνικό γονιδίωμα συνυπάρχει με ένα μιτοχονδριακό γονιδίωμα. Όταν υπάρχουν περισσότεροι μιτοχονδριακοί απλότυποι με λειτουργικές διαφορές στις περιοχές που κωδικοποιούν για πρωτεΐνες, η γονιδιωματική σύγκρουση που προκύπτει ανάμεσα στα μιτοχόνδρια μπορεί να «εκτροχιάσει» τη λειτουργία του ατόμου (Innocenti et al, 2011, Lane, 2012). Ο Lane (2005, 2014) πρότεινε πως ο καλύτερος τρόπος για να επιτευχθεί η μιτο-πυρηνική συμβατότητα σε απογόνους που προέρχονται από δύο πυρηνικούς γενότυπους είναι να δοκιμαστεί ο νέος, ανασυνδυασμένος πυρηνικός γενότυπος με ένα μόνο μιτοχονδριακό απλότυπο. Η ύπαρξη ενός μοναδικού μιτοχονδριακού απλότυπου στα ζυγωτά βοηθά στην αποτελεσματικότερη επιλογή στο επίπεδο του ζυγωτού, ευνοώντας την επιλογή

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/06/2024 15:10:58 EEST - 3.135.219.133

υπερ του πιο προσαρμοσμένου απλοτύπου που οδηγεί και στην γονιδιωματική συμβατότητα. Ο Δρ. Hadjivasiliou και οι συνεργάτες του (2012, 2013) ανέπτυξαν μοντέλα, τα οποία έδειξαν πως η ύπαρξη δύο έναντι πολλαπλών τύπων ζευγαρώματος είναι η πιο αποτελεσματική μορφή για την μιτο-πυρηνική συμπροσαρμογή και για την διατήρηση της κυτταρικής αναπνοής σε ένα μεγάλο εύρος ταξινομικών βαθμίδων. Επιπλέον, τα μοντέλα προέβλεψαν τις καταστάσεις στις οποίες θα ευνοούνταν η κληρονόμηση των μιτοχονδριακών απλοτύπων και από τα δύο φύλα (Hadjivasiliou et al, 2013).

Η εξέλιξη των δύο αναπαραγωγικών τύπων που συμμετέχουν στην φυλετική αναπαραγωγή φαίνεται να ήταν ένα κρίσιμο βήμα για την εξέλιξη των ευκαρυωτών, επιτρέποντας τη διατήρηση των συμπροσαρμοσμένων συμπλόκων μιτο-πυρηνικών γονιδίων. Παρόλα αυτά, η συμπροσαρμογή βασίζεται και στην ύπαρξη γαμετών από γονιδιακές δεξαμενές οι οποίες έχουν συμβατά μιτοχονδριακά και πυρηνικά γονίδια (Gershoni et al, 2009, Hill, 2014). Η εξέλιξη αυτών των δύο αναπαραγωγικών τύπων οδήγησε αναπόφευκτα και στην φυλετική επιλογή – τον ανταγωνισμό δηλαδή για πρόσβαση σε άτομα του αντίθετου φύλου (Andersson, 1994, Parker, 2014). Επειδή τα θηλυκά άτομα φαίνεται να επενδύουν περισσότερους πόρους στους απογόνους σε σύγκριση με τα αρσενικά άτομα, φαίνεται να είναι συνήθως και το φύλο που επιλέγει και έτσι η επιλογή συντρόφου από τα θηλυκά άτομα φαίνεται να είναι η κινητήρια δύναμη της φυλετικής επιλογής (Andersson & Simmons, 2006). Η φυλετική επιλογή έχει τη δυνατότητα να προωθήσει την συμπροσαρμογή πέρα απο την κλασσική θεώρηση για αποφυγή της μίξης γονιδιωμάτων από διαφορετικά είδη.

Στους φυλετικά αναπαραγόμενους οργανισμούς, νέοι πυρηνικοί γονότυποι δημιουργούνται σε κάθε γενιά μέσω μεταλλάξεων και ανασυνδυασμών και έτσι προκύπτουν νέοι συνδυασμοί N-mt γονιδίων (Lane 2011, 2014). Κάποιοι από αυτούς τους γονότυπους είναι πιο συμβατοί με τα μιτοχονδριακά γονιδιώματα σε σύγκριση με άλλους (Dowling et al, 2006, Arnqvist et al, 2010). Τα θηλυκά άτομα, θα αποκομίσουν οφέλη αναγνωρίζοντας και αποφεύγοντας τους συντρόφους με λιγότερο λειτουργικά μιτοπυρηνικά γονίδια που προέρχονται από μεταλλάξεις, ανασυνδυασμούς ή γονιδιακή ροή. Έτσι, τα θηλυκά άτομα, επιλέγοντας αρσενικά άτομα με πλήρως λειτουργική κυτταρική αναπνοή ευνοούν την επιλογή συντρόφου

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/06/2024 15:10:58 EEST - 3.135.219.133

για χαρακτηριστικά γνωρίσματα της απόδοσης της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης (Hill, 2011, Hill & Johnson, 2013). Πρόσφατες εργασίες προτείνουν πως η ύπαρξη σημάτων για την αποδοτικότητα της κυτταρικής αναπνοής είναι ένα χαρακτηριστικό κοινό στοιχείο των αρσενικών κοσμητικών χαρακτηριστικών (Johnson & Hill, 2013, Hill, 2014), το οποίο όμως πρέπει να μελετηθεί εκτενέστερα. Όλες αυτές οι νέες θεωρίες για την επιλογή συντρόφου υπό το πρίσμα της μιτοπυρηνικής συμπροσαρμογής μπορούν να ενσωματωθούν ικανοποιητικά στα υπάρχοντα μοντέλα της φυλετικής επιλογής (Kuijper et al, 2012). Σύμφωνα με τις θεωρίες της φυλετικής επιλογής, τα θηλυκά άτομα φέρεται να επιλέγουν τα αρσενικά άτομα που φέρουν «καλά γονίδια» που σχετίζονται με την προσαρμογή (Hamilton & Zuk, 1982). Τα μοντέλα της μιτοπυρηνικής συμβατότητας δεν έρχονται να αντικαταστήσουν τα μοντέλα αυτά, αλλά δίνουν ιδιαίτερη έμφαση στην επιλογή γονιδίων που είναι απαραίτητα για την συμπροσαρμογή. Η αναγνώριση του είδους κατά τη διάρκεια της επιλογής συντρόφου στο πλαίσιο της διατήρησης της μιτοπυρηνικής συμπροσαρμογής φαίνεται να λήφθηκε υπόψη σχετικά πρόσφατα (Hill & Johnson, 2013, Hill, 2016) αλλά η ενίσχυση των ορίων των ειδών είναι η παλαιότερη εξήγηση για το γεγονός πως τα θηλυκά άτομα εκτιμούν τα κοσμητικά χαρακτηριστικά των αρσενικών κατά τη διάρκεια της επιλογής συντρόφου (Wallace, 1889). Η υπόθεση πως τα θηλυκά άτομα επιλέγουν συντρόφους του ίδιου είδους βασίστηκε σε παρατηρήσεις που έγιναν σε ορισμένα είδη πουλιών. Ο Mayr (Mayr, 1963) εκτίμησε πως σε μία μουσειακή συλλογή υπήρχε μόνο ένα δείγμα ανάμεσα σε 60000 δείγματα που είχε υβριδιακή προέλευση. Επιπλέον, έχει αναφερθεί εκτενώς στη βιβλιογραφία πως η επιλογή συντρόφου βασίζεται στην επιλογή κοσμητικών χαρακτήρων του ίδιου είδους παρά διαφορετικών ειδών (Saetre et al, 1997, Smadja et al, 2015, Freeman & Montgomery, 2017). Τα περισσότερα είδη πουλιών έχουν ένα μιτοχονδριακό γονότυπο που είναι ελάχιστα πολυμορφικός εντός του είδους αλλά διαφέρει αρκετά μεταξύ των ειδών (Bareira et al, 2016, Tavares & Baker, 2008).

Ο γενετικός πολυμορφισμός που προκύπτει από την φυλετική αναπαραγωγή μέσω του ανασυνδυασμού, είναι απαραίτητος ώστε τα άτομα να είναι σε θέση να ανταποκρίνονται σε περιβαλλοντικά ερεθίσματα (Crespi & Schwander, 2012). Αυτή η θεωρία είναι γνωστή και ως “The Red Queen Hypothesis” (Lively et al, 1990). Η

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/06/2024 15:10:58 EEST - 3.135.219.133

ύπαρξη του ανασυνδυασμού ενισχύει τη δυνατότητα δράσης της επιλογής σε αλληλόμορφα ενός τόπου ανεξάρτητα από τα αλληλόμορφα άλλων τόπων, οδηγώντας έτσι σε γενετικό πολυμορφισμό (Otto & Michalakis, 1998, Otto & Barton, 2001, McGaugh et al, 2012).

Μία νέα υπόθεση για τα πλεονεκτήματα της φυλετικής αναπαραγωγής που διατυπώθηκε από τους Havird, Hall και Dowling (2015) επικεντρώνεται στην μιτο-πυρηνική συνεξέλιξη και συγκεκριμένα στην επιτακτική ανάγκη, που υπάρχει για αντισταθμιστικές μεταλλάξεις στο πυρηνικό γονιδίωμα, οι οποίες θα αντισταθμίσουν τα βλαβερά αποτελέσματα των μιτοχονδριακών μεταλλάξεων (Gershoni et al, 2010, Zhang & Broughton, 2013, van der Sluis et al, 2015, Havird & Sloan, 2016, Osada & Akashi, 2012, Burton & Barreto, 2012). Τέτοιες αντισταθμιστικές μεταλλάξεις φαίνεται να συμβαίνουν όχι μόνο στο επίπεδο αλληλεπίδρασης πρωτεϊνων στην αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων, αλλά και στο επίπεδο αλληλεπιδράσεων πρωτεϊνών και DNA κατά την αντιγραφή του mtDNA (Ellison & Burton, 2010), στο επίπεδο αλληλεπίδρασης πρωτεϊνών-RNA στα μιτοχονδριακά ριβοσώματα (van der Sluis et al, 2015, Havird & Sloan, 2016, Osada & Akashi, 2012, Burton & Barreton 2012, Ellison & Burton, 2010, Barreto & Burton, 2013) και στο επίπεδο αλληλεπιδράσεων μεταξύ των μιτοχονδριακών tRNAs και των άμινοακυλο-tRNA συνθετασών (Adrion et al, 2015). Επειδή το μιτοχονδριακό γονιδίωμα εμφανίζει υψηλότερους εξελικτικούς ρυθμούς από αυτούς του πυρηνικού γονιδιώματος (Lynch, 1997) και δεν υπόκειται σε ανασυνδυασμό, εμφανίζει ένα μεγάλο γενετικό φορτίο στο μιτοχόνδριο, το οποίο επηρεάζει την αποτελεσματικότητα της αναπνοής και της προσαρμογής (Denver et al, 2000, James & Ballard, 2003). Αντισταθμιστικές αλλαγές στα γονίδια N-mt μπορούν να αυξήσουν την αρμοστικότητα των οργανισμών (Frank, 1996, Barreto & Burton, 2013b). Νεότερες μελέτες προτείνουν πως το κύριο πλεονέκτημα της φυλετικής αναπαραγωγής είναι η αυξημένη δυνατότητα που δίνεται στα N-mt γονίδια να διατηρήσουν τον ίδιο εξελικτικό ρυθμό με τα μιτοχονδριακά γονίδια μέσω γρήγορων γεγονότων ανασυνδυασμού πυρηνικών γονιδίων, μέχρι να βρεθεί ο κατάλληλος συνδυασμός που θα έχει αντισταθμιστικά αποτελέσματα (Havird et al, 2015). Με άλλα λόγια, η φυλετική αναπαραγωγή μέσω του ανασυνδυασμού επιτρέπει την εξέλιξη μεμονωμένων γονιδίων που προωθούν την συμπροσαρμογή

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/06/2024 15:10:58 EEST - 3.135.219.133

των γονιδίων, αποφεύγοντας έτσι γεγονότα επιλεκτικής σάρωσης (selective sweeps) που θα περιλάμβαναν ολόκληρα χρωμοσώματα (Lane, 2014).

Μιτοπυρηνική συνεξέλιξη και προσαρμογή

Σύμφωνα με αυτές τις νέες υποθέσεις, η ύπαρξη δύο αναπαραγωγικών τύπων και η επιλογή συντρόφου από τα θηλυκά άτομα εξελίχτηκαν ώστε να εξασφαλιστεί η μιτοπυρηνική συμπροσαρμογή με το πέρασμα των γενεών. Όμως, σε συνεχώς μεταβαλλόμενα περιβάλλοντα, η στατικότητα στους μηχανισμούς παραγωγής ενέργειας είναι ένα απίθανο σενάριο. Οι πληθυσμοί πρέπει να προσαρμοστούν στις περιβαλλοντικές αλλαγές, διαφορετικά θα υπάρξουν αρνητικές συνέπειες στην αρμοστικότητά τους (Orr 2005b). Μέχρι πρόσφατα, η διαφοροποίηση στο επίπεδο του μιτοχονδριακού γονιδιώματος θεωρούνταν ουδέτερη και η συνεισφορά του στις προσαρμοστικές αλλαγές σε απόκριση στις περιβαλλοντικές αλλαγές αμελητέα (Ballard & Kreitman 1995, Galtier et al 2009).

Παρόλα αυτά, υπάρχει μία εκτεταμένη βιβλιογραφία που υποστηρίζει πως τα μιτοχονδριακά γονίδια υπόκεινται στη δράση της επιλογής, τόσο της σταθεροποιούσας όσο και της κατευθύνουσας (Hahn 2008, Stoeckle & Thaler 2014, Garvin et al 2015) και πως η εξέλιξη των μιτοχονδριακών γονιδίων είναι θεμελιώδης για την προσαρμογή στα νέα περιβάλλοντα (Dowling et al, 2008, Wallace, 2013, Levin et al, 2014, Morales et al, 2015). Για παράδειγμα, η ικανότητα πτήσης πάνω από το όρος Ιμαλάια και η μετανάστευση σε απομακρυσμένες περιοχές στο είδος χήνας *Anser indicus* φαίνεται να προέκυψε από μία αμινοξική αντικατάσταση στο μιτοχονδριακό γονίδιο COX3, το οποίο κωδικοποιεί για μία υπομονάδα του πυρήνα του συμπλόκου IV του συστήματος μεταφοράς ηλεκτρονίων (Scott et al, 2011, 2015). Ο νέος μιτοχονδριακός γονότυπος επιτρέπει στο συγκεκριμένο είδος να προσαρμόζεται σε χαμηλές συγκεντρώσεις οξυγόνου στα πολύ μεγάλα υψόμετρα, σε αντίθεση με τα υπόλοιπα είδη της οικογένειάς του. Η συγκεκριμένη μελέτη αποτελεί ένα παράδειγμα ανάμεσα σε μία εκτενή βιβλιογραφία που συνδέει τις λειτουργικές αλλαγές των μιτοχονδριακών γονιδίων με καλύτερη ανταπόκριση στις περιβαλλοντικές συνθήκες και έχουν αναφερθεί σε ένα μεγάλο εύρος ειδών, συμπεριλαμβανομένου και του ανθρώπινου (Wallace, 2010b, 2013, Cheviron &

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/06/2024 15:10:58 EEST - 3.135.219.133

Brumfield, 2011, Wilson et al, 2013). Επιπλέον, η υπάρχουσα ποικιλομορφία στους μιτοχονδριακούς απλότυπους συνδέεται πλέον με την αναπνευστική λειτουργία και την αρμοστικότητα (Kurbalija et al, 2015). Η εξέλιξη των μιτοχονδριακών γονιδίων, όπως ήδη αναφέρθηκε, έχει συσχετιστεί με προσαρμογές σε θερμοκρασιακά περιβάλλοντα ή υψόμετρα, αλλά φαίνεται να σχετίζεται και με φαινόμενα ακτινωτής προσαρμογής. Πρόσφατες μελέτες έχουν συνδέσει τις λειτουργικές αλλαγές σε σημαντικά μιτοχονδριακά γονίδια με προσαρμογές που αφορούν το πέταγμα στις νυχτερίδες (Shen et al, 2010) ή την κατανάλωση μεγάλων θηραμάτων από είδη φιδιών (Castoe et al, 2008).

Προσαρμογή και ειδογένεση: Η συμβολή της γενετικής διαφοροποίησης του mtDNA

Η προσαρμογή στα περιβάλλοντα είναι μία διαδικασία πολύ στενά συνδεδεμένη με την ειδογένεση. Στους ευκαρυώτες, η διατήρηση των ξεχωριστών δεξαμενών συμπροσαρμοσμένων γονιδίων είναι ο θεμέλιος λίθος της θεώρησης των ειδών (Coyne & Orr, 2004, Price, 2007). Σύμφωνα με τα συμβατικά μοντέλα της ειδογένεσης, όταν οι πληθυσμοί είναι απομονωμένοι, η διαφοροποίηση στα γονιδιώματα οδηγεί στην αναπαραγωγική απομόνωση επειδή υπάρχει διάσπαση στα συμπροσαρμοσμένα συμπλέγματα γονιδίων, όταν αναμειγνύονται οι διαφοροποιημένοι γονότυποι στους υβριδικούς απογόνους (Coyne & Orr, 2004, Turelli & Moyle, 2007). Μέχρι προσφάτως, οι γονιδιωματικές αλληλεπιδράσεις, που ήταν υπεύθυνες για την εμφάνιση ασυμβατότητας και μειωμένης αρμοστικότητας στα υβρίδια, θεωρούνταν ότι περιλάμβαναν αποκλειστικά γονίδια του πυρήνα και οι μιτοχονδριακοί απλότυποι θεωρούνταν ουδέτεροι δείκτες της διαφοροποίησης (Gerber et al, 2001, Dowling et al, 2008).

Η εκτίμηση της συμπροσαρμογής των μιτοχονδριακών και μιτοπυρηνικών (αυτό ή θα είναι έτσι ή mt και n-mt) γονιδίων καθώς και η ταχύτητα με την οποία εμφανίζονται οι ασυμβατότητες δίνουν μία νέα προοπτική στην μελέτη των μηχανισμών ειδογένεσης. Σύμφωνα με την προοπτική αυτή, η έλλειψη της γονιδιακής ροής και οι υψηλοί εξελικτικοί ρυθμοί του μιτοχονδριακού γονιδιώματος θα οδηγήσουν σε γρήγορες και απρόβλεπτες διαφοροποιήσεις μεταξύ των πληθυσμών στα συμπροσαρμοσμένα γονίδια (Gershoni et al, 2009, Chou & Leu, 2010). Αυτοί οι νέοι

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/06/2024 15:10:58 EEST - 3.135.219.133

γονότυποι συμπροσαρμοσμένων γονιδίων θα είναι πλέον ασύμβατοι με τους γονότυπους ενός διαφοροποιημένου πληθυσμού θα δημιουργήσουν έτσι ένα μετασυζευκτικό απομονωτικό μηχανισμό στη γονιδιακή ροή με συνέπεια την ειδογένεση (Burton & Barreto, 2012). Με την έλλειψη της γονιδιακής ροής, οι πληθυσμοί του ίδιου είδους αναμένεται να εξελιχθούν μέσω ανεξάρτητων «οδών», με τον κάθε πληθυσμό να συσσωρεύει το δικό του σύνολο προσαρμογών στα αλληλεπιδρόντα γονίδια των δύο γονιδιωμάτων, με την εμφάνιση των επιβλαβών μεταλλάξεων στο mtDNA και την αντίστοιχη εμφάνιση των αλληλομόρφων του πυρήνα που θα αποκαθιστούν τη φυσιολογική λειτουργία. Το αποτέλεσμα αυτών των «οδών» θα είναι πως οι μιτοπυρηνικές αλλελεπιδράσεις και η λειτουργία του OXPHOS θα εξελιχθούν προς ένα βέλτιστο, το οποίο θα είναι εξειδικευμένο για κάθε πληθυσμό και έτσι οι μιτοπυρηνικές μονάδες του κάθε αρχικού πληθυσμού θα γίνονται ολοένα και πιο ασύμβατες καθώς οι πληθυσμοί αποκλίνουν, σύμφωνα με το μοντέλο ασυμβατότητας των Ντομπζάνσκυ-Μίλλερ για τα υβρίδια (ασυμβατότητες Dobzhansky-Muller), με την μιτοπυρηνική μονάδα πλέον να παίζει κεντρικό ρόλο στην εμφάνιση αυτών των ασυμβατοτήτων (Burton & Barreto, 2012). Γενικά, οι ασυμβατότητες DM μπορούν να αφορούν οποιοδήποτε ζευγάρι γονιδίων. Εάν ληφθεί υπόψη πως το mtDNA αποτελεί ένα πολύ μικρό ποσοστό των ευκυαρυωτικών γονιδιωμάτων, θα αναμενόταν οι ασυμβατότητες να εμφανίζονται κυρίως μεταξύ πυρηνικών γονιδίων και οι μιτοπυρηνικές ασυμβατότητες να είναι ασυνήθιστες. Για παράδειγμα, σε ένα οργανισμό με 20000 γονίδια που κωδικοποιούν για πρωτεΐνες από τα οποία τα 13 χαρτογραφούνται στο mtDNA, μόνο το 0,1 % όλων των αλληλεπιδράσεων θα ήταν μιτοπυρηνικές. Παρόλα αυτά, οι αλλεπιδράσεις αυτές έχουν αναγνωριστεί ως ένας σημαντικός παράγοντας που συνεισφέρει σε αναπαραγωγικούς φραγμούς σε διαφοροποιημένες ευκαρυωτικές γενεαλογίες. Επίσης, μελέτες σε είδη φυτών που αφορούσαν αναπαραγωγικούς φραγμούς και σχετίζονταν με ασυμβατότητες πλαστιδίων-πυρήνα αναδεικνύουν το ρόλο των κυτοπλασμικών-πυρηνικών αλληλεπιδράσεων στην ειδογένεση (Levin, 2003, Greiner et al, 2011). Οι παρατηρήσεις όλων αυτών των μελετών συνηγορούν πως τα κυτταροπλασματικά γονιδιώματα παίζουν σημαντικό και δυσανάλογο ρόλο στην αναπαραγωγική απομόνωση.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/06/2024 15:10:58 EEST - 3.135.219.133

Προσαρμογή και ειδογένεση: Η ενδοειδική διαφοροποίηση

Τα κλασσικά πειράματα διασταυρώσεων που ξεκίνησαν ακόμα και το 18^{ο} αιώνα από τον J.G. Kolreuter (Mayr, 1986), έδειξαν πως οι αναπαραγωγικοί φραγμοί που αποτρέπουν τον υβριδισμό μεταξύ απομονωμένων πληθυσμών είναι συχνά ασύμμετροι, δηλαδή η έκταση των ασυμβατοτήτων στους υβριδικούς απογόνους εξαρτάται από το ποιος πληθυσμός δρα ως πατρικός και ποιος ως μητρικός (Turelli & Moyle, 2007). Η επίδραση του μιτοχονδριακού DNA και άλλων κυτταροπλασματικών κληρονομήσιμων γονιδιωμάτων (πχ. Πλαστιδίων και βακτηριακών ενδοσυμβιωτών) αποτελούν ένα παράγοντα που επηρεάζει τις ασυμμετρίες στις διασταυρώσεις αυτές. Ο Δαρβινός (1859) ήταν ο πρώτος που επισήμανε αυτές τις ασυμμετρίες και προς τιμήν του το φαινόμενο αυτό ονομάστηκε «Δαρβινικό επακόλουθο» (“Darwin’s corollary”) (Turelli & Moyle, 2007).

Μελέτες σε είδη μοντέλα όπως κωπήποδα (Burton et al 2013), ζύμη (Chou & Leu, 2010), *Drosophila* (Sackton et al, 2003, Meiklejohn et al, 2013) και ιχθύες (Bolnick et al 2008) παρέχουν σημαντικές πληροφορίες για το πως οι ασυμβατότητες αυτές σε διασταυρώσεις μεταξύ διαφοροποιημένων πληθυσμών οδηγούν σε μειωμένη βιωσιμότητα των απογόνων, λειτουργώντας ως ένας απομονωτικός μηχανισμός.

Οι σημαντικότερες ενδείξεις για τη συμβολή της μιτοπυρηνικής συνεξέλιξης στην αρμοστικότητα των οργανισμών προέρχονται από μελέτες υβριδισμού στο κωπήποδο *Tigriopus californicus.* Σε πειράματα διασταυρώσεων μεταξύ κωπηπώδων που προέρχονταν από γεωγραφικά απομονωμένους πληθυσμούς, παρατηρήθηκε δραματική μείωση της αρμοστικότητας από την F2 γενιά και έπειτα, μειωμένη επιβίωση των λάρβων (Burton, 1986), καθυστερημένη ανάπτυξη (Burton, 1990), μειωμένη αναπαραγωγική ικανότητα και βιωσιμότητα (Edmands, 1999) καθώς και μειωμένη δραστικότητα του συμπλόκου IV της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης και μειωμένη παραγωγή ATP (Edmands, 1999, Rawson & Burton, 2002, Ellison & Burton, 2006). Η μειωμένη δραστικότητα του συμπλόκου και παραγωγή ATP φαίνεται να προκαλούνται από ένα σετ μεταλλάξεων στο μιτοχονδριακό κυτόχρωμα c (Rawson et al, 2000, Harrison & Burton, 2006). Αυτές οι μεταλλάξεις στο mtDNA φαίνεται να αντισταθμίζονται από πυρηνικές μεταλλάξεις ειδικές για κάθε πληθυσμό, η δράση

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/06/2024 15:10:58 EEST - 3.135.219.133

τους όμως αποκαλύπτεται στα υβρίδια της F2 γενιάς (Harrison & Burton, 2006). Η μειωμένη αρμοστικότητα στα υβρίδια σχετίζεται και με τα αυξημένα επίπεδα οξειδωτικής βλάβης (Barreto & Burton, 2013) καθώς και με τη διαφορική έκφραση των μιτοχονδριακών και πυρηνικών γονιδίων του OXPHOS (Ellison & Burton, 2008), δίνοντας έτσι μία ένδειξη για τις πολύπλοκες επιπτώσεις που έχει η διαταραχή της συνεξελιγμένης μιτοπυρηνικής γενεαλογίας. Η αρμοστικότητα των υβριδίων φάνηκε να αποκαθίσταται μετά από επαναδιασταυρώσεις με τη μητρική γενεαλογία, αναδεικνύοντας έτσι την αρνητική μιτοχονδριακή επίσταση ως την γενεσιουργό αιτία της υβριδιακής κατάπτωσης (Ellison & Burton, 2008b).

Ένα άλλο ζωικό μοντέλο, στο οποίο έχει μελετηθεί ο ρόλος των αλληλεπιδράσεων αυτών στην αρμοστικότητα, είναι η *Drosophila*. Σε πειραματικές μελέτες, χρησιμοποιήθηκαν διαφορετικοί μιτοχονδριακοί απλότυποι που προέρχονταν από διαφορετικούς πληθυσμούς από διάφορα μέρη του πλανήτη και τοποθετήθηκαν σε ένα κοινό πυρηνικό γενετικό υπόβαθρο (Yee et al, 2013,Clancy, 2008). Με αυτό τον τρόπο εξαλείφθηκε τελείως ο παράγοντας της πυρηνικής γενετικής διαφοροποίησης οπότε οι φαινοτυπικές αλλαγές ανάμεσα στις σειρές θα οφείλονταν στη μιτοχονδριακή ποικιλομορφία (Clancy, 2008). Η εκτίμηση της γονιμότητας σε όλες αυτές τις σειρές έδειξε πως όλοι οι απλότυποι προκάλεσαν μειωμένη γονιμότητα στα αρσενικά όταν συνδυάστηκαν με το νέο πυρηνικό γονιδίωμα σε σύγκριση με τη γονιμότητα που είχαν οι συμπροσαρμοσμένοι γονότυποι (Yee et al, 2013). Αυτά τα πρότυπα της μειωμένης αρμοστικότητας λόγω μιτοπυρηνικής ασυμβατότητας είναι σύμφωνα με την υπόθεση πως τα συνεξελιγμένα πυρηνικά γονιδιώματα φέρουν αντισταθμιστικές αλλαγές που μετριάζουν ή εξαλείφουν τις επιδράσεις των επιβλαβών μεταλλάξεων στο mtDNA. Μία μελέτη στην οποία χρησιμοποιήθηκαν αυτές οι σειρές κατέληξε στο συμπέρασμα πως υπήρχε μεταβολή της έκφρασης γονιδίων του πυρήνα που χαρτογραφούνταν σε όλο το γονιδίωμα και πως αυτή η μεταβολή οφείλονταν στην ποικιλομορφία του mtDNA. Αξίζει να σημειωθεί πως οι μεταβολές αυτές παρατηρήθηκαν εντονότερα σε αρσενικά άτομα. Ειδικότερα, η έκφραση περίπου του 10% των γονιδίων στα αρσενικά άτομα επηρεάστηκε από το μιτοχονδριακό απλότυπο (περίπου 1500 μετάγραφα του πυρήνα) ενώ στα θηλυκά τα αντίστοιχα γονίδια που επηρεάστηκαν ήταν μόλις εφτά (Innocenti et al, 2011). Η

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/06/2024 15:10:58 EEST - 3.135.219.133

εξειδίκευση αυτών των επιπτώσεων στα αρσενικά άτομα συμφωνεί με την υπόθεση πως η μητρική κληρονόμηση των μιτοχονδρίων διευκολύνει τη συσσώρευση μεταλλάξεων που έχουν εντονότερη επίδραση στα αρσενικά άτομα μέσω μίας φυλοεξαρτώμενης δράσης της επιλογής, το οποίο περιγράφηκε προηγουμένως και ως «η κατάρα της μητέρας» (Camus et al, 2012, Innocenti et al, 2011, Frank & Hurst, 1996, Gemmell et al, 2004, Wolff & Gemmell, 2013).

Μιτοπυρηνικές ασυμβατότητες έχουν επίσης παρατηρηθεί σε υβρίδια διαφοροποιημένων πληθυσμών στη φύση. Ο Morales και οι συνεργάτες του (2016) ανέλυσαν δύο πληθυσμούς πτηνών του είδους *Eopsaltria australis* οι οποίοι είχαν προσαρμοστεί σε διαφορετικά περιβάλλοντα φέροντας διαφορετικούς μιτοχονδριακούς απλότυπους και εντόπισαν πως οι υψηλα διαφοροποιημένες περιοχές των γονιδιωμάτων τους ήταν πλούσιες σε γονίδια που κωδικοποιούν για μιτοχονδριακές πρωτεΐνες. Σύμφωνα με τα ευρήματα αυτά, η διαφοροποίηση ανάμεσα στους πληθυσμούς διατηρείται μέσω των μιτοπυρηνικών ασυμβατοτήτων παρά μέσω φαινομένων γονιδιακής ροής (Morales et al, 2016). Σε μία δεύτερη μελέτη, ο Baris και οι συνεργάτες του (2017) ανέλυσαν πληθυσμούς ιχθύων του είδους *Fundulus heteroclitis* που φέρουν διαφοροποιημένα μιτοχονδριακά γονιδιώματα και εντόπισαν πως τα υβρίδια που προκύπτουν από διασταυρώσεις μεταξύ των πληθυσμών αυτών εμφανίζουν μειωμένη ενεργότητα του OXPHOS (Baris et al, 2017).

Τέλος, σε μία μελέτη που αφορούσε το είδος του Ευρωπαϊκού λαγού *Lepus europaeus*, πραγματοποιήθηκαν επιλεκτικές διασταυρώσεις μεταξύ ατόμων του είδους που έφεραν διαφοροποιημένους μιτοχονδριακούς απλότυπους. Πιο συγκεκριμένα, σε μία μονάδα εκτροφής λαγών, που προέρχονταν από την Κεντρική Ευρώπη, προστέθηκε ένας αριθμός ατόμων που προέρχονταν από μία διαφορετική μιτοχονδριακή γενεαλογία, σύμφωνα με την φυλογεωγραφική ομαδοποίηση του είδους (Kasapidis et al, 2005, Stamatis et al, 2009). Από τα αποτελέσματα των διασταυρώσεων, προέκυψε πως οι αρσενικοί λαγοί που προέρχονταν από τη διαφοροποιημένη μιτοχονδριακή γενεαλογία εμφάνισαν μειωμένη αναπαραγωγική επιτυχία σε σχέση με τους υπόλοιπους λαγούς. Το εύρημα αυτό είναι σε συμφωνία με το φαινόμενο της κατάρας της μητέρας, καθώς τα σπερματοζωάρια αναμένεται

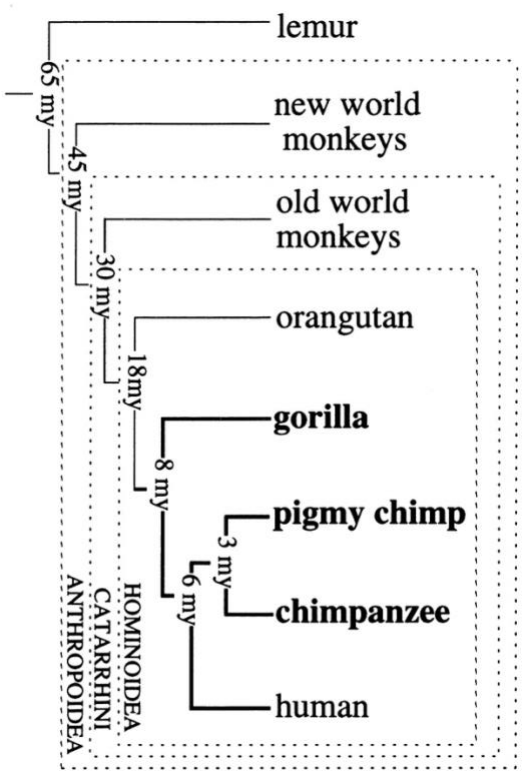
Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/06/2024 15:10:58 EEST - 3.135.219.133

να επηρεαστούν περισσότερο από τα υπόλοιπα κύτταρα λόγω των δυσανάλογα αυξημένων ενεργειακών τους απαιτήσεων, τις οποίες καλύπτουν και μέσω του OXPHOS, παρότι μάλιστα φέρουν λιγότερα μιτοχόνδρια σε σύγκριση με τα υπόλοιπα κύτταρα (Cummins 1998, Diez-Sanchez et al 2003). Με αυτό τον τρόπο, οι μεταλλάξεις που επηρεάζουν τη λειτουργικότητα του OXPHOS μπορούν να έχουν πολύ μεγάλη επίδραση στη λειτουργία του σπερματοζωαρίου, και συνεπώς στην αναπαραγωγική επιτυχία των αρσενικών, χωρίς να επηρεάζουν τα θηλυκά άτομα.

Προσαρμογή και ειδογένεση: Η διαειδική διαφοροποίηση

Στοιχεία που στηρίζουν πως οι ασυμβατότητες αυξάνονται με την αύξηση της διαφοροποίησης προέρχονται από μελέτες που χρησιμοποίησαν ανθρώπινες κυτταρικές σειρές από τις οποίες είχε αφαιρεθεί το μιτοχονδριακό γονιδίωμα και είχε αντικατασταθεί από το αντίστοιχο γονιδίωμα που άνηκε σε συγγενικά τάξα που εμφάνιζαν διαβαθμισμένη γενετική διαφοροποίηση με τον άνθρωπο (Kenyon & Moraes, 1997, Barrientos et al, 1998). Σε μία πρώτη μελέτη χρησιμοποιήθηκε το mtDNA του χιμπατζή (*Pan troglodytes*), του πυγμαίου χιμπατζή ή μπονόμπο (*Pan paniscus*) και του γορίλλα (*Gorilla gorilla*) (Barrientos et al, 1998). Η διαταραχή των συνεξελιγμένων μιτοπυρηνικών γονιδίων οδήγησε στη μείωση της ενεργότητας του συμπλόκου I στα υβριδικά κύτταρα σε σχέση με τα κύτταρα αγρίου τύπου, ενώ τα σύμπλοκα II, III, IV και V δεν επηρεάστηκαν. Σε μία δεύτερη μελέτη, χρησιμοποιήθηκαν επιπλέον μιτοχονδριακοί απλότυποι από πιο απομακρυσμένες ταξινομικές ομάδες, όπως ο ουρακοτάγκος (*Pongo pygmaeus*), είδη αντιπροσωπευτικά των μαϊμούδων του Παλιού και Νέου κόσμου καθώς και λεμούριοι. Σε όλες τις περιπτώσεις αυτές δε παρατηρήθηκε ενεργότητα OXPHOS (Kenyon & Moraes, 1997). Οι φυλογενετικές σχέσεις των ειδών που μελετήθηκαν παρουσιάζονται στην εικόνα 8.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/06/2024 15:10:58 EEST - 3.135.219.133



Εικόνα 8: Οι φυλογενετικές σχέσεις των ειδών που χρησιμοποιήθηκαν στις υβριδικές κυτταρικές σειρές.

Παρόμοιες ασυμβατότητες παρατηρήθηκαν σε κυτταρικές σειρές ποντικών στις οποίες είχε αντικατασταθεί το μιτοχονδριακό DNA από αντίστοιχο που άνηκε σε συγγενικά είδη τρωκτικών (Yamaoka et al, 2000, McKenzie et al, 2003, Dey et al, 2000). Μέσω της αξιολόγησης της αναπνευστικής ικανότητας των κυττάρων αυτών, τα πειράματα έδειξαν πως τα σύμπλοκα της mETS επηρεάστηκαν ποικιλοτρόπως, με το σύμπλοκο III να φαίνεται το πιο έντονα επηρεασμένο, καθώς εμφάνισε μία δραματική μείωση στην ικανότητα μεταφοράς ηλεκτρονίων (McKenzie et al, 2003).

Η ευαισθησία του OXPHOS στις ασυμβατότητες μεταξύ των ειδών γίνεται πιο κατανοητή εάν ληφθεί υπόψη πως όλες οι μιτοχονδριακές λειτουργίες εξαρτώνται από πυρηνικούς παράγοντες που εισάγονται στο μιτοχόνδριο, όπως παράγοντες της μετάφρασης, παράγοντες τερματισμού της μεταγραφής, ένζυμα τροποποίησης του RNA, ριβοσωμικές πρωτεΐνες, μεταγραφικοί παράγοντες. Όλοι αυτοί οι παράγοντες αλληλεπιδρούν με συγκεκριμένα μοτίβα αλληλουχιών DNA ή RNA που προέρχονται από το μιτοχονδριακό γονιδίωμα για να πραγματοποιήσουν τη λειτουργία τους (Smits et al, 2010), και αυτή η αλληλεπίδραση εμφανίζει ευαισθησία στα αυξημένα επίπεδα γενετικής διαφοροποίησης μεταξύ των γονιδιωμάτων. Οι αλλαγές στις

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/06/2024 15:10:58 EEST - 3.135.219.133

θέσεις αναγνώρισης μπορούν να διαταράξουν τη λειτουργία της μιτοχονδριακής μετάφρασης, οδηγώντας σε απώλεια λειτουργίας του OXPHOS. Ένα τέτοιο χαρακτηριστικό παράδειγμα προέρχεται από μελέτη στην οποία χρησιμοποιήθηκε ένα *in vitro* σύστημα, που συνδύαζε παράγοντες του ανθρώπινου συστήματος μιτοχονδριακής μεταγραφής μαζί με παράγοντες του ποντικού (*Mus musculus*). Παρατηρήθηκε πως η μιτοχονδριακή RNA πολυμεράση του ποντικού είχε πολύ χαμηλή απόδοση στη μεταγραφή του mtDNA όταν χρησιμοποιούσε τους ανθρώπινους υποκινητές (Gaspari et al, 2004). Τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης προτείνουν πως η χαμηλή απόδοση συνδέεται με την αλλαγή στα μοτίβα αναγνώρισης της μεταγραφικής μηχανής, που είναι απαραίτητα για την σύνδεση της POLRMT και του mtDNA και έχουν συνεξελιχθεί ξεχωριστά στα δύο αυτά είδη . Ένα άλλο τέτοιο παράδειγμα προέρχεται από το μοντέλο υβριδίων των *S. cerevisiae* και *S. bayanus*, στο οποίο προσδιορίστηκε πως ο πυρηνικός μεταγραφικός παράγοντας AEP2 του *S. bayanus* δεν είναι σε θέση να ρυθμίσει την μετάφραση της μιτοχονδριακής υπομονάδας c της F0-ATP συνθάσης του *S. serevisiae*, οδηγώντας σε στειρότητα και σε μειωμένη σποριογένεση (Lee et al, 2008). Παρόμοια φαινόμενα ασυμβατότητας παρατηρήθηκαν και σε υβρίδια μεταξύ ειδών ζύμης (Chou et al, 2010). Η ασυμβατότητα μεταξύ των συγκεκριμένων ειδών προσδιορίστηκε πως εμφανίζονταν στο επίπεδο της επεξεργασίας των μεταγράφων του γονίδιου COX1 κατά το μάτισμα από τον πυρηνικό παράγοντα Mrs1, γεγονός που οδηγούσε σε στειρότητα (Chou et al, 2010). Σε πρόσφατες μελέτες υβριδισμού σε είδη *Drosophila*, παρατηρήθηκαν μιτοπυρηνικές ασυμβατότητες που εντοπίζονταν ειδικά στο μιτοχονδριακώς κωδικοποιούμενο tRNA της τυροσίνης της *Drosophila simulans* και της πυρηνικής άμινοακυλο-tRNA συνθετάσης της τυροσίνης της *Drosophila melanogaster* (Meiklejohn et al, 2013). Η ασυμβατότητα αυτή οδηγούσε σε μειωμένη ενεργότητα των συμπλόκων I,II και IV και σχετίστηκε με καθυστερημένη ανάπτυξη και μειωμένη γονιμότητα. Παρόμοια μείωση στην λειτουργικότητα του OXPHOS είχε παρατηρηθεί και σε πειράματα διασταυρώσεων μεταξύ *D.simulans* και *D. melanogaster*, όπου προκύπταν υβριδικοί απόγονοι με μειωμένη γονιμότητα και μειωμένη βιωσιμότητα απογόνων που οδηγούσε σε υβριδική κατάπτωση (Ellison et al, 2008, Niehuis et al, 2008, Koevoets et al, 2012).

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/06/2024 15:10:58 EEST - 3.135.219.133

Παρόμοιες ασυμβατότητες μεταξύ πυρηνικών και κυτταροπλασματικών στοιχείων έχουν οδηγήσει σε υβριδιακή κατάπτωση και σε μειωμένη ενεργότητα του OXPHOS σε υβρίδια μεταξύ των ειδών σφήκας *Nasonia giraulti* και *Nasonia vitripennis* (Niehuis et al, 2008). Παρόμοια, μειωμένη βιωσιμότητα έχει παρατηρηθεί σε διαειδικά υβρίδια των ψαριών του γένους *Centrarchidae* που διαφέρουν στους εξελικτικούς ρυθμούς των μιτοχονδριακών τους γονιδιωμάτων (Bolnick et al, 2008). Παρόμοια φαινόμενα έχουν παρατηρηθεί και στα μονοκότυλα φυτά του είδους *Loyisiana iris* (Cruzan & Arnold, 1999), στο κόκκινο σκαθάρι *Tribolium castaeneum* (Damuth & Wade, 2007), στο είδος μπιζελιού Chamaecrista fasciculata (Galloway & Fenster, 2001) και στο ευδικοτυλήδονο *Campanulastrum americanum* (Etterson et al, 2007).

Οι παραπάνω μελέτες προτείνουν πως η διατάραξη της συνεξελιγμένης μιτοπυρηνικής γενεαλογίας οδηγεί σε ασυμβατότητες, μειώνοντας τη λειτουργία του OXPHOS, την συναρμογή των συμπλόκων είτε αυξάνοντας τις ελεύθερες ρίζες οξυγόνου και πως αυτές οι ασυμβατότητες αυξάνονται όσο αυξάνεται η διαφοροποίηση ανάμεσα στις ομάδες των οργανισμών. Μπορούμε να συμπεράνουμε ότι η μιτοπυρηνική μονάδα είναι μία εξελικτική μονάδα και η διαδικασία της συνεξέλιξης της μονάδας αυτής είναι πιθανό να επιδρά στο εξελικτικό δυναμικό των πληθυσμών. Σύμφωνα με αυτό, συγκεκριμένοι μιτοχονδριακοί απλότυποι αναμένεται να έχουν καλή απόδοση όταν συνδυαστούν με συγκεκριμένους πυρηνικούς γονότυπους, αλλά να έχουν πολύ χαμηλή απόδοση σε συνδυασμό με άλλους, παίζοντας βασικό ρόλο σαν ρυθμιστές της προσαρμογής. Έτσι, τα πυρηνικά και τα μιτοχονδριακά αλληλόμορφα των συμπλόκων αυτών δεν είναι στοιχεία που αναμένεται να μεταβάλλονται ελεύθερα, αλλά δρουν σαν μία ενιαία, υψηλά προσαρμοσμένη λειτουργική μονάδα. Σύμφωνα με αυτή τη θεώρηση, ο Hill πρότεινε ένα νέο ορισμό για τα είδη που βασίζεται στην μιτοπυρηνική συμβατότητα: «Ένα είδος αποτελείται από ένα πληθυσμό αναπαραγωγικά απομονωμένο από άλλους πληθυσμούς λόγω ασυμβατοτήτων στα συμπροσαρμοσμένα μιτοχονδριακά και N-mt γονίδια». Συμπερασματικά, θα μπορούσαμε να πούμε πως η συσσώρευση γενετικού πολυμορφισμού στο επίπεδο

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/06/2024 15:10:58 EEST - 3.135.219.133

του μιτοχονδριακού DNA «οδηγεί» και στη διαφοροποίηση των αντίστοιχων γονιδίων του πυρηνικού γονιδιώματος, λειτουργώντας έτσι σαν μία «μηχανή ειδογένεσης».

Γενετική διαφοροποίηση: τοποθετώντας το mtDNA «στον πάγο»

Η επίδραση των τελευταίων παγετωνικών περιόδων στην διαμόρφωση των επιπέδων του πολυμορφισμού, ιδιαίτερα για τα χερσαία ζώα, έχει μελετηθεί εκτενώς. Παρατηρήσεις για το φαινόμενο αυτό έχουν καταγραφεί σε όλες σχεδόν τις ηπείρους, με την Ευρωπαϊκή Ήπειρο να είναι στο επίκεντρο των μελετών φυλογεωγραφίας αρκετών ταξινομικών ομάδων (Taberlet et al, 1998, Hewitt, 2004). Οι μελέτες σε διάφορα είδη ζώων και φυτών της Ευρώπης έδειξαν πως κατά τη διάρκεια του Πλειστόκενου και του Πλειόκενου, οι πληθυσμοί του Βορρά είτε μετακινήθηκαν νοτιότερα, σε θερμότερα κλίματα (Hewitt, 2000, 2004) είτε εξαφανίστηκαν. Κατά τη διάρκεια των τελευταίων μεγάλων παγετωνικών περιόδων (Late Glacial Maxima, LGM), οι τρεις κύριες νότιες χερσόνησοι της Ευρώπης, η Ιβηρική, η Ιταλική και τα Βαλκάνια, αποτέλεσαν καταφύγια για τους οργανισμούς (Hewitt, 2000, Taberlet et al, 1998, Dubey et al, 2006, Orth et al, 2002) απομονώνοντας παράλληλα τους πληθυσμούς των ειδών και οδηγώντας τους στην γενετική διαφοροποίηση, η οποία ήταν αποτέλεσμα της συνδυασμένης δράσης της παρέκκλισης και της επιλογής (Hewitt, 2004). Οι τρείς αυτές χερσόνησοι, μαζί τα καταφύγια που σχηματίστηκαν στην Ανατολία, θεωρείται ότι συνέβαλαν στην διατήρηση του γενετικού πολυμορφισμού και στον μετα-παγετωνικό επανεποικισμό της Ευρώπης από ζωικά είδη. Η εξάπλωση των πληθυσμών μετά το τέλος των παγετωνικών περιόδων φαίνεται να έγινε μέσω διαφορετικών οδών, οι οποίες αφορούσαν στη συμμετοχή ή όχι των ξεχωριστών καταφυγίων στις μετακινήσεις, καθώς και στις παρεμποδίσεις που εμφανίζονταν από τις ταυτόχρονες μετακινήσεις πληθυσμών έξω από τα καταφύγια. Αυτή η διαφορετική εξάπλωση των πληθυσμών άρα και του γενετικού πολυμορφισμού οδήγησε στη δημιουργία υβριδικών ζωνών όπου τα διαφοροποιημένα γονιδιώματαα βρέθηκαν σε επαφή, παράγοντας υβρίδια, τα οποία λόγω της γενετικής διαφοροποίησης εμφάνισαν υβριδική κατάπτωση

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/06/2024 15:10:58 EEST - 3.135.219.133

(Hewitt, 2004b). Έτσι, οι υβριδιακές αυτές ζώνες, λειτούργησαν σαν φραγμός για τη γεωγραφική και γενετική ανάμειξη των διαφοροποιημένων πληθυσμών.

Υβριδιακές ζώνες και ειδογένεση

Οι υβριδιακές ζώνες έχουν μελετηθεί εκτενώς στη βιβλιογραφία και θεωρούνται ως «φυσικά εργαστήρια» για τη μελέτη των εξελικτικών δυνάμεων που δρουν σε πληθυσμιακό επίπεδο (Hewitt, 1988). Οι υβριδιακές ζώνες φαίνεται να διατηρούνται από τη δράση δύο διαφορετικών διαδικασιών: της τυχαίας διασποράς των ατόμων και της αρνητικής επιλογής των υβριδίων (Barton & Hewitt, 1989). Η μειωμένη αρμοστικότητα των υβριδίων συνήθως προκαλείται από πολλά γονίδια, που χαρτογραφούνται σε όλο το γονιδίωμα και έχουν από ένα μικρό ποσοστό επίδρασης παρά από λίγα γονίδια με μεγάλη επίδραση (Hewitt, 1988). Έτσι, τα αλληλόμορφα που διέρχονται μία υβριδιακή ζώνη επιλέγονται αρνητικά, καθώς βρίσκονται στο «λάθος» περιβάλλον ή αλληλεπιδρούν με τα «λάθος» αλληλόμορφα (Barton & Hewitt, 1989). Η θεώρηση αυτή λαμβάνει ιδιαίτερη βαρύτητα, αν ληφθούν υπόψη δύο γεγονότα τα οποία ήδη αναφέρθηκαν: η συνεισφορά του μιτοχονδριακού DNA στην προσαρμογή στα διαφορετικά περιβάλλοντα και η ανάγκη για εναρμονισμένη συνεργασία και μιτοπυρηνική συμπροσαρμογή στα επίπεδα κυρίως της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης. Με βάση την επέκταση αυτή, οι παραπάτριοι πληθυσμοί και οι υβριδιακές ζώνες μπορεί να αντανακλούν τα διαφορετικά στάδια που αφορούν τα στάδια της γενετικής διαφοροποίησης: από διαφοροποιημένους πληθυσμούς μέχρι διαφορετικά είδη (Hewitt, 1988). Έχει χαρακτηριστεί η ύπαρξη υβριδιακών ζωνών για ένα μεγάλο εύρος ειδών, όπως οι ακρίδες του είδους *Chorthippus parallelus* (Cooper et al, 1995), οι σκατζόχοιροι του είδους *Erinaceous concolor* (Filippucci & Simson, 1996, Santucci et al, 1998, Seddon et al, 2002), η μυγαλή *Crocidura leucodon (*Dubey et al, 2007), ο Ευρωπαϊκός λαγός (Kasapidis et al, 2004, Stamatis et al, 2009) και άλλα (ανασκόπηση από Bilgin, 2011).

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/06/2024 15:10:58 EEST - 3.135.219.133

Μιτοπυρηνική συνεξέλιξη: Το παράδειγμα του Ευρωπαϊκού λαγού (*Lepus europaeus*)

Το είδος *του Lepus europaeus* αποτελεί σημαντικό είδος, τόσο σε οικονομικό επίπεδο, καθώς αποτελεί θηρευτικό είδος, όσο και σε ερευνητικό επίπεδο, καθώς η εκτεταμένη του κατανομή και η ταχεία του προσαρμογή σε νέα ενδιαιτήματα το καθιστά ως ένα είδος μοντέλο για τη μελέτη των μηχανισμών προσαρμογής και διαφοροποίησης. Η κατανομή του είδους εκτείνεται σε όλη την Ευρώπη και την Ανατολία, μέχρι τα μέσα της Ασίας, στα Ευρωπαϊκά νησιά (Ηνωμένο Βασίλειο) και στη Μεσόγειο (Lincoln, 1974, Caillol & Meunier, 1989, Poli et al , 1991, Broekhuizen & Maaskamp, 1980) και έχει εισαχθεί με επιτυχία στην Νότια Αμερική, την Αυστραλία και τη Νέα Ζηλανδία (Lincoln, 1974, Caillol & Meunier, 1989, Bonino & Montenegro, 1997). Η κατανομή του είδους εμφανίζεται στην εικόνα 9.

Εικόνα 9:Η κατανομή του είδους Lepus europaeus. *Με κόκκινο χρώμα εμφανίζονται οι περιοχές στις οποίες το είδος είναι γηγενές, ενω με ρόζ οι περιοχές στις οποίες εισήχθη κατά το παρελθόν.*

Δύο μεγάλες μελέτες που αφορούσαν τη φυλογεωγραφία του είδους, πραγματοποιήθηκαν με τη χρήση μοριακών δεικτών του μιτοχονδριακού DNA και περιλάμβαναν αρκετές περιοχές δειγματοληψίας, τόσο στον Ευρωπαϊκό όσο και στον Ανατολικό χώρο, κατέληξαν στο ίδιο συμπέρασμα. Το κοινό συμπέρασμα των δύο αυτών μελετών ήταν η ύπαρξη δύο καλά διαχωρισμένων, γεωγραφικά και γενετικά, γενεαλογιών. Οι δύο γενεαλογίες, η Ευρωπαϊκή, η οποία εμφανίζει και μία υπο-κατηγοριοποίηση σε Κεντρική Ευρωπαϊκή και σε Νότια Ανατολική Ευρωπαϊκή, και η Ανατολική εμφανίζουν σαφή γεωγραφικό διαχωρισμό, καθώς η πρώτη εμφανίζεται

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/06/2024 15:10:58 EEST - 3.135.219.133

στις ευρωπαϊκές χώρες, όπως η Γερμανία, η Γαλλία, η Αγγλία, η Ελλάδα κτλ., ενώ η δεύτερη εμφανίζεται στην Τουρκία, την Κύπρο, το Ισραήλ και στα μεσογειακά νησιά που βρίσκονται κοντά στα παράλια της Μικράς Ασίας.

Όπως αναφέρθηκε ήδη προηγουμένως, το είδος αυτό διαθέτει κάποια ιδιαίτερα χαρακτηριστικά που το καθιστούν ως είδος μοντέλο για τη μελέτη των εξελικτικών δυνάμεων. Ανάμεσα στα κυριότερα χαρακτηριστικά, μπορούμε να διαχωρίσουμε δύο τα οποία καθιστούν το είδος αυτό ως ένα πολύ καλό υποψήφιο για τη μελέτη της συνεξέλιξης των δύο γονιδιωμάτων:

1. Στη μελέτη των Smith και των συνεργατών (2010), παρατηρήθηκε το φαινόμενο της «κατάρας της μητέρας», σε πειράματα επιλεκτικών διασταυρώσεων σε λαγούς που έφεραν διαφοροποιημένους μιτοχονδριακούς απλότυπους και

2. Η ύπαρξη μίας υβριδιακής ζώνης στη Βόρεια Ελλάδα και τη Βουλγαρία, που έχει αναφερθεί και στις δύο μεγάλες μελέτες της φυλογεωγραφίας του είδους (Kasapidis et al, 2004, Stamatis et al, 2009), στην οποία συνυπάρχουν και οι δύο κύριες γενεαλογίες. Πέραν αυτής της υβριδιακής ζώνης, δεν φαίνεται να υπάρχει καμία άλλη περιοχή στην οποία να συνυπάρχουν οι γενεαλογίες, μίας και δεν έχει ταυτοποιηθεί ποτέ ευρωπαϊκός μιτοχονδριακός απλότυπος στην Ανατολία και αντιστρόφως (Stamatis et al, 2009, Antoniou et al, 2013).

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/06/2024 15:10:58 EEST - 3.135.219.133

Σκοπός

Σκοπός της παρούσας διατριβής είναι η μελέτη της συμβολής της μιτοπυρηνικής συμπροσαρμογής στην εξέλιξη των ειδών και σε διαδικασίες ειδογένεσης, έχοντας στο επίκεντρο το είδος του ευρωπαϊκού λαγού, καθώς και συγγενικά του είδη. Για το σκοπό αυτό, η μελέτη οργανώνεται σε τέσσερις βασικούς άξονες:

1. Μελέτη της διαφοροποίησης του μιτοχονδριακού DNA σε γονιδιωματικό επίπεδο και αξιολόγηση των αποτελεσμάτων στο πλαίσιο της λειτουργικότητας των συμπλόκων της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης. Παράλληλα, μελετάται και η επίδραση της φυσικής επιλογής στο επίπεδο του mtDNA σε σχέση πάλι με τη λειτουργικότητα της βιοενεργητικής.
2. Μελέτη της συμπροσαρμογής των μιτοχονδριακών και πυρηνικών γονιδίων των δυο γενεαλογιών του είδους του Ευρωπαϊκού λαγού με τη χρήση δεδομένων απο αλληλούχηση νέας γενιάς στο επίπεδο της βιοενεργητικής και σύγκριση με την εξέλιξη των γονιδίων των υπόλοιπων διαδικασιών παραγωγής ενέργειας του κυττάρου (γλυκόλυση, κύκλος του Krebs).
3. Μελέτη της συμπροσαρμογής των μιτοχονδριακών και πυρηνικών γονιδίων διαειδικά, με τη χρήση αλληλουχιών που προέρχονται από τον Ευρωπαϊκό λαγό και από συγγενικά του είδη. Το επίπεδο της σύγκρισης είναι το ίδιο με τον δεύτερο άξονα.
4. Μελέτη της πληθυσμιακής δυναμικής της περιοχής υβριδισμού των δύο γενεαλογιών με τη χρήση γενετικών δεικτών του μιτοχονδριακού και του πυρηνικού DNA για την εξαγωγή συμπερασμάτων σχετικά με διαδικασίες ειδογένεσης που προκύπτουν από την αναπαραγωγική απομόνωση και την απουσία γενετικής ροής μεταξύ των δυο γενεαλογικών κατά τις παγετωνικές περιόδους του Πλειστόκενου.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/06/2024 15:10:58 EEST - 3.135.219.133

Αποτελέσματα

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/06/2024 15:10:58 EEST - 3.135.219.133

Τα αποτελέσματα της διατριβής χωρίζονται σε τέσσερα διαφορετικά κεφάλαια, όπως παρουσιάζονται συνοπτικά παρακάτω:

Κεφάλαιο 1: Το μιτοχονδριακό DNA: γενετική διαφοροποίηση και επιλογή

Στο κεφάλαιο αυτό παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της συγκριτικής γονιδιωματικής των μιτοχονδριακών γονιδιωμάτων που προέρχονται από τις δυο γενεαλογίες του Ευρωπαϊκου λαγού, τα οποία εστιάζονται κυρίως στη γενετική διαφοροποίηση των γονιδίων που κωδικοποιούν για πρωτεΐνες. Διερευνάται η δράση της επιλογής στα επιμέρους μιτοχονδριακά γονίδια της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης, τόσο σε ενδοειδικό όσο και σε διαειδικό επίπεδο.

Κεφάλαιο 2: Η μιτοπυρηνική συμπροσαρμογή των δύο γενεαλογιών του Ευρωπαϊκού λαγού

Στο κεφάλαιο αυτό, τα δεδομένα των μιτοχονδριακών γονιδιωμάτων του κεφαλαίου 1 συνδυάζονται με αποτελέσματα που προέρχονται από ανάλυση μεταγραφώματος σε δείγματα που προέρχονται από τις δυο γενεαλογίες του Ευρωπαϊκού λαγού με σκοπό την μελέτη της συνεξέλιξης των αλληλεπιδρόντων γονιδίων πυρήνα και μιτοχονδρίου. Η ανάλυση επικεντρώνεται στη μελέτη των γονιδίων που συμμετέχουν στις διαδικασίες παραγωγής ενέργειας του κυττάρου: τη γλυκόλυση, τον κύκλο του Krebs και την οξειδωτική φωσφορυλίωση**.**

Κεφάλαιο 3: Η μιτοπυρηνική συμπροσαρμογή σε διαειδικό επίπεδο

Τα δεδομένα που χρησιμοποιήθηκαν στο κεφάλαιο 2 συνδυάζονται με δεδομένα από ανάλυση μεταγραφώματος που προέρχονται από συγγενικά είδη του Ευρωπαϊκού λαγού, με σκοπό τη διερεύνηση του φαινομένου της συνεξέλιξης σε διαειδικό επίπεδο. Η ανάλυση που ακολουθείται είναι ίδια με την αντίστοιχη του κεφαλαίου 2.

Κεφάλαιο 4: Υβριδιακές ζώνες και νησιωτικοί πληθυσμοί: Τα φυσικά εργαστήρια για τη μελέτη της εξέλιξης

Στο τελευταίο κεφάλαιο αναλύονται οι εξελικτικές δυνάμεις που δρουν σε νησιωτικούς και υβριδικούς πληθυσμούς του είδους του Ευρωπαϊκού λαγού. Οι πληθυσμοί αυτοί θεωρούνται ιδιαίτερα χρήσιμοι για την μελέτη των εξελικτικών δυνάμεων, λόγω της γεωγραφικής και αναπαραγωγικής απομόνωσης (νησιωτικοί πληθυσμοί) και λόγω των φαινομένων γονιδιακής ροής ανάμεσα σε διαφοροποιημένους πληθυσμούς του είδους (υβριδικοί πληθυσμοί). Η μελέτη επικεντρώνεται στη δράση της αρχής του ιδρυτή και της γενετικής παρέκκλισης στη διαμόρφωση των επιπέδων του πολυμορφισμού των απομονωμένων πληθυσμών, καθώς και την επίδραση της γενετικής ασυμβατότητας των υβριδίων στην γονιδιακή ροή των μιτοχονδριακών και πυρηνικών γονιδίων.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/06/2024 15:10:58 EEST - 3.135.219.133

Κεφάλαιο 1: Το μιτοχονδριακό DNA: γενετική διαφοροποίηση και επιλογή

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/06/2024 15:10:58 EEST - 3.135.219.133

PLOS | ONE

RESEARCH ARTICLE

SNP Identification through Transcriptome Analysis of the European Brown Hare (*Lepus europaeus*): Cellular Energetics and Mother's Curse

Grigoris D. Amoutzias☯, Themistoklis Giannoulis☯, Katerina A. Moutou, Anna-Maria G. Psarra, Costas Stamatis, Andreas Tsipourlianos, Zissis Mamuris*

Department of Biochemistry and Biotechnology, University of Thessaly, 41221, Larissa, Greece

☯ These authors contributed equally to this work.
* zmamur@bio.uth.gr

CrossMark
click for updates

OPEN ACCESS

Citation: Amoutzias GD, Giannoulis T, Moutou KA, Psarra A-MG, Stamatis C, Tsipourlianos A, et al. (2016) SNP Identification through Transcriptome Analysis of the European Brown Hare (*Lepus europaeus*): Cellular Energetics and Mother's Curse. PLoS ONE 11(7): e0159939. doi:10.1371/journal.pone.0159939

Editor: Nikos T Papadopoulos, University of Thessaly, GREECE

Received: February 4, 2016

Accepted: July 11, 2016

Published: July 26, 2016

Copyright: © 2016 Amoutzias et al. This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: Data are available through SRA Depository (Reference Number SRP055741) and Genbank (Accession numbers KU250057-KU250134).

Funding: Laboratory work was financed by the Postgraduate Courses "Biotechnology -Quality Assessment in Nutrition and the Environment" and "Applications of Molecular Biology – Genetics—Diagnostic Biomarkers" of the Department of Biochemistry and Biotechnology, University of Thessaly, Greece.

Abstract

The European brown hare (*Lepus europaeus*, Pallas 1778) is an important small game species in Europe. Due to its size and position in the food chain, as well as its life history, phenotypic variation and the relatively recent speciation events, brown hare plays an important role in the structure of various ecosystems and has emerged as an important species for population management and evolutionary studies. In order to identify informative SNPs for such studies, heart and liver tissues of three samples from the European lineage and a three-sample pool from the Anatolian lineage were subjected to RNA-Sequencing analysis. This effort resulted in 9496 well-assembled protein-coding sequences with close homology to human. After applying very stringent filtering criteria, 66185 polymorphic sites were identified in 7665 genes/cds and 2050 of those polymorphic sites are potentially capable of distinguishing the European from the Anatolian lineage. From these distinguishing mutations we focused on those in genes that are involved in cellular energy production, namely the glycolysis, Krebs cycle and the OXPHOS machinery. A selected set of SNPs was also validated by Sanger sequencing. By simulating the three European individuals as one pool, no substantial informative-SNP identification was lost, making it a cost-efficient approach. To our knowledge this is the first attempt to correlate the differentiation in both nuclear and mitochondrial genome between the two different lineages of *L*. *europaeus* with the observed spatial partitioning of the lineages of the species, proposing a possible mechanism that is maintaining the reproductive isolation of the lineages.

Introduction

The European brown hare (*Lepus europaeus*, Pallas 1778) is an important small game species in Europe. According to molecular data most of the African and European species of hare studied could have originated during the last 3 Myr, i.e. in the second half of the Pliocene and at the

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/06/2024 15:10:58 EEST - 3.135.219.133

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

Plio/Pleistocene boundary [1]. Brown hare originated on the open steppe grasslands of Eurasia, adapted very successfully to mixed arable agriculture and was introduced successfully into other countries such as New Zealand and Argentina [2]. Due to its size and position in the food chain, brown hare plays an important role in the structure of various ecosystems. Nevertheless, its populations have decreased dramatically ([3] and literature cited therein).

A large number of studies over the last 20 years have focused on its distribution, ecology, biology, population dynamics and evolutionary history and have helped us to better understand fundamental issues concerning mammalian micro- and macro-evolution, conservation biology and local adaptations. Data that were based on nuclear DNA markers have supported relatively high rates of gene flow across large geographical ranges, whereas mitochondrial DNA (mtDNA) analysis has revealed a higher degree of spatial partitioning [4, 5]. A comprehensive phylogeographic analysis, based on mtDNA variability of >1200 individuals from Europe, Asia Minor, Middle East and Cyprus identified three major haplogroups with a clear phylogeographic signal that reflected the presence of late-Pleistocene refugia in the central⁄southern Balkans and in Anatolia ([4]; unpublished data). The latter study identified two distinct mtDNA lineages, one in Europe and one in Anatolia that were well separated, whereas the European lineage was further subdivided in a Greek and a Central European one (Fig 1) [4]. So far, no European mtDNA haplotypes have been detected in Turkey and Israel. Also, no Anatolian mtDNA haplotypes have been detected in North-Western, Central, South Greece or the rest of Europe. Similarly, Greek mtDNA lineages have not been detected in north-central Europe. However, there is a large introgression zone with all haplogroups present in Bulgaria and North-Eastern Greece (Fig 1). The population dynamics and the spatial partitioning of the introgression zone have been well described in a study of Antoniou and her colleagues [6] by using mitochondrial sequences of the control region along with microsatellite data for 10 loci. The existence of two diversified clades of mtDNA was confirmed once again, along with the partitioning of the samples in five major groups, the parental populations that mate and produce offspring and three groups of hybrids (F1, F2 hybrids and backcrosses with parental populations). Other studies also support the differentiation in nuclear level, using functional genes related to immune response [7] as well as coding and non-coding regions of the Y chromosome [8]. To summarize, in the above studies, a broad area of sampling have been used and the existence of the two lineages has been well supported so far from mitochondrial and nuclear data.

A big decline in the number of individuals of the species caused by extensive hunting and spread of diseases raised the need for restocking operations in many European countries [1, 4,

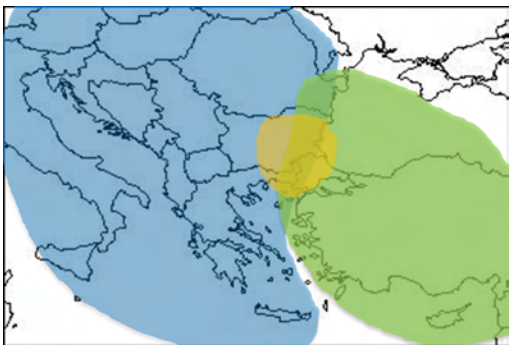


Fig 1. *Lepus europaeus'* distribution and phylogeny. The occurrence of two distinct, well separated, mtDNA lineages, in Europe (blue) and in Anatolia (green) [4]. No European haplotypes have been detected in Anatolia, and no Anatolian haplotypes have been detected in North-Western, Central, South Greece or the rest of Europe. However, there is an introgression zone with the two haplogroups present in Bulgaria and North-Eastern Greece (orange).

doi:10.1371/journal.pone.0159939.g001

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/06/2024 15:10:58 EEST - 3.135.219.133

9,10]. Although various restocking operations could be partly responsible for the presence of unexpected haplotypes in certain areas, previous studies traced a strong phylogeographic signal throughout all the regions under study and especially between Europe and Anatolia [1, 4, 9,10]. This distribution pattern observed between populations within the species may reflect micro-evolutionary processes that have resulted in local adaptations of specific gene pools.

Adaptive mechanisms and their genetic basis are nowadays in the centre of evolutionary biology and molecular ecology studies. Most of the studies use neutral markers to estimate the differentiation and genetic variability of natural populations, to elucidate evolutionary histories and to deduce the influence of humans and the environment on demographic parameters and gene flow. However, neutral loci cannot provide information on the mechanisms shaping adaptive variation, the relative contribution of different micro-evolutionary processes and the action of natural selection in the retention of adaptive polymorphisms [11]. So far, mtDNA was considered neutral in selection terms [12]. However, since mtDNA encodes for proteins that participate in the oxidative phosphorylation (OXPHOS), it may affect fitness by altering metabolic performance [13]. OXPHOS is a great paradigm of genome cooperation: mtDNA- and nuclear- encoded subunits form the five complexes of the machinery that produces ATP via electron transport. Mitochondrial DNA mutation rates are high and new mtDNA alleles are being continuously generated [12]. These alleles persist, even if they are slightly deleterious, because the lack of recombination in mtDNA leads to an inevitable accumulation of linkage disequilibrium. The higher mutation rates of mtDNA calls for tight co-evolution of the cooperating nuclear genes. In several instances this cooperation may break affecting the performance of the machinery. In the study of Smith et al [14] it was found that brown hares carrying different haplotypes of mtDNA exhibited impaired reproductive success when crossing with each other in captivity, proposing the phenomenon of mother's curse: mtDNA mutations that affect OXPHOS efficiency have higher impact on sperm cells due to its high energy demands, thus reducing male fertility, unlike the ovum that displays low energy demands. Through such mechanism, mtDNA mutations may act as drivers of adaptive evolution in nuclear genes.

The aim of this study is to analyze the trancriptome polymorphism, using transcriptome shotgun sequencing (RNA-seq), along with mtDNA polymorphism of the European brown hare and investigate sequence variation from individuals that belong to the two distinct major mtDNA phylogroups, the European and the Anatolian one. The purpose was (a) to elucidate the relations between the energy production procedures and the local adaptations of populations of the species and (b) to provide an explanation for the absence of "Anatolian" haplotypes in Europe and vice-versa despite the presence of the large introgression zone bearing all haplogroups in Bulgaria and North-Eastern Greece for more than 10000 years. A plausible hypothesis could be the reduced fitness of hybrids due to impaired efficiency in energy production. The study focused on genes involved in cellular energetics, namely, the glycolysis, Krebs cycle and the OXPHOS machinery. The first two are governed solely by nuclear-encoded genes whereas the later demands the efficient cross-talk of nuclear- and mitochondrial-encoded genes.

Materials and Methods

Ethics statement

The hare samples were collected opportunistically (no active capture, killing and sampling of wild animals specifically for this study was performed) from animals hunter-harvested by members of Greek Hunting Federation of Macedonia and Thrace and Cyprus (Licenced by the Greek Ministry of Rural Development and Food and the Cypriot Service of Game and Fauna respectively), from species considered quarry and during the hunting seasons, according to the

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/06/2024 15:10:58 EEST - 3.135.219.133

prerequisites of the Greek Legislation (FEK3100 B'/06-12-2013) or the Cypriot Legislation (EEKD 4617 8/8/2014), thus special approval was not necessary and steps to ameliorate suffering were not applicable in this study.

Sample collection, RNA/DNA extraction and sequencing

For the RNA-Seq analysis, total RNA was extracted from the heart and liver of six (6) specimens of *Lepus europaeus*, using TRI Reagent (Sigma-Aldrich, Product No.T9424) according to manufacturer's protocol. For each individual, RNA from both tissues was pooled together. Three of the samples belonged to the European lineage (originating from North Eastern Greece), whereas the other three belonged to the Anatolian haplogroup (all three from Cyprus). The tissues from each individual were immediately placed in separate tubes and held in dry ice until the RNA extraction. Subsequently, the three Anatolian samples were pooled together as one sample (thus reducing their sequencing cost to 1/3), indexed H456, whereas the three European samples, indexed H1, H2 and H3, were processed separately (Fig 2).

The four RNA samples were dispatched to Macrogen Inc. (Korea) for analysis. Poly-A containing RNA molecules were purified and fractionated. The RNA fragments were used for cDNA synthesis, library construction and were sequenced on an Illumina HiSeq 2000, providing 100 nt long Paired-End reads. The filtered fastq files were submitted to the NCBI Sequence read archive with accession numbers SAMN03382608-SAMN03382611.

For mtDNA analysis DNA extraction was performed in the six samples using PureLink Genomic DNA kits (Invitrogen, Carlsbad, CA) according to manufacturer's protocol, followed by mtDNA isolation using PureLink® Genomic DNA Mini Kit according to manufacturer's protocol. The mtDNA samples were also dispatched to Macrogen Inc (Korea) and were sequenced on an Illumina HiSeq 2000, providing 100 nt long PE reads.

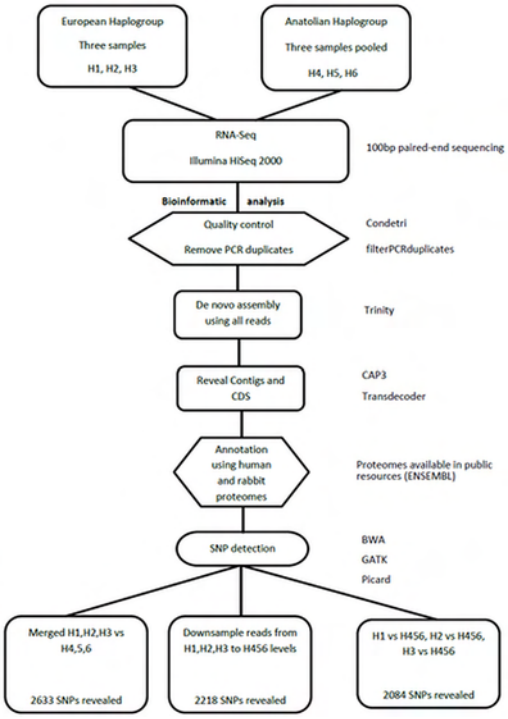


Fig 2. RNA-seq analysis pipeline. Schematic representation of the bioinformatics pipeline used in RNA-Seq analysis and SNP detection in nuclear-encoded genes.

doi:10.1371/journal.pone.0159939.g002

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/06/2024 15:10:58 EEST - 3.135.219.133

Bioinformatics analyses

Assembly step. Quality control of sequenced reads was performed with the FASTQC software (http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/). Sequence reads were trimmed based on q-score base qualities and filtered for PCR duplicates with the Condetri and the filterPCRduplicates software [15]. All four samples (H1, H2, H3 –European haplogroup; H456 –Anatolian haplogroup) were pooled into one (H123456) to increase read overlaps and thus improve the assembly of transcripts with the Trinity software (default parameters; [16]). Next, these transcripts were further merged into contigs whenever possible with the CAP3 software (default parameters; [17]). The Transdecoder program, within the Trinity software was implemented (default parameters) to predict the protein coding sequences (cds) from the transcripts (http://transdecoder.github.io/) (Fig 2). For mtDNA sequences, we used the same criteria for quality control and trimming and the reads were mapped on the available mtDNA sequence of *L. europaeus* (Accession number NC_004028.1) (Fig 3).

Homology search and annotation of nuclear genes. The human (GRC37.71.all.peps) and rabbit (Oryctolagus2.73.all.peps) proteomes were downloaded from ENSEMBL and were used for identifying homologous sequences in the brown hare proteins [18, 19]. Thus, two separate Blastp runs [20] were implemented with an E-value cutoff of 1e-10, where the hare proteins were used as queries and the human and rabbit proteomes as databases respectively. For every hare protein we retained the best blastp hit (based on blast bit score) against human or rabbit proteins. Next, if two or more hare proteins had the same human gene as their closest homolog, we would only retain that hare protein with the longest cds. Successively, we only retained those hare proteins that had good blastp query and subject coverage ($\geq$70%) against their best human and rabbit homologs. The blast results were integrated with annotation from ENSEMBL, concerning ENSEMBL gene id, protein id and function. This integration was done with the ENSEMBL Biomart tool and custom Perl scripts (Fig 2).

Mitochondrial sequences. Using the blastn program with default parameters, with the available mtDNA-encoded genes as query, we were able to retrieve the full length of the thirteen protein coding genes of the mtDNA for each of the six samples. The absence of insertions, deletions or in-frame stop codons within the sequences indicate that they correspond to functional mitochondrial genes and are not derived from pseudogenes from nuclear DNA's residues that could be present in the sample (Accession numbers KU250057-KU250134).

SNP identification. The well assembled protein-coding nucleotide sequences were used as a reference set, upon which BWA aligned the sequence reads of each sample, in order to detect

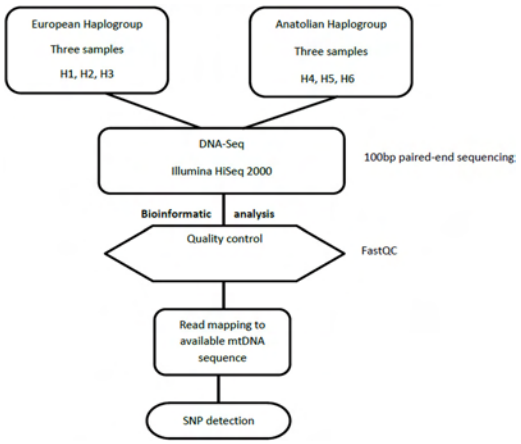


Fig 3. DNA-Seq analysis pipeline. Schematic representation of the bioinformatics pipeline used in DNAseq analysis and SNP detection in mtDNA-encoded genes.

doi:10.1371/journal.pone.0159939.g003

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/06/2024 15:10:58 EEST - 3.135.219.133

polymorphic sites [21]. Manipulation, filtering, and realignment of polymorphic sites were implemented with the GATK [22] and Picard software tools (http://broadinstitute.github.io/picard/) (Fig 2).

Unified genotyper of the GATK software was run three (3) times (Fig 2), using as cutoff a QVALUE of 30.

- In the first run, the three European samples (H1, H2, H3) were merged together into a pooled one sample (H123) and analyzed against the Anatolian pooled sample (H456). The two pools were treated as hexaploids. The results of this run are saved as a vcf file in supplementary material (S3 File).
- In the second one, the three European samples (H1, H2, H3) were stochastically down-sampled with Picard (in a balanced way) and then were merged together into a pooled one, thus generating a new pooled sample (H123_downsampled) of the same number of reads as the H456 pooled sample. Afterwards, the two pooled samples (H123_downsampled and H456) were analyzed against each other and were treated as hexaploids. The results of this run are saved as a vcf file available upon request.
- In the third run, each of the three individual samples (H1, H2, H3) and the 4th pooled sample (H456) were analyzed individually against each other. The results of this run are saved as a vcf file available upon request.

Filtering of polymorphic sites. The identified, confident polymorphic sites that could potentially distinguish the European from the Anatolian lineages were filtered by applying five stringent criteria in our analysis. The first criterion was that the alleles observed in one population were not present at all in the other population. The second criterion was that any genotypes observed were supported by a QVALUE of 100 or more. The third criterion was that any allele observed in a certain population was supported by at least thirty sequence reads. The fourth criterion was that in each sample/population we allowed only one read to support an allele not suggested from UnifiedGenotyper in GATK. The fifth criterion was to exclude polymorphic sites from any sequences for which there was evidence that they could be merged close duplicates.

Genes involved in Cellular Energetics. Following the annotation and SNP identification, the SNPs of the coding sequences of genes involved in cellular energetics were retrieved and compared among the two haplogroups. The complete list of genes is shown in Table 1. The analysis was made treating the samples as hexaploids to detect their genotypes. A 50%-differentiation criterion was used to make the call for the differentiating SNPs (e.g. genotypes 0/0/0/0/0/0 and 0/0/0/1/1/1, where 0 and 1 are referred to different alleles, are considered differentiated).

SNP Validation

A selected set of RNA-Seq determined SNPs was validated with Sanger sequencing. The selected SNPs were from the total SNP list and weren't extracted from the SNPs that could potentially distinguish the two lineages (see Results section below). DNA was extracted from 10 European and 10 Anatolian samples that were not included in the RNA-Seq analysis. The European samples were from Greece (4), Germany (3) and France (3) whereas the Anatolian samples were from Cyprus (5) and Turkey (5). DNA extraction was performed using PureLink Genomic DNA kits (Invitrogen, Carlsbad, CA) according to manufacturer's protocol. PCR Primers were designed for 54 RNA-Seq detected polymorphic sites (non-synonymous

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/06/2024 15:10:58 EEST - 3.135.219.133

Table 1. The list of genes involved in cellular energetics that were targeted in the current analysis. Genes involved in Oxidative Phosphorylation are also separated by Complex (Complexes I-V). Genes encoded by the mtDNA are presented as underlined.

Glycolysis	Krebs cycle	Complex I nuclear genes	Complex I mtDNA genes	Complex II nuclear genes	Complex III nuclear genes	Complex III mtDNA genes	Complex IV nuclear genes	Complex IV mtDNA genes	Complex V nuclear genes	Complex V mtDNA genes
HK1	ACO2	NDUFV1	ND1	SDHA	CYC1	CYTB	COX4I1	COXI	ATP5A1	ATP6
GPI	CS	NDUFV2	ND2	SDHB	UQCRC1		COX5B	COXII	ATP5B	ATP8
PFKL	FH	NDUFS1	ND3	SDHC	UQCRC2		COX6A2	COXIII	ATP5C1	
ALDOA	IDH2	NDUFS2	ND4	SDHD	UQCRFS1		COX6B1		ATP5D	
TPI1	MDH1	NDUFS3	ND4L		UQCRH		COX6C		ATP5F1	
GAPDH	OGDH	NDUFS7	ND5		UQCRQ		COX7A2		ATP5G1	
PGK1	SDHA	NDUFS8	ND6						ATP5G2	
PGAM1	SUCLA2	NDUFV3							ATP5H	
PKM		NDUFS4							ATP5J2	
ENO1		NDUFS5							ATP5L	
		NDUFS6							ATP5O	
		NDUFA1							ATP5S	
		NDUFA2								
		NDUFA3								
		NDUFA4								
		NDUFA5								
		NDUFA6								
		NDUFA7								
		NDUFA8								
		NDUFA9								
		NDUFA11								
		NDUFA12								
		NDUFA13								
		NDUFAB1								
		NDUFB1								
		NDUFB2								
		NDUFB3								
		NDUFB4								
		NDUFB5								
		NDUFB6								
		NDUFB7								
		NDUFB8								
		NDUFB9								
		NDUFB10								
		NDUFB11								
		NDUFC1								
		NDUFC2								

doi:10.1371/journal.pone.0159939.t001

mutations) within 24 genes for validation with Sanger sequencing. The primer sets were designed using the NCBI Primer-Blast algorithm (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/) (see S2 Table; worksheet: Primers_Sanger_validation). The cycling conditions consisted of an initial denaturation at 95°C for 5 min followed by 35 cycles of denaturation at 95°C for 30 sec, annealing at specific temperatures for each primer set and extension at 72°C for 30 sec, with a final extension at 72°C for 10min. PCR products were purified using QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN, Hilden, Germany) and sequenced bi-directionally. Sanger

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/06/2024 15:10:58 EEST - 3.135.219.133

sequencing was performed at Macrogen Inc. (The Netherlands). Nucleotide sequences were aligned using ClustalX [23].

Results

Identification of homologous sequences in Human and Rabbit

RNA-Sequencing of the three European RNA-Seq samples and of the one pooled Anatolian sample generated between 10 and 17 million paired-end reads for each sample (H1: 10,378,247; H2: 17,869,153; H3: 16,463,647; H456: 16,288,904), after the filtering applied. The Trinity assembly resulted in 174,942 contigs, whereas the extra CAP3 assembly step reduced the contigs to 162,519 of which 147,818 were protein-coding, according to Transdecoder.

After Blastp and the relevant stringent filtering steps mentioned in Materials and Methods, we identified 9496 hare cds/proteins that were the closest and best homologs against human genes (see S1 and S2 Files). Thus, we did a 1:1 mapping between hare and human protein coding sequences. For these hare cds/proteins, the average identity and similarity against human proteins was 89.9% and 93.9% respectively. Also, on average, 95% of each hare cds/protein was aligned with its human homolog in a blastp pairwise alignment, an indication that for this set of 9496 sequences the Trinity and CAP3 assemblies were very good (see S1 Table).

The same steps as above were performed between hare and rabbit sequences, but 8264 hare sequences were retained this time, instead of the 9496 when using the human genes/proteins. This is an expected indication that the human genome is more mature/complete than the rabbit genome. Of note, those 8264 hare sequences had an average 96.6% identity and 97.6% similarity against rabbit proteins. Also, on average, 95% of each hare cds/protein was aligned with its rabbit homolog in a blastp pairwise alignment.

In order to estimate the divergence at the nucleotide level of protein coding sequences between the two closely related species *L. europeus* and *L. granatensis*, sequences of the latter were obtained from an RNA-seq experiment by Cahais et al [24]. The 9496 cds of *L. europeus* were blasted (blastn—evalue cutoff 1e-10) against the 45151 contigs of *L. granatensis* and the average nucleotide identity was estimated at 99.29%.

Identification of SNPs

From the first run (H123 vs H456), and after filtering the vcf file (with a qvalue$\geq$100 and DP$\geq$30 and MQ0 = 0 and MQ$\geq$30 or more), we identified 69,608 polymorphic sites in 7,755 genes/cds. After filtering out the 90 cds that could be merged gene duplicates our list was reduced to 7665 genes/cds that had 66,185 polymorphic sites (see S2 Table; worksheet: 69608_polymorphic_sites & worksheet:7755_genes-cds).

The application of stringent criteria (see Materials and Methods) resulted in 2050 polymorphic sites (2046 SNPs and 4 indels) in 1147 sequences that could potentially differentiate between the two lineages (see S2 Table; worksheet: differentiating_SNPs_2popul). The top ten polymorphic genes of this type had between 9–31 polymorphic sites each. The above filters create two biases, one in favour of highly expressed genes and the other in favour of homozygous sites. Nevertheless, these biases are not our primary concern, because the goal of this specific analysis is to generate a set of polymorphic sites that can distinguish one lineage from the other.

The effect of pooling the samples of one lineages

Treating the European samples either as individuals or as a pool had the following effects: 2541/2633 confident polymorphic sites (that could potentially differentiate one lineage from the other) would be identified correctly if we investigated each individual separately. This is

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/06/2024 15:10:58 EEST - 3.135.219.133

because in some cases one of the three individuals had a low number of sequence reads for a particular site, whereas another individual of the same population had a high number of reads for the same site. When these samples were pooled together, this difference was ameliorated. In addition, if we applied an extra filter of 10 reads at least for each allele in each individual, then, the number of confidently identified polymorphic sites that are capable of separating the two lineage would drop to 2084/2633 (79%). On top of that, if we applied the additional filter of removing polymorphisms from sequences that are suspected to be merged closely related gene duplicates, the number of polymorphic sites that may separate one lineage from the other drops to 2050. Therefore, the effect of pooling is not as dramatic, when considering the reduction of cost.

Polymorphic sites in genes involved in cellular energetics

After the assembly/annotation/SNP identification steps, the coding sequences from the genes of interest were retrieved. For this purpose, the dataset of SNPs that derived from the first run of variant calling mentioned above was used, when all the samples of one population were merged in one pool and were compared as hexaploids (H123 vs H456). SNPs belonging to these genes, along with SNPs from other genes with functions related with mitochondrion, were further validated with Sanger sequencing. The complete list of SNPs is provided in Table 2.

Subsequently, the SNPs in these genes for each separated lineage were identified and compared in order to detect differences between the lineages/haplotypes. This procedure was run separately for each step of energy production: the glycolysis, the Krebs cycle and the oxidative phosphorylation (OXPHOS). The rate of total mutations per nucleotide and the rate of non-synonymous mutations per nucleotide differentiating the European from the Anatolian lineage was calculated (Table 3). Interestingly, the OXPHOS nuclear genes exhibited the same level of total differentiating mutations with the glycolysis and the Krebs cycle, whereas non-synonymous mutations in the nuclear genes of the OXPHOS were 3.5- and 2.7-fold more than in the glycolysis and the Krebs cycle, respectively. The thirteen mtDNA-encoded genes exhibited a 4.6- and 3.5-fold higher rate of non-synonymous mutations compared with the glycolysis and the Krebs cycle.

While the glycolysis, the Krebs cycle and the complex II are encoded solely by nuclear genes, the complexes I, III, IV and IV of OXPHOS require mitochondrial and nuclear encoded genes for their formation. For this reason, we calculated the rate of total mutations per nucleotide and the rate of non-synonymous mutations per nucleotide for the mtDNA and nuclear encoded-genes, respectively, for each of the five (5) complexes (I-V) of OXPHOS, to allow the comparison on equal grounds. Complex II, which is encoded solely by nuclear genes, had approximately the same rate of accumulating differentiating mutations with the glycolysis and the Krebs cycle, yet a lower rate of non-synonumous mutations. The nuclear subunits of Complex IV, although they accumulate differentiating mutations at a same rate with the glycolysis and the Krebs cycle, they exhibited a 10- and 8-fold higher rate of non-synonumous mutations than the glycolysis and the Krebs cycle, respectively. Generally, nuclear subunits of OXPHOS showed a little difference in the rate of total mutations compared with the glycolysis and the Krebs cycle, but when the non-synonymous rates were compared, the differentiation was at least 2-fold higher in the OXPHOS genes. MtDNA-encoded subunits had higher rates in general in accumulating mutations differentiating the two lineages, almost five times higher than the glycolysis and the Krebs cycle, whereas they accumulated non-synonymous mutations at a lower rate.

COI Barcodes

In order to explore further the differentiation between the two lineages, we used the COI barcoding system proposed by Hebert and his colleagues [25], when a proportion of the mtDNA-encoded gene of COI is used to identify even close related species. For this purpose, we used

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/06/2024 15:10:58 EEST - 3.135.219.133

Table 2. RNA-Seq identified SNPs that were further validated by Sanger sequencing in other individuals of the two lineages. Shaded boxes correspond to SNPs that Sanger sequencing failed to validate.

Gene name	SNP Position	Reference allele	Alternative allele	European	Anatolian Haplogroup	*European*	*Anatolian*
		RNA-Seq	RNA-Seq	Haplogroup	RNA-Seq	*Haplogroup*	*Haprogroup*
				RNA-Seq		*Sanger*	*Sanger*
UQCRC2	1218	C	T	C	C/T	*C*	*C*
UQCRC2	1234	G	A	G	G/A	*G*	*G*
UQCRC2	1263	C	T	C	C/T	*C*	*C*
NDUFB5	54	G	A	G	G/A	*G*	*G*
NDUFB5	55	C	T	C	T	*C*	*C*
NDUFB5	56	G	C	G	C	*G*	*G*
NDUFB5	91	G	A	G	A	*G*	*G*
ATP5G1	178	T	A	A/T	T	*A/T*	*T*
ATP5H	556	A	C/G	A/G	A/C	*A*	*A*
NDUFA4	218	G	A	G	G/A	*G*	*G*
NDUFS2	70	G	T	G/T	G	*G*	*G*
EPRS	1258	A	G	G/A	G	*G/A*	*G*
RARS	242	G	A	G/A	G	*G*	*G*
RARS	280	C	T	C/T	C	*C*	*C*
RARS	312	A	G	A/G	A	*A/G*	*G*
DARS2	334	G	A	G	G/A	*G*	*A*
DARS2	554	A	C	A	A/C	*A/C*	*A/C*
DARS2	1405	G	A	G	G/A	*G*	*A*
DARS2	1600	A	G	A	A/G	*A*	*A*
ATP5J2	275	G	A	G/A	G	*G/A*	*G/A*
ATP5J2	465	C	A	C/A	A	*C/A*	*A*
ATP5J2	474	T	C	T/C	T	*T/C*	*T/C*
ETFA	139	G	C	G	G/C	*G/C*	*G/C*
NDUFAF7	1145	A	C	A/C	A/C	*A/C*	*A*
NDUFAF7	1215	G	T	G	G/T	*G*	*G*
NDUFAF7	1248	G	A	G/A	G/A	*G/A*	*G*
NDUFAF1	32	C	T	C/T	C	*C/T*	*C*
NDUFAF1	67	C	G	C/G	C	*C/G*	*C*
NDUFAF1	91	C	T	C/T	C	*C*	*C*
NDUFB6	386	A	G	A/G	A	*A*	*A*
NDUFV2	519	A	G	A/G	A/G	*A/G*	*A*
OXA1L	111	G	A	G/A	G	*G/A*	*G*
OXA1L	122	G	A	G/A	G	*G/A*	*G/A*
OXA1L	145	G	C	G	G/C	*G*	*G*
SCO1	409	G	A	G/A	G	*G*	*G*
SCO1	800	A	T	A/T	A	*A*	*A*
SCO1	804	C	T	C	C/T	*C*	*C*
SDHD	91	G	A	G/A	G	*T/G*	*G*
SDHD	93	C	T	C/T	C	*C/T*	*C*
SDHD	157	C	T	C/T	C	*A/C/T*	*C/T*
TFAM	315	A	T	A	A/T	*A*	*A*
TFAM	371	G	C	G/C	G/C	*G/C*	*G*
SARS2	487	T	C	T/C	C	*T/C*	*C*
FARS2	140	G	A	G/A	G	*G*	*G*

(*Continued*)

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/06/2024 15:10:58 EEST - 3.135.219.133

Table 2. (*Continued*)

Gene name	SNP Position	Reference allele RNA-Seq	Alternative allele RNA-Seq	European Haplogroup RNA-Seq	Anatolian Haplogroup RNA-Seq	*European Haplogroup Sanger*	*Anatolian Haprogroup Sanger*
FARS2	663	G	C	G/C	G	*G/C*	*G*
FARS2	680	A	G	A	A/G	*A*	*A*
FARS2	693	G	A	A/G	A/G	*A/G*	*G*
FARS2	708	T	C	T/C	T/C	*T/C*	*T*
FARS2	756	A	G	A/G	A/G	*G*	*A*
LARS2	2434	G	A	G	G/A	*G*	*G*
LARS2	2489	T	C	T/C	C	*T/C*	*C*
LARS2	2509	G	C	G	G/C	*G*	*G*
LARS	1085	T	C	T/C	T	*C*	*T*
COX5B	356	A	G	A/G	A/G	*A*	*G*

doi:10.1371/journal.pone.0159939.t002

our data combined with data available from BOLDSystems (http://www.barcodeoflife.org/) for all the *Lepus* species available. The species selected were: *Lepus americanus*, *L. capensis*, *L. comus*, *L. coreanus*, *L. granatensis*, *L. hainanus*, *L. mandschuricus*, *L. microtis*, *L. oiostolus*, *L. peguensis*, *L. sinensis*, *L. timidus*, *L. tolai*, *L. townsendii*, *L. americanus and the sequences we derived in this analysis for L. europaeus*, where we treated each lineage as a separate group. The average differentiation among species was 6.77%, while the differentiation between the European and the Anatolian lineage was found 1.74%. Interestingly, there were species pairs which showed lower differentiation than the two lineages. These pairs were: *L. granatensis vs L. coreanus*, *L. arcticus vs L. granatensis and L. coreanus*, *L. timidus vs L. granatensis*, *L. coreanus and L. arcticus*, which had a distance between 0.31 and 1.11%.

Discussion

This genetic break at the margin between Anatolia and the surrounding areas has been observed in a variety of species, the dispersal of which includes these specific territories [26].

Table 3. The rate of total and non-synonymous differentiating mutations, respectively, for the three energy producing procedures. In the OXPHOS, rates are also presented for each of the five complexes separately, distinguishing between nuclear and mtDNA-encoded genes.

Energy Production Procedure		Mutations/nucleotide	Non-synonymous Mutations/nucleotide
Glycolysis		0.004685	0.000344
Krebs cycle		0.004060	0.000451
OXPHOS		0.008056	0.001258
OXPHOS	*nuclear*	0.003691	0.001212
	mtDNA	0.022641	0.001409
Complex I	*nuclear*	0.003900	0.001282
	mtDNA	0.020899	0.001583
Complex II	*nuclear*	0.005405	0.000257
Complex III	*nuclear*	0.003373	0.000930
	mtDNA	0.033333	0.001754
Complex IV	*nuclear*	0.005391	0.003732
	mtDNA	0.016943	0.000664
Complex V	*nuclear*	0.001978	0.000923
	mtDNA	0.040677	0.002259

doi:10.1371/journal.pone.0159939.t003

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/06/2024 15:10:58 EEST - 3.135.219.133

Some paradigms include the European green toad [27], the long-fingered bat [28], the yellow-necked fieldmouse [29] and the European grasshopper [30]. In the majority of these cases, mitochondrial DNA markers have been used in order to reveal the differentiation between the geographically isolated populations of the different species.Although mitochondrial DNA markers have proven their usage as molecular markers for inferring phylogenies, population dynamics and evolutionary patterns, they tend to show some disadvantages when they are used self-standing. Mitochondrial DNA, due to the uniparental inheritance and the lack of recombination is vulnerable to phenomena of selective sweeps, which tend to reduce the polymorphism in species level. Also the uniparental inheritance creates a bias in which the marker does not reflect the history of the species as a whole but only that of the female portion. For example, the existence of the hybridization zone in North Greek territory and Bulgaria [antoniou] as well as the hybridization between the *L. europaeus and L. timidus* in Switzerland, Scandinavia and Russia, [5,31,32] were revealed by application of mtDNA markers and were confirmed using nuclear markers. Moreover, the use of mtDNA as marker for DNA barcoding relies on the low levels of variation within a species compared with intraspecific variation and monophyly of mtDNA within species. Case studies have made clear that this general pattern may not be true for all species. In a review of Funk and Omland [33], using mtDNA data, they suggested that 23% of species examined may not be monophyletic for mtDNA sequences. The disadvantages of the application of solely mtDNA markers discussed above underline the need for combined studies of mitochondrial and nuclear markers in order to infer more accurate theories about species phylogeny and evolutionary processes currently acting on populations. However, in *Lepus europaeus* the differentiation between Anatolian and European lineages has been supported so far by population studies using one or a small number of mitochondrial genes [4, 34], functional regions of the nuclear genome related to immune response [7] and a combination of coding and non-coding regions of Y chromosome [8].

This is the first study to use genome-scale sequence data in order to investigate the level of differentiation and find a possible cause of the lack of the Anatolian lineage in Europe and vice versa, despite the presence of all haplogroups in North-Eastern Greece and Bulgaria. Except of the genomes of two lagomorph species, of the American pika (*Ochotona princeps*) and of the European rabbit (*Oryctolagus cuniculus*), that have been sequenced and assembled by the Broad Institute in the framework of the Mammalian Genome Project [18], to our knowledge this is the first attempt to obtain transcriptome sequences by RNA-Seq in *L. europaeus* and the second, after the iberian hare *L. granatensis* [24, 35], within the genus *Lepus* that is comprised of 32 species with worldwide distribution [36].

RNA-Seq (heart and liver tissues) of samples from the European and Anatolian phylogenetic lineages resulted in 9496 well-assembled protein coding sequences. After applying very stringent filtering criteria, 66185 polymorphic sites were identified in 7665 genes/cds. The above numbers do not reflect the real level of polymorphism, because they are based on RNA-Seq data, where the sequencing coverage is not uniform among the various genes. Therefore, for highly covered/expressed genes, the current estimated (by RNA-Seq) level of polymorphism is closer to the true one, whereas for lowly covered/expressed genes the level of polymorphism is most probably underestimated.

Fifty four of those sites situated in 24 genes were validated with Sanger sequencing in 10 individuals from each lineage. In addition, 2050 of those polymorphic sites (found in 1147 genes) are potentially capable of distinguishing the members of one lineage from the other. Although, for this analysis, three individuals per lineage were used, the strictness of the criteria can ensure the validity of the SNPs that were uncovered from the analysis. However, the actual number of lineage-separating polymorphisms is bound to be lower.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/06/2024 15:10:58 EEST - 3.135.219.133

An interesting finding in energy production processes, after the analysis of these large scale data, was that the glycolysis and the Krebs cycle, governed solely by nuclear-encoded genes, showed a slower rate (almost half) of accumulating differentiating mutations compared with the OXPHOS machinery, which requires the cooperation of mitochondrial and nuclear genome. Moreover, this difference is even higher when comparing the rate of non-synonymous mutations between these three procedures; OXPHOS machinery showed a ~3-fold higher on average rate of differentiating non-synonymous (ns) mutations compared with the glycolysis and the Krebs cycle.

Also, when comparing the rates of nuclear-encoded genes of OXPHOS to the glycolysis and the Krebs cycle, whilst the rate of differentiating mutations was approximately the same, when comparing non-synonymous rates the OXPHOS' nuclear subunits showed a three times higher rate on average compared with the other two, and the mtDNA encoded genes show a 3.5-fold higher rate compared with the glycolysis and the Krebs cycle.

More interestingly, when the differentiation in every complex of the OXPHOS was computed separately (I-V), the results were more definite: complex II, which is encoded only by nuclear genes, had a similar rate of ns mutations with glycolysis and Krebs cycle while complexes I,III,IV and V have a ~3.5-fold higher rate on average. The bigger divergence was found in Complex IV, where the mitochondrial subunits have the catalytic functions and are showing the lower differentiation among the mitochondrial genes and the nuclear encoded subunits, which have role in assembly and regulation of the activity [37], are showing a nine-fold higher rate on average when compared to glycolysis and Krebs cycle. The role of cytochrome C oxidase (Complex IV) has been found to be responsible in hybrid breakdown in marine copepods [38], where COX activity was significantly reduced in hybrids of crosses between different geographical populations. A similar mtDNA introgression study in *Drosophila* showed a more pronounced COX disruption effect in interspecific versus intraspecific backcrosses [39].

It is very likely that the different rate of adaptive evolution of nuclear genes OXPHOS, as opposed to the other two groups of genes (glycolysis and Krebs cycle), to be related to the "effort" of nuclear genes OXPHOS to co-evolve and co-adapt with the corresponding, rapidly evolving, mitochondrial genes. The co-adaptation of cooperating genes leads to normal function of the OXPHOS machinery. This coordinated evolution between genomes occur by reciprocal changes in interacting proteins; the deleterious impact of mutations can be "masked" with a mutation in a second site which act as a compensatory mutation [40]. The well-established cooperation between the genomes in separated populations is disrupted when distinct lineages of mtDNA are crossed and the hybrids are less competitive due to low energy production: the distinct mtDNA shows a lack of cooperation with the new nuclear background, affecting mostly the OXPHOS efficiency [12].

The occurrence of 2050 polymorphic sites in 1147 genes, potentially capable of distinguishing between the two lineages may be indicative of a gradual differentiation between "European" and "Anatolian" population with absence of gene flow. The separation of gene pools will, sooner or later, lead to low reproductive success or even to reproductive isolation. The accumulation of non-neutral genetic variation could lead to speciation, with mtDNA polymorphism between populations to drive the differentiation to the associating parts of the nuclear genome, acting as an "engine of speciation". This hybrid breakdown has been reported in species with distinct geographical populations, such as *Tigriopus californicus*, where crossing of individuals from distinct populations resulted in hybrids with lower energy production [39]. Also, Smith and his colleagues [14] observed impaired reproductive success when crossing brown hares carrying different mitochondrial haplotypes.

To conclude, a plausible scenario to explain the current phylogeographic status of *Lepus europaeus* populations may be the following: (1) According to available molecular data

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/06/2024 15:10:58 EEST - 3.135.219.133

sequence divergence of mitochondrial cytochrome b (Cytb) gene between European and Anatolian lineages ranges from 3.4 to 3.8% (this study, [8]). If we apply the standard calibration of Cytb divergence rate of 2–4% per million years (Myr) [41, 42, 43], with the most possible rate for *Lepus* being 4%, according to fossil data [44] the splitting between the phylogenetic lineages corresponds to 0.85 Myr; (2) During the Late Glacial Maximum (LGM), southern and south-eastern European and Anatolian landscapes could have served as refugia for brown hares [45], as indicated to a certain extent by fossil records from the late Pleistocene (see references in [46]; (3) This palaeogeographic situation, under the absence of significant gene flow between European and Anatolian refugia over millennia, has led to differentiated mitochondrial and nuclear gene pools, as indicated by the present and several other studies. For instance sequence divergence for Cytb between closely related *L. timidus*/*L. corsicanus* is at 3.3% which is very similar with that between European/Anatolian lineages; (4) At the same time, within isolated populations, mitochondrial and nuclear genes have co-evolved, assuring co-adaptation of cooperating genes and normal function of the cellular energetics; (5) Melting of ice and expansion of populations through various corridors enabled post-glacial colonization of large parts of Europe and Anatolia and has promoted admixtures of populations with different mitochondrial an nuclear genetic backgrounds. The presence of haplotypes of different haplogroups in Bulgaria and North-Eastern Greece indicates a large overlap zone and reveal gene flow from Anatolia to Europe across the late Pleistocene Bosporus land-bridge; (5) In this contact zone it is plausible that the well-established cooperation between the genomes in separated populations is disrupted when distinct lineages of mtDNA are crossed. Distinct mtDNA shows a lack of cooperation with the new nuclear background, affecting mostly the OXPHOS efficiency and the hybrids are less competitive due to low energy production. In this case, this post coupling barrier reinforces reproductive isolation as a first step of an ongoing speciation between these distinct lineages of *L. europaeus*.

Supporting Information

S1 File. 9496_hare_cds_nucleotide_seqs.fa. The FASTA file of the 9496 brown hare coding sequences (as nucleotides).
(RAR)

S2 File. 9496_hare_cds_protein_seqs.fa. The FASTA file of the 9496 brown hare coding sequences (as proteins).
(FA)

S3 File. SNPs.H123full_vs_H456_9496_contigs.vcf. The vcf file generated from Unified Genotyper in GATK that contains information on the identified SNPs and their quality, when comparing the European samples (as a pool) to the Anatolian pooled sample.
(RAR)

S1 Table. Blast_human_rabbit.xlsx. An excel file that contains the blast results of the brown hare assembled sequences against human and rabbit (downloaded from ENSEMBL).
(XLSX)

S2 Table. Polymorphisms.xlsx. An excel file that contains the following worksheets: **(i)** differentiating_SNPs_2popul: This worksheet contains the 2050 identified polymorphisms that separate the two populations (European vs Anatolian). **(ii)** 69608_polymorphic_sites: This worksheet contains the 69608 identified polymorphic sites found in 7755 out of 9496 brown hare sequences. **(iii)** 7755_genes-cds: This worksheet contains the 7755 brown hare sequences and their annotation (based on Blast) for which we found the 69608 polymorphisms. **(iv)**

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/06/2024 15:10:58 EEST - 3.135.219.133

effect_of_coverage_on_SNP_detec: This worksheet shows the effect of coverage (average number of reads/cds) on the detection of SNPs within a cds. **(v)** Primers_Sanger_validation: This worksheet contains the primer pairs designed for validating with Sanger sequencing a selected subset of RNA-Seq identified SNPs. **(vi)** Sanger validation: This worksheet contains the results from the Sanger validation for a selected set of genes.
(XLSX)

Acknowledgments

The authors would like to thank the hunting associations and the hare breeder Mr Tsoumanis for their help in collecting samples from Greece. We are indebted to Dr Sfendourakis for providing *Lepus* samples from Cyprus.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: ZM KAM GDA AMGP. Performed the experiments: TG KAM CS AT. Analyzed the data: GDA TG ZM. Wrote the paper: ZM KAM GDA TG.

References

1. Pierpaoli M, Riga F, Trocchi, Randi E. Species distinction and evolutionary relationship of the Italian hare (Lepus corsicanus) as described by mitochondrial DNA sequencing. Mol. Ecol. 1999; 8: 1805–1817. PMID: 10620225
2. Flux J. Notes on New Zealand mammals 3. Brown hare signals to cat. New Zeal.J.Zool. 2007; 34: 159–160.
3. Smith RK, Vaughan Jennings N, Harris S. A quantitative analysis of the abundance and demography of European hares *Lepus europaeus* in relation to habitat type, intensity of agriculture and climate. Mammal Rev. 2005; 35: 1–24.
4. Stamatis C, Suchentrunk F, Moutou KA, Giacometti M, Haerer G, Djan M et al. Phylogeography of the brown hare (*Lepus europaeus*) in Europe: a legacy of south-eastern Mediterranean refugia?. J. Biogeogr. 2009; 36: 515–528.
5. Koutsogiannouli E, Moutou KA, Stamatis C, Mamuris Z. Analysis of MC1R genetic variation in *Lepus* species in Mediterranean refugia. Mamm. Biol.2012; 77: 428–433.
6. Antoniou A, Magoulas A, Platis P, Kotoulas G. Assessing the genetic landscape of a contact zone: the case of European hare in northeastern Greece. Genetica. 2013; 141: 23–40. doi: 10.1007/s10709-013-9703-z PMID: 23381134
7. Koutsogiannouli EA, Moutou KA, Sarafidou T, Stamatis C, Spyrou V, Mamuris Z. Major histocompatibility complex variation at class II DQA locus in the brown hare (*Lepus europaeus*). Mol. Ecol. 2009; 18: 4631–4649. doi: 10.1111/j.1365-294X.2009.04394.x PMID: 19845856
8. Mamuris Z, Moutou AK, Stamatis C, Sarafidou T, Suchentrunk F. Y DNA and mitochondrial lineages in European and Asian populations of the brown hare (*Lepus europaeus*). Mamm. Biol. 2010; 75(3): 233–242.
9. Flux JEC. Introduction to taxonomic problems in hares. Acta Zool. Fennica. 1983; 174: 7–10.
10. Mamuris Z, Sfougaris AI, Stamatis C. Genetic structure of Greek brown hare (*Lepus europaeus*) populations as revealed by mtDBNA RFLP-PCR analysis: implications for conserving genetic diversity. Biol. Conserv. 2001; 101: 187–196.
11. Via S. Natural selection in action during speciation. P. Natl. Acad. Sci. USA. 2009; 106: 9939–9946.
12. Rand DM. The units of selection on mitochondrial DNA. Annu. Rev. Ecol. Syst. 2001; 32: 415–449.
13. Da Fonseca RR, Johnson WE, O'Brien SJ, Ramos MJ, Antunes A. The adaptive evolution of the mammalian mitochondrial genome. BMC genomics. 2008; 9: 119–140. doi: 10.1186/1471-2164-9-119 PMID: 18318906
14. Smith S, Turbill C, Suchentrunk F. Introducing mother's curse: low male fertility associated with an imported mtDNA haplotype in a captive colony of brown hares. Mol.Ecol. 2010; 19(1): 36–43. doi: 10.1111/j.1365-294X.2009.04444.x PMID: 19943893
15. Smeds L, Künstner A. ConDeTri—a content dependent read trimmer for Illumina data. PloS One. 2011; 6(10): e26314. doi: 10.1371/journal.pone.0026314 PMID: 22039460

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/06/2024 15:10:58 EEST - 3.135.219.133

16. Haas BJ, Papanicolaou A, Yassour M, Grabherr M, Blood PD, Bowden J, et al. De novo transcript sequence reconstruction from RNA-seq using the Trinity platform for reference generation and analysis. Nat. Protoc. 2013; 8: 1494–1512. doi: 10.1038/nprot.2013.084 PMID: 23845962

17. Huang X, Madan A. CAP3: A DNA sequence assembly program. Genome Res. 1999; 9: 868–877. PMID: 10508846

18. Lindblad-Toh K, Garber M, Zuk O, Lin MF, Parker BJ, Washietl S, et al. A high-resolution map of human evolutionary constraint using 29 mammals. Nature. 2011; 478: 476–482. doi: 10.1038/nature10530 PMID: 21993624

19. Flicek P, Amode MR, Barrell D, Beal K, Brent S, Carvalh-Silva D, et al. Ensembl 2012. Nucleic Acids Res. 2012; 40: 84–90.

20. Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. Basic local alignment search tool. J. Mol. Biol. 1990; 215: 403–410. PMID: 2231712

21. Li H, Durbin R. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. Bioinformatics. 2009; 25: 1754–1760. doi: 10.1093/bioinformatics/btp324 PMID: 19451168

22. DePristo MA, Banks E, Poplin R, Garimella VK, Maguire RJ, Hartl C, et al. A framework for variation discovery and genotyping using next-generation DNA sequencing data. Nat. Genet. 2011; 43: 491–498. doi: 10.1038/ng.806 PMID: 21478889

23. Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG. The CLUSTAL X Windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. Nucleic Acid Res. 2007; 25: 4876–4882.

24. Cahais V, Gayral P, Tsagkogeorga G, Melo-Ferreira J, Ballenghien M, Weinert L, et al. Reference-free transcriptome assembly in non-model animals from next-generation sequencing data. Mol. Ecol. Resour. 2012; 12: 834–845. doi: 10.1111/j.1755-0998.2012.03148.x PMID: 22540679

25. Hebert PD, Cywinska A, Ball SL, deWaard JR. Biological identification through DNA Barcodes. Proc Biol Sci. 2003; 270: 313–321. PMID: 12614582

26. Bilgin R. Back to the Suture: The Distribution of Intraspecific Genetic Diversity in and Around Anatolia. Int. J. Mol. Sci. 2011; 12: 4080–4103. doi: 10.3390/ijms12064080 PMID: 21747726

27. Stöck M, Moritz C, Hackerson M, Frynta D, Dujsebayeva T, Eremchenko V, et al. Evolution of mitochondrial relationships and biogeography of Palearctic green toads (*Bufo viridis* subgroup) with insights in their genomic plasticity. Mol. Phylogenet. Evol. 2006; 41: 663–689. PMID: 16919484

28. Bilgin R, Karatas A, Coraman E, Morales JC. The mitochondrial and nuclear genetic structure of *Myotis capaccinii* (Chiroptera: Vespertilionidae) in the Eurasian transition, and its taxonomic implications. Zool. Scr. 2008; 37: 253–262.

29. Michaux J, Libois R, Paradis E, Filippucci M. Phylogeographic history of the yellow-necked fieldmouse (*Apodemus flavicollis*) in Europe and in the Near and Middle East. Mol. Phylogen. Evol. 2004; 32: 788–798.

30. Cooper SJ, Ibrahim KM, Hewitt GM. Postglacial expansion and genome subdivision in the European grasshopper Chorthippus parallelus. Mol. Ecol. 1995; 4: 49–60. PMID: 7711954

31. Thulin CG, Fang M, Averianov A. Introgression from *Lepus europaeus* to L. timidus in Russia revealed by mitochondrial single nucleotide polymorphisms and nuclear microsatellites. Hereditas. 2006; 143: 68–76. PMID: 17362337

32. Thulin CG, Stone J, Tegelstrom H, Walker C. Species assignment and hybrid identification among Scandinavian hares *Lepus europaeus* and *L. timidus*. Wildlife Biol. 2006; 12: 29–38.

33. Funk D., Omland K. Species-level paraphyly and polyphyly: Frequency, Causes, and Consequences, with Insights from Animal Mitochondrial DNA. Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst. 2003; 34: 397–423.

34. Kasapidis P, Suchentrunk F, Magoulas A, Kotoulas G. The shaping of mitochondrial DNA phylogeographic patterns of the brown hare (*Lepus europaeus*) under the combined influence of Late Pleistocene climatic fluctuations and anthropogenic translocations, Mol. Phylogen. Evol. 2005; 34: 55–66.

35. Lemay MA, Henry P, Lamb CT, Robson KM, Russello MA. Novel genomic resources for a climate change sensitive mammal: characterization of the American pika transcriptome. BMC Genomics. 2013; 14: 311–321. doi: 10.1186/1471-2164-14-311 PMID: 23663654

36. Hoffman R, Smith A. Lagomorphs. In: Wilson Don E. & Reeder DeeAnn M. editors. Mammal Species of the World. A Taxonomic and Geographic Reference. 3rd Edition, Johns Hopkins University Press; 2005. pp. 185–211.

37. Goldberg A, Wildman DE, Schmidt TR, Huttemann M, Goodman M, Weiss ML, et al. Adaptive evolution of cytochrome c oxidase subunit VIII in anthropoid primates. PNAS. 2003; 100(10): 5873–5878. PMID: 12716970

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/06/2024 15:10:58 EEST - 3.135.219.133

38. Edmands S, Burton S. Cytochrome C oxidase activity in interpopulation hybrids of a marine copepod: a test for nuclear-nuclear or nuclear-cytoplasmic coadaptation. Evolution. 1995; 53(6): 1972–1978.
39. Sackton T, Haney R, Rand D. Cytonuclear coadaptation in Drosophila: Disruption of cytochrome C oxidase activity in backcross genotypes, Evolution. 2003; 57: 2315–2325. PMID: 14628919
40. Rand D, Haney R, Fry A. Cytonuclear coevolution: the genomics of cooperation. Trends Ecol. Evol. 2004; 12(12): 645–653.
41. Martin AP, Palumbi SR. Body size, metabolic rate, generation time, and the molecular clock. PNAS. 1993; 90: 4087–4091. PMID: 8483925
42. Avise JC, Walker DE, Johns JC. Speciation duration and Pleistocene effects on vertebrate phylogeography. Proc.R.Soc.Lond. 1998; 265: 1707–1712.
43. Santucci F, Emerson BC, Hewitt GM. Mitochondrial DNA phylogeography of European hedgehogs. Mol.Ecol. 1998; 7: 1163–1172. PMID: 9734073
44. Lopez Martinez N. Les lagomorphes (Mammalia) du Pleistocene superieur de Jaurens. Arch.Mus.Hist. Nat.Lyon. 1980; 18:5–16.
45. Corbet GB. Relationships and origins of the European lagomorphs. Mammal Rev. 1986; 16: 105–110.
46. Suchentrunk F, Mamuris Z, Sfougaris AI, Stamatis C. Biochemical Genetic Variability in Brown Hares (*Lepus europaeus*) From Greece. Biochem Genet. 2003; 5: 127–140.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/06/2024 15:10:58 EEST - 3.135.219.133

Κεφάλαιο 2: Η μιτοπυρηνική συμπροσαρμογή των δύο γενεαλογιών του Ευρωπαϊκού λαγού

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/06/2024 15:10:58 EEST - 3.135.219.133

Taylor & Francis
Taylor & Francis Group

Mitochondrial DNA Part A

DNA Mapping, Sequencing, and Analysis

ISSN: 2470-1394 (Print) 2470-1408 (Online) Journal homepage: http://www.tandfonline.com/loi/imdn21

Mitogenomic analysis in European brown hare (Lepus europaeus) proposes genetic and functional differentiation between the distinct lineages

Themistoklis Giannoulis, Costas Stamatis, Andreas Tsipourlianos & Zissis Mamuris

To cite this article: Themistoklis Giannoulis, Costas Stamatis, Andreas Tsipourlianos & Zissis Mamuris (2017): Mitogenomic analysis in European brown hare (Lepus europaeus) proposes genetic and functional differentiation between the distinct lineages, Mitochondrial DNA Part A, DOI: 10.1080/24701394.2016.1278540

To link to this article: http://dx.doi.org/10.1080/24701394.2016.1278540

Published online: 27 Jan 2017.

Submit your article to this journal

View related articles

View Crossmark data

Full Terms & Conditions of access and use can be found at
http://www.tandfonline.com/action/journalInformation?journalCode=imdn21

Download by: [FU Berlin]

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/06/2024 15:10:58 EEST - 3.135.219.133

Date: 29 January 2017, At: 17:13

MITOCHONDRIAL DNA PART A, 2017
http://dx.doi.org/10.1080/24701394.2016.1278540

Taylor & Francis
Taylor & Francis Group

RESEARCH ARTICLE

Mitogenomic analysis in European brown hare (*Lepus europaeus*) proposes genetic and functional differentiation between the distinct lineages

Themistoklis Giannoulis, Costas Stamatis, Andreas Tsipourlianos and Zissis Mamuris

Department of Biochemistry and Biotechnology, University of Thessaly, Larissa, Greece

ABSTRACT

European brown hare is a small game species spreading across Europe to Asia Minor, with important economic traits. Population genetics studies using mitochondrial DNA markers have revealed the existence of two major phylogeographic lineages, the European and the Anatolian. European lineage is further divided in the European type halpogroup and south-eastern European type halpogroup, while Anatolian consists only by the Anatolian/Middle Eastern type halpogroup. All three haplogroups show a discrete geographical distribution, with an overlapping zone forming in North-East Greece and Bulgaria, forming a contact zone. Despite the existence of a contact zone, European haplotype was never detected in Anatolia and vice versa, proposing the presence of genetic barriers responsible for this phenomenon. In this study, we analyzed the whole mitochondrial genomes of specimens originating from both lineages, aiming to detect the genetic and functional differentiation of the oxidative phosphorylation complexes that are encoded by mtDNA that could lead gradually to the reproductive isolation of the lineages.

ARTICLE HISTORY
Received 24 November 2016
Revised 28 December 2016
Accepted 31 December 2016

KEYWORDS
OXPHOS; mtDNA; genomics; *Lepus europaeus*; next generation sequencing

Introduction

The European brown hare (*Lepus europaeus*, Pallas 1778) originated on the open steppe grasslands of Eurasia, adapted very successfully to mixed arable agriculture and was introduced into other countries such as New Zealand and Argentina (Flux 1983). During the past two decades, a large number of studies focused on its distribution, ecology, and evolutionary history gave insight in issues concerning micro- and macro-evolution, conservation biology, and local adaptation (Koutsogiannouli et al. 2009, 2012; Antoniou et al. 2013).

A phylogeographic analysis, based on mtDNA variability of >1200 individuals from Europe, Asia Minor, Middle East, and Cyprus identified three major haplogroups with a clear phylogeographic signal: two distinct mtDNA lineages, one in Europe, and one in Anatolia that were well separated, whereas the European lineage was further subdivided into Greek and a Central European (Figure 1, Stamatis et al. 2009). So far, no European mtDNA haplotypes have been detected in Anatolia and Israel. Also, no Anatolian mtDNA haplotypes have been detected in north-western, central, south Greece or the rest of Europe. Similarly, Greek mtDNA lineages have not been detected in north-central Europe. The absence of European haplotypes in Anatolia has also been confirmed in the study of Sert et al. (2008), where they studied samples from Anatolia and all the haplotypes uncovered by this study grouped together with A-haplotypes reported from Kasapidis et al. (2005), which included specimens from SE Europe and eastern Mediterranean islands, while all samples from Central Europe, the Ionian islands and mainland Greece were grouped in cluster B.

However, there is a large introgression zone with all haplogroups present in Bulgaria and north-eastern Greece (Figure 1).The existence of the hybridization zone as well as the population dynamics in this territory were discussed in-depth in a study by Antoniou et al., using microsatellite data along with data of the mitochondrial control region.

This distribution pattern observed between populations within the species could reflect the presence of late-Pleistocene refugia in the central/southern Balkans and in Anatolia (Stamatis et al. 2009; unpublished data), in combination with micro-evolutionary procedures that have resulted in local adaptations of specific gene pools. The adaptive mechanisms and their genetic basis have drawn the attention of evolutionary studies. Mitochondrial DNA markers were used as selection markers for such studies, showing a higher evolutionary rate compared to the nuclear rate, it has uniparental heritage, it lacks recombination and repairing mechanisms, making it vulnerable to mutagenesis caused by the ROS-rich environment inside the mitochondria. A typical metazoan mtDNA contains 13 protein-coding genes (PCG), coding for subunits of the oxidative phosphorylation system (OXPHOS), 2 rRNA genes encoding for subunits of mitochondrial ribosome and 22 tRNA genes. Since OXPHOS is producing ~95% of cellular energy, genes encoding for OXPHOS subunits must be under selection, because variations in these genes may affect the organism fitness by directly influencing the metabolic performance. The understanding of selective

CONTACT Zissis Mamuris zmamur@bio.uth.gr Department of Biochemistry and Biotechnology, University of Thessaly, Larissa, Greece
© 2017 Informa UK Limited, trading as Taylor & Francis Group
Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/06/2024 15:10:58 EEST - 3.135.219.133

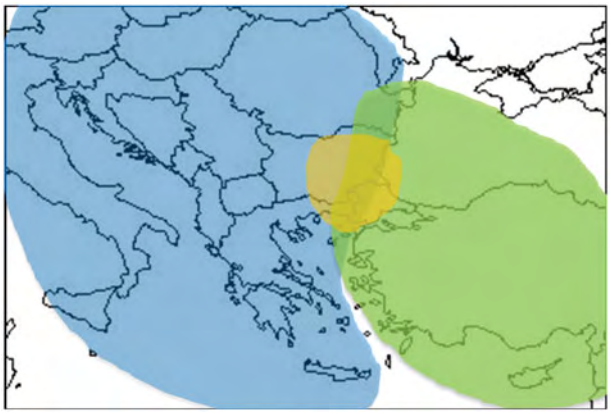


Figure 1. *Lepus europaeus*' distribution and phylogeny. The occurrence of two distinct, well separated, mtDNA lineages, in Europe and in Anatolia (Avril et al. 2011). No European haplotypes have been detected in Anatolia, and no Anatolian haplotypes have been detected in North-Western, Central, South Greece or the rest of Europe. However, there is an introgression zone with the two haplogroups present in Bulgaria and North-Eastern Greece.

pressures acting on mtDNA genes can give insight in the adaptive evolution of mitochondrial genome and its contribution to environmental adaptation, fitness and fertility (Rand 2001). Considering that mtDNA has a maternal inheritance, deleterious mutations that are present in males will not be under purifying selection, but they will have an impact in male fertility, because sperm cells have high energy demands and so impairment in OXPHOS efficiency due to mtDNA variations can lead to lower reproductive success. This phenomenon has been named as 'a mother's curse' by Gemmell et al. (2004) and has been observed in hares in captivity, where individuals carrying different haplotypes of mtDNA exhibited impaired reproductive success when crossed with each other (Smith et al. 2010).

The usage of mtDNA genomic data has been proven useful in the inference of phylogenetic relationships in detail and depth, in close related species (Yu et al. 2007) or even in different population of the same species (Zhou et al. 2014) adapted in different environments. Since the acquisition of Next Generation sequencing technologies, obtaining genomic data for mitochondrial DNA has been relatively easy compared to classic Sanger sequencing methods.

So far, phylogeographic studies on the species have utilized only segments of mitochondrial genes (Kasapidis et al. 2005; Stamatis et al. 2009), genomic regions related with immune response (Koutsogiannouli et al. 2009) or a combination of coding and non-coding regions of Y chromosome (Mamuris et al. 2010). A functional genomics study performed recently (Amoutzias et al. 2016), using transcriptomics data along with mtDNA data of the two separate lineages of the species showed that nuclear genes which participate in the oxidative phosphorylation (OXPHOS) accumulate differentiating mutations between the lineages much faster than the genes participating in the other two energy productive procedures of the cell, glycolysis, and the Krebs cycle. The driving force for this fast evolutionary rate of these genes could be the cooperating mitochondrial genes that are also participating in the OXPHOS to form the four of the five complexes (I, III, IV and V). The differentiation of these genes (nuclear and mitochondrial) may be the genetic barrier that is responsible for the absence of European haplotypes in Anatolia and vice versa; although hybrids are produced, there is a breakdown in energy production procedures due to the incompatibility between mitochondrial and nuclear genes, making these individuals less competitive in the natural populations.

The aim of this study is to analyze mitogenomic polymorphism and investigate sequence variation from individuals belonging to all three distinct lineages mentioned above along with sequences derived from the other species of the genus *Lepus* in order (i) to reconstruct the phylogenetic relationships in mitogenomic level, (ii) to evaluate the selective pressures acting on mitochondrial genes, and (iii) to provide an explanation for the absence of migration between the European and Anatolian territories despite the presence of the large introgression zone in Bulgaria and NE Greece for more than 1000 years. Phylogenetic relationships for the species would be more descriptive with the usage of samples from West Turkey as well, yet we chose samples with proximity to the hybridization zone in SE Europe since these haplotypes are more possible to disperse and get in contact in this particular territory.

Materials and methods

DNA extraction

Fourteen tissue samples were collected for the analysis, originating from Greece (4), Germany (2), Poland (3), Cyprus (4) and Anatolia (1). DNA extraction was performed using Invitrogen Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA) according to the manufacturer's protocol.

After PCR-RFLP analysis on a segment of CytB gene (Stamatis et al. 2007), samples from Greece were assigned to the south-eastern European lineage, samples from Poland and Germany to the central European while Anatolian and Cypriot samples were assigned to the Anatolian lineage.

mtDNA sequencing

In order to obtain the whole mitochondrial sequence for each sample, two different methods were chosen: eight samples of mitochondrial DNA were dispatched to Macrogen and were sequenced with Illumina Hiseq 2000 (Illumina, San Diego, CA), producing 100 base pairs, paired end reads. For the rest of the samples, we design a set of primers which produced overlapping segments of mitochondrial DNA sequence.

NextGen sequencing pipeline

Quality control of sequence reads was performed using FASTQC software (http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/). Sequence reads were trimmed based on q-score base qualities using Condetri software (Smeds & Künstner 2011). A q-score of 30 was chosen to ensure high-quality data and grow the reliance on SNP calling steps which followed. The high-quality reads were mapped on the

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/06/2024 15:10:58 EEST - 3.135.219.133

available mitochondrial genome (Accession number AJ421471.1) and one contig was retrieved for each individual.

Sanger sequencing pipeline

PCR reactions for each segment were carried out using the following parameters: 95 °C for 4 min, 35 cycles of denaturation in 95 °C for 40 s, annealing at 50–60 °C (depending on primers) for 40 s, extension at 72 °C for 1 min, and a final extension step at 72 °C for 10 min. PCR products were purified using QIAGEN PCR cleanup and sequenced bi-directionally. Sequences were edited using the BioEdit software and were mapped to reference genome, to produce one contig per sample.

Sequence analysis

Additionally to the 14 samples, we used the available mitochondrial genomes for the species from GenBank (accession number AJ421471.1). The sequences were aligned using Muscle 3.8.31 (Edgar 2004) and refined by eye. Using the BLAST algorithm, we were able to retrieve coding sequence for each of the PCG, the ribosomal RNAs, and the tRNAs. For phylogenetic reconstruction, we used two types of data: (i) the whole sequences derived from the analysis; (ii) the concatenated sequences of PCG, rRNA genes, and tRNA genes. jModeltest (Guindon & Gascuel 2003; Darriba et al. 2012) was used to identify the model of nucleotide evolution for each dataset, under the BIC criterion. Pairwise distances were computed for each pair of sequences and after grouping the sequences in three distinct groups, the distance between groups was also calculated using MEGA version 6 (Tamura et al. 2013).

Analysis of selective pressures

For the detection of selective pressures acting in protein sequences and quantification of dN and dS, we used the DataMonkey gateway (http://www.datamonkey.org) (Pond & Frost 2005a), selecting the FEL, REL, and SLAC methods (Pond & Frost 2005b) with default parameters and significance level $p < .05$. Moreover, PARRIS analysis (Scheffler et al. 2006) and Branch-site REL methods (Pond & Frost 2005c) were used for the detection of positive selection events that took place in the evolution of the Leporidae family. Substitution models determined in sequences analysis were used, the PCG were aligned and uploaded and the five methods were executed separately for each gene. Additionally to our sequences, we used sequences of known *Lepus* species with available mtDNA genomes (*L. americanus, L. townsendii, L. capensis, L. tolai, L. timidus, L. granatensis, L. coreanus, L. sinensis, L. hainanus*) as well as the rabbit mitochondrial genes (*Oryctolagus cuniculus*).

Results

Characteristics of mitochondrial genomes

The general characteristics are summarized in Table 1. The lengths of the sequences derived from the analysis were 16,680 bp and they were deposited in GenBank under the Accession numbers KY211021–KY211034. The mitochondrial genomes are AT-biased, with an average content AT% 61.2%. Pairwise distances among individuals ranged from 0% to 1.9%, with an average distance of 1.7% while group distances where: central European–south-eastern European 0.52%, central European–Anatolian 1.8% and south-eastern European–Anatolian 1.8%. The average sequence distance between the *Lepus* species was 6.3%, with some species pairs showing a smaller divergence than the one observed between the Europea-Anatolian lineages (*L. timidus* vs *L. coreanus* 0.9%, *L. timidus* vs *L. granatensis* 0.9%, *L. coreans* vs *L. granatensis* 0.6%, *L. capensis* vs *L. tolai* 0.5%). In concatenated PCG′ sequences, the pairwise distances ranged from 0% to 2.2%, with an average of 1.2%. When grouped, the distances were 0.5% between the European groups and 2.1% between the European groups and the Anatolian.

Table 1. Mitochondrial genes characteristics on polymorphism and substitution models.

Gene name	Complex	Length	Parsimony-informative sites	Best-fit model
Whole mtDNA sequence		16,224	348	HKY + I
Combined PCG data		11,391	279	HKY + I
ND1	I	957	27	HKY
ND2	I	1044	28	HKY + I
ND3	I	346	6	HKY
ND4	I	346	24	HKY
ND4L	I	297	8	HKY
ND5	I	1812	45	HKY + I
ND6	I	525	13	HKY
CYTB	III	1140	41	HKY + I
COX1	IV	1542	33	HKY + I
COX2	IV	684	15	HKY
COX3	IV	784	7	HKY
ATP6	V	681	27	HKY + I
ATP8	V	204	5	HKY
rRNAs combined		2536	25	HKY + I
tRNAs combined		1491	10	HKY + I
Control region		1239	43	HKY + G

Complex analysis

As mentioned in the "Introduction" section, 13 out of the 37 genes of mtDNA are PCG and are encoding for the four of the five complexes of the OXPHOS machinery. Here, we calculated variation in both intra-species and inter-species levels for each of the four complexes. Particularly, in the inter-species analysis, we detected total mutations, non-synonymous mutations and parsimonious, and the same analysis was performed for the intra-species level with the addition of distinguishing mutations, i.e. nucleotide/aminoacid positions that are monomorphic within the lineages but are differentiated between them and could be used to assign individuals to the two lineages.

Complex I, which includes 7 out of the 13 PCG, was found to be the most polymorphic, with 1908 mutations (266 non-synonymous) in inter-species level and 213 mutations (27 non-synonymous) in intra-species level, followed by complex IV with 773 mutations (36 ns) and 55 (11 ns) respectively for inter- and intra-species level. Detailed results for every complex are shown in Table 2. Interestingly, when we computed

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/06/2024 15:10:58 EEST - 3.135.219.133

Table 2. The four of the five complexes of OXPHOS, for which mtDNA genes are encoding for.

Complex name	Total length	Total mutations (inter/intra-species)	Distinguishing mutations (intraspecies)	Parsimony-informative (inter/intra-species)	Non-synonymous mutations (inter/intra-species	Distinguishing NS-mutations (intraspecies)
NADH:ubiquinone reductase (complex I)	6356	213/1908	109	151/1464	27/266	11
Coenzyme Q: cytochrome c – oxidoreductase (complex III)	1140	41/328	25	41/264	7/38	0
Cytochrome C oxidase (complex IV)	3010	55/773	37	55/573	11/36	1
ATP synthase (complex V)	885	32/277	25	32/176	8/50	1

Total length corresponds to the summary of gene lengths while total mutations correspond to the summary of synonymous plus non-synonymous mutations.

Table 3. Mutation rates for the four complexes of the OXPHOS.

Complex name	Mutations/nucleotide (intraspecies)	NS-mutations/Nucleotide (intraspecies)	Mutations/nucleotide (interspecies)	NS-mutations/Nucleotide (interspecies)
NADH:ubiquinone reductase (complex I)	0.0238	0.0025	0.2303	0.0269
Coenzyme Q: cytochrome c-oxidoreductase(complex III)	0.0360	0.0018	0.2316	0.0167
Cytochrome C oxidase (complex IV)	0.0183	0.0007	0.1904	0.0050
ATP synthase (complex V)	0.0362	0.0045	0.2215	0.0305

the rate of mutations (total and non-synonymous) for each complex, by dividing the number of corresponding mutations with the coding length of each complex (by summarizing the gene lengths of each complex) complex IV showed the lower rate of accumulating parsimonious NS mutations compared to the other three complexes, which have 3-fold to 7-fold higher rates in intraspecific and interspecific levels. Results are shown in Table 3.

Phylogenetic analyses

The full sequences and the combined data of PCG were selected for genomic-level phylogenetic analysis. The analysis was based on maximum likelihood methods, using the substitution models that were defined using jmodeltest, using 500 bootstrap replications. Phylogenetic trees that were resulted for each of the two types of datasets were in accordance between them (Figures 2 and 3, respectively) and with the presence of three well-defined phylogeographic groups, with the Anatolian group to be the more differentiated. Still, phylogenetic analysis with PCG sequences exceeded higher bootstrap values, even in the deeper branches of the tree.

COI barcodes

In order to explore further the differentiation between the two lineages and compare this differentiation with species-level differentiation in the genus of *Lepus*, we used the COI barcoding system proposed by Hebert et al., when a proportion of the mtDNA-encoded gene of COI is used to identify even close related species. For this purpose, we used our data combined with data available from BOLD Systems (http://www.barcodeoflife.org/) for all the *Lepus* species available The species selected were: *Lepus americanus, L. capensis, L. comus, L. coreanus, L. granatensis, L. hainanus, L. mandschuricus, L. microtis, L. oiostolus, L. peguensis, L. sinensis, L. timidus, L. tolai, L. townsendii, L. americanus* and the sequences we derived in this analysis for *L. europaeus,* where we treated each lineage as a separate group. The average differentiation among species was 6.77%, while the differentiation between the European and the Anatolian lineage was found to be 2.3%. Interestingly, there were species pairs which showed lower differentiation than the two lineages. These pairs were: *L. granatensis* vs *L. coreanus*, *L. arcticus* vs *L. granatensis* and *L. coreanus*, *L. timidus* vs *L. granatensis*, *L. coreanus*, and *L. arcticus,* which had a distance between 0. 21% and 2.11%.

Divergence time of the lineages

Molecular analyses of cytochrome b gene combined with fossil data have resulted in the creation of a molecular clock for the species of the genus *Lepus*, with a standard divergence rate of 2–4% per million years (Myr) (Martin & Palumbi 1993; Avise et al. 1998, Santucci et al. 1998). According to available molecular data, sequence divergence of CytB genes between the European and the Anatolian lineages range from 3.2% to 3.8% (this study; Pierpaoli et al. 1999; Mamuris et al. 2010), thus the splitting of the phylogenetic lineages corresponds to ~0.85 Myr before.

Selection analyses

Using the above-mentioned methods, no positive selected sites were found in all 13 PCG. However, strong evidence for negative selection was found in all genes in at least 1 codon position. Considering the fact that we used more than one methods for detecting selective pressures, we choose the sites that were in accordance in at least two of them. Complex I had the higher portion of negatively selected sites,

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/06/2024 15:10:58 EEST - 3.135.219.133

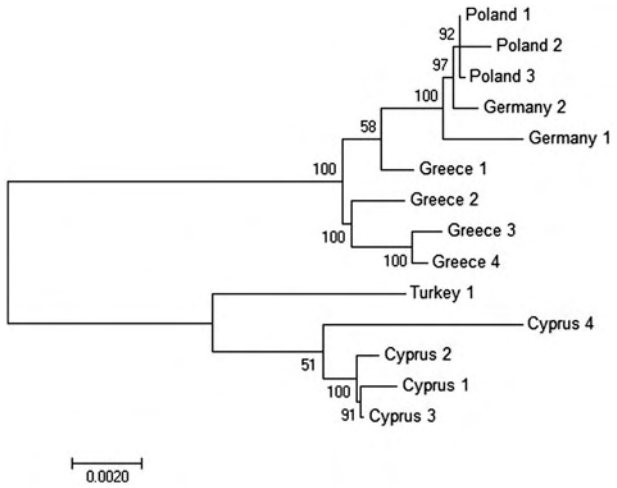


Figure 2. Phylogenetic tree based on the complete mitochondrial genomes of *Lepus europaeus*. Phylogenetic tree confirms the existence of the two distinct lineages. Also, the sub-division of the European lineage to central European and south-eastern European haplotypes is observed.

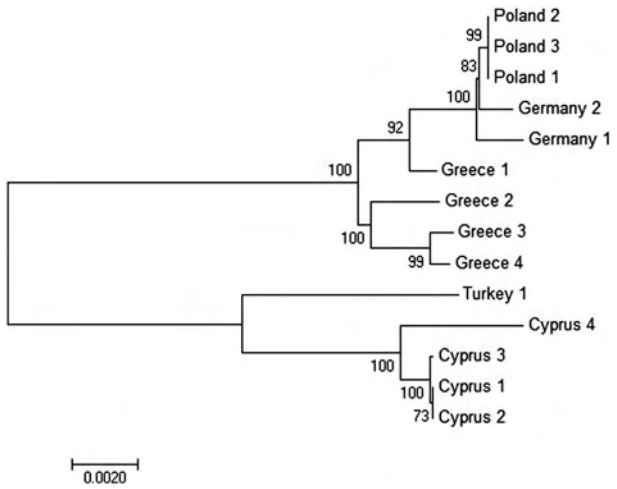


Figure 3. Phylogenetic tree based on the concatenated sequences of the PCG of *Lepus europaeus*. The topology of the tree derived from the analysis of the PCG are in accordance with complete mtDNA analysis (Figures 2).

with 435, followed by complexes III, IV, and V with 169, 118, and 91, respectively. The numbers of selected sites for each mtDNA-encoded gene are shown in Table 4. The PARRIS analysis as well as the branch-site REL analysis also did not result in any positive selection site among the 13 genes examined.

Table 4. Results from selection analysis using FEL/REL/SLAC methods.

Gene	Negatively-selected sites (*L. europaeus* only)	Negatively-selected sites (All species)
ND1	20	47
ND2	33	37
ND3	3	46
ND4	41	202
ND4L	0	17
ND5	51	68
ND6	9	18
CYTB	39	169
COX1	50	74
COX2	3	27
COX3	15	17
ATP6	18	74
ATP8	12	17

Discussion

This genetic break at the margin between Anatolia and the surrounding areas has been observed in a variety of species, the dispersal of which includes these specific territories (Bilgin 2011). Paradigms include the European green toad (*Bufo viridis*) (Stöck et al. 2006), the long-fingered bat (*Myotis capacinnii*) (Bilgin et al. 2008), the yellow-necked fieldmouse (*Apodemus flavicollis*) (Michaux et al. 2004), and the European grasshopper (*Chorthippus parallelus*) (Cooper et al. 1995). It is suggested that Ice ages must have played the central role in the allopatric isolation of populations and the consequent genetic differentiation rather than the geographical barriers that could prevent the dispersal of the species; clades of the species were seen on both sides of the major barriers, such as Taurus, the Anatolian Diagonal, and the Sea of Marmara (Bilgin 2011). Only in a number of cases the distribution of genetic differentiation overlaps with the geographical barriers while most of them support the post-glacial dispersal beyond the barriers. Especially in Bulgaria and NE Greece, there is a large overlap zone of the distinct lineages of *Lepus europaeus,* where Anatolian haplotypes are the invasive (Antoniou et al. 2013) and it is believed that the migration occurred through the late Pleistocene Bosporus land-bridge. The dispersal of the Anatolian lineage is halted in this particular contact zone and no Anatolian haplotype has been detected so far in Greece or Central Europe, despite the absence of geographical barriers that could limit the migration to these territories (e.g. there is no geographical barrier between Thrace and Central Greece that could possibly affect the migration). Thus, the genetic barrier rather than the geographical barrier is the strong force that leads to isolation: diverse genomes meet and form hybrid zones and the hybrids are showing low fitness and are less competitive compared to others, preventing the gene flow between Europe and Anatolian populations.

In the majority of these cases, mitochondrial DNA markers have been used in order to reveal the differentiation between the geographically isolated populations of the species. In *L. europaeus* the differentiation between Anatolian and European clades has been supported so far by population studies using one or a small number of mitochondrial genes (Kasapidis et al. 2005; Stamatis et al. 2009). However, this is the first study to use genomic-scale mitogenomic data to investigate the differentiation between the lineages and give a possible cause of the lack of introgression of Anatolian clade in Europe and vice versa, and also to infer the phylogenetic relationships of the species using data from massive parallel sequencing methods. However, the detection of dispersal between geographically separated populations should use nuclear markers as well, especially in the species of *L. europaeus,* because the applications of solely mitochondrial markers fail to detect male dispersal, which was found to be double than the female dispersal (48% vs 22% respectively) (Bray et al. 2007; Avril et al. 2011). This sex-biased model of dispersal is common on mammal species (McLellan & Hovey 2001; Devillard et al. 2004; Macdonald et al. 2008) and have

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/06/2024 15:10:58 EEST - 3.135.219.133

been found on other lagomorphs as well (Kunkele & von Holst 1996; Gillis & Krebs 1999).

Our results are in accordance with previous results inferred from the analysis of partial mtDNA-encoded genes (Kasapidis et al. 2005; Stamatis et al. 2009). The presence of two distinct lineages, the European and the Anatolian, also the sub-dividing of the European clade to a Greek and central-European sub-clades is well-supported. The utilization of combined data of PCG and the whole mitogenomic sequence resulted in the same tree topology (figures) being able to distinguish the major lineages but, yet the PCG data showed greater bootstrap values even in deeper nodes compared to the whole mitogenomic data.

Nucleotide differentiation between the Anatolian and the European clades was found to be four times higher compared to the differentiation between the European clades (2.1% and 0.5%, respectively). The occurrence of 196 distinguishing sites between the clades (13 of them correspond to non-synonymous mutation sites) indicate a gradual differentiation between the two populations with the absence of gene flow. Furthermore, this differentiation is well-supported by a functional genomics study of the species, where we detected 2050 distinguishing sites between the clades spanning in 1400 nuclear genes (Amoutzias et al. 2016). This mtDNA differentiation may be the explanation for the absence of migration: mtDNA-encoded genes are cooperating with nuclear-encoded genes in order to form the four of the five complexes of oxidative phosphorylation. The higher mutation rates of mtDNA calls for tight co-evolution of the cooperating nuclear genes. The well-established cooperation between the genomes in separated populations is disrupted when distinct lineages of mtDNA are crossed and the hybrids are less competitive due to low-energy production: the distinct mtDNA shows a lack of cooperation with the new nuclear background, affecting mostly the OXPHOS efficiency (Rand 2001).

Among the OXPHOS complexes, complex IV tends to show lower rates of accumulating non-synonymous mutations, whereas the other complexes show 3–7 times greater rate. In complex IV, the mitochondrial subunits (COXI, COXII, COXIII) have the catalytic functions while the other mitochondrial genes mainly have a role of assembly and regulation in their complexes (Goldberg et al. 2003). The role of cytochrome C oxidase (complex IV) has been found to be responsible in hybrid breakdown in marine copepods (Edmands & Burton 1995), where COX activity was significantly reduced in hybrids of crosses between different geographical populations. A similar mtDNA introgression study in *Drosophila* showed a more pronounced COX disruption effect in interspecific versus intraspecific backcrosses (Sackton et al. 2003).

The importance of the OXPHOS machinery for energy production, and thus cellular and organism function can lead to the assumption that the genes of this procedure are under selective pressures. Evidence for purifying selection on the mitogenome has been reported (Ruiz-Pesini et al. 2004; Sun et al. 2007; Stewart et al. 2008) and only in a few cases has been found evidence for positive selection (Foote et al. 2010; Zhou et al. 2014) because positive selection will act only in a few sites and for a short period of time, which is followed by long periods of purifying selection and so the signal of positive selection in PCG will be weak or even lost by the effects of purifying selection. Purifying selection will act to ensure that protein sequences will carry out their function and will not be affected by deleterious mutations that can arise from random mutations in the mitogenome. The only case that positive selection can be favoured is when the mutations lead to an evolutionary advantage or benefit for the individual or the population, e.g. when amino acid change make a protein more efficient (Creevey & McInerney 2002).

Interestingly functional regions of the nuclear genome related to immune response (Koutsogiannouli et al. 2009) and a combination of coding and non-coding regions of Y chromosome (Mamuris et al. 2010) showed also a pronounced divergence between Anatolia and Europe. Using functional genomics approach, Amoutzias et al. assumed that PCG of the mtDNA are the driving force for the faster evolution rates of nuclear genes that encode for the four of the five complexes of the OXPHOS comparing to genes that contribute to the other energy-producing procedures of the cell, namely the glycolysis and the Krebs cycle. These genes were found to accumulate differentiating mutations between the lineages with higher rates and so when these differentiated genomes meet, the hybrids are showing impairment in energy-producing procedures, causing an energy breakdown in the individuals (Amoutzias et al. 2016).

To summarize, the time of divergence calculated by the standard molecular clock using Cytb sequence differentiation is giving a possible explanation for the lack of haplotype introgression in the distribution area of the species: populations of the species have inhabited different refugia during the few to many Ice Ages of the Quaternary, where they adopted and developed a well-established cooperation between nuclear and mitochondrial genes, ensuring the normal function of the cellular energetics. Peripheral areas were colonized and cleared during the repeated cooling periods of the Quaternary, allowing the refugial populations to diverge and develop genetic differentiations (Hewitt 2000). This is a form of allopatry, which may accelerate speciation by selection for different adaptations. After the ice meltdown, the populations expanded and colonized the majority of the European continent, without being affected by geographical barriers that could prevent the dispersal, and so populations with different genetic backgrounds came in contact. In the contact zones, where the lineages meet, the cooperation which is responsible for the cellular energetics is disrupted, because the distinct mtDNA shows a lack of cooperation with the new nuclear background affecting mostly the OXPHOS efficiency and the hybrids are less competitive due to low-energy production. This genetic barrier is leading to a reproductive isolation of the differentiated populations, which we believe is the first step for an ongoing speciation happening between the distinct lineages of the species of *L. europaeus*.

In this case, this post coupling barrier reinforces reproductive isolation as a first step of an ongoing speciation between these distinct lineages of *L. europaeus*, which is accompanied by a strong divergent selection on diverse genomes and local adaptation to differentiated habitats. This hypothesis for divergent selection is strongly supported by our recent study

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/06/2024 15:10:58 EEST - 3.135.219.133

(Amoutzias et al. 2016), where the differentiation in nuclear-encoded genes was found to be high for the two lineages, especially in genes which cooperate with the mtDNA genome.

Acknowledgements

The authors would like to thank Assistant Professor Grigorios Amoutzias for his contribution to bioinformatics analysis and his useful suggestions. Also, the authors would like to thank the hunting associations and the hare breeder Mr Tsoumanis for their help in collecting samples from Greece. We are indebted to Dr Sfendourakis for providing *Lepus* samples from Cyprus.

Disclosure statement

The authors report no declarations of interest

Funding

Funding was received from Postgraduate Courses "Biotechnology—Quality Assessment in Nutrition and the Environment" and "Applications of Molecular Biology—Genetics—Diagnostic Biomarkers" of the Department of Biochemistry and Biotechnology, University of Thessaly, Larissa, Greece.

References

Amoutzias GD, Giannoulis T, Moutou KA, Psarra A-MG, Stamatis C, Tsipourlianos A, Mamuris Z. 2016. SNP identification through transcriptome analysis of the European Brown Hare (*Lepus europaeus*): cellular energetics and mother's curse. PLoS One. 11:e0159939.

Antoniou A, Magoulas A, Platis P, Kotoulas G. 2013. Assessing the genetic landscape of a contact zone: the case of European hare in northeastern Greece. Genetica. 141:23–40.

Avise JC, Walker DE, Johns JC. 1998. Speciation durations and Pleistocene effects on vertebrate phylogeography. Proc Biol Sci. 265:1707–1712.

Avril A, Leonard Y, Letty J, Peroux R, Guitton JS, Pontier D. 2011. Natal dispersal of European hare in a high-density population. Mamm Biol. 76:148–156.

Bilgin R, Karataş A, Çoraman E, Morales JC. 2008. The mitochondrial and nuclear genetic structure of *Myotis capaccinii* (Chiroptera: Vespertilionidae) in the Eurasian transition, and its taxonomic implications. Zool Scr. 37:253–262.

Bilgin R. 2011. Back to the Suture: the distribution of intraspecific genetic diversity in and around Anatolia. Int J Mol Sci. 12:4080–4103.

Bray Y, Devillard S, Marboutin E, Mauvy B, Peroux R. 2007. Natal dispersal of European hare in France. J Zool. 273:426–434.

Cooper SJ, Ibrahim KM, Hewitt GM. 1995. Postglacial expansion and genome subdivision in the European grasshopper *Chorthippus parallelus*. Mol Ecol. 4:49–60.

Creevey CJ, McInerney JO. 2002. An algorithm for detecting directional and non-directional positive selection, neutrality and negative selection in protein coding DNA sequences. Gene. 300:43–51.

Darriba D, Taboada GL, Doallo R, Posada D. 2012. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. Nat Methods. 9:772.

Devillard S, Say L, Pontier D. 2004. Molecular and behavioural analyses reveal male-biased dispersal between social groups of domestic cats. Ecoscience. 11:175–180.

Edgar R. 2004. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. Nucleic Acids Res. 32:1792–1797.

Edmands S, Burton S. 1995. Cytochrome C oxidase activity in interpopulation hybrids of a marine copepod: a test for nuclear-nuclear or nuclear-cytoplasmic coadaptation. Evolution. 53:1972–1978.

Flux JEC. 1983. Introduction to taxonomic problems in hares. Acta Zool Fennica. 174:7–10.

Foote AD, Morin PA, Durban J, Pitman R, Wade P, Willerslev E, Gilbert MTP, daFonseca RR. 2010. Positive selection on the killer whale mitogenome. Biol Lett. 7:116–118.

Gemmell N, Metcalf V, Allendorf F. 2004. Mother's curse: the effect of mtDNA on individual fitness and population viability. Trends Ecol Evol (Amst). 19:238–244.

Gillis EA, Krebs CJ. 1999. Natal dispersal of snowshoe hares during a cyclic population increase. J Mammal. 80:933–939.

Goldberg A, Wildman DE, Schmidt TR, Huttemann M, Goodman M, Weiss ML, Grossman LI. 2003. Adaptive evolution of cytochrome c oxidase subunit VIII in anthropoid primates. Proc Natl Acad Sci USA. 100:5873–5878.

Guindon S, Gascuel O. 2003. A simple, fast and accurate method to estimate large phylogenies by maximum-likelihood. Syst Biol. 52:696–704.

Hewitt G. 2000. The genetic legacy of the Quaternary ice ages. Nature. 405:907–913.

Kasapidis P, Suchentrunk F, Magoulas A, Kotoulas G. 2005. The shaping of mitochondrial DNA phylogeographic patterns of the brown hare (*Lepus europaeus*) under the combined influence of Late Pleistocene climatic fluctuations and anthropogenic translocations. Mol Phylogenet Evol. 34:55–66.

Koutsogiannouli E, Moutou KA, Stamatis C, Mamuris Z. 2012. Analysis of MC1R genetic variation in *Lepus* species in Mediterranean refugia. Mamm Biol. 77:428–433.

Koutsogiannouli EA, Moutou KA, Sarafidou T, Stamatis C, Spyrou V, Mamuris Z. 2009. Major histocompatibility complex variation at class II DQA locus in the brown hare (*Lepus europaeus*). Mol Ecol. 18:4631–4649.

Kunkele J, von Holst D. 1996. Natal dispersal in the European wild rabbit. Anim Behav. 51:1047–1059.

Macdonald DW, Newman C, Buesching CD, Johnson PJ. 2008. Male-biased movement in a high-density population of the Eurasian badger (*Meles meles*). J Mammal. 89:1077–1086.

Mamuris Z, Moutou AK, Stamatis C, Sarafidou T, Suchentrunk F. 2010. Y DNA and mitochondrial lineages in European and Asian populations of the brown hare (*Lepus europaeus*). Mamm Biol. 75:233–242.

Martin AP, Palumbi SR. 1993. Body size, metabolic rate, generation time, and the molecular clock. Proc Natl Acad Sci USA. 90:4087–4091.

McLellan BN, Hovey FW. 2001. Natal dispersal of grizzly bears. Can J Zool. 79:838–844.

Michaux J, Libois R, Paradis E, Filippucci M. 2004. Phylogeographic history of the yellow-necked fieldmouse (*Apodemus flavicollis*) in Europe and in the Near and Middle East. Mol Phylogenet Evol. 32:788–798.

Pierpaoli M, Riga F, Trocchi V, Randi E. 1999. Species distinction and evolutionary relationships of the Italian hare (*Lepus corsicanus*) as described by mitochondrial DNA sequencing. Mol Ecol. 8:1805–1817.

Pond SL, Frost SD. 2005a. Datamonkey: rapid detection of selective pressure on individual sites of codon alignments. Bioinformatics. 21:2531–2533.

Pond SL, Frost SD. 2005b. Not so different after all: a comparison of methods for detecting amino acid sites under selection. Mol Biol Evol. 22:1208–1222.

Pond SL, Frost SD. 2005c. A Genetic algorithm approach to detecting lineage-specific variation in selection pressure. Mol Biol Evol. 22:478–485.

Rand DM. 2001. The units of selection on mitochondrial DNA. Annu Rev Ecol Syst. 32:415–449.

Ruiz-Pesini E, Mishmar D, Brandon M, Procaccio V, Wallace DC. 2004. Effects of purifying and adaptive selection in regional variation in human mtDNA. Science. 303:223–226.

Sackton T, Haney R, Rand D. 2003. Cytonuclear coadaptation in *Drosophila*: Disruption of cytochrome C oxidase activity in backcross genotypes. Evolution. 57:2315–2325.

Santucci F, Emerson BC, Hewitt GM. 1998. Mitochondrial DNA phylogeography of European hedgehogs. Mol Ecol. 7:1163–1172.

Scheffler K, Martin DP, Seoighe C. 2006. Robust inference of positive selection from recombining coding sequences. Bioinformatics. 22:2493–2499.

Sert H, Ben Slimen H, Erdogan A, Suchentrunk F. 2008. Mitochondrial HVI sequence variation in Anatolian hares (*Lepus europaeus* Pallas, 1778). Mamm Biol. 74:286–297.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/06/2024 15:10:58 EEST - 3.135.219.133

Smeds L, Künstner A. 2011. ConDeTri-a content dependent read trimmer for Illumina data. PloS ONE. 6:e26314.

Smith S, Turbill C, Suchentrunk F. 2010. Introducing mother's curse: low male fertility associated with an imported mtDNA haplotype in a captive colony of brown hares. Mol Ecol. 19:36–43.

Stamatis C, Suchentrunk F, Moutou KA, Giacometti M, Haerer G, Djan M, Vapa L, Vukovic M, Tvrtkovic N, Sert H, et al. 2009. Phylogeography of the brown hare (*Lepus europaeus*) in Europe: a legacy of south-eastern Mediterranean refugia? J Biogeogr. 36:515–528.

Stamatis C, Suchentrunk F, Sert H, Triantaphyllidis C, Mamuris Z. 2007. Genetic evidence for survival of released captive-bred brown hare *Lepus europaeus* during restocking operations in Greece. Oryx. 41:548–551.

Stewart JB, Freyer C, Elson JL, Wredenberg A, Cansu Z, Trifunovic A, Larsson NG. 2008. Strong purifying selection in transmission of mammalian mitochondrial DNA. PLoS Biol. 6:e10.

Stöck M, Moritz C, Hickerson M, Frynta D, Dujsebayeva T, Eremchenko V, Macey JR, Papenfuss TJ, Wake DB. 2006. Evolution of mitochondrial relationships and biogeography of Palearctic green toads (*Bufo viridis* subgroup) with insights in their genomic plasticity. Mol Phylogenet Evol. 41:663–689.

Sun C, Kong QP, Zhanq YP. 2007. The role of climate in human mitochondrial DNA evolution: a reappraisal. Genomics. 89:338–342.

Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S. 2013. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. Mol Biol Evol. 30:2725–2729.

Yu L, Li YW, Ryder O, Zhang YP. 2007. Analysis of complete mitochondrial genome sequences increases phylogenetic resolution of bears (Ursidae), a mammalian family that experienced rapid speciation. BMC Evol Biol. 7:198.

Zhou T, Shen X, Irwin DM, Shen Y, Zhang Y. 2014. Mitogenomic analyses propose positive selection in mitochondrial genes for high-altitude adaptation in galliform birds. Mitochondrion. 18:70–75.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/06/2024 15:10:58 EEST - 3.135.219.133

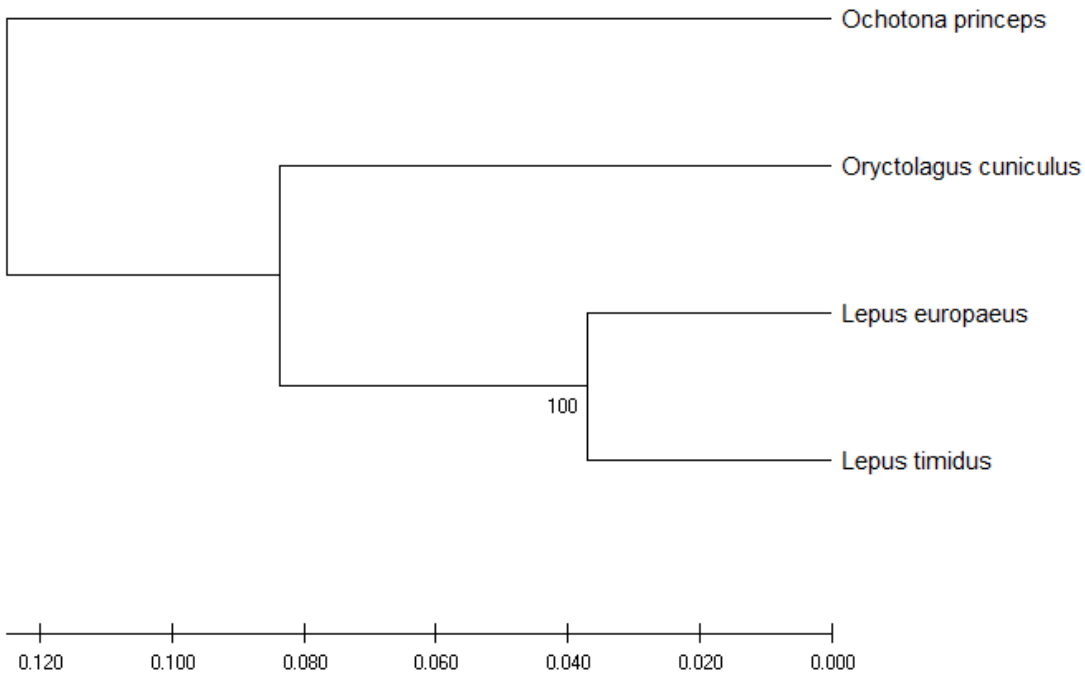
Κεφάλαιο 3: Η μιτοπυρηνική συμπροσαρμογή σε διαειδικό επίπεδο

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/06/2024 15:10:58 EEST - 3.135.219.133

Για τη μελέτη της μιτοπυρηνικής συμπροσαρμογής σε διαειδικό επίπεδο, χρησιμοποιήθηκε το είδος του Ευρωπαϊκού λαγού (*Lepus europaeus*), το είδος του κουνελιού (*Oryctolagus cuniculus*), ο λαγός των βουνών (*Lepus timidus*) και το είδος του American pika (*Ochotona princeps*). Τα είδη αυτά επιλέχθηκαν με δύο κριτήρια:

1. Να είναι συγγενικά με τον ευρωπαϊκό λαγό
2. Να υπάρχουν διαθέσιμες αλληλουχίες σε γονιδιωματικό επίπεδο.

Οι φυλογενετικές σχέσεις των ειδών παρουσιάζονται στο παρακάτω δέντρο, που κατασκευάστηκε με το πρόγραμμα MEGA, με τη χρήση του γονιδίου της υπομονάδας I της κυτοχρωμικής οξειδάσης και της δοκιμασίας bootstrap με 500 επαναλήψεις.



Εικόνα 10: Οι φυλογενετικές σχέσεις των ειδών της ανάλυσης

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/06/2024 15:10:58 EEST - 3.135.219.133

Για την ανάλυση της μιτοπυρηνικής προσαρμογής, χρησιμοποιήθηκαν οι ίδιες ομάδες γονιδίων όπως και στο προηγούμενο κεφάλαιο:

Α. τα μιτοχονδριακά γονίδια που κωδικοποιούν για υπομονάδες των συμπλόκων του OXPHOS (mt-OXPHOS)

Β. τα πυρηνικά γονίδια που κωδικοποιούν για υπομονάδες των συμπλόκων του OXPHOS (nu-OXPHOS)

Γ. τα πυρηνικά γονίδια που κωδικοποιούν για ένζυμα της γλυκόλυσης

Δ. τα πυρηνικά γονίδια που κωδικοποιούν για ένζυμα του κύκλου του Krebs

Τα δεδομένα της ανάλυσης για τα πυρηνικά γονίδια προέρχονταν:

- από την ανάλυση RNA-Sequencing του Ευρωπαϊκού λαγού (Amoutzias et al, 2016)
- από την ανάλυση RNA-Sequencing του American pika (Lemay et al, 2013)
- από την ανάλυση RNA-Sequencing του λαγού των βουνών (Marques et al, 2017)
- από το διαθέσιμο γονιδίωμα του κουνελιού στον ιστότοπο της Ensembl (https://www.ensembl.org/Oryctolagus_cuniculus/Info/Index)

ενώ για τα μιτοχονδριακά γονίδια χρησιμοποιήθηκαν οι πρότυπες αλληλουχίες του κάθε είδους από την Genbank, με Accession numbers:

NC_004028.1 για τον ευρωπαϊκό λαγό

KR019013.1 για τον λαγό των βουνών

NC_001913.1 για το κουνέλι και

NC_005358.1 για το American pika

Με τη χρήση του αλγόριθμου BLAST και χρησιμοποιώντας σαν αλληλουχία επερώτησης την αντίστοιχη αλληλουχία του ευρωπαϊκού λαγού, συγκεντρώθηκαν οι αλληλουχίες των επιμέρους γονιδίων. Στη συνέχεια, οι αλληλουχίες αυτές στοιχήθηκαν με τη χρήση του αλγορίθμου MUSCLE, που βρίσκεται ενσωματωμένος στο πρόγραμμα Aliview και οι στοιχίσεις διορθώθηκαν. Στη συνέχεια, με τη χρήση του προγράμματος MEGA, προσδιορίστηκαν τόσο οι συνώνυμες όσο και οι μη συνώνυμες μεταλλάξεις ανά γονίδιο, με τη χρήση του κατάλληλου γενετικού κώδικα κατά περίπτωση. Ο αριθμός των συνώνυμων και

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/06/2024 15:10:58 EEST - 3.135.219.133

μη συνώνυμων μεταλλάξεων διαιρέθηκε με το μήκος της στοιχισμένης αλληλουχίας, ώστε να υπάρχει μια κανονικοποίηση σε όλους τους ρυθμούς εμφάνισης μεταλλάξεων στα γονίδια αυτά (εκφρασμένοι όλοι οι ρυθμοί ως: μετάλλαξη/νουκλεοτίδιο).

Στη συνέχεια, υπολογίστηκε ο μέσος όρος των ρυθμών αυτών και για τις τέσσερις ομάδες γονιδίων και οι σχετικοί ρυθμοί μεταλλάξεων, σε σύγκριση με το μιτοχονδριακό γονιδίωμα. Με βάση αυτά, προέκυψαν τρείς τιμές που εκφράζουν τους ακόλουθους λόγους:

α. Ρυθμοί μεταλλάξεων mt-OXPHOS / Ρυθμοί μεταλλάξεων nu-OXPHOS

β. Ρυθμοί μεταλλάξεων mt-OXPHOS/ Ρυθμοί μεταλλάξεων γλυκόλυσης

γ. Ρυθμοί μεταλλάξεων mt-OXPHOS/ Ρυθμοί μεταλλάξεων κύκλου του Krebs

Τα αποτελέσματα της ανάλυσης παρουσιάζονται στους παρακάτω πίνακες:

Πίνακας 2: Αριθμός μεταλλάξεων στις ομάδες γονιδίων της μελέτης ανάμεσα στα τέσσερα είδη (οι τιμές αφορούν τον αριθμό μεταλλάξεων ανά δέκα νουκλεοτίδια)

Γονίδια	Συνώνυμες μεταλλάξεις (ds)	Μη συνώνυμες μεταλλάξεις (dns)
mt-OXPHOS	**3,29**	**1,99**
nu-OXPHOS	**0,94**	**0,62**
Glycolysis	**0,97**	**0,34**
Krebs	**0,85**	**0,34**

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/06/2024 15:10:58 EEST - 3.135.219.133

Πίνακας 3: Σχετικοί ρυθμοί μεταλλάξεων των τεσσάρων ομάδων γονιδίων της μελέτης ανάμεσα στα τέσσερα είδη

	ds	dns
mt-OXPHOS /nu-OXPHOS	**3,50**	**3,21**
mt-OXPHOS/Glycolysis	**3,41**	**5,94**
mt-OXPHOS /Krebs	**3,87**	**5,93**

Στη συνέχεια, η ίδια ανάλυση πραγματοποιήθηκε εξαιρώντας το είδος *Ochotona princeps*, για δύο λόγους: για να περιοριστεί το «φυλογενετικό φάσμα» της ανάλυσης (όπως φαίνεται και από το φυλογενετικό δένδρο, αποτελεί το πιο απομακρυσμένο, εξελικτικά, είδος), και λόγω της κακής ποιότητας αλληλουχιών, που περιλάμβαναν πολλές αμφίβολες θέσεις (εμφανίζονται ως N στην νουκλεοτιδική αλληλουχία). Οι υπολογισμοί έγιναν εκ νέου για τα τρία είδη και παρουσιάζονται στους παρακάτω πίνακες:

Πίνακας 4: Αριθμός μεταλλάξεων στις ομάδες γονιδίων της μελέτης ανάμεσα στα τρία είδη
(οι τιμές αφορούν τον αριθμό μεταλλάξεων ανά δέκα νουκλεοτίδια)

Γονίδια	Συνώνυμες μεταλλάξεις (ds)	Μη συνώνυμες μεταλλάξεις (dns)
mt-OXPHOS	**2,06**	**0,77**
nu-OXPHOS	**0,19**	**0,22**
Glycolysis	**0,20**	**0,06**
Krebs	**0,22**	**0,07**

Πίνακας 5:Σχετικοί ρυθμοί μεταλλάξεων των τεσσάρων ομάδων γονιδίων της μελέτης ανάμεσα στα τρία είδη

	ds	dns
mt-OXPHOS /nu-OXPHOS	**9,93**	**3,5**
mt-OXPHOS/Glycolysis	**11.01**	**11,2**

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/06/2024 15:10:58 EEST - 3.135.219.133

mt-OXPHOS /Krebs	**10,31**	**10,3**

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/06/2024 15:10:58 EEST - 3.135.219.133

Κεφάλαιο 4: Υβριδιακές ζώνες και νησιωτικοί πληθυσμοί: Τα φυσικά εργαστήρια για τη μελέτη της εξέλιξης

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/06/2024 15:10:58 EEST - 3.135.219.133

Manuscript Click here to download Manuscript Paper_islands_final.docx

Click here to view linked References

Title page

Title

Islands and hybrid zones: Combining the knowledge from "Natural Laboratories" to explain phylogeographic patterns of the European brown hare

Authors

1. **Giannoulis Themistoklis**, Laboratory of Genetics, Comparative and Evolutionary Biology, University of Thessaly. Viopolis, Mezourlo, Larissa. themisgia@hotmail.com
2. **Plageras Dimitrios**, Laboratory of Genetics, Comparative and Evolutionary Biology, University of Thessaly. Viopolis, Mezourlo, Larissa. dplageras@hotmail.gr
3. **Stamatis Costas**, Laboratory of Genetics, Comparative and Evolutionary Biology, University of Thessaly. Viopolis, Mezourlo, Larissa. kstamatis@med.uth.gr
4. **Chatzivagia Eleni**, Laboratory of Genetics, Comparative and Evolutionary Biology, University of Thessaly. Viopolis, Mezourlo, Larissa. elenisandie@gmail.com
5. **Tsipourlianos Andreas,** Laboratory of Genetics, Comparative and Evolutionary Biology, University of Thessaly. Viopolis, Mezourlo, Larissa**.** a.tsipourlianos@gmail.com
6. **Birtsas Periklis,** Department of Forestry and Natural Environment Administration, TEI of Thessaly. Larissa. birtsas@teilar.gr
7. **Billinis Charalambos,** Faculty of Veterinary Medicine, University of Thessaly, Karditsa, Greece, **cbillinis@gmail.com**
8. **Suchentrunk Franz**, Research Institute of Wildlife Ecology, University of Veterinary Medicine Vienna, Vienna, Austria. Franz.Suchentrunk@vetmeduni.ac.at
9. **Mamuris Zissis**, Laboratory of Genetics, Comparative and Evolutionary Biology, University of Thessaly. Viopolis, Mezourlo, Larissa. zmamuris@gmail.com

Corresponding author: Zissis Mamuris, zmamuris@gmail.com, +3024105652

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/06/2024 15:10:58 EEST - 3.135.219.133

Abstract

Background: The aim of the study was to use hybrid populations as well as island populations of the European brown hare (*Lepus europaeus)* to explore the effect of evolutionary events, such as the post-meltdown translocations, spontaneous and human-mediated, local adaptation and the genetic drift in the shaping of the phylogeographic patterns of the species. For this purpose, we used molecular markers, both nuclear and mitochondrial, that are indicative for local adaptation as well as neutral markers to elucidate the patterns of population differentiation based on geographic isolation and the lineage of origin. To broaden our analysis, we included data from our previous studies concerning mainland populations, to explore the genetic differentiation in the base of the geographic origin (mainland/island) of the populations.

Results: Our results suggest that local adaptation shapes the differentiation in both genomes, favoring specific alleles in nuclear genes (e.g. DQA) or haplotypes in mtDNA (e.g. DLoop). The differentiation in the mtDNA was found to be in a higher level and was able to give a phylogeographic signal for the populations. Futhermore, we found that the differentiation was influenced not only by the geographic origin, but also by the lineage of origin, since specific island populations belonging to one lineage showed a greater degree of differentiation compared to specific mainland populations of the other lineage. Concerning the hybrid population, we confirmed the existence of both lineages in the territory and we provided a possible explanation for the lack of introgression between the lineages.

Conclusion: Our results indicate that the Quaternary played a major role in the shaping of the phylogeographic patterns of the species, by isolating populations in the distinct refugia, where they adapted and differentiate in allopatry, leading to genome incompatibilities observed nowadays.

Keywords: adaptive variation, neutral loci, brown hare, phylogeography

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/06/2024 15:10:58 EEST - 3.135.219.133

Background

By their own very nature, islands and hybrid zones are considered as "natural laboratories" for the study of acting evolutionary forces in populations inhabiting such territories [1,2]. Island populations are often small, derived from a bigger continental population through the founder effect, resulting in reduced levels of heterozygosity [3]. Migrations to and from the population are usually rare, especially for species with low dispersal ability. Thus, the genetic drift is acting to shape the levels of variation through generations. Translocations of such populations are usually human-mediated, especially when the species are lacking the ability to fly (e.g. the paradigm of Iberian red deer, [4]) but many times, permanent or transient land bridges mediate the translocations [5,6]. On the other hand, hybrid populations are formed in territories when two distinct genomes meet and hybridize [7]. During the last ice ages, which took place on the Quaternary, populations of the North have declined dramatically by extinction or by migration to southern and warmer territories [8,9] (e.g. the paradigm of the Gray Wolf, [10]). In the example of Europe, northern population have migrated to the South, where certain and distinct refugia for the species have been recognized so far in Italy, the Iberian Peninsula, the Balkans and Anatolia [8,11,12,13]. The isolation of those populations for a long period resulted to their genetic differentiation. Subsequent post-glacial expansion of the populations led to the formation of the hybrid zones, where different genomes met, yet their differences were responsible for hybrid unfitness [9]. Genetic differentiation of the genomes

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/06/2024 15:10:58 EEST - 3.135.219.133

could be a result of selection or drift. Despite the hybridization, the intraspecific lineages do not geographically mix, which could be a result of the classic hybrid unfitness: F1 hybrids are usually fertile and well-adapted but F2 hybrids tend to show low levels of fitness and adaptation [2,14,15]. It is believed that hybrid zones are maintained by the action of two different processes: random dispersal and selection against hybrids [7]. The reduced fitness of the hybrids is usually caused by many genes with small effect, spreading throughout the genomes rather that a big contribution of a few genes [2]. So, alleles that are crossing the zone are selected negatively: they are in the wrong environment or they are combined with wrong alleles [7]. These parapatric populations and the hybrid zones may reflect the different stages corresponding to scaling levels of differentiation: from divergent populations, up to different species [2]. The existence of hybrid zones has been well characterized for a variety of species, such as the grasshopper, hedgehog, shrew, mouse and the European brown hare (reviewed in [16]).

A paradigm of a species to study the above evolutionary forces acting on multiple levels of population dynamics is the European brown hare (*Lepus europaeus*). Brown hare distribution covers Europe and Anatolia and has been introduced in the past in South America, Australia and New Zealand [17]. It is also present in European Islands, such as the UK and Mediterranean islands. The introductions of the species to these islands have followed two major paths: (a) human mediated translocations, for restocking operations for hunting purposes or as a symbol of fertility, brought during migration activities and/or (b) by movement through temporary land bridges that connected the mainland with these islands and gave the ability to migrate [18]. Thus, hares from islands with proximity to the Anatolian coast, like Chios or Lesvos

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/06/2024 15:10:58 EEST - 3.135.219.133

originated from the Anatolia and migrated when sea level was lowered enough during the Late Glacial Maximum [19,20].

Two major studies for the phylogeography of the species have revealed the existence of two well-separated, spatially and genetically, clades: The European clade, which can be subdivided in Central European and South-Eastern European sub-clade, and the Anatolian clade [20,21]. The European clade is present in European countries, such as Germany, France, Italy, Greece etc., and the Anatolian clade encompasses Anatolia, Cyprus, Israel and the Mediterranean islands with proximity to the Anatolian coast. Despite the distinct geographical distribution of each clade, there is a contact zone in Northern Greece and Bulgaria where the two clades meet and form a hybrid zone. The distribution of the clades is shown in fig. 1. A recent study of the population of the hybrid zone has revealed that the intruding clade is the Anatolian and also areas of genetic discontinuities were found, indicating the reduced gene flow between clades. The reduced gene flow between the clades on contact zone may have resulted in an intriguing fact, which is the absence of geographical mix of the clades anywhere else than the hybrid zone; there has been found none individuals carrying the European haplotype in Anatolia and vice versa [21,22]. Djan and her colleagues [23] by using an extensive sampling in the Balkans (Serbia, Kossovo, Bulgaria, FYROM) and a partial control region of the mitochondrial DNA proposed a refined phylogeographic model for the species, which is in accordance with the previous ones, while they also observed the lack of introgression of the Anatolian clade further from the contact zone in Bulgaria and Northern Greece.

In two recent studies, we tried to explain this phenomenon by using two different approaches. In the first one [24], we used transcriptomics data from individuals of both clades, accounting for fixed mutations in energy producing procedures that are

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/06/2024 15:10:58 EEST - 3.135.219.133

differentiated between the clades. With this approach, we detected signs of co-adaptation in the nuclear genes of OXPHOS, which cooperate with the mitochondrial protein-coding genes to perform the cellular respiration. The theory of co-adaptation refers to genes that cooperate to complete a process are thought to have similar evolutionary rates [25]. In the second study [26] we sequenced fourteen complete mitochondrial genomes representing also both clades. The differentiation of the genes encoding for the mitochondrial OXPHOS subunits was confirmed once again. The contribution of "mother's curse" could be responsible for the hybrid breakdown in the above-mentioned territory: male individuals carrying a specific mitochondrial haplotype are showing a lower reproductive ability. This phenomenon has been observed in individuals of the species of the brown hare kept in captivity, where crosses between individuals with different mitochondrial background resulted in different reproductive success [15]. Sperm cells have higher energy demands compared to ova, so when the mitochondrial haplotype has to cooperate with a differentiated genetic background, there is a breakdown in energy production, affecting the male individuals rather than the females [27].

This model of differentiation is in accordance with the allopatric model, which requires a geographic gap between the populations and a reduced gene flow between them for a long period of time. These criteria are met by the conditions that existed during the Ice Ages mentioned above. Separated populations have developed local adaptations and have diversified through time and these have resulted in a genetic incompatibility, when these two genomes are meeting and hybridizing.

In this context, one of the adaptive loci widely studied is the major histocompatibility complex (MHC). MHC is part of the adaptive immune system and its gene family is comprised by several genes, usually organized in clusters (e.g. in human chromosome

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/06/2024 15:10:58 EEST - 3.135.219.133

6, in mouse chromosome 17, data from Ensembl Genomes (http://ensemblgenomes.org/info/genomes)). The major role of MHC is the presentation of processed antigens to T-cells (CD4 or CD8). MHC molecules are binding antigens using specific structural domains, called peptide-binding regions (PBRs) or binding pockets. A match between the three components, PBR, the antigen and receptors of T-cell are required to start the immune response of the organism [28]. MHC gene family possesses a position among the most polymorphic genes and most of the variation is mapped in the PBR regions, resulting in the extended ability of recognizing a great repertoire of antigens and subsequent presentation to T-cells [29]. In such a manner, populations are capable of resisting a variety of pathogens, affecting populations' adaptation and viability. These high levels of variation are maintained by overdominance or frequency-dependence [30,31]. Generally, the variation in MHC genes is maintained by positive selection, increasing the available pool of different antigen presenting molecules [32,33].

Many associations between the variation of DQ genes (genes of the HLA complex, encoding for surface receptor proteins found on antigen presenting cells) and susceptibility or resistance to disease have been conducted so far, reflecting the importance of maintaining high levels of variation at these particular genes. In the species of European brown hare, there are paradigms correlating specific alleles of MHC genes with susceptibility to EBHS virus [34]. Furthermore, studies in other vertebrates have associated MHC variations with susceptibility to autoimmune diseases, individual odors, mating preferences, kin recognition, co-operation and reproduction success [35,36,37]. Especially in the species of *L. europaeus*, which is the only small sized mammals in Europe which raise their young above the ground right from the day of birth, there is a need for a very efficient immune system, which

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/06/2024 15:10:58 EEST - 3.135.219.133

ensures the protection against any possible infectious factors [38]. Considering the implication of MHC genes in the above-mentioned functions, which are tightly connected to fitness and adaptation of individuals and populations, it has been the marker of choice in studies focusing the mechanisms and significance of molecular adaptation in vertebrates.

The aim of this study is the analysis of adaptive and neutral variations that are established in island populations of the species of *L. europaeus* and compare it with the respective levels in mainland populations. For the former, we use a marker of the MHC gene family and more specifically the exon 2 of DQA gene (MHC class II), that has been proven to be useful for this kind of studies [28,34] and a mitochondrial region [containing partial sequence of the CytB gene, two genes encoding for tRNAs ($tRNA^{Thr}$ and $tRNA^{Pro}$) and a partial sequence of Control Region or D-Loop] while for the latter we genotyped six microsatellite loci. Additionally, we applied the same microsatellite markers in a hybrid population and populations that belong to the major haplogroups, to estimate the current population dynamics in this particular area and how it is affected by the simultaneous existence of the two diversified mitochondrial haplotypes at the same region.

Results

Samples' assignment

All samples were assigned to the 3 major phylogeographic group according to their restriction pattern according to the method proposed by Stamatis and his colleagues (2009). The samples from Greece were assigned to the South-Eastern European group, while the samples of New Zealand and the UK were assigned to the Central

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/06/2024 15:10:58 EEST - 3.135.219.133

European group. The samples of the Greek islands along with the samples of Anatolia, Isreal and Cyprus were assigned to the Anatolian group, with only one exception in the Cypriot population (1 sample was assigned to the Central European group). The samples from the hybrid zone were assigned as follows: 6 were assigned to the SE European, 20 in the Central European and 22 to the Anatolian group.

Variation in MHC DQA exon 2

Twelve different alleles (named allele 1 – allele 12) were detected combined to 21 different genotypes. Six alleles were discovered for the first time and were deposited in GenBank under the accession numbers MH029632-MH029637. Allele frequencies are presented in table 2. As shown in the table, there are overlapping alleles between populations belonging to different clades (e.g. alleles 1 and 2). Pairwise Fst values of the population pairs range from 0.046 (Rodos vs New Zealand) to 0.434 (Samos vs New Zealand) and are presented in table 3.

Table 1:Allele frequencies (%) of DQA exon 2

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	Samples
N.Zealand	88.2	3.9	5.3	0.0	2.6	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	38
Samos	1.4	50.0	0.0	4.3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	44.3	0.0	0.0	35
Rodos	66.7	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	16.7	16.7	0.0	0.0	0.0	6
Mytilini	0.0	41.7	25.0	0.0	0.0	0.0	0.0	33.3	0.0	0.0	0.0	0.0	12
Chios	11.8	8.8	0.0	5.9	0.0	0.0	0.0	5.9	61.8	0.0	5.9	0.0	17
Cyprus	0.0	17.5	2.5	0.0	0.0	25.0	48.8	0.0	0.0	0.0	0.0	6.3	40

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/06/2024 15:10:58 EEST - 3.135.219.133

Table 2:Pairwise Fst values of DQA exon 2 genotype frequencies

	N.Zealand	Samos	Rodos	Mytilini	Chios
Samos	0.43				
Rodos	0.05	0.18			
Mytilini	0.38	0.11	0.21		
Chios	0.39	0.23	0.15	0.20	
Cyprus	0.38	0.20	0.13	0.12	0.19

Pocket analysis

The translation of the sequences of the twelve alleles revealed also twelve different amino acid sequences, which means that each allele carries at least one different non-synonymous mutation compared to the rest. Specific positions of the amino acid sequence encode for partial regions of pocket 1, 6 and 9 according to Bondinas and his colleagues [49]. In this study, we detected five, four and three different pocket variants for pocket 1, 6 and 9 respectively. Their respective frequencies per population are presented in additional table 3. Interestingly, several variants were present only in one or two of the studied populations. Particular variants were detected in Cyprus and Chios populations, while being absent in their parental populations of Anatolia. All pocket variants detected in this study were also discovered in the study of Koutsogiannouli et al [28].

Given the fact that the variants were five, four and three respectively for the pockets 1, 6 and 9, we would expect a maximum number of sixty combinations (haplotypes). However, the unique combinations we observed were only 8 and their frequencies are given in table 4.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/06/2024 15:10:58 EEST - 3.135.219.133

Table 4: Unique pocket combinations and their respective frequencies (%)

Pockets Combinations	N.Zealand	Samos	Rodos	Mytilini	Chios	Cyprus
YHEFWR/NETAN/YNILR	92.11	51.43	66.67	41.67	20.59	17.50
YHLFWT/NETAN/YNILR	5.26	0.00	0.00	25.00	0.00	2.50
YHQFWT/NNTAN/YNILR	0.00	4.29	0.00	0.00	73.53	0.00
YHEFWA/NNTAN/YNIMR	2.63	0.00	16.67	0.00	0.00	0.00
YHQFWA/NNTEN/YNILR	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	25.00
YHQFWA/NNTAG/YGIMR	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	55.00
YHQFWT/NNTAN/YNIMR	0.00	0.00	16.67	33.33	5.88	0.00
YHQFWA/NNTAN/YNILR	0.00	44.29	0.00	0.00	0.00	0.00

The most frequent haplotype in the European clade was found to be the YHEFWR/NETAN/YNILR with a frequency of 92%. In the Anatolian clade, the most frequent combination was the same as in the European (YHEFWR/NETAN/YNILR), with a significant difference in their frequencies (34% versus 92%). The combination analysis revealed also three unique variants for the Anatolian group, two of them were only present in Cypriot population (YHQFWA/NNTAG/YGIMR and YHQFWA/NNTEN/YNILR) and the third one (YHQFWA/NNTAN/YNILR) uniquely in Samos.

Selection analysis

A total of 49 sequences (6 new alleles and 43 already deposited in GenBank) were used for the selection analyses. Since we used more than one methods for detecting selective pressures, we chose the sites that were in accordance in at least two of them. Applying the above criteria, we found strong evidence for positive selection in codon 8 and six positions under negative selective pressure (codon positions: 2, 10, 17, 19, 26, 30). Neither the positively selected site nor the negatively selected sites are encoding for the PBR regions that we mentioned above.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/06/2024 15:10:58 EEST - 3.135.219.133

Mitochondrial DNA analysis

After splitting the region in its counterparts, we detected 10 different haplotypes for the tRNAs genes, 23 for the partial CytB gene and 54 in the partial DLoop sequences (GenBank Accession Numbers: MH029638-MH029691). The outcome of the BlastClust program showed that the CytB and tRNAs regions fail to show geographic grouping of the sequences in finer scale (sequences from different populations were grouped together due to their 100% similarity) while D-Loop grouping has a clear geographic signal following the distribution of the samples. The only exception in the D-loop grouping were three haplotypes shared between the samples of England and New Zealand, possibly due to their common origin, which led us to treat these two populations as one in the ongoing analysis. For this reason, we focused our analysis in the DLoop region, so we could detect the differences between the geographic territories as well. The pairwise genetic distances among the DLoop haplotypes are shown on table 5. Pairwise distances varied from 0.65% (between Samos and Lesvos) to 6.4% between England/New Zealand and Chios. The overall mean distance was calculated to be 3.7%, while the intragroup distances ranged from 0.22% (Chios) to 2.55% (Anatolia). Island populations had an average value of intrapopulation genetic distance equal to 0.63% and the continental population had 2.55% respectively. When we split the populations to the two major haplogroups and calculated again the distances, we found an intragroup distance 0.58% in European populations and 2.7% in Anatolian and the pairwise distance between them was calculated 5.97%.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/06/2024 15:10:58 EEST - 3.135.219.133

Table 5: Pairwise distance of DLoop haplotypes per population

	Rhodes	Anatolia	Lesvos	Samos	Chios	Cyprus
Anatolia	2.94					
Lesvos	2.26	2.17				
Samos	2.37	2.13	0.65			
Chios	2.71	2.90	2.87	2.88		
Cyprus	3.95	3.18	3.14	3.08	3.96	
UK/N. Zealand	6.04	5.94	5.53	5.87	6.41	5.94

The phylogenetic tree revealed the expected topology; we observed two major groups corresponding to the two major lineages, the European and the Anatolian. In the Anatolian lineage, there are also two sub-clades formed, one containing the haplotypes of Cyprus mainly and the other containing the rest of Anatolian haplotypes. Moreover, the haplotypes of Samos and Lesvos are grouped together in the sub-structuring of the Anatolian clade. This type of grouping for the samples of Cyprus, Samos and Lesvos is in accordance with the results from the network analysis in the study of Kasapidis and his colleagues [20] and with the results of our network analysis (fig. 4).

Microsatellite analysis

Tests for HWE and LD

By comparing the results of the chi-square tests with the corrected p-values using the sequential Bonferroni method, we detected population-locus specific deviations from the HWE (additional table 1). In most of these cases, the corresponding Fis values for these combinations were positive, thus were indicative for a deficiency in heterozygotes. Furthermore, in these specific combinations of populations and loci, there was an excess of null alleles (e.g. 13% in Cyprus-Sol30, 21.7% Cyprus-Sat2)

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/06/2024 15:10:58 EEST - 3.135.219.133

and a significantly large frequency of rare alleles (frequency < 10%) (e.g. 19.5% of Cyprus-Sat2, 28.5% of UK-Sat2 were assigned in rare alleles combined).

All 15 tests for LD failed to reject the null hypothesis of linkage equilibrium between the pairs of loci (additional table 2). By using the nominal p-value for our comparisons, the pair of loci Lsa1 and Sat2 showed a significant signal of LD. However, the markers are mapped in chromosomes 5 and 15 of the rabbit genome respectively (which is the most relative species to *L. europaeus* sequenced so far), so we believe this is not a true signal of physical linkage of the loci. Based on these results, we used all the 6 markers for the downstream analysis.

First approach – Population number = 11

The six microsatellite loci analyzed in this study were polymorphic with a mean number of alleles per locus equal to 15.3, ranging from 6 (Lsa6) to 30 (sol30). The number of alleles, the observed and the expected heterozygosities (Hobs and Hexp respectively) calculated for each locus and population are shown in additional table 3. The continental populations had an average of Hobs equal to 0.520 while the island populations had an average of 0.299. Also, there was a difference between the number of alleles between continental and island populations, with continental populations containing approximately double numbers compared to the island populations (6.6 vs 3.2 in Sol08, 11 vs 4.1 in Sol30, 4.5 vs 2.85 in Sol 33, 5 vs 4.7 in Lsa1, 2.75 vs 1.85 in Lsa6 and 10.25 vs 5.28 in Sat2). The number of alleles and the Hobs and Hexp for each locus and population are presented in additional table 4.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/06/2024 15:10:58 EEST - 3.135.219.133

Pairwise Fst values (table 6) ranged from 0.05 between N. Zealand and the UK, (Central European clade), to 0.44 between Samos and Mytilini (Anatolian clade). The hybrid zone population showed a minimum pairwise value compared to the Greek population (0.07) and the maximum values were calculated when compared with Anatolian populations (0.27 vs Mytilini, 0.26 vs Rodos, 0.24 vs Anatolia).

(Table 6 location, placed in the end of the file due to its big size)

Plotting the q-values of each individual (fig. 5) reveals differences between the populations of the three haplogroups (South-Eastern European group: samples 1-39, Central European Group: samples 40-73, Anatolian Group: Samples 74-144), with the populations of Rodos (74-78) and Mytilini (79-83) showing an admixture of patterns. The populations of Samos, Anatolia and Cyprus (84-99, 100-117 and 118-144 respectively), despite belonging to the same clade, are shown to have diversified from each other. The hybrid population (145-192), is showing a uniform pattern, regardless of the mitochondrial haplogroup of origin. The same pattern is observed partially in the Greek individuals also.

Second approach – Population number = 3

Examining the plot K~ΔK, we could infer the real value of K for our data to be equal to 3 as expected, due to the phylogeographic status of the species. We sub-divided the samples to the 3 groups using the q-values, which are calculated automatically by the Structure program. Samples from Greece and the hybrid zone were assigned to group 1, samples from N. Zealand and England were assigned to group 2 and the Anatolian

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/06/2024 15:10:58 EEST - 3.135.219.133

samples were grouped in group 3 with minor exceptions (e.g. the Cypriot sample carrying the Central European mitochondrial haplotype). Pairwise Fst values were recalculated (table 7) for all the three population pairs.

Table 7: Pairwise Fst Values (k=3)

	Anatolian	**Central European**	**SE European**
Anatolian		0.19	0.13
Central European	0.19		0.11
SE European	0.13	0.11	

The observed and expected heterozygosities (Hobs and Hexp respectively) were calculated for each locus and populations. The Hobs values ranged from 0.04 to 0.88 (in marker sol30 in South-Eastern European population) (additional table 5).

Plotting the q-values of each individual, we resulted in the fig. 6. The South-Eastern European samples (showing in red) and the Central European samples (in blue) are showing a discrete grouping from the Anatolian group (green colour). However, in this grouping, the samples from Mytilini and Samos are showing to have the Central European pattern.. Hybrid samples (145-192) are mostly assigned to the South-Eastern European group, with minor assignments to the Central European group while the Anatolian-type grouping is almost absent from the hybrid individuals (green color).

Kinship analysis

Taken into account that the hybrid population contains European (both Central and South-Eastern) and Anatolian haplotypes, we would expect the full-sib or half-sib relationships to be limited between samples from the same lineage in the case of pre-zygotic reproductive isolation between them. However, we detected half-sib relationships from all the different combinations (Central-South Eastern European,

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/06/2024 15:10:58 EEST - 3.135.219.133

Central European-Anatolian, South-Eastern European – Anatolian). Considering the fact that samples from different lineage have different mitochondrial genetic background and so different maternal lineage, we can conclude that these inter-lineage halfsibs are paternal halfsibs (i.e. they have the same father).

Discussion

To our knowledge, this is the first study of the species to combine the analysis of adaptive and non-adaptive variation in island and hybrid populations simultaneously. The importance of studying these populations have well been documented elsewhere [1,2,7,60,61], since they represent perfect examples of isolation (islands) and mix of differentiated genomes (hybrid zones). The formation of these populations under dispersal/translocations was followed by the action of the forces that shaped their genetic pool, which led in the fixation of adaptive and non-adaptive variation as well. So, the adaptive variation that was generated and maintained (fixed) in the populations can be indicative for the populations' history and local adaptation in the different habitats. On the other hand, non-adaptive variation that was generated probably by random mutations in the different populations can give useful insights in the phylogeography of the species, while the adaptive variations may fail to show a phylogenetic signal. One example is the MHC DQA locus, which reflects the absence of the phylogeographic signal: the pairwise Fst values are not following the expected pattern of the phylogeographic status of the species.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/06/2024 15:10:58 EEST - 3.135.219.133

Adaptive variation – DQA and mitochondrial loci

DQA exon 2

The different challenges each population had to face during the isolation in the distinct refugia was the selective force that shaped the DQA variation among the lineages. This is reflected by the diversity in allele distribution in DQA gene between the Anatolian and European populations; they had to challenge different pathogens in their refugia, so specific alleles were favored by selection in each population. The overlap of common alleles between the lineages was found to be absent [28]or limited (this study). This overlap could also be a result of human-mediated translocations in the specific islands. However, even in common alleles, the frequencies showed a significant difference between the lineages. These differences are highlighted also in pocket variant frequencies, where we calculated significant differences in specific pocket variants (P1, P6 and P9) but also in combinations of pockets boring in each allele. Interestingly, the differences are not only observed between lineages but also among populations belonging to the same lineage (e.g. Pocket 1 variant YHQFWA is present in Samos and Cyprus, but totally absent from the rest populations, Pocket 6 variants NNTEN and NNTAG are only present in Chios and Cyprus and absent from the rest populations). The same pattern of differentiation is observed in pocket combinations: unique combinations are observed in specific populations (YHQFWA/NNTEN/YNILR, YHQFWA/NNTAG/YGIMR in Cyprus population, YHQFWA/NNTAN/YNILR in Samos). The important thing behind this finding is that these combinations are not only unique in specific populations, but are also absent from their presumably parental population of Anatolia [28]. So, the

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/06/2024 15:10:58 EEST - 3.135.219.133

introduction of random mutations may have played a role in the appearance of the specific alleles and later on they were positively selected in order to be fixed in these territories. However, positive selection analysis didn't reveal any PBR residues that are positively selected, since codon 8 doesn't contribute to the formation of any pocket. This codon however is in proximity with a codon forming the pocket 1 (codon 9) and with a codon forming pocket 6 (codon 11). There is a number of studies concerning positive selection on DQA genes, that failed to find evidence for positive selection on cotton rat and the European woodmouse [62,63]. Also, a large proportion of codons under positive selection are positioned very close to PBR codons, as a consequence of inferring PBR residues of DQ genes from the three-dimensional structures of DR genes. The absence of positively selected residues in DQ genes may be a result either of a different assembly of DQ genes from the one inferred or by a weaker selection pressure in these genes [64]. This hypothesis is also supported by our finding of 6 codons under negative selection, which may be a result of different selecting pressures acting on DQ genes. Interestingly, there is a variety of positions identified in other species to be positively selected (codons 47, 55, 56, 68, 69, 76 and 79 in species from a variety of orders, e.g. Primates (*H.sapiens*), Rodentia (*M.musculus*), Lagomorpha (*O. cuniculus*), Cetartiodactyla (*B. taurus, O. aries*), Carnivora (*C.familiaris*)). These positions that are recognized in a variety of species as positively selected are might have functional implication in antigen presenting process [64]. The remodeling of PBR positions from DQ specific crystal structure information could shed the light on this phenomenon.

Comparing the values of Hobs and Hexp, we can notice the extremely low values of Hobs in all populations under study. This results is in contrast with the overdominance (the heterozygote advantage), which is believed to be one of the

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/06/2024 15:10:58 EEST - 3.135.219.133

factors contributing to the high levels of MHC variation. This may be a result of a failure to amplify the second allele in the PCR reaction, so we get a pattern of homozygosity in SSCP pattern, or due to selecting only the exon 2 of the gene, where the samples appear to be homozygous, while they are heterozygous at other exonic regions. However, repeating the PCR/SSCP method or sub-cloning the PCR products and further sequencing them, didn't change the results of the analysis.

Interestingly, Hobs values range from 0 (in Rodos population) to 0.33 in Mytilini population, with a weighted mean value of 0.18, while the continental populations from the study of Koutsogiannouli and her colleagues revealed a mean value of Hobs of 0.31 for the Greek haplogroup, 0.42 for the Central European and 0.42 for the Anatolian haplogroup. This reflects a signal of the founder effect: small island populations are created either by translocations (e.g. New Zealand, [20]) or by natural dispersal through temporal land bridges (e.g. Cyprus, [19,20]) and a small proportion of the genetic diversity of the parental population is present in the newly formed island population, leading gradually to homozygosity through inbreeding and through the action of genetic drift, which is also responsible for the fixation of the newly found alleles in the island populations, which are totally absent in their parental populations.

Another example of adaptive variation is the genetic variance of D-Loop region under study among the different territories. The mitochondrial DNA, once considered neutral in terms of selection, now it is believed to be under purifying selection [65]: protein-coding genes are encoding for subunits of the oxidative phosphorylation. Any mutations leading to impairment of the complexes of the OXPHOS would lead to reduction of the energy produced, having a big effect on individual fitness and reproductive success. Also, the control region is harboring

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/06/2024 15:10:58 EEST - 3.135.219.133

essential items for mtDNA's replication and expression. Cooperation of the DLoop elements with counterparts of the nuclear genome, for example the γDNA polymerase or transcription factors, is essential for mitochondrial functions and therefore for the organism's viability. According to the above, the control region of the mtDNA may not be under selection *per se* but it is in high LD with genes under selection, since the mtDNA is transmitted as a whole, due to the absence of recombination events. Traces of selection in the species' mtDNA have beed documented elsewhere [26].

In our populations, there is a clear phylogeographic signal in the D-Loop region; the European haplotypes are grouped together and separately from the Anatolian haplotypes in the constructed phylogenetic tree. This could be explained by two, not mutually exclusive, hypotheses: DLoop is showing an elevated rate of fixing mutations since it is the only non-coding area of the mitochondrial DNA, making it more susceptible to mutations (this study, [26]) and is used for evolutionary studies in many animal species (e.g. Cattle, [66], European brown hare, [20]). There is also evidence for length variation along with sequence variation in the D-Loop region of certain species [67,68]. On the other hand, the functional role of the DLoop described above, could lead to the assumption that this particular region is coevolving/coadapting with the cooperating nuclear genes, so the most adapted combination is favored in terms of effective replication and expression of mtDNA [69,70,71] under specific environmental conditions.

Concluding, the DLoop region is affected by high mutation rate and possibly by coevolution patterns governing the relations between the two separate genomes, leading to locally adaptive variants, specific for each lineage of the species.

It is noteworthy that D-Loop variation is not only influenced by the population localization (mainland, island) but also by the lineage of origin. In this study, we

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/06/2024 15:10:58 EEST - 3.135.219.133

detected a higher rate of haplotypes per sample in mainland populations when compared to island populations (0.76 to 0.24 respectively). However, when taken into account the data of Stamatis and his colleagues (2009), the mainland populations of Anatolia exceeded a higher rate compared to mainland populations of Europe (0.48 to 0.21), while the Anatolian islands exceeded also a higher rate compared to the European islands (0.26 to 0.20) and to the mainland European populations (0.26 to 0.21). These observations are in accordance with the data obtained with mtDNA and allozyme markers [19,72] and are probably caused by the biogeographic position of Anatolia, which is characterized by few environmental barriers for gene flow during the Pleistocene and Holocene epochs for many mammalian species [73,74]. Also, the density of the sampling could be a factor for the variation, since the samples from the mainland Anatolian populations are limited compared to the samples from the mainland European populations (45 vs 751 in this study and Stamatis et al., 2009). A more extended sampling in the Anatolian populations might have lowered the intrapopulation differentiation levels.

Non-adaptive variation – Microsatellites

Concerning neutral variation, the study of the six microsatellite loci, resulted in the expected outcome, if we take into account the phylogeographic status of the species. Using Evanno's estimation of the real K of the populations, we calculated the number of discrete populations to be equal to 3, which corresponds to the distinct phylogenetic haplotypes of the species. The downstream analysis of the samples distribution and assignment revealed some discrepancies in particular island samples (e.g. Rodos, Mytilini), which may be a result of human-mediated translocations.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/06/2024 15:10:58 EEST - 3.135.219.133

However, when we studied variation in the level of mtDNA, these samples showed a clear signal of belonging to the Anatolian lineage, as was revealed by the phylogenetic tree constructed by the D-Loop region as well as by the restriction pattern of the mitochondrial Cytb gene. We believe that these ambiguities are a result of human-mediated translocations of male individuals; human-mediated because there is no land bridge connecting the Central Europe to these islands and male individuals, since the mitochondrial lineage remains of the Anatolian origin.

Tests for HWE revealed some specific population-locus combinations that deviated from the expected equilibrium. These deviations may be explained by the homozygote excess, as revealed by the Wright's Fis values. Furthermore, null or rare alleles may be responsible for the deviations. According to Hale and her colleagues [75], there is a need for 25 to 30 samples per population to estimate the allele frequencies and the heterozygosity range of each population. In our study, this criterion isn't met in specific populations with limited sampling, which affects the estimation of the frequencies which are used in the HWE models. Taken into account these factors, we decided to keep all six markers for the downstream analysis.

The continental populations showed a higher level of Hobs compared to island populations (0.55 vs 0.34 respectively), which is a result of the creation of island populations under the founder effect and the action of genetic drift. Also, it is notable that in all six loci, island populations appear to have alleles that are absent from the parental terrestrial populations. Random mutations may be the "creative force" for these alleles, which remain to the population and establish more easily than the newly created DQA alleles, because of the selective neutrality of these nuclear loci. Pairwise comparison of the 3 groups that were formed in our analysis with Structure showed that the groups that comprised the South-Eastern European samples and the Central

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/06/2024 15:10:58 EEST - 3.135.219.133

European samples had the minimum difference (0.11), while the groups South-Eastern European versus Anatolian and the Central European versus Anatolian showed an elevated differentiation (0.13 and 0.19 respectively). Samples from the hybrid zone, despite carrying all the possible mitochondrial haplotypes, are showing the South-Eastern European pattern as the dominant pattern in their grouping, with some particular individuals to show an intermediate pattern among the Central European and the South-Eastern European. Anatolian pattern is almost absent from the profiling of the samples of the hybrid zone, so we can hypothesize that the hybrids are not F1 hybrids, where we would expect an intermediate pattern in the samples. The SE European haplotype is in geographical proximity with the territory, so we can assume that it is the prevalent one in the specific area through random dispersal of individuals. Mitochondrial haplotypes of the other two groups may be present through the maternal lineage for a prolonged period of time, but their correspondent nuclear loci seem to decrease over time. The decline in their frequency may be a result of their limited dispersal along with the limited fitness of hybrids carrying an admixture of different mitochondrial and nuclear counterparts. Furthermore, when performed sibship analysis, we detected half-sib relationships among individuals carrying different mitochondrial haplotypes (e.g. Anatolian – SE European or Anatolian – Central European), meaning that these individuals share the paternal lineage. Thus, this is another indication that the lineages do not only mix geographically in this territory but they also reproduce and produce offspring. Considering the fact that the lineages meet and mate but there is no introgression between them, we can hypothesize that there is a genetic barrier in the gene flow since there are no geographical barriers that could halt the translocations. This hypothesis can be supported also by the finding of our studies [24,26], where we detected that the

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/06/2024 15:10:58 EEST - 3.135.219.133

OXPHOS genes, nuclear and mitochondrial, are showing an elevated rate of evolution between the lineages of the species, that can cause incompatibilities in the adaptation and the reproduction of the species, when differentiated populations meet and mate in the case of hybrid zones. This phenomenon has also been observed in other species when differentiated populations were crossed to study the effect of the OXPHOS evolution rate in reproductive isolation (e.g. *Tigriopus californicus*, [76,77], *Drosophila*, [78]).

Another possible explanation for this pattern of introgression is the outcome of the meta-analysis of Petit and Excoffier [79], which concluded that species with male-biased dispersal, like many mammals (and the species of *L.europaeus* among them [80,81] appear to have an introgression biased towards mtDNA. Furthermore, according to Petit and Excoffier, the organelle genomes (and the respective markers like CytB, which assigns the samples to the haplogroups) introgress more easily than the nuclear genomes, because they are less likely to hitchhike with a region under selection, that could limit the introgression or even prevent it. A more comprehensive multilocus study of the adaptive variation in the hybrid zone population and in populations with ambiguities between their mitochondrial and nuclear background (e.g. Mytilini), using genomics approaches, would give useful insight on the population composition regarding their current condition and could infer some conclusions on population history and dynamics, which would be used on future approaches for the conservation and the management of the local populations, since the restocking operations is a common practice used worldwide for the species, especially for hunting purposes. The genomics approach could reveal the levels of genetic mixture of the lineages in the nuclear level as well, so that we could detect

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/06/2024 15:10:58 EEST - 3.135.219.133

incompatibilities between the cooperating genes of the two genomes by detecting unusual combinations of alleles in specific genes.

Conclusions

Our multilocus phylogeographic analysis of European brown hare populations from islands allowed to test the effect of the founder effect on these populations in terms of genetic polymorphism, compared to mainland populations. We showed that island populations are showing a lower level of genetic polymorphism but the geographic origin is not the only decisive factor, since the lineage of origin seems to contribute also in the levels of the genetic polymorphism of the island populations. Concerning the hybrid population, we confirmed the mtDNA introgression in the hybrid zone which was not followed by the nuclear DNA introgression of the invasive haplotype (the Anatolian) and we provided a possible explanation based on previous studies of the species and in a theory developed by Petit and Excoffier [ref] that concerns species with male-biased dispersal. According to this theory, the introgression is biased towards mtDNA. Furthermore, using these results of introgression along with data from other studies (Stamatis, Kasapidis, Djan) we can conclude that the Quaternary played a major role in the shaping of the phylogeographic patterns of the species, by isolating populations in distinct refugia, leading to genome differentiation and genomic conflicts observed nowadays.

Methods

Sample collection and assignment

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/06/2024 15:10:58 EEST - 3.135.219.133

One hundred ninety-two samples (192) were collected during 2000-2016 from hunting associations. Sampling areas were selected in the way to ensure that the major haplogroups are represented in the analysis. Sampling areas are shown in fig. 2. DNA extraction was performed using Invitrogen Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA) according to the manufacturer's protocol. The samples were assigned to the three different phylogeographic groups, using the method described in Stamatis et al. [39]: (a) the south-eastern European; (b) the central European; (c) the Anatolian.

PCR amplification

The primers sets we used for the analysis were: DQAF: 5'-TCATCAGCTGACCACGTTGG-3' and DQAR: 5'-GACAGCAGCAGTAGAGTTGG-3' for DQA exon 2 (a 231-bp long amplified region) [40], LepCyb2L: 5'-GAAACTGGCTCCAATAACCC-3' and LepD2H: 5'-ATTTAAGAGGAACGTGTGGG-3' for the mitochondrial region (a 1200-bp long amplified region, comprising the partial CytB, the $tRNA^{Thr}$ and $tRNA^{Pro}$ and the partial DLoop regions) [41]. DQA samples were screened further for variation by single strand conformation analysis (SSCP) and sequencing, according to the method described in Koutsogiannouli et al. [28]. More specifically, 5ul of the PCR product were mixed with 10ul of loading buffer (95% formamide), denaturated at 99° C for 10 minutes and immediately kept in ice to avoid re-hybridization of the clones. The samples were loaded in a 10% acrylamide gel and electrophoresed overnight at 220V. The results were visualized using silver staining and the samples were grouped according to their electrophoretic profile. Representative samples of each profile were selected and cloned in a pGEM-T easy vector and transformed into *E.coli* DH5a

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/06/2024 15:10:58 EEST - 3.135.219.133

competent cells. Using this approach, we could obtain both sequences from a heterozygote profile and a unique sequence from a homozygous profile. After blue/white screening, a number of clones were selected and grown in order to perform isolation of the plasmid DNA. The subsequent PCR-SSCP analysis provided all the alleles in hemizygous condition, so we could perform the sequencing analysis. Sequences were aligned in Bioedit 7.0 and refined by eye. Along with these data, we used data from our previous analysis [28] that used the same genomic regiom.

For the microsatellite analysis, we used 6 primer sets (sol08, sol30, sol33, Lsa1, Lsa6 and Sat2) [42,43,44]. DNA samples were shipped to BGI China, where the amplifications and the sequencing reads were performed in an ABI 3730XL. Raw data were imported to GENEMARKER, exporting the peak figure (FSA files) and site information sheet (Excel format).

Data analysis

MHC locus

Genotype and allele frequencies for each population as well as genotypic differentiation between island populations were measured using GenePop 4.6. Expected and observed heterozygosities and pairwise Fst values among populations were estimated using the package adegenet which is implemented in R [45,46], using individual data (genind option in package). Synonymous and non-synonymous substitutions were detected with MEGA 7. Traces of selection acting in this region were estimated with Datamonkey gateway [47] under the FEL, REL and SLAC methods with levels of significance $p < 0.05$, using the alleles we detected along with

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/06/2024 15:10:58 EEST - 3.135.219.133

all the deposited sequences mapping to this region. FEL and SLAC methods are using Maximum Likelihood approaches to infer nonsynonumous and sunonumous substitutions rates per base of a given alignment while REL tests for selection signatures for each branch of the phylogeny instead of testing for specific sites [48]. To estimate pocket differences between the different alleles, a custom script was written to extract the combinations of partial pockets 1, 6 and 9 encoded by this particular region. The custom script extracts the specific pocket positions of a given amino-acid alignment according to Bondinas et al [49] and records unique pocket variants (pocket 1 variant for each allele etc) and a combination of all three pockets for each allele of the alignment (pocket1-pocket6-pocket9 for allele 1 etc). The exact positions of the alignment that correspond to the pocket positions were retrieved from the study of Koutsogiannouli et al [28]. The frequencies of the combinations per populations were also measured and compared with the respective frequencies from a former study on mainland populations of the species [28].

Mitochondrial DNA region

The 1200 bp-long region was further split in the three different parts: the partial CytB region, the $tRNA^{Thr}$ and $tRNA^{Pro}$ region and finally the partial DLoop region by aligning it to the reference genome (Accession number: AJ421471). The total numbers of mutations in each of the three sub-divisions of the amplicon were measured using MEGA 7. We used the BlastClust algorithm to extract the unique sequences among the samples (100% length coverage plus 100% similarity) and distributed each sample to the unique haplotypes derived from the program. The total number of mutations and haplotypes (unique sequences) for each region is presented

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/06/2024 15:10:58 EEST - 3.135.219.133

in table 1. Using the unique haplotypes, we constructed a ML tree with bootstrap test to test for the potent phylogeographic signal of the haplotypes (fig 3). Additionally, we performed a network analysis, using the program PopART [50] to visualize the spatial relationships between the unique haplotypes.

Table 3: Total number of mutations and haplotypes per locus

Genomic Region	Number of mutations	Number of haplotypes	Geographic grouping
Dloop	79	53	Yes
tRNAs	8	10	No
Cytb	33	23	Partial
DQA exon 2	37	12	No

Microsatellites analysis

Genotype construction for each sample was extracted using GeneScan with default parameters, using LIZ 500 as a marker (ThermoFisher Scientific). Homozygous samples exceeded one peak at a specific size while heterozygous samples showed two peaks at two different sizes. The sizes of the peaks were estimated by comparing the samples' peak distance from the peaks of the LIZ 500 marker, which are of known sizes (ranging from 35 to 500). In order to round all allele sizes in an equivalent way, the program tandem was used, which uses an exhaustive search using the power function (transformed allele size) = a + b × (observed allele size)^{c} while optimizing parameters a, b and c so that rounding errors are minimal when rounding transformed allele sizes to integers that fit the expected nucleotide repeat patterns [51]. The first step in data analysis was checking for Hardy-Weinberg equilibrium across all population and loci combinations and for linkage disequilibrium for each pair of loci across all populations. For the purpose, we used the program Genepop 4.6 (available online at: genepop.curtin.edu.au) [52]. We considered all tests of all loci/locus pairs to

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/06/2024 15:10:58 EEST - 3.135.219.133

be part of a single experiment, which produced n*m independent tests of HW (n: number of populations, m: number of markers of study) and m(m-1)/2 tests of LD. The p-values of each test were compared to the corrected α for multiple testing using the sequential Bonferroni correction, according to Holm and Rice [53,54] to check for departures from HWE or for loci with signs of LD. At some particular combinations of populations and loci (e.g. Mytilini for the marker Sol08, Chios for the marker Sol30), the HW test couldn't be performed (one allele per locus) so we excluded these from the correction of α. Futhermore, we computed the Wright's coefficient of inbreeding (Fis) for every combination of population and loci ($F_{is} = \frac{Hexp-Hobs}{Hexp}$) [55]. Positive values of Fis are indicative of deficiency in heterozygosity while negative values are indicative for excess, thus, we could use this information to explain any deviations from HWE. The specific departures of HWE are shown in additional table 1 with the corresponding Fis values. Pairwise p-values for the LD testing are shown in additional table 2.

For the downstream analysis, we used two different approaches: in the first, we assumed the number of populations to be the number of distinct geographic groups and we calculated allele frequencies, observed and expected heterozygosity for each population and each locus using the package adegenet, and the pairwise Fst values for every locus, using the program MSA 4.05 [56]. In the second approach, we wanted to avoid the use of the geographic origin of the samples as a distribution criterion for populations assignment, for two main reasons: first, for samples in proximity, we can't assume genetic similarity due to undefined genetic barriers in gene flow (a phenomenon which is observed in European hare populations in the contact zone) and second, geographic separation is not always resulting in genetic differentiation [57]. For these reasons, we tried to infer the real number of populations (from now on

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/06/2024 15:10:58 EEST - 3.135.219.133

referred as K) using the Structure program [58]. The true number of K is usually inferred using the maximum value of LnP(D), which stands for the posterior probability of the data for a given K. However, this method fails to detect the real K, since the LnP(D) tends to increase slightly for larger Ks until it reaches a plateau. So, we used the alternative method, plotting the second order of change of L(K) (Δ(K)) as described in the study of Evanno and his colleagues [57], using among others simulated datasets of island populations and contact zones. We ran twenty simulations for each value of K ranging from two to nine and the mean value of LnP(D) along with the variance was used for further analysis. The calculations of the Δ(K) require multiple steps: calculation of the mean likelihood L(K) over 20 runs for each K, calculation of the mean difference between successive likelihood values of K, L'(K)= L(K)-L(K-1), which corresponds to the rate of change for the likelihood function. In a third step, there is a calculation of the absolute value of the differences between two successive values ok L'(K), which corresponds to the second order rate of change of L(K) (L''(K)). Finally, the estimation of ΔK is the average mean of L''(K) divided by the standard deviation of L(K) [57]. By examining the plot K~ΔK (additional fig.1) the real K was inferred for our data to be equal to three (K=3). Samples were divided in three groups using the Q-values, which are automatically produced by structure runs. Then, we set K=3 in a single structure run with all the details implemented to plot the distribution of the generated Q-values of each individual. The Q values represent the cluster membership coefficient, i.e. the probability of the individual to be a member of a specific genetic cluster.

Additionally, to assess the deeper structure of the hybrid population and infer the relationships between individuals, we used the program Colony [59], which implements likelihood methods to infer kinship relationships between individuals

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/06/2024 15:10:58 EEST - 3.135.219.133

(halfsib and fullsib, sharing one or both parents respectively) using multilocus genotype data along with information about species ploidy, mating systems and genotyping error rates.

List of abbreviations

Not applicable

Declarations

Ethics approval and consent to participate

Not applicable

Consent for publication

Not applicable

Availability of data and material

The sequencing data that support the findings of this study will be available from Genbank (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/) under the accession numbers MH029632-MH029691 but at the moment they are not available since there is a date embargo. Data will be published after the publication of the manuscript. Microsatellite Data are however available from the authors upon reasonable request.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Funding

Funding was received from Postgraduate Courses ‘‘Biotechnology—Quality Assessment in Nutrition and the Environment’’ and ‘‘Applications of Molecular Biology—Genetics—Diagnostic Biomarkers’’ of the Department of Biochemistry and Biotechnology, University of Thessaly, Larissa, Greece.

Authors' contributions

TG, KS and ZM conceived and designed the experiment. PB, CB and FZ conducted fieldwork on sampling. TG, DP, EC and AT performed the experiments. TG, DP, KS

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/06/2024 15:10:58 EEST - 3.135.219.133

and AT analysed the data. TG, DP, KS, AT and ZM wrote the paper. PB, CB and FZ provided valuable comments. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgements

Not applicable

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/06/2024 15:10:58 EEST - 3.135.219.133

References

1. Emerson BC. Evolution of oceanic islands: Molecular phylogenetic approaches to understanding patern and process. Mol Ecol.2002;11(6):951-66
2. Hewitt GM. Hybriz Zones – Natural Laboratories for Evolutionary Studies.TREE.1988;3(7):158-167
3. Baker AJ, Jenkins PF. Founder effect and cultural evolution of songs in an isolated population of chaffinches, Fringilla coelebs, in the Chatham islands. Animal Behaviour.1987; 35(6):1793-1803
4. Fernandez-Garcia JL, Carranza J, Martinez JG, Randi E. Mitochondrial D-loop phylogeny signals two native Iberian red deer (Cervus elaphus) Lineages genetically different to Western and Eastern European red deer and infers human-mediated translocations. Biodivers Conserv.2014; 23:537-554
5. van Andel TH, Shackleton JC. Late Paleolithic and Mesolithic Coastlines of Greece and the Aegean. Journal of Field Archaeology.1982;9:445-454
6. Sfenthourakis S, Triantis AK. The Aegean archipelago: a natural laboratory of evolution, ecology and civilisations. J of Biol Res-Thessaloniki.2017;24(4):1-13
7. Barton NH, Hewitt GM. Adaptation, speciation and hybrid zones. Nature.1989; 341:497-503
8. Hewitt GM. The genetic legacy of the Quaternary ice ages. Nature.2000;405:907-913
9. Hewitt GM. Genetic consequences of climatic oscillations in the Quaternary. Phil Trans R Soc Lond B.2004; 359:183-195
10. Wayne KT, Lehman N. Mitochondrial DNA variability of the Gray Wolf: Genetic consequences of Population Decline and Habitat Framgentation. Conservation Biology.1992; 6(4):559-569
11. Taberlet P, Fumagalli L, Wust-Saucy AG, Cosson JF. Comparative phylogeography and postglacial colonization routes in Europe. Molecular Ecology.1998; 7(4):453-464
12. Dubey S, Zaitsev M, Cosson JF, Abdukadier A, Vogel P. Pliocene and Pleistocene diversification and multiple refugia in a Eurasian shrew (Crocidura suaveolens group). Mol Phylogen Evol.2006; 38(3):635-647
13. Orth A, Auffray AJ, Bonhomme F. Two deeply divergent mitochondrial clades in the wild mouse Mus macedonicus reveal multiple glacial refuges south of Caucasus. Heredity.2002; 89:353-357
14. Burton RS, Ellison CK, Harrison JS. The Sorry State of F2 Hybrids: Consequences of Rapid Mitochondrial DNA Evolution in Allopatric Populations. The American Naturalist.2006; 168:14-24
15. Smith S, Turbill C, Suchentrunk F. Introducing mother's curse: low male fertility associated with an imported mtDNA haplotype in a captive colony of brown hares. Molecular ecology.2010; 19(1):36-43
16. Bilgin R. Back to the suture: The Distribution of Intraspecific Genetic Diversity in and Around Anatolia. Int J Mol Sci.2011; 12:4080-4103

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/06/2024 15:10:58 EEST - 3.135.219.133

17. Flux JEC. Introduction to taxonomic problems In hares. Acta Zoologica Fennica.1983; 174:7-10
18. Fraguglione D.Introduction artificielle et tentative d_acclimatitation due lièvre commun (Lepus europaeus Pallas, 1778) (par le monde).Royal Saint Hubert Club Belgique.1964;pp 1-16
19. Suchentrunk F, Ben Slimen H, Stamatis C, Sert H, Scandura M, Apollonio M, Mamuris Z. Molecular approaches revealing prehistoric, historic, or recent translocations and introductions of hares (Genus Lepus) by humans. Human Evolution.2006; 21:151-165
20. Kasapidis P, Suchentrunk F, Magoulas A, Kotoulas G. The shaping of mitochondrial DNA phylogeographic patterns of the brown hare (Lepus europaeus) under the combined influence of Late Pleistocene climatic fluctuations and anthropogenic translocations. Molecular Phylogenetics and Evolution.2005; 34:55-66
21. Stamatis C, Suchentrunk F, Moutou AK, Giacometti M, Haerer G, Djan M, Vapa L, Vukovic M, Tvrtkovic N, Sert H, Alves PC, Mamuris Z. Phylogeography of the brown hare (Lepus europaeus) in Europe: a legacy of south-eastern Mediterranean refugia?. J Biogeogr.2009; 36:515-528
22. Antoniou A, Magoulas A, Platis P, Kotoulas G. Assessing the genetic landscape of a contact zone: the case of European hare in northeastern Greece. Genetics.2013; 141:23-40
23. Djan M, Stefanovic M, Velickovic N, Lavadinovic V, Alves PC, Suchentrunk F. Brown hares (Lepus europaeus Pallas, 1778) from the Balkans: a refined phylogeographic model. Hystrix, the Italian Journal of Mammalogy.2017; 28(2):196-193
24. Amoutzias GD, Giannoulis T, Moutou AK, Psarra AMG, Stamatis C, Tsipourlianos A, Mamuris Z.. PLoS ONE.2016; 11(7):e0159939
25. Blier PU, Dufresne F, Burton RS. Natural selection and the evolution of mtDNA-encoded peptides: evidence for intergenomic co-adaptation.TRENDS in Genetics.2001; 17(7):400-406
26. Giannoulis T, Stamatis C, Tsipourlianos A, Mamuris Z. Mitogenomic analysis in European brown hare (Lepus europaeus) proposes genetic and functional differentiation between the distinct lineages. Mitochondrial DNA A DNA Mapp Seq Anal.2017; 27:1-8
27. Gemmell NJ, Metcalf VJ, Allendorf FW. Mother’s curse: the effect of mtDNA on individual fitness and population viability. Trends in Ecology & Evolution.2004; 19(5):238-244
28. Koutsogiannouli EA, Moutou AK, Sarafidou T, Stamatis C, Spyrou V, Mamuris Z. Major histocompatibility complex variation at class II DQA locus in the brown hare (Lepus europaeus). Molecular Ecology.2009; 18(22):4631-4649
29. Smith TR, Tang X, Maricic I, Garcia Z, Fanchiang S, et al.Dendritic cells use endocytic pathway for cross-priming class Ib MHC-restricted

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/06/2024 15:10:58 EEST - 3.135.219.133

CD8alphaalpha+TCRalphabeta+ T cells with regulatory properties. J Immunol 182: 6959–6968.2009;

30. Penn DJ, Potts WK. The Evolution of Mating Preferences and Major Histocompatibility Complex Genes. The American Naturalist.1998; 153(2)
31. Piertney SB, Oliver MK. The evolutionary ecology of the major histocompatibility complex. Heredity.2006; 96:7-21
32. Hughes AL, Yeager M, Tel Elshof AET. A new taxonomy of mammalian MHC class I molecules. Immunology Today.1999; 20(1):22-26
33. Yeager M, Hughes AL. Evolution of the mammalian MHC: natural selection, recombination, and convergent evolution. Immunologican reviews.1999; 167(1):45-48
34. Iacovakis C, Mamuris Z, Moutou AK, Touloudi A, Hammer AS, Valiakos G, Giannoulis T, Stamatis C, Spyrou V, Athanasiou LV, Kantere M, Asferg T, Giannakopoulos A, Salomonsen CM, Bogdanos D, Birtsas P, Petrovska L, Hannant D, Billinis C. Polarisation of Major Histocompatibility Complex II host genotype with pathogenesis of European brown hare syndrome virus. PLOS ONE.2013; 8(9): e74360
35. Hedrick PW. Evolutionary genetics at the major histocompatibility complex. American naturalist.1994; 143:954-964
36. Bernatchez L, Laundry C. MHC studies in nonmodel vertebrates: what have we learned about natural selection in 15 years? .Journal of Evolutionary Biology.2003; 16:363-377
37. Sommer S. The importance of immune gene variability (MHC) in evolutionary ecology and conservation. Frontiers in Zoology.2005; 2:16
38. Smith S, Mang T, de Bellock JG, Schaschl H, Zeitlhofer C, Hackländer K Suchentrunk F. Homozygosity at a class II MHC locus depresses female reproductive ability in European brown hares. Molecular Ecology.2010; 18:4131-4143
39. Stamatis C, Suchentrunk F, Sert H, Triantaphyllidis C, Mamuris Z. Genetic evidence for survival of released captive-bread brown hares Lepus europaeus during restocking operations in Greece. Oryx.2007; 41(4):548-551
40. Fain MA, Zhao T, Kindt T.Improved typing procedure for the polymorphic single-copy RLA-DQA gene of the rabbit reveals a new allele.Tissue Antigens.2001;57:332-338
41. Pierpaoli M, Riga F, Trocchi V, Randi E. Species distinction and evolutionary relationships of the Italian hare (Lepus corsicanus) as described by mitochondrial DNA sequencing. Mol Ecol.1999; 8(11):1805-17
42. Rico C, Rico I, Webb N, Smith S, Bell D, Hewitt G. Four polymorphic microsatellite loci for the European wild rabbit, Oryctolagus cuniculus. Animal Genetics.1994; 25(5):367
43. Surridge AK, Bell DJ, Rico C, Hewitt GM. Polymorphic microsatellite loci in the European Rabbit (Oryctolagus cuniculus) are also amplified in the other lagomorph species. Animal genetics.1997; 28(4):302-305

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/06/2024 15:10:58 EEST - 3.135.219.133

44. Mougel F, Mounolou JC, Monnerot M. Nine polymorphic microsatellite loci in the rabbit, Oryctolagus cuniculus. Animal genetics.1997; 28:58-71
45. Jombart T. adegenet: a R package for the multivariate analysis of genetic markers. Bioinformatics.2008; 24:1403-1405
46. Jombart T, Ahmed I. adegenet 1.3-1: new tools for the analysis of genome-wide SNP data. Bioinformatics.2011;27:3070-3071
47. Pond SL, Frost SD. Datamonkey: rapid detection of selective pressure on individual sites of codon alignments. Bioinformatics.2005; 21:2531-2533
48. Pond SL, Frost SD. Not so different after all: a comparison of methods for detecting amino acid sites under selection. Mol Biol Evol.2005; 22:1208-1222
49. Bondinas GP, Moustakas AK, Papadopoulos GK. The spectrum of HLA-DQ and HLA-DR alleles, 2006: a listing correlating sequence and structure with function. Immunogenetics.2007; 59:539-553
50. Leigh JW, Bryant D. PopART: Full-feature software for haplotype network construction. Methods Ecol Evol.2015; 6(9):1110–1116
51. Matschiner M, Salzburger W. TANDEM: integrating automated allele binding into genetics and genomics workflows. Bioinformatics.2009; 25(15): 1982-1983
52. Rousset F. genepop' 007: a complete re-implementation of the genepop software for Windows and Linux. Molecular Ecology Resources.2008; 8:103-106
53. Rise WR.Analyzing tables of statistical tests. Evolution.1989; 43:223-225
54. Holm S. A simple sequential rejective multiple test procedure. Scand J Stat.1979; 6:65-70
55. Waples RS. Testing for Hardy-Weinberg Proportions: Have We Lost the Plot?. Journal of Heredity.2015; 106(1):1-19
56. Dieringer D, Schlötterer C. MICROSATELLITE ANALYSER (MSA): a platform independent analysis tool for large microsatellite data sets. Molecular Ecology Resources.2003; 3(1):167-169
57. Evanno G, Regnaut S, Goudet J. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. Molecolar Ecology.2005; 14:2611-2620
58. Porras-Hurtado L, Ruiz Y, Santos C, Phillips C, Carracedo A, Lareu MV. An overview of STRUCTURE: applications, parameter settings and supporting software. Front Genet.2013; 4:98
59. Jones OR, Wang J. COLONY: a program for parentage and sibship inference from multilocus genotype data. Molecular Ecology Resources.2009; 10(3):551-555
60. Payseur BA. Using differential introgression in hybrid zones to identify genomic regions involved in speciation. Molecular Ecology Resources.2010; 10(5):806-820
61. Wolf JBW, Ellegren H. Making sense of genomic islands of differentiation in light of speciation. Nature Reviews Genetics.2017; 18:87-100

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/06/2024 15:10:58 EEST - 3.135.219.133

62. Pfau RS, Van Den Bussche RA, McBee K, Lochmiller RL. Allelic diversity at the Mhc-DQA locus in cotton rats (Simgodon hispidus) and a comparison of DQA sequences within the family muridae (Mammalia:Rodentia). Immunogenetics.1999; 49:886-893
63. De Bellock JG, Delarbre C, Gachelin G, Morand S. Allelic diversity at the Mhc-DQA locus of woodmouse populations (Apodemus sylvaticus) present in the islands and the mainland of the northern Meditteranean. Glob Ecol Biogeogr.2005; 14:115-122
64. Amills M, Ramíres O, Tomàs A, Obexer-Ruff G, Vidal O. Positive selection on mammalian MHC-DQ genes revisited from a multispecies perspective. Genes and Immunity.2008; 9:651-658
65. Rand DM. The units of selection on Mitochondrial DNA. Annual Review of Ecology and Systematics.2001; 32:415-448
66. Jia S, Chen H, Zhang G, Wang Z, Lei C, Yao R, Han X. Genetic Variation of Mitochondrial D-loop Region and Evolution Analysis in Some Chinese Cattle Breeds. Journal of Genetics and Genomics.2007; 34(6):510-518
67. Wilkinson SG, Chapman MA. Length and sequence variation in Evening Bat D-Lool mtDNA. Genetics.1991; 128:607-617
68. Brown JR, Beckenbach AT, Smith MJ. Mitochondrial DNA Length Variation and Heteroplasmy in Populations of White Sturgeon (Acipenser transmontanus). Genetics.1992;132:221-228
69. Taanman JW. The mitochondrial genome: structure, transcription, translation and replication. Biochimica et Biophysica acta.1999; 1410:103-123
70. Clayton AD. Transcription and replication of mitochondrial DNA. Human Reproduction.2000;15:11-17
71. Hill J, Chen Z, Xu H. Selective propagation of functional mitochondrial DNA during oogenesis restricts the transmission of a deleterious mitochondrial variant. Nature Genetics.2014; 46(4):389-393
72. Sert H, Suchentrunk F, Erdogan A. Genetic diversity within Anatolian brown hares (Lepus europaeus Pallas, 1778) and differentiation among Anatolian and European populations. Mammalian Biology.2005; 70:171-186
73. Cheylan G. Patterns of Pleistocene turnover, current distribution and speciation among Mediterranean mammals. In: Biogeography of Meditterenean Invasion (eds Groves RH, Di Castri F). Cambridge University Press,Cambridge. pp.1991; 227-262
74. Roberts N, Kuzucuoglu C, Karabiyikoglu M. The Late Quaternary in the Eastern Mediterranean region: an introduction. Quaternary Science Reviews.1999; 18:497-499
75. Hale ML, Burg TM, Steeves TE. Sampling for Microsatellite-Based Population Genetic Studies: 25 to 30 individuals per Population is Enough to Accurately Estimate Allele Frequencies. PLOS ONE.2012; 7(9):e45170
76. Ellison CD, Burton RS. Interpopulation hybrid breakdown maps to the mitochondrial genome. Evolution.2008; 62(3):631-638

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/06/2024 15:10:58 EEST - 3.135.219.133

77. Ellison CK, Burton RS. Disruption of mitochondrial function in interpopulation hybrids of Tigriopus californicus. Evolution.2006; 60(7):1382-1391
78. Hutter P. X-linked small GPTase and OXPHOS genes are candidates for the genetic bases of hybrid inviability in Drosophila. Development Genes and Evolution.2002; 212(10):504-512
79. Petit R, Excoffier L. Gene flow and species delimitation. Trends in Ecology & Evolution.2009; 24(7):386-393
80. Bray Y, Devillard S, Marboutin E, Mauvy B, Peroux R. Natal dispersal of European hare in France. J Zool.2007; 273:426-434
81. Avril A, Leonard Y, Letty J, Peroux R, Guitton JS, Pontier D. Natal dispersal of European hare in a high-density population. Mamm Biol.2011; 76:148-156

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/06/2024 15:10:58 EEST - 3.135.219.133

Tables

Table 6: Pairwise Fst values (k=11)

	Greece	N. Zealand	UK	Rodos	Mytilini	Samos	Anatolia	Chios	Cyprus	Israel	Hybrid Zone
Greece		0.22	0.15	0.17	0.22	0.20	0.17	0.18	0.17	0.16	0.07
N. Zealand	0.22		0.05	0.28	0.37	0.33	0.37	0.36	0.29	0.38	0.22
UK	0.15	0.05		0.23	0.27	0.17	0.28	0.29	0.23	0.30	0.13
Rodos	0.17	0.28	0.23		0.31	0.40	0.22	0.23	0.15	0.21	0.26
Mytilini	0.22	0.37	0.27	0.31		0.44	0.33	0.36	0.26	0.35	0.27
Samos	0.20	0.33	0.17	0.40	0.44		0.31	0.38	0.31	0.38	0.14
Anatolia	0.17	0.37	0.28	0.22	0.33	0.31		0.24	0.16	0.21	0.24
Chios	0.18	0.36	0.29	0.23	0.36	0.38	0.24		0.21	0.30	0.23
Cyprus	0.17	0.29	0.23	0.15	0.26	0.31	0.16	0.21		0.07	0.20
Israel	0.16	0.38	0.30	0.21	0.35	0.38	0.21	0.30	0.07		0.21
Hybrid Zone	0.07	0.22	0.13	0.26	0.27	0.14	0.24	0.23	0.20	0.21	

Figures titles and legends

Figure 1: **The distribution of the species.** The discrete lineages (green for the European, red for the Anatolian) are having a contact zone in North-Eastern Greece and Bulgaria (blue).

Figure 2: **The sampling locations.** The coloring is in accordance with the lineage of the species present in each location.

Figure 3: **An ML tree of the unique D-Loop haplotypes.**

Figure 4: **Network analysis of the D-Loop haplotypes**. Coloring is in accordance with the lineage of origin of the population (green for the European, red for the Anatolian).

Figure 5: **Samples' assignments to eleven clusters, using the geographic origin of the samples.**

Figure 6: **Samples' assignments to three clusters, using the phylogeographic origin of the samples.**

Additional files

Additional Figure 1: **The K-Δ(K) plot using the Evanno's approach.** The peak of the plot is for K=3.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/06/2024 15:10:58 EEST - 3.135.219.133

Additional table 1: Deviations from HQE and the respective Fis values

Additional table 2: Pairwise test for LD among marker pairs

Additional table 3: Pocket frequencies per population

Additional table 4: Number of alleles, observed and expected heterozygosities in six microsatellite markers

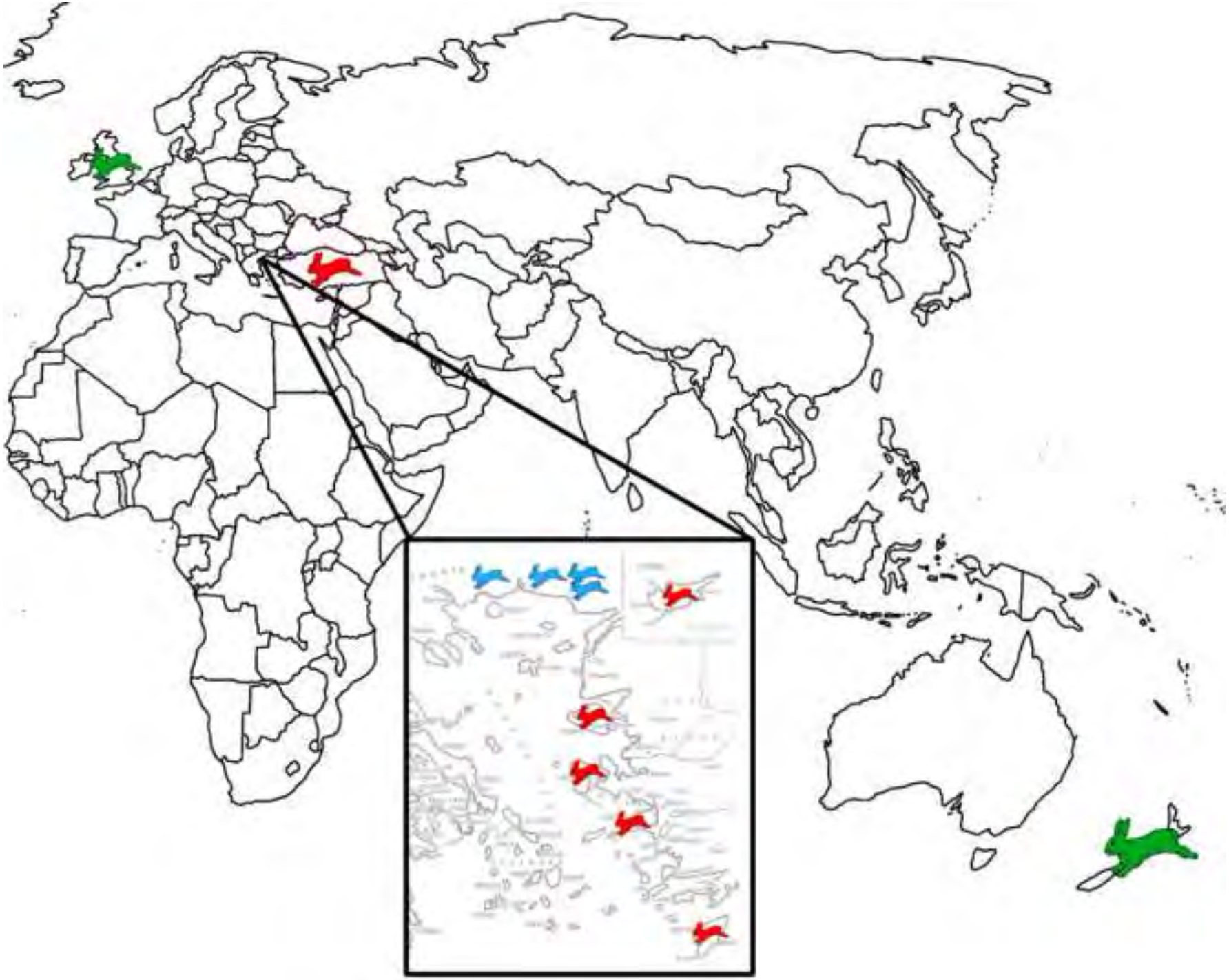
Additional table 5: Observed and expected heterozygosities in six microsatellite markers

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/06/2024 15:10:58 EEST - 3.135.219.133

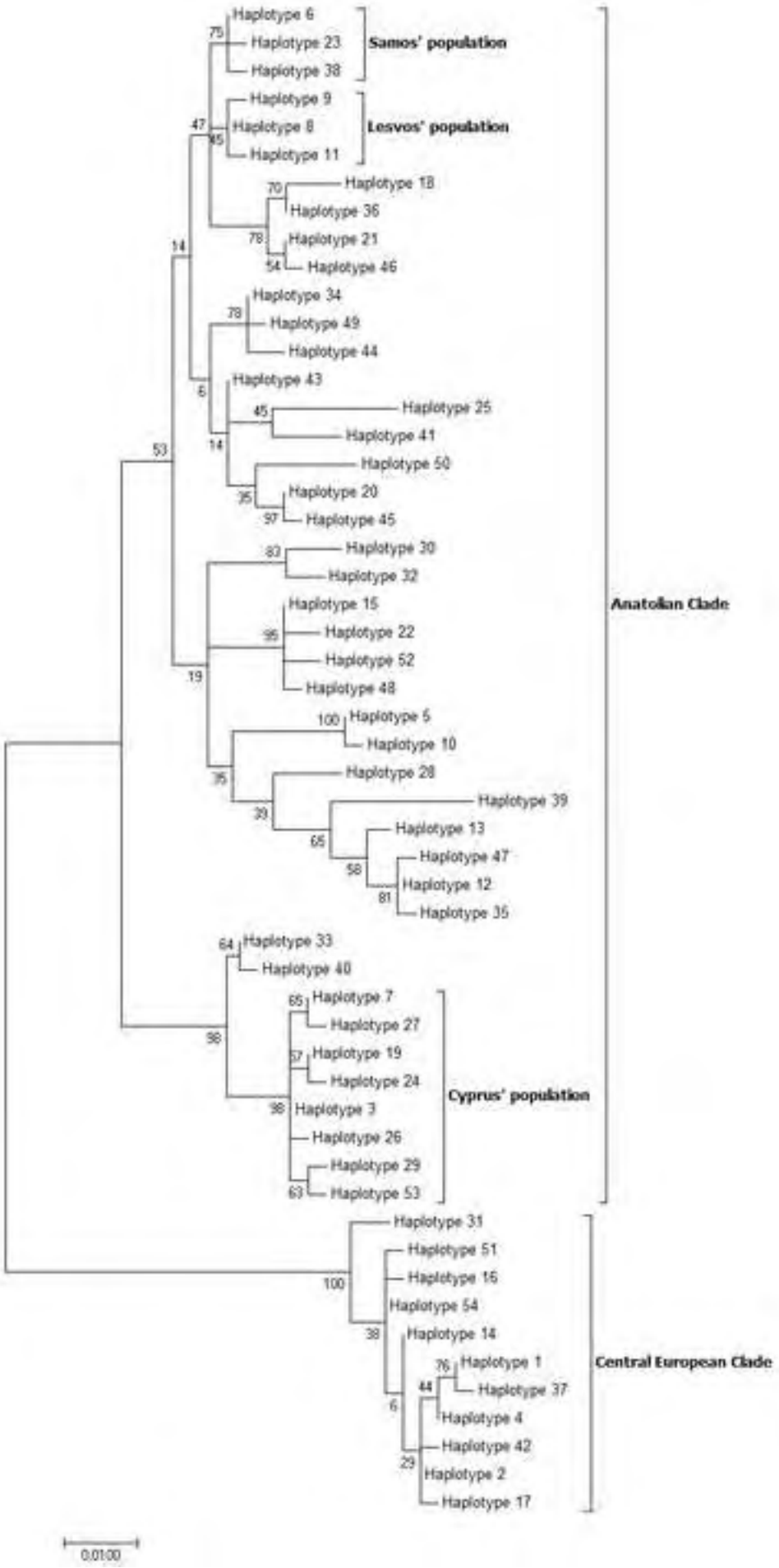
Click here to download Figure Figure_1.jpg

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/06/2024 15:10:58 EEST - 3.135.219.133

Click here to download Figure Figure_2.png

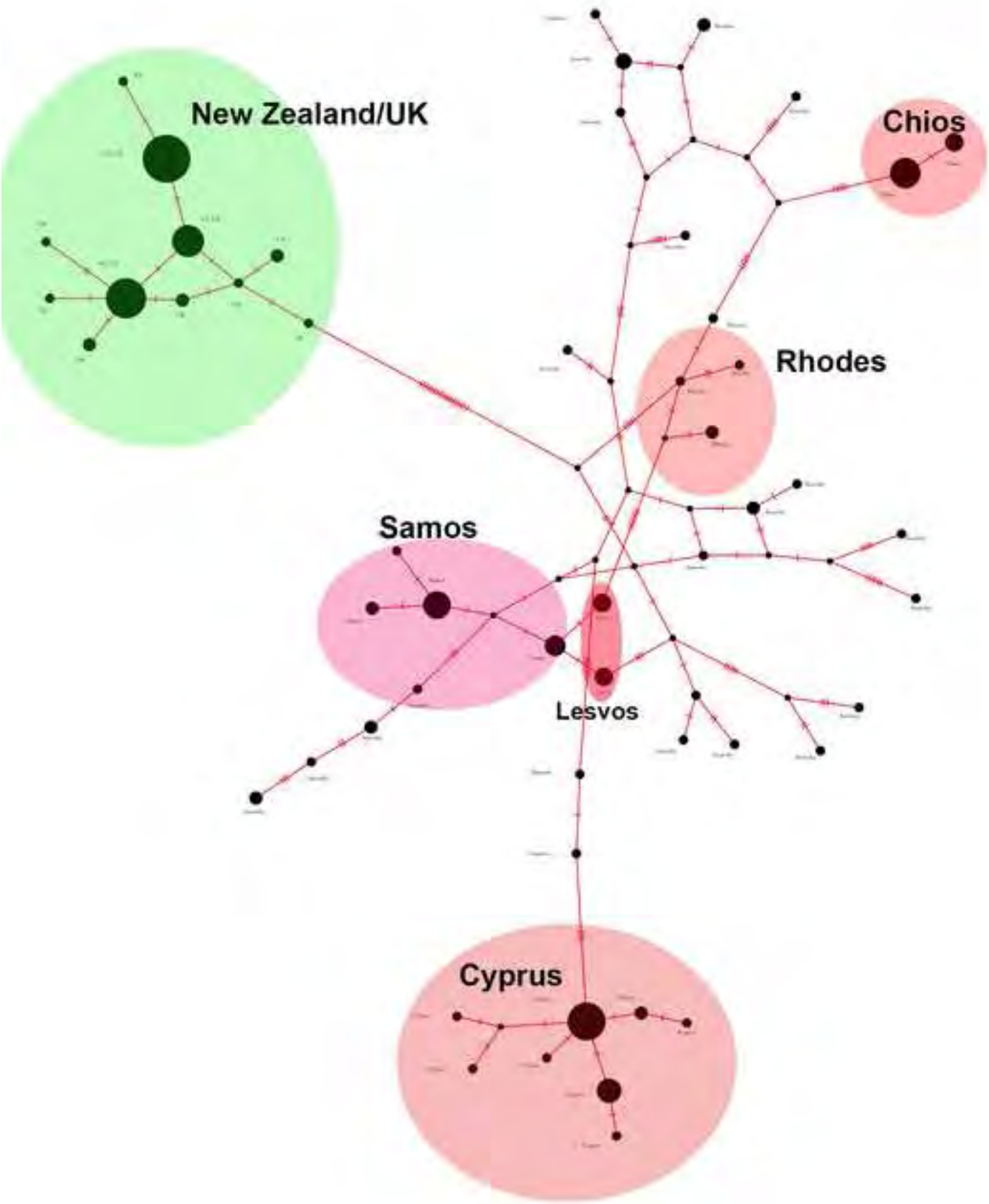


Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/06/2024 15:10:58 EEST - 3.1.35.219.133



Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/06/2024 15:10:58 EEST - 3.135.219.133

Click here to download Figure figure_4.png

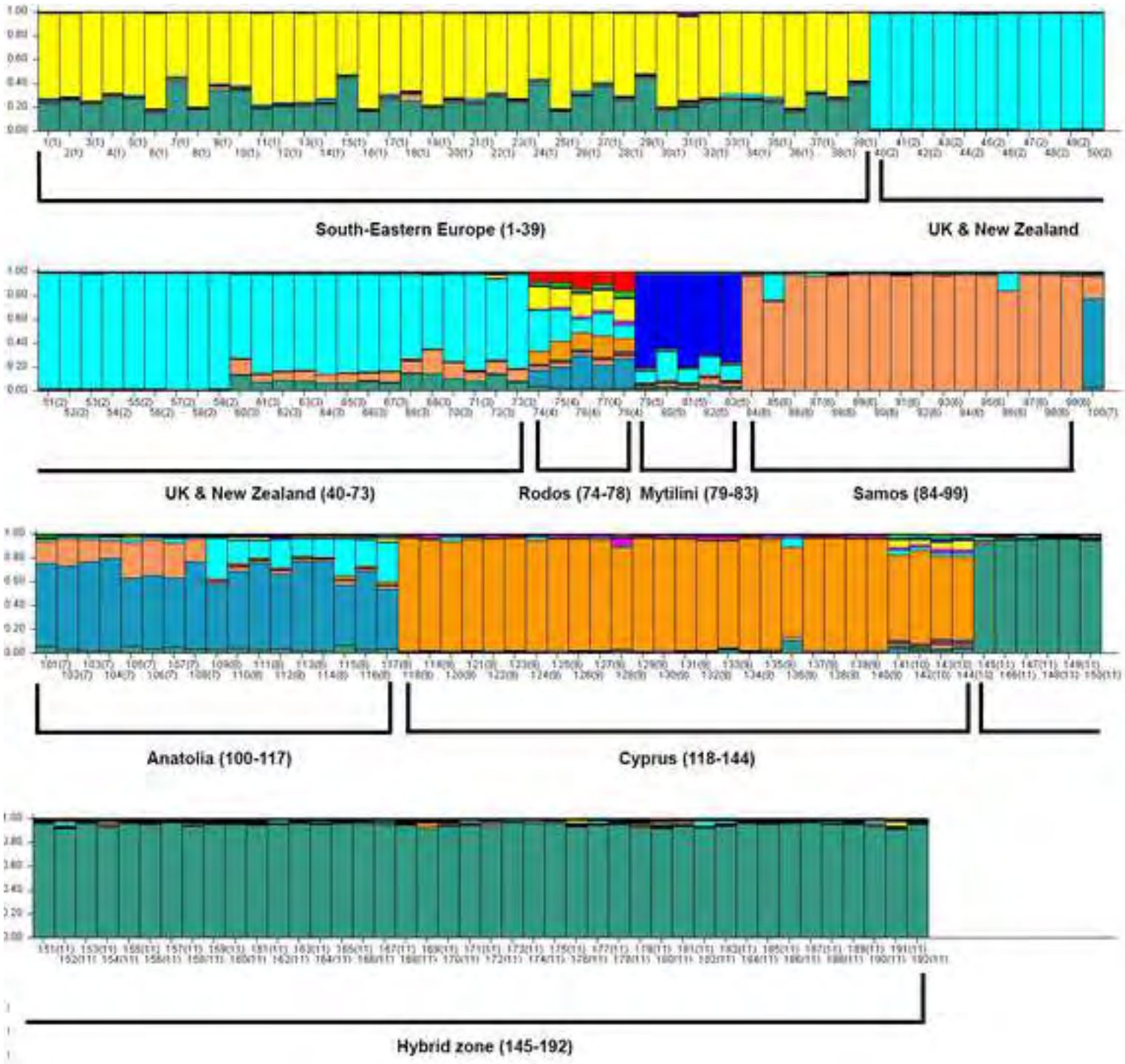


Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/06/2024 15:10:58 EEST - 3.135.219.133

Figure_5

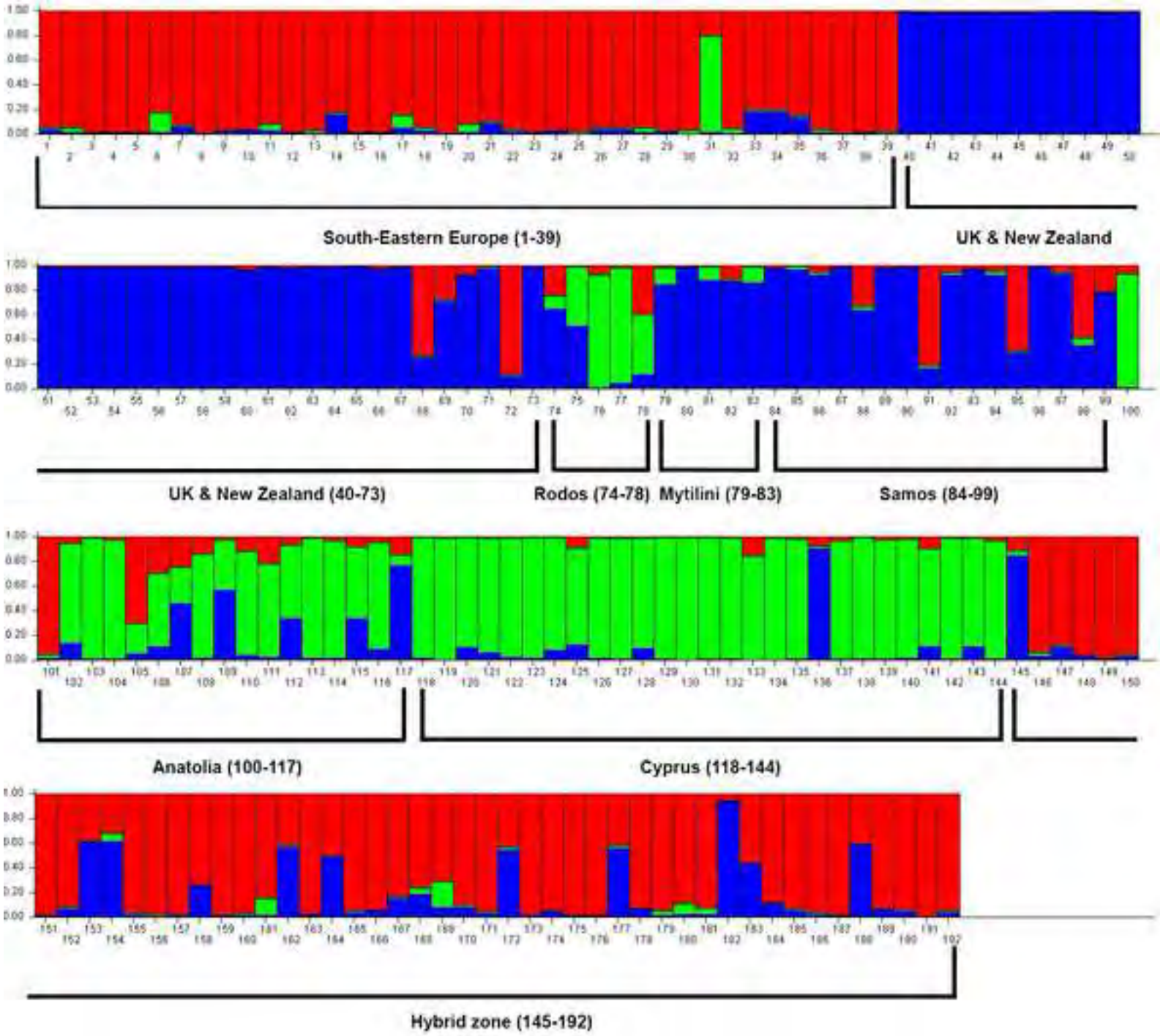
Click here to download Figure Figure_5.png

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/06/2024 15:10:58 EEST - 3.1.35.219.133



Click here to download Figure Figure_6.png

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/06/2024 15:10:58 EEST - 3.1.35.219.133



Συζήτηση

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/06/2024 15:10:58 EEST - 3.135.219.133

Η βιοενεργητική συνεισφορά των προκαρυωτών στην ευκαρυωτική εξέλιξη

Η ηλιακή ακτινοβολία είναι η πηγή που παρέχει το σύνολο της ενέργειας για το σύνολο των ειδών, μέσω των πρωτονίων υψηλής ενέργειας. Τα πρωτόνια αυτά συλλέγονται από τους χλωροπλάστες των φυτών και η ενέργεια χρησιμοποιείται για τη διάσπαση του νερού σε οξυγόνο και υδρογόνο. Το υδρογόνο στη συνέχεια ενσωματώνεται στους άνθρακες για το σχηματισμό της γλυκόζης. Μέσω της κατανάλωσης των φυτών, τα ζώα προσλαμβάνουν τη γλυκόζη και τα ανηγμένα ισοδύναμα, τα οποία διασπούν και στη συνέχεια τα προϊόντα διάσπασης εισέρχονται στα μιτοχόνδρια, όπου τελικά τα υδρογόνα ανάγουν το οξυγόνο προς νερό, με ταυτόχρονη παραγωγή ενέργειας. Όπως έχει αναφερθεί, τόσο οι χλωροπλάστες όσο και τα μιτοχόνδρια προέρχονται από βακτηριακές μορφές ζωής. Γίνεται, λοιπόν, κατανοητό πως οι προκαρυώτες συνέβαλλαν τα μέγιστα στη βιοενεργητική των ευκαρυωτών, μέσω της ανάπτυξης συμβιωτικών σχέσεων κατά τα πρώτα στάδια της ευκαρυογένεσης.

Η ενσωμάτωση των μιτοχονδρίων φαίνεται να απελευθέρωσε τον ευκαρυωτικό πρόγονο από τους βιοενεργητικούς περιορισμούς στους οποίους υπόκεινται τα αρχαία και τα βακτήρια, επιτρέποντας την επέκταση του αριθμού των γονιδίων και την ταυτόχρονη ανάπτυξη της κυτταρικής πολυπλοκότητας (Lane & Martin, 2010). Υπάρχουν ενδείξεις πως τα βακτήρια έκαναν την αρχή αλλά η προσπάθεια τους αυτή φαίνεται να εγκαταλείφθηκε σύντομα. Υπάρχουν προκαρυωτικά παραδείγματα για γραμμικά χρωμοσώματα (Bentley et al, 2002), για γενετικό ανασυνδυασμό (Maynard Smith et al, 1993), ιντρόνια και εξόνια (Simon & Zimmerly, 2008), πολυπλοειδία (Mendell et al, 2008), δομές παρόμοιες με τον πυρήνα (Lindsay et al, 2008), εσωτερικές μεμβράνες (Pinevich, 1997), αυξημένο κυτταρικό μέγεθος (Schulz & Jorgensen, 2001), δυναμικό κυτταροσκελετό (Vats et al, 2009), παρασιτισμό (Moran, 2007), ενδοκύττωση (Lonhienne et al, 2010), ακόμα και για ενδοσυμβίωση (von Dohlen et al, 2001, Wujek, 1979). Αυτό που φαίνεται να απουσιάζει είναι η ταυτόχρονη παρουσία περισσοτέρων του ενός από αυτά τα χαρακτηριστικά, γεγονός που συνδέεται με το κύριο χαρακτηριστικό της προκαρυωτικής εξέλιξης: τα μικρά προκαρυωτικά γονιδιώματα επιλέγονται εναντίον των μεγαλύτερων, λόγω της

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/06/2024 15:10:58 EEST - 3.135.219.133

δυνατότητας της γρήγορης αντιγραφής και τα πλεονάζοντα γονίδια χάνονται εύκολα (Dagan & Martin, 2007, Lynch & Corvey, 2003). Το ίδιο φαινόμενο παρατηρείται και στην εξέλιξη των ενδοσυμβιωτικών γονιδιωμάτων, το οποίο έχει αναφερθεί ήδη ως «μειωτική εξέλιξη», με απώλεια γονιδίων τα οποία είτε χάνονται είτε μεταφέρονται στον πυρήνα, όπως περιγράφηκε στην αντίστοιχη ενότητα της εισαγωγής. Τυπικά, η συνολική ποσότητα του DNA στο κύτταρο δεν επηρεάζεται, αλλά η κατανομή του οδηγεί σε μια γονιδιωματική ασυμμετρία, με εκατοντάδες ή χιλιάδες μιτοχόνδρια, να υποστηρίζουν ενεργειακά ένα τεράστιο πυρηνικό γονιδίωμα (Gregory, 2005).

Η απώλεια γονιδίων αφενός δεν επηρεάζει το ρυθμό παραγωγής ATP, αφετέρου οδηγεί σε ένα ενεργειακό κέρδος, στη μείωση της δαπάνης για πρωτεϊνοσύνθεση. Έχει υπολογιστεί πως μια απώλεια 5% των γονιδίων από 100 ενδοσυμβιωτικά κύτταρα εξοικονομεί 50 δισεκατομμύρια μόρια ATP για τον ξενιστή. Λόγω της εξοικονόμησης αυτής, ήταν δυνατή η εμφάνιση 3000 νέων γονιδιακών οικογενειών στους ευκαρυώτες (Koonin et al, 2004, Frint-Laylin et al, 2010). Τα μιτοχόνδρια παρείχαν στον ξενιστή 10-100 χιλιάδες φορές περισσότερη ενέργεια ανά γονίδιο, επιτρέποντας έτσι την εξέλιξη και την έκφραση αρκετών εκατοντάδων χιλιάδων γονίδιων χωρίς ουσιαστικό ενεργειακό κόστος για τον ξενιστή. Επιπλέον, η διαθέσιμη ενέργεια επέτρεψε την εξέλιξη και νέων πρωτεϊνικών διαμορφώσεων. Χαρακτηριστικά, αναφέρεται πως οι ευκαρυώτες εμφανίζουν πέντε φορές περισσότερες πρωτεϊνικές διαμορφώσεις σε σχέση με τα ευβακτήρια και δέκα φορές σε σχέση με τα αρχαία (Koonin et al, 2010), ενώ το μέσο μέγεθος των πρωτεϊνών τους είναι περίπου 30% μεγαλύτερο από το αντίστοιχο στους προκαρυώτες.

Τα διαθέσιμα ενεργειακά αποθέματα, λοιπόν, επέτρεψαν την ανάπτυξη της κυτταρικής πολυπλοκότητας και την εμφάνιση των πολυκύτταρων οργανισμών, που ευνοήθηκαν από τα οφέλη που τους προσέδωσε το μεγαλύτερο μέγεθος, όπως η αποτελεσματικότερη διασπορά, η εκμετάλλευση περισσότερων και διαφορετικών ενεργειακών πηγών, η παραγωγή περισσοτέρων απογόνων, η αποφυγή θηρευτών και άλλα (Bonner, 1988, 1998, Lachmann et al, 2003). Επειδή όλες οι κυτταρικές λειτουργίες απαιτούν τη δαπάνη ενέργειας, η μεταβολική ρύθμιση αναμένεται να διαδραματίζει κεντρικό ρόλο στα σύγχρονα κύτταρα (Lazar & Birnbaum, 2012, Wang et al, 2012). Πιο συγκεκριμένα, η ανάπτυξη και ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/06/2024 15:10:58 EEST - 3.135.219.133

απαιτούν ενέργεια και εξαρτώνται άμεσα από τη μεταβολική κατάσταση του οργανισμού (Lane, 2011). Η μεταβολική κατάσταση με τη σειρά της εξαρτάται από τη διαθεσιμότητα των οξειδοαναγωγικών, τα οποία προέρχονται από το περιβάλλον (Allen, 1993). Με αυτό τον τρόπο, η ανάπτυξη και ο πολλαπλασιασμός τελικά φαίνεται να ρυθμίζονται από το περιβάλλον.

Τοπική προσαρμογή και εξέλιξη του μιτοχονδριακού DNA

"It is not the strongest of the species that survives, nor the most intelligent that survives. It is the one that is most adaptable to change."

Η φράση αυτή, που συχνά λανθασμένα αποδίδεται στο Δαρβίνο, ανήκει στον Leon Megginson (1963), ο οποίος στηριζόμενος στην Καταγωγή των Ειδών, διατύπωσε με αυτό τον τρόπο τη σημασία της προσαρμογής στην επιβίωση των οργανισμών στα μεταβαλλόμενα περιβάλλοντα.

Σύμφωνα με τα προηγούμενα, το περιβάλλον φαίνεται να είναι ένας σημαντικός ρυθμιστής της μεταβολικής κατάστασης των οργανισμών. Το θερμοκρασιακό περιβάλλον μπορεί να οδηγήσει σε ισχυρή επιλογή σε οργανισμούς και εξελικτικές αποκρίσεις, οι οποίες σχετίζονται με μεταβολικές διεργασίες που εμπλέκονται στην προσαρμογή (Weathers, 1979, Bozinovic & Rosenmann 1989, Hosken & Whithers, 1997, Rezende et al, 2004, Swanson & Garland, 2009). Τα μιτοχόνδρια είναι υπεύθυνα για την αερόβια αναπνοή οπότε αναμένεται να παίζουν σημαντικό ρόλο στη διαμόρφωση του μεταβολισμού των οργανισμών (Ballard & Melvin, 2010). Επίσης, έχει αναφερθεί πως τα μιτοχόνδρια εξελίχθηκαν ώστε να προσαρμόζουν το ρυθμό του OXPHOS σε ειδικές περιβαλλοντικές συνθήκες (Das, 2006).

Οι προσαρμογές των ειδών σε ένα πολύ μεγάλο εύρος θερμοκρασιών έχουν αποτελέσει το αντικείμενο μελέτης σε έρευνες που είχαν σαν στόχο να

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/06/2024 15:10:58 EEST - 3.135.219.133

προσδιορίσουν τις αλλαγές, τόσο σε επίπεδο φυσιολογίας όσο και σε επίπεδο μεταβολισμού σε συνάρτηση με τη θερμοκρασία και την ανάδειξη των φαινοτυπικών χαρακτηριστικών, τα οποία είναι σε θέση να προσαρμόζονται (Johnston & Benett 1996, Angiletta et al 2006, Angilleta, 2009, White et al, 2012). Επίσης, ο προσδιορισμός των γενετικών στοιχείων που οδηγούν σε επιβίωση σε ατομικό/πληθυσμιακό επίπεδο ή σε επίπεδο είδους έχει τραβήξει ήδη την προσοχή της επιστημονικής κοινότητας. Σύμφωνα με μια υπόθεση, τα ζωικά είδη χαρακτηρίζονται από μια θερμική ανθεκτικότητα, η οποία περιορίζεται από τη διαθεσιμότητα του οξυγόνου (Oxygen Capacity Limited Thermal Tolerance, OCLTT) (Federich & Portner, 2000, Portner, 2001, 2002, 2006, 2007). Με βάση την υπόθεση αυτή, τόσο τα κρύα όσο και τα θερμά περιβάλλοντα, προκαλούν δυσλειτουργίες στον αερόβιο μεταβολισμό, είτε λόγω ασυμφωνιών στις ανάγκες και στην παροχή του οξυγόνου, είτε λόγω περιορισμών στη μιτοχονδριακή λειτουργία.

Η εξέλιξη των μιτοχονδριακών γονιδίων φαίνεται να είναι θεμελιώδης για την περιβαλλοντική προσαρμογή (Dowling et al, 2008, Wallace, 2013, Levin et al, 2014, Moraes et al 2015). Η οξειδωτική φωσφορυλίωση είναι σε θέση να παράγει τόσο ενέργεια όσο και θερμότητα και η ισορροπία αυτή εξαρτάται από την αποτελεσματικότητα της σύζευξης της ETC με την συνθάση του ATP (Wallace, 2005, Portner, 2004). Η ισορροπία που κλίνει προς τη λιγότερο αποτελεσματική παραγωγή ενέργειας και την παραγωγή θερμότητας ευνοείται ιδιαίτερα σε ψυχρά περιβάλλοντα. Ένα τέτοιο φαινόμενο παρατηρήθηκε σε είδη ψαριών που διαβιούν σε ψυχρότερα ενδιαιτήματα σε σύγκριση με πληθυσμούς που διαβιούν σε θερμότερα περιβάλλοντα (Pereira et al, 2014). Αντίθετα, η παραγωγή θερμότητας μπορεί να είναι βλαβερή σε θερμά περιβάλλοντα, να καθιστά αναγκαία την επιπλέον πρόσληψη τροφής και να σχετίζεται με αυξημένο οξειδωτικό στρες λόγω αυξημένης παραγωγής ROS (Portner et al 1998, Brand 2000, Somero 2002, Fangue et al 2009, Stier et al 2014a,b). Πολυμορφισμοί του ανθρώπινου mtDNA σε γονίδια που κωδικοποιούν για πρωτεΐνες και rRNA εμφάνισαν διαφορετικά πρότυπα κατανομής σε πληθυσμούς της Αρκτικής, της εύκρατης και της τροπικής ζώνης (Ruiz-Pesini et al, 2004, Ruiz-Pesini & Wallace, 2006, Mishmar et al, 2003). Μία αμινοξική αλλαγή στο μιτοχονδριακό γονίδιο COX3 έδωσε την ικανότητα σε πληθυσμούς του είδους χήνας

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/06/2024 15:10:58 EEST - 3.135.219.133

Anser indicus να πετούν πάνω από τα Ιμαλάια, χρησιμοποιώντας συντομότερους δρόμους μετανάστευσης (Scott et al,2011,2015). Ο νέος αυτός απλότυπος επιτρέπει τη λειτουργία του οργανισμού σε μειωμένη διαθεσιμότητα οξυγόνου σε μεγάλα υψόμετρα. Είναι γνωστό ότι τα μιτοχόνδρια επηρεάζουν άμεσα στην προσαρμογή και σε τοξικά περιβάλλοντα, όπως στην περίπτωση του μονοκύτταρου ευκαρυώτη *Rhodotrula glutinis*, ο οποίος έχει τη δυνατότητα να αναπτύσσεται παρουσία αλουμινίου (Tani et al, 2008). Αυτές οι μελέτες αποτελούν παραδείγματα μιας εκτεταμένης βιβλιογραφίας που συνδέει τις λειτουργικές αλλαγές των μιτοχονδριακών γονιδίων με την καλύτερη προσαρμογή σε περιβαλλοντικές καταστάσεις (Wallace 2010b,2013, Cheviron & Brumfield, 2011, Wilson et al 2013, Bernatchez et al 1995, Mishmar et al 2003, Melo-Ferreira et al 2005, Dowling et al 2008, Morales et al 2015). Επιπλέον, ο υπάρχον πολυμορφισμός στους μιτοχονδριακούς απλότυπους πλέον συνδέεται με την αναπνευστική λειτουργία και την αρμοστικότητα (Jurbalija Novicic et al 2015).

Παρόμοια πρότυπα γενετικής ποικιλότητας στο επίπεδο του mtDNA εμφανίζονται και στο είδος του ευρωπαϊκού λαγού. Κατά τη διάρκεια των τελευταίων παγετωνικών περιόδων (Late Glacial Maxima, LGM), μεγάλα τμήματα της Ευρώπης καλύφθηκαν από πάγο (Frenzel et al, 1992). Τα νότια και νοτιοανατολικά τμήματα της Ευρώπης, που διέθεταν από στέπες και ανοιχτές δασικές εκτάσεις (Bennett et al, 1991) έγιναν καταφύγια για το είδος του λαγού (Corbet et al, 1986), όπως φανερώνουν και απολιθώματα που προέρχονται από τον Πλειστόκενο (Suchentrunk et al, 2003). Φαίνεται να υπήρξαν διάφορα καταφύγια, που εμφανίστηκαν στην Βαλκανική χερσόνησο (Kasapidis et al, 2005), τα οποία λόγω της απουσίας γενετικής ροής οδήγησαν σε γενετική διαφοροποίηση αυτών των πληθυσμών στο επίπεδο του mtDNA. Η γενετική διαφοροποίηση των δυο απλοομάδων προσδιορίστηκε για πρώτη φορά στο επίπεδο ολόκληρου του μιτοχονδριακού γονιδιώματος στην παρούσα μελέτη (Giannoulis et al, 2017) και επιβεβαιώθηκαν τα πρότυπα φυλογεωγραφίας από προηγούμενες μελέτες (Kasapidis et al, 2004, Stamatis et al, 2009). Η παραδοσιακή χρήση ενός μόνο ή μερικών δεικτών για την εκτίμηση και αποτίμηση της γενετικής διαφοροποίησης φαίνεται να εγκαταλείπεται και στο γεγονός αυτό βοηθάει και η ραγδαία ανάπτυξη των τεχνικών αλληλούχησης νέας γενιάς καθώς και

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/06/2024 15:10:58 EEST - 3.135.219.133

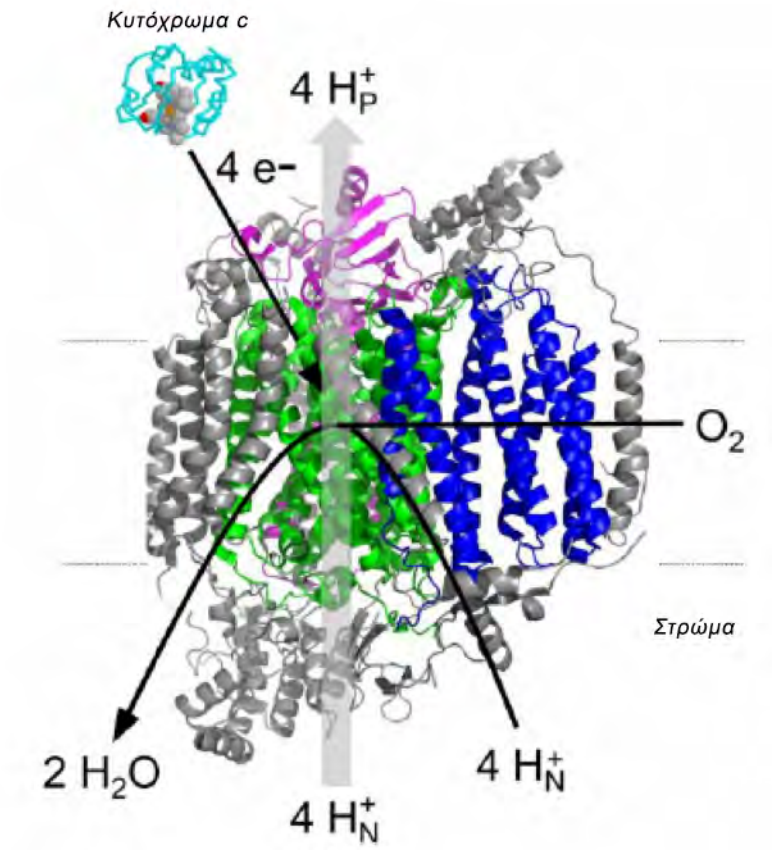
των ανάλογων βιοπληροφορικών εργαλείων για την ανάλυση του μεγάλου όγκου των δεδομένων, με την παράλληλη μείωση του κόστους αλληλούχησης ανά νουκλεοτίδιο.

Η «διαμερισματοποίηση» της γενετικής διαφοροποίησης – Η συμβολή του λειτουργικού περιορισμού

Η γενετική διαφοροποίηση των δύο απλοομάδων κυμαίνεται σε υψηλά επίπεδα και είναι χαρακτηριστικό πως η χρήση του DNA barcode γονιδίου, COX1, εμφανίζει μια διαπληθυσμιακή διαφοροποίηση, η οποία ξεπερνάει τις αντίστοιχες διαειδικές διαφοροποιήσεις μεταξύ συγκεκριμένων ζευγών ειδών που ανήκουν στο γένος του *Lepus*. Τέτοια πρότυπα εμφάνισης γενετικής διαφοροποίησης είναι σε συμφωνία με τη δράση της επιλογής, η οποία μπορεί να αποτελέσει σημαντικό βήμα στην πιθανή δημιουργία αναπαραγωγικών φραγμών που οδηγούν στην ειδογένεση (Dowling et al, 2007). Η προσαρμογή, λοιπόν, είναι μια θεμελιώδης δύναμη που στηρίζει αρκετούς μηχανισμούς ειδογένεσης, τόσο από μόνη της όσο και σε συνεργασία με άλλες εξελικτικές δυνάμεις (Templeton, 1981, 2008).

Τα γονίδια που κωδικοποιούν για rRNAs και tRNAs εμφανίζονται αρκετά συντηρημένα σε σύγκριση με τα γονίδια που κωδικοποιούν για πρωτεΐνες. Αυτό αντανακλά και τη σημασία των γονιδίων αυτών στην έκφραση των μιτοχονδριακών γονιδίων, που είναι υπεύθυνη για την παραγωγή των υπομονάδων του OXPHOS. Παρόμοια επίπεδα συντήρησης εμφανίζονται και στα γονίδια που κωδικοποιούν για υπομονάδες του συμπλόκου IV (COX1-3), τα οποία συνοδεύονται και από εκτεταμένες ενδείξεις για τη δράση της αρνητικής επιλογής. Τα δύο αυτά στοιχεία συμφωνούν με το λειτουργικό περιορισμό, που ενδέχεται να επηρεάζει την εξέλιξη των συγκεκριμένων γονιδίων, καθώς και τα τρία γονίδια είναι υπεύθυνα για την καταλυτική δράση του συμπλόκου IV, ενώ οι υπόλοιπες δέκα πυρηνικές υπομονάδες έχουν ρυθμιστικό ρόλο (Rich, 2017, εικόνα 11). Τα μιτοχονδριακά γονίδια του συμπλόκου IV φάνηκε να είναι τα λιγότερο πολυμορφικά ανάμεσα στα μιτοχονδριακά γονίδια και σε άλλες μελέτες (Pesole et al 1999, da Fonseca et al 2008), επειδή υπόκεινται στη δράση της αρνητικής επιλογής (Kerr 2011).

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/06/2024 15:10:58 EEST - 3.135.219.133



Εικόνα 11: Η δομή του συμπλόκου IV στα μιτοχόνδρια των θηλαστικών. *Οι τρείς καταλυτικές υπομονάδες κωδικοποιούνται απο το μιτοχονδριακό γονιδίωμα και εμφανίζονται με πράσινο (υπομονάδα I), μωβ (υπομονάδα II) και μπλε (υπομονάδα III). Οι δέκα υπομονάδες που κωδικοποιούνται απο τον πυρήνα εμφανίζονται με γκρι χρώμα (εικόνα απο Rich, 2017).*

Η εξέλιξη των αλληλουχιών φαίνεται να εξαρτάται από τέτοιου είδους λειτουργικούς περιορισμούς, οι οποίοι περιλαμβάνουν τη διαφορική έκφραση, την πρωτεϊνική διαμόρφωση, την λειτουργική σημασία και την έκταση της έκφρασης των γονιδίων ανάμεσα στους ιστούς (Zhang et al, 2015). Παρόμοια δράση της αρνητικής επιλογής έχει αναφερθεί και σε γονίδια του OXPHOS με ιδιαίτερα αυξημένη έκφραση σε σύγκριση με πυρηνικά γονίδια σε άλλες μελέτες (Nabholz et al 2013, Zhang & Broughton 2013).

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/06/2024 15:10:58 EEST - 3.135.219.133

Εξέλιξη του μιτοχονδριακού DNA – Η επίδραση της βιοενεργητικής στην αναπαραγωγή των ειδών

Τα ωοκύτταρα των θηλαστικών περιέχουν από μερικές εκατοντάδες χιλιάδες μέχρι εκατομμύρια αντίγραφα του mtDNA ενώ φαίνεται να υπάρχει μεγάλη διακύμανση τόσο μεταξύ των διαφορετικών ωοκυττάρων όσο και μεταξύ των ειδών (Wai et al, 2008, Thundathil et al, 2005, Smith et al, 2005, May-Panloup et al, 2005, Wai et al, 2010). Τα μιτοχόνδρια επιδέχονται δραστικές αλλαγές κατά την ωογένεση, τη γονιμοποίηση και την εμβρυονική ανάπτυξη. Οι αλλαγές της μορφολογίας επηρεάζουν την παραγωγή ενέργειας: τα επιμηκυμένα μιτοχόνδρια παράγουν περισσότερα μόρια ATP, ενώ τα σφαιρικά μιτοχόνδρια δεν είναι τόσο αποδοτικά (Yoon, 2005). Τα μιτοχόνδρια στα ωοκύτταρα των θηλυκών ατόμων είναι σφαιρικά με λίγες μόνο ακρολοφίες (Cummins, 2001), και παραμένουν μεταγραφικά και βιοενεργητικά ανενεργά. Η ανενεργή κατάσταση φαίνεται να είναι συντηρημένη εξελικτικά (Allen & de Paula, 2013, de Paula et al, 2013), ιδιαίτερα στα ανώριμα κύτταρα, τα οποία έχουν μικρή παραγωγή ATP (Bentov et al, 2011). Αυτή η ανενεργή κατάσταση φαίνεται να διατηρεί τις μεταλλάξεις στο ελάχιστο, καθώς όσες μεταλλάξεις προκύψουν υπάρχει η πιθανότητα να κληρονομηθούν στους απογόνους (de Paula et al, 2013).

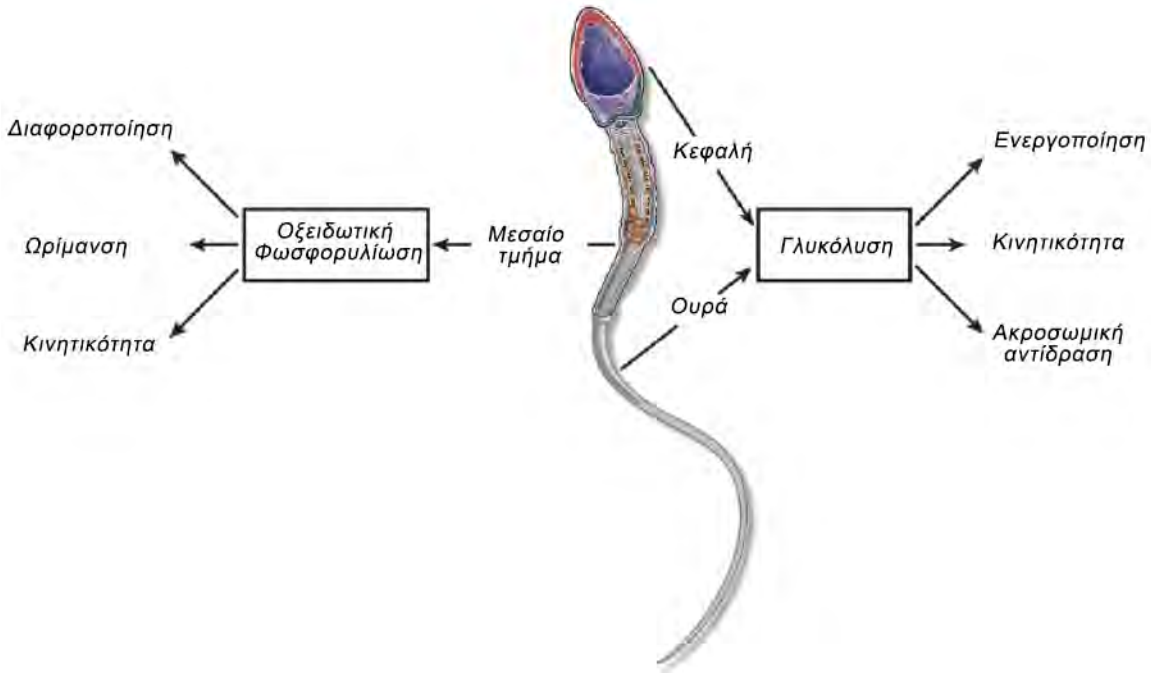
Στο αναπαραγωγικό σύστημα των θηλυκών φαίνεται να υπάρχει ένα σύστημα επιλογής, το οποίο απαλείφει τα πρωτο-ωοκύτταρα που φέρουν τις πιο επιβλαβείς μεταλλάξεις στο mtDNA (Fan et al, 2008, Stewart et al, 2008). Έτσι, μέσω αυτού του συστήματος στενωπού, μόνο τα ωάρια με μέτρια επιβλαβείς ή επωφελείς μεταλλάξεις μεταβιβάζονται στην επόμενη γενιά. Η ανακάλυψη αυτού του συστήματος επιλογής εξηγεί γιατί οι υψηλοί εξελικτικοί ρυθμοί δεν οδηγούν τα είδη σε εξαφάνιση, λόγω του Muller’s ratchet. Η έκφραση των γονιδίων του μιτοχονδριακού DNA σε όλα τα κύτταρα και όλα τα στάδια της ανάπτυξης κάνει δυνατή τη δράση αυτού του συστήματος επιλογής, το οποίο είναι σε θέση να ελέγξει τις επιδράσεις των μεταλλάξεων και να απαλείψει τις πιο επιβλαβείς. Αντίθετα, τα γονίδια του πυρήνα που σχετίζονται με την ανάπτυξη δεν εκφράζονται στους

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/06/2024 15:10:58 EEST - 3.135.219.133

γαμέτες, οπότε οι γαμέτες που φέρουν επιβλαβείς μεταλλάξεις σε αυτά τα γονίδια δεν αναγνωρίζονται και δεν απαλείφονται. Η επιλογή για τα γονίδια αυτά μπορεί να δράσει μετά τη γονιμοποίηση, αυξάνοντας έτσι το γενετικό φορτίο καθώς και την ενεργειακή δαπάνη.

Τα σπερματοζωάρια των θηλαστικών των θηλαστικών περιέχουν από 50-75 μιτοχόνδρια (Ankel-Simmons, 1996), τα οποία εμφανίζουν μια συμπυκνωμένη μορφή και ένα ιδιαίτερα περιορισμένο στρώμα, γεγονός που επιτρέπει την μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα στην παραγωγή ενέργειας. Ο μεταβολισμός των σπερματοζωαρίων διαφέρει δραματικά μεταξύ των ειδών, πιθανόν λόγω προσαρμογών στα διαφορετικά περιβάλλονται που συναντώνται στα αναπαραγωγικά όργανα των θηλυκών, οι οποίες επιτρέπουν την ανάπτυξη διαφοροποιήσεων στην κινητικότητα και τις ενεργειακές απαιτήσεις. Τα μιτοχόνδρια εντοπίζονται αποκλειστικά στη μέση των σπερματοζωαρίων, ενώ στο μαστίγιο εντοπίζονται τα ένζυμα της γλυκόλυσης (εικόνα 12). Η γλυκόλυση και η οξειδωτική φωσφορυλίωση είναι τα δυο κύρια μεταβολικά μονοπάτια που παράγουν ενέργεια με τη μορφή ATP. Αρκετοί ερευνητές υποστηρίζουν πως η γλυκόλυση αντιπροσωπεύει την κύρια πηγή ενέργειας για τα σπερματοζώαρια (Turner, 2006, Narisawa et al, 2002, Nascimento et al, 2008, Miki et al, 2004) ενώ άλλοι στηρίζουν την σημασία των μιτοχονδρίων για την αερόβια παραγωγή ενέργειας καθώς η απόδοση της γλυκόλυσης σε ATP είναι ιδιαίτερα μικρή (Ruiz-Pesini et al, 1998, Ruiz-Pesini et al, 2000, Marchetti et al, 2002, Gallon et al, 2006, Nakada et al, 2006, Ferramosca et al, 2012). Πράγματι, τα σπερματοζωάρια είναι σε θέση να χρησιμοποιήσουν διαφορετικά υποστρώματα και αν χρησιμοποιήσουν διαφορετικά μονοπάτια παραγωγής ενέργειας σε διάφορα στάδια της γονιμοποίησης και σε διαφορετικές περιβαλλοντικές συνθήκες (Ruiz-Pesini et al, 2007, Storey, 2008). Επίσης, το προτιμώμενο μεταβολικό μονοπάτι φαίνεται να είναι ειδικό για κάθε διαφορετικό είδος (Piomboni et al, 2012). Οι δυο διαδικασίες δεν είναι αμοιβαία αποκλειόμενες, καθώς τα σπερματοζωάρια χρησιμοποιούν και τα δυο μονοπάτια για να καλύψουν τις ενεργειακές τους ανάγκες (εικόνα 12).

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/06/2024 15:10:58 EEST - 3.135.219.133



Εικόνα 12: Η κατανομή των μεταβολικών διεργασιών στο σπερματοζωάριο

Υπάρχουν διαφορές ανάμεσα στα διαφορετικά είδη που σχετίζονται με το ισοζύγιο των δυο μονοπατιών, επιτρέποντας έτσι να υπάρχει μια πλαστικότητα στις μεταβολικές στρατηγικές για να μπορέσει να ολοκληρωθεί «το ταξίδι» που θα οδηγήσει στη γονιμοποίηση. Για παράδειγμα, τα σπερματοζωάρια των ανθρώπων, του χοίρου και του ποντικού κλίνουν προς ένα μεταβολισμό που στηρίζεται στη γλυκόλυση ενώ τα σπερματοζωάρια των αλόγων επιλέγουν το OXPHOS (Tourmente et al 2015, Herebg et al 2011, Rodriguez-Gil & Bonet 2016). Τα σπερματοζωάρια του ταύρου βρίσκονται σε ένα ενδιάμεσο στάδιο με την ικανότητα να χρησιμοποιούν και τις δυο διεργασίες με υψηλή αποτελεσματικότητα (Losano et al 2017). Πιθανώς, η γλυκόλυση στηρίζει την ταχύτητα της κίνησης λόγω του εντοπισμού των γλυκολυτικών ενζύμων στο χώρο του μαστιγίου (duPlessis et al 2015). Ο συν-εντοπισμός τους με την δυνεΐνη, που είναι μια ATPάση, επιτρέπει την γρήγορη κατανάλωση του ATP με σκοπό την αυξημένη κινητικότητα. Η μιτοχονδριακή διάχυση του ATP μπορεί να μην είναι σε θέση να καλύψει όλες τις περιοχές του μαστιγίου (Mukan & Travis, 2012).

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/06/2024 15:10:58 EEST - 3.135.219.133

Μελέτες έχουν προτείνει πως τα πιο γόνιμα σπερματοζωάρια «ζουν γρήγορα και πεθαίνουν νέα», σε απόκριση στα αυξημένα επίπεδα ROS που προκαλούνται από την αυξημένη λειτουργικότητα των σπερματοζωαρίων (Gibb et al 2014). Τα σπερματοζωάρια διαθέτουν SODs, υπεροξειδάση της γλουταθειόνης και ισομορφές της περοξιδίνης που εντοπίζονται στο μεσαίο τμήμα και προστατεύουν απο την βλάβη των ROS (Aitken et al, 2014). Εκτός από τα δυο σημεία παραγωγής ROS στο ETC, υπάρχουν και άλλες μιτοχονδριακές πηγές παραγωγής ROS: οι αντιδράσεις οξειδωτικής αποκαρβοξυλίωσης του λιποϊκού οξέος, οι αφυδρογονάσες του πυροσταφυλικού και του 2-οξογλουταρικού, το σύμπλοκο II, και η οξειδωαναγωγάση UQ που μεταφέρει τα ηλεκτρόνια από τη μιτοχονδριακή β-οξείδωση (Nicholls & Ferguson, 2013). Επίσης, πηγές ROS υπάρχουν και εκτός μιτοχονδρίων, όπως για παράδειγμα από οξειδάσες του NADPH της πλασματικής μεμβράνης, όπως το NOX5, το οποίο εντοπίζεται στα σπερματοζωάρια των θηλαστικών (Aitken et al 1997) .

Το οξειδωτικό στρες μπορεί να έχει καταστρεπτικές επιδράσεις στη δομή των σπερματοζωαρίων και στη λειτουργία, οδηγώντας σε υπεροξείδωση λιπιδίων, απώλεια της κινητικότητας, σε απώλεια του μεμβρανικού δυναμικού των μιτοχονδρίων και σε διαταραχή της ETC, οξειδωτική βλάβη του DNA καθώς και ενεργοποίηση των κασπασών και επομένων και του εσωτερικού μονοπατιού της απόπτωσης (Amaral et al 2013, Aitken et al 2016). Τα ενδιάμεσα επίπεδα οξειδωτικού στρες θεωρούνται ως μια φυσιολογική απόκριση και είναι απαραίτητα για διάφορες λειτουργίες του σπέρματος, όπως η γονιμοποίηση, η κινητικότητα, η ακροσωμική αντίδραση και η υπερενεργοποίηση (Baumber et al, 2003,. Amaral et al, 2013, Gibb et al, 2014). Πρόσφατες μελέτες σε σπερματοζωάρια έδειξαν πως αυξημένη παραγωγή ROS σχετίζεται και με τα πιο κινητικά και γόνιμα σπερματοζωάρια και είναι ενδεικτική για την αυξημένη ενεργότητα των μιτοχονδρίων (Gibb et al, 2014, Darr et al, 2016b, Yeste et al 2015). Γίνεται σαφές πως το σπερματοζωάριο εξαρτάται από εσωτερικούς μηχανισμούς για να ξεπεράσει το οξειδωτικό στρες και να ισορροπήσει την κυτταρική βλάβη με τις κρίσιμες λειτουργίες που είναι απαραίτητες για τη γονιμοποίηση.

Όπως γίνεται κατανοητό, αφενός η μεταγραφική απενεργοποίηση και αφετέρου το σύστημα επιλογής των ωοκυττάρων προστατεύουν τα θηλυκά γαμετικά κύτταρα από

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/06/2024 15:10:58 EEST - 3.135.219.133

τις επιβλαβείς επιδράσεις των μεταλλάξεων του μιτοχονδριακού DNA. Από την άλλη πλευρά, οι αυξημένες ενεργειακές απαιτήσεις και η απουσία επιλογής στα σπερματοζωάρια δημιουργούν το φαινόμενο που έχει περιγραφεί ως «η κατάρα της μητέρας» (Gemmell et al, 2004). Το φαινόμενο αυτό, περιγράφηκε και στο είδος του ευρωπαϊκού λαγού (Smith et al, 2010), σε πειράματα επιλεκτικών διασταυρώσεων μεταξύ ατόμων που έφεραν διαφοροποιημένους μιτοχονδριακούς απλότυπους. Η παρούσα μελέτη παρείχε για πρώτη φορά δεδομένα για τα επίπεδα πολυμορφισμού των γονιδίων της γλυκόλυσης και του OXPHOS, που αποτελούν τα βασικά μεταβολικά μονοπάτια των σπερματοζωαρίων. Στο είδος του ευρωπαϊκού λαγού, δεν έχουν γίνει έρευνες που να αφορούσαν τη μελέτη της προτίμησης των μεταβολικών μονοπατιών. Παρόλα αυτά, για πρώτη φορά παρατηρήθηκε στο κουνέλι (*Oryctolagus cuniculus*) ενεργότητα της γαλακτικής αφυδρογονάσης στο στρώμα των μιτοχονδρίων των σπερματοζωαρίων, η οποία καταλύει την μετατροπή του γαλακτικού σε πυροσταφυλικό (Storey & Kayne, 1977) και η αντίδραση αυτή εντοπίζεται μόνο στο μιτοχονδριακό μεταβολισμό των σπερματοζωαρίων (Passarella et al, 2008). Το πυροσταφυλικό στη συνέχεια ενσωματώνεται στον κύκλο του Krebs και επάγει το OXPHOS (Ferramosca, 2014). Η παρουσία αυτού του ενζύμου στο συγγενικό είδος του ευρωπαϊκού λαγού θα μπορούσε να αποτελέσει το εφαλτήριο για τη διερεύνηση της δράσης του ενζύμου και στο είδος του λαγού και την αποσαφήνιση της συμμετοχής των επιμέρους διεργασιών στην κάλυψη των ενεργειακών αναγκών των σπερματοζωαρίων.

Στην παρούσα μελέτη, οι ρυθμοί εμφάνισης των μη συνώνυμων (ή λειτουργικών) μεταλλάξεων που προσδιορίστηκαν για τα γονίδια που συμμετέχουν στη γλυκόλυση είναι σταθερά μικρότεροι, τόσο διαπληθυσμιακά (ανάμεσα στις δύο απλοομάδες του Ευρωπαϊκού λαγού) όσο και διαειδικά σε σύγκριση με τους αντίστοιχους ρυθμούς των πυρηνικών γονιδίων του OXPHOS. Το αποτέλεσμα αυτό μπορεί να έχει μια διπλή ανάγνωση: από τη μια, η γλυκόλυση είναι μια διαδικασία συντηρημένη, τόσο στα σωματικά κύτταρα, όπου παράγει περίπου το 2% των συνολικών ενεργειακών αποθεμάτων του κυττάρου, όσο και στα σπερματοζωάρια, όπου φαίνεται να συμμετέχει ενεργά στην κινητικότητα των σπερματοζωαρίων. Με βάση αυτή τη λειτουργική σημασία της, αναμένεται τα γονίδια της να εξελίσσονται αργά λόγω του

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/06/2024 15:10:58 EEST - 3.135.219.133

λειτουργικού περιορισμού που αναφέρθηκε και προηγουμένως. Από την άλλη, τα πυρηνικά γονίδια του OXPHOS, παρότι συμμετέχουν επίσης σε μια διαδικασία πολύ καλά συντηρημένη και σημαντική για την παροχή της πλειοψηφίας της κυτταρικής ενέργειας, βρίσκονται σε ένα διαρκές «κυνήγι» με τους ρυθμούς που έχουν αλληλεπιδρόντα μιτοχονδριακά γονίδια, τα οποία εξελίσσονται ταχύτερα. Η ανάγκη για συνεργασία των δύο αυτών ομάδων γονιδίων για την ομαλή σπερματογένεση «οδηγεί» τους εξελικτικούς ρυθμούς αυτών των γονιδίων σε υψηλότερα επίπεδα από τα αντίστοιχα της γλυκόλυσης. Η προσαρμογή των ρυθμών μετάλλαξης των γονιδίων αυτών έχει αναφερθεί προηγουμένως και ως συνεξέλιξη των δύο γονιδιωμάτων.

Η συμβολή της συνεξέλιξης στην προσαρμογή

Η προσαρμογή στα περιβάλλοντα είναι μια διαδικασία πολύ στενά συνδεδεμένη με την ειδογένεση. Στους ευκαρυώτες, η διατήρηση των ξεχωριστών δεξαμενών συμπροσαρμοσμένων γονιδίων είναι ο θεμέλιος λίθος της θεώρησης των ειδών (Coyne & Orr 2004, Price 2007). Σύμφωνα με τα συμβατικά μοντέλα της ειδογένεσης, όταν οι πληθυσμοί είναι απομονωμένοι, η διαφοροποίηση στα γονιδιώματα οδηγεί στην αναπαραγωγική απομόνωση επειδή υπάρχει διάρρηξη στα συμπροσαρμοσμένα συμπλέγματα γονιδίων, όταν οι διαφοροποιημένοι γονότυποι αναμειγνύονται στους υβριδικούς απογόνους (Coyne & Orr 2004, Turelli & Moyle 2007). Μέχρι προσφάτως, οι γονιδιωματικές αλληλεπιδράσεις που ήταν υπεύθυνες για την εμφάνιση ασυμβατότητας και μειωμένης αρμοστικότητας στα υβρίδια θεωρούνταν οτι περιλάμβαναν αποκλειστικά γονίδια του πυρήνα και οι μιτοχονδριακοί απλότυποι θεωρούνταν ουδέτεροι δείκτες της διαφοροποίησης (Gerber et al 2001, Dowling et al 2008). Η εκτίμηση της συμπροσαρμογής των μιτοχονδριακών και μιτοπυρηνικών γονιδίων καθώς και η ταχύτητα με την οποία εμφανίζονται οι ασυμβατότητες δίνουν μια νέα προοπτική στην μελέτη των μηχανισμών ειδογένεσης. Σύμφωνα με την προοπτική αυτή, η διάρρηξη της γονιδιακής ροής και οι υψηλοί εξελικτικοί ρυθμοί του μιτοχονδριακού γονιδιώματος θα οδηγήσουν σε γρήγορες και απρόβλεπτες διαφοροποιήσεις ανάμεσα στους πληθυσμούς στα συμπροσαρμοσμένα γονίδια (Gershoni et al 2009, Chou & Leu 2010). Αυτοί οι νέοι γονότυποι

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/06/2024 15:10:58 EEST - 3.135.219.133

συμπροσαρμοσμένων γονιδίων θα είναι πλέον ασύμβατοι με τους γονότυπους ενός διαφοροποιημένου πληθυσμού δημιουργώντας έτσι ένα μετασυζευκτικό απομονωτικό μηχανισμό στη γονιδιακή ροή, οδηγώντας στην ειδογένεση (Burton & Barreto 2012).

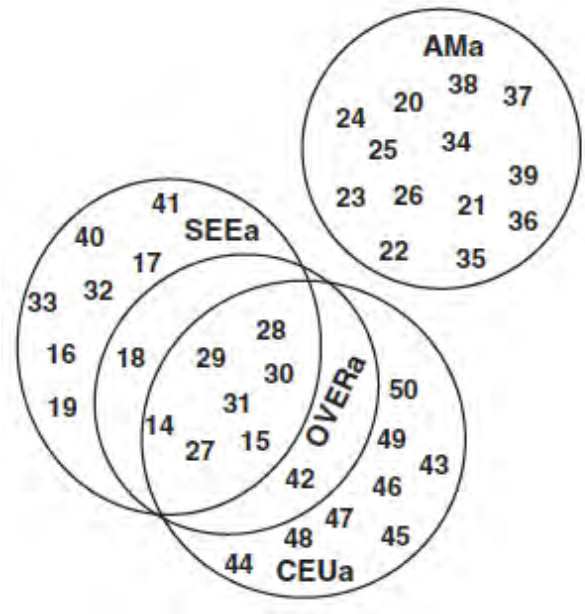
Με την έλλειψη της γονιδιακής ροής, οι πληθυσμοί του ίδιου είδους αναμένεται να εξελιχθούν μέσω ανεξάρτητων «οδών», με τον κάθε πληθυσμό να συσσωρεύει το δικό του σετ προσαρμογών στα αλληλεπιδρόντα γονίδια των δυο γονιδιωμάτων, με την εμφάνιση των επιβλαβών μεταλλάξεων στο mtDNA και την αντίστοιχη εμφάνιση των αλληλομόρφων του πυρήνα που θα αποκαθιστούν τη φυσιολογική λειτουργία. Το αποτέλεσμα αυτών των «οδών» θα είναι πως οι μιτοπυρηνικές αλλελεπιδράσεις και η λειτουργία του OXPHOS θα εξελιχθούν προς ένα βέλτιστο το οποίο θα είναι εξειδικευμένο για κάθε πληθυσμό και έτσι οι μιτοπυρηνικές μονάδες του κάθε αρχικού πληθυσμού θα γίνονται ολοένα και πιο ασύμβατες καθώς οι πληθυσμοί αποκλίνουν, σύμφωνα με το μοντέλο ασυμβατότητας των Ντομπζάνσκυ-Μίλλερ για τα υβρίδια (DMIs), με την μιτοπυρηνική μονάδα πλέον να παίζει κεντρικό ρόλο στην εμφάνιση αυτών των ασυμβατοτήτων (61). Λαμβάνοντας υπόψη τον κεντρικό ρόλο της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης στην αρμοστικότητα του οργανισμού, κάθε διατάραξη των συνεξελιγμένων συνδυασμών αναμένεται να οδηγήσει σε επιβλαβείς επιπτώσεις για την αρμοστικότητα των υβριδίων. Οι διαταραχές αυτές σε βασικές λειτουργίες και κυρίως στην έκφραση των αναπαραγωγικών χαρακτηριστικών, αναδεικνύουν τον σημαντικό ρόλο των μιτοπυρηνικών αλληλεπιδράσεων στην αρμοστικότητα και την πιθανή σημασία αυτών των επιστατικών αλληλεπιδράσεων στην εξέλιξη της αναπαραγωγικής απομόνωσης μεταξύ αλλοπάτριων πληθυσμών του ίδιου είδους (10,43,72). Μελέτες σε ένα μεγάλο αριθμό ειδών έχουν δείξει πως οι μιτοπυρηνικές ασυμβατότητες μπορεί να έχουν επιβλαβείς επιδράσεις και να συνεισφέρουν στη δημιουργία αναπαραγωγικών φραγμών μεταξύ πληθυσμών (Burton & Barreto 2012, Gibson et al 2013, Hoekstra et al 2013, Lamelza & Ailion 2017, Ma et al 2016, Narbonne et al 2012,Sloan et al 2017, Spirek et al 2014). Πάντως, σε πολύ λίγες περιπτώσεις έχει προσδιοριστεί κάποιο συγκεκριμένο γονίδιο το οποίο ευθύνεται για τις ασυμβατότητες αυτές (Chou et al 2010, Lee et al 2008, Meiklejohn et al 2013, Singh & Brown 1991, Spirek et al 2014).

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/06/2024 15:10:58 EEST - 3.135.219.133

Στο είδος του ευρωπαϊκού λαγού, τέτοια φαινόμενα διακοπής της γονιδιακής ροής φαίνεται να προέκυψαν επανειλημμένα κατά τις τελευταίες παγετωνικές περιόδους, με τα διακριτά καταφύγια να εμφανίζουν μια γεωγραφική κατανομή, ενδεικτική της γεωγραφικής απομόνωσης των πληθυσμών (Stamatis et al, 2009). Η δράση της γενετικής παρέκκλισης και της προσαρμοστικής επιλογής οδήγησε αναπόφευκτα στην γενετική διαφοροποίηση των πληθυσμών αυτών. Είναι χαρακτηριστικό πως, με βάση τα μοριακά δεδομένα και τη χρονολόγηση με τη χρήση του μιτοχονδριακού γονιδίου Cytb, οι δύο γενεαλογίες του είδους φαίνεται να διαχωρίστηκαν περίπου 850 χιλιάδες χρόνια πριν. Η περίοδος αυτή, γνωστή με την ονομασία Quaternary, ανήκει στη μεγάλη γεωλογική περίοδο του Πλειστόκενου είναι γνωστή για τα επαναλαμβανόμενα γεγονότα εμφάνισης παγετώνων. Χαρακτηριστικά αναφέρεται πως έχουν αναγνωριστεί τουλάχιστον 11 κύριες παγετωνικές περίοδοι (Richmond & Fulerton, 1986). Οι κύριες επιδράσεις των παγετωνικών περιόδων αφορούσαν σε διάβρωση των εδαφών, σε ανακατανομή των υλικών κατά μήκος των ηπείρων, σε αλλαγή στα επίπεδα των θαλασσών, σε πλημμύρες και ασυνήθιστους ανέμους. Οι επιδράσεις αυτές «επανασχεδίασαν» το περιβάλλον των ενδιαιτημάτων, οπότε επίδρασαν και στις αντίστοιχες βιολογικές οντότητες. Η προσαρμοστική επιλογή των πληθυσμών στα καταφύγια δεν αντανακλάται βέβαια μόνο στο επίπεδο της μιτοχονδριακής ποικιλότητας. Ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα διαφοροποίησης λόγω προσαρμοστική επιλογής αποτελούν και τα γονίδια του μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας, τα οποία είναι υπεύθυνα για την ανοσοαπόκριση του οργανισμού. Στην παρούσα μελέτη, καθώς και στη μελέτη των Koutsogiannouli και των συνεργατών της (2009), προσδιορίστηκε μια σαφής διαφοροποίηση των δύο γενεαλογιών στο επίπεδο του γονιδίου DQA, που αποτελεί ένα γονίδιο της τάξης II του MHC. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός πως οι κύριοι ηπειρωτικοί πληθυσμοί που μελετήθηκαν απο τους Koutsogiannouli και τους συνεργάτες της (Τουρκία και Ισραήλ που ταξινομούνται στην Ανατολική γενεαλογία, πληθυσμοί Ευρωπαϊκών χωρών που ταξινομούνται στην Ευρωπαϊκή γενεαλογία) δεν εμφανίζουν κοινά αλληλόμορφα στο εξόνιο II του γονιδίου DQA (εικόνα 13), το οποίο συμμετέχει στη διαμόρφωση της α1 περιοχής, που σχετίζεται με την πρόσδεση του αντιγόνου και την αντιγονοπαρουσίαση: οι πληθυσμοί αναπτύσσονται σε διαφορετικά περιβάλλοντα, έχοντας να αντιμετωπίσουν διαφορετικά παθογόνα, επομένως η δράση της επιλογής

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/06/2024 15:10:58 EEST - 3.135.219.133

ευνοεί την επικράτηση διαφορετικών αλληλομόρφων στα γονίδια της ανοσοαπόκρισης. Στην παρούσα μελέτη, η εμφάνιση κοινών αλληλομόρφων στους νησιωτικούς πληθυσμούς με διαφορετική φυλογεωγραφική προέλευση μπορεί να αποτελεί είτε αποτέλεσμα συγκλίνουσας εξέλιξης (η αντιμετώπιση κοινών παθογόνων οδηγεί σε επικράτηση των ίδιων αλληλομόρφων), είτε μπορεί να οφείλεται σε ανθρωπογενείς παρεμβάσεις. Ιδιαίτερα σε νησιά που στερούνταν φυσικών συνδέσεων με την ήπειρο, οι ανθρωπογενείς μεταφορές ατόμων διαμόρφωσαν και τα επίπεδα της γενετικής διαφοροποίησης καθώς και της γενετικής δομής των πληθυσμών αυτών (Shuckentrunk et al, 2003). Επομένως, η εμφάνιση των αλληλομόρφων αυτών μπορεί να μην σχετίζεται με τη δράση της προσαρμοστικής επιλογής.



Εικόνα 13: Η κατανομή των αλληλομόρφων του εξονίου 2 του γονιδίου DQA. (από Koutsogiannouli et al, 2009)

AMa: πληθυσμοί της ανατολικής γενεαλογίας, SEEa,CEUa: πληθυσμοί της ευρωπαϊκής γενεαλογίας, OVERa: πληθυσμοί της υβριδιακής ζώνης

Η προσαρμοστική επιλογή, διαμορφώνοντας όπως αναφέρθηκε τα επίπεδα της μιτοχονδριακής γενετικής διαφοροποίησης, «δημιούργησε» την ανάγκη για προσαρμογή και των πυρηνικών γονιδίων που αλληλεπιδρούν με τα αντίστοιχα

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/06/2024 15:10:58 EEST - 3.135.219.133

μιτοχονδριακά γονίδια. Έτσι, τα πυρηνικά γονίδια του OXPHOS, που συμμετέχουν στα σύμπλοκα I,III,IV και IV, αναμένεται να εμφανίσουν και υψηλότερους εξελικτικούς ρυθμούς. Πράγματι, η χρήση των δεδομένων σε γονιδιωματικό επιβεβαίωσε αυτή τη θεωρία, τόσο σε διαπληθυσμιακό όσο και σε διαειδικό επίπεδο. Στη μελέτη των δυο γενεαλογιών του ευρωπαϊκού λαγού, οι λειτουργικές (μη συνώνυμες) μεταλλάξεις των πυρηνικών γονιδίων του OXPHOS εμφάνισαν συχνότητα 1,20/100 νουκλεοτίδια, των μιτοχονδριακών γονιδίων του OXPHOS 1,40/100 νουκλεοτίδια ενώ της γλυκόλυσης και του κύκλου του Krebs 0,34 και 0,45 αντίστοιχα. Σε παρόμοια χαμηλά επίπεδα κυμαίνονται και οι μεταλλάξεις του συμπλόκου II του OXPHOS που κωδικοποιείται αποκλειστικά από πυρηνικά γονίδια (0,25/100 νουκλεοτίδια). Σε γονιδιωματική ανάλυση με τη χρήση των ειδών του λαγού, του κουνελιού (Oryctolagus cuniculus), του λαγού των βουνών (Lepus timidus) και του American pika (Ochotona princeps) για τα οποία υπάρχουν διαθέσιμα γονιδιωματικά δεδομένα από αλληλούχηση γονιδιώματος (Whole Genome Sequencing,WGS) είτε από αλληλούχηση μεταγραφώματος (RNA Sequencing), προέκυψαν παρόμοια αποτελέσματα. Με τη συγκριτική ανάλυση και των τεσσάρων ειδών, τα μιτοχονδριακά γονίδια εμφάνισαν τριπλάσιους ρυθμούς εμφάνισης λειτουργικών μεταλλάξεων σε σχέση με τα πυρηνικά γονίδια του OXPHOS, ενώ οι ρυθμοί σε σχέση με τη γλυκόλυση και τον κύκλο του Krebs ήταν εξαπλάσιοι. Αξίζει να αναφερθεί πως τα αποτελέσματα αυτά φαίνεται να επηρεάζονται και από τις κακής ποιότητας αλληλουχίες και από το κακό annotation του μεταγραφώματος του είδους American pika. Αφαιρώντας το είδος αυτό από την ανάλυση και πραγματοποιώντας τους ίδιους υπολογισμούς, οι σχετικοί ρυθμοί των μιτοχονδριακών γονιδίων εμφανίστηκαν έντεκα και δεκατρείς φορές μεγαλύτεροι από τη γλυκόλυση και τον κύκλο του Krebs, ενώ σε σχέση με τα πυρηνικά γονίδια του OXPHOS φάνηκε να είναι τριπλάσιοι. Συμπερασματικά, η διαφοροποίηση του μιτοχονδριακού DNA φαίνεται να είναι η «κινητήρια δύναμη» για την εξελικτική πορεία των πυρηνικών γονιδίων του OXPHOS (Moontooth et al, 2010), ενώ τα γονίδια της γλυκόλυσης και του κύκλου του Krebs φαίνεται να είναι αρκετά συντηρημένα, κυρίως λόγω λειτουργικών περιορισμών. Η στενή συνεξέλιξη των γονιδιωμάτων συμβάλλει στην όξυνση της λειτουργικής ασυμβατότητας μεταξύ γενετικά διαφοροποιημένων υποβάθρων. Αυτή είναι και η άποψη του Gershoni και των συνεργατών του (2009) που θεωρούν ότι η συνεξέλιξη

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/06/2024 15:10:58 EEST - 3.135.219.133

και οι ασυμβατότητες που δημιουργεί μπορεί να οδηγήσουν σε ειδογένεση.

Συνεξέλιξη γονιδίων και βιοενεργητική: Πετώντας ψηλά ή ζώντας ζεν

Με βάση τα όσα αναφέρθηκαν, μπορούμε να συμπεράνουμε ότι η μιτοπυρηνική μονάδα είναι μια εξελικτική μονάδα και η διαδικασία της συνεξέλιξης της μονάδας αυτής είναι πιθανό να επιδρά στο εξελικτικό δυναμικό των πληθυσμών. Σύμφωνα με αυτή τη θεώρηση, συγκεκριμένοι μιτοχονδριακοί απλότυποι αναμένεται να έχουν καλή απόδοση όταν συνδυαστούν με συγκεκριμένους πυρηνικούς γονότυπους, αλλά να έχουν πολύ χαμηλή απόδοση σε συνδυασμό με άλλους, παίζοντας έτσι βασικό ρόλο σαν ρυθμιστές της προσαρμογής. Αυτές οι επιστατικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των μιτοχονδριακών και πυρηνικών γενετικών τόπων διαμορφώνουν την προσαρμογή των οργανισμών και τη γενετική του αρχιτεκτονική σύμφωνα με την εξελικτική τροχιά των πληθυσμών και των ειδών. Έτσι, τα πυρηνικά και τα μιτοχονδριακά αλληλόμορφα των συμπλόκων αυτών δεν είναι στοιχεία που αναμένεται να αλλάζουν ελεύθερα, αλλά δρουν σαν μία ενιαία, υψηλά προσαρμοσμένη λειτουργική μονάδα. Η αποτελεσματική λειτουργία της αναπνοής εξαρτάται σε ένα μεγάλο βαθμό απο το καλό "ταίριασμα" των αλληλομόρφων αυτών, με τους λιγότερο ταιριαστούς συνδυασμούς να οδηγούν σε μείωση της αρμοστικότητας, επειδή όλα τα χαρακτηριστικά της αρμοστικότητας βασίζονται στη μιτοχονδριακή λειτουργία (Lane, 2011). Για να επιτευχθεί η βέλτιστη αναπνοή, τα ηλεκτρόνια πρέπει να μεταφερθούν κατά μήκος της αναπνευστικής αλυσίδας χωρίς προβλήματα, και κάθε αντίσταση σε αυτή τη ροή θα πρέπει να απαλείφεται. Αυτό σημαίνει πως κάθε μικρή ασυμβατότητα στις μιτοπυρηνικές αλληλεπιδράσεις θα πρέπει να οδηγεί σε απόπτωση, «θυσιάζοντας» έτσι ακόμα και έμβρυα με μικρή απόκλιση από τη βέλτιστη απόδοση. Αυτή η απώλεια θα έχει νόημα εάν οι ενεργειακές απαιτήσεις είναι υψηλές, όπως για παράδειγμα το πέταγμα στις νυχτερίδες και στα πουλιά, το οποίο προϋποθέτει γρήγορη ηλεκτρονιακή ροή, και έτσι η αυστηρή επιλογή για τα μιτοπυρηνικά σύμπλοκα θα είναι επικερδής παρά το υψηλό κόστος επιλογής. Από την άλλη μεριά, σε ζώα με χαμηλές ενεργειακές απαιτήσεις, όπως οι αρουραίοι, αναμένεται να υπάρχει μεγαλύτερη ανοχή σε διαρροή ROS κατά την εμβρυική ανάπτυξη. Έτσι, θα μπορούσαμε να πούμε πως

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/06/2024 15:10:58 EEST - 3.135.219.133

υπάρχει ένα “αποπτωτικό κατώφλι” ειδικό για κάθε είδος. Αυτό το κατώφλι θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί για να προβλεφθούν χαρακτηριστικά όπως η αρμοστικότητα, η γονιμότητα, η διάρκεια ζωής καθώς και ασθένειες που σχετίζονται με τη γήρανση. Για παράδειγμα, εάν υπάρχει ανάγκη για άριστη συνεργασία των μιτοπυρηνικών συμπλόκων, τότε οι οργανισμοί με ασυμβατότητες να απαλείφονται κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης λόγω διαρροής ROS. Εάν όλα τα έμβρυα με διαρροή ROS οδηγούνται σε θάνατο, τότε μόνο μερικά έμβρυα αναμένεται να επιζήσουν, τα οποία θα έχουν και τη χαμηλότερη διαρροή ROS. Με βάση αυτό, η γονιμότητα και η διαρροή των ROS αναμένεται να εμφανίζουν μια συσχέτιση στα είδη. Τα είδη των πτηνών και των νυχτερίδων έχουν χαμηλή διαρροή σε ROS οπότε και χαμηλή γονιμότητα, μικρότερο αριθμό νεογνών ανά γέννα, ενώ στους αρουραίους με τη μεγάλη διαρροή ROS, έχουμε αυξημένη γονιμότητα και αριθμό νεογνών ανά γέννα. Σύμφωνα με το μοντέλο αυτό, η παραγωγή ROS είναι κρίσιμο στοιχείο για τη δράση της επιλογής, και μπορεί να αποτελεί και πλεονέκτημα και να επιλέγεται θετικά, οπότε δε θα πρέπει να θεωρείται απλά μια ανεπιθύμητη παρενέργεια της αναπνοής. Η σημαντικότερη συνέπεια αυτού του γεγονότος είναι και η σύνδεση της παραγωγής ROS με τη διάρκεια ζωής των ειδών (Barja, 2007). Τα περιστέρια και οι αρουραίοι έχουν παρόμοιο μέγεθος σώματος και παρόμοιο μεταβολικό ρυθμό σε κατάσταση ηρεμίας, αλλά η παραγωγή ROS στα περιστέρια είναι πολύ χαμηλότερη και ζουν περίπου 10 φορές περισσότερο. Επίσης, το αποπτωτικό κατώφλι που δρα σε κάθε γενιά μπορεί να επηρεάζει και τη γήρανση και την ευαισθησία σε ασθένειες. Το πρόβλημα προκύπτει από το γεγονός ότι οι μεταλλάξεις στο mtDNA εμφανίζονται με το πέρασμα του χρόνου και η μιτοχονδριακή ετεροπλασμία είναι πολύ συνήθης σε γηρασμένους ιστούς και σε πολλούς καρκινικούς ιστούς (He et al, 2010). Η ετεροπλασμία ενισχύει την ασυμβατότητα, οδηγώντας σε αυξημένη πιθανότητα απόπτωσης, που μπορεί να οδηγήσει και σε απώλεια ιστών. Οι ιστοί που έχουν υψηλή μεταβολική ενεργότητα, όπως ο εγκέφαλος και οι μύες, αναμένεται να εμφανίσουν σημαντικά προβλήματα όταν περάσουν αυτό το αποπτωτικό κατώφλι, οδηγώντας στην εμφάνιση εκφυλιστικών ασθενειών. Παρόλα αυτά, μερικά γηρασμένα κύτταρα μπορεί να διαφύγουν από αυτή την αποπτωτική τους μοίρα, παράγοντας ενέργεια μέσω της γλυκόλυσης, εμφανίζοντας έτσι υψηλά επίπεδα οξειδωτικού στρες. Το γεγονός αυτό οδηγεί σε επιγενετικές αλλαγές και στην

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/06/2024 15:10:58 EEST - 3.135.219.133

έκφραση προφλεγμονωδών παραγόντων (Wallace, 2010) που σχετίζονται με καταστάσεις χρόνιας φλεγμονής όπως ο διαβήτης και ο καρκίνος (Green et al, 2011). Με βάση τα παραπάνω, η μιτοπυρηνική προσαρμογή μπορεί να εξηγήσει τη σχέση ανάμενα στην αρμοστικότητα, την διάρκεια ζωής και τη γονιμότητα των ειδών με ένα απλό κυτταρικό μηχανισμό, όπως η παραγωγή ROS.

Αυτό το ενεργειακό κατώφλι φαίνεται να βρίσκει εφαρμογή και στον ευρωπαϊκό λαγό και πιο συγκεκριμένα στον τρόπο ζευγαρώματος: όταν το θηλυκό άτομο είναι σε περίοδο αναπαραγωγής, αρχίζει να διασχίζει τρέχοντας στην ύπαιθρο, ξεκινώντας ένα κυνήγι με τα αρσενικά άτομα. Το κυνήγι αυτό, λειτουργεί σαν μια δοκιμασία για την αντοχή των αρσενικών ατόμων που ακολουθούν. Όταν παραμείνει τελικά μόνο ένα αρσενικό, το θηλυκό σταματάει και του επιτρέπει το ζευγάρωμα (Holly, 2001). Όπως γίνεται εύκολα κατανοητό, η αποτελεσματικότητα της σύζευξης και της παραγωγής ενέργειας στα αρσενικά άτομα αναμένεται να έχει μεγάλη επίδραση και στην πιθανότητα που έχουν να αναπαραχθούν: άτομα με ασυμβατότητες στα μιτοπυρηνικά γονίδια εμφανίζουν μειωμένη αναπαραγωγή ATP, αυξημένη παραγωγή ROS οπότε μειώνονται αισθητά οι πιθανότητες αναπαραγωγής τους σύμφωνα με αυτό το μοντέλο. Με αυτό τον τρόπο, η επιλογή ενός συντρόφου που μπορεί να παρέχει ένα σύνολο N-mt γονιδίων που είναι συμβατά με τα μιτοχονδριακά γονίδια ώστε να παραχθούν απόγονοι πλήρως λειτουργικοί, είναι η κινητήρια δύναμη για την εξέλιξη της επιλογής των θηλυκών ατόμων για συγκεκριμένα κοσμητικά χαρακτηριστικά στα ζώα (Hill & Johnson, 2013). Σύμφωνα με αυτή την υπόθεση, η προσυζευτική επιλογή για τα κοσμητικά χαρακτηριστικά προκύπτει από την ανάγκη για διαλογή των γονιδιακών δεξαμενών που περιέχουν συμβατά γονίδια N-mt και μιτοχονδριακά, και έτσι τα χαρακτηριστικά αυτά λειτουργούν ως αναγνωριστικά στοιχεία τα οποία οριοθετούν τις συμβατές δεξαμενές. Η υπόθεση αυτή επιβεβαιώνεται και απο το γεγονός πως τα χαρακτηριστικά αυτά στα ζώα φαίνεται να έχουν μικρή ποικιλομορφία εντός των ειδών ενώ εμφανίζουν μεγάλες και ποσοτικές διαφορές ανάμεσα στα είδη (Dalrymple et al, 2015). Επομένως, η εκτίμηση της μιτοχονδριακής λειτουργίας είναι ένα σημείο κλειδί στην εκτίμηση της ποιότητας των ατόμων επειδή η αποτελεσματικότητα της αναπνοής είναι ένα βασικό στοιχείο της απόδοσης ενός

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/06/2024 15:10:58 EEST - 3.135.219.133

ατόμου (Gershoni et al, 2009). Η χαμηλή απόδοση της κυτταρικής αναπνοής μπορεί να οφείλεται στο γονότυπο (τόσο στα μιτοχονδριακά όσο και στα πυρηνικά γονίδια), στο περιβάλλον ή και στο συνδυασμό του γονότυπου με το περιβάλλον (Innocenti et al, 2011, Frank & Hurst, 1996).

Βιοενεργητική και ειδογένεση: Η συμβολή των υβριδίων στους αναπαραγωγικούς φραγμούς

Πριν από μερικές δεκαετίες, είχε προταθεί πως οι μετασυζευκτικοί απομονωτικοί μηχανισμοί που οφείλονται στην ασυμβατότητα υβριδίων προκύπτουν από επιστατικές αλληλεπιδράσεων αλληλομόρφων που έχουν διαφοροποιηθεί λόγω μεταλλάξεων και υπόκεινται στη δράση της επιλογής μέσα στα είδη ή στους πληθυσμούς (Wolff & Gemmell, 2013, Lane, 2011, Arnqvist et al, 2010). Οι πιθανοί μηχανισμοί που εμπλέκονται στην διαδικασία της ειδογένεσης πρέπει να φέρουν τρία σημαντικά χαρακτηριστικά:

1. Να εμπλέκονται στην αναπαραγωγή και στη δημιουργία των αναπαραγωγικών φραγμών
2. Να είναι στενά συνδεδεμένοι με μηχανισμούς προσαρμογής
3. Να είναι σημαντικοί για τη βιωσιμότητα του οργανισμού

Ένας τέτοιος μηχανισμός φαίνεται να είναι αυτός της μιτοχονδριακής βιοενεργητικής, ο οποίος, όπως αναφέρθηκε και στα προηγούμενα κεφάλαια, καθώς αποτελεί κεντρικό μηχανισμό για τη διατήρηση της ζωής, στην γαμετογένεση, την γονιμότητα, της ανάπτυξη των εμβρύων καθώς και για την προσαρμογή και τη ρύθμιση των ενεργειακών απαιτήσεων των ιστών. Η στενή συμπροσαρμογή των μιτοπυρηνικών γονιδίων πιθανώς παίζει σημαντικό ρόλο στη δημιουργία των αναπαραγωγικών φραγμών. Σε αντίθεση με τις περισσότερες πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις, οι μιτοπυρηνικές αλληλεπιδράσεις διατηρούν μια μοναδική λειτουργική και ρυθμιστική αλληλεπίδραση γονιδίων που μεταφράζονται στο κυτταρόπλασμα με γονίδια που ρυθμίζονται σε ένα προκαρυωτικό περιβάλλον. Οι ασυμβατότητες στις αλληλεπιδράσεις αυτές, όπως προβλέπεται από το μοντέλο ασυμβατοτήτων των

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/06/2024 15:10:58 EEST - 3.135.219.133

Dobzhansky-Muller, εμπλέκονται σε υβριδιακή κατάπτωση και σε μετασυζευκτική στειρότητα όπως έχει αναφερθεί σε αρκετά παραδείγματα παραγωγής υβριδίων, είτε σε φυσικούς πληθυσμούς ειδών, τόσο ενδοειδικά όσο και διαειδικά, όσο και σε κατασκευασμένες υβριδικές κυτταρικές σειρές, που έφεραν διαφορετικούς συνδυασμούς μιτοχονδριακών και πυρηνικών γονιδιωμάτων. Οι λόγοι που εμφανίζεται αυτή η «γενετική προδιάθεση» των γονιδίων αυτών να συνεισφέρουν στην ειδογένεση. περιλαμβάνουν τη συχνή συνεξέλιξη των γονιδιωμάτων αυτών, συμπεριλαμβανομένων και των διαγονιδιωματικών συμπροσαρμογών σε διαδικασίες όπως η αναπνοή και η φωτοσύνθεση (Rand et al 2004). Τα γονιδιώματα των οργανιδίων έχουν μειωμένο δραστικό μέγεθος και απουσία ανανασυνδυασμού (Birky 2001). Τα χαρακτηριστικά αυτά αυξάνουν τη δράση της παρέκκλισης, οδηγώντας στην πιθανή συσσώρευση επιβλαβών μεταλλάξεων και στην επιλογή αντισταθμιστικών μεταλλάξεων στα αλληλεπιδρόντα πυρηνικά γονίδια, οδηγώντας σε διαγονιδιωματική συμπροασρμογή. Λόγω αυτών των παραγόντων, οι ασυμβατότητες οργανιδίων/πυρήνα έχουν προταθεί ότι είναι από τις πρώτες ασυμβατότητες που εμφανίζονται, επηρεάζοντας τα αρχικά στάδια της ειδογένεσης (Levin 2003, Fishman & Wills 2006, Greiner et al 2011, Burton et al 2013). Εάν αυτές οι ασυμβατότητες επηρεάζουν τα αρχικά στάδια της ειδογένεσης, θα αναμενόταν να συνεισφέρουν και σε φαινόμενα αναπαραγωγικής απομόνωσης μέσα στα είδη. Στη βιβλιογραφία έχουν αναφερθεί περιορισμένα παραδείγματα ασυμβατοτήτων μέσα στα είδη (Ellison & Burton, 2008, Chang et al, 2016) ενώ αρκετές μελέτες έχουν αναδείξει τη συνεισφορά τους στην αναπαραγωγική απομόνωση ανάμεσα στα είδη (Fishman & Willis 2006, Sambatti et al 2008, Chou & Leu 2010, Greiner et al 2011, Burton et al 2013).

Ένα ακόμα παράδειγμα ασυμβατοτήτων που σχετίζονται με την μιτοχονδριακή βιοενεργητική προέρχεται από τον ευρωπαϊκό λαγό. Στα πειράματα επιλεκτικών διασταυρώσεων των Smith και των συνεργατών του (2010) προσδιορίστηκε για πρώτη φορά η συμβολή της μιτοχονδριακής γενετικής διαφοροποίησης στην αναπαραγωγική επιτυχία και την παραγωγή υβριδίων μεταξύ των δυο γενεαλογιών, όπου και αναφέρθηκε για πρώτη φορά η επίδραση του φαινομένου της κατάρας της μητέρας στο είδος. Τα πιο εκτεταμένα στοιχεία που σχετίζονται με τη συμβολή των

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/06/2024 15:10:58 EEST - 3.135.219.133

ασυμβατοτήτων και τη δράση τους ως γενετικός φραγμός προέρχονται από τη φυσική ζώνη επαφής των δυο γενεαλογιών στη φύση. Οι δύο γενεαλογίες, όπως έχει ήδη περιγραφεί, συνυπάρχουν μόνο στην περιοχή της Βόρειοανατολικής Ελλάδας και της Βουλγαρίας. Η ύπαρξη αυτής της υβριδιακής ζώνης έχει αναγνωριστεί από πολλές μελέτες (Stamatis et al, 2009, Kasapidis et al, 2004, Antoniou et al, 2014, παρούσα μελέτη). Παρά την ύπαρξη αυτής της υβριδιακής ζώνης, δεν έχει παρατηρηθεί ποτέ ευρωπαϊκός απλότυπος στην Ανατολία και το αντίστροφο. Επιπλέον, σε μια πρόσφατη μελέτη των Djan και των συνεργατών της (2017), η οποία περιλάμβανε δειγματοληψίες από χώρες που περιβάλλουν την υβριδιακή ζώνη (Σερβία, FYROM, Μαυροβούνιο) αναφέρθηκε η πλήρης απουσία του ανατολικού απλότυπου πέραν της υβριδιακής ζώνης. Η συνδυαστική χρήση μιτοχονδριακών και πυρηνικών δεικτών στην παρούσα μελέτη ανέδειξε δύο σημαντικά στοιχεία: την εισροή του ανατολικού μιτοχονδριακού απλότυπο, η οποία δεν συνοδεύεται από την εισροή των πυρηνικών γενετικών στοιχείων, καθώς τα άτομα της υβριδιακής ζώνης δεν εμφανίζουν τον πυρηνικό «μωσαϊκισμό» που θα αναμενόταν σε περίπτωση συν-εισροής. Επιπλέον, από τα αποτελέσματα των Koutsogiannouli και των συνεργατών της, προκύπτει και η απουσία των αλληλομόρφων ανατολικού τύπου για το γονίδιο του DQA. Με βάση τα παραπάνω, μπορούμε να συμπεράνουμε πως η επιλογή ευνοεί τους πληθυσμούς που είναι τοπικά προσαρμοσμένοι (Burton, 2010). Η επιλογή αυτή δημιουργεί μια σταθερή υβριδιακή ζώνη που διαχωρίζει τα όρια των δυο πληθυσμών, η οποία λειτουργεί σαν γενετικός φραγμός στην γονιδιακή ροή και τη μίξη των πληθυσμών. Ο εντοπισμός των πυρηνικών γονιδίων που εισρέουν είναι δύσκολος, καθώς παρατηρείται το φαινόμενο της «γενετικής αραίωσης» σε κάθε διασταύρωση (Marques et al, 2017), ενώ αντίθετα η μιτοχονδριακή γενεαλογία που εισρέει μπορεί να εντοπίζεται για πολλές γενιές (Arnold, 1997, Alvet et al, 2008, Boratynski et al, 2011). Τα φαινόμενα αυτά της «ασύμμετρης» εισροής φαίνονται να ενισχύονται ιδιαίτερα σε είδη που εμφανίζουν φιλοπατρία των θηλυκών (Petit & Excofier, 2009), ενώ τα αρσενικά άτομα τείνουν να εμφανίζουν μεγαλύτερη ικανότητα διασποράς, όπως συμβαίνει και στον ευρωπαϊκό λαγό (Bray et al, 2007, Avril et al, 2011). Επομένως, η ασυμβατότητα των υβριδίων, που προκύπτει από την μιτοπυρηνική διαφοροποίηση που προσδιορίστηκε στην παρούσα μελέτη με τη συνδυαστική χρήση μιτοχονδριακών γονιδιωματικών δεδομένων και δεδομένων από ανάλυση

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/06/2024 15:10:58 EEST - 3.135.219.133

μεταγραφώματος, φαίνεται να λειτουργεί ως ένας μετασυζευκτικός μηχανισμός απομόνωσης, που αποτελεί ένα από τα πρώτα βήματα της ειδογένεσης. Το μοντέλο αυτό συμφωνεί και με το μοντέλο μειωμένης αρμοστικότητας υβριδίων που αναφέρει ο Hewitt (1988), στο οποίο η κατάπτωση προκαλείται απο τη συνεισφορά πολλών γονιδίων με μικρή συμμετοχή (όπως τα μιτοπυρηνικά γονίδια στην συγκεκριμένη περίπτωση) τα οποία είναι διάσπαρτα στο γονιδίωμα, παρά από τη συνεισφορά μόνο λίγων γονιδίων.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/06/2024 15:10:58 EEST - 3.135.219.133

Συμπεράσματα

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/06/2024 15:10:58 EEST - 3.135.219.133

Ο ορισμός των ειδών, αποτέλεσε και αποτελεί ένα από τα κυριότερα θέματα που έχουν απασχολήσει κατά καιρούς τους ερευνητές. Υπάρχουν τουλάχιστον 34 διαφορετικές προσεγγίσεις για την έννοια του είδους (Zachos et al, 2016). Η έννοια του βιολογικού είδους επικεντρώνεται κυρίως στην αναπαραγωγική απομόνωση από άλλους πληθυσμούς, η οποία είναι ένα σημαντικό χαρακτηριστικό για ένα είδος και έτσι ο υβριδισμός των γενεαλογιών και η γονιδιακή ροή μεταξύ πληθυσμών είναι δυο στοιχεία που αντιτίθεται στην κλασσική θεώρηση των ειδών σύμφωνα με τον Mayr (1940). Παρ την ποικιλία των ορισμών που έχουν διατυπωθεί, όλοι συμφωνούν πως τα είδη είναι απομονωμένες γενεαλογίες πληθυσμών που εξελίσσονται σύμφωνα με την εξελικτική θεώρηση του είδους (Evolutionary Species Concept, ESC, Wiley 1978). Πρόσφατα, διατυπώθηκε μια νέα θεωρία για τον ορισμό του είδους: Η θεωρία της μιτοπυρηνικής συμβατότητας (Mitonuclear Compatibility Species Concept, MCSC, Hill, 2017). Ο Hill αναφέρει πως: «η διαδικασία της ειδογένεσης είναι η διαδικασία της διαφοροποίησης των συμπροσαρμοσμένων γονιδίων mt και N-mt, τα οποία είναι σε θέση να ορίσουν ένα είδος και να διατηρήσουν την ταυτότητά του. Η απώλεια της αρμοστικότητας στους απογόνους που προέρχονται από μίξη mt και N-mt γονιδίων θα λειτουργεί ως φραγμός για τη γονιδιακή ροή μεταξύ των ειδών». Η γενετική διαφοροποίηση των συμπροσαρμοσμένων γονιδίων είναι μια δυναμική διεργασία: νέοι μιτοχονδριακοί απλότυποι δημιουργούνται σε κάθε γενιά και τα δυνητικά επιβλαβή τους αποτελέσματα πρέπει να αντισταθμιστούν από αλλαγές στο πυρηνικό DNA. Έτσι, οι πληθυσμοί βρίσκονται σε μια διαρκή αλληλεπίδραση γενετικών αλλαγών και προσαρμογών που έχει σαν στόχο την προσαρμογή και τη διαιώνιση τους. Η διαδικασία αυτή είναι συνεχής και ορίζεται ως η εξέλιξη των ειδών. Για το λόγο αυτό, ο Dobzhansky (1937) ανέφερε χαρακτηριστικά πως: «Το είδος είναι ένα στάδιο μιας διαδικασίας και όχι μια στατική μονάδα».

Το είδος του ευρωπαϊκού λαγού αποτελεί ένα πολύ καλό σύστημα για τη μελέτη των μιτοπυρηνικών αυτών αλληλεπιδράσεων που οδηγούν σε προσαρμογή και σε ειδογένεση. Η γεωγραφική απομόνωση των πληθυσμών κατά τις παγετωνικές περιόδους οδήγησε στη γενετική διαφοροποίηση τους και η μεταπαγετωνική εξάπλωση τους «έφερε στο φως» τις ασυμβατότητες των δυο γενεαλογιών του είδους. Η παρούσα μελέτη συνεισφέρει στην κατανόηση και εξήγηση των προτύπων

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/06/2024 15:10:58 EEST - 3.135.219.133

φυλογεωγραφίας του είδους καθώς και των μηχανισμών εξέλιξης που σχετίζονται τόσο με τις ασυμβατότητες των γενεαλογιών, όσο και με τις γενετικές διαφοροποιήσεις που συνέβαλλαν στο διαχωρισμό του είδους με άλλα συγγενικά είδη, όπως ο λαγός των βουνών (*Lepus timidus*), το είδος του American pika (*Ochotona princeps*) και το κουνέλι (*Oryctolagus cuniculus*). Τα πιο σημαντικά ευρήματα της μελέτης συνοψίζονται στα εξής:

- Προσδιορίστηκε η γενετική διαφοροποίηση των δυο γενεαλογιών σε επίπεδο μιτοχονδριακού γονιδιώματος για πρώτη φορά. Η αλληλούχηση των 14 μιτοχονδριακών γονιδιωμάτων παρείχε πληροφορίες τόσο για τα γενικά επίπεδα γενετικού και πρωτεϊνικού πολυμορφισμού, όσο και για τα επίπεδα πολυμορφισμών που εμφανίζονται στα επίπεδα των μεμονωμένων συμπλόκων της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης. Από την ανάλυση, προέκυψε πως η μεγαλύτερη συντήρηση στο επίπεδο του μιτοχονδριακού DNA εμφανίζεται στο σύμπλοκο IV, στο οποίο οι υπομονάδες COX1-3 είναι υπεύθυνες για την καταλυτική του ενεργότητα

- Αναλύθηκε η επίδραση των μοντέλων επιλογής στα επίπεδα του μιτοχονδριακού DNA, τόσο μεταξύ των γενεαλογιών του είδους όσο και σε είδη που απαρτίζουν το γένος του *Lepus*. Με την εφαρμογή διαφορετικών αλγορίθμων, προσδιορίστηκαν οι θέσεις των γονιδίων που κωδικοποιούν για πρωτεΐνες, οι οποίες φαίνεται να βρίσκονται υπο τη δράση της επιλογής. Η ανάλυση δεν ανέδειξε καμία νουκλεοτιδική θέση στην οποία να δρα η θετική επιλογή. Αντίθετα, προσδιορίστηκαν αρκετές θέσεις σε όλα τα σύμπλοκα της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης που βρίσκονται υπό τη δράση της αρνητικής επιλογής. Τα αποτελέσματα αυτά βρίσκονται σε συμφωνία με προηγούμενες ενδείξεις πως το μιτοχονδριακό DNA δεν είναι επιλεκτικά ουδέτερο, αλλά λόγω της λειτουργικής του σημασίας, η επιλογή δρα στο επίπεδο των γονιδίων

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/06/2024 15:10:58 EEST - 3.135.219.133

- Με τη χρήση του παγκόσμιου δείκτη DNA barcode, του μιτοχονδριακού γονιδίου της υπομονάδας I της κυτοχρωμικής οξειδάσης (COXI), υπολογίστηκαν οι διαφοροποιήσεις κατά ζεύγη για τα είδη του γένους *Lepus* όσο και τις δυο ξεχωριστές γενεαλογίες του είδους του ευρωπαϊκού λαγού. Η διαφοροποίηση που παρατηρήθηκε μεταξύ των δυο γενεαλογιών σε μερικές περιπτώσεις φάνηκε να είναι μεγαλύτερη από τις διαφοροποιήσεις μεταξύ διαφορετικών ειδών. Η ειδογένεση είναι μια διαδικασία που συμβαίνει μέσω προσαρμοστικής διαφοροποίησης στα συμπροσαρμοσμένα μιτοπυρηνικά γονίδια και τα γονίδια COX είναι πιθανό να αποτελούν στόχους τέτοιας προσαρμοστικής εξέλιξης καθώς το σύμπλοκο IV είναι σημαντικός ρυθμιστής της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων (Villani and Attardi 1997, Piccoli et al 2006, Pacelli et al 2011, Arnold et al 2012). Επομένως, η διαφοροποίηση ανάμεσα στις δυο γενεαλογίες μπορεί να είναι ενδεικτική για τα γεγονότα αναπαραγωγικής απομόνωσης των γενεαλογιών, που οδηγούν συνήθως στην ειδογένεση.

- Προσδιορίστηκε το μεταγράφωμα του είδους για πρώτη φορά και αποτέλεσε το πρώτο μεταγράφωμα του γένους το οποίο αλληλουχήθηκε. Ακολούθησε στη συνέχεια ο χαρακτηρισμός του μεταγραφώματος του λαγού των βουνών (Marques et al, 2017). Η συγκριτική ανάλυση του μεταγραφώματος σε επίπεδο αλληλουχιών ανέδειξε τις πολυμορφικές θέσεις των δυο γενεαλογιών που θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως διαγνωστικοί δείκτες για την ταξινόμηση. Η ανάλυση των λειτουργικών μεταλλάξεων στα τρία κύρια επίπεδα παραγωγής της κυτταρικής ενέργειας, της γλυκόλυσης, του κύκλου του Krebs και της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης ήταν ενδεικτική για τα γεγονότα συνεξέλιξης των μιτοπυρηνικών γονιδίων: τα γονίδια της γλυκόλυσης, του κύκλου του Krebs και του συμπλόκου II της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης, που κωδικοποιείται αποκλειστικά από πυρηνικά γονίδια, εμφανίζουν παρόμοιους ρυθμούς συσσώρευσης μεταλλάξεων που

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/06/2024 15:10:58 EEST - 3.135.219.133

διαφοροποιούν τις δυο γενεαλογίες, οι οποίες είναι τρείς με τέσσερις φορές μικρότεροι από τους αντίστοιχους ρυθμούς που εμφανίζουν τα μιτοχονδριακά γονίδια της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης και τα πυρηνικά γονίδια των συμπλόκων I,III,IV και V. Τα γονίδια αυτά τείνουν να εμφανίζουν υψηλότερους εξελικτικούς ρυθμούς, για να αντισταθμίσουν τα επιβλαβή αποτελέσματα των μιτοχονδριακών μεταλλάξεων

- Η συγκριτική γονιδιωματική ανάλυση του ευρωπαϊκού λαγού, του λαγού των βουνών, του κουνελιού και του American pika στα επίπεδα της παραγωγής της κυτταρικής ενέργειας ήταν επίσης ενδεικτική για τη συνεξέλιξη των μιτοπυρηνικών γονιδίων, τα οποία διαφοροποιούνται και οδηγούν τη διαφοροποίηση μεταξύ των ειδών, μέσω της ανάπτυξης ασυμβατοτήτων στις γονιδιακές αλληλεπιδράσεις και της ανάπτυξης αναπαραγωγικής απομόνωσης. Τα μιτοχονδριακά και πυρηνικά γονίδια της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης βρέθηκε να εξελίσσονται ταχύτερα από τα πυρηνικά γονίδια της γλυκόλυσης και του κύκλου του Krebs, όπως και στην περίπτωση της σύγκρισης των δύο γενεαλογιών.

- Η συνδυαστική χρήση μοριακών δεικτών του πυρήνα και του μιτοχονδρίου σε απομονωμένους πληθυσμούς και στον πληθυσμό της υβριδιακής ζώνης παρείχε πληροφορίες για τη δράση της γενετικής παρέκκλισης και της φυσικής επιλογής στη διαμόρφωση των επιπέδων του γενετικού πολυμορφισμού στους πληθυσμούς αυτούς. Οι νησιωτικοί πληθυσμοί εμφανίστηκαν κατά κανόνα να είναι λιγότερο πολυμορφικοί από τους ηπειρωτικούς πληθυσμούς. Η ανάλυση του πληθυσμού της υβριδιακής ζώνης ανέδειξε τον μηχανισμό που είναι υπεύθυνος για την απουσία γονιδιακής ροής των γενεαλογιών. Η διασπορά του εισερχόμενου ανατολικού απλότυπου περιορίζεται στην υβριδιακή ζώνη, καθώς η ασυμβατότητα των υβριδίων που οφείλεται στις μιτοπυρηνικές ασυμβατότητες φαίνεται να επηρεάζει την αρμοστικότητα των υβριδίων και την ικανότητα διασποράς

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/06/2024 15:10:58 EEST - 3.135.219.133

τους. Η απουσία συν-εισροής του ανατολικού πυρηνικού προτύπου είναι ενδεικτική για την επιλογή που ευνοεί τους τοπικά προσαρμοσμένους γονότυπους έναντι των εισερχόμενων.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/06/2024 15:10:58 EEST - 3.135.219.133

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/06/2024 15:10:58 EEST - 3.135.219.133

Summary

Mitochondrio is a semi-autonomous organelle of the cell, which produces the majority of the cellular energy through the Oxidative Phosphorylation system (OXPHOS). OXPHOS is mediated by 5 multisubunit enzymatic complexes. The subunits of the complexes are encoded by genes mapped in both the cellular genomes, the nuclear and the mitochondrial. The mitochondrial genome possesses some unique features, mentioning the maternal inheritance, the absence of repairing mechanisms, its autonomous replication system, resulting in faster evolutionary rhythms compared to the nuclear genome. So, in order to keep the functionality of the OXPHOS machinery, the nuclear genome has to keep the pace in the evolutionary rhythms of the genes that are cooperating with the mitochondrial genome, by co-adapting the respective nuclear genes. Until the last decade, the mtDNA was considered neutral in terms of natural selection and it was believed that is didn't participate in adaptive mechanisms. However, in nowadays, mtDNA is not considered neutral and natural selection acts on mutations that affect the organisms' fitness. Due to its maternal inheritance, the selection acts solely in the females rather than the males, so mutations that are neutral or beneficial to the females are favored. Though, these beneficial or neutral mutations for the females may have a negative impact in males' fitness, leading to the phenomenon of the "mother's curse".

Allopatric populations of the species differentiate genetically through natural selection and the random genetic drift and this divergence can lead to reproductive isolation. The interpopulation hybrids tend to show lower fitness and reproductive ability compared to the parental populations, and these effects are mainly caused by the mitochondrial dysfunction of the hybrids. This model of incompatibility is well-known as the Dobzhansky-Muller model of incompatibility (DMI) and includes many genetic loci. Nowadays, there are numerous studies that detect the cause of the hybrid failure in the mitochondrial dysfuncntion of the hybrids.

In this thesis, we studied the selective pressures that act upon the mitochondrial genome in the species of the European brown hare (*Lepus europaeus)* as well as in closely relative species of the genus and how these pressures are shaping the levels of genetic variability. Also, by using data of transcriptomic analyses, we studied the effect of coadaptation in the genetic differentiation of both genomes, the nuclear and the mitochondrial, by assessing the relative rhythms of the genes encoding for the major energy producing mechanisms of the cells, namely the glycolysis, the Krebs cycle and the OXPHOS. The results, both in interpopulation and interspecies level, are in accordance with the coadaptation patterns of cooperating genes that are mapped in different genomes. Lastly, by studying both nuclear and mitochondrial markers in a hybrid population of the species of the European brown hare, we defined the major factors that affect the lack of gene flow and the introgression between the two lineages of the species.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/06/2024 15:10:58 EEST - 3.135.219.133

Βιβλιογραφία

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/06/2024 15:10:58 EEST - 3.135.219.133

1. Acín-Pérez, R., Fernández-Silva, P., Peleato, M. L., Pérez-Martos, A., & Enriquez, J. A. (2008). Respiratory Active Mitochondrial Supercomplexes. *Molecular Cell*, *32*(4), 529–539. https://doi.org/10.1016/J.MOLCEL.2008.10.021
2. Acín-Pérez, R., Bayona-Bafaluy, M. P., Fernández-Silva, P., Moreno-Loshuertos, R., Pérez-Martos, A., Bruno, C., … Enríquez, J. A. (2004). Respiratory Complex III Is Required to Maintain Complex I in Mammalian Mitochondria. *Molecular Cell*, *13*(6), 805–815. https://doi.org/10.1016/S1097-2765(04)00124-8
3. Ackerman, S. H., & Tzagoloff, A. (1990). Identification of two nuclear genes (ATP11, ATP12) required for assembly of the yeast F1-ATPase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *87*(13), 4986–4990. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2142305
4. Adams, K. L., Daley, D. O., Qiu, Y.-L., Whelan, J., & Palmer, J. D. (2000). Repeated, recent and diverse transfers of a mitochondrial gene to the nucleus in flowering plants. *Nature*, *408*(6810), 354–357. https://doi.org/10.1038/35042567
5. Adrion, J. R., White, P. S., & Montooth, K. L. (2016). The Roles of Compensatory Evolution and Constraint in Aminoacyl tRNA Synthetase Evolution. *Molecular Biology and Evolution*, *33*(1), 152–161. https://doi.org/10.1093/molbev/msv206
6. Agris, P. F., Vendeix, F. A. P., & Graham, W. D. (2007). tRNA's Wobble Decoding of the Genome: 40 Years of Modification. *Journal of Molecular Biology*, *366*(1), 1–13. https://doi.org/10.1016/J.JMB.2006.11.046
7. Aitken, R. J. (1997). Molecular mechanisms regulating sperm function A novel antioxidant formulation designed to treat male infertility associated with oxidative stress: promising preclinical evidence from animal models. View project Mammalian Sperm Membrane Protein Complexes View project. https://doi.org/10.1093/molehr/3.3.169
8. Aitken, R. J., Fisher, H. M., Fulton, N., Gomez, E., Knox, W., Lewis, B., & Irvine, S. (1997). Reactive oxygen species generation by human spermatozoa is induced by exogenous NADPH and inhibited by the flavoprotein inhibitors diphenylene iodonium and quinacrine. *Molecular Reproduction and Development*, *47*(4), 468–482. https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-2795(199708)47:4<468::AID-MRD14>3.0.CO;2-S
9. Aitken, R. J., Gibb, Z., Baker, M. A., Drevet, J., & Gharagozloo, P. (2016). Causes and consequences of oxidative stress in spermatozoa. *Reproduction, Fertility and Development*, *28*(2), 1. https://doi.org/10.1071/RD15325
10. Aitken, R. J., Smith, T. B., Jobling, M. S., Baker, M. A., & De Iuliis, G. N. (2014). Oxidative stress and male reproductive health. *Asian Journal of Andrology*, *16*(1), 31–38. https://doi.org/10.4103/1008-682X.122203
11. Akashi, H., Osada, N., & Ohta, T. (2012). Weak Selection and Protein Evolution. *Genetics*, *192*(1), 15–31. https://doi.org/10.1534/genetics.112.140178
12. Al-Hamdany, A. K., Al-Khatib, A. R., & Al-Sadi, H. I. (2017). Influence of olive oil on alveolar bone response during orthodontic retention period: rabbit model study. *Acta Odontologica Scandinavica*, *75*(6), 413–422. https://doi.org/10.1080/00016357.2017.1328613
13. Alessandri, B., Gugliotta, M., Levasseur, J. E., & Bullock, M. R. (2009). Lactate and glucose as energy substrates and their role in traumatic brain injury and therapy. *Future Neurology*, *4*(2), 209–228. https://doi.org/10.2217/14796708.4.2.209
14. Alfonzo, J. D., & Söll, D. (2009). Mitochondrial tRNA import – the challenge to understand has just begun. *Biological Chemistry*, *390*(8), 717–722. https://doi.org/10.1515/BC.2009.101
15. Allegretti, M., Klusch, N., Mills, D. J., Vonck, J., Kühlbrandt, W., & Davies, K. M. (2015). Horizontal membrane-intrinsic α-helices in the stator a-subunit of an F-type ATP synthase. *Nature*, *521*(7551), 237–240. https://doi.org/10.1038/nature14185
16. Allen, J. F. (1993). Control of Gene Expression by Redox Potential and the Requirement for Chloroplast and Mitochondrial Genomes. *Journal of Theoretical Biology*, *165*(4), 609–631. https://doi.org/10.1006/JTBI.1993.1210
17. Allen, J. F. (2003). Why chloroplasts and mitochondria contain genomes. *Comparative and Functional Genomics*, *4*(1), 31–36. https://doi.org/10.1002/cfg.245
18. Allen, J. F., & de Paula, W. B. M. (2013). Mitochondrial genome function and maternal inheritance. *Biochemical Society Transactions*, *41*(5), 1298–1304. https://doi.org/10.1042/BST20130106

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/06/2024 15:10:58 EEST - 3.135.219.133

19. Allen, J. F., & Raven, J. A. (1996). Free-radical-induced mutation vs redox regulation: Costs and benefits of genes in organelles. *Journal of Molecular Evolution*, *42*(5), 482–492. https://doi.org/10.1007/BF02352278
20. Alsmark, C., Foster, P. G., Sicheritz-Ponten, T., Nakjang, S., Martin Embley, T., & Hirt, R. P. (2013). Patterns of prokaryotic lateral gene transfers affecting parasitic microbial eukaryotes. *Genome Biology*, *14*(2), R19. https://doi.org/10.1186/gb-2013-14-2-r19
21. Amaral, A., Lourenço, B., Marques, M., & Ramalho-Santos, J. (2013). Mitochondria functionality and sperm quality. *Reproduction (Cambridge, England)*, *146*(5), R163-74. https://doi.org/10.1530/REP-13-0178
22. Amoutzias, G. D., Giannoulis, T., Moutou, K. A., Psarra, A.-M. G., Stamatis, C., Tsipourlianos, A., & Mamuris, Z. (2016). SNP Identification through Transcriptome Analysis of the European Brown Hare (Lepus europaeus): Cellular Energetics and Mother's Curse. *PloS One*, *11*(7), e0159939. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0159939
23. Andersson, J. O. (2009). Gene Transfer and Diversification of Microbial Eukaryotes. *Annual Review of Microbiology*, *63*(1), 177–193. https://doi.org/10.1146/annurev.micro.091208.073203
24. Andersson, M. B. (1994). *Sexual selection*. Princeton University Press. Retrieved from https://books.google.gr/books?hl=el&lr=&id=lNnHdvzBlTYC&oi=fnd&pg=PR15&dq=Andersson+1994&ots=dwZeijGwv4&sig=gdSROll6LRA30zg6y1-5ifEe81I&redir_esc=y#v=onepage&q=Andersson 1994&f=false
25. Andersson, M., & Simmons, L. W. (2006). Sexual selection and mate choice. *Trends in Ecology & Evolution*, *21*(6), 296–302. https://doi.org/10.1016/J.TREE.2006.03.015
26. Andersson, S. G. E., Zomorodipour, A., Andersson, J. O., Sicheritz-Pontén, T., Alsmark, U. C. M., Podowski, R. M., … Kurland, C. G. (1998). The genome sequence of Rickettsia prowazekii and the origin ofmitochondria. *Nature*, *396*(6707), 133–140. https://doi.org/10.1038/24094
27. Angilletta Jr., M. J. (2009). *Thermal Adaptation*. Oxford University Press. https://doi.org/10.1093/acprof:oso/9780198570875.001.1
28. Angilletta, M. J., Bennett, A. F., Guderley, H., Navas, C. A., Seebacher, F., & Wilson, R. S. (2015). Coadaptation: a unifying principle in evolutionary thermal biology. *Physiological and Biochemical Zoology : PBZ*, *79*(2), 282–294. https://doi.org/10.1086/499990
29. Ankel-Simons, F., & Cummins, J. M. (1996). Misconceptions about mitochondria and mammalian fertilization: implications for theories on human evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *93*(24), 13859–13863. https://doi.org/10.1073/PNAS.93.24.13859
30. Antoniou, A., Magoulas, A., Platis, P., & Kotoulas, G. (2013). Assessing the genetic landscape of a contact zone: the case of European hare in northeastern Greece. *Genetica*, *141*(1–3), 23–40. https://doi.org/10.1007/s10709-013-9703-z
31. Antoshechkin, I., Bogenhagen, D. F., & Shadel, G. S. (1995). Distinct roles for two purified factors in transcription of Xenopus mitochondrial DNA. *Molecular and Cellular Biology*, *15*(12), 7032–7042. https://doi.org/10.1128/mcb.22.4.1116-1125.2002
32. Aravind, L., Iyer, L. M., & Koonin, E. V. (2006). Comparative genomics and structural biology of the molecular innovations of eukaryotes. *Current Opinion in Structural Biology*, *16*(3), 409–419. https://doi.org/10.1016/J.SBI.2006.04.006
33. Arch, J. R. S., Ainsworth, A. T., Cawthorne, M. A., Piercy, V., Sennitt, M. V., Thody, V. E., … Wilson, S. (1984). Atypical β-adrenoceptor on brown adipocytes as target for anti-obesity drugs. *Nature*, *309*(5964), 163–165. https://doi.org/10.1038/309163a0
34. Archibald, J. M. (2014). *One plus one equals one : symbiosis and the evolution of complex life*.
35. Arnold, S. (2012). The power of life—Cytochrome c oxidase takes center stage in metabolic control, cell signalling and survival. *Mitochondrion*, *12*(1), 46–56. https://doi.org/10.1016/j.mito.2011.05.003
36. Arnold, S., & Kadenbach, B. (1997). Cell Respiration is Controlled by ATP, an Allosteric Inhibitor of Cytochrome-c Oxidase. *European Journal of Biochemistry*, *249*(1), 350–354. https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1997.t01-1-00350.x
37. Arnqvist, G., Dowling, D. K., Eady, P., Gay, L., Tregenza, T., Tuda, M., & Hosken, D. J. (2010). GENETIC ARCHITECTURE OF METABOLIC RATE: ENVIRONMENT SPECIFIC EPISTASIS

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/06/2024 15:10:58 EEST - 3.135.219.133

BETWEEN MITOCHONDRIAL AND NUCLEAR GENES IN AN INSECT. *Evolution*, *64*(12), 3354–3363. https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.2010.01135.x

38. Asin-Cayuela, J., & Gustafsson, C. M. (2007). Mitochondrial transcription and its regulation in mammalian cells. *Trends in Biochemical Sciences*, *32*(3), 111–117. https://doi.org/10.1016/J.TIBS.2007.01.003
39. Atlante, A., de Bari, L., Bobba, A., & Amadoro, G. (2017). A disease with a sweet tooth: exploring the Warburg effect in Alzheimer's disease. *Biogerontology*, *18*(3), 301–319. https://doi.org/10.1007/s10522-017-9692-x
40. Avril, A., Léonard, Y., Letty, J., Péroux, R., Guitton, J.-S., & Pontier, D. (2011). Natal dispersal of European hare in a high-density population. *Mammalian Biology - Zeitschrift Für Säugetierkunde*, *76*(2), 148–156. https://doi.org/10.1016/J.MAMBIO.2010.07.001
41. Ballard, J. W. O., & Kreitman, M. (1995). Is mitochondrial DNA a strictly neutral marker? *Trends in Ecology & Evolution*, *10*(12), 485–488. https://doi.org/10.1016/S0169-5347(00)89195-8
42. BALLARD, J. W. O., & MELVIN, R. G. (2010). Linking the mitochondrial genotype to the organismal phenotype. *Molecular Ecology*, *19*(8), 1523–1539. https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2010.04594.x
43. Ballard, J. W. O., & Whitlock, M. C. (2004). The incomplete natural history of mitochondria. *Molecular Ecology*, *13*(4), 729–744. https://doi.org/10.1046/j.1365-294X.2003.02063.x
44. Bar-Yaacov, D., Blumberg, A., & Mishmar, D. (2012). Mitochondrial-nuclear co-evolution and its effects on OXPHOS activity and regulation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms*, *1819*(9–10), 1107–1111. https://doi.org/10.1016/J.BBAGRM.2011.10.008
45. Baris, T. Z., Wagner, D. N., Dayan, D. I., Du, X., Blier, P. U., Pichaud, N., … Crawford, D. L. (2017). Evolved genetic and phenotypic differences due to mitochondrial-nuclear interactions. *PLOS Genetics*, *13*(3), e1006517. https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1006517
46. Barja, G. (2007). Mitochondrial Oxygen Consumption and Reactive Oxygen Species Production are Independently Modulated: Implications for Aging Studies. *Rejuvenation Research*, *10*(2), 215–224. https://doi.org/10.1089/rej.2006.0516
47. Barreto, F. S., & Burton, R. S. (2013). Evidence for Compensatory Evolution of Ribosomal Proteins in Response to Rapid Divergence of Mitochondrial rRNA. *Molecular Biology and Evolution*, *30*(2), 310–314. https://doi.org/10.1093/molbev/mss228
48. Barrientos, A., Kenyon, L., & Moraes, C. T. (1998). Human xenomitochondrial cybrids. Cellular models of mitochondrial complex I deficiency. *The Journal of Biological Chemistry*, *273*(23), 14210–14217. https://doi.org/10.1074/JBC.273.23.14210
49. Barroso, N., Campos, Y., Huertas, R., Esteban, J., Molina, J. A., Alonso, A., … Arenas, J. (1993). Respiratory chain enzyme activities in lymphocytes from untreated patients with Parkinson disease. *Clinical Chemistry*, *39*(4), 667–669. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8386068
50. Bartlett, K., & Eaton, S. (2004). Mitochondrial beta-oxidation. *European Journal of Biochemistry*, *271*(3), 462–469. https://doi.org/10.1046/j.1432-1033.2003.03947.x
51. Barton, N. H., & Charlesworth, B. (1998). Why sex and recombination? *Science (New York, N.Y.)*, *281*(5385), 1986–1990. https://doi.org/10.1126/SCIENCE.281.5385.1986
52. Barton, N. H., & Hewitt, G. M. (1989). Adaptation, speciation and hybrid zones. *Nature*, *341*(6242), 497–503. https://doi.org/10.1038/341497a0
53. Baughman, J. M., Perocchi, F., Girgis, H. S., Plovanich, M., Belcher-Timme, C. A., Sancak, Y., … Mootha, V. K. (2011). Integrative genomics identifies MCU as an essential component of the mitochondrial calcium uniporter. *Nature*, *476*(7360), 341–345. https://doi.org/10.1038/nature10234
54. Baumber, J., Ball, B. A., Linfor, J. J., & Meyers, S. A. (2003). Reactive Oxygen Species and Cryopreservation Promote DNA Fragmentation in Equine Spermatozoa. *Journal of Andrology*, *24*(4), 621–628. https://doi.org/10.1002/j.1939-4640.2003.tb02714.x
55. Beekman, M., Dowling, D. K., & Aanen, D. K. (2014). The costs of being male: are there sex-specific effects of uniparental mitochondrial inheritance? *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, *369*(1646), 20130440–20130440. https://doi.org/10.1098/rstb.2013.0440

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/06/2024 15:10:58 EEST - 3.135.219.133

56. Bekker, A., Holland, H. D., Wang, P.-L., Rumble, D., Stein, H. J., Hannah, J. L., … Beukes, N. J. (2004). Dating the rise of atmospheric oxygen. *Nature*, *427*(6970), 117–120. https://doi.org/10.1038/nature02260
57. Béland-Millar, A., Larcher, J., Courtemanche, J., Yuan, T., & Messier, C. (2017). Effects of Systemic Metabolic Fuels on Glucose and Lactate Levels in the Brain Extracellular Compartment of the Mouse. *Frontiers in Neuroscience*, *11*. https://doi.org/10.3389/fnins.2017.00007
58. Bellance, N., Lestienne, P., & Rossignol, R. (2009). Mitochondria: from bioenergetics to the metabolic regulation of carcinogenesis. *Frontiers in Bioscience (Landmark Edition)*, *14*, 4015–4034. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19273331
59. Bennett, A. F., & Johnston, I. A. (2008). *Animals and temperature : phenotypic and evolutionary adaptation*. Cambridge University Press. Retrieved from http://www.cambridge.org/gb/academic/subjects/life-sciences/zoology/animals-and-temperature-phenotypic-and-evolutionary-adaptation?format=PB
60. Bennett, K. D., Tzedakis, P. C., & Willis, K. J. (1991). Quaternary Refugia of North European Trees. *Journal of Biogeography*, *18*(1), 103. https://doi.org/10.2307/2845248
61. Bensasson, D., Zhang, D.-X., Hartl, D. L., & Hewitt, G. M. (2001). Mitochondrial pseudogenes: evolution's misplaced witnesses. *Trends in Ecology & Evolution*, *16*(6), 314–321. https://doi.org/10.1016/S0169-5347(01)02151-6
62. Bentov, Y., Yavorska, T., Esfandiari, N., Jurisicova, A., & Casper, R. F. (2011). The contribution of mitochondrial function to reproductive aging. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, *28*(9), 773–783. https://doi.org/10.1007/s10815-011-9588-7
63. Berg, O. G., & Kurland, C. G. (2000). Why Mitochondrial Genes are Most Often Found in Nuclei. *Molecular Biology and Evolution*, *17*(6), 951–961. https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a026376
64. Bernander, R., Lind, A. E., & Ettema, T. J. G. (2011). An archaeal origin for the actin cytoskeleton: Implications for eukaryogenesis. *Communicative & Integrative Biology*, *4*(6), 664–667. https://doi.org/10.4161/cib.16974
65. BERNATCHEZ, L., & OSINOV, A. (1995). Genetic diversity of trout (genus Salmo) from its most eastern native range based on mitochondrial DNA and nuclear gene variation. *Molecular Ecology*, *4*(3), 285–298. https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.1995.tb00222.x
66. Bernatchez, L., Glémet, H., Wilson, C. C., & Danzmann, R. G. (1995). Introgression and fixation of Arctic char (*Salvelinus alpinus*) mitochondrial genome in an allopatric population of brook trout (*Salvelinus fontinalis*). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, *52*(1), 179–185. https://doi.org/10.1139/f95-018
67. Bianchi, C., Genova, M. L., Castelli, G. P., & Lenaz, G. (2004). *The mitochondrial respiratory chain is partially organized in a supercomplex assembly KINETIC EVIDENCE USING FLUX CONTROL ANALYSIS Downloaded from*. JBC Papers in Press. Retrieved from http://www.jbc.org/
68. Bilgin, R., Bilgin, & Rasit. (2011). Back to the Suture: The Distribution of Intraspecific Genetic Diversity in and Around Anatolia. *International Journal of Molecular Sciences*, *12*(6), 4080–4103. https://doi.org/10.3390/ijms12064080
69. Birky, C. W. (1995). Uniparental inheritance of mitochondrial and chloroplast genes: mechanisms and evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *92*(25), 11331–11338. https://doi.org/10.1073/PNAS.92.25.11331
70. Birky, C. W. (2001). The Inheritance of Genes in Mitochondria and Chloroplasts: Laws, Mechanisms, and Models. *Annual Review of Genetics*, *35*(1), 125–148. https://doi.org/10.1146/annurev.genet.35.102401.090231
71. Blackstone, N. W. (2013). Why did eukaryotes evolve only once? Genetic and energetic aspects of conflict and conflict mediation. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, *368*(1622), 20120266–20120266. https://doi.org/10.1098/rstb.2012.0266
72. Blanchard, J. L., & Lynch, M. (2000). Organellar genes: why do they end up in the nucleus? *Trends in Genetics*, *16*(7), 315–320. https://doi.org/10.1016/S0168-9525(00)02053-9
73. Blanchard, J. L., & Schmidt, G. W. (1995). Pervasive migration of organellar DNA to the nucleus in plants. *Journal of Molecular Evolution*, *41*(4), 397–406. https://doi.org/10.1007/BF00160310

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/06/2024 15:10:58 EEST - 3.135.219.133

74. Blier, P. U., Dufresne, F., & Burton, R. S. (2001). Natural selection and the evolution of mtDNA-encoded peptides: evidence for intergenomic co-adaptation. *Trends in Genetics*, *17*(7), 400–406. https://doi.org/10.1016/S0168-9525(01)02338-1
75. Bobba, A., Amadoro, G., La Piana, G., Calissano, P., & Atlante, A. (2015). Glycolytic enzyme upregulation and numbness of mitochondrial activity characterize the early phase of apoptosis in cerebellar granule cells. *Apoptosis*, *20*(1), 10–28. https://doi.org/10.1007/s10495-014-1049-1
76. Bobrowicz, A. J., Lightowlers, R. N., & Chrzanowska-Lightowlers, Z. (2008). Polyadenylation and degradation of mRNA in mammalian mitochondria: a missing link?: Table 1. *Biochemical Society Transactions*, *36*(3), 517–519. https://doi.org/10.1042/BST0360517
77. Bogenhagen, D. F. (1999). Repair of mtDNA in vertebrates. *American Journal of Human Genetics*, *64*(5), 1276–1281. https://doi.org/10.1086/302392
78. Bolnick, D. I., Turelli, M., López-Fernández, H., Wainwright, P. C., & Near, T. J. (2008). Accelerated mitochondrial evolution and "Darwin's corollary": asymmetric viability of reciprocal F1 hybrids in Centrarchid fishes. *Genetics*, *178*(2), 1037–1048. https://doi.org/10.1534/genetics.107.081364
79. Bolnick, D. I., Turelli, M., Wainwright, P. C., & Near, T. J. (2008). Published Articles Ahead of Print. *Genetics*. https://doi.org/10.1534/genetics.107.081364
80. Bonino, N., & Montenegro, A. (1997). *Reproduction of the European hare in Patagonia*. *A cta Theriologica* (Vol. 42). Retrieved from http://rcin.org.pl/Content/26767/BI002_2613_Cz-40-2_Acta-T42-nr5-47-54_o.pdf
81. Bonner, J. T. (1988). *The evolution of complexity by means of natural selection*. Princeton University Press.
82. Bonner, J. T. (1998). The origins of multicellularity. *Integrative Biology: Issues, News, and Reviews*, *1*(1), 27–36. https://doi.org/10.1002/(SICI)1520-6602(1998)1:1<27::AID-INBI4>3.0.CO;2-6
83. Boore, J. L. (2006). The use of genome-level characters for phylogenetic reconstruction. *Trends in Ecology & Evolution*, *21*(8), 439–446. https://doi.org/10.1016/J.TREE.2006.05.009
84. Boratyński, Z., Alves, P., Berto, S., Koskela, E., Mappes, T., & Melo-Ferreira, J. (2011). Introgression of mitochondrial DNA among Myodes voles: consequences for energetics? *BMC Evolutionary Biology*, *11*(1), 355. https://doi.org/10.1186/1471-2148-11-355
85. Börner, G. V., Mörl, M., Janke, A., & Pääbo, S. (1996). RNA editing changes the identity of a mitochondrial tRNA in marsupials. *The EMBO Journal*, *15*(21), 5949–5957. https://doi.org/10.1002/J.1460-2075.1996.TB00981.X
86. Bourlat, S. J., Nielsen, C., Economou, A. D., & Telford, M. J. (2008). Testing the new animal phylogeny: A phylum level molecular analysis of the animal kingdom. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, *49*(1), 23–31. https://doi.org/10.1016/J.YMPEV.2008.07.008
87. Bozinovic, F., & Rosenmann, M. (1989). Maximum Metabolic Rate of Rodents: Physiological and Ecological Consequences on Distributional Limits. *Functional Ecology*, *3*(2), 173. https://doi.org/10.2307/2389298
88. Brand, M. D. (2000). Uncoupling to survive? The role of mitochondrial inefficiency in ageing. *Experimental Gerontology*, *35*(6–7), 811–820. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11053672
89. Brand, M. D., & Nicholls, D. G. (2011). Assessing mitochondrial dysfunction in cells. *Biochemical Journal*, *435*(2), 297–312. https://doi.org/10.1042/BJ20110162
90. Brand, M. D., Affourtit, C., Esteves, T. C., Green, K., Lambert, A. J., Miwa, S., … Parker, N. (2004). Mitochondrial superoxide: production, biological effects, and activation of uncoupling proteins. *Free Radical Biology and Medicine*, *37*(6), 755–767. https://doi.org/10.1016/J.FREERADBIOMED.2004.05.034
91. Brandt, U. (2006). Energy Converting NADH: Quinone Oxidoreductase (Complex I). *Annual Review of Biochemistry*, *75*(1), 69–92. https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.75.103004.142539
92. Brandt, U., Yu, L., Yu, C. A., & Trumpower, B. L. (1993). The mitochondrial targeting presequence of the Rieske iron-sulfur protein is processed in a single step after insertion into the cytochrome bc1 complex in mammals and retained as a subunit in the complex. *The Journal of Biological Chemistry*, *268*(12), 8387–8390. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8386158

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/06/2024 15:10:58 EEST - 3.135.219.133

93. Bray, Y., Devillard, S., Marboutin, E., Mauvy, B., & Péroux, R. (2007). Natal dispersal of European hare in France. *Journal of Zoology*, *273*(4), 426–434. https://doi.org/10.1111/j.1469-7998.2007.00348.x
94. Broekhuizen, S., & Maaskamp, F. (2009). Behaviour of does and leverets of the European hare (Lepus europaem) whilst nursing. *Journal of Zoology*, *191*(4), 487–501. https://doi.org/10.1111/j.1469-7998.1980.tb01480.x
95. Brooks, G. (2012). Lactate Shuttling and the Mitochondrial Lactate Oxidation Complex (pp. 131–155). https://doi.org/10.1201/b12308-10
96. Brooks, G. A. (2009). Cell-cell and intracellular lactate shuttles. *The Journal of Physiology*, *587*(23), 5591–5600. https://doi.org/10.1113/jphysiol.2009.178350
97. Brown, G. C. (1992). Control of respiration and ATP synthesis in mammalian mitochondria and cells. *Biochemical Journal*, *284*(1), 1–13. https://doi.org/10.1042/bj2840001
98. Brown, G. G., & Simpson, M. V. (1982). Novel features of animal mtDNA evolution as shown by sequences of two rat cytochrome oxidase subunit II genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *79*(10), 3246–3250. https://doi.org/10.1073/PNAS.79.10.3246
99. Brown, W. M., George, M., & Wilson, A. C. (1979). Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *76*(4), 1967–1971. https://doi.org/10.1073/PNAS.76.4.1967
100. Bullerwell, C. E., Forget, L., & Lang, B. F. (2003). Evolution of monoblepharidalean fungi based on complete mitochondrial genome sequences. *Nucleic Acids Research*, *31*(6), 1614–1623. https://doi.org/10.1093/nar/gkg264
101. Bullerwell, C. E., Leigh, J., Forget, L., & Lang, B. F. (2003). A comparison of three fission yeast mitochondrial genomes. *Nucleic Acids Research*, *31*(2), 759–768. https://doi.org/10.1093/nar/gkg134
102. Burger, G., Gray, M. W., Forget, L., & Lang, B. F. (2013). Strikingly bacteria-like and gene-rich mitochondrial genomes throughout jakobid protists. *Genome Biology and Evolution*, *5*(2), 418–438. https://doi.org/10.1093/gbe/evt008
103. Burton, R. S. (1986). Incorporation of14C-bicarbonate into the free amino acid pool during hyperosmotic stress in an intertidal copepod. *Journal of Experimental Zoology*, *238*(1), 55–61. https://doi.org/10.1002/jez.1402380107
104. Burton, R. S. (1990). HYBRID BREAKDOWN IN DEVELOPMENTAL TIME IN THE COPEPOD *TIGRIOPUS CALIFORNICUS*. *Evolution*, *44*(7), 1814–1822. https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.1990.tb05252.x
105. Burton, R. S., & Barreto, F. S. (2012). A disproportionate role for mtDNA in Dobzhansky-Muller incompatibilities? *Molecular Ecology*, *21*(20), 4942–4957. https://doi.org/10.1111/mec.12006
106. Burton, R. S., Ellison, C. K., & Harrison, J. S. (2006). The sorry state of F2 hybrids: consequences of rapid mitochondrial DNA evolution in allopatric populations. *The American Naturalist*, *168 Suppl 6*, S14-24. https://doi.org/10.1086/509046
107. Burton, R. S., Pereira, R. J., & Barreto, F. S. (2013). Cytonuclear Genomic Interactions and Hybrid Breakdown. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, *44*(1), 281–302. https://doi.org/10.1146/annurev-ecolsys-110512-135758
108. Butterfield, N. J. (2015). Early evolution of the Eukaryota. *Palaeontology*, *58*(1), 5–17. https://doi.org/10.1111/pala.12139
109. Caillol, M., Meunier, M., Mondain-Monval, M., & Simon, P. (1989). Seasonal variations in testis size, testosterone and LH basal levels, and pituitary response to luteinizing hormone releasing hormone in the brown hare, *Lepus europaeus*. *Canadian Journal of Zoology*, *67*(7), 1626–1630. https://doi.org/10.1139/z89-232
110. Calvo, S. E., & Mootha, V. K. (2010). The Mitochondrial Proteome and Human Disease. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*, *11*(1), 25–44. https://doi.org/10.1146/annurev-genom-082509-141720
111. Campbell, C. T., Kolesar, J. E., & Kaufman, B. A. (2012). Mitochondrial transcription factor A regulates mitochondrial transcription initiation, DNA packaging, and genome copy number. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms*, *1819*(9–10), 921–929. https://doi.org/10.1016/J.BBAGRM.2012.03.002

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/06/2024 15:10:58 EEST - 3.135.219.133

112. Camus, M. F., Clancy, D. J., & Dowling, D. K. (2012). Mitochondria, Maternal Inheritance, and Male Aging. *Current Biology*, *22*(18), 1717–1721. https://doi.org/10.1016/j.cub.2012.07.018
113. Cassard-Doulcier, A. M. (1993). Tissue-specific and beta-adrenergic regulation of the mitochondrial uncoupling protein gene: control by cis-acting elements in the 5'- flanking region. *Molecular Endocrinology*, *7*(4), 497–506. https://doi.org/10.1210/me.7.4.497
114. Castoe, T. A., Jiang, Z. J., Gu, W., Wang, Z. O., & Pollock, D. D. (2008). Adaptive Evolution and Functional Redesign of Core Metabolic Proteins in Snakes. *PLoS ONE*, *3*(5), e2201. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0002201
115. CAVALIER-SMITH, T. (1987). The Simultaneous Symbiotic Origin of Mitochondria, Chloroplasts, and Microbodies. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *503*(1 Endocytobiolo), 55–71. https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1987.tb40597.x
116. Cavalier-Smith, T. (1989). Molecular phylogeny. Archaebacteria and Archezoa. *Nature*, *339*(6220), l00-1. https://doi.org/10.1038/339100a0
117. Chacinska, A., Koehler, C. M., Milenkovic, D., Lithgow, T., & Pfanner, N. (2009). Importing Mitochondrial Proteins: Machineries and Mechanisms. *Cell*, *138*(4), 628–644. https://doi.org/10.1016/J.CELL.2009.08.005
118. Chen, Y.-C., Taylor, E. B., Dephoure, N., Heo, J.-M., Tonhato, A., Papandreou, I., … Rutter, J. (2012). Identification of a Protein Mediating Respiratory Supercomplex Stability. *Cell Metabolism*, *15*(3), 348–360. https://doi.org/10.1016/J.CMET.2012.02.006
119. Cheviron, Z. A., & Brumfield, R. T. (2012). Genomic insights into adaptation to high-altitude environments. *Heredity*, *108*(4), 354–361. https://doi.org/10.1038/hdy.2011.85
120. Chi, A., Li, H., Kang, C., Guo, H., Wang, Y., Guo, F., & Tang, L. (2015). Anti-fatigue activity of a novel polysaccharide conjugates from Ziyang green tea. *International Journal of Biological Macromolecules*, *80*, 566–572. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.06.055
121. Chou, J.-Y., & Leu, J.-Y. (2010). Speciation through cytonuclear incompatibility: Insights from yeast and implications for higher eukaryotes. *BioEssays*, *32*(5), 401–411. https://doi.org/10.1002/bies.200900162
122. Christian, B. E., & Spremulli, L. L. (2009). Evidence for an Active Role of IF3 $_{mt}$ in the Initiation of Translation in Mammalian Mitochondria †. *Biochemistry*, *48*(15), 3269–3278. https://doi.org/10.1021/bi8023493
123. Christian, B. E., & Spremulli, L. L. (2012). Mechanism of protein biosynthesis in mammalian mitochondria. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms*, *1819*(9–10), 1035–1054. https://doi.org/10.1016/J.BBAGRM.2011.11.009
124. Clancy, D. J. (2008). Variation in mitochondrial genotype has substantial lifespan effects which may be modulated by nuclear background. *Aging Cell*, *7*(6), 795–804. https://doi.org/10.1111/j.1474-9726.2008.00428.x
125. Claros, M. G., Perea, J., Shu, Y., Samatey, F. A., Popot, J.-L., & Jacq, C. (1995). Limitations to in vivo Import of Hydrophobic Proteins into Yeast Mitochondria. The Case of a Cytoplasmically Synthesized Apocytochrome b. *European Journal of Biochemistry*, *228*(3), 762–771. https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1995.0762m.x
126. Coenen, M. J. H., Antonicka, H., Ugalde, C., Sasarman, F., Rossi, R., Heister, J. G. A. M. A., … Smeitink, J. A. M. (2004). Mutant Mitochondrial Elongation Factor G1 and Combined Oxidative Phosphorylation Deficiency. *New England Journal of Medicine*, *351*(20), 2080–2086. https://doi.org/10.1056/NEJMoa041878
127. Cogliati, S., Enriquez, J. A., & Scorrano, L. (2016). Mitochondrial Cristae: Where Beauty Meets Functionality. *Trends in Biochemical Sciences*, *41*(3), 261–273. https://doi.org/10.1016/J.TIBS.2016.01.001
128. Collinson, I. R., Runs Wick, M. J., Buchanan, S. K., Fearnley, I. M., Skehel, J. M., Van Raaij, M. J., … Walker, J. E. (1994). *Membrane Domain of ATP Synthase from Bovine Heart Mitochondria: Purification, Subunit Composition, and Reconstitution with Fi-ATPase1*. *Biochemistry* (Vol. 33). Retrieved from https://pubs.acs.org/sharingguidelines
129. Cooper, S. J. B., Ibrahim, K. M., & Hewitt, G. M. (1995). Postglacial expansion and genome subdivision in the European grasshopper Chorthippus parallelus. *Molecular Ecology*, *4*(1), 49–60. https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.1995.tb00191.x
130. CORBET, G. B. (1986). Relationships and origins of the European lagomorphs. *Mammal Review*, *16*(3–4), 105–110. https://doi.org/10.1111/j.1365-2907.1986.tb00029.x

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/06/2024 15:10:58 EEST - 3.135.219.133

131. Cordero-Martínez, J., Aguirre-Alvarado, C., Wong, C., & Rodríguez-Páez, L. (2014). Effect of oxamic analogues on functional mice sperm parameters. *Systems Biology in Reproductive Medicine*, *60*(4), 189–198. https://doi.org/10.3109/19396368.2014.902144
132. Cotney, J., & Shadel, G. S. (2006). Evidence for an Early Gene Duplication Event in the Evolution of the Mitochondrial Transcription Factor B Family and Maintenance of rRNA Methyltransferase Activity in Human mtTFB1 and mtTFB2. *Journal of Molecular Evolution*, *63*(5), 707–717. https://doi.org/10.1007/s00239-006-0075-1
133. Cotton, J. A., & McInerney, J. O. (2010). Eukaryotic genes of archaebacterial origin are more important than the more numerous eubacterial genes, irrespective of function. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *107*(40), 17252–17255. https://doi.org/10.1073/pnas.1000265107
134. Covello, P. S., & Gray, M. W. (1992). Silent mitochondrial and active nuclear genes for subunit 2 of cytochrome c oxidase (cox2) in soybean: evidence for RNA-mediated gene transfer. *The EMBO Journal*, *11*(11), 3815–3820. https://doi.org/10.1002/J.1460-2075.1992.TB05473.X
135. Cox, C. J., Foster, P. G., Hirt, R. P., Harris, S. R., & Martin Embley, T. (2008). *The archaebacterial origin of eukaryotes*. Retrieved from www.pnas.orgcgidoi10.1073pnas.0810647105
136. Coyne, J. A. & Orr, H. A. 2004 Speciation. Sunderland, MA:
137. Crespi, B., & Nosil, P. (2013). Conflictual speciation: species formation via genomic conflict. *Trends in Ecology & Evolution*, *28*(1), 48–57. https://doi.org/10.1016/J.TREE.2012.08.015
138. CRESPI, B., & SCHWANDER, T. (2012). Asexual evolution: do intragenomic parasites maintain sex? *Molecular Ecology*, *21*(16), 3893–3895. https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2012.05638.x
139. Crofts, A. R. (2004). The Cytochrome bc_1 Complex: Function in the Context of Structure. *Annual Review of Physiology*, *66*(1), 689–733. https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.66.032102.150251
140. Cruz, R. S. de O., de Aguiar, R. A., Turnes, T., Penteado Dos Santos, R., Fernandes Mendes de Oliveira, M., & Caputo, F. (2012). Intracellular Shuttle: The Lactate Aerobic Metabolism. *The Scientific World Journal*, *2012*, 1–8. https://doi.org/10.1100/2012/420984
141. Cruzan, M. B., & Arnold, M. L. (1999). Consequences of cytonuclear epistasis and assortative mating for the genetic structure of hybrid populations. *Heredity*, *82*(1), 36–45. https://doi.org/10.1046/J.1365-2540.1999.00443.X
142. Cummins, J. (1998). Mitochondrial DNA in mammalian reproduction. *Reviews of Reproduction*, *3*(3), 172–182. https://doi.org/10.1530/ROR.0.0030172
143. Cummins, J. M. (2001). Epigenetic and experimental modifications in early mammalian development: Part I: Mitochondria: potential roles in embryogenesis and nucleocytoplasmic transfer. *Human Reproduction Update*, *7*(2), 217–228. https://doi.org/10.1093/humupd/7.2.217
144. Curgy, J. J. (1985). The mitoribosomes. *Biology of the Cell*, *54*(1), 1–38. https://doi.org/10.1111/j.1768-322X.1985.tb00377.x
145. da Fonseca, R. R., Johnson, W. E., O'Brien, S. J., Ramos, M., & Antunes, A. (2008). The adaptive evolution of the mammalian mitochondrial genome. *BMC Genomics*, *9*(1), 119. https://doi.org/10.1186/1471-2164-9-119
146. Daley, D. O., Clifton, R., & Whelan, J. (2002). Intracellular gene transfer: reduced hydrophobicity facilitates gene transfer for subunit 2 of cytochrome c oxidase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *99*(16), 10510–10515. https://doi.org/10.1073/pnas.122354399
147. Darr, C. R., Cortopassi, G. A., Datta, S., Varner, D. D., & Meyers, S. A. (2016). Mitochondrial oxygen consumption is a unique indicator of stallion spermatozoal health and varies with cryopreservation media. *Theriogenology*, *86*(5), 1382–1392. https://doi.org/10.1016/J.THERIOGENOLOGY.2016.04.082
148. Darr, CR., Cortopassi, GA., Datta, S., Varner DD., Meyers, SA. (2016).Mitochondrial oxygen consumption is a unique indicator of stallion spermatozoal health and varies with cryopreservation media. (2016). *Theriogenology*, *86*(5), 1382–1392. https://doi.org/10.1016/J.THERIOGENOLOGY.2016.04.082

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/06/2024 15:10:58 EEST - 3.135.219.133

149. DARWIN, C., 1859 On the Origin of Species. Harvard University Press, Cambridge, MA.
150. Das, J. (2006). The role of mitochondrial respiration in physiological and evolutionary adaptation. *BioEssays*, *28*(9), 890–901. https://doi.org/10.1002/bies.20463
151. de Bari, L., Valenti, D., Atlante, A., & Passarella, S. (2010). l -Lactate generates hydrogen peroxide in purified rat liver mitochondria due to the putative l -lactate oxidase localized in the intermembrane space. *FEBS Letters*, *584*(11), 2285–2290. https://doi.org/10.1016/j.febslet.2010.03.038
152. de la Cruz, V. F., Lake, J. A., Simpson, A. M., Simpson, L., & Agrawal, R. K. (1985). A minimal ribosomal RNA: sequence and secondary structure of the 9S kinetoplast ribosomal RNA from Leishmania tarentolae. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *82*(5), 1401–1405. https://doi.org/10.1073/pnas.82.5.1401
153. De Meirleir, L., Seneca, S., Lissens, W., De Clercq, I., Eyskens, F., Gerlo, E., … Van Coster, R. (2004). Respiratory chain complex V deficiency due to a mutation in the assembly gene ATP12. *Journal of Medical Genetics*, *41*(2), 120–124. https://doi.org/10.1136/JMG.2003.012047
154. de Paula, W. B. M., Lucas, C. H., Agip, A.-N. A., Vizcay-Barrena, G., & Allen, J. F. (2013). Energy, ageing, fidelity and sex: oocyte mitochondrial DNA as a protected genetic template. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, *368*(1622), 20120263. https://doi.org/10.1098/rstb.2012.0263
155. De Stefani, D., Raffaello, A., Teardo, E., Szabò, I., & Rizzuto, R. (2011). A forty-kilodalton protein of the inner membrane is the mitochondrial calcium uniporter. *Nature*, *476*(7360), 336–340. https://doi.org/10.1038/nature10230
156. Dean, R., Zimmer, F., & Mank, J. E. (2014). The Potential Role of Sexual Conflict and Sexual Selection in Shaping the Genomic Distribution of Mito-nuclear Genes. *Genome Biology and Evolution*, *6*(5), 1096–1104. https://doi.org/10.1093/gbe/evu063
157. Decatur, W. A., & Fournier, M. J. (2002). rRNA modifications and ribosome function. *Trends in Biochemical Sciences*, *27*(7), 344–351. https://doi.org/10.1016/S0968-0004(02)02109-6
158. Demonacos, C. V., Karayanni, N., Hatzoglou, E., Tsiriyiotis, C., Spandidos, D. A., & Sekeris, C. E. (1996). Mitochondrial genes as sites of primary action of steroid hormones. *Steroids*, *61*(4), 226–232. https://doi.org/10.1016/0039-128X(96)00019-0
159. Demuth, J. P., & Wade, M. J. (2007). POPULATION DIFFERENTIATION IN THE BEETLE TRIBOLIUM CASTANEUM. II. HALDANE'S RULE AND INCIPIENT SPECIATION. *Evolution*, *61*(3), 694–699. https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.2007.00049.x
160. Denver, D. R., Morris, K., Lynch, M., Vassilieva, L. L., & Thomas, W. K. (2000). High direct estimate of the mutation rate in the mitochondrial genome of Caenorhabditis elegans. *Science (New York, N.Y.)*, *289*(5488), 2342–2344. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11009418
161. Dey, R., Barrientos, A., & Moraes, C. T. (2000). Functional constraints of nuclear-mitochondrial DNA interactions in xenomitochondrial rodent cell lines. *The Journal of Biological Chemistry*, *275*(40), 31520–31527. https://doi.org/10.1074/jbc.M004053200
162. Diaz, F., Enríquez, J. A., & Moraes, C. T. (2012). Cells lacking Rieske iron-sulfur protein have a reactive oxygen species-associated decrease in respiratory complexes I and IV. *Molecular and Cellular Biology*, *32*(2), 415–429. https://doi.org/10.1128/MCB.06051-11
163. Diaz, F., Fukui, H., Garcia, S., & Moraes, C. T. (2006). Cytochrome c Oxidase Is Required for the Assembly/Stability of Respiratory Complex I in Mouse Fibroblasts. *Molecular and Cellular Biology*, *26*(13), 4872–4881. https://doi.org/10.1128/MCB.01767-05
164. Díez-Sánchez, C., Ruiz-Pesini, E., Lapeña, A. C., Montoya, J., Pérez-Martos, A., Enríquez, J. A., & López-Pérez, M. J. (2003). Mitochondrial DNA Content of Human Spermatozoa1. *Biology of Reproduction*, *68*(1), 180–185. https://doi.org/10.1095/biolreprod.102.005140
165. Djan, M., Stefanović, M., Veličković, N., Lavadinović, V., Alves, P. C., & Suchentrunk, F. (2017). Brown hares (Lepus europaeus Pallas, 1778) from the Balkans: a refined phylogeographic model. *Hystrix, the Italian Journal of Mammalogy*, *28*(2), 186–193. https://doi.org/10.4404/hystrix-28.2-12202
166. Dobzhansky, T. (1937). Genetic Nature of Species Differences. *The American Naturalist*, *71*(735), 404–420. https://doi.org/10.1086/280726

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/06/2024 15:10:58 EEST - 3.135.219.133

167. DOBZHANSKY, T. (1946). Genetics of natural populations; recombination and variability in populations of Drosophila pseudoobscura. *Genetics*, *31*(3), 269–290. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20985721
168. Doolittle, W. F. (2014). How Natural a Kind Is "Eukaryote?" *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, *6*(6), a015974–a015974. https://doi.org/10.1101/cshperspect.a015974
169. Doolittle, W. F., Brunet, T. D. P., Linquist, S., & Gregory, T. R. (2014). Distinguishing between Function & Effect in Genome Biology. *Genome Biology and Evolution*, *6*(5), 1234–1237. https://doi.org/10.1093/gbe/evu098
170. Đorđević, M., Stojković, B., Savković, U., Immonen, E., Tucić, N., Lazarević, J., & Arnqvist, G. (2017). Sex-specific mitonuclear epistasis and the evolution of mitochondrial bioenergetics, ageing, and life history in seed beetles. *Evolution*, *71*(2), 274–288. https://doi.org/10.1111/evo.13109
171. Dowling, D. K., & Simmons, L. W. (2009). Reactive oxygen species as universal constraints in life-history evolution. *Proceedings. Biological Sciences*, *276*(1663), 1737–1745. https://doi.org/10.1098/rspb.2008.1791
172. Dowling, D. K., Friberg, U., & Lindell, J. (2008). Evolutionary implications of non-neutral mitochondrial genetic variation. *Trends in Ecology & Evolution*, *23*(10), 546–554. https://doi.org/10.1016/J.TREE.2008.05.011
173. DOWLING, D. K., NOWOSTAWSKI, A. L., & ARNQVIST, G. (2007). Effects of cytoplasmic genes on sperm viability and sperm morphology in a seed beetle: implications for sperm competition theory? *Journal of Evolutionary Biology*, *20*(1), 358–368. https://doi.org/10.1111/j.1420-9101.2006.01189.x
174. Drown, D. M., Preuss, K. M., & Wade, M. J. (2012). Evidence of a Paucity of Genes That Interact with the Mitochondrion on the X in Mammals. *Genome Biology and Evolution*, *4*(8), 875–880. https://doi.org/10.1093/gbe/evs064
175. Du Plessis, S. S., Agarwal, A., Halabi, J., & Tvrda, E. (2015). Contemporary evidence on the physiological role of reactive oxygen species in human sperm function. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, *32*(4), 509–520. https://doi.org/10.1007/s10815-014-0425-7
176. DUBEY, S., COSSON, J.-F., MAGNANOU, E., VOHRALÍK, V., BENDA, P., FRYNTA, D., … VOGEL, P. (2007). Mediterranean populations of the lesser white-toothed shrew (Crocidura suaveolens group): an unexpected puzzle of Pleistocene survivors and prehistoric introductions. *Molecular Ecology*, *16*(16), 3438–3452. https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2007.03396.x
177. Dubey, S., Zaitsev, M., Cosson, J.-F., Abdukadier, A., & Vogel, P. (2006). Pliocene and Pleistocene diversification and multiple refugia in a Eurasian shrew (Crocidura suaveolens group). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, *38*(3), 635–647. https://doi.org/10.1016/J.YMPEV.2005.11.005
178. Duchen, M. R. (1992). Ca(2+)-dependent changes in the mitochondrial energetics in single dissociated mouse sensory neurons. *The Biochemical Journal*, *283 (Pt 1)*(1), 41–50. https://doi.org/10.1042/BJ2830041
179. Edmands, S. (1999). HETEROSIS AND OUTBREEDING DEPRESSION IN INTERPOPULATION CROSSES SPANNING A WIDE RANGE OF DIVERGENCE. *Evolution*, *53*(6), 1757–1768. https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.1999.tb04560.x
180. Ellison, C. K., & Burton, R. S. (2006). DISRUPTION OF MITOCHONDRIAL FUNCTION IN INTERPOPULATION HYBRIDS OF TIGRIOPUS CALIFORNICUS. *Evolution*, *60*(7), 1382–1391. https://doi.org/10.1111/j.0014-3820.2006.tb01217.x
181. Ellison, C. K., & Burton, R. S. (2008). INTERPOPULATION HYBRID BREAKDOWN MAPS TO THE MITOCHONDRIAL GENOME. *Evolution*, *62*(3), 631–638. https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.2007.00305.x
182. ELLISON, C. K., & BURTON, R. S. (2010). Cytonuclear conflict in interpopulation hybrids: the role of RNA polymerase in mtDNA transcription and replication. *Journal of Evolutionary Biology*, *23*(3), 528–538. https://doi.org/10.1111/j.1420-9101.2009.01917.x
183. ELLISON, C. K., NIEHUIS, O., & GADAU, J. (2008). Hybrid breakdown and mitochondrial dysfunction in hybrids of Nasonia parasitoid wasps. *Journal of Evolutionary Biology*, *21*(6), 1844–1851. https://doi.org/10.1111/j.1420-9101.2008.01608.x

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/06/2024 15:10:58 EEST - 3.135.219.133

184. Elmquist, J. K., Elias, C. F., & Saper, C. B. (1999). From Lesions to Leptin. *Neuron*, *22*(2), 221–232. https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)81084-3
185. Elustondo, P. A., White, A. E., Hughes, M. E., Brebner, K., Pavlov, E., & Kane, D. A. (2013). Physical and Functional Association of Lactate Dehydrogenase (LDH) with Skeletal Muscle Mitochondria. *Journal of Biological Chemistry*, *288*(35), 25309–25317. https://doi.org/10.1074/jbc.M113.476648
186. Embley, T. M. (2006). Multiple secondary origins of the anaerobic lifestyle in eukaryotes. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, *361*(1470), 1055–1067. https://doi.org/10.1098/rstb.2006.1844
187. Embley, T. M., & Martin, W. (2006). Eukaryotic evolution, changes and challenges. *Nature*, *440*(7084), 623–630. https://doi.org/10.1038/nature04546
188. Eme, L., Gentekaki, E., Curtis, B., Archibald, J. M., & Roger, A. J. (2017). Lateral Gene Transfer in the Adaptation of the Anaerobic Parasite Blastocystis to the Gut. *Current Biology*, *27*(6), 807–820. https://doi.org/10.1016/j.cub.2017.02.003
189. Eme, L., Sharpe, S. C., Brown, M. W., & Roger, A. J. (2014). On the age of eukaryotes: evaluating evidence from fossils and molecular clocks. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, *6*(8), a016139. https://doi.org/10.1101/cshperspect.a016139
190. Eme, L., Spang, A., Lombard, J., Stairs, C. W., & Ettema, T. J. G. (2017). Archaea and the origin of eukaryotes. *Nature Reviews Microbiology*, *15*(12), 711–723. https://doi.org/10.1038/nrmicro.2017.133
191. Enerbäck, S., Jacobsson, A., Simpson, E. M., Guerra, C., Yamashita, H., Harper, M.-E., & Kozak, L. P. (1997). Mice lacking mitochondrial uncoupling protein are cold-sensitive but not obese. *Nature*, *387*(6628), 90–94. https://doi.org/10.1038/387090a0
192. Engqvist, M., Drincovich, M. F., Flügge, U.-I., & Maurino, V. G. (2009). Two d-2-Hydroxy-acid Dehydrogenases in *Arabidopsis thaliana* with Catalytic Capacities to Participate in the Last Reactions of the Methylglyoxal and β-Oxidation Pathways. *Journal of Biological Chemistry*, *284*(37), 25026–25037. https://doi.org/10.1074/jbc.M109.021253
193. Enríquez, J. A. (2016). Supramolecular Organization of Respiratory Complexes. *Annual Review of Physiology*, *78*(1), 533–561. https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-021115-105031
194. Entelis, N. S., Kolesnikova, O. A., Dogan, S., Martin, R. P., & Tarassov, I. A. (2001). 5 S rRNA and tRNA import into human mitochondria. Comparison of in vitro requirements. *The Journal of Biological Chemistry*, *276*(49), 45642–45653. https://doi.org/10.1074/jbc.M103906200
195. Ettema, T. J. G., Lindås, A.-C., & Bernander, R. (2011). An actin-based cytoskeleton in archaea. *Molecular Microbiology*, *80*(4), 1052–1061. https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2011.07635.x
196. Etterson, J. R., Keller, S. R., & Galloway, L. F. (2007). EPISTATIC AND CYTONUCLEAR INTERACTIONS GOVERN OUTBREEDING DEPRESSION IN THE AUTOTETRAPLOID CAMPANULASTRUM AMERICANUM. *Evolution*, *61*(11), 2671–2683. https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.2007.00234.x
197. Eyo Hunter, S., & Spremulli, L. L. (2004). Interaction of mitochondrial elongation factor Tu with aminoacyl-tRNAs. *Mitochondrion*, *4*(1), 21–29. https://doi.org/10.1016/J.MITO.2004.04.003
198. Falkenberg, M., Gaspari, M., Rantanen, A., Trifunovic, A., Larsson, N.-G., & Gustafsson, C. M. (2002). Mitochondrial transcription factors B1 and B2 activate transcription of human mtDNA. *Nature Genetics*, *31*(3), 289–294. https://doi.org/10.1038/ng909
199. Fan, L., Kim, S., Farr, C. L., Schaefer, K. T., Randolph, K. M., Tainer, J. A., & Kaguni, L. S. (2006). A Novel Processive Mechanism for DNA Synthesis Revealed by Structure, Modeling and Mutagenesis of the Accessory Subunit of Human Mitochondrial DNA Polymerase. *Journal of Molecular Biology*, *358*(5), 1229–1243. https://doi.org/10.1016/j.jmb.2006.02.073
200. Fan, W., Waymire, K. G., Narula, N., Li, P., Rocher, C., Coskun, P. E., … Wallace, D. C. (2008). A mouse model of mitochondrial disease reveals germline selection against severe mtDNA mutations. *Science (New York, N.Y.)*, *319*(5865), 958–962. https://doi.org/10.1126/science.1147786

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/06/2024 15:10:58 EEST - 3.135.219.133

201. Fangue, N. A., Richards, J. G., & Schulte, P. M. (2009). Do mitochondrial properties explain intraspecific variation in thermal tolerance? *Journal of Experimental Biology*, *212*(4), 514–522. https://doi.org/10.1242/jeb.024034
202. Faubert, B., Li, K. Y., Cai, L., Hensley, C. T., Kim, J., Zacharias, L. G., … DeBerardinis, R. J. (2017). Lactate Metabolism in Human Lung Tumors. *Cell*, *171*(2), 358–371.e9. https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.09.019
203. Feagin, J. E. (1994). The Extrachromosomal DNAs of Apicomplexan Parasites. *Annual Review of Microbiology*, *48*(1), 81–104. https://doi.org/10.1146/annurev.mi.48.100194.000501
204. Ferguson, B. S., Rogatzki, M. J., Goodwin, M. L., Kane, D. A., Rightmire, Z., & Gladden, L. B. (2018). Lactate metabolism: historical context, prior misinterpretations, and current understanding. *European Journal of Applied Physiology*, *118*(4), 691–728. https://doi.org/10.1007/s00421-017-3795-6
205. Ferguson, S. J. (2010). ATP synthase: from sequence to ring size to the P/O ratio. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *107*(39), 16755–16756. https://doi.org/10.1073/pnas.1012260107
206. Fernández-Silva, P., Enriquez, J. A., & Montoya, J. (2003). Replication and Transcription of Mammalian Mitochondrial Dna. *Experimental Physiology*, *88*(1), 41–56. https://doi.org/10.1113/eph8802514
207. Ferramosca, A., & Zara, V. (2014). Bioenergetics of Mammalian Sperm Capacitation. *BioMed Research International*, *2014*, 1–8. https://doi.org/10.1155/2014/902953
208. Ferramosca, A., & Zara, V. (2014). Bioenergetics of mammalian sperm capacitation. *BioMed Research International*, *2014*, 902953. https://doi.org/10.1155/2014/902953
209. Ferramosca, A., Provenzano, S. P., Coppola, L., & Zara, V. (2012). Mitochondrial Respiratory Efficiency is Positively Correlated With Human Sperm Motility. *Urology*, *79*(4), 809–814. https://doi.org/10.1016/J.UROLOGY.2011.12.042
210. Ferramosca, A., Provenzano, SP., Coppola, L., Zara, V. (2012).Mitochondrial Respiratory Efficiency is Positively Correlated With Human Sperm Motility. *Urology*, *79*(4), 809–814. https://doi.org/10.1016/J.UROLOGY.2011.12.042
211. Filippucci, M. G. (n.d.). Allozyme variation and divergence in Erinaceidae (Mammalia, Insectivora). *Israel Journal …*. Retrieved from http://www.academia.edu/26108145/Allozyme_variation_and_divergence_in_Erinaceidae_Mammalia_Insectivora_
212. Fischer, R. (1930). *The Genetical Theory Of Natural Selection. At the Clarendon Press*
213. Fishman, L., & Willis, J. H. (2006). A CYTONUCLEAR INCOMPATIBILITY CAUSES ANTHER STERILITY IN *MIMULUS* HYBRIDS. *Evolution*, *60*(7), 1372–1381. https://doi.org/10.1111/j.0014-3820.2006.tb01216.x
214. Fiume, L., Manerba, M., Vettraino, M., & Di Stefano, G. (2014). Inhibition of lactate dehydrogenase activity as an approach to cancer therapy. *Future Medicinal Chemistry*, *6*(4), 429–445. https://doi.org/10.4155/fmc.13.206
215. Foellmi-Adams, L. A., Wyse, B. M., Herron, D., Nedergaard, J., & Kletzien, R. F. (1996). Induction of uncoupling protein in brown adipose tissue. *Biochemical Pharmacology*, *52*(5), 693–701. https://doi.org/10.1016/0006-2952(96)00345-0
216. Foley, B. R., Rose, C. G., Rundle, D. E., Leong, W., & Edmands, S. (2013). Postzygotic isolation involves strong mitochondrial and sex-specific effects in Tigriopus californicus, a species lacking heteromorphic sex chromosomes. *Heredity*, *111*(5), 391–401. https://doi.org/10.1038/hdy.2013.61
217. Folsch, H., Gaume, B., Brunner, M., Neupert, W., & Stuart, R. A. (1998). C- to N-terminal translocation of preproteins into mitochondria. *The EMBO Journal*, *17*(22), 6508–6515. https://doi.org/10.1093/emboj/17.22.6508
218. Forner, F., Foster, L. J., Campanaro, S., Valle, G., & Mann, M. (2006). Quantitative proteomic comparison of rat mitochondria from muscle, heart, and liver. *Molecular & Cellular Proteomics : MCP*, *5*(4), 608–619. https://doi.org/10.1074/mcp.M500298-MCP200
219. Foster, P. G., Cox, C. J., & Martin Embley, T. (2009). The primary divisions of life: a phylogenomic approach employing composition-heterogeneous methods. Philos Trans R Soc R Lond B Biol Sci. 364(1527).https://doi.org/10.1098/rstb.2009.0034

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/06/2024 15:10:58 EEST - 3.135.219.133

220. Frank, S. A., & Hurst, L. D. (1996). Mitochondria and male disease. *Nature*, *383*(6597), 224–224. https://doi.org/10.1038/383224a0
221. Fraser, C. M., Gocayne, J. D., White, O., Adams, M. D., Clayton, R. A., Fleischmann, R. D., … Venter, J. C. (1995). The minimal gene complement of Mycoplasma genitalium. *Science (New York, N.Y.)*, *270*(5235), 397–403. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7569993
222. Frederich, M., & Pörtner, H. O. (2000). Oxygen limitation of thermal tolerance defined by cardiac and ventilatory performance in spider crab, *Maja squinado*. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, *279*(5), R1531–R1538. https://doi.org/10.1152/ajpregu.2000.279.5.R1531
223. Freeman, B. G., & Montgomery, G. (2016). Interspecific aggression by the Swainson's Thrush (*Catharus ustulatus*) may limit the distribution of the threatened Bicknell's Thrush (*Catharus bicknelli*) in the Adirondack Mountains. *The Condor*, *118*(1), 169–178. https://doi.org/10.1650/CONDOR-15-145.1
224. Freeman, B. G., & Montgomery, G. A. (2017). Using song playback experiments to measure species recognition between geographically isolated populations: A comparison with acoustic trait analyses. *The Auk*, *134*(4), 857–870. https://doi.org/10.1642/AUK-17-63.1
225. Frenzel, B. (1992). Atlas of paleoclimates and paleoenvironments of the northern hemisphere. *EPIC3Geographical Research Institute, Hungarian Academy of SCiences, Budapest, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart Jena New York., Bremerhaven, PANGAEA*. Retrieved from http://epic.awi.de/29922/
226. Froman, D. P., & Kirby, J. D. (2005). Sperm Mobility: Phenotype in Roosters (Gallus domesticus) Determined by Mitochondrial Function1. *Biology of Reproduction*, *72*(3), 562–567. https://doi.org/10.1095/biolreprod.104.035113
227. Funes, S., Davidson, E., Claros, M. G., van Lis, R., Pérez-Martínez, X., Vázquez-Acevedo, M., … González-Halphen, D. (2002). The typically mitochondrial DNA-encoded ATP6 subunit of the F1F0-ATPase is encoded by a nuclear gene in Chlamydomonas reinhardtii. *The Journal of Biological Chemistry*, *277*(8), 6051–6058. https://doi.org/10.1074/jbc.M109993200
228. Fung, S., Nishimura, T., Sasarman, F., & Shoubridge, E. A. (2013). The conserved interaction of C7orf30 with MRPL14 promotes biogenesis of the mitochondrial large ribosomal subunit and mitochondrial translation. *Molecular Biology of the Cell*, *24*(3), 184–193. https://doi.org/10.1091/mbc.e12-09-0651
229. Gabaldón, T., & Huynen, M. A. (2004). Shaping the mitochondrial proteome. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, *1659*(2–3), 212–220. https://doi.org/10.1016/J.BBABIO.2004.07.011
230. GALLON, F., MARCHETTI, C., JOUY, N., & MARCHETTI, P. (2006). The functionality of mitochondria differentiates human spermatozoa with high and low fertilizing capability. *Fertility and Sterility*, *86*(5), 1526–1530. https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2006.03.055
231. Galloway, L. F., & Fenster, C. B. (2007). NUCLEAR AND CYTOPLASMIC CONTRIBUTIONS TO INTRASPECIFIC DIVERGENCE IN AN ANNUAL LEGUME. *Evolution*, *55*(3), 488–497. https://doi.org/10.1111/j.0014-3820.2001.tb00783.x
232. GALTIER, N., NABHOLZ, B., GLÉMIN, S., & HURST, G. D. D. (2009). Mitochondrial DNA as a marker of molecular diversity: a reappraisal. *Molecular Ecology*, *18*(22), 4541–4550. https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2009.04380.x
233. Garcia-Alvarez, M., Marik, P., & Bellomo, R. (2014). Stress hyperlactataemia: present understanding and controversy. *The Lancet Diabetes & Endocrinology*, *2*(4), 339–347. https://doi.org/10.1016/S2213-8587(13)70154-2
234. Garrido, N., Griparic, L., Jokitalo, E., Wartiovaara, J., van der Bliek, A. M., & Spelbrink, J. N. (2003). Composition and Dynamics of Human Mitochondrial Nucleoids. *Molecular Biology of the Cell*, *14*(4), 1583–1596. https://doi.org/10.1091/mbc.e02-07-0399
235. Garvin, M. R., Bielawski, J. P., Sazanov, L. A., & Gharrett, A. J. (2015). Review and meta-analysis of natural selection in mitochondrial complex I in metazoans. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*, *53*(1), 1–17. https://doi.org/10.1111/jzs.12079
236. Gaspari, M., Falkenberg, M., Larsson, N.-G., & Gustafsson, C. M. (2004). The mitochondrial RNA polymerase contributes critically to promoter specificity in mammalian cells. *The EMBO Journal*, *23*(23), 4606–4614. https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600465

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/06/2024 15:10:58 EEST - 3.135.219.133

237. Gaur, R., Grasso, D., Datta, P. P., Krishna, P. D. V., Das, G., Spencer, A., … Varshney, U. (2008). A Single Mammalian Mitochondrial Translation Initiation Factor Functionally Replaces Two Bacterial Factors. *Molecular Cell*, *29*(2), 180–190. https://doi.org/10.1016/J.MOLCEL.2007.11.021
238. Gemmell, N. J., Metcalf, V. J., & Allendorf, F. W. (2004). Mother's curse: the effect of mtDNA on individual fitness and population viability. *Trends in Ecology & Evolution*, *19*(5), 238–244. https://doi.org/10.1016/J.TREE.2004.02.002
239. Gene flow and species delimitation. (2009). *Trends in Ecology & Evolution*, *24*(7), 386–393. https://doi.org/10.1016/J.TREE.2009.02.011
240. Gerber, A. S., Loggins, R., Kumar, S., & Dowling, T. E. (2001). Does Nonneutral Evolution Shape Observed Patterns of DNA Variation in Animal Mitochondrial Genomes? *Annual Review of Genetics*, *35*(1), 539–566. https://doi.org/10.1146/annurev.genet.35.102401.091106
241. Gershoni, M., Fuchs, A., Shani, N., Fridman, Y., Corral-Debrinski, M., Aharoni, A., … Mishmar, D. (2010). Coevolution Predicts Direct Interactions between mtDNA-Encoded and nDNA-Encoded Subunits of Oxidative Phosphorylation Complex I. *Journal of Molecular Biology*, *404*(1), 158–171. https://doi.org/10.1016/J.JMB.2010.09.029
242. Gershoni, M., Templeton, A. R., & Mishmar, D. (2009). Mitochondrial bioenergetics as a major motive force of speciation. *BioEssays*, *31*(6), 642–650. https://doi.org/10.1002/bies.200800139
243. Giannattasio, S., Guaragnella, N., Arbini, A. A., & Moro, L. (2013). Stress-Related Mitochondrial Components and Mitochondrial Genome as Targets of Anticancer Therapy. *Chemical Biology & Drug Design*, *81*(1), 102–112. https://doi.org/10.1111/cbdd.12057
244. Gibb, Z., Lambourne, S. R., & Aitken, R. J. (2014). The Paradoxical Relationship Between Stallion Fertility and Oxidative Stress1. *Biology of Reproduction*, *91*(3), 77. https://doi.org/10.1095/biolreprod.114.118539
245. Gibson, J. D., Niehuis, O., Peirson, B. R. E., Cash, E. I., & Gadau, J. (2013). GENETIC AND DEVELOPMENTAL BASIS OF F_2 HYBRID BREAKDOWN IN *NASONIA* PARASITOID WASPS. *Evolution*, *67*(7), 2124–2132. https://doi.org/10.1111/evo.12080
246. Glover, K. E., Spencer, D. F., & Gray, M. W. (2001). Identification and structural characterization of nucleus-encoded transfer RNAs imported into wheat mitochondria. *The Journal of Biological Chemistry*, *276*(1), 639–648. https://doi.org/10.1074/jbc.M007708200
247. Grau-Bové, X., Sebé-Pedrós, A., & Ruiz-Trillo, I. (2015). The Eukaryotic Ancestor Had a Complex Ubiquitin Signaling System of Archaeal Origin. *Molecular Biology and Evolution*, *32*(3), 726–739. https://doi.org/10.1093/molbev/msu334
248. Gray MW, Schnare MN. 1996. Evolution of rRNA gene organization, in Ribosomal RNA Structure, Evolution, Processing, and Function in Protein Biosynthesis (eds R.A. Zimmerman, and A.E. Dahlberg), CRC Press, Boca Raton FL. pp49–69.
249. Gray MW, Spencer DF 1996. Organellar evolution. In Evolution of microbial life (ed. Roberts D, et al.), pp. 109–126 Cambridge University Press, Cambridge
250. Gray, M. W. (1988). Organelle origins and ribosomal RNA. *Biochemistry and Cell Biology = Biochimie et Biologie Cellulaire*, *66*(5), 325–348.
251. Gray, M. W. (1992). The Endosymbiont Hypothesis Revisited. *International Review of Cytology*, *141*, 233–357. https://doi.org/10.1016/S0074-7696(08)62068-9
252. Gray, M. W. (1999). Evolution of organellar genomes. *Current Opinion in Genetics & Development*, *9*(6), 678–687. https://doi.org/10.1016/S0959-437X(99)00030-1
253. Gray, M. W. (2012). Mitochondrial Evolution. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, *4*(9), a011403–a011403. https://doi.org/10.1101/cshperspect.a011403
254. Gray, M., Lang, B. F., Cedergren, R., Golding, G. B., Lemieux, C., Sankoff, D., … Burger, G. (1998). Genome structure and gene content in protist mitochondrial DNAs. *Nucleic Acids Research*, *26*(4), 865–878. https://doi.org/10.1093/nar/26.4.865
255. Gray,MW. (1999). Evolution of organellar genomes Gray . Curr Opin Genet Dev. 9(6):678-87
256. Gredilla, R. (2010). DNA damage and base excision repair in mitochondria and their role in aging. *Journal of Aging Research*, *2011*, 257093. https://doi.org/10.4061/2011/257093

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/06/2024 15:10:58 EEST - 3.135.219.133

257. Green, D. R., Reed, J. C., Gu, J., Dawson, M. I., Cao, X., Hobbs, P. D., … Zhang, X. (1998). Mitochondria and apoptosis. *Science (New York, N.Y.)*, *281*(5381), 1309–1312. https://doi.org/10.1126/science.281.5381.1309
258. Greggio, C., Jha, P., Kulkarni, S. S., Lagarrigue, S., Broskey, N. T., Boutant, M., … Amati, F. (2017). Enhanced Respiratory Chain Supercomplex Formation in Response to Exercise in Human Skeletal Muscle. *Cell Metabolism*, *25*(2), 301–311. https://doi.org/10.1016/J.CMET.2016.11.004
259. GREGORY, T. R. (2005). Genome Size Evolution in Animals. *The Evolution of the Genome*, 3–87. https://doi.org/10.1016/B978-012301463-4/50003-6
260. GREINER, S., RAUWOLF, U., MEURER, J., & HERRMANN, R. G. (2011). The role of plastids in plant speciation. *Molecular Ecology*, *20*(4), 671–691. https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2010.04984.x
261. Gribaldo, S., Poole, A. M., Daubin, V., Forterre, P., & Brochier-Armanet, C. (2010). The origin of eukaryotes and their relationship with the Archaea: are we at a phylogenomic impasse? *Nature Reviews Microbiology*, *8*(10), 743–752. https://doi.org/10.1038/nrmicro2426
262. Grossman, L. I., & Lomax, M. I. (1997). Nuclear genes for cytochrome c oxidase. *Biochimica et Biophysica Acta*, *1352*(2), 174–192. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9199249
263. Guaragnella, N., Giannattasio, S., & Moro, L. (2014). Mitochondrial dysfunction in cancer chemoresistance. *Biochemical Pharmacology*, *92*(1), 62–72. https://doi.org/10.1016/j.bcp.2014.07.027
264. Guerra, C., Koza, R. A., Yamashita, H., Walsh, K., & Kozak, L. P. (1998). Emergence of brown adipocytes in white fat in mice is under genetic control. Effects on body weight and adiposity. *Journal of Clinical Investigation*, *102*(2), 412–420. https://doi.org/10.1172/JCI3155
265. Gugneja, S., Virbasius, C. M., & Scarpulla, R. C. (1996). Nuclear respiratory factors 1 and 2 utilize similar glutamine-containing clusters of hydrophobic residues to activate transcription. *Molecular and Cellular Biology*, *16*(10), 5708–5716. https://doi.org/10.1128/MCB.16.10.5708
266. Gupte, S., Wu, E. S., Hoechli, L., Hoechli, M., Jacobson, K., Sowers, A. E., & Hackenbrock, C. R. (1984). Relationship between lateral diffusion, collision frequency, and electron transfer of mitochondrial inner membrane oxidation-reduction components. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *81*(9), 2606–2610. https://doi.org/10.1073/pnas.81.9.2606
267. Gustilo, E. M., Vendeix, F. A., & Agris, P. F. (2008). tRNA's modifications bring order to gene expression. *Current Opinion in Microbiology*, *11*(2), 134–140. https://doi.org/10.1016/J.MIB.2008.02.003
268. Guy, L., & Ettema, T. J. G. (2011). The archaeal 'TACK' superphylum and the origin of eukaryotes. *Trends in Microbiology*, *19*(12), 580–587. https://doi.org/10.1016/J.TIM.2011.09.002
269. Gyllensten, U., Wharton, D., Josefsson, A., & Wilson, A. C. (1991). Paternal inheritance of mitochondrial DNA in mice. *Nature*, *352*(6332), 255–257. https://doi.org/10.1038/352255a0
270. H., P. (2001). Climate change and temperature-dependent biogeography: oxygen limitation of thermal tolerance in animals. *Naturwissenschaften*, *88*(4), 137–146. https://doi.org/10.1007/s001140100216
271. Hadjivasiliou, Z., Lane, N., Seymour, R. M., & Pomiankowski, A. (2013). Dynamics of mitochondrial inheritance in the evolution of binary mating types and two sexes. *Proceedings. Biological Sciences*, *280*(1769), 20131920. https://doi.org/10.1098/rspb.2013.1920
272. Hadjivasiliou, Z., Pomiankowski, A., Seymour, R. M., & Lane, N. (2012). Selection for mitonuclear co-adaptation could favour the evolution of two sexes. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, *279*(1734), 1865–1872. https://doi.org/10.1098/rspb.2011.1871
273. Hägerhäll, C., & Hederstedt, L. (1996). A structural moDAl for the membrane-integral domain of succinate:quinone oxidoreductases. *FEBS Letters*, *389*(1), 25–31. https://doi.org/10.1016/0014-5793(96)00529-7

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/06/2024 15:10:58 EEST - 3.135.219.133

274. Hahn, M. W. (2008). TOWARD A SELECTION THEORY OF MOLECULAR EVOLUTION. *Evolution*, *62*(2), 255–265. https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.2007.00308.x
275. Hanson, M. R., & Folkerts, O. (1992). Structure and Function of the Higher Plant Mitochondrial Genome. *International Review of Cytology*, *141*, 129–172. https://doi.org/10.1016/S0074-7696(08)62065-3
276. HARMAN, D. (1972). The Biologic Clock: The Mitochondria? *Journal of the American Geriatrics Society*, *20*(4), 145–147. https://doi.org/10.1111/j.1532-5415.1972.tb00787.x
277. Hartman, H., & Fedorov, A. (2002). The origin of the eukaryotic cell: a genomic investigation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *99*(3), 1420–1425. https://doi.org/10.1073/pnas.032658599
278. Hassanin, A., Léger, N., Deutsch, J., & Collins, T. (2005). Evidence for Multiple Reversals of Asymmetric Mutational Constraints during the Evolution of the Mitochondrial Genome of Metazoa, and Consequences for Phylogenetic Inferences. *Systematic Biology*, *54*(2), 277–298. https://doi.org/10.1080/10635150590947843
279. Havird, J. C., & Sloan, D. B. (2016). The Roles of Mutation, Selection, and Expression in Determining Relative Rates of Evolution in Mitochondrial versus Nuclear Genomes. *Molecular Biology and Evolution*, *33*(12), 3042–3053. https://doi.org/10.1093/molbev/msw185
280. Havird, J. C., Hall, M. D., & Dowling, D. K. (2015). The evolution of sex: A new hypothesis based on mitochondrial mutational erosion. *BioEssays*, *37*(9), 951–958. https://doi.org/10.1002/bies.201500057
281. Hawkes, L. A., Balachandran, S., Batbayar, N., Butler, P. J., Chua, B., Douglas, D. C., … Bishop, C. M. (2012). The paradox of extreme high-altitude migration in bar-headed geese Anser indicus. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, *280*(1750), 20122114–20122114. https://doi.org/10.1098/rspb.2012.2114
282. Hazkani-Covo, E., Sorek, R., & Graur, D. (2003). Evolutionary Dynamics of Large Numts in the Human Genome: Rarity of Independent Insertions and Abundance of Post-Insertion Duplications. *Journal of Molecular Evolution*, *56*(2), 169–174. https://doi.org/10.1007/s00239-002-2390-5
283. He, Y., Wu, J., Dressman, D. C., Iacobuzio-Donahue, C., Markowitz, S. D., Velculescu, V. E., … Papadopoulos, N. (2010). Heteroplasmic mitochondrial DNA mutations in normal and tumour cells. *Nature*, *464*(7288), 610–614. https://doi.org/10.1038/nature08802
284. Hedrick, P. W. (2012). REVERSING MOTHER'S CURSE REVISITED. *Evolution*, *66*(2), 612–616. https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.2011.01465.x
285. Heijne, G. von. (1986). Mitochondrial targeting sequences may form amphiphilic helices. *The EMBO Journal*, *5*(6), 1335–1342. https://doi.org/10.1002/J.1460-2075.1986.TB04364.X
286. Helm, M., & Attardi, G. (2004). Nuclear Control of Cloverleaf Structure of Human Mitochondrial tRNALys. *Journal of Molecular Biology*, *337*(3), 545–560. https://doi.org/10.1016/j.jmb.2004.01.036
287. Helm, M., Brule, H., Degoul, F., Cepanec, C., Leroux, J.-P., Giege, R., & Florentz, C. (1998). The presence of modified nucleotides is required for cloverleaf folding of a human mitochondrial tRNA. *Nucleic Acids Research*, *26*(7), 1636–1643. https://doi.org/10.1093/nar/26.7.1636
288. Hewitt, G. (2000). The genetic legacy of the Quaternary ice ages. *Nature*, *405*(6789), 907–913. https://doi.org/10.1038/35016000
289. Hewitt, G. M. (1988). *Hybrid Zones-Natural Laboratories for Evolutionary Studies* (Vol. 3). Retrieved from https://www.cell.com/trends/ecology-evolution/pdf/0169-5347(88)90033-X.pdf
290. Hewitt, G. M. (2004). Genetic consequences of climatic oscillations in the Quaternary. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, *359*(1442), 183–95; discussion 195. https://doi.org/10.1098/rstb.2003.1388
291. Hill, G. E. (2011). Condition-dependent traits as signals of the functionality of vital cellular processes. *Ecology Letters*, *14*(7), 625–634. https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2011.01622.x
292. Hill, G. E. (2014). Cellular Respiration: The Nexus of Stress, Condition, and Ornamentation. *Integrative and Comparative Biology*, *54*(4), 645–657. https://doi.org/10.1093/icb/icu029

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/06/2024 15:10:58 EEST - 3.135.219.133

293. Hill, G. E. (2016). Mitonuclear coevolution as the genesis of speciation and the mitochondrial DNA barcode gap. *Ecology and Evolution*, *6*(16), 5831–5842. https://doi.org/10.1002/ece3.2338
294. Hill, G. E. (2017). The mitonuclear compatibility species concept. *The Auk*, *134*(2), 393–409. https://doi.org/10.1642/AUK-16-201.1
295. Hill, G. E., & Johnson, J. D. (2013). The mitonuclear compatibility hypothesis of sexual selection. *Proceedings. Biological Sciences*, *280*(1768), 20131314. https://doi.org/10.1098/rspb.2013.1314
296. Hoekstra, L. A., Siddiq, M. A., & Montooth, K. L. (2013). Pleiotropic effects of a mitochondrial-nuclear incompatibility depend upon the accelerating effect of temperature in Drosophila. *Genetics*, *195*(3), 1129–1139. https://doi.org/10.1534/genetics.113.154914
297. Hoekstra, R. F. (2000). Evolutionary origin and consequences of uniparental mitochondrial inheritance. *Human Reproduction*, *15*(suppl 2), 102–111. https://doi.org/10.1093/humrep/15.suppl_2.102
298. Holland HD (1994) In: Bengston S (ed) Early Life on Earth, pp. 237–244. Columbia University Press, New York
299. Holland, H. D. (1972). *The geologic history of sea water-an attempt to solve the problem** (Vol. 36). Pergamon Press. Printed in Northern Ireland. Retrieved from https://ac.els-cdn.com/0016703772901081/1-s2.0-0016703772901081-main.pdf?_tid=0b17680e-4eba-4ac1-b989-d6807f08e76d&acdnat=1534845118_5caa211c217e016044b0c893047c009f
300. Holly, T. (2001). "Mad World of the European Hare". In MacDonald, D. The New Encyclopedia of Mammals. Oxford: Oxford University Press. pp. 710–711.
301. Holyoake, A. J., McHugh, P., Wu, M., O'Carroll, S., Benny, P., Sin, I. L., & Sin, F. Y. (2001). High incidence of single nucleotide substitutions in the mitochondrial genome is associated with poor semen parameters in men. *International Journal of Andrology*, *24*(3), 175–182. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11380706
302. Hosken, D. J., & Withers, P. C. (1997). Temperature regulation and metabolism of an Australian bat, Chalinolobus gouldii (Chiroptera: Vespertilionidae) when euthermic and torpid. *Journal of Comparative Physiology B: Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology*, *167*(1), 71–80. https://doi.org/10.1007/s003600050049
303. Houštěk, J., Pícková, A., Vojtíšková, A., Mráček, T., Pecina, P., & Ješina, P. (2006). Mitochondrial diseases and genetic defects of ATP synthase. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, *1757*(9–10), 1400–1405. https://doi.org/10.1016/J.BBABIO.2006.04.006
304. Huang, X., Chen, Q., Yang, G., Dai, W., Lang, Q., Du, J., … Ling, C. (2012). Metabolic Profiling Study of Yang Deficiency Syndrome in Hepatocellular Carcinoma by H 1 NMR and Pattern Recognition. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, *2012*, 1–6. https://doi.org/10.1155/2012/843048
305. Human mtDNA Haplogroups Associated with High or Reduced Spermatozoa Motility. (2000). *The American Journal of Human Genetics*, *67*(3), 682–696. https://doi.org/10.1086/303040
306. Husnik, F., Nikoh, N., Koga, R., Ross, L., Duncan, R. P., Fujie, M., … McCutcheon, J. P. (2013). Horizontal Gene Transfer from Diverse Bacteria to an Insect Genome Enables a Tripartite Nested Mealybug Symbiosis. *Cell*, *153*(7), 1567–1578. https://doi.org/10.1016/J.CELL.2013.05.040
307. Ikeda, K., Shiba, S., Horie-Inoue, K., Shimokata, K., & Inoue, S. (2013). A stabilizing factor for mitochondrial respiratory supercomplex assembly regulates energy metabolism in muscle. *Nature Communications*, *4*(1), 2147. https://doi.org/10.1038/ncomms3147
308. Irfan, A., Cauchi, M., Edmands, W., Gooderham, N. J., Njuguna, J., & Zhu, H. (2014). Assessment of Temporal Dose-Toxicity Relationship of Fumed Silica Nanoparticle in Human Lung A549 Cells by Conventional Cytotoxicity and 1H-NMR-Based Extracellular Metabonomic Assays. *Toxicological Sciences*, *138*(2), 354–364. https://doi.org/10.1093/toxsci/kfu009
309. Ishii, Y., Imamoto, Y., Yamamoto, R., Tsukahara, M., & Wakamatsu, K. (2015). Titer of trastuzumab produced by a Chinese hamster ovary cell line is associated with tricarboxylic acid cycle activity rather than lactate metabolism. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, *119*(4), 478–485. https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2014.09.017

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/06/2024 15:10:58 EEST - 3.135.219.133

310. Itoh, K., Tamura, Y., Iijima, M., & Sesaki, H. (2013). Effects of Fcj1-Mos1 and mitochondrial division on aggregation of mitochondrial DNA nucleoids and organelle morphology. *Molecular Biology of the Cell*, *24*(12), 1842–1851. https://doi.org/10.1091/mbc.e13-03-0125
311. Iwata, S., Lee, J. W., Okada, K., Lee, J. K., Iwata, M., Rasmussen, B., … Jap, B. K. (1998). Complete structure of the 11-subunit bovine mitochondrial cytochrome bc1 complex. *Science (New York, N.Y.)*, *281*(5373), 64–71. https://doi.org/10.1126/SCIENCE.281.5373.64
312. Jacobs, R. A., Meinild, A.-K., Nordsborg, N. B., & Lundby, C. (2013). Lactate oxidation in human skeletal muscle mitochondria. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, *304*(7), E686–E694. https://doi.org/10.1152/ajpendo.00476.2012
313. Jäger, S., Handschin, C., St-Pierre, J., & Spiegelman, B. M. (2007). AMP-activated protein kinase (AMPK) action in skeletal muscle via direct phosphorylation of PGC-1alpha. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *104*(29), 12017–12022. https://doi.org/10.1073/pnas.0705070104
314. James, A. C., & Ballard, J. W. O. (2003). Mitochondrial genotype affects fitness in Drosophila simulans. *Genetics*, *164*(1), 187–194. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12750331
315. Jankovic, A., Korac, A., Buzadzic, B., Otasevic, V., Stancic, A., Daiber, A., & Korac, B. (2015). Redox implications in adipose tissue (dys)function—A new look at old acquaintances. *Redox Biology*, *6*, 19–32. https://doi.org/10.1016/j.redox.2015.06.018
316. Jékely, G. (2003). Small GTPases and the evolution of the eukaryotic cell. *BioEssays*, *25*(11), 1129–1138. https://doi.org/10.1002/bies.10353
317. Jeninga, E. H., Schoonjans, K., & Auwerx, J. (2010). Reversible acetylation of PGC-1: connecting energy sensors and effectors to guarantee metabolic flexibility. *Oncogene*, *29*(33), 4617–4624. https://doi.org/10.1038/onc.2010.206
318. Ježek, P., Engstová, H., Žáčková, M., Vercesi, A. E., Costa, A. D. T., Arruda, P., & Garlid, K. D. (1998). Fatty acid cycling mechanism and mitochondrial uncoupling proteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, *1365*(1–2), 319–327. https://doi.org/10.1016/S0005-2728(98)00084-X
319. Jha, M. K., Lee, I.-K., & Suk, K. (2016). Metabolic reprogramming by the pyruvate dehydrogenase kinase–lactic acid axis: Linking metabolism and diverse neuropathophysiologies. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, *68*, 1–19. https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2016.05.006
320. Johnson, J. D., & Hill, G. E. (2013). Is carotenoid ornamentation linked to the inner mitochondria membrane potential? A hypothesis for the maintenance of signal honesty. *Biochimie*, *95*(2), 436–444. https://doi.org/10.1016/J.BIOCHI.2012.10.021
321. Jouaville, L. S., Pinton, P., Bastianutto, C., Rutter, G. A., & Rizzuto, R. (1999). Regulation of mitochondrial ATP synthesis by calcium: evidence for a long-term metabolic priming. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *96*(24), 13807–13812. https://doi.org/10.1073/PNAS.96.24.13807
322. Joyce, P. B. M., & Gray, M. W. (1989). Chloroplast-like transfer RNA genes expressed in wheat *mitochondria*. *Nucleic Acids Research*, *17*(14), 5461–5476. https://doi.org/10.1093/nar/17.14.5461
323. Juhling, F., Morl, M., Hartmann, R. K., Sprinzl, M., Stadler, P. F., & Putz, J. (2009). tRNAdb 2009: compilation of tRNA sequences and tRNA genes. *Nucleic Acids Research*, *37*(Database), D159–D162. https://doi.org/10.1093/nar/gkn772
324. Kan, S.-C., Chang, W.-F., Lan, M.-C., Lin, C.-C., Lai, W.-S., Shieh, C.-J., … Liu, Y.-C. (2015). Development of an enzymatic chromatography strip with nicotinamide adenine dinucleotide–tetrazolium coupling reactions for quantitative l-lactate analysis. *Analytical Biochemistry*, *471*, 61–66. https://doi.org/10.1016/j.ab.2014.11.015
325. Karlberg, O., Canbäck, B., Kurland, C. G., & Andersson, S. G. (2000). The dual origin of the yeast mitochondrial proteome. *Yeast (Chichester, England)*, *17*(3), 170–187. https://doi.org/10.1002/1097-0061(20000930)17:3<170::AID-YEA25>3.0.CO;2-V
326. Karlin, S., Brocchieri, L., Mrázek, J., Campbell, A. M., & Spormann, A. M. (1999). A chimeric prokaryotic ancestry of mitochondria and primitive eukaryotes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *96*(16), 9190–9195. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10430918

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/06/2024 15:10:58 EEST - 3.135.219.133

327. Kasapidis, P., Suchentrunk, F., Magoulas, A., & Kotoulas, G. (2005). The shaping of mitochondrial DNA phylogeographic patterns of the brown hare (Lepus europaeus) under the combined influence of Late Pleistocene climatic fluctuations and anthropogenic translocations. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, *34*(1), 55–66. https://doi.org/10.1016/J.YMPEV.2004.09.007
328. Kaufman, B. A., Durisic, N., Mativetsky, J. M., Costantino, S., Hancock, M. A., Grutter, P., & Shoubridge, E. A. (2007). The Mitochondrial Transcription Factor TFAM Coordinates the Assembly of Multiple DNA Molecules into Nucleoid-like Structures. *Molecular Biology of the Cell*, *18*(9), 3225–3236. https://doi.org/10.1091/mbc.e07-05-0404
329. Kelly, S., Wickstead, B., & Gull, K. (2011). Archaeal phylogenomics provides evidence in support of a methanogenic origin of the Archaea and a thaumarchaeal origin for the eukaryotes. *Proceedings. Biological Sciences*, *278*(1708), 1009–1018. https://doi.org/10.1098/rspb.2010.1427
330. Kenyon, L., & Moraes, C. T. (1997). Expanding the functional human mitochondrial DNA database by the establishment of primate xenomitochondrial cybrids. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *94*(17), 9131–9135. https://doi.org/10.1073/PNAS.94.17.9131
331. KERR, K. C. R. (2011). Searching for evidence of selection in avian DNA barcodes. *Molecular Ecology Resources*, *11*(6), 1045–1055. https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2011.03049.x
332. Kirichok, Y., Krapivinsky, G., & Clapham, D. E. (2004). The mitochondrial calcium uniporter is a highly selective ion channel. *Nature*, *427*(6972), 360–364. https://doi.org/10.1038/nature02246
333. Kirkton, S. D., Nyberg, E. T., & Fox, K. M. (2011). Ontogenetic changes in citrate synthase and lactate dehydrogenase activity in the jumping muscle of the American locust (Schistocerca americana). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, *160*(2–3), 110–116. https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2011.07.004
334. Klinger, C. M., Spang, A., Dacks, J. B., & Ettema, T. J. G. (2016). Tracing the Archaeal Origins of Eukaryotic Membrane-Trafficking System Building Blocks. *Molecular Biology and Evolution*, *33*(6), 1528–1541. https://doi.org/10.1093/molbev/msw034
335. Koc, E. C., & Spremulli, L. L. (2002). Identification of mammalian mitochondrial translational initiation factor 3 and examination of its role in initiation complex formation with natural mRNAs. *The Journal of Biological Chemistry*, *277*(38), 35541–35549. https://doi.org/10.1074/jbc.M202498200
336. Koevoets, T., Niehuis, O., van de Zande, L., & Beukeboom, L. W. (2012). Hybrid incompatibilities in the parasitic wasp genus Nasonia: negative effects of hemizygosity and the identification of transmission ratio distortion loci. *Heredity*, *108*(3), 302–311. https://doi.org/10.1038/hdy.2011.75
337. Konovalova, S., & Tyynismaa, H. (2013). Mitochondrial aminoacyl-tRNA synthetases in human disease. *Molecular Genetics and Metabolism*, *108*(4), 206–211. https://doi.org/10.1016/J.YMGME.2013.01.010
338. Koonin, E. V, Fedorova, N. D., Jackson, J. D., Jacobs, A. R., Krylov, D. M., Makarova, K. S., … Natale, D. A. (2004). A comprehensive evolutionary classification of proteins encoded in complete eukaryotic genomes. *Genome Biology*, *5*(2), R7. https://doi.org/10.1186/gb-2004-5-2-r7
339. Koonin, E. V. (2010). The origin and early evolution of eukaryotes in the light of phylogenomics. *Genome Biology*, *11*(5), 209. https://doi.org/10.1186/gb-2010-11-5-209
340. Koonin, E. V. (2012). *The logic of chance : the nature and origin of biological evolution*. Pearson Education.
341. Koonin, E. V. (2015). Origin of eukaryotes from within archaea, archaeal eukaryome and bursts of gene gain: eukaryogenesis just made easier? *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, *370*(1678), 20140333. https://doi.org/10.1098/rstb.2014.0333
342. Koreny, L., & Field, M. C. (2016). Ancient Eukaryotic Origin and Evolutionary Plasticity of Nuclear Lamina. *Genome Biology and Evolution*, *8*(9), 2663–2671. https://doi.org/10.1093/gbe/evw087

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/06/2024 15:10:58 EEST - 3.135.219.133

343. Korhonen, J. A., Pham, X. H., Pellegrini, M., & Falkenberg, M. (2004). Reconstitution of a minimal mtDNA replisome in vitro. *The EMBO Journal*, *23*(12), 2423–2429. https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600257
344. Koumandou, V. L., Wickstead, B., Ginger, M. L., van der Giezen, M., Dacks, J. B., & Field, M. C. (2013). Molecular paleontology and complexity in the last eukaryotic common ancestor. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, *48*(4), 373–396. https://doi.org/10.3109/10409238.2013.821444
345. KOUTSOGIANNOULI, E. A., MOUTOU, K. A., SARAFIDOU, T., STAMATIS, C., SPYROU, V., & MAMURIS, Z. (2009). Major histocompatibility complex variation at class II DQA locus in the brown hare (*Lepus europaeus*). *Molecular Ecology*, *18*(22), 4631–4649. https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2009.04394.x
346. Krishnan, N. M., Seligmann, H., Stewart, C.-B., de Koning, A. P. J., & Pollock, D. D. (2004). Ancestral Sequence Reconstruction in Primate Mitochondrial DNA: Compositional Bias and Effect on Functional Inference. *Molecular Biology and Evolution*, *21*(10), 1871–1883. https://doi.org/10.1093/molbev/msh198
347. Kruse, B., Narasimhan, N., & Attardi, G. (1989). Termination of transcription in human mitochondria: Identification and purification of a DNA binding protein factor that promotes termination. *Cell*, *58*(2), 391–397. https://doi.org/10.1016/0092-8674(89)90853-2
348. Ku, C., Nelson-Sathi, S., Roettger, M., Garg, S., Hazkani-Covo, E., & Martin, W. F. (2015). Endosymbiotic gene transfer from prokaryotic pangenomes: Inherited chimerism in eukaryotes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *112*(33), 10139–10146. https://doi.org/10.1073/pnas.1421385112
349. Kuijper, B., Lane, N., & Pomiankowski, A. (2015). Can paternal leakage maintain sexually antagonistic polymorphism in the cytoplasm? *Journal of Evolutionary Biology*, *28*(2), 468–480. https://doi.org/10.1111/jeb.12582
350. Kuijper, B., Pen, I., & Weissing, F. J. (2012). A Guide to Sexual Selection Theory. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, *43*(1), 287–311. https://doi.org/10.1146/annurev-ecolsys-110411-160245
351. Kumar, R., Small, I., Maréchal-Drouard, L., & Akama, K. (1996). Striking differences in mitochondrial tRNA import between different plant species. *MGG Molecular & General Genetics*, *252*(4), 404–411. https://doi.org/10.1007/BF02173005
352. Kurbalija Novičić, Z., Immonen, E., Jelić, M., AnĐelković, M., Stamenković-Radak, M., & Arnqvist, G. (2015). Within-population genetic effects of mtDNA on metabolic rate in *Drosophila subobscura*. *Journal of Evolutionary Biology*, *28*(2), 338–346. https://doi.org/10.1111/jeb.12565
353. Kurland, C. G., & Andersson, S. G. (2000). Origin and evolution of the mitochondrial proteome. *Microbiology and Molecular Biology Reviews : MMBR*, *64*(4), 786–820. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11104819
354. Kussmaul, L., & Hirst, J. (2006). The mechanism of superoxide production by NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I) from bovine heart mitochondria. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *103*(20), 7607–7612. https://doi.org/10.1073/pnas.0510977103
355. Lamelza, P., & Ailion, M. (2017). *Cytoplasmic-Nuclear Incompatibility Between Wild Isolates of Caenorhabditis nouraguensis*. Retrieved from www.g3journal.org/lookup/suppl/
356. Lane, N. (2005). *Power, sex, suicide : mitochondria and the meaning of life*. Oxford University Press.
357. Lane, N. (2011). Mitonuclear match: Optimizing fitness and fertility over generations drives ageing within generations. *BioEssays*, *33*(11), 860–869. https://doi.org/10.1002/bies.201100051
358. Lane, N. (2012). The Problem with Mixing Mitochondria. *Cell*, *151*(2), 246–248. https://doi.org/10.1016/J.CELL.2012.09.028
359. Lane, N. (2014). Bioenergetic constraints on the evolution of complex life. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, *6*(5), a015982. https://doi.org/10.1101/cshperspect.a015982
360. Lane, N., & Martin, W. (2010). The energetics of genome complexity. *Nature*, *467*(7318), 929–934. https://doi.org/10.1038/nature09486

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/06/2024 15:10:58 EEST - 3.135.219.133

361. Lang, B. F., Burger, G., O'Kelly, C. J., Cedergren, R., Golding, G. B., Lemieux, C., … Gray, M. W. (1997). An ancestral mitochondrial DNA resembling a eubacterial genome in miniature. *Nature*, *387*(6632), 493–497. https://doi.org/10.1038/387493a0
362. Lang, B. F., Gray, M. W., & Burger, G. (1999). Mitochondrial Genome Evolution and the Origin of Eukaryotes. *Annual Review of Genetics*, *33*(1), 351–397. https://doi.org/10.1146/annurev.genet.33.1.351
363. LANG, B. F., SEIF, E., GRAY, M. W., O'KELLY, C. J., & BURGER, G. (1999). A Comparative Genomics Approach to the Evolution of Eukaryotes and their Mitochondria. *The Journal of Eukaryotic Microbiology*, *46*(4), 320–326. https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.1999.tb04611.x
364. Lapuente-Brun, E., Moreno-Loshuertos, R., Acín-Pérez, R., Latorre-Pellicer, A., Colás, C., Balsa, E., … Enríquez, J. A. (2013). Supercomplex assembly determines electron flux in the mitochondrial electron transport chain. *Science (New York, N.Y.)*, *340*(6140), 1567–1570. https://doi.org/10.1126/science.1230381
365. Larsson, N.-G., Wang, J., Wilhelmsson, H., Oldfors, A., Rustin, P., Lewandoski, M., … Clayton, D. A. (1998). Mitochondrial transcription factor A is necessary for mtDNA maintance and embryogenesis in mice. *Nature Genetics*, *18*(3), 231–236. https://doi.org/10.1038/ng0398-231
366. Lasek-Nesselquist, E., & Gogarten, J. P. (2013). The effects of model choice and mitigating bias on the ribosomal tree of life. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, *69*(1), 17–38. https://doi.org/10.1016/j.ympev.2013.05.006
367. Lazar, M. A., & Birnbaum, M. J. (2012). De-Meaning of Metabolism. *Science*, *336*(6089), 1651–1652. https://doi.org/10.1126/science.1221834
368. Lecrenier, N., Van Der Bruggen, P., & Foury, F. (1997). Mitochondrial DNA polymerases from yeast to man: a new family of polymerases. *Gene*, *185*(1), 147–152. https://doi.org/10.1016/S0378-1119(96)00663-4
369. Leibel, R. L., Rosenbaum, M., & Hirsch, J. (1995). Changes in Energy Expenditure Resulting from Altered Body Weight. *New England Journal of Medicine*, *332*(10), 621–628. https://doi.org/10.1056/NEJM199503093321001
370. Lemay, M. A., Henry, P., Lamb, C. T., Robson, K. M., & Russello, M. A. (2013). Novel genomic resources for a climate change sensitive mammal: characterization of the American pika transcriptome. *BMC Genomics*, *14*(1), 311. https://doi.org/10.1186/1471-2164-14-311
371. Lemire, J., Auger, C., Mailloux, R., & Appanna, V. D. (2014). Mitochondrial lactate metabolism is involved in antioxidative defense in human astrocytoma cells. *Journal of Neuroscience Research*, *92*(4), 464–475. https://doi.org/10.1002/jnr.23338
372. Lemos, B., Araripe, L. O., & Hartl, D. L. (2008). Polymorphic Y Chromosomes Harbor Cryptic Variation with Manifold Functional Consequences. *Science*, *319*(5859), 91–93. https://doi.org/10.1126/science.1148861
373. Letts, J. A., & Sazanov, L. A. (2017). Clarifying the supercomplex: the higher-order organization of the mitochondrial electron transport chain. *Nature Structural & Molecular Biology*, *24*(10), 800–808. https://doi.org/10.1038/nsmb.3460
374. Levin, D. A. (2009). The Cytoplasmic Factor in Plant Speciation. *Http://Dx.Doi.Org/10.1043/0363-6445-28.1.5*. https://doi.org/10.1043/0363-6445-28.1.5
375. Levin, L., Blumberg, A., Barshad, G., & Mishmar, D. (2014). Mito-nuclear co-evolution: the positive and negative sides of functional ancient mutations. *Frontiers in Genetics*, *5*, 448. https://doi.org/10.3389/fgene.2014.00448
376. Levine, J. A. (1999). Role of Nonexercise Activity Thermogenesis in Resistance to Fat Gain in Humans. *Science*, *283*(5399), 212–214. https://doi.org/10.1126/science.283.5399.212
377. Levinger, L., Mörl, M., & Florentz, C. (2004). Mitochondrial tRNA 3' end metabolism and human disease. *Nucleic Acids Research*, *32*(18), 5430–5441. https://doi.org/10.1093/nar/gkh884
378. Li, F., Ackermann, E. J., Bennett, C. F., Rothermel, A. L., Plescia, J., Tognin, S., … Altieri, D. C. (1999). Pleiotropic cell-division defects and apoptosis induced by interference with survivin function. *Nature Cell Biology*, *1*(8), 461–466. https://doi.org/10.1038/70242
379. Li, P., Nijhawan, D., Budihardjo, I., Srinivasula, S. M., Ahmad, M., Alnemri, E. S., & Wang, X. (1997). Cytochrome c and dATP-Dependent Formation of Apaf-1/Caspase-9 Complex

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/06/2024 15:10:58 EEST - 3.135.219.133

Initiates an Apoptotic Protease Cascade. *Cell*, *91*(4), 479–489. https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80434-1
380. Lincoln, G. A. (2009). Reproduction and "March madness" in the Brown hare, Lepus europaeus. *Journal of Zoology*, *174*(1), 1–14. https://doi.org/10.1111/j.1469-7998.1974.tb03140.x
381. Lindsay, M. R., Webb, R. I., Strous, M., Jetten, M. S., Butler, M. K., Forde, R. J., & Fuerst, J. A. (2001). Cell compartmentalisation in planctomycetes: novel types of structural organisation for the bacterial cell. *Archives of Microbiology*, *175*(6), 413–429. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11491082
382. Liste-Calleja, L., Lecina, M., Lopez-Repullo, J., Albiol, J., Solà, C., & Cairó, J. J. (2015). Lactate and glucose concomitant consumption as a self-regulated pH detoxification mechanism in HEK293 cell cultures. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *99*(23), 9951–9960. https://doi.org/10.1007/s00253-015-6855-z
383. Liu, J., Qin, L., & Ferguson-Miller, S. (2011). Crystallographic and online spectral evidence for role of conformational change and conserved water in cytochrome oxidase proton pump. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *108*(4), 1284–1289. https://doi.org/10.1073/pnas.1012846108
384. Lively, C. M., Craddock, C., & Vrijenhoek, R. C. (1990). Red Queen hypothesis supported by parasitism in sexual and clonal fish. *Nature*, *344*(6269), 864–866. https://doi.org/10.1038/344864a0
385. Llopis, J., McCaffery, J. M., Miyawaki, A., Farquhar, M. G., Tsien, R. Y., Rycovska, A., … Kühlbrandt, W. (1998). Measurement of cytosolic, mitochondrial, and Golgi pH in single living cells with green fluorescent proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *95*(12), 6803–6808. https://doi.org/10.1073/pnas.95.12.6803
386. Lonhienne, T. G. A., Sagulenko, E., Webb, R. I., Lee, K.-C., Franke, J., Devos, D. P., … Fuerst, J. A. (2010). Endocytosis-like protein uptake in the bacterium Gemmata obscuriglobus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *107*(29), 12883–12888. https://doi.org/10.1073/pnas.1001085107
387. Lopez-Fabuel, I., Le Douce, J., Logan, A., James, A. M., Bonvento, G., Murphy, M. P., … Bolaños, J. P. (2016). Complex I assembly into supercomplexes determines differential mitochondrial ROS production in neurons and astrocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *113*(46), 13063–13068. https://doi.org/10.1073/pnas.1613701113
388. López-García, P., & Moreira, D. (2015). Open Questions on the Origin of Eukaryotes. *Trends in Ecology & Evolution*, *30*(11), 697–708. https://doi.org/10.1016/J.TREE.2015.09.005
389. Losano, J. D. A., Padín, J. F., Méndez-López, I., Angrimani, D. S. R., García, A. G., Barnabe, V. H., & Nichi, M. (2017). The Stimulated Glycolytic Pathway Is Able to Maintain ATP Levels and Kinetic Patterns of Bovine Epididymal Sperm Subjected to Mitochondrial Uncoupling. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, *2017*, 1682393. https://doi.org/10.1155/2017/1682393
390. Lowell, B. B., & Spiegelman, B. M. (2000). Towards a molecular understanding of adaptive thermogenesis. *Nature*, *404*(6778), 652–660. https://doi.org/10.1038/35007527
391. Lucassen, M., Koschnick, N., Eckerle, L. G., & Pörtner, H.-O. (2006). Mitochondrial mechanisms of cold adaptation in cod (Gadus morhua L.) populations from different climatic zones. *Journal of Experimental Biology*, *209*(13), 2462–2471. https://doi.org/10.1242/jeb.02268
392. Luo, J., Vijayasankaran, N., Autsen, J., Santuray, R., Hudson, T., Amanullah, A., & Li, F. (2012). Comparative metabolite analysis to understand lactate metabolism shift in Chinese hamster ovary cell culture process. *Biotechnology and Bioengineering*, *109*(1), 146–156. https://doi.org/10.1002/bit.23291
393. Lynch, M. (1997). Mutation accumulation in nuclear, organelle, and prokaryotic transfer RNA genes. *Molecular Biology and Evolution*, *14*(9), 914–925. https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a025834
394. Lynch, M., & Conery, J. S. (2003). The Origins of Genome Complexity. *Science*, *302*(5649), 1401–1404. https://doi.org/10.1126/science.1089370
395. Ma, H., Marti Gutierrez, N., Morey, R., Van Dyken, C., Kang, E., Hayama, T., … Mitalipov, S. (2016). Incompatibility between Nuclear and Mitochondrial Genomes Contributes to an

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/06/2024 15:10:58 EEST - 3.135.219.133

Interspecies Reproductive Barrier. *Cell Metabolism*, *24*(2), 283–294. https://doi.org/10.1016/j.cmet.2016.06.012
396. Maechler, P., Carobbio, S., & Rubi, B. (2006). In beta-cells, mitochondria integrate and generate metabolic signals controlling insulin secretion. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, *38*(5–6), 696–709. https://doi.org/10.1016/J.BIOCEL.2005.12.006
397. Magalhães, P. J., Andreu, A. L., & Schon, E. A. (1998). Evidence for the presence of 5S rRNA in mammalian mitochondria. *Molecular Biology of the Cell*, *9*(9), 2375–2382. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9725900
398. Mahler, H. R. (1981). MITOCHONDRIAL EVOLUTION: ORGANIZATION AND REGULATION OF MITOCHONDRIAL GENES. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *361*(1 Origins and E), 53–75. https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1981.tb54357.x
399. Makarova, K. S., Wolf, Y. I., Mekhedov, S. L., Mirkin, B. G., & Koonin, E. V. (2005). Ancestral paralogs and pseudoparalogs and their role in the emergence of the eukaryotic cell. *Nucleic Acids Research*, *33*(14), 4626–4638. https://doi.org/10.1093/nar/gki775
400. Maranzana, E., Barbero, G., Falasca, A. I., Lenaz, G., & Genova, M. L. (2013). Mitochondrial Respiratory Supercomplex Association Limits Production of Reactive Oxygen Species from Complex I. *Antioxidants & Redox Signaling*, *19*(13), 1469–1480. https://doi.org/10.1089/ars.2012.4845
401. Marchetti, C., Obert, G., Deffosez, A., Formstecher, P., & Marchetti, P. (2002). Study of mitochondrial membrane potential, reactive oxygen species, DNA fragmentation and cell viability by flow cytometry in human sperm. *Human Reproduction (Oxford, England)*, *17*(5), 1257–1265. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11980749
402. Marcotte, E. M., Xenarios, I., van der Bliek, A. M., & Eisenberg, D. (2000). Localizing proteins in the cell from their phylogenetic profiles. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *97*(22), 12115–12120. https://doi.org/10.1073/pnas.220399497
403. Margulis, & L. (1981). Symbiosis in cell evolution: Life and its environment on the early earth. Retrieved from https://ntrs.nasa.gov/search.jsp?R=19820044578
404. Margulis, L. (1970). *Origin of eukaryotic cells; evidence and research implications for a theory of the origin and evolution of microbial, plant, and animal cells on the Precambrian earth.* Yale University Press.
405. Marques, J. P., Farelo, L., Vilela, J., Vanderpool, D., Alves, P. C., Good, J. M., … Melo-Ferreira, J. (2017). Range expansion underlies historical introgressive hybridization in the Iberian hare. *Scientific Reports*, *7*, 40788. Retrieved from http://dx.doi.org/10.1038/srep40788
406. Marques, J. P., Ferreira, M. S., Farelo, L., Callahan, C. M., Hackländer, K., Jenny, H., … Melo-Ferreira, J. (2017). Mountain hare transcriptome and diagnostic markers as resources to monitor hybridization with European hares. *Scientific Data*, *4*, 170178. https://doi.org/10.1038/sdata.2017.178
407. Martijn, J., & Ettema, T. J. G. (2013). From archaeon to eukaryote: the evolutionary dark ages of the eukaryotic cell. *Biochemical Society Transactions*, *41*(1), 451–457. https://doi.org/10.1042/BST20120292
408. Martin Embley, T. (2006). Multiple secondary origins of the anaerobic lifestyle in eukaryotes. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, *361*(1470), 1055–1067. https://doi.org/10.1098/rstb.2006.1844
409. Martin, W., & Herrmann, R. G. (1998). Gene transfer from organelles to the nucleus: how much, what happens, and Why? *Plant Physiology*, *118*(1), 9–17. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9733521
410. Martin, W., & Koonin, E. V. (2006). Introns and the origin of nucleus–cytosol compartmentalization. *Nature*, *440*(7080), 41–45. https://doi.org/10.1038/nature04531
411. Martin, W., & Müller, M. (1998). The hydrogen hypothesis for the first eukaryote. *Nature*, *392*(6671), 37–41. https://doi.org/10.1038/32096
412. Martin, W., & Schnarrenberger, C. (1997). The evolution of the Calvin cycle from prokaryotic to eukaryotic chromosomes: a case study of functional redundancy in ancient pathways through endosymbiosis. *Current Genetics*, *32*(1), 1–18. https://doi.org/10.1007/s002940050241

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/06/2024 15:10:58 EEST - 3.135.219.133

413. Masters, B. S., Stohl, L. L., & Clayton, D. A. (1987). Yeast mitochondrial RNA polymerase is homologous to those encoded by bacteriophages T3 and T7. *Cell*, *51*(1), 89–99. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3308116
414. Maurino, V. G., & Engqvist, M. K. M. (2015). 2-Hydroxy Acids in Plant Metabolism. *The Arabidopsis Book*, *13*, e0182. https://doi.org/10.1199/tab.0182
415. May-Panloup, P., Chrétien, M. F., Jacques, C., Vasseur, C., Malthièry, Y., & Reynier, P. (2005). Low oocyte mitochondrial DNA content in ovarian insufficiency. *Human Reproduction*, *20*(3), 593–597. https://doi.org/10.1093/humrep/deh667
416. Maynard-Smith, J. (1958). The Theory of Evolution. *Eweb:124840*.
417. Mayr 1963. Animal Species and Evolution. Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts
418. Mayr, E. (1940). Speciation Phenomena in Birds. *The American Naturalist*, *74*(752), 249–278. https://doi.org/10.1086/280892
419. Mayr, E. (1963). *Animal Species and Evolution*.
420. McCauley, D. E. (2013). Paternal leakage, heteroplasmy, and the evolution of plant mitochondrial genomes. *New Phytologist*, *200*(4), 966–977. https://doi.org/10.1111/nph.12431
421. McCormack, J. G., Halestrap, A. P., & Denton, R. M. (1990). Role of calcium ions in regulation of mammalian intramitochondrial metabolism. *Physiological Reviews*, *70*(2), 391–425. https://doi.org/10.1152/physrev.1990.70.2.391
422. McCulloch, V., Seidel-Rogol, B. L., & Shadel, G. S. (2002). A human mitochondrial transcription factor is related to RNA adenine methyltransferases and binds S-adenosylmethionine. *Molecular and Cellular Biology*, *22*(4), 1116–1125. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11809803
423. McDevitt, H. O., & Chinitz, A. (1969). Genetic Control of the Antibody Response: Relationship between Immune Response and Histocompatibility (H-2) Type. *Science*, *163*(3872), 1207–1208. https://doi.org/10.1126/science.163.3872.1207
424. McGaugh, S. E., Heil, C. S. S., Manzano-Winkler, B., Loewe, L., Goldstein, S., Himmel, T. L., & Noor, M. A. F. (2012). Recombination Modulates How Selection Affects Linked Sites in Drosophila. *PLoS Biology*, *10*(11), e1001422. https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001422
425. McInerney, J. O., Pisani, D., Bapteste, E., & O'Connell, M. J. (2011). The public goods hypothesis for the evolution of life on Earth. *Biology Direct*, *6*(1), 41. https://doi.org/10.1186/1745-6150-6-41
426. McKenzie, M., Chiotis, M., Pinkert, C. A., & Trounce, I. A. (2003). Functional Respiratory Chain Analyses in Murid Xenomitochondrial Cybrids Expose Coevolutionary Constraints of Cytochrome b and Nuclear Subunits of Complex III. *Molecular Biology and Evolution*, *20*(7), 1117–1124. https://doi.org/10.1093/molbev/msg132
427. Meiklejohn, C. D., Holmbeck, M. A., Siddiq, M. A., Abt, D. N., Rand, D. M., & Montooth, K. L. (2013). An Incompatibility between a Mitochondrial tRNA and Its Nuclear-Encoded tRNA Synthetase Compromises Development and Fitness in Drosophila. *PLoS Genetics*, *9*(1), e1003238. https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003238
428. MELO-FERREIRA, J., BOURSOT, P., SUCHENTRUNK, F., FERRAND, N., & ALVES, P. C. (2005). Invasion from the cold past: extensive introgression of mountain hare (Lepus timidus) mitochondrial DNA into three other hare species in northern Iberia. *Molecular Ecology*, *14*(8), 2459–2464. https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2005.02599.x
429. Mendell, J. E., Clements, K. D., Choat, J. H., & Angert, E. R. (2008). Extreme polyploidy in a large bacterium. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *105*(18), 6730–6734. https://doi.org/10.1073/pnas.0707522105
430. Mercer, T. R., Neph, S., Dinger, M. E., Crawford, J., Smith, M. A., Shearwood, A.-M. J., … Mattick, J. S. (2011). The Human Mitochondrial Transcriptome. *Cell*, *146*(4), 645–658. https://doi.org/10.1016/J.CELL.2011.06.051
431. MERESCHKOWSKY, & C. (1905). Uber Natur und Ursprung der Chromatophoren im Pflanzenreiche. *Biologisches Centralblatt*, *25*, 293–604. Retrieved from https://ci.nii.ac.jp/naid/10020710100/
432. Messmer, M., Pütz, J., Suzuki, T., Suzuki, T., Sauter, C., Sissler, M., & Catherine, F. (2009). Tertiary network in mammalian mitochondrial tRNAAsp revealed by solution probing and

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/06/2024 15:10:58 EEST - 3.135.219.133

phylogeny. *Nucleic Acids Research*, *37*(20), 6881–6895. https://doi.org/10.1093/nar/gkp697
433. Miki, K., Qu, W., Goulding, E. H., Willis, W. D., Bunch, D. O., Strader, L. F., … O'Brien, D. A. (2004). Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase-S, a sperm-specific glycolytic enzyme, is required for sperm motility and male fertility. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *101*(47), 16501–16506. https://doi.org/10.1073/pnas.0407708101
434. Milenkovic, D., Blaza, J. N., Larsson, N.-G., & Hirst, J. (2017). The Enigma of the Respiratory Chain Supercomplex. *Cell Metabolism*, *25*(4), 765–776. https://doi.org/10.1016/J.CMET.2017.03.009
435. Mishmar, D., Ruiz-Pesini, E., Golik, P., Macaulay, V., Clark, A. G., Hosseini, S., … Wallace, D. C. (2003). Natural selection shaped regional mtDNA variation in humans. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *100*(1), 171–176. https://doi.org/10.1073/pnas.0136972100
436. MITCHELL, P. (1961). Coupling of Phosphorylation to Electron and Hydrogen Transfer by a Chemi-Osmotic type of Mechanism. *Nature*, *191*(4784), 144–148. https://doi.org/10.1038/191144a0
437. Moazeni, F., Zhang, G., & Sun, H. J. (2010). Imperfect Asymmetry of Life: Earth Microbial Communities Prefer D-Lactate but Can Use L-Lactate Also. *Astrobiology*, *10*(4), 397–402. https://doi.org/10.1089/ast.2009.0438
438. Montooth, K. L., Meiklejohn, C. D., Abt, D. N., & Rand, D. M. (2010). MITOCHONDRIAL-NUCLEAR EPISTASIS AFFECTS FITNESS WITHIN SPECIES BUT DOES NOT CONTRIBUTE TO FIXED INCOMPATIBILITIES BETWEEN SPECIES OF DROSOPHILA. *Evolution*, *64*(12), 3364–3379. https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.2010.01077.x
439. Morales, H. E., Pavlova, A., Joseph, L., & Sunnucks, P. (2015). Positive and purifying selection in mitochondrial genomes of a bird with mitonuclear discordance. *Molecular Ecology*, *24*(11), 2820–2837. https://doi.org/10.1111/mec.13203
440. Moran, N. A. (2007). Symbiosis as an adaptive process and source of phenotypic complexity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *104*(Supplement 1), 8627–8633. https://doi.org/10.1073/pnas.0611659104
441. Moran, N. A., McCutcheon, J. P., & Nakabachi, A. (2008). Genomics and Evolution of Heritable Bacterial Symbionts. *Annual Review of Genetics*, *42*(1), 165–190. https://doi.org/10.1146/annurev.genet.41.110306.130119
442. Moreno-Lastres, D., Fontanesi, F., García-Consuegra, I., Martín, M. A., Arenas, J., Barrientos, A., & Ugalde, C. (2012). Mitochondrial Complex I Plays an Essential Role in Human Respirasome Assembly. *Cell Metabolism*, *15*(3), 324–335. https://doi.org/10.1016/J.CMET.2012.01.015
443. Mourier, A., Matic, S., Ruzzenente, B., Larsson, N.-G., & Milenkovic, D. (2014). The Respiratory Chain Supercomplex Organization Is Independent of COX7a2l Isoforms. *Cell Metabolism*, *20*(6), 1069–1075. https://doi.org/10.1016/J.CMET.2014.11.005
444. Mourier, T., Hansen, A. J., Willerslev, E., & Arctander, P. (2001). The Human Genome Project Reveals a Continuous Transfer of Large Mitochondrial Fragments to the Nucleus. *Molecular Biology and Evolution*, *18*(9), 1833–1837. https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a003971
445. Mukai, C., & Travis, A. J. (2012). What sperm can teach us about energy production. *Reproduction in Domestic Animals = Zuchthygiene*, *47 Suppl 4*(0 4), 164–169. https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2012.02071.x
446. Muller, F. L., Liu, Y., & Van Remmen, H. (2004). Complex III Releases Superoxide to Both Sides of the Inner Mitochondrial Membrane. *Journal of Biological Chemistry*, *279*(47), 49064–49073. https://doi.org/10.1074/jbc.M407715200
447. Muller, H. J. (1932). Some Genetic Aspects of Sex. *The American Naturalist*, *66*(703), 118–138. https://doi.org/10.1086/280418
448. Muller, H. J. (1964). The relation of recombination to mutational advance. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, *1*(1), 2–9. https://doi.org/10.1016/0027-5107(64)90047-8
449. Murphy, M. P. (2009). How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochemical Journal*, *417*(1), 1–13. https://doi.org/10.1042/BJ20081386

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/06/2024 15:10:58 EEST - 3.135.219.133

450. Nabholz, B., Ellegren, H., & Wolf, J. B. W. (2013). High Levels of Gene Expression Explain the Strong Evolutionary Constraint of Mitochondrial Protein-Coding Genes. *Molecular Biology and Evolution*, *30*(2), 272–284. https://doi.org/10.1093/molbev/mss238
451. Nagaike, T., Suzuki, T., Katoh, T., & Ueda, T. (2005). Human mitochondrial mRNAs are stabilized with polyadenylation regulated by mitochondria-specific poly(A) polymerase and polynucleotide phosphorylase. *The Journal of Biological Chemistry*, *280*(20), 19721–19727. https://doi.org/10.1074/jbc.M500804200
452. Nagaike, T., Suzuki, T., Tomari, Y., Takemoto-Hori, C., Negayama, F., Watanabe, K., & Ueda, T. (2001). Identification and characterization of mammalian mitochondrial tRNA nucleotidyltransferases. *The Journal of Biological Chemistry*, *276*(43), 40041–40049. https://doi.org/10.1074/jbc.M106202200
453. Nagao, A., Suzuki, T., Katoh, T., Sakaguchi, Y., & Suzuki, T. (2009). Biogenesis of glutaminyl-mt tRNAGln in human mitochondria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *106*(38), 16209–16214. https://doi.org/10.1073/pnas.0907602106
454. Nakada, K., Sato, A., Yoshida, K., Morita, T., Tanaka, H., Inoue, S.-I., … Hayashi, J.-I. (2006). Mitochondria-related male infertility. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *103*(41), 15148–15153. https://doi.org/10.1073/pnas.0604641103
455. Nakamoto, R. K., Baylis Scanlon, J. A., & Al-Shawi, M. K. (2008). The rotary mechanism of the ATP synthase. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, *476*(1), 43–50. https://doi.org/10.1016/J.ABB.2008.05.004
456. Narbonne, P., Halley-Stott, R. P., & Gurdon, J. B. (2012). On the cellular and developmental lethality of a Xenopus nucleocytoplasmic hybrid. *Communicative & Integrative Biology*, *5*(4), 329–333. https://doi.org/10.4161/cib.20334
457. Narisawa, S., Hecht, N. B., Goldberg, E., Boatright, K. M., Reed, J. C., & Millán, J. L. (2002). Testis-specific cytochrome c-null mice produce functional sperm but undergo early testicular atrophy. *Molecular and Cellular Biology*, *22*(15), 5554–5562. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12101247
458. Nascimento, J. M., Shi, L. Z., Tam, J., Chandsawangbhuwana, C., Durrant, B., Botvinick, E. L., & Berns, M. W. (2008). Comparison of glycolysis and oxidative phosphorylation as energy sources for mammalian sperm motility, using the combination of fluorescence imaging, laser tweezers, and real-time automated tracking and trapping. *Journal of Cellular Physiology*, *217*(3), 745–751. https://doi.org/10.1002/jcp.21549
459. Neupert, W., & Herrmann, J. M. (2007). Translocation of Proteins into Mitochondria. *Annual Review of Biochemistry*, *76*(1), 723–749. https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.76.052705.163409
460. Newington, J. T., Harris, R. A., & Cumming, R. C. (2013). Reevaluating Metabolism in Alzheimer's Disease from the Perspective of the Astrocyte-Neuron Lactate Shuttle Model. *Journal of Neurodegenerative Diseases*, *2013*, 1–13. https://doi.org/10.1155/2013/234572
461. Ni, W., Gao, T., Wang, H., Du, Y., Li, J., Li, C., … Bi, H. (2013). Anti-fatigue activity of polysaccharides from the fruits of four Tibetan plateau indigenous medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*, *150*(2), 529–535. https://doi.org/10.1016/j.jep.2013.08.055
462. Niehuis, O., Judson, A. K., & Gadau, J. (2008). Cytonuclear genic incompatibilities cause increased mortality in male F2 hybrids of Nasonia giraulti and N. vitripennis. *Genetics*, *178*(1), 413–426. https://doi.org/10.1534/genetics.107.080523
463. Nozaki, Y., Matsunaga, N., Ishizawa, T., Ueda, T., & Takeuchi, N. (2008). HMRF1L is a human mitochondrial translation release factor involved in the decoding of the termination codons UAA and UAG. *Genes to Cells*, *13*(5), 429–438. https://doi.org/10.1111/j.1365-2443.2008.01181.x
464. Nugent, J. M., & Palmer, J. D. (1991). RNA-mediated transfer of the gene coxII from the mitochondrion to the nucleus during flowering plant evolution. *Cell*, *66*(3), 473–481. https://doi.org/10.1016/0092-8674(81)90011-8
465. O'Brien, T. (2003). Properties of Human Mitochondrial Ribosomes. *IUBMB Life (International Union of Biochemistry and Molecular Biology: Life)*, *55*(9), 505–513. https://doi.org/10.1080/15216540310001626610

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/06/2024 15:10:58 EEST - 3.135.219.133

466. O'Brien, T. W. (2002). Evolution of a protein-rich mitochondrial ribosome: implications for human genetic disease. *Gene*, *286*(1), 73–79. https://doi.org/10.1016/S0378-1119(01)00808-3
467. Ofengand, J., & Bakin, A. (1997). Mapping to nucleotide resolution of pseudouridine residues in large subunit ribosomal RNAs from representative eukaryotes, prokaryotes, archaebacteria, mitochondria and chloroplasts. *Journal of Molecular Biology*, *266*(2), 246–268. https://doi.org/10.1006/JMBI.1996.0737
468. Ohno, S. (1970). The Enormous Diversity in Genome Sizes of Fish as a Reflection of Nature's Extensive Experiments with Gene Duplication. *Transactions of the American Fisheries Society*, *99*(1), 120–130. https://doi.org/10.1577/1548-8659(1970)99<120:TEDIGS>2.0.CO;2
469. Ojuka, E. O., Jones, T. E., Han, D.-H., Chen, M., Wamhoff, B. R., Sturek, M., & Holloszy, J. O. (2002). Intermittent increases in cytosolic Ca^{2+} stimulate mitochondrial biogenesis in muscle cells. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, *283*(5), E1040–E1045. https://doi.org/10.1152/ajpendo.00242.2002
470. Olsen, G. J., Woese, C. R., & Overbeek, R. (1994). The winds of (evolutionary) change: breathing new life into microbiology. *Journal of Bacteriology*, *176*(1), 1–6. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8282683
471. Orr, H. A. (2005). The genetic theory of adaptation: a brief history. *Nature Reviews Genetics*, *6*(2), 119–127. https://doi.org/10.1038/nrg1523
472. Orth, A., Auffray, J.-C., & Bonhomme, F. (2002). Two deeply divergent mitochondrial clades in the wild mouse Mus macedonicus reveal multiple glacial refuges south of Caucasus. *Heredity*, *89*(5), 353–357. https://doi.org/10.1038/sj.hdy.6800147
473. Ott, M., Amunts, A., & Brown, A. (2016). Organization and Regulation of Mitochondrial Protein Synthesis. *Annual Review of Biochemistry*, *85*(1), 77–101. https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-060815-014334
474. Otto, S. P., & Barton, N. H. (2001). SELECTION FOR RECOMBINATION IN SMALL POPULATIONS. *Evolution*, *55*(10), 1921–1931. https://doi.org/10.1111/j.0014-3820.2001.tb01310.x
475. Otto, S. P., & Michalakis, Y. (1998). The evolution of recombination in changing environments. *Trends in Ecology & Evolution*, *13*(4), 145–151. https://doi.org/10.1016/S0169-5347(97)01260-3
476. Oudot-Le Secq, M.-P., Fontaine, J.-M., Rousvoal, S., Kloareg, B., & Loiseaux-de Goër, S. (2001). The Complete Sequence of a Brown Algal Mitochondrial Genome, the Ectocarpale Pylaiella littoralis (L.) Kjellm. *Journal of Molecular Evolution*, *53*(2), 80–88. https://doi.org/10.1007/s002390010196
477. Ow, Y.-L. P., Green, D. R., Hao, Z., & Mak, T. W. (2008). Cytochrome c: functions beyond respiration. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *9*(7), 532–542. https://doi.org/10.1038/nrm2434
478. Pacelli, C., Latorre, D., Cocco, T., Capuano, F., Kukat, C., Seibel, P., & Villani, G. (2011). Tight control of mitochondrial membrane potential by cytochrome c oxidase. *Mitochondrion*, *11*(2), 334–341. https://doi.org/10.1016/j.mito.2010.12.004
479. Pagliarini, D. J., Calvo, S. E., Chang, B., Sheth, S. A., Vafai, S. B., Ong, S.-E., … Mootha, V. K. (2008). A Mitochondrial Protein Compendium Elucidates Complex I Disease Biology. *Cell*, *134*(1), 112–123. https://doi.org/10.1016/J.CELL.2008.06.016
480. Papp, B., Pál, C., & Hurst, L. D. (2003). Dosage sensitivity and the evolution of gene families in yeast. *Nature*, *424*(6945), 194–197. https://doi.org/10.1038/nature01771
481. Parker, G. A. (2014). The sexual cascade and the rise of pre-ejaculatory (Darwinian) sexual selection, sex roles, and sexual conflict. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, *6*(10), a017509. https://doi.org/10.1101/cshperspect.a017509
482. Parsons, D. F., & Parsons, D. F. (1963). Mitochondrial Structure: Two Types of Subunits on Negatively Stained Mitochondrial Membranes. *Science*, *140*(3570), 985–987. https://doi.org/10.1126/science.140.3570.985
483. Passarella, S., & Karu, T. (2014). Absorption of monochromatic and narrow band radiation in the visible and near IR by both mitochondrial and non-mitochondrial photoacceptors results in photobiomodulation. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, *140*, 344–358. https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2014.07.021

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/06/2024 15:10:58 EEST - 3.135.219.133

484. Passarella, S., de Bari, L., Valenti, D., Pizzuto, R., Paventi, G., & Atlante, A. (2008). Mitochondria and l -lactate metabolism. *FEBS Letters*, *582*(25–26), 3569–3576. https://doi.org/10.1016/j.febslet.2008.09.042
485. Passarella, S., Paventi, G., & Pizzuto, R. (2014). The mitochondrial L-lactate dehydrogenase affair. *Frontiers in Neuroscience*, *8*. https://doi.org/10.3389/fnins.2014.00407
486. Paventi, G., Lessard, C., Bailey, J. L., & Passarella, S. (2015). In boar sperm capacitation l -lactate and succinate, but not pyruvate and citrate, contribute to the mitochondrial membrane potential increase as monitored via safranine O fluorescence. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *462*(3), 257–262. https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2015.04.128
487. Paventi, G., Pizzuto, R., & Passarella, S. (2017). The occurrence of l -lactate dehydrogenase in the inner mitochondrial compartment of pig liver. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *489*(2), 255–261. https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.05.154
488. Pérez-Martínez, X., Antaramian, A., Vázquez-Acevedo, M., Funes, S., Tolkunova, E., D´alayer, J., … González-Halphen, D. (2000). *SUBUNIT II OF CYTOCHROME c OXIDASE IN CHLAMYDOMONAD ALGAE IS A HETERODIMER ENCODED BY TWO INDEPENDENT NUCLEAR GENES Downloaded from*. JBC Papers in Press. Retrieved from http://www.jbc.org/
489. Pérez-Martínez, X., Antaramian, A., Vázquez-Acevedo, M., Funes, S., Tolkunova, E., d'Alayer, J., … González-Halphen, D. (2001). Subunit II of Cytochrome *c* Oxidase in Chlamydomonad Algae Is a Heterodimer Encoded by Two Independent Nuclear Genes. *Journal of Biological Chemistry*, *276*(14), 11302–11309. https://doi.org/10.1074/jbc.M010244200
490. Pérez-Pérez, R., Lobo-Jarne, T., Milenkovic, D., Mourier, A., Bratic, A., García-Bartolomé, A., … Ugalde, C. (2016). COX7A2L Is a Mitochondrial Complex III Binding Protein that Stabilizes the III2+IV Supercomplex without Affecting Respirasome Formation. *Cell Reports*, *16*(9), 2387–2398. https://doi.org/10.1016/J.CELREP.2016.07.081
491. Pesole, G., Gissi, C., De Chirico, A., & Saccone, C. (1999). Nucleotide Substitution Rate of Mammalian Mitochondrial Genomes. *Journal of Molecular Evolution*, *48*(4), 427–434. https://doi.org/10.1007/PL00006487
492. Petit, R. J., & Excoffier, L. (2009). Gene flow and species delimitation. *Trends in Ecology & Evolution*, *24*(7), 386–393. https://doi.org/10.1016/J.TREE.2009.02.011
493. Piccoli, C., Scrima, R., Boffoli, D., & Capitanio, N. (2006). Control by cytochrome *c* oxidase of the cellular oxidative phosphorylation system depends on the mitochondrial energy state. *Biochemical Journal*, *396*(3), 573–583. https://doi.org/10.1042/BJ20060077
494. Pierron, D., Wildman, D. E., Hüttemann, M., Markondapatnaikuni, G. C., Aras, S., & Grossman, L. I. (2012). Cytochrome c oxidase: Evolution of control via nuclear subunit addition. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, *1817*(4), 590–597. https://doi.org/10.1016/j.bbabio.2011.07.007
495. Pinevich, A.V.. (1997). Intracytoplasmic membrane structures in bacteria. Endocytobiosis and Cell Research. 12. 9-40.
496. Piomboni, P., Focarelli, R., Stendardi, A., Ferramosca, A., & Zara, V. (2012). The role of mitochondria in energy production for human sperm motility. *International Journal of Andrology*, *35*(2), 109–124. https://doi.org/10.1111/j.1365-2605.2011.01218.x
497. Pittis, A. A., & Gabaldón, T. (2016). Late acquisition of mitochondria by a host with chimaeric prokaryotic ancestry. *Nature*, *531*(7592), 101–104. https://doi.org/10.1038/nature16941
498. Pizzuto, R., Paventi, G., Atlante, A., & Passarella, S. (2010). Pyruvate kinase in pig liver mitochondria. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, *495*(1), 42–48. https://doi.org/10.1016/j.abb.2009.12.016
499. Pizzuto, R., Paventi, G., Porcile, C., Sarnataro, D., Daniele, A., & Passarella, S. (2012). l-Lactate metabolism in HEP G2 cell mitochondria due to the l-lactate dehydrogenase determines the occurrence of the lactate/pyruvate shuttle and the appearance of oxaloacetate, malate and citrate outside mitochondria. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, *1817*(9), 1679–1690. https://doi.org/10.1016/j.bbabio.2012.05.010
500. Poli, A., Nigro, M., Gallazzi, D., Sironi, G., Lavazza, A., & Gelmetti, D. (1991). ACUTE HEPATOSIS IN THE EUROPEAN BROWN HARE (LEPUS EUROPAEUS) IN ITALY. *Journal of Wildlife Diseases*, *27*(4), 621–629. https://doi.org/10.7589/0090-3558-27.4.621

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/06/2024 15:10:58 EEST - 3.135.219.133

501. Poole, A. M., & Gribaldo, S. (2014). Eukaryotic origins: How and when was the mitochondrion acquired? *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, *6*(12), a015990. https://doi.org/10.1101/cshperspect.a015990
502. Popot, J. L., & Vitry, C. (1990). On the Microassembly of Integral Membrane Proteins. *Annual Review of Biophysics and Biophysical Chemistry*, *19*(1), 369–403. https://doi.org/10.1146/annurev.bb.19.060190.002101
503. Pörtner, H. . (2002). Climate variations and the physiological basis of temperature dependent biogeography: systemic to molecular hierarchy of thermal tolerance in animals. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, *132*(4), 739–761. https://doi.org/10.1016/S1095-6433(02)00045-4
504. Pörtner, H. O. (2006). Climate-dependent evolution of Antarctic ectotherms: An integrative analysis. *Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography*, *53*(8–10), 1071–1104. https://doi.org/10.1016/J.DSR2.2006.02.015
505. Pörtner, H. O., & Knust, R. (2007). Climate change affects marine fishes through the oxygen limitation of thermal tolerance. *Science (New York, N.Y.)*, *315*(5808), 95–97. https://doi.org/10.1126/science.1135471
506. Pörtner, H.-O., Hardewig, I., Sartoris, F.-J., & van Dijk, P. (1998). Energetic aspects of cold adaptation critical temperatures in metabolic, ionic and acid-base regulation? *EPIC3Cold Ocean Physiology (H O Pörtner, R Playle, Eds) Cambridge University Press, Pp. 88-120*. Retrieved from http://epic.awi.de/2453/
507. Prasad', B., Un1yaland, S. N., & Asher, R. (2005). *Organic-walled microfossils from the Proterozoic Vindhyan Supergroup of Son Valley, Madhya Pradesh, India*. *Pnincobo/nllisl* (Vol. 54). Retrieved from http://14.139.63.228:8080/pbrep/bitstream/123456789/1084/1/PbV54_13.pdf
508. Price, T. D. (2007). Speciation in Birds. Roberts, London, UK.
509. Pryde, K. R., & Hirst, J. (2011). Superoxide is produced by the reduced flavin in mitochondrial complex I: a single, unified mechanism that applies during both forward and reverse electron transfer. *The Journal of Biological Chemistry*, *286*(20), 18056–18065. https://doi.org/10.1074/jbc.M110.186841
510. Psarra, A.-M. G., & Sekeris, C. E. (2008). Nuclear receptors and other nuclear transcription factors in mitochondria: Regulatory molecules in a new environment. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, *1783*(1), 1–11. https://doi.org/10.1016/J.BBAMCR.2007.10.021
511. Puigserver, P., Wu, Z., Park, C. W., Graves, R., Wright, M., & Spiegelman, B. M. (1998). A Cold-Inducible Coactivator of Nuclear Receptors Linked to Adaptive Thermogenesis. *Cell*, *92*(6), 829–839. https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81410-5
512. Race, H. L., Herrmann, R. G., & Martin, W. (1999). Why have organelles retained genomes? *Trends in Genetics*, *15*(9), 364–370. https://doi.org/10.1016/S0168-9525(99)01766-7
513. Raff, R. A., & Mahler, H. R. (n.d.). The Non symbiotic Origin of Mitochondria. *Science*. American Association for the Advancement of Science. https://doi.org/10.2307/1734045
514. Rand, D. M. (2001). The Units of Selection on Mitochondrial DNA. *Annual Review of Ecology and Systematics*, *32*(1), 415–448. https://doi.org/10.1146/annurev.ecolsys.32.081501.114109
515. Rand, D. M., Haney, R. A., & Fry, A. J. (2004). Cytonuclear coevolution: the genomics of cooperation. *Trends in Ecology & Evolution*, *19*(12), 645–653. https://doi.org/10.1016/J.TREE.2004.10.003
516. Ravussin, E., Lillioja, S., Knowler, W. C., Christin, L., Freymond, D., Abbott, W. G. H., … Bogardus, C. (1988). Reduced Rate of Energy Expenditure as a Risk Factor for Body-Weight Gain. *New England Journal of Medicine*, *318*(8), 467–472. https://doi.org/10.1056/NEJM198802253180802
517. Rawson, P. D., & Burton, R. S. (2002). Functional coadaptation between cytochrome c and cytochrome c oxidase within allopatric populations of a marine copepod. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *99*(20), 12955–12958. https://doi.org/10.1073/pnas.202335899
518. Raymann, K., Brochier-Armanet, C., & Gribaldo, S. (2015). The two-domain tree of life is linked to a new root for the Archaea, *112*(21). https://doi.org/10.1073/pnas.1420858112

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/06/2024 15:10:58 EEST - 3.135.219.133

519. Reyes, A., Gissi, C., Pesole, G., & Saccone, C. (1998). Asymmetrical directional mutation pressure in the mitochondrial genome of mammals. *Molecular Biology and Evolution*, *15*(8), 957–966. https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a026011
520. Rezende, E. L., Bozinovic, F., & Jr, T. G. (2004). CLIMATIC ADAPTATION AND THE EVOLUTION OF BASAL AND MAXIMUM RATES OF METABOLISM IN RODENTS. *Evolution*, *58*(6), 1361–1374. https://doi.org/10.1111/j.0014-3820.2004.tb01714.x
521. Rich, P. R. (2003). The molecular machinery of Keilin's respiratory chain. *Biochemical Society Transactions*, *31*(Pt 6), 1095–1105. https://doi.org/10.1042/
522. Rich, P. R. (2017). Mitochondrial cytochrome c oxidase: catalysis, coupling and controversies. *Biochemical Society Transactions*, *45*(3), 813–829. https://doi.org/10.1042/BST20160139
523. Richmond, G. M., & Fullerton, D. S. (1986). Summation of quaternary glaciations in the United States of America. *Quaternary Science Reviews*, *5*, 183–196. https://doi.org/10.1016/0277-3791(86)90184-8
524. Roberti, M., Polosa, P. L., Bruni, F., Manzari, C., Deceglie, S., Gadaleta, M. N., & Cantatore, P. (2009). The MTERF family proteins: Mitochondrial transcription regulators and beyond. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, *1787*(5), 303–311. https://doi.org/10.1016/J.BBABIO.2009.01.013
525. Rochette, N. C., Brochier-Armanet, C., & Gouy, M. (2014). Phylogenomic Test of the Hypotheses for the Evolutionary Origin of Eukaryotes. *Molecular Biology and Evolution*, *31*(4), 832–845. https://doi.org/10.1093/molbev/mst272
526. Rodeheffer, M. S., & Shadel, G. S. (2003). Multiple interactions involving the amino-terminal domain of yeast mtRNA polymerase determine the efficiency of mitochondrial protein synthesis. *The Journal of Biological Chemistry*, *278*(20), 18695–18701. https://doi.org/10.1074/jbc.M301399200
527. Rodríguez-Gil, J. E., & Bonet, S. (2016). Current knowledge on boar sperm metabolism: Comparison with other mammalian species. *Theriogenology*, *85*(1), 4–11. https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2015.05.005
528. Rodriguez-Gil, JE, Bonet, S. (2016). Current knowledge on boar sperm metabolism: Comparison with other mammalian species. *Theriogenology*, *85*(1), 4–11. https://doi.org/10.1016/J.THERIOGENOLOGY.2015.05.005
529. Rodriguez, J., & Lazebnik, Y. (1999). Caspase-9 and APAF-1 form an active holoenzyme. *Genes & Development*, *13*(24), 3179–3184. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10617566
530. Rogell, B., Dean, R., Lemos, B., & Dowling, D. K. (2014). Mito-nuclear interactions as drivers of gene movement on and off the X-chromosome. *BMC Genomics*, *15*(1), 330. https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-330
531. Rorbach, J., Richter, R., Wessels, H. J., Wydro, M., Pekalski, M., Farhoud, M., … Chrzanowska-Lightowlers, Z. M. A. (2008). The human mitochondrial ribosome recycling factor is essential for cell viability. *Nucleic Acids Research*, *36*(18), 5787–5799. https://doi.org/10.1093/nar/gkn576
532. RUBEY, W. W. (1951). GEOLOGIC HISTORY OF SEA WATERAN ATTEMPT TO STATE THE PROBLEM. *GSA Bulletin*, *62*(9), 1111–1148. https://doi.org/10.1130/0016-7606(1951)62[1111:ghosw]2.0.co;2
533. Ruiz-Pesini, E., & Wallace, D. C. (2006). Evidence for adaptive selection acting on the tRNA and rRNA genes of human mitochondrial DNA. *Human Mutation*, *27*(11), 1072–1081. https://doi.org/10.1002/humu.20378
534. Ruiz-Pesini, E., Diez-Sanchez, C., Lopez-Perez, MJ., Enriquez, JA. (2007). The Role of the Mitochondrion in Sperm Function: Is There a Place for Oxidative Phosphorylation or Is This a Purely Glycolytic Process? (2007), *77*, 3–19. https://doi.org/10.1016/S0070-2153(06)77001-6
535. Ruiz-Pesini, E., Lapeña, A.-C., Díez-Sánchez, C., Pérez-Martos, A., Montoya, J., Alvarez, E., … Enríquez, J. A. (2000). Human mtDNA Haplogroups Associated with High or Reduced Spermatozoa Motility. *The American Journal of Human Genetics*, *67*(3), 682–696. https://doi.org/10.1086/303040

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/06/2024 15:10:58 EEST - 3.135.219.133

536. Ruiz-Pesini, E., Mishmar, D., Brandon, M., Procaccio, V., & Wallace, D. C. (2004). Effects of purifying and adaptive selection on regional variation in human mtDNA. *Science (New York, N.Y.)*, *303*(5655), 223–226. https://doi.org/10.1126/science.1088434
537. Ruiz-Pesini, E., Díez-Sánchez, C., López-Pérez, M. J., & Enríquez, J. A. (2007). The Role of the Mitochondrion in Sperm Function: Is There a Place for Oxidative Phosphorylation or Is This a Purely Glycolytic Process? *Current Topics in Developmental Biology*, *77*, 3–19. https://doi.org/10.1016/S0070-2153(06)77001-6
538. Ryan, M. T., & Hoogenraad, N. J. (2007). Mitochondrial-Nuclear Communications. *Annual Review of Biochemistry*, *76*(1), 701–722. https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.76.052305.091720
539. Sackton, T. B., Haney, R. A., & Rand, D. M. (2003). CYTONUCLEAR COADAPTATION IN DROSOPHILA: DISRUPTION OF CYTOCHROME C OXIDASE ACTIVITY IN BACKCROSS GENOTYPES. *Evolution*, *57*(10), 2315–2325. https://doi.org/10.1111/j.0014-3820.2003.tb00243.x
540. Saetre, G.-P., Kral, M., & Bures, S. (1997). Differential Species Recognition Abilities of Males and Females in a Flycatcher Hybrid Zone. *Journal of Avian Biology*, *28*(3), 259. https://doi.org/10.2307/3676978
541. Sagan, L. (1967). On the origin of mitosing cells. *Journal of Theoretical Biology*, *14*(3), 255–274. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11541392
542. Saito, S., Tamura, K., & Aotsuka, T. (2005). Replication origin of mitochondrial DNA in insects. *Genetics*, *171*(4), 1695–1705. https://doi.org/10.1534/genetics.105.046243
543. Sambatti, J. B. M., Ortiz-Barrientos, D., Baack, E. J., & Rieseberg, L. H. (2008). Ecological selection maintains cytonuclear incompatibilities in hybridizing sunflowers. *Ecology Letters*, *11*(10), 1082–1091. https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2008.01224.x
544. Santos, M. A. ., Moura, G., Massey, S. E., & Tuite, M. F. (2004). Driving change: the evolution of alternative genetic codes. *Trends in Genetics*, *20*(2), 95–102. https://doi.org/10.1016/J.TIG.2003.12.009
545. SANTUCCI, F., EMERSON, B. C., & HEWITT, G. M. (1998). Mitochondrial DNA phylogeography of European hedgehogs. *Molecular Ecology*, *7*(9), 1163–1172. https://doi.org/10.1046/j.1365-294x.1998.00436.x
546. Sas, K. M., Kayampilly, P., Byun, J., Nair, V., Hinder, L. M., Hur, J., … Pennathur, S. (2016). Tissue-specific metabolic reprogramming drives nutrient flux in diabetic complications. *JCI Insight*, *1*(15). https://doi.org/10.1172/jci.insight.86976
547. Sasaki, N., Kuroiwa, H., Nishitani, C., Takano, H., Higashiyama, T., Kobayashi, T., … Kuroiwa, T. (2003). Glom Is a Novel Mitochondrial DNA Packaging Protein in *Physarum polycephalum* and Causes Intense Chromatin Condensation without Suppressing DNA Functions. *Molecular Biology of the Cell*, *14*(12), 4758–4769. https://doi.org/10.1091/mbc.e03-02-0099
548. Sasarman, F., Brunel-Guitton, C., Antonicka, H., Wai, T., & Shoubridge, E. A. (2010). LRPPRC and SLIRP Interact in a Ribonucleoprotein Complex That Regulates Posttranscriptional Gene Expression in Mitochondria. *Molecular Biology of the Cell*, *21*(8), 1315–1323. https://doi.org/10.1091/mbc.e10-01-0047
549. Sato, K., Arai, N., Omori, A., Hida, A., Kimura, A., & Takeuchi, S. (2016). Hyperammonaemia and associated factors in unprovoked convulsive seizures: A cross-sectional study. *Seizure*, *43*, 6–12. https://doi.org/10.1016/j.seizure.2016.09.015
550. Savelsbergh, A., Rodnina, M. V, & Wintermeyer, W. (2009). Distinct functions of elongation factor G in ribosome recycling and translocation. *RNA (New York, N.Y.)*, *15*(5), 772–780. https://doi.org/10.1261/rna.1592509
551. Scarpulla, R. C. (2008). Transcriptional Paradigms in Mammalian Mitochondrial Biogenesis and Function. *Physiological Reviews*, *88*(2), 611–638. https://doi.org/10.1152/physrev.00025.2007
552. Scarpulla, R. C., Vega, R. B., & Kelly, D. P. (2012). Transcriptional integration of mitochondrial biogenesis. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, *23*(9), 459–466. https://doi.org/10.1016/J.TEM.2012.06.006
553. Schägger, H., & Pfeiffer, K. (2000). Supercomplexes in the respiratory chains of yeast and mammalian mitochondria. *The EMBO Journal*, *19*(8), 1777–1783. https://doi.org/10.1093/emboj/19.8.1777

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/06/2024 15:10:58 EEST - 3.135.219.133

554. Schinkel, A. H., Groot Koerkamp, M. J., Tabak, H. F., & Gustafsson, C. M. (1988). Mitochondrial RNA polymerase of Saccharomyces cerevisiae: composition and mechanism of promoter recognition. *The EMBO Journal*, *7*(10), 3255–3262. https://doi.org/10.1093/emboj/16.11.3198
555. Schmidt, O., Harbauer, A. B., Rao, S., Eyrich, B., Zahedi, R. P., Stojanovski, D., … Meisinger, C. (2011). Regulation of Mitochondrial Protein Import by Cytosolic Kinases. *Cell*, *144*(2), 227–239. https://doi.org/10.1016/J.CELL.2010.12.015
556. Schmidt, O., Pfanner, N., & Meisinger, C. (2010). Mitochondrial protein import: from proteomics to functional mechanisms. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *11*(9), 655–667. https://doi.org/10.1038/nrm2959
557. Schrader, M., & Yoon, Y. (2007). Mitochondria and peroxisomes: Are the 'Big Brother' and the 'Little Sister' closer than assumed? *BioEssays*, *29*(11), 1105–1114. https://doi.org/10.1002/bies.20659
558. Schulz, H. N., & Jørgensen, B. B. (2001). Big Bacteria. *Annual Review of Microbiology*, *55*(1), 105–137. https://doi.org/10.1146/annurev.micro.55.1.105
559. Schurr, A. (2014). Cerebral glycolysis: a century of persistent misunderstanding and misconception. *Frontiers in Neuroscience*, *8*. https://doi.org/10.3389/fnins.2014.00360
560. Schurr, A., & Gozal, E. (2015). Glycolysis at 75: is it time to tweak the first elucidated metabolic pathway in history? *Frontiers in Neuroscience*, *9*. https://doi.org/10.3389/fnins.2015.00170
561. Scott, G. R. (2015). Early insights into the evolution of respiratory and cardiovascular physiology in vertebrates. *Journal of Experimental Biology*, *218*(18), 2818–2820. https://doi.org/10.1242/jeb.109868
562. Scott, G. R., Schulte, P. M., Egginton, S., Scott, A. L. M., Richards, J. G., & Milsom, W. K. (2011). Molecular Evolution of Cytochrome c Oxidase Underlies High-Altitude Adaptation in the Bar-Headed Goose. *Molecular Biology and Evolution*, *28*(1), 351–363. https://doi.org/10.1093/molbev/msq205
563. Seidel-Rogol, B. L., McCulloch, V., & Shadel, G. S. (2003). Human mitochondrial transcription factor B1 methylates ribosomal RNA at a conserved stem-loop. *Nature Genetics*, *33*(1), 23–24. https://doi.org/10.1038/ng1064
564. Shabalina, S. A., & Koonin, E. V. (2008). Origins and evolution of eukaryotic RNA interference. *Trends in Ecology & Evolution*, *23*(10), 578–587. https://doi.org/10.1016/J.TREE.2008.06.005
565. Shadel, G. S. (2008). Expression and Maintenance of Mitochondrial DNA: New Insights into Human Disease Pathology. *The American Journal of Pathology*, *172*(6), 1445–1456. https://doi.org/10.2353/AJPATH.2008.071163
566. Shani, N., Valle, D., Thompson, M. J., Eisenberg, D., & Yeates, T. O. (1996). A Saccharomyces cerevisiae homolog of the human adrenoleukodystrophy transporter is a heterodimer of two half ATP-binding cassette transporters. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *93*(21), 11901–11906. https://doi.org/10.1073/pnas.93.21.11901
567. Sharma, M. R., Koc, E. C., Datta, P. P., Booth, T. M., Spremulli, L. L., & Agrawal, R. K. (2003). Structure of the Mammalian Mitochondrial Ribosome Reveals an Expanded Functional Role for Its Component Proteins. *Cell*, *115*(1), 97–108. https://doi.org/10.1016/S0092-8674(03)00762-1
568. Sheibani, S., Jones, N. K., Eid, R., Gharib, N., Arab, N. T. T., Titorenko, V., … Greenwood, M. T. (2015). Inhibition of stress mediated cell death by human lactate dehydrogenase B in yeast. *FEMS Yeast Research*, *15*(5), fov032. https://doi.org/10.1093/femsyr/fov032
569. Shen, Y.-Y., Liang, L., Zhu, Z.-H., Zhou, W.-P., Irwin, D. M., & Zhang, Y.-P. (2010). Adaptive evolution of energy metabolism genes and the origin of flight in bats. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *107*(19), 8666–8671. https://doi.org/10.1073/pnas.0912613107
570. Shinzawa-Itoh, K., Shimomura, H., Yanagisawa, S., Shimada, S., Takahashi, R., Oosaki, M., … Tsukihara, T. (2016). Purification of Active Respiratory Supercomplex from Bovine Heart Mitochondria Enables Functional Studies. *The Journal of Biological Chemistry*, *291*(8), 4178–4184. https://doi.org/10.1074/jbc.M115.680553
571. Shitara, H., Hayashi, J. I., Takahama, S., Kaneda, H., Yonekawa, H., & Hayashi, J.-I. (1998). Maternal inheritance of mouse mtDNA in interspecific hybrids: segregation of the leaked

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/06/2024 15:10:58 EEST - 3.135.219.133

paternal mtDNA followed by the prevention of subsequent paternal leakage. *Genetics*, *148*(2), 851–857. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9504930

572. Shutt, T. E., & Gray, M. W. (2006). Homologs of Mitochondrial Transcription Factor B, Sparsely Distributed Within the Eukaryotic Radiation, Are Likely Derived from the Dimethyladenosine Methyltransferase of the Mitochondrial Endosymbiont. *Molecular Biology and Evolution*, *23*(6), 1169–1179. https://doi.org/10.1093/molbev/msk001
573. Sicheritz-Pontén, T., Kurland, C. G., & Andersson, S. G. E. (1998). A phylogenetic analysis of the cytochrome b and cytochrome c oxidase I genes supports an origin of mitochondria from within the Rickettsiaceae. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, *1365*(3), 545–551. https://doi.org/10.1016/S0005-2728(98)00099-1
574. Sickmann, A., Reinders, J., Wagner, Y., Joppich, C., Zahedi, R., Meyer, H. E., … Meisinger, C. (2003). The proteome of Saccharomyces cerevisiae mitochondria. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *100*(23), 13207–13212. https://doi.org/10.1073/pnas.2135385100
575. Simon, D. M., & Zimmerly, S. (2008). A diversity of uncharacterized reverse transcriptases in bacteria. *Nucleic Acids Research*, *36*(22), 7219–7229. https://doi.org/10.1093/nar/gkn867
576. Simsek, D., Furda, A., Gao, Y., Artus, J., Brunet, E., Hadjantonakis, A.-K., … Jasin, M. (2011). Crucial role for DNA ligase III in mitochondria but not in Xrcc1-dependent repair. *Nature*, *471*(7337), 245–248. https://doi.org/10.1038/nature09794
577. Sinauer Associates.
578. Singh, M., & Brown, G. G. (1991). Suppression of cytoplasmic male sterility by nuclear genes alters expression of a novel mitochondrial gene region. *The Plant Cell*, *3*(12), 1349–1362. https://doi.org/10.1105/tpc.3.12.1349
579. Singh, R. P., Sastry, K. V. H., Pandey, N. K., Shit, N., Agrawal, R., Singh, K. B., … Moudgal, R. P. (2011). Characterization of lactate dehydrogenase enzyme in seminal plasma of Japanese quail (Coturnix coturnix japonica). *Theriogenology*, *75*(3), 555–562. https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2010.09.026
580. Singh, R. P., Sastry, K. V. H., Shit, N., Pandey, N. K., Singh, K. B., Mohan, J., & Moudgal, R. P. (2011). Cloacal gland foam enhances motility and disaggregation of spermatozoa in Japanese quail (Coturnix japonica). *Theriogenology*, *75*(3), 563–569. https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2010.09.028
581. Sirum-Connolly, K., & Mason, T. L. (1995). The role of nucleotide modifications in the yeast mitochondrial ribosome. *Nucleic Acids Symposium Series*, (33), 73–75. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8643404
582. Sloan, D. B., Havird, J. C., & Sharbrough, J. (2017). The on-again, off-again relationship between mitochondrial genomes and species boundaries. *Molecular Ecology*, *26*(8), 2212–2236. https://doi.org/10.1111/mec.13959
583. Smadja, C. M., Loire, E., Caminade, P., Thoma, M., Latour, Y., Roux, C., … Boursot, P. (2015). Seeking signatures of reinforcement at the genetic level: a hitchhiking mapping and candidate gene approach in the house mouse. *Molecular Ecology*, *24*(16), 4222–4237. https://doi.org/10.1111/mec.13301
584. Small, I., Akashi, K., Chapron, A., Dietrich, A., Duchene, A.-M., Lancelin, D., … Wintz, H. (1999). The strange evolutionary history of plant mitochondrial tRNAs and their aminoacyl-tRNA synthetases. *Journal of Heredity*, *90*(3), 333–337. https://doi.org/10.1093/jhered/90.3.333
585. Smith, J. M., Smith, N. H., O'Rourke, M., & Spratt, B. G. (1993). How clonal are bacteria? *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *90*(10), 4384–4388. https://doi.org/10.1073/PNAS.90.10.4384
586. SMITH, S., TURBILL, C., & SUCHENTRUNK, F. (2010). Introducing mother's curse: low male fertility associated with an imported mtDNA haplotype in a captive colony of brown hares. *Molecular Ecology*, *19*(1), 36–43. https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2009.04444.x
587. Smits, P., Smeitink, J., & van den Heuvel, L. (2010). Mitochondrial translation and beyond: processes implicated in combined oxidative phosphorylation deficiencies. *Journal of Biomedicine & Biotechnology*, *2010*, 737385. https://doi.org/10.1155/2010/737385

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/06/2024 15:10:58 EEST - 3.135.219.133

588. Soanes, D., & Richards, T. A. (2014). Horizontal Gene Transfer in Eukaryotic Plant Pathogens. *Annual Review of Phytopathology*, *52*(1), 583–614. https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-102313-050127
589. Society for General Microbiology. Symposium (54th : 1996 : University of Warwick), & Roberts, D. M. (David M. (1996). *Evolution of microbial life : Fifty-fourth Symposium of the Society for General Microbiology held at the University of Warwick, March 1996*. Cambridge University Press. Retrieved from https://books.google.gr/books?hl=el&lr=&id=R2ldCb0VrxgC&oi=fnd&pg=PA109&dq=Gray+%26+Spencer+1996+ricketsia&ots=0_pguTnmit&sig=CyLf9f9k2fuO1O7igoQEu2tdFzQ&redir_esc=y#v=onepage&q=Gray %26 Spencer 1996 ricketsia&f=false
590. Soleimanpour-Lichaei, H. R., Kühl, I., Gaisne, M., Passos, J. F., Wydro, M., Rorbach, J., … Chrzanowska-Lightowlers, Z. (2007). mtRF1a Is a Human Mitochondrial Translation Release Factor Decoding the Major Termination Codons UAA and UAG. *Molecular Cell*, *27*(5), 745–757. https://doi.org/10.1016/j.molcel.2007.06.031
591. Somero, G. N. (2002). Thermal Physiology and Vertical Zonation of Intertidal Animals: Optima, Limits, and Costs of Living. *Integrative and Comparative Biology*, *42*(4), 780–789. https://doi.org/10.1093/icb/42.4.780
592. Sorenson, M. D., & Fleischer, R. C. (1996). Multiple independent transpositions of mitochondrial DNA control region sequences to the nucleus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *93*(26), 15239–15243. https://doi.org/10.1073/PNAS.93.26.15239
593. Spang, A., Saw, J. H., Jørgensen, S. L., Zaremba-Niedzwiedzka, K., Martijn, J., Lind, A. E., … Ettema, T. J. G. (2015). Complex archaea that bridge the gap between prokaryotes and eukaryotes. *Nature*, *521*(7551), 173–179. https://doi.org/10.1038/nature14447
594. Spelbrink, J. N., Li, F.-Y., Tiranti, V., Nikali, K., Yuan, Q.-P., Tariq, M., … Larsson, C. (2001). Human mitochondrial DNA deletions associated with mutations in the gene encoding Twinkle, a phage T7 gene 4-like protein localized in mitochondria. *Nature Genetics*, *28*(3), 223–231. https://doi.org/10.1038/90058
595. Sperl, W., Ješina, P., Zeman, J., Mayr, J. A., DeMeirleir, L., VanCoster, R., … Houštěk, J. (2006). Deficiency of mitochondrial ATP synthase of nuclear genetic origin. *Neuromuscular Disorders*, *16*(12), 821–829. https://doi.org/10.1016/j.nmd.2006.08.008
596. Spirek, M, Polakova, S, Jatzova, K, Sulo, P. (2015). Post-zygotic sterility and cytonuclear compatibility limits in S. cerevisiae xenomitochondrial cybrids. *Frontiers in Genetics*, *5*, 454. https://doi.org/10.3389/fgene.2014.00454
597. Stamatis, C., Suchentrunk, F., Moutou, K. A., Giacometti, M., Haerer, G., Djan, M., … Mamuris, Z. (2009). Phylogeography of the brown hare (*Lepus europaeus*) in Europe: a legacy of south-eastern Mediterranean refugia? *Journal of Biogeography*, *36*(3), 515–528. https://doi.org/10.1111/j.1365-2699.2008.02013.x
598. Stewart, J. B., & Beckenbach, A. T. (2009). Characterization of mature mitochondrial transcripts in Drosophila, and the implications for the tRNA punctuation model in arthropods. *Gene*, *445*(1–2), 49–57. https://doi.org/10.1016/J.GENE.2009.06.006
599. Stewart, J. B., Freyer, C., Elson, J. L., Wredenberg, A., Cansu, Z., Trifunovic, A., & Larsson, N.-G. (2008). Strong Purifying Selection in Transmission of Mammalian Mitochondrial DNA. *PLoS Biology*, *6*(1), e10. https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0060010
600. Stier, A., Bize, P., Habold, C., Bouillaud, F., Massemin, S., & Criscuolo, F. (2014). Mitochondrial uncoupling prevents cold-induced oxidative stress: a case study using UCP1 knockout mice. *The Journal of Experimental Biology*, *217*(Pt 4), 624–630. https://doi.org/10.1242/jeb.092700
601. Stier, A., Bize, P., Roussel, D., Schull, Q., Massemin, S., & Criscuolo, F. (2014). Mitochondrial uncoupling as a regulator of life-history trajectories in birds: an experimental study in the zebra finch. *Journal of Experimental Biology*, *217*(19), 3579–3589. https://doi.org/10.1242/jeb.103945
602. Stier, A., Massemin, S., & Criscuolo, F. (2014). Chronic mitochondrial uncoupling treatment prevents acute cold-induced oxidative stress in birds. *Journal of Comparative Physiology B*, *184*(8), 1021–1029. https://doi.org/10.1007/s00360-014-0856-6

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/06/2024 15:10:58 EEST - 3.135.219.133

603. Stock, D., Leslie, A. G., & Walker, J. E. (1999). Molecular architecture of the rotary motor in ATP synthase. *Science (New York, N.Y.)*, *286*(5445), 1700–1705. https://doi.org/10.1126/SCIENCE.286.5445.1700
604. Stoeckle, M. Y., & Thaler, D. S. (2014). DNA Barcoding Works in Practice but Not in (Neutral) Theory. *PLoS ONE*, *9*(7), e100755. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0100755
605. Storey, B. T. (2008). Mammalian sperm metabolism: oxygen and sugar, friend and foe. *The International Journal of Developmental Biology*, *52*(5–6), 427–437. https://doi.org/10.1387/ijdb.072522bs
606. Storey, B. T., & Kayne, F. J. (1977). Energy metabolism of spermatozoa. VI. Direct intramitochondrial lactate oxidation by rabbit sperm mitochondria. *Biology of Reproduction*, *16*(4), 549–556. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/192355
607. Stroud, D. A., Surgenor, E. E., Formosa, L. E., Reljic, B., Frazier, A. E., Dibley, M. G., … Ryan, M. T. (2016). Accessory subunits are integral for assembly and function of human mitochondrial complex I. *Nature*, *538*(7623), 123–126. https://doi.org/10.1038/nature19754
608. Stumpf, J. D., & Copeland, W. C. (2011). Mitochondrial DNA replication and disease: insights from DNA polymerase γ mutations. *Cellular and Molecular Life Sciences*, *68*(2), 219–233. https://doi.org/10.1007/s00018-010-0530-4
609. Summation of quaternary glaciations in the United States of America. (1986). *Quaternary Science Reviews*, *5*, 183–196. https://doi.org/10.1016/0277-3791(86)90184-8
610. Sun, F., Huo, X., Zhai, Y., Wang, A., Xu, J., Su, D., … Rao, Z. (2005). Crystal Structure of Mitochondrial Respiratory Membrane Protein Complex II. *Cell*, *121*(7), 1043–1057. https://doi.org/10.1016/J.CELL.2005.05.025
611. Surkont, J., & Pereira-Leal, J. B. (2016). Are There Rab GTPases in Archaea? *Molecular Biology and Evolution*, *33*(7), 1833–1842. https://doi.org/10.1093/molbev/msw061
612. Susin, S. A., Lorenzo, H. K., Zamzami, N., Marzo, I., Brenner, C., Larochette, N., … Kroemer, G. (1999). Mitochondrial release of caspase-2 and -9 during the apoptotic process. *The Journal of Experimental Medicine*, *189*(2), 381–394. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9892620
613. Susulic, V. S., Frederich, R. C., Lawitts, J., Tozzo, E., Kahn, B. B., Harper, M.-E., … Lowell, B. B. (1995). Targeted Disruption of the β_3-Adrenergic Receptor Gene. *Journal of Biological Chemistry*, *270*(49), 29483–29492. https://doi.org/10.1074/jbc.270.49.29483
614. Suzuki, H., Ueda, T., Taguchi, H., & Takeuchi, N. (2007). Chaperone properties of mammalian mitochondrial translation elongation factor Tu. *The Journal of Biological Chemistry*, *282*(6), 4076–4084. https://doi.org/10.1074/jbc.M608187200
615. Swanson, D. L., & Garland, Jr., T. (2009). THE EVOLUTION OF HIGH SUMMIT METABOLISM AND COLD TOLERANCE IN BIRDS AND ITS IMPACT ON PRESENT-DAY DISTRIBUTIONS. *Evolution*, *63*(1), 184–194. https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.2008.00522.x
616. Szklarczyk, R., & Huynen, M. A. (2010). Mosaic origin of the mitochondrial proteome. *PROTEOMICS*, *10*(22), 4012–4024. https://doi.org/10.1002/pmic.201000329
617. TABERLET, P., FUMAGALLI, L., WUST-SAUCY, A.-G., & COSSON, J.-F. (1998). Comparative phylogeography and postglacial colonization routes in Europe. *Molecular Ecology*, *7*(4), 453–464. https://doi.org/10.1046/j.1365-294x.1998.00289.x
618. Tang, Y., Manfredi, G., Hirano, M., & Schon, E. A. (2000). Maintenance of Human Rearranged Mitochondrial DNAs in Long-Term Cultured Transmitochondrial Cell Lines. *Molecular Biology of the Cell*, *11*(7), 2349–2358. https://doi.org/10.1091/mbc.11.7.2349
619. Tang, Y., Schon, E. A., Wilichowski, E., Vazquez-Memije, M. E., Davidson, E., & King, M. P. (2000). Rearrangements of Human Mitochondrial DNA (mtDNA): New Insights into the Regulation of mtDNA Copy Number and Gene Expression. *Molecular Biology of the Cell*, *11*(4), 1471–1485. https://doi.org/10.1091/mbc.11.4.1471
620. Tani, A., Inoue, C., Tanaka, Y., Yamamoto, Y., Kondo, H., Hiradate, S., … Kawai, F. (2008). The crucial role of mitochondrial regulation in adaptive aluminium resistance in Rhodotorula glutinis. *Microbiology*, *154*(11), 3437–3446. https://doi.org/10.1099/mic.0.2007/016048-0
621. Tavares, E. S., & Baker, A. J. (2008). Single mitochondrial gene barcodes reliably identify sister-species in diverse clades of birds. *BMC Evolutionary Biology*, *8*(1), 81. https://doi.org/10.1186/1471-2148-8-81

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/06/2024 15:10:58 EEST - 3.135.219.133

622. Taylor, S. D., Zhang, H., Eaton, J. S., Rodeheffer, M. S., Lebedeva, M. A., O'Rourke, T. W., … Shadel, G. S. (2005). The Conserved Mec1/Rad53 Nuclear Checkpoint Pathway Regulates Mitochondrial DNA Copy Number in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Biology of the Cell*, *16*(6), 3010–3018. https://doi.org/10.1091/mbc.e05-01-0053
623. Templeton, A. R. (1981). Mechanisms of Speciation - A Population Genetic Approach. *Annual Review of Ecology and Systematics*, *12*(1), 23–48. https://doi.org/10.1146/annurev.es.12.110181.000323
624. Templeton, A. R. (2008). The reality and importance of founder speciation in evolution. *BioEssays*, *30*(5), 470–479. https://doi.org/10.1002/bies.20745
625. Thiergart, T., Landan, G., Schenk, M., Dagan, T., & Martin, W. F. (2012). An Evolutionary Network of Genes Present in the Eukaryote Common Ancestor Polls Genomes on Eukaryotic and Mitochondrial Origin. *Genome Biology and Evolution*, *4*(4), 466–485. https://doi.org/10.1093/gbe/evs018
626. Thorsness, P. E., & Fox, T. D. (1990). Escape of DNA from mitochondria to the nucleus in Saccharomyces cerevisiae. *Nature*, *346*(6282), 376–379. https://doi.org/10.1038/346376a0
627. Thorsness, P. E., & Fox, T. D. (1993). Nuclear mutations in Saccharomyces cerevisiae that affect the escape of DNA from mitochondria to the nucleus. *Genetics*, *134*(1).
628. Thundathil, J., Filion, F., & Smith, L. C. (2005). Molecular control of mitochondrial function in preimplantation mouse embryos. *Molecular Reproduction and Development*, *71*(4), 405–413. https://doi.org/10.1002/mrd.20260
629. Timón-Gómez, A., Sanfeliu-Redondo, D., Pascual-Ahuir, A., & Proft, M. (2018). Regulation of the Stress-Activated Degradation of Mitochondrial Respiratory Complexes in Yeast. *Frontiers in Microbiology*, *9*, 106. https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00106
630. Tiranti, V., Savoia, A., Forti, F., D'Apolito, M.-F., Centra, M., Rocchi, M., & Zeviani, M. (1997). Identification of the gene encoding the human mitochondrial RNA polymerase (h-mtRPOL) by cyberscreening of the Expressed Sequence Tags database. *Human Molecular Genetics*, *6*(4), 615–625. https://doi.org/10.1093/hmg/6.4.615
631. Todd, J. J. (2014). Lactate: valuable for physical performance and maintenance of brain function during exercise. *Bioscience Horizons*, *7*(0), hzu001-hzu001. https://doi.org/10.1093/biohorizons/hzu001
632. Tourmente, M., Villar-Moya, P., Rial, E., & Roldan, E. R. S. (2015). Differences in ATP Generation Via Glycolysis and Oxidative Phosphorylation and Relationships with Sperm Motility in Mouse Species. *The Journal of Biological Chemistry*, *290*(33), 20613–20626. https://doi.org/10.1074/jbc.M115.664813
633. Trounce, I., Neill, S., Wallace, D. C., Shuster, R., Wallace, D. C., Hosseini, S., … Wallace, D. C. (1994). Cytoplasmic transfer of the mtDNA nt 8993 T-->G (ATP6) point mutation associated with Leigh syndrome into mtDNA-less cells demonstrates cosegregation with a decrease in state III respiration and ADP/O ratio. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *91*(18), 8334–8338. https://doi.org/10.1073/pnas.91.18.8334
634. Tsuboi, M., Morita, H., Nozaki, Y., Akama, K., Ueda, T., Ito, K., … Takeuchi, N. (2009). EF-G2mt Is an Exclusive Recycling Factor in Mammalian Mitochondrial Protein Synthesis. *Molecular Cell*, *35*(4), 502–510. https://doi.org/10.1016/J.MOLCEL.2009.06.028
635. Tsukihara, T., Aoyama, H., Yamashita, E., Tomizaki, T., Yamaguchi, H., Shinzawa-Itoh, K., … Tsukihara, T. (1996). The Whole Structure of the 13-Subunit Oxidized Cytochrome c Oxidase at 2.8 A. *Science*, *272*(5265), 1136–1144. https://doi.org/10.1126/science.272.5265.1136
636. Tsukihara, T., Aoyama, H., Yamashita, E., Tomizaki, T., Yamaguchi, H., Shinzawa-Itoh, K., … Yoshikawa, S. (1995). Structures of metal sites of oxidized bovine heart cytochrome c oxidase at 2.8 A. *Science*, *269*(5227), 1069–1074. https://doi.org/10.1126/science.7652554
637. Tucker, E. J., Hershman, S. G., Köhrer, C., Belcher-Timme, C. A., Patel, J., Goldberger, O. A., … Mootha, V. K. (2011). Mutations in MTFMT Underlie a Human Disorder of Formylation Causing Impaired Mitochondrial Translation. *Cell Metabolism*, *14*(3), 428–434. https://doi.org/10.1016/J.CMET.2011.07.010
638. Turelli, M., & Moyle, L. C. (2007). Published Articles Ahead of Print. *Genetics*, 10. https://doi.org/10.1534/genetics.106.065979

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/06/2024 15:10:58 EEST - 3.135.219.133

639. Turner, T. T., Bang, H. J., Attipoe, S. A., Johnston, D. S., & Tomsig, J. L. (2006). Sonic Hedgehog Pathway Inhibition Alters Epididymal Function as Assessed by the Development of Sperm Motility. *Journal of Andrology*, *27*(2), 225–232. https://doi.org/10.2164/jandrol.05114
640. Tyynismaa, H., Sembongi, H., Bokori-Brown, M., Granycome, C., Ashley, N., Poulton, J., … Suomalainen, A. (2004). Twinkle helicase is essential for mtDNA maintenance and regulates mtDNA copy number. *Human Molecular Genetics*, *13*(24), 3219–3227. https://doi.org/10.1093/hmg/ddh342
641. Unseld, M., Marienfeld, J. R., Brandt, P., & Brennicke, A. (1997). The mitochondrial genome of Arabidopsis thaliana contains 57 genes in 366,924 nucleotides. *Nature Genetics*, *15*(1), 57–61. https://doi.org/10.1038/ng0197-57
642. Uzzell, T., & Spolsky, C. (n.d.). Mitochondria and Plastids as Endosymbionts: A Revival of Special Creation? The similarities between cellular organelles and prokaryotes are probably primitive features retained independently from a common ancestor. *American Scientist*. Sigma Xi, The Scientific Research Honor Society. https://doi.org/10.2307/27844887
643. Valente, L., Tiranti, V., Marsano, R. M., Malfatti, E., Fernandez-Vizarra, E., Donnini, C., … Zeviani, M. (2007). Infantile Encephalopathy and Defective Mitochondrial DNA Translation in Patients with Mutations of Mitochondrial Elongation Factors EFG1 and EFTu. *The American Journal of Human Genetics*, *80*(1), 44–58. https://doi.org/10.1086/510559
644. van Dam, T. J. P., Bos, J., & Snel, B. (2011). Evolution of the Ras-like small GTPases and their regulators. *Small GTPases*, *2*(1), 4–16. https://doi.org/10.4161/sgtp.2.1.15113
645. van der Sluis, E. O., Bauerschmitt, H., Becker, T., Mielke, T., Frauenfeld, J., Berninghausen, O., … Beckmann, R. (2015). Parallel Structural Evolution of Mitochondrial Ribosomes and OXPHOS Complexes. *Genome Biology and Evolution*, *7*(5), 1235–1251. https://doi.org/10.1093/gbe/evv061
646. van Loon, A. P., Schatz, G., Tzagoloff, A., Stuart, R., & Schägger, H. (1987). Transport of proteins to the mitochondrial intermembrane space: the “sorting” domain of the cytochrome c1 presequence is a stop-transfer sequence specific for the mitochondrial inner membrane. *The EMBO Journal*, *6*(8), 2441–2448. https://doi.org/10.1093/emboj/17.24.7170
647. van Nederveen, F. H., Gaal, J., Favier, J., Korpershoek, E., Oldenburg, R. A., de Bruyn, E. M., … Dinjens, W. N. (2009). An immunohistochemical procedure to detect patients with paraganglioma and phaeochromocytoma with germline SDHB, SDHC, or SDHD gene mutations: a retrospective and prospective analysis. *The Lancet Oncology*, *10*(8), 764–771. https://doi.org/10.1016/S1470-2045(09)70164-0
648. Vats, P., Shih, Y.-L., & Rothfield, L. (2009). Assembly of the MreB-associated cytoskeletal ring of Escherichia coli. *Molecular Microbiology*, *72*(1), 170–182. https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2009.06632.x
649. Venu Prasa, M. P., & Khanum, F. (2012). Antifatigue Activity of Ethanolic Extract of Ocimum sanctum in Rats. *Research Journal of Medicinal Plant*, *6*(1), 37–46. https://doi.org/10.3923/rjmp.2012.37.46
650. Viale, A. M., & Arakaki, A. K. (1994). The chaperone connection to the origins of the eukaryotic organelles. *FEBS Letters*, *341*(2–3), 146–151. https://doi.org/10.1016/0014-5793(94)80446-X
651. Villani, G., & Attardi, G. (1997). In vivo control of respiration by cytochrome c oxidase in wild-type and mitochondrial DNA mutation-carrying human cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *94*(4), 1166–1171. https://doi.org/10.1073/PNAS.94.4.1166
652. von Dohlen, C. D., Kohler, S., Alsop, S. T., & McManus, W. R. (2001). Mealybug β-proteobacterial endosymbionts contain γ-proteobacterial symbionts. *Nature*, *412*(6845), 433–436. https://doi.org/10.1038/35086563
653. Wade, M. J., & Brandvain, Y. (2009). REVERSING MOTHER’S CURSE: SELECTION ON MALE MITOCHONDRIAL FITNESS EFFECTS. *Evolution*, *63*(4), 1084–1089. https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.2009.00614.x
654. Wai, T., Ao, A., Zhang, X., Cyr, D., Dufort, D., & Shoubridge, E. A. (2010). The Role of Mitochondrial DNA Copy Number in Mammalian Fertility1. *Biology of Reproduction*, *83*(1), 52–62. https://doi.org/10.1095/biolreprod.109.080887

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/06/2024 15:10:58 EEST - 3.135.219.133

655. Wai, T., Teoli, D., & Shoubridge, E. A. (2008). The mitochondrial DNA genetic bottleneck results from replication of a subpopulation of genomes. *Nature Genetics*, *40*(12), 1484–1488. https://doi.org/10.1038/ng.258
656. Walker, J. E., Collinson, I. R., Van Raaij, M. J., & Runswick, M. J. (1995). Structural analysis of ATP synthase from bovine heart mitochondria. *Methods in Enzymology*, *260*, 163–190. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8592443
657. Wallace, A. R., & Wallace, A. R. (1889). *A narrative of travels on the Amazon and Rio Negro : with an account of the native tribes, and observations of the climate, geology, and natural history of the Amazon Valley / by Alfred Russel Wallace ; with a biographical introduction by the editor.* (2d ed.). London ; Ward, Lock,. https://doi.org/10.5962/bhl.title.2764
658. Wallace, D. C. (2005). Mitochondria and cancer: Warburg addressed. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, *70*, 363–374. https://doi.org/10.1101/sqb.2005.70.035
659. Wallace, D. C. (2007). Why Do We Still Have a Maternally Inherited Mitochondrial DNA? Insights from Evolutionary Medicine. *Annual Review of Biochemistry*, *76*(1), 781–821. https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.76.081205.150955
660. Wallace, D. C. (2010). Mitochondrial DNA mutations in disease and aging. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, *51*(5), n/a-n/a. https://doi.org/10.1002/em.20586
661. Wallace, D. C. (2013). A mitochondrial bioenergetic etiology of disease. *The Journal of Clinical Investigation*, *123*(4), 1405–1412. https://doi.org/10.1172/JCI61398
662. Wallace, D. C., & Chalkia, D. (2013). Mitochondrial DNA genetics and the heteroplasmy conundrum in evolution and disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, *5*(11), a021220. https://doi.org/10.1101/cshperspect.a021220
663. Wang, J. L., Liu, D., Zhang, Z. J., Shan, S., Han, X., Srinivasula, S. M., … Huang, Z. (2000). Structure-based discovery of an organic compound that binds Bcl-2 protein and induces apoptosis of tumor cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *97*(13), 7124–7129. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10860979
664. Wang, J.-C., Gray, N. E., Kuo, T., & Harris, C. A. (2012). Regulation of triglyceride metabolism by glucocorticoid receptor. *Cell & Bioscience*, *2*(1), 19. https://doi.org/10.1186/2045-3701-2-19
665. Wang, J., Li, S., Fan, Y., Chen, Y., Liu, D., Cheng, H., … Zhou, Y. (2010). Anti-fatigue activity of the water-soluble polysaccharides isolated from Panax ginseng C. A. Meyer. *Journal of Ethnopharmacology*, *130*(2), 421–423. https://doi.org/10.1016/j.jep.2010.05.027
666. Wang, J., Sun, C., Zheng, Y., Pan, H., Zhou, Y., & Fan, Y. (2014). The effective mechanism of the polysaccharides from Panax ginseng on chronic fatigue syndrome. *Archives of Pharmacal Research*, *37*(4), 530–538. https://doi.org/10.1007/s12272-013-0235-y
667. Wang, Z. G., & Ackerman, S. H. (2000). The assembly factor Atp11p binds to the beta-subunit of the mitochondrial F(1)-ATPase. *The Journal of Biological Chemistry*, *275*(8), 5767–5772. https://doi.org/10.1074/JBC.275.8.5767
668. Wang, Z., Cotney, J., & Shadel, G. S. (2007). Human Mitochondrial Ribosomal Protein MRPL12 Interacts Directly with Mitochondrial RNA Polymerase to Modulate Mitochondrial Gene Expression. *Journal of Biological Chemistry*, *282*(17), 12610–12618. https://doi.org/10.1074/jbc.M700461200
669. Wanrooij, S., Fusté, J. M., Farge, G., Shi, Y., Gustafsson, C. M., & Falkenberg, M. (2008). Human mitochondrial RNA polymerase primes lagging-strand DNA synthesis in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *105*(32), 11122–11127. https://doi.org/10.1073/pnas.0805399105
670. Watanabe, K., & Yokobori, S.-I. (2011). tRNA Modification and Genetic Code Variations in Animal Mitochondria. *Journal of Nucleic Acids*, *2011*, 623095. https://doi.org/10.4061/2011/623095
671. Weathers, W. W. (1979). Climatic adaptation in Svian standard metabolic rate. *Oecologia*, *42*(1), 81–89. https://doi.org/10.1007/BF00347620
672. Weber, J.-M., Rayner, J. M., Moller, U., Jackson, D. M., Nachtigall, W., Speakman, J. R., … Margreiter, R. (2009). The physiology of long-distance migration: extending the limits of endurance metabolism. *Journal of Experimental Biology*, *212*(5), 593–597. https://doi.org/10.1242/jeb.015024

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/06/2024 15:10:58 EEST - 3.135.219.133

673. Wenz, T., Luca, C., Torraco, A., & Moraes, C. T. (2009). RETRACTED: mTERF2 Regulates Oxidative Phosphorylation by Modulating mtDNA Transcription. *Cell Metabolism*, *9*(6), 499–511. https://doi.org/10.1016/J.CMET.2009.04.010
674. White, C., Alton, L., B, P. F.-P. R. S., & 2011, undefined. (n.d.). Metabolic cold adaptation in fishes occurs at the level of whole animal, mitochondria and enzyme. *Rspb.Royalsocietypublishing.Org*. Retrieved from http://rspb.royalsocietypublishing.org/content/early/2011/11/28/rspb.2011.2060.short
675. Wiedemann, N., & Pfanner, N. (2017). Mitochondrial Machineries for Protein Import and Assembly. *Annual Review of Biochemistry*, *86*(1), 685–714. https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-060815-014352
676. Wiley EO (1978) The evolutionary species concept reconsidered. SystZool 27:17–26
677. Williams, T. A., & Embley, T. M. (2014). Archaeal "Dark Matter" and the Origin of Eukaryotes. *Genome Biology and Evolution*, *6*(3), 474–481. https://doi.org/10.1093/gbe/evu031
678. Williams, T. A., Foster, P. G., Cox, C. J., & Embley, T. M. (2013). An archaeal origin of eukaryotes supports only two primary domains of life. *Nature*, *504*(7479), 231–236. https://doi.org/10.1038/nature12779
679. Williams, T. A., Foster, P. G., Nye, T. M. W., Cox, C. J., & Embley, T. M. (2012). A congruent phylogenomic signal places eukaryotes within the Archaea. *Proceedings. Biological Sciences*, *279*(1749), 4870–4879. https://doi.org/10.1098/rspb.2012.1795
680. Woese, C. R., & Martin, W. (2000). Interpreting the universal phylogenetic tree. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *97*(15), 8392–8396. https://doi.org/10.1073/pnas.97.15.8392
681. Woese, C. R., Kandler, O., & Wheelis, M. L. (1990). Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *87*(12), 4576–4579. https://doi.org/10.1073/PNAS.87.12.4576
682. Woischnik, M., & Moraes, C. T. (2002). Pattern of organization of human mitochondrial pseudogenes in the nuclear genome. *Genome Research*, *12*(6), 885–893. https://doi.org/10.1101/gr.227202
683. Wolff, J. N., & Gemmell, N. J. (2013). Mitochondria, maternal inheritance, and asymmetric fitness: Why males die younger. *BioEssays*, *35*(2), 93–99. https://doi.org/10.1002/bies.201200141
684. Wolff, J. N., Ladoukakis, E. D., Enríquez, J. A., & Dowling, D. K. (2014). Mitonuclear interactions: evolutionary consequences over multiple biological scales. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, *369*(1646), 20130443. https://doi.org/10.1098/rstb.2013.0443
685. Wolstenholme,DR (1992). Animal Mitochondrial DNA: Structure and Evolution.*International Review of Cytology*, *141*, 173–216. https://doi.org/10.1016/S0074-7696(08)62066-5
686. Woodson, J. D., & Chory, J. (2008). Coordination of gene expression between organellar and nuclear genomes. *Nature Reviews Genetics*, *9*(5), 383–395. https://doi.org/10.1038/nrg2348
687. Wujek, D. E. (1979). Intracellular Bacteria in the Blue-Green Alga Pleurocapsa minor. *Transactions of the American Microscopical Society*, *98*(1), 143. https://doi.org/10.2307/3225953
688. Yang, D., Oyaizu, Y., Oyaizu, H., Olsen, G. J., & Woese, C. R. (1985). Mitochondrial origins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *82*(13), 4443–4447. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3892535
689. Yee, W. K. W., Sutton, K. L., & Dowling, D. K. (2013). In vivo male fertility is affected by naturally occurring mitochondrial haplotypes. *Current Biology*, *23*(2), R55–R56. https://doi.org/10.1016/J.CUB.2012.12.002
690. Yeste, M., Estrada, E., Rocha, L. G., Marín, H., Rodríguez-Gil, J. E., & Miró, J. (2015). Cryotolerance of stallion spermatozoa is related to ROS production and mitochondrial membrane potential rather than to the integrity of sperm nucleus. *Andrology*, *3*(2), 395–407. https://doi.org/10.1111/ANDR.291

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/06/2024 15:10:58 EEST - 3.135.219.133

691. Ylikallio, E., Tyynismaa, H., Tsutsui, H., Ide, T., & Suomalainen, A. (2010). High mitochondrial DNA copy number has detrimental effects in mice. *Human Molecular Genetics*, *19*(13), 2695–2705. https://doi.org/10.1093/hmg/ddq163
692. Yoshikawa, S., Shinzawa-Itoh, K., Nakashima, R., Yaono, R., Yamashita, E., Inoue, N., … Tsukihara, T. (1998). Redox-coupled crystal structural changes in bovine heart cytochrome c oxidase. *Science (New York, N.Y.)*, *280*(5370), 1723–1729. https://doi.org/10.1126/SCIENCE.280.5370.1723
693. Yu, J., Wang, Y., Li, Z., Dong, S., Wang, D., Gong, L., … Mu, R. (2016). Effect of Heme Oxygenase-1 on Mitofusin-1 protein in LPS-induced ALI/ARDS in rats. *Scientific Reports*, *6*(1), 36530. https://doi.org/10.1038/srep36530
694. Yutin, N., Puigbò, P., Koonin, E. V., & Wolf, Y. I. (2012). Phylogenomics of Prokaryotic Ribosomal Proteins. *PLoS ONE*, *7*(5), e36972. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0036972
695. Yutin, N., Wolf, M. Y., Wolf, Y. I., & Koonin, E. V. (2009). The origins of phagocytosis and eukaryogenesis. *Biology Direct*, *4*(1), 9. https://doi.org/10.1186/1745-6150-4-9
696. Zachos, F. E. (2016). A Brief History of Species Concepts and the Species Problem. In *Species Concepts in Biology* (pp. 17–44). Cham: Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-44966-1_2
697. Zainal Ariffin, S. H., Yamamoto, Z., Zainol Abidin, Intan Z., Megat Abdul Wahab, R., & Zainal Ariffin, Z. (2011). Cellular and Molecular Changes in Orthodontic Tooth Movement. *The Scientific World JOURNAL*, *11*, 1788–1803. https://doi.org/10.1100/2011/761768
698. Zara, V., Conte, L., & Trumpower, B. L. (2009). Biogenesis of the yeast cytochrome bc1 complex. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, *1793*(1), 89–96. https://doi.org/10.1016/J.BBAMCR.2008.04.011
699. Zardoya, R., & Meyer, A. (1996). Phylogenetic performance of mitochondrial protein-coding genes in resolving relationships among vertebrates. *Molecular Biology and Evolution*, *13*(7), 933–942. https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a025661
700. Zaremba-Niedzwiedzka, K., Caceres, E. F., Saw, J. H., Bäckström, D., Juzokaite, L., Vancaester, E., … Ettema, T. J. G. (2017). Asgard archaea illuminate the origin of eukaryotic cellular complexity. *Nature*, *541*(7637), 353–358. https://doi.org/10.1038/nature21031
701. Zhang, D.-X., & Hewitt, G. M. (1997). Insect mitochondrial control region: A review of its structure, evolution and usefulness in evolutionary studies. *Biochemical Systematics and Ecology*, *25*(2), 99–120. https://doi.org/10.1016/S0305-1978(96)00042-7
702. Zhang, F., & Broughton, R. E. (2013). Mitochondrial–Nuclear Interactions: Compensatory Evolution or Variable Functional Constraint among Vertebrate Oxidative Phosphorylation Genes? *Genome Biology and Evolution*, *5*(10), 1781–1791. https://doi.org/10.1093/gbe/evt129
703. Zhang, J., & Yang, J.-R. (2015). Determinants of the rate of protein sequence evolution. *Nature Reviews Genetics*, *16*(7), 409–420. https://doi.org/10.1038/nrg3950
704. Zhang, X., Shen, J., Cao, B., Xu, L., Zhao, T., Liu, X., & Zhang, H. (2013). Metabolomic investigation of Arthus reaction in a rat model using proton nuclear magnetic resonance (1H NMR) spectroscopy and rapid resolution liquid chromatography (RRLC). *Molecular BioSystems*, *9*(6), 1423. https://doi.org/10.1039/c3mb25412g
705. Zhang, X., Xu, L., Shen, J., Cao, B., Cheng, T., Zhao, T., … Zhang, H. (2013). Metabolic signatures of esophageal cancer: NMR-based metabolomics and UHPLC-based focused metabolomics of blood serum. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, *1832*(8), 1207–1216. https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2013.03.009
706. Zhang, Y., & Spremulli, L. L. (1998). Identification and cloning of human mitochondrial translational release factor 1 and the ribosome recycling factor. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression*, *1443*(1–2), 245–250. https://doi.org/10.1016/S0167-4781(98)00223-1
707. Zhou, R., Yazdi, A. S., Menu, P., & Tschopp, J. (2011). A role for mitochondria in NLRP3 inflammasome activation. *Nature*, *469*(7329), 221–225. https://doi.org/10.1038/nature09663
708. Zíková, A., Kopečná, J., Schumacher, M. A., Stuart, K., Trantírek, L., & Lukeš, J. (2008). Structure and function of the native and recombinant mitochondrial MRP1/MRP2 complex

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/06/2024 15:10:58 EEST - 3.135.219.133

from Trypanosoma brucei. *International Journal for Parasitology*, *38*(8–9), 901–912. https://doi.org/10.1016/J.IJPARA.2007.12.009

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/06/2024 15:10:58 EEST - 3.135.219.133