

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ  
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ  
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟΣ ΤΙΤΛΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

ΤΙΤΛΟΣ: «**Εξέλιξη και μεταλλαγή μικροδορυφόρων στην τσιπούρα  
(*Sparus aurata*)**»

ΕΜΜΑΝΟΥΗΛ ΔΕΡΜΙΤΖΑΚΗΣ

ΣΕΠΤΕΜΒΡΙΟΣ 1998

ΣΥΜΒΟΥΛΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: ΕΛΕΥΘΕΡΙΟΣ ΖΟΥΡΟΣ.

ΗΡΑΚΛΕΙΟ 1998

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΓΕΝΙΚΗ ΕΙΣΑΓΩΓΗ	2
ΑΡΝΗΤΙΚΗ ΣΥΜΕΤΑΒΛΗΤΟΤΗΤΑ ΜΕΤΑΞΥ ΔΥΟ ΣΥΝΔΕΔΕΜΕΝΩΝ ΜΙΚΡΟΔΟΥΦΟΡΩΝ	
ΕΙΣΑΓΩΓΗ	6
ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	8
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	12
ΣΥΖΗΤΗΣΗ	21
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	26
ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	30

## ΓΕΝΙΚΗ ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Ένα από τα πιο ενδιαφέροντα χαρακτηριστικά του γονιδιώματος των ευκαρυωτικών οργανισμών είναι η παρουσία επαναληπτικών αλληλουχιών. Μια κατηγορία αυτών των αλληλουχιών είναι οι μικροδορυφόροι. Πρόκειται για επαναλήψεις δι- τρι- ή τετρανουκλεοτιδίων που βρίσκονται διάσπαρτες στο γονιδίωμα των ευκαρυωτικών οργανισμών. Οι αλληλουχίες αυτές αποτελούν σημαντικούς μοριακούς γενετικούς σημαντές λόγω του αυξημένου πολυμορφισμού σε σχέση με άλλους γενετικούς σημαντές όπως τα αλλοένζυμα ή το μιτοχονδριακό DNA.

Η σημαντικότητα αυτών των αλληλουχιών άρχισε να γίνεται ορατή στις αρχές της δεκαετίας του 1990 όταν διάφορες μελέτες αποκάλυψαν τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά τους (Tautz 1989, Scoletterer και Tautz 1992). Από τότε οι μικροδορυφόροι έχουν χρησιμοποιηθεί για μελέτες πληθυσμιακής δομής γενικότερα για την μελέτη πληθυσμιακών φαινομένων όπως μετανάστευση, στενωπό κ.α.. Όλες αυτές οι μελέτες υποθέτουν ότι αυτές οι αλληλουχίες έχουν συγκεκριμένο τρόπο μεταλλαγής. Είναι πολύ σημαντικό να είναι γνωστός ο τρόπος με τον οποίο δημιουργείται ο πολυμορφισμός, προκειμένου να είναι σωστή η ερμηνεία των αποτελεσμάτων που αποκτούνται από τη μελέτη μοριακών γενετικών δεικτών σε διάφορους πληθυσμούς.

Οι μικροδορυφόροι έχουν κάποια ιδιαίτερα χαρακτηριστικά τα οποία έχουν επισημανθεί από διάφορους ερευνητές και διάφορες μελέτες. Το πιο ξεκάθαρο ήταν ο ρυθμός μεταλλαγής. Έχει υπολογιστεί ότι ο ρυθμός μεταλλαγής των μικροδορυφόρων

είναι στα επίπεδα του  $10^{-3}$  με  $10^{-5}$ . Ο ορισμός αυτού του ρυθμού μεταλλαγής είναι η αλλαγή του αριθμού των επαναλήψεων σε μια αλληλουχία ανα αντιγραφή. Φυσικά ο ρυθμός αυτός δεν μπορεί άμεσα να συγκριθεί με αυτόν των μοναδικών αλληλουχιών αφού η φύση των μεταλλαγών στις μοναδικές αλληλουχίες είναι αρκετά διαφορετική και ο μηχανισμός ακόμη περισσότερο. Οι μικροδορυφόροι φαίνεται ότι μεταλλάσσονται με δύο κυρίως μηχανισμούς, το γλίστρημα κατά την αντιγραφή (replication slippage) και τον άνισο επιχιασμό (unequal crossing-over). Το γλίστρημα κατά την αντιγραφή είναι ο πιο συνήθης τρόπος και δημιουργεί αλληλόμορφα που διαφέρουν κυρίως κατά μία επανάληψη, και σπανια κατά περισσότερες. Αυτός είναι και ο κύριος λόγος που οι μικροδορυφόροι πιστεύεται ότι ακολουθούν το μοντέλο μεταλλαγής κατά βήματα (stepwise mutation model, Ohta και Kimura 1973) σε αντίθεση με τις μοναδικές νουκλεοτιδικές αλληλουχίες που κυρίως ακολουθούν το μοντέλο μεταλλαγής απείρων αλληλομόρφων (infinite alleles mutation model, Kimura και Crow 1964).

Τα παραπάνω μοντέλα υποθέτουν ότι η εξέλιξη των μικροδορυφόρων είναι ουδέτερη και υπόκειται μόνο στις ιδιότητες του μηχανισμού μεταλλαγής που περιγράφω παραπάνω. Παρόλαυτά υπάρχουν αρκετές μελέτες που αναφέρουν μεροληψία στον τρόπο με τον οποίο οι μικροδορυφόροι εξελίσσονται και μεταλλάσσονται. Η μία πλευρά αυτής της μεροληψίας έχει να κάνει με το ότι οι μεταλλαγές που έχουν παρατηρηθεί πειραματικά δείχνουν μία τάση προς αύξηση του αριθμού των επαναλήψεων (Weber και Wong 1993, Rubinsztein *et al.* 1995) και όχι συμμετρικές μεταλλαγές και προς τις δύο κατευθύνσεις (αύξηση ή μείωση).

Από την άλλη πλευρά το μέγεθος των επαναλήψεων δεν είναι όσο μεγάλο όσο θα περίμενε κανένας από τυχαίες μεταλλαγές προς κάθε κατεύθυνση. Αυτό γίνεται ακόμα πιο αξιοσημείωτο αν το μοντέλο της μεροληπτικής μεταλλαγής προς αύξηση είναι αληθινό. Θα περίμεναμε οι μικροδορυφόροι να αποκτούν τεράστια μεγέθη, κάτι που δε συμβαίνει (Garza *et al.* 1995). Η εξήγηση που έχει δοθεί είναι ότι υπάρχουν περιορισμοί στο μέγεθος που μπορεί να αποκτήσει ένας μικροδορυφόρος, και αυτοί οι περιορισμοί καθορίζονται είτε από κάποιο μηχανισμό φυσικής επιλογής είτε από κατευθυνόμενες μεταλλαγές που τείνουν να μειώνουν τον αριθμό των επαναλήψεων. Επίσης έχει προταθεί και το μοντέλο της γενετικής μετατροπής αλλά μέχρι στιγμής δεν υπάρχουν στοιχεία που να το υποστηρίζουν. Ο μηχανισμός αυτός, όποιος και αν είναι, φαίνεται ότι ενεργοποιείται όταν ο μικροδορυφόρος έχει αποκτήσει μεγάλο μέγεθος, κάτι που θεωρείται δηλητηριώδες για τον οργανισμό που το φέρει (Charlesworth *et al.* 1994).

Όλα τα παραπάνω μοντέλα δείχνουν ότι η μεταλλαγή και η εξέλιξη των μικροδορυφόρων δεν είναι ένας απλός μηχανισμός όπως τον είχαν σκεφτεί οι πρώτοι ερευνητές. Πρόκειται, πιθανότατα, για πολύπλοκο μηχανισμό που εξαρτάται από την κατάσταση του μικροδορυφόρου (μέγεθος, πλευρικές μοναδικές αλληλουχίες κ.α.). Σε αυτή την εργασία θα προσπαθήσω να προσεγγίσω το θέμα της εξέλιξης των μικροδορυφόρων από την παρακάτω σκοπιά. Θα συζητήσω για τη μελέτη δύο ιδιαίτερα πολυμορφικών μικροδορυφόρων που έχουν πολλή στενή φυσική σύνδεση (75 νουκλεοτίδια) στην τσιπούρα (*Sparus aurata*). Θα προσπαθήσω να αποκαλύψω μερικές από τις ιδιότητες των συνδεδεμένων μικροδορυφόρων και τι πληροφορίες μας δίνουν για τους περιορισμούς στη μεταλλαγή, μελετώντας το πρότυπο ανισορροπίας σύνδεσης των

αλληλομόρφων των δύο συνδεδεμενων μικροδορυφόρων. Θα εφαρμόσω επίσης διάφορα μοντέλα προκειμένου να εξηγήσω το πρότυπο πολυμορφισμού που παρατηρούμε σήμερα.

**ΑΡΝΗΤΙΚΗ ΣΥΜΕΤΑΒΑΗΤΟΤΗΤΑ ΜΕΤΑΞΥ ΔΥΟ ΣΥΝΔΕΔΕΜΕΝΩΝ  
ΜΙΚΡΟΔΟΥΡΥΦΟΡΩΝ: ΜΕΡΟΛΗΨΙΑ ΣΤΗ ΜΕΤΑΛΛΑΓΗ Η ΦΥΣΙΚΗ  
ΕΠΙΛΟΓΗ;**

**ΕΙΣΑΓΩΓΗ**

Η χρήση των μικροδορυφορικών επαναλήψεων για την εξαγωγή συμπερασμάτων σχετικά με την ιστορία ενός πληθυσμού απαιτεί την κατανόηση του τρόπου μεταλλαγής που δημιουργεί το μεγάλο πολυμορφισμό και τις σημαντικές αποκλίσεις μεταξύ πληθυσμών. Διάφορα μοντέλα έχουν προταθεί για τη εξέλιξη των μικροδορυφόρων (Zhivotovsky and Feldman 1995, Zhivotovsky *et al.* 1997, Goldstein *et al.* 1995, Pritchard and Feldman 1996), αλλά σχετικά λίγες πειραματικές μελέτες έχουν ποσοτικοποιήσει την εξελικτική δυναμική αυτών των αλληλουχιών (Garza *et al.* 1995, Schug *et al.* 1997, Schloetterer *et al.* 1997, Estoup *et al.* 1995). Τα δύο κύρια μοντέλα γέννησης πολυμορφισμού που έχουν προταθεί, όπως αναφέρθηκε παραπάνω, είναι το μοντέλο της μεταλλαγής κατά βήματα (stepwise mutation model, Ohta and Kimura 1973) και το μοντελο των απείρων αλληλομόρφων (infinite allele model, Kimura and Crow 1964). Και τα δύο μοντέλα καταφέρνουν να εξηγήσουν κάποιες από τις ιδιότητες αυτών των αλληλουχιών, αλλά το πιο πιθανό μοντέλο είναι αυτό που υποθέτει κυρίως μεταλλαγές μίας επανάληψης, με περιστασιακές μεταλλάξεις περισσότερων επαναλήψεων (Valdes *et al.* 1993, Di Rienzo *et al.* 1994). Επιπρόσθετα, διάφορες μελέτες έχουν προτείνει μεροληψία στον τρόπο που μεταλλάσσονται οι μικροδορυφόροι με τάση να αυξάνονται σε μέγεθος παρά να μειώνονται (Weber and Wong 1993,

Rubinsztein *et al.* 1995, Amos *et al.* 1996), όμως αυτή η ιδιότητα είναι ακόμη υπό αμφισβήτηση.

Ο Garza και οι συνεργάτες του (1995) μελέτησαν τη μεταλλαγή και εξέλιξη μικροδορυφόρων συγκρίνοντας το εύρος και την ποικιλομορφία των ίδιων τόπων σε ανθρώπους και χιμπατζήδες. Τα συμπεράσματα τους είναι ότι πρέπει να υπάρχουν κάποιοι περιορισμοί σε αυτές τις αλληλουχίες, βασιζόμενοι στο γεγονός ότι οι διαφορές στο μέσο μέγεθος μεταξύ των δύο ειδών ήταν πολύ μικρές για την εξελικτική τους απόσταση, με δεδομένο το υψηλό ρυθμό μεταλλαγής. Η υπόθεση που προτείνουν είναι ότι η πιθανή εξήγηση για τα αποτελέσματα τους είναι μεροληπτικές μεταλλαγές, γενετική μετατροπή ή φυσική επιλογή. Ο Slatkin (1995) και ο Goldstein και συνεργάτες (1995) προτείνουν μεθόδους για τη μέτρηση γενετικών αποστάσεων μεταξύ πληθυσμών, αλλά οι Takezaki και Nei (1996) και ο Feldman και συνεργάτες (1997) έδειξαν ότι αυτές οι μέθοδοι είναι πληροφοριακές μόνο για πολύ συγγενικούς πληθυσμούς. Οι περιορισμοί στο μέγεθος του αριθμού των επαναλήψεων προσεγγίζει ένα πλατώ για σημαντικά μακρινούς πληθυσμούς. Παρόλο που είναι πιθανό να εκτιμήσουμε αποστάσεις παρουσία τέτοιων περιορισμών, οι ειδοειδικές και τοπο-ειδικές ιδιότητες των περιορισμών κάνει ιδιαίτερα περίπλοκο τον υπολογισμό τέτοιων αποστάσεων.

Κατα τη διάρκεια της μελέτης πληθυσμιακής δομής της τσιπούρας (*Sparus aurata*) της Μεσογείου, απομονώσαμε δύο μικροδορυφορικούς τόπους (επαναλήψεις GT) που διαχωρίζονται από 75 νουκλεοτίδια μοναδικής αλληλουχίας, κάθε ένα από τα οποία παρουσιάζει ιδιαίτερα μεγάλο πολυμορφισμό. Είχαμε τη δυνατότητα να



πολλαπλασιάσουμε με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) καθένα από τους δύο τόπους καθώς και τους δύο μαζί, και επομένως μπορέσαμε να ταυτοποιήσουμε απλότυπους για κάθε χρωμόσωμα κάθε ψαριού ξεχωριστά. Αυτό μας επέτρεψε να ποσοτικοποιήσουμε τη συσχέτιση των αλληλομόρφων σε κάθε τόπο και στους δύο μαζί στο επίπεδο του ζυγώτη καθώς και στο γαμετικό (απλοειδές) επίπεδο. Το πρότυπο ανισορροπίας σύνδεσης μεταξύ των αλληλομόρφων των δύο τόπων μας τροφοδοτεί με σημαντικές πληροφορίες για το τρόπο με τον οποίο περιορίζονται οι μικροδορυφόροι σε μια χρωμοσωμική περιοχή.

## **ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.**

### **Δειγματοληψία**





Συλλέξαμε δείγματα τσιπούρας από πέντε γεωγραφικά διαφορετικές περιοχές στη Μεσόγειο και τον Ατλαντικό ωκεανό: α) IMBC-1: άγρια άτομα συλέχτηκαν το 1993 από διάφορες περιοχές των Ελληνικών θαλασσών (n = 32). Αυτά τα άτομα διατηρήθηκαν στις εγκαταστάσεις του Ινστιτούτου Θαλάσσιας Βιολογίας Κρήτης (IMBC) για πειραματικούς σκοπούς. β) G2: δείγμα που συλλέχτηκε το 1996 από τη λιμνοθάλασσα του Μεσολογγίου ( n = 40). γ) I2: δείγμα που συλλέχτηκε το 1996 από τη Βόρεια Αδριατική στην Ιταλία (n = 40). δ) S4: δείγμα που συλλέχτηκε το 1996 από το Alicante στη Μεσογειακή ακτή της Ισπανίας (n = 51). ε) S3: δείγμα που συλλέχτηκε το 1996 από το Cadiz στην Ατλαντική πλευρά του Γιβλαρτάρ (n= 48). Τα δείγματα καταψύχθηκαν το συντομότερο δυνατό μετά από τη συλλογή και μεταφέρθηκαν στο εργαστήριο για εξαγωγή ιστού. Η εξαγωγή DNA έγινε από καταψυγμένο συκώτι ή από τους μύες που

είχαν διατηρηθεί σε 70% αιθανόλη. Και στις δύο περιπτώσεις ακολουθήθηκε το πρωτόκολο εξαγωγής των Rogson και Zouros (1994).

### **Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης**

Ο Batargias και συνεργάτες (1998) ανέπτυξαν μια ομάδα μικροδορυφορικών σημαντών για την τσιπούρα. Οι δύο μικροδορυφόροι που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη ήταν επαναλήψεις (GT)<sub>n</sub> που διαχωρίζονταν από 75 νουκελοτίδια μοναδικής αλληλουχίας. Ονομάστηκαν *SA41a* και *SA41b* και ολόκληρος ο τόπος ονομάστηκε *SA41*. Τέσσερις (4) εκκινητές σχεδιάστηκαν για την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης που πολλαπλασιάζουν τον κάθε τόπο ξεχωριστά και τους δύο μαζί (ΕΙΚΟΝΑ 1). Για τον πολλαπλασιασμό του *SA41a* οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν είναι οι pSA41Fa και pSA41Ra, για τον τόπο *SA41b* οι εκκινητές pSA41Fb και pSA41Rb και για τον *SA41* (οι δύο μικροδορυφόροι μαζί) οι εκκινητές pSA41Rb και pSA41Fa. Για την οπτικοποίηση των προϊόντων της αντίδρασης ένας από τους δύο εκκινητές είχε σημειωθεί στο 5' άκρο με γ-<sup>32</sup>ATP. Οι εκκινητές pSA41Ra και pSA41Rb σημειώθηκαν για τους τόπους *SA41a* και *SA41b* αντίστοιχα, ενώ ο εκκινητής pSA41Fa σημειώθηκε για το προϊόν και των δύο τόπων μαζί (*SA41*).

Όλες οι αντιδράσεις έγιναν σε σωλήνες αντίδρασης των 0.2ml με 10μl όγκο αντίδρασης που περιείχε 1x PCR buffer (Gibco BRL), 0.6μM από κάθε νουκλεοτίδιο (dNTPs), 1mM συγκεντρωση σε MgCl<sub>2</sub>, 0.04 μM από τον σημασμένο εκκινητή και 0.25 μοναδες (units) απο τον ένζυμο *Taq* polymerase και περίπου 10 ng ολικού γενωμικού DNA. Οι συνθήκες αντίδρασης για τον πολλαπλασιασμό ήταν: 95°C για 2 λεπτά (hot

TGCAGGGTCGACTCTAGAGGATCCCCCTTTCTTTGGCTTTTCTGCCCTCTGTCA<sup>TTAAGCTC</sup>  
 TCCCATG TCAAAGACAGATGGAGCTGG TGCCC - **(TG)** 27-C - **(GT)** 7- A<sup>TTTGTGTAT</sup>  
 pSA4IFa  pSA4IRa   
GGAGGCACTTGCAAGTGCAG ACTTG CAAGTGCAGACTGATGTGAC CCACCCAACTCTAGA  
 pSA4IFb   
 GACAG - **(AC)** 13- CAT<sup>TGAGCCC</sup>TGCCCTTGATTTCTGCC<sup>TTT</sup>CAGCGGGGATCTCAGGGCA  
 pSA4IRb   
G CTACCAGACCTCTGCCATCT GCAGTCAGTCAGTCCCTGAGGGTCCGGACA

**ΕΙΚΟΝΑ 1:** Η αλληλουχία του τόπου *SA41*. Στα κουτάκια συμβολίζονται οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν με την κατεύθυνση προς την οποία γίνεται η αντιγραφή.

start) για ένα κύκλο, και μετά 95°C για 45 δευτερόλεπτα, 52°C για 30 δευτερόλεπτα, 72°C για 30 δευτερόλεπτα για 35 κύκλους, και 72°C για 10 λεπτά στο τέλος.

### **Ηλεκτροφόρηση και ταυτοποίηση μεγέθους**

Τα προϊόντα του πολλαπλασιασμού PCR ηλεκτροφορήθηκαν σε αποδιατακτικό gel πολυακρυλαμίδης 6%. Η αλληλουχία του φαγικού πλασμιδίου M-13 χρησιμοποιήθηκε ως δείκτης μεγέθους για τη ταυτοποίηση των γονοτύπων συγκεκριμένων ατόμων που στη συνέχεια χρησιμοποιήθηκαν ως δείκτες μεγέθους. Για να εξασφαλιστεί η ακρίβεια στην ταυτοποίηση του μεγέθους οι δείκτες-γονότυποι κάλυπταν το πλήρες εύρος των προϊόντων της PCR.

Η ταυτοποίηση του μεγέθους από τις αυτοραδιογραφίες έγινε τουλάχιστον τρεις φορές για κάθε περίπτωση και πολλά από τα άτομα γονοτυπήθηκαν παραπάνω από μία φορά σε διαφορετικά gels. Η πληροφορία που αποκτήθηκε αποτελούνταν από τριακόσια είκοσι επτά (327) ζεύγη συνδεδεμένων αλληλομόρφων των δύο τόπων, τα περισσότερα από τα οποία εξήχθυσαν από την κατευθείαν παρουσία του σύνθετου προϊόντος στο gel (SA41). Σε μερικές περιπτώσεις (περίπου 10% των χρωμοσωμάτων που αναλύθηκαν) ο ένας από τους δύο απλότυπους ταυτοποιήθηκε με αφαιρετική μέθοδο, όταν μόνο ένα από τα δύο προϊόντα ήταν εμφανές (υπέθεσα ότι το άλλο ζεύγος αλληλομόρφων ήταν συνδεδεμένο, παρόλο που δεν μπορούσαμε να δούμε το σύνθετο προϊόν). Αυτή η μέθοδος χρησιμοποιήθηκε μόνο στις περιπτώσεις που η γονοτύπηση των δύο τόπων ξεχωριστά ήταν αναμφισβήτητη. Αποκτήσαμε εκατόν πενήντα επτά γονοτύπους (που

αντιστοιχούν σε 314 απλοτύπους) λόγω του ότι μόνο για ένα χρωμόσωμα από τα δύο ταυτοποιήθηκε ο απλότυπος για 13 άτομα.

Είχαμε τη δυνατότητα να επιβεβαιώσουμε την σύνδεση όλων των αλληλομόρφων για τον πληθυσμό IMBC-1 (60 απλότυποι: 18.3% του ολικού αριθμού των απλοτύπων που αναλύθηκαν), ταυτοποιώντας το γονότυπο των απογόνων πειραματικών διασταυρώσεων μεταξύ αυτών των ατόμων (Κώστας Μπαταργιάς, προσωπική επικοινωνία) και παρατηρώντας την συγκληρονόμηση των αλληλομόρφων των δύο τόπων στην επόμενη γενιά. Σε όλες τις 60 περιπτώσεις το συνδεδεμένο ζεύγος που παρατηρήθηκε στην επόμενη γενιά συνέπιπτε με αυτό που αποκτήσαμε με τη μέθοδο που περιγράψαμε παραπάνω (PCR).

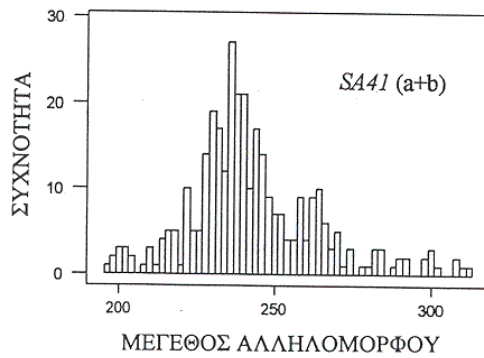
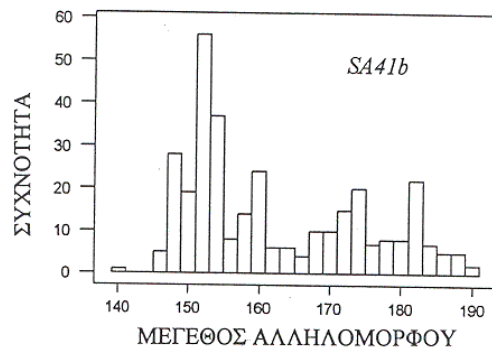
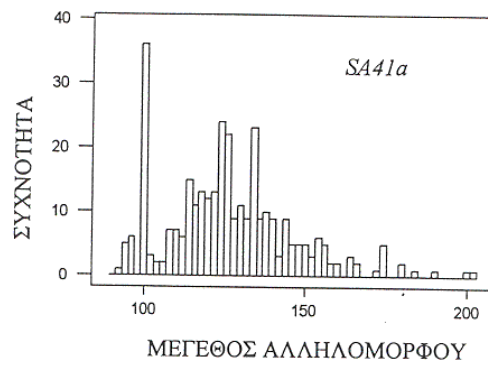
### **Τεστ αναδιάταξης (permutation test)**

Διάφορες δοκιμές εφαρμόστηκαν με σκοπό να εκτιμήσουμε την στατιστική σημαντικότητα των ιδιοτήτων της της ποικιλομορφίας των υπο μελέτη μικροδορυφορών. Αρχικές παρατηρήσεις των πληροφοριών υποδείκνυαν ότι η μεταβλητότητα στο μήκος του σύνθετου προϊόντος ήταν μικρότερη από την αναμενόμενη από τυχαίο συνδυασμό των αλληλομόρφων των δύο τόπων. Το γεγονός αυτό ενθαρρύνει ένα τεστ για τη σύγκριση της παρατηρούμενης μεταβλητότητας στο αριθμό των επαναλήψεων με τιμές που αποκτούμε από τυχαία αναδιάταξη των αλληλομόρφων και δημιουργία τυχαίων ζευγών από τα παρατηρούμενα. Ειδικότερα, δημιουργήσαμε χίλια (1000) δείγματα από 327 ζεύγη αλληλομόρφων, αναδιατάσσοντας τα αλληλόμορφα του ενός τόπου απέναντι

στον άλλο. Επίσης, εφαρμόσαμε το ίδιο τεστ για να συγκρίνουμε την παρατηρούμενη συμεταβλητότητα του αριθμού των δινουκλεοτιδικών επαναλήψεων με αυτή που αναμένουμε από τύχη, όπως προτάθηκε από τους Pritchard και Feldman (1996).

## ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Συχνότητες αλληλομόρφων και γονοτύπων: Οι Μεσογειακοί πληθυσμοί της τσιπούρας δε δείχνουν σημαντική γενετική ετερογένεια ως αναφορά τα αλλοένζυμα και το μιτοχονδριακό DNA (Μαγουλάς, προσωπική επικοινωνία, Magoulas et al. 1995, αντίστοιχα). Η μηδενική υπόθεση αλληλικής ομοιογένειας για τα πέντε δείγματα (χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα GENEPOP από τους Raymond και Rousset 1995) δεν απορρίπτεται για τον τόπο *SA41b* ( $P = 0.248$ ) αλλά απορρίπτεται για το τόπο *SA41a* ( $P = 0.0065$ ). Ο μεγάλος αριθμός των αλληλομόρφων ( $n = 43$ ) και τα σχετικά μικρά δείγματα από τους διάφορους πληθυσμούς παίζουν πιθανότατα σημαντικό ρόλο σε αυτή την ετερογένεια. Η ετερογένεια αυτή δεν επηρεάζει την ανάλυση μας για σύνδεση αλληλομόρφων των δύο τόπων, αφού τυχαία ανισόρροπία σύνδεσης από την ένωση δειγμάτων μπορεί να προκύψει μόνο αν τα δείγματα είναι ετερογενή και για τους δύο τόπους (παράρτημα από Prout στο Mitton και Koehn 1973). Επομένως ομαδοποιήσαμε τα δείγματα σε ένα. Οι συχνότητες των αλληλομόρφων φαίνονται στην ΕΙΚΟΝΑ 2. Στο ομαδοποιημένο δείγμα οι συχνότητες δεν αποκλίνουν από ισορροπία Hardy-Weinberg σε καθένα από τους τόπους ( $P = 0.232$  και  $P = 0.0564$  για *SA41a* και *SA41b* αντίστοιχα όπως ελέγχθηκαν από το ακριβές τεστ του Fisher χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα των Raymond και Rousset 1995).



ΕΙΚΟΝΑ 2: Οι συχνότητες των αλληλομόρφων για τους τύπους SA41a, SA41b και SA41.

## Ανισορροπία σύνδεσης

Παρόλο που δεν υπάρχει κατευθείαν εκτίμηση του ρυθμού ανασυνδυασμού μεταξύ των δύο των δύο τόπων, η απόσταση των 75 νουκλεοτιδίων σημαίνει ότι ο ανασυνδυασμός πρέπει να είναι σπάνιος. Μία ένδειξη του χαμηλού ρυθμού ανασυνδυασμού είναι το γεγονός ότι δεν υπάρχει ούτε μία περίπτωση στην οποία ένας απλότυπος να αποτελείται από τα δύο πιο συχνά αλληλόμορφα (*SA41a*<sup>99</sup> και *SA41b*<sup>152</sup>). Με δεδομένη αυτή τη στενή σύνδεση. Η ανισορροπία σύνδεσης μεταξύ των αλληλομόρφων στους δύο τόπους πρέπει να διαταράσσεται από μεταλλαγές, που μπορούν να δημιουργήσουν πολλαπλούς συνδυασμούς του ίδιου μήκους σε καθένα από τους δύο τόπους, όμως αυτοί οι συνδυασμοί δεν θα είναι όμοιοι λόγω καταγωγής.

Συνολικά η ανισορροπία σύνδεσης μεταξύ αλληλομόρφων βρέθηκε πολύ σημαντική από το τεστ  $X^2$  (Raymond και Rousset 1995). Το ίδιο αποτέλεσμα είχαμε και όταν εφαρμόσαμε το τεστ  $X^2$  που προτάθηκε από τον Weir (1979, χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα POPGENE από τον Yeh et al. 1997). Με την παραπάνω μέθοδο (Weir 1979) είχαμε τη δυνατότητα να ταυτοποιήσουμε απλότυπους στον σύνθετο τόπο που είναι σε περίσσεια ή έλλειψη. Με δεδομένη τη στενή σύνδεση, η παρατήρηση της υψηλής ανισορροπίας σύνδεσης ήταν αναμενόμενη. Παρόλαυτα, παρατηρήσαμε ότι υπήρχε δυνατή συσχέτιση μεταξύ του σύνθετου μήκους των αλληλομόρφων στους δύο τόπους και της πιθανότητας ότι αυτός ο συνδυασμός θα ήταν σε περίσσεια ή έλλειψη. Οι υψηλότερες τιμές ανισορροπίας σύνδεσης (όπως ορίζεται από τον τύπο

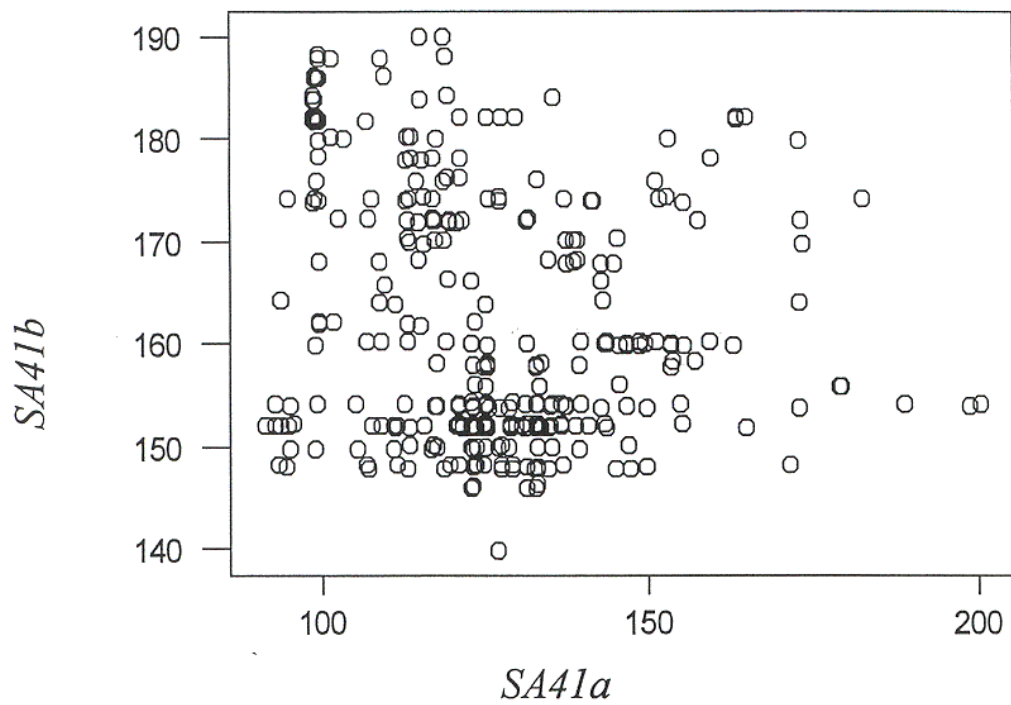


$$D = P_{ij} - P_i P_j$$

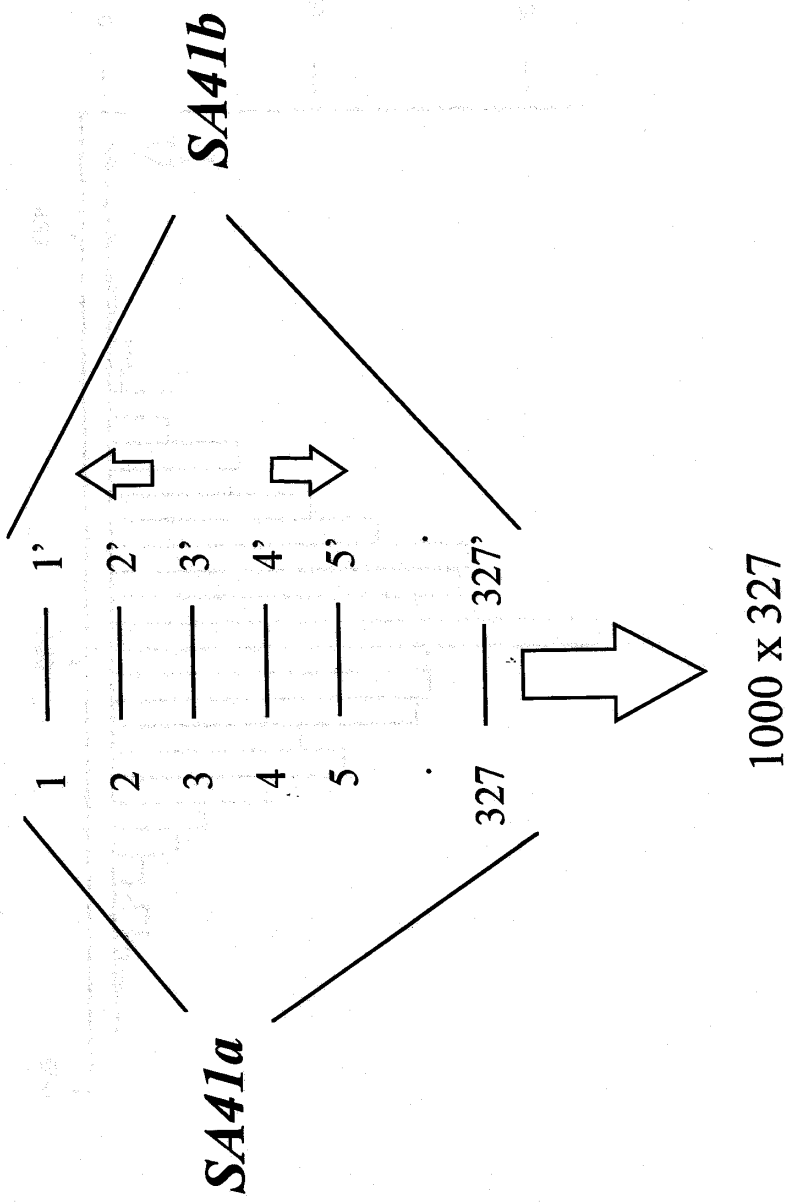
όπου  $P_i$  είναι η συχνότητα του αλληλομόρφου  $i$  στο τόπο  $SA41a$ ,  $P_j$  η συχνότητα του αλληλομόρφου  $j$  στον τόπο  $SA41b$  και  $P_{ij}$  η συχνότητα του απλοτύπου με αλληλόμορφα  $i$  του τόπου  $SA41a$  και  $j$  του τόπου  $SA41b$ ), βρέθηκε να ομαδοποιείται σε δύο κυρίως περιοχές του πεδίου που ορίζεται από τα αλληλικά μεγέθη των δύο τόπων. Επίσης, ήταν σημαντικό ότι οι δύο ομάδες είχαν περίπου το ίδιο συνολικό μήκος (ΕΙΚΟΝΑ 3). Οι συνδυασμοί σε υψηλότερη περίσσεια ήταν  $SA41a^{99}-SA41b^{182}$  (σύνθετο μήκος 236 νουκλεοτίδια) και  $SA41a^{133}-SA41b^{152}$  (σύνθετο μήκος 240 νουκλεοτίδια). Συνολικά υπήρχε ισχυρή αρνητική συσχέτιση μεταξύ των μεγεθών των αλληλομόρφων των δύο τόπων ( $r = -0.229$ ,  $P = 0.001$ ).

#### **Τεστ αναδιάταξης για τυχαία σύνδεση αλληλομόρφων των τόπων $SA41a$ και $Sa41b$**

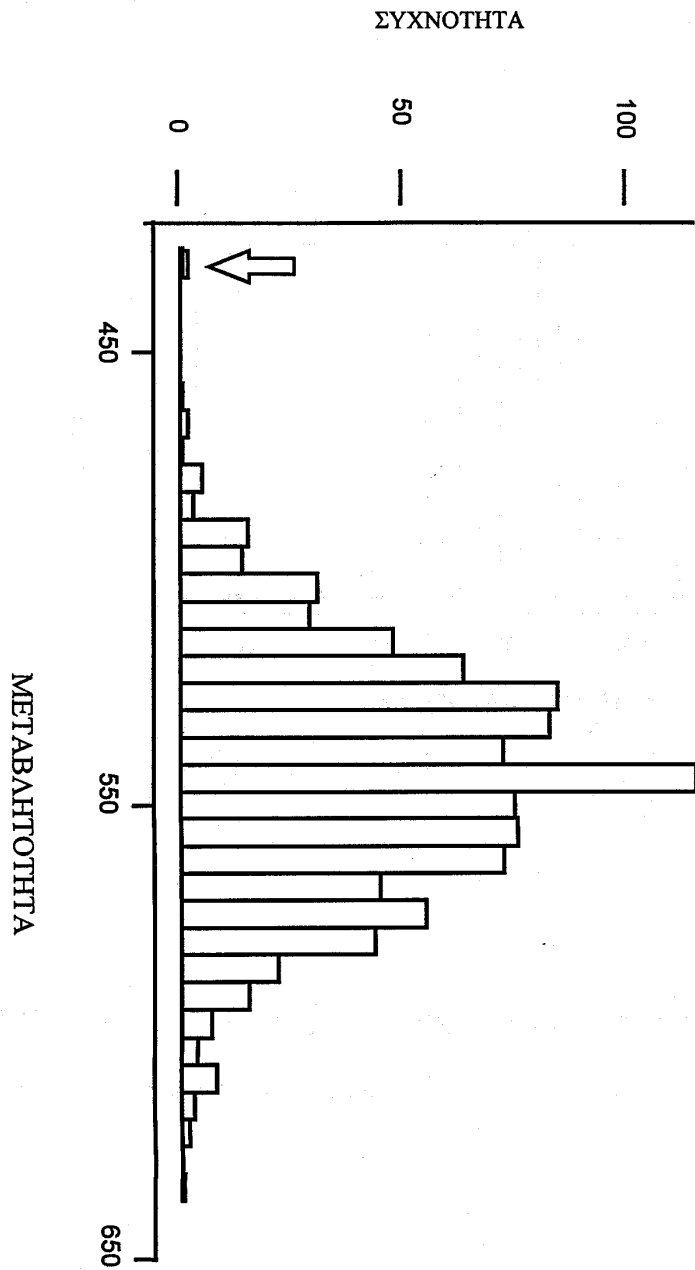
Η αρνητική συσχέτιση του μήκους των αλληλομόρφων των δύο τόπων ενθαρύνει ένα τεστ που θα συνέκρινε την μεταβλητότητα και συμεταβλητότητα των παρατηρούμενων στοιχείων με αυτά που μπορούμε να αποκτήσουμε από 1000 επαναλήψεις αναδιάταξης των αλληλομόρφων του ενός τόπου απέναντι στον άλλο, όπως περιγράφεται στις μεθόδους. Η κατανομή της μεταβλητότητας του μεγέθους (ΕΙΚΟΝΑ 5) και της συμεταβλητότητας μεταξύ των αλληλομόρφων των δύο τόπων (ΕΙΚΟΝΑ 6) από τις 1000 επαναλήψεις δεν έχει καθόλου συγκάλυψη με τις παρατηρούμενες τιμές, κάτι που δείχνει ότι η πιθανότητα να αποκτηθεί τέτοια τιμή κατά τύχη είναι μικρότερη από 0.001. Η σημαντική αρνητική συμεταβλητότητα μπορεί να δημιουργηθεί από



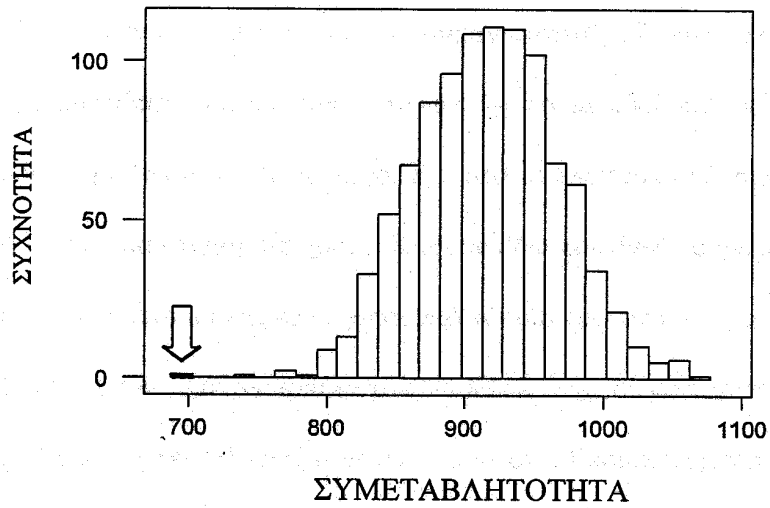
**ΕΙΚΟΝΑ 3:** Διάγραμμα των ζευγών των αλληλομόρφων που συνθέτουν τους απλότυπους για τους τόπους *SA41a* και *SA41b*. Ο συντελεστής συσχέτισης είναι  $r = -0.229$ , με  $P = 0.001$ .



**ΕΙΚΟΝΑ 4:** Ο σχεδιασμός του τεστ αναδιάταξης. Δημιουργήθηκαν για κάθε περίπτωση 1000 ομάδες από 327 απλότυπους.



**EIKONA 5:** Η κατανομή της μεταβλητότητας από το τεστ αναδιάταξης. Με το βέλος ενδεικνύεται η παρατηρούμενη τιμή.



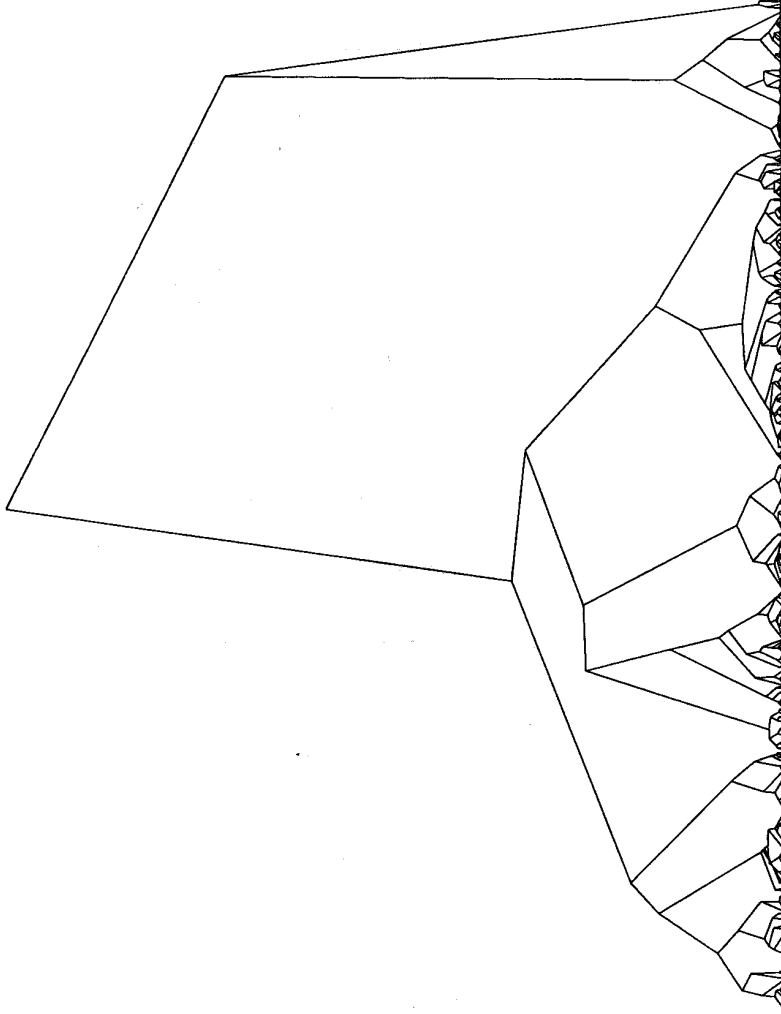
**ΕΙΚΟΝΑ 6:** Η κατανομή της μεταβλητότητας από το τεστ αναδιάταξης. Με το βέλος ενδεικνύεται η παρατηρούμενη τιμή.

διάφορους μηχανισμούς, κάποιιοι από τους οποίους ερευνώνται με τις προσομοιώσεις που περιγράφονται παρακάτω.

### **Προσομοιώσεις γενεαλογικής σύγκλισης (Coalescent simulations)**

Προκειμένου να εκτιμήσουμε τη σημαντικότητα κάποιων παρατηρήσεων σε πληθυσμιακό επίπεδο, είναι απαραίτητο να γνωρίζουμε πόσο πιθανό είναι να παρατηρήσουμε ένα τέτοιο φαινόμενο. Ένα δείγμα από ένα πληθυσμό αποτελεί κάτι παραπάνω από μία στιγμή στο χρόνο. Κάθε γονίδιο που διαλέγουμε από τον πληθυσμό έχει τη δική του ιστορία και προέρχεται από κάποιο προγονικό μερικές εκατοντάδες ή χιλιάδες γενιές πριν. Κάποια από τα γονίδια που έχουμε σε κάποιο δείγμα έχουν σε κάποιο σημείο της γενεαλογίας τους κοινό πρόγονο. Επομένως μπορούμε να αναπαράξουμε την ιστορία κάποιου αριθμού γονιδίων, πηγαίνοντας πίσω στο χρόνο έως ότου φτάσουμε στο σημείο που όλα τα γονίδια μας έχουν ένα κοινό πρόγονο (EIKONA 7).

Αυτή η διαδικασία της αναπαραγωγής της γενεαλογίας των γονιδίων ονομάζεται γενεαλογική σύγκλιση (coalescence) και περιγραφήκε για πρώτη φορά σαν ιδέα από τον Kingman (1980). Φυσικά για να μπορέσουμε να αναπαράξουμε αυτή την ιστορία είναι σημαντικό να ξέρουμε αρκετά στοιχεία για τις συνθήκες που επικρατούσαν την περίοδο της διαδικασίας στον πληθυσμό. Από την άλλη πλευρά μπορούμε δοκιμάζοντας διάφορα σενάρια, και μελετώντας τα αποτελέσματα του καθενός και συγκρίνοντας τα με τα παρατηρούμενα, να υποθέσουμε κάτω από ποιές συνθήκες δημιουργήθηκε το



**ΕΙΚΟΝΑ 7:** Δείγμα από δένδρο που προκύπτει από τη μέθοδο της γενεαλογικής σύγκλισης (coalescent process).

παρατηρούμενο πρότυπο της πληροφορίας που αποκτήσαμε από τη δειγματοληψία στην παρούσα χρονική στιγμή. Αυτό ακριβώς επιχειρώ παρακάτω, με τις προσομοιώσεις που περιγράφονται, προκειμένου να εξηγήσω την αρνητική συσχέτιση μεταξύ των μεγεθών των αλληλομόρφων των δύο τόπων.

### **Προσομοιώσεις μοντέλων εξέλιξης μικροδορυφόρων**

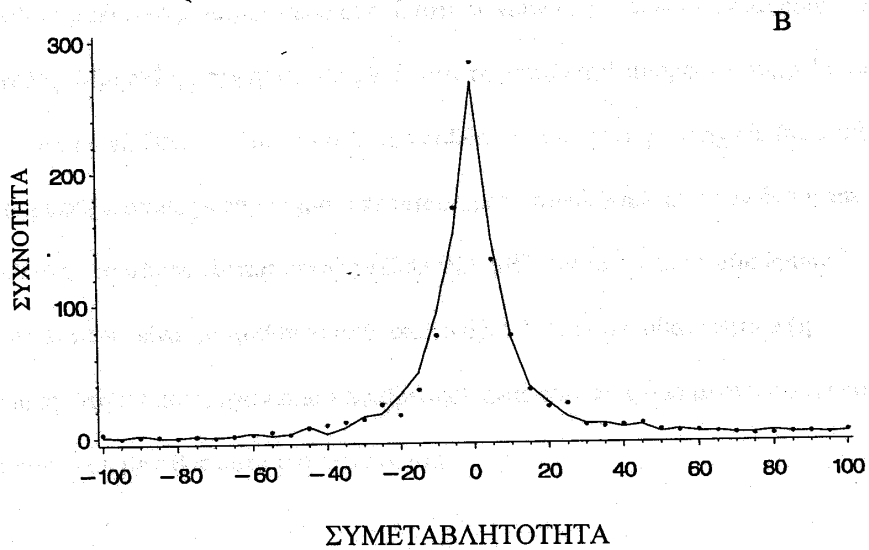
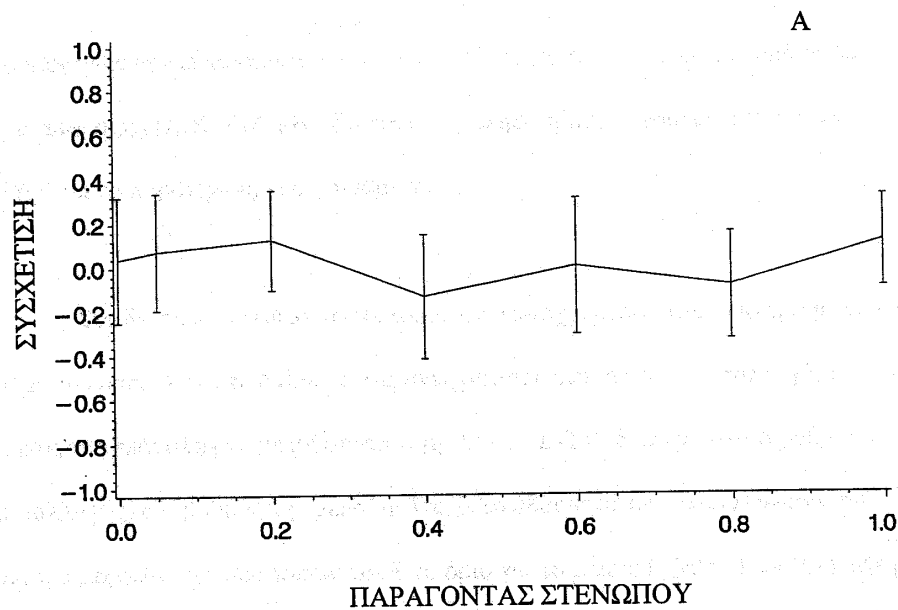
Θεωρούμε τρία κυρίως μοντέλα που κατ' αρχήν θα περιμέναμε να δημιουργήσουν αρνητική συσχέτιση: πέρασμα του πληθυσμού από στενωπό, μεροληψία κατά τη μεταλλαγή, και φυσική επιλογή. Δεν εξετάζουμε την υπόθεση γενετικής μετατροπής, που προτάθηκε από τους Garza και συνεργάτες (1995), αφού το ίδιο μέγεθος του σύνθετου αλληλομόρφου δημιουργείται από διαφορετικούς συνδυασμούς αλληλομόρφων των δύο τόπων, και επομένως έχουν διαφορετικές αλληλουχίες. Προσομοιώσαμε και τα τρία μοντέλα όπως περιγράφεται παρακάτω και τα συγκρίναμε με τα μηδενικά μοντέλα που υποθέτουν ότι κανένας από τους μηχανισμούς που περιγράφηκαν παραπάνω δεν ισχύει.

Οι προσομοιώσεις των μοντελων κάνουν χρήση της συγκλίνουσας διαδικασίας (coalescent process) για τη δημιουργία των γενεολογιών των γονιδίων χωρίς ανασυνδυασμό (Hudson 1990, Valdes et al. 1993). Σε αυτές τις ουδέτερες γενεολογίες γονιδίων οι μεταλλαγές τοποθετούνται ακολουθώντας κατανομή Poisson με μέση τιμή μεταλλάγών  $\mu t$  για κάθε κλαδί μήκους  $t$ . Αν το μοντέλο υποθέτει αυστηρά μεταλλάξεις κατά βήμα (stepwise) για κάθε τόπο, και δεν υπάρχουν περιορισμοί στο μήκος, οι προσομοιώσεις παράγουν αναμενόμενη μηδενική συσχέτιση (όπως δείχνεται από το



άκρως αριστερό σημείο στην ΕΙΚΟΝΑ 9 και το ακρως δεξιο στην ΕΙΚΟΝΑ 8Α). Και τα τρία μοντέλα υιοθετούν το παρατηρούμενο μέγεθος δείγματος των 327 ζευγών αλληλομόρφων και όλα χρησιμοποιούν την παράμετρο  $\theta = 4N\mu = 30$  και για τους δύο τόπους. Αυτή η τιμή επιλέχτηκε γιατί παράγει κατανομή της μεταβλητότητας με μέση τιμή ίση με την παρατηρούμενη με τη χρήση του μηδενικού μοντελου (χωρίς στενωπό, μεροληψία στη μεταλλαγή ή επιλογή). Αν ο ρυθμός μεταλλαγής είναι  $10^{-4}$ , τότε το  $\theta = 4N\mu = 30$  αντιστοιχεί σε μέγεθος πληθυσμού 75.000, που είναι πιθανό.

Το πρώτο μοντέλο υποθέτει πληθυσμιακή στενωπό χωρίς στο δένδρο που μειώνει το πληθυσμιακό μέγεθος σε ποσοστό B («παράγοντας στενωπού») του προηγούμενου μεγέθους για την περίοδο από τον κόμβο 40 μέχρι τον κόμβο 320 (όπου ο νωρίτερος κόμβος ορίζεται σαν 1). Μετά τη στενωπό ο πληθυσμός αφήνεται να επανέλθει στο αρχικό μέγεθος. Αυτές οι αλλαγές στο πληθυσμιακό μέγεθος μοντελοποιούνται ως αλλαγές στην ένταση της σύγκλισης (coalescence), κάτι που επηρεάζει το μήκος των κλαδιών του δένδρου. Στην ΕΙΚΟΝΑ 8Α παρουσιάζεται η συσχέτιση μεταξύ των δύο επαναλήψεων για διαφορετικής έντασης στενωπούς. Η σημαντική παρατήρηση είναι ότι δεν υπάρχει συσχέτιση στο μήκος των αλληλομόρφων ακόμη και όταν ο πληθυσμός μειώνεται σε ποσοστό 1% του τρέχοντος μεγέθους. Αν ο πληθυσμός μειωθεί σε σημείο ώστε μόνο δύο γενεολογίες επιβιώνουν, τότε από τύχη αυτές μπορούν να δώσουν την αρνητική συμεταβλητότητα, αλλά τέτοιος βαθμός στενωπού είναι απίθανος για την τσιπούρα με βάση την διαθέσιμη πληροφορία από μιτοχονδριακό DNA και αλλοένζυμα (Magoulas et al. 1995, Μαγουλάς προσωπική επικοινωνία). Η κατανομή της συμεταβλητότητας των αλληλομόρφων για τον αριθμό των 1000 επαναλήψεων των

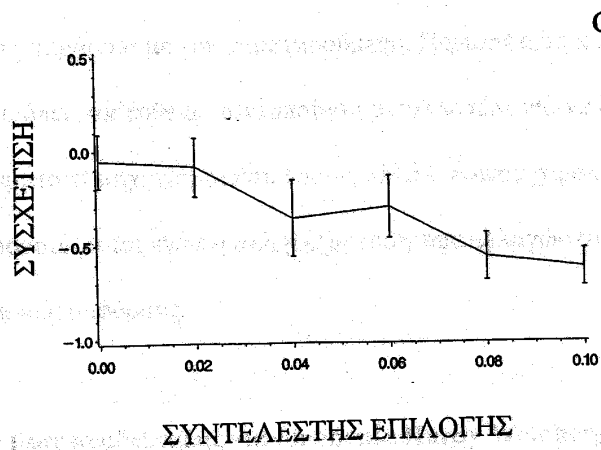
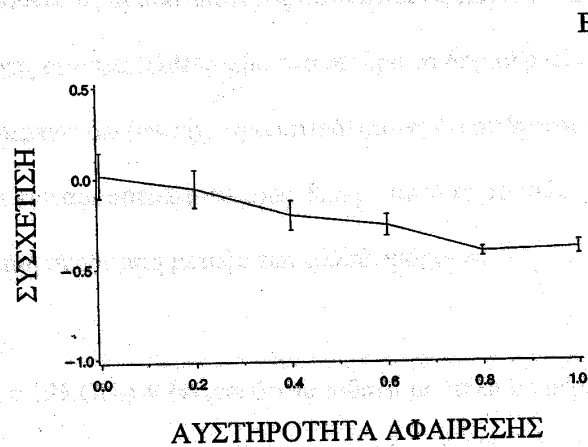
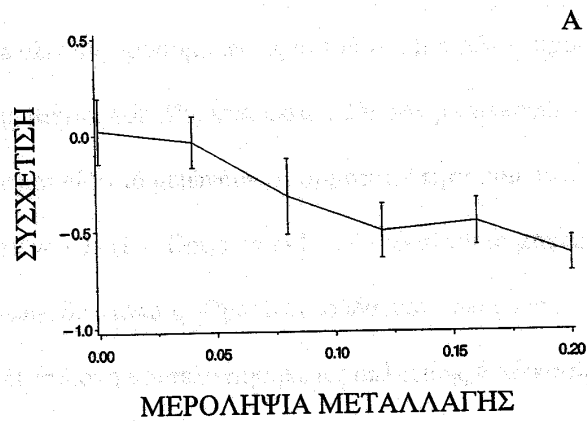


**ΕΙΚΟΝΑ 8:** A) Οι τιμές του συντελεστή συσχέτισης για διάφορες τιμές του παράγοντα στενωπού (B), που προέκυψαν από τις προσομοιώσεις. B) Οι κατανομές της συμεταβλητότητας για δύο διαφορετικές τιμές του παράγοντα στενωπού (100% και 5%). Παρατηρήστε ότι οι δύο κατανομές είναι σχεδόν πανομοιότυπες.

προσομοιώσεων είναι σημαντικά όμοια ανεξάρτητα αν ο πληθυσμός υπόκειται σε στενωπό ή όχι (EIKONA 8B). Συνολικά, η πληθυσμική στενωπός αποτυγχάνει να εξηγήσει το παρατηρούμενο φαινόμενο.

Στο δεύτερο μοντέλο, υποθέτουμε ότι υπάρχει μεροληψία στο τρόπο που γίνονται οι μεταλλάγες (κατά τη διάρκεια της αντιγραφής), έτσι ώστε οι μεταλλάγες αυξάνουν το μήκος της επανάληψης με πιθανότητα  $\mu[1/2 - \alpha(L-T)]$ , όπου  $\mu$  είναι ο ρυθμός μεταλλάγης,  $\alpha$  ο βαθμός της μεροληψίας,  $L$  το άθροισμα των επαναλήψεων των αλληλομόρφων των δύο τόπων και  $T$  το όριο για το μήκος  $L$  (EIKONA 9A). Με βάση αυτό το μοντέλο, όταν το σύνθετο μήκος των αλληλομόρφων είναι μικρότερο από  $T$ , τότε οι δύο επαναλήψεις τείνουν να μεταλλάσσονται σε μικρότερο μέγεθος, ενώ όταν το σύνθετο μήκος είναι μεγαλύτερο από  $T$  τότε τείνουν να μεταλλάσσονται προς μικρότερο μέγεθος. Μια άλλη μορφή μεροληψίας κατά τη μεταλλαγή μπορεί να συμβεί μετά από την αντιγραφή DNA. Αυτό το μοντέλο υποθέτει ένα μηχανισμό ανίχνευσης μετά από την αντιγραφή, ο οποίος αφαιρεί μία ή περισσότερες επαναλήψεις από τον ένα ή τον άλλο τόπο όταν το μήκος γίνεται μεγάλο (EIKONA 9B). Αν το σύνθετο μήκος των δύο επαναλήψεων είναι μεγαλύτερο από το όριο  $T$ , τότε με πιθανότητα  $s$  (η «αυστηρότητα» του μηχανισμού αφαίρεσης), ένας από τους δύο μικροδορυφόρους μικραίνει σε μέγεθος κατά μία επανάληψη.

Το τρίτο μοντέλο υποθέτει ότι η φυσική επιλογή δρα στο σύνθετο μήκος των δύο επαναλήψεων (με τις μεγάλες επαναλήψεις να έχουν μικρότερη αρμοστικότητα), μαζί με ένα μηχανισμό μεροληψίας στη μεταλλαγή που ευνοεί την αύξηση της επανάληψης



**ΕΙΚΟΝΑ 9:** Οι τιμές του συντελεστή συσχέτισης για: A) το μοντέλο της μεροληψίας κατα τη μεταλλαγή, B) το μοντέλο του μηχανισμού αφαίρεσης, C) και το μοντέλο της επιλογής.

(EIKONA 9C). Σε όλες τις προσομοιώσεις αυτού του μοντέλου, προστέθηκε μεροληψία στη μεταλλαγή της τάξεως του 2%, έτσι ώστε 52% των μεταλλαγών αυξάνουν το μήκος των επαναλήψεων και 48% το μειώνουν. Η αρμοστικότητα που συνδέεται με κάθε αλληλόμορφο ήταν  $w = 1 - (L - Opt)s$  όπου L είναι το σύνθετο μήκος των δύο αλληλομόρφων στους δύο τόπους, Opt είναι το ιδανικό μήκος και s είναι ο συντελεστής αρμοστικότητας. Η επιλογή μοντελοπιήθηκε ως απλοειδής διαδικασία, που είναι όμοια με φαινόμενο προσθετικής αρμοστικότητας σε διπλοειδές μοντέλο. Έγινε μια προσέγγιση απλοειδούς επιλογής έχοντας κάθε κόμβο στο δένδρο να δημιουργεί ένα αριθμό από απογόνους, καθένας των οποίων είχε αρμοστικότητα w. Οι απόγονοι επιλέχθηκαν με πιθανότητα ίση με την αρμοστικότητά τους. Και με αυτό το μοντέλο μπορούμε να παράξουμε αρνητική συσχέτιση μεταξύ των αλληλομόρφων.

Συνολικά, η EIKONA 9 δείχνει ότι τα πιθανά μοντέλα με μεροληψία στη μεταλλαγή (πριν ή μετά την αντιγραφή) ή με φυσική επιλογή μπορούν να παράξουν αρνητική συσχέτιση παρόμοια με την παρατηρούμενη. Περισσότερη πειραματική δουλειά χρειάζεται, όπως απ'ευθείας ταυτοποίηση μεταλλαγών, για να διαχωρίσουμε ποιοί είναι οι πραγματικοί μηχανισμοί που δρουν, αλλά ο κοινός χαρακτήρας των μοντέλων που παρουσιάζονται είναι η αλληλεξάρτηση των αλλαγών στους δύο συνδεδεμένους μικροδορυφόρους.

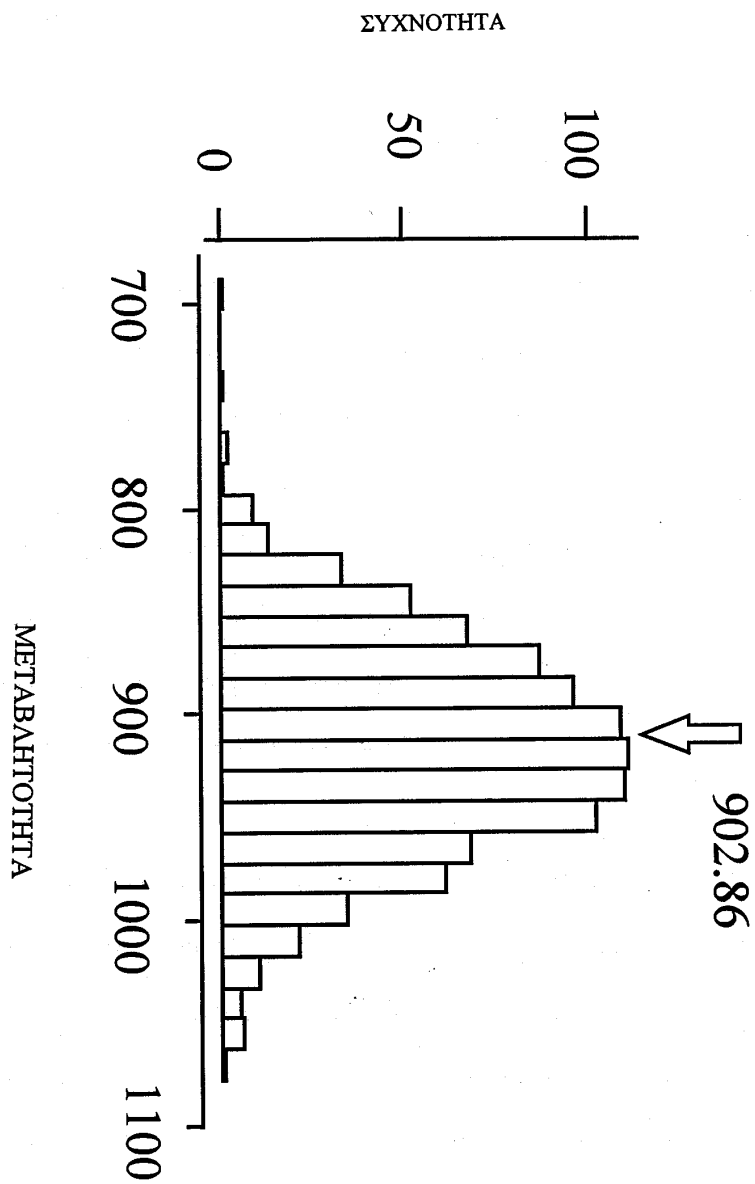
### **Τεστ αναδιάταξης για ισορροπία Hardy Weinberg**

Ένα τεστ που θα μπορούσε να αναγνωρίσει ποικιλομορφία στην αρμοστικότητα

διαφορετικών γονοτύπων του *S44I* είναι η εξέταση του κατά πόσο οι συχνότητες των γονοτύπων αντιστοιχούν σε αυτές που περιμένει κανείς από τυχαία ενοποίηση των γαμετών. Ειδικότερα, θέλουμε να δούμε αν τα αλληλόμορφα που συνθέτουν τους διπλοειδείς γονοτύπους επιλέγονται στην τύχη. Επιχειρήσαμε να απαντήσουμε αυτή την ερώτηση με δύο διαφορετικά τεστ.

Η αρνητική συσχέτιση που είδαμε μεταξύ αλληλομόρφων σε ένα χρωμόσωμα μπορεί να επεκτείνεται σε μη τυχαία ενοποίηση των απλοτύπων σε γονότυπους. Τέτοια μη τυχαία συσχέτιση μπορεί να προκύψει αν η γονοτυπική αρμοστικότητα επηρεάζεται με κάποιο τρόπο. Χρησιμοποιήσαμε ένα τεστ αναδιάταξης (permutation test) για την ταυτοποίηση αποκλίσεων τέτοιου τύπου. Υπολογίσαμε την μεταβλητότητα του αθροίσματος των δύο απλοτύπων (το άθροισμα των σύνθετων μηκών του *S44I* στα δύο χρωμοσώματα) και τη μεταβλητότητα της διαφοράς τους για όλους τους 157 γονοτύπους των οποίων η αλληλική σύνθεση ήταν αδιαμφισβήτητη (βλέπε μεθόδους). Έπειτα δημιουργήσαμε τυχαία ζεύγη απλοτύπων, με το να ανακατέψουμε τους παρατηρούμενους απλοτύπους, συνθέτοντας 1000 ομάδες 157 γονοτύπων και υπολογίσαμε τη μεταβλητότητα του αθροίσματος και της διαφοράς για κάθε ομάδα. Στη συνέχεια αποκτήσαμε την κατανομή της μεταβλητότητας για τις δύο περιπτώσεις και τη συγκρίναμε με την παρατηρούμενη. Και στις δύο περιπτώσεις, οι παρατηρούμενες τιμές βρίσκονταν στον πυρήνα των κατανομών ( $P > 0.3$ , EIKONA 10), κάτι που δείχνει ότι η σχέση των απλοτύπων σε διπλοειδείς γονοτύπους ήταν τυχαία.

Επίσης δοκιμάσαμε το τυπικό τεστ για ισορροπία Hardy-Weinberg (Raymond και



**ΕΙΚΟΝΑ 10:** Οι τιμές μεταβλητότητας από το τεστ αναδιάταξης των γονοτύπων. Με το βέλος ενδεικνύεται η παρατηρούμενη τιμή.

Rousset 1995) συσχέτισης των σύνθετων αλληλομόρφων και η μηδενική υπόθεση για ισορροπία δεν απορίφθηκε ( $P > 0.05$ ), κάτι που επίσης υποστηρίζει την τυχαία συσχέτιση απλοτύπων.

## ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Αυτή η μελέτη δείχνει ότι δύο στενά συνδεδεμένοι μικροδορυφόροι, των οποίων ο αριθμός των επαναλήψεων αναμένεται να εξελίσσεται ανεξάρτητα, μπορούν στην πραγματικότητα να παρουσιάσουν αλληλεξάρτηση τέτοια ώστε να υπάρχει ένα «προτιμώμενο» μέγεθος του σύνθετου μήκους. Τα τεστ αναδιάταξης έδειξαν πρώτα ότι υπάρχει σημαντική αρνητική συμεταβλητότητα μεταξύ των επαναλήψεων των τόπων *SA41a* και *SA41b*. Θεωρούμε τρία μοντέλα που θα μπορούσαν να εξηγήσουν αυτό το πρότυπο μεταβλητότητας τα οποία είναι η πληθυσμιακή ιστορία (στενωπός), μεροληψία κατά τη μεταλλαγή και φυσική επιλογή.

Στο πρώτο μοντέλο (πληθυσμιακή ιστορία) υποθέτουμε ότι τα δύο πιο κοινά ζεύγη αλληλομόρφων (*SA41a*<sup>99</sup>-*Sa41b*<sup>182</sup> και *SA41a*<sup>133</sup>-*SA41b*<sup>152</sup>) αντιπροσωπεύουν προγονικούς απλοτύπους στον τόπο *SA41* των οποίων η πληθώρα σήμερα στον πληθυσμό της τσιπούρας υπάρχει είτε γιατί αυτοί οι απλότυποι ήταν οι αρχικοί στον πληθυσμό που εξελίχθηκε στο είδος της τσιπούρας ή γιατί σε κάποια άλλη στιγμή το είδος, συνολικά, πέρασε από σοβαρή στενωπό μέσα από την οποία αυτοί ήταν που επιβίωσαν. Μία δυσκολία με αυτή την εξήγηση είναι ότι η αρχική πληθώρα των δύο εναλλακτικών απλοτύπων υποτίθεται ότι προέκυψε κατά τύχη. Παρόλο που αυτό είναι



τυπικά δυνατό, οι προσομοιώσεις δείχνουν ότι αυτό είναι σχετικά απίθανο εκτός αν η στενωπός ήταν πολύ σοβαρή κάτι που δεν φαίνεται να ισχύει από άλλες πληροφορίες (Magoulas *et al.* 1995, Μαγουλάς προσωπική επικοινωνία). Μια άλλη δυσκολία με αυτή την υπόθεση ότι οι δύο απλότυποι ήταν οι μόνοι αρχικοί στον πληθυσμό της τσιπούρας, είναι το γεγονός ότι ο ρυθμός μεταλλαγής των μικροδορυφόρων είναι αρκετά μεγάλος ώστε να διαβρώσει τους προσωρινά κυρίαρχους απλότυπους. Επίσης ο μόνος τρόπος που μπορεί να εξηγηθεί το παρατηρούμενο φαινόμενο με στενωπό είναι αν η στενωπός ήταν πολλή σοβαρή (περίπου μείωση του πληθυσμού σε λιγότερο από 1%) , γιατί μόνο έτσι θα μπορούσαν να επιβιώσουν μόνο δύο κύριοι απλότυποι.

Τα άλλα δύο μοντέλα (φυσική επιλογή και μεροληψία κατά τη μεταλλαγή) μοιράζονται την πρόβλεψη ότι θα έπρεπε να παρατηρήσουμε περισσότερους απλότυπους με το ίδιο σύνθετο μήκος αλλά ενδιάμεσοι των δύο ομάδων που παρατηρήθηκαν. Επιλεκτική πίεση σε επαναληπτικές αλληλουχίες έχει προταθεί από τον Charlesworth και συνεργάτες (1986 και 1993) και από τον Stephan (1989). Το μοντέλο επιλογής που εφαρμόστηκε υποθέτει ότι τα άτομα που έχουν σύνθετα αλληλόμορφα μεγαλύτερα από μήκος 236 νουκλεοτίδια έχουν επιλεκτικό μειονέκτημα σε σύγκριση με τα άτομα με μικρότερα αλληλόμορφα. Αυτό βασίζεται στο γεγονός ότι μεγάλες σε μέγεθος αλληλουχίες επαναλήψεων γενικά έχουν σαν αποτέλεσμα την αστάθεια των περιοχών του DNA που τις φέρουν (για παράδειγμα Fragile X στον άνθρωπο). Η παρατήρηση ότι οι απλότυποι στο δείγμα συντίθενται σε γονοτύπους τυχαία δεν συμφωνεί με αυτή την υπόθεση, παρόλο που αποκλίσεις από την μηδενική υπόθεση μη επιλογής είναι αναμενόμενες μόνο όταν υπάρχουν ισχυρές διαφορές στην αρμοστικότητα των

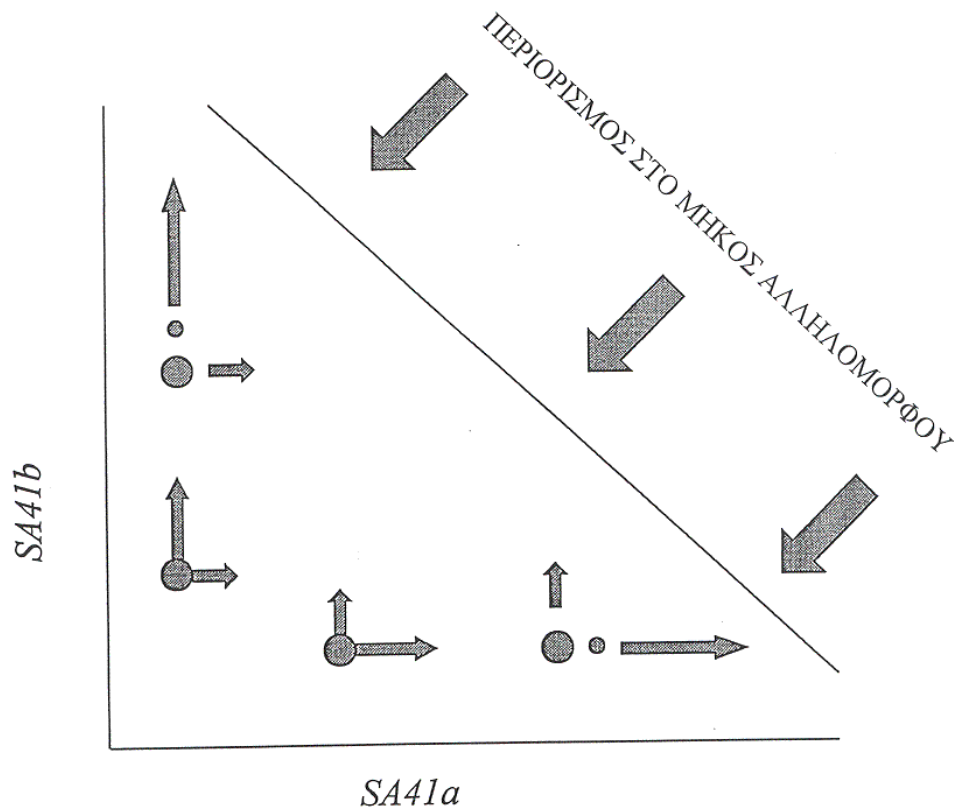
γονοτύπων. Η επιλογή μπορεί να είναι πολύ πιο αδύναμη από αυτή που μπορεί να ανιχνευθεί από το τεστ για ισορροπία Hardy-Weinberg. Παρόλαυτά, προσομοιώνοντας ένα μοντέλο επιλογής καταλήξαμε στο συμπέρασμα ότι για να αποκτήσουμε την αρνητική συσχέτιση που παρατηρήσαμε, ο συντελεστής αρμοστικότητας  $s$  πρέπει να είναι μεγάλος. Επομένως, φαίνεται απίθανο τέτοια επιλογή να δρα στην αλληλουχία αυτή, εκτός αν η αλληλουχία έχει ειδικές ιδιότητες κάτι που δεν μοιάζει πιθανό από την τυχαία σύνθεση των απλοτύπων σε γονότυπους. Άρα η υπόθεση της επιλογής είναι λιγότερο πιθανή για την εξήγηση του παρατηρούμενου φαινομένου, αλλά δεν μπορεί να αποριφθεί.

Το μοντέλο της μεροληψίας κατά τη μεταλλαγή (πριν ή μετά την αντιγραφή) υποθέτει ότι όταν το σύνθετο μήκος ξεπεράσει κάποιο όριο επαναλήψεων (που σε αυτή τη περίπτωση μπορεί να είναι κοντά στο 236), είτε ο μηχανισμός αντιγραφής ευνοεί την μείωση του αριθμού των επαναλήψεων, είτε υπάρχει κάποιος άλλος μηχανισμός που αφαιρεί επαναλήψεις από τον ένα ή τον άλλο τόπο. Το μόνο πρόβλημα με αυτή την εξήγηση είναι το γεγονός ότι δεν μπορεί να εξηγηθεί η ομαδοποίηση των απλοτύπων που παρατηρήθηκε. Αντίθετα θα έπρεπε να είχαμε παρατηρήσει πολλούς απλότυπους με το ίδιο σύνθετο μήκος.

Παρόλαυτά, με βάση την υπάρχουσα πληροφορία για τους μικροδορυφόρους μπορεί να προταθεί ένα μοντέλο για το πως θα μπορούσε να προκύψει η ομαδοποίηση. Έχει προταθεί και υποστηριχθεί από εμπειρικές μελέτες (Weber και Wong 1993, Rubinsztein et al. 1995, Amos et al. 1996), ότι οι μεταλλαγές στους μικροδορυφόρους

είναι μεροληπτικές με τάση να δημιουργούν μεγαλύτερες επαναλήψεις. Την ίδια στιγμή είναι λογικό να υποθέσουμε ότι μεγαλύτερες επαναλήψεις ευνοούν περισσότερα γεγονότα γλιστρήματος κατά την αντιγραφή (replication slippage). Για αυτό υπάρχουν ενδείξεις από το ότι συνήθως η μεταβλητότητα ενός μικροδορυφόρου είναι θετικά συσχετιζόμενη με το μήκος (Goldstein και Clark 1995). Ξεκινώντας με ένα απλότυπο που συντίθεται από δύο μικρές επαναλήψεις, ας πούμε ίδιου μεγέθους, τότε από τύχη μερικοί από αυτούς αυξάνονται σε μήκος είτε στον *SA41a* και άλλοι στον *SA41b*. Αυτοί οι απλότυποι θα μεταλλάσσονται με τα μεγάλα αλληλόμορφα να μεταλλάσσονται γρηγορότερα από τα μικρότερα σε μήκος. Όταν ο μηχανισμός περιορισμού του μήκους (μεροληψία στη μεταλλαγή ή φυσική επιλογή) αρχίσει να δρα, αφαιρεί επαναλήψεις τυχαία από τον ένα ή τον άλλο τόπο με ίση πιθανότητα. Επομένως η μεγάλη επανάληψη θα χάνει επαναλήψεις με τον ίδιο ρυθμό όπως και η μικρή αλλά θα αποκτά με μεγαλύτερο ρυθμό από τη μικρή. Αν ο μηχανισμός αυτός αφεθεί να δράσει για μεγάλο διάστημα, θα δημιουργήσει δύο ομάδες απλοτύπων ίδιου μήκους αλλά στα δύο άκρα ενός τριγώνου (EIKONA 11).

Παρόλο που η φυσική επιλογή δεν μπορεί να απορριφθεί ως πιθανή εξήγηση για τα αποτελέσματα, η μεροληψία κατά τη μεταλλαγή φαίνεται πιο πιθανή, γιατί ταιριάζει περισσότερο με τις υποθέσεις και τα μοντέλα που είναι παραδεκτά αυτή τη στιγμή για τους μικροδορυφόρους. Η υπόθεση μεροληψίας κατά τη μεταλλαγή είναι σύμφωνη με διάφορες μελέτες που προτείνουν περιορισμούς στο μήκος για τους μικροδορυφόρους (Garza *et al.* 1995, Feldman *et al.* 1997, Goldstein και Pollock 1997). Η Wierdl και συνεργάτες (1997) παρατήρησαν διάφορα γεγονότα αφαίρεσης επαναλήψεων από



**ΕΙΚΟΝΑ 11:** Το μοντέλο που προτείνεται για την ομαδοποίηση των απλοτύπων.

Ξεκινώντας με ένα απλότυπο που συντίθεται από δύο μικρές επαναλήψεις, ας πούμε ίδιου μεγέθους, τότε από τύχη μερικοί από αυτούς αυξάνονται σε μήκος είτε στον *SA41a* και άλλοι στον *SA41b*. Αυτοί οι απλότυποι θα μεταλλάσσονται με τα μεγάλα αλληλόμορφα να μεταλλάσσονται γρηγορότερα από τα μικρότερα σε μήκος. Όταν ο μηχανισμός περιορισμού του μήκους (μεροληψία στη μεταλλαγή ή φυσική επιλογή) αρχίσει να δρα, αφαιρεί επαναλήψεις τυχαία από τον ένα ή τον άλλο τόπο με ίση πιθανότητα. Επομένως η μεγάλη επανάληψη θα χάνει επαναλήψεις με τον ίδιο ρυθμό όπως και η μικρή αλλά θα αποκτά με μεγαλύτερο ρυθμό από τη μικρή. Αν ο μηχανισμός αυτός αφεθεί να δράσει για μεγάλο διάστημα, θα δημιουργήσει δύο ομάδες απλοτύπων ίδιου μήκους αλλά στα δύο άκρα ενός τριγώνου.

μικροδορυφόρους (GT) n στο σακχαρομόκητα, όταν ήταν πολύ μεγάλοι σε μήκος. Σε μια πρόσφατη μελέτη (Schug *et al.* 1998) μελετήθηκαν και συγκρίθηκαν οι περιορισμοί στο μήκος των μικροδορυφόρων σε διάφορα είδη και φαίνεται ότι είναι ειδοειδικοί ή τουλάχιστον ειδικοί για ταξονομικές ομάδες. Ο πολύ μικρός ρυθμός μεταλλαγής που παρατηρήθηκε στη *Drosophila melanogaster* (Schug *et al.* 1997) δείχνει ότι οι μηχανισμοί που είναι υπεύθυνοι για τη μεταλλαγή και εξέλιξη των μικροδορυφόρων δεν είναι εντελώς τυχαίοι.

Οι παρατηρήσεις στην παρούσα μελέτη μπορεί να είναι αποτέλεσμα μεροληψίας στη μεταλλαγή ή φυσικής επιλογής και το ποιος από τους δύο είναι ο πραγματικός μηχανισμός θα ξεκαθαριστεί σε μελλοντικές μελέτες που θα παράξουν περισσότερη πληροφορία για στενά συνδεδεμένους μικροδορυφόρους. Εδώ παρουσιάζονται μοντέλα για την εξέλιξη στενά συνδεδεμένων μικροδορυφόρων βασισμένα σε παρατηρήσεις στο είδος *Sparus aurata* (τσιπούρα). Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν ότι το πρότυπο ανισορροπίας σύνδεσης στενά συνδεδεμένων μικροδορυφόρων μπορεί να δώσει πολλές πληροφορίες για τους μηχανισμούς μεταλλαγής και εξέλιξης αυτών των επαναληπτικών αλληλουχιών.

## BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- AMOS, W., S. J. SAWCER, R. W. FEAKES, and D. C. RUBINSZTEIN 1996 Microsatellites show mutational bias and heterozygote instability. *Nat. Genet.* **13**: 390-391.
- BATARGIAS C., E. T. DERMITZAKIS, A. MAGOULAS and E. ZOUROS 1998 Characterization of six polymorphic microsatellite markers in gilthead seabream, *Sparus aurata* (Linnaeus 1758). Submitted to *Molecular Ecology*.
- CHARLESWORTH, B., C. H. LANGLEY, and W. STEPHAN 1986 The evolution of restricted recombination and the accumulation of repeated DNA sequences. *Genetics* **112**: 947-962.
- CHARLESWORTH, B., P. SNIEGOWSKI, and W. STEPHAN 1994 The evolutionary dynamics of repetitive DNA in eukaryotes. *Nature (London)* **371**: 215-220.
- DI RIENZO, A., A. C. PETERSON, J. C. GARZA, A. M. VALDES, M. SLATKIN, and N. B. FREIMER 1994 Mutational processes of simple-sequence repeat loci in human populations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**: 3166-3170.
- ESTOUP, A., L. GARNERY, M. SOLIGNAC, and J. M. CORNUET 1995 Microsatellite variation in honey bee (*Apis mellifera*) populations: hierarchical genetic structure and test of the infinite allele and stepwise mutation models. *Genetics* **140**: 679-695.
- FELDMAN, M. W., A. BERGMAN, D. D. POLLOCK, and D. B. GOLDSTEIN 1997 Microsatellite genetic distances with range constraints: analytic description and problems of estimation. *Genetics* **145**: 207-216.
- GARZA, J. C., M. SLATKIN, and N. B. FREIMER 1995 Microsatellite allele frequencies in

- humans and chimpanzees, with implications for constraints on allele size. *Mol. Biol. Evol.* **12**: 594-603.
- GOLDSTEIN, D. B., and A. G. CLARK 1995 Microsatellite variation in North American populations of *Drosophila melanogaster*. *Nucleic Acids Res.* **23**: 3882-3886.
- GOLDSTEIN, D. B., and D. D. POLLOCK 1997 Launching microsatellites: a review of mutation processes and methods of phylogenetic inference. *J. Heredity* **88**, 335-342.
- GOLDSTEIN, D. B., A. RUIZ LINARES, L. L. CAVALLI-SFORZA, and M. W. FELDMAN 1995 Genetic absolute dating based on microsatellites and the origin of modern humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**: 6723-6727.
- HUDSON, R. R. 1990 Gene genealogies and the coalescent process. *Oxf. Surv. Evol. Biol.* **17**: 1-44.
- KIMURA M., and J. F. CROW 1964 The number of alleles that can be maintained in a finite population. *Genetics* **49**: 725-738
- KINGMAN J. F. C. 1980 *Mathematics of Genetic Diversity*. Society for Industrial and Applied Mathematics, Philadelphia.
- MAGOULAS, A., K. SOPHRONIDES, T. PATARNELLO, E. HATZILARIS, and E. ZOUROS 1995 Mitochondrial DNA variation in an experimental stock of gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.* **4(2)**: 110-116.
- MITTON J. B., and R. K. KOEHN 1973 Population genetics of marine pelecypods. 3. Epistasis between functionally related isoenzymes of *Mytilus edulis*. *Genetics* **73**: 493-496. Appendix by T. PROUT.
- OHTA T., and M. KIMURA 1973 A model of mutation appropriate to estimate the number

- of electrophoretically detectable alleles in a finite population. *Genet. Res.* **22**: 201-204
- POGSON, G. H., and E. ZOUROS 1994 Allozyme and RFLP heterozygosities as correlates of growth rate in the scallop *Placopecten magellanicus*: a test of the associative overdominance hypothesis. *Genetics* **137**: 221-231.
- PRITCHARD, J. K., and M. W. FELDMAN 1996 Statistics for microsatellite variation based on coalescence. *Theo. Pop. Biol.* **50**: 325-344.
- RAYMOND, M., and F. ROUSSET 1995 GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenism. *J. Heredity* **86**: 248-249.
- RUBINSZTEIN, D. C., W. AMOS, J. LEGGO, S. GOODBURN, S. JAIN, S. H. LI, R. L. MARGOLIS, C. A. ROSS, and M. A. FERGUSON-SMITH 1995 Microsatellite evolution—evidence for directionality and variation in rate between species. *Nat. Genet.* **10**: 337-343.
- SCHLOETTERER, C., C. VOGL, and D. TAUTZ 1997 Polymorphism and locus-specific effects on polymorphism at microsatellite loci in natural *Drosophila melanogaster* populations. *Genetics* **146**: 309-320.
- SCHLOETTERER, C., and D. TAUTZ 1992 Slippage synthesis of simple sequence DNA. *Nucleic Acids Research* **20**: 211-215
- SCHUG, M. D., T. F. C. MACKAY, and C. F. AQUADRO 1997 Low mutation rates of microsatellite loci in *Drosophila melanogaster*. *Nat. Genet.* **15**: 99-102.
- SCHUG, M. D., K. A. WETTERSTRAND, M. S. GUADETTE, R. H. LIM, C. M. HUTTER, and C. F. AQUADRO 1997 The distribution and frequency of microsatellite loci in *Drosophila melanogaster*. *Mol. Ecol.* **7**: 57-69



- SLATKIN, M. 1995 A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies. *Genetics* **139**: 457-462.
- STEPHAN, W. 1989 Tandem-repetitive noncoding DNA: forms and forces. *Mol. Biol. Evol.* **6**: 198-212.
- TAKEZAKI, N., and M. NEI 1996 Genetic distances and reconstruction of phylogenetic trees from microsatellite DNA. *Genetics* **144**: 389-399
- TAUTZ, D. 1989 Simple sequences are ubiquitous repetitive components of eukaryotic genomes. *Nucleic Acids Research* **17**: 6463-6471
- VALDES, A. M., M. SLATKIN, and N. B. FREIMER 1993 Allele frequencies at microsatellite loci: the stepwise mutation model revisited. *Genetics* **133**: 737-749.
- WEBER, J. L., and C. WONG 1993 Mutation of human short tandem repeats. *Hum. Mol. Genet.* **2(8)**: 1123-1128.
- WEIR, B. S. 1979 Inferences about linkage disequilibrium. *Biometrics* **35**: 235-254.
- WIERDL, M., M. DOMINSKA, and T. PETES 1997 Microsatellite instability in yeast: dependence on the length of the microsatellite. *Genetics* **146**: 769-779.
- YEH, F.C., R-C. YANG, T. B. J. BOYLE, Z-H. YE, and J. X. MAO 1997 POPGENE: the user-friendly shareware for population genetic analysis. Molecular Biology and Biotechnology Center, University of Alberta, Canada.
- ZHIVOTOVSKY, L. A., and M. W. FELDMAN 1995 Microsatellite variability and genetic distances. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**: 11549-11552.
- ZHIVOTOVSKY, L. A., M. W. FELDMAN, and S. A. GRISHECHKIN 1997 Biased mutations and microsatellite variation. *Mol. Biol. Evol.* **14**: 926-933.

## ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Πρώτα και πάνω από όλους θα ήθελα να ευχαριστήσω τον καθηγητή Ελευθέριο Ζούρο για την υποστήριξη του σε όλη τη διάρκεια αυτής της δουλειάς και για την καθοδήγηση του στα τρία χρόνια που δούλεψα στο εργαστήριο του. Τα αυστηρά σχόλια του, η έντονη κριτική του και η επιστημονική του προσωπικότητα αποτέλεσαν για μένα πηγές ανήπνησης σε στιγμές αδράνειας αλλά και έμπνευσης για την δουλειά μου και την μετέπειτα πορεία μου.

Φυσικά μαζί με τον κύριο Ζούρο πρέπει να ευχαριστήσω τον Αντώνη Μαγουλά για τον ρόλο του σαν δεύτερο καθοδηγητή μου. Ο χρόνος που διέθεσε για μένα αλλά και τα σημαντικά σχόλια του ήταν πολύ βασικά για την ολοκλήρωση αυτής της δουλειάς.

Πολλές επίσης ευχαριστίες στον Γιώργο Κωτούλα που όχι μόνο διέθεσε χρόνο για μένα επιστημονικά με τις προτότυπες και συναρπαστικές ιδέες (ίσως μη ρεαλιστικές για τα Ελληνικά δεδομένα!) αλλά και για τις ευχάριστες συζητήσεις μέσα και έξω από το εργαστήριο.

Ο Κώστας Μπαταργιάς υπήρξε σημαντική πηγή πληροφοριών και γνώσεων αφού τους δικούς του μικροδορυφόρους χρησιμοποίησα αλλά και πολλή ευχάριστη φιλική συντροφιά σε κάτι μοναχικά βράδυα στο παλιό εργαστήριο όπου σχεδιάζαμε μεγαλόπνοα πειράματα που ποτέ δε δούλεψαν!

Ο ισπανός του εργαστηρίου μας ο Carlos Saavedra προσέθεσε κάτι το «διεθνές» στη όλη παρέα και πολλές φορές με συνέφερε όταν το μυαλό μου πήγαινε πολύ γρήγορα (και συχνά σε λάθος κατεύθυνση). Ήταν από τους βασικότερους συμβούλους μου σε αυτή τη δουλειά αφού τον ενοχλούσα συνέχεια με ερωτήσεις (οι πιο πολλές χωρίς νόημα!).

Φυσικά δε θα μπορούσα να ξεχάσω τη Βασω Τερζόγλου και την Κατερίνα Οικονομάκη που με βοήθησαν πάρα πολύ σε διάφορα στάδια της δουλειάς μου, και ας μην τους άρεσε η μουσική μου (που συχνά ήταν πολύ δυνατά!). Επίσης πολλές ευχαριστίες στο Στέλιο που παρόλο που ήρθε στο εργαστήριο μας αργά είχα την ευκαιρία να συνεργαστώ μαζί του.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω όλα τα μέλη του εργαστηρίου Πληθυσμιακής Γενετικής και Εξέλιξης που πέρασαν από το εργαστήριο όσο καιρό ήμουν εκεί, για την ευχάριστη και δημιουργική συνεργασία.

Έξω από το εργαστήριο πρώτα από όλα θα ήθελα να πω ένα μεγάλο ευχαριστώ τις γραμματείς του τμήματος Χαρά Σφακιανάκη και Βάνα Μαρκάκη που με άντεξαν τόσα χρόνια με τις φωνές και τις αντιρρήσεις μου. Πέρασα πολλές καλές στιγμές μαζί τους που δεν ξεχνώ.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω το εργαστήριο Αλιευτικής Βιολογίας για διάφορες μορφές βοήθειας και ιδιαίτερα το φίλο μου Γιάννη Κωστίκα που τόσα περάσαμε μαζί στα έξι χρόνια που ήμουν στο Πανεπιστήμιο Κρήτης.

Δε θα ήθελα όμως να αφήσω απ' έξω δύο άλλα άτομα που υπήρξαν πηγές έμπνευσης και προβληματισμού. Ο καθ. Νίκος Μοσχονάς που με βοήθησε πολύ και όταν έκανα το rotation μου αλλά και κατά τη διάρκεια της δουλειας μου. Από την άλλη πλευρα ο Αλέξανδρος Αργυροκαστρίτης υπήρξε καλός φίλος και σύμβουλος σε πολλά θέματα που αφορούν την επιστήμη και μη. Ακόμα, ευχαριστώ το εργαστήριο Μοριακής Γενετικής του Ανθρώπου (Αγγέλα, Ελεωνόρα, Μαρία, Ηλία κ.τ.λ.) για τη φιλία τους και τη βοήθεια τους.

Επιπρόσθετα, πολλά ευχαριστώ στον τωρινό σύμβουλο καθηγητή μου Andrew

Clark για την πολύπλευρη βοήθεια του στην ανάλυση των αποτελεσμάτων και που μου επέτρεψε να αφιερώσω χρόνο σε αποτελέσματα που δεν αποκτήθηκαν στο εργαστήριο του.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω το Ίδρυμα Κρατικών Υποτροφιών (I.K.Y.) που με υποστήριξε σε αυτή την διατριβή.

Ζητώ συγγνώμη αν ξεχασα πολλούς άλλους που στάθηκαν δίπλα μου σε όλη αυτή την περίοδο αλλά τους διαβεβαιώ ότι τους θυμάμαι εδώ που βρίσκομαι.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω το Ίδρυμα Κρατικών Υποτροφιών (I.K.Y.) που με υποστήριξε σε αυτή την διατριβή.

## **ΛΕΞΑΝΤΕΣ ΕΙΚΟΝΩΝ:**

**ΕΙΚΟΝΑ 1:** Η αλληλουχία του τόπου *SA41*. Στα κουτάκια συμβολίζονται οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν με την κατεύθυνση προς την οποία γίνεται η αντιγραφή.

**ΕΙΚΟΝΑ 2:** Οι συχνότητες των αλληλομόρφων για τους τόπους *SA41a*, *SA41b* και *SA41*.

**ΕΙΚΟΝΑ 3:** Διάγραμμα των ζευγών των αλληλομόρφων που συνθέτουν τους απλότυπους για τους τόπους *SA41a* και *SA41b*. Ο συντελεστής συσχέτισης είναι  $r = -0.229$ , με  $P = 0.001$ .

**ΕΙΚΟΝΑ 4:** Ο σχεδιασμός του τεστ αναδιάταξης. Δημιουργήθηκαν για κάθε περίπτωση 1000 ομάδες από 327 απλότυπους.

**ΕΙΚΟΝΑ 5:** Η κατανομή της μεταβλητότητας από το τεστ αναδιάταξης. Με το βέλος ενδεικνύεται η παρατηρούμενη τιμή.

**ΕΙΚΟΝΑ 6:** Η κατανομή της συμεταβλητότητας από το τεστ αναδιάταξης. Με το βέλος ενδεικνύεται η παρατηρούμενη τιμή.

**ΕΙΚΟΝΑ 7:** Δείγμα από δένδρο που προκύπτει από τη μέθοδο της γενεαλογικής σύγκλισης (coalescent process).

**ΕΙΚΟΝΑ 8:** A) Οι τιμές του συντελεστή συσχέτισης για διάφορες τιμές του παράγοντα στενωπού (B), που προέκυψαν από τις προσομοιώσεις. B) Οι κατανομές της συμεταβλητότητας για δύο διαφορετικές τιμές του παράγοντα στενωπού (100% και 5%). Παρατηρήστε ότι οι δύο κατανομές είναι σχεδόν πανομοιότυπες.

**ΕΙΚΟΝΑ 9:** Οι τιμές του συντελεστή συσχέτισης για: A) το μοντέλο της μεροληψίας κατά τη μεταλλαγή, B) το μοντέλο του μηχανισμού αφαίρεσης, C) και το μοντέλο της επιλογής.

**ΕΙΚΟΝΑ 10:** Οι τιμές μεταβλητότητας από το τεστ αναδιάταξης των γονοτύπων. Με το βέλος ενδεικνύεται η παρατηρούμενη τιμή.

**ΕΙΚΟΝΑ 11:** Το μοντέλο που προτείνεται για την ομαδοποίηση των απλότυπων.

Ξεκινώντας με ένα απλότυπο που συντίθεται από δύο μικρές επαναλήψεις, ας πούμε ίδιου μεγέθους, τότε από τύχη μερικοί από αυτούς αυξάνονται σε μήκος είτε στον *SA41a* και άλλοι στον *SA41b*. Αυτοί οι απλότυποι θα μεταλλάσσονται με τα μεγάλα αλληλόμορφα να μεταλλάσσονται γρηγορότερα από τα μικρότερα σε μήκος. Όταν ο μηχανισμός περιορισμού του μήκους (μεροληψία στη μεταλλαγή ή φυσική επιλογή) αρχίσει να δρα, αφαιρεί επαναλήψεις τυχαία από τον ένα ή τον άλλο τόπο με ίση πιθανότητα. Επομένως η μεγάλη επανάληψη θα

χάνει επαναλήψεις με τον ίδιο ρυθμό όπως και η μικρή αλλά θα αποκτή με μεγαλύτερο ρυθμό από τη μικρή. Αν ο μηχανισμός αυτός αφεθεί να δράσει για μεγάλο διάστημα, θα δημιουργήσει δύο ομάδες απλοτύπων ίδιου μήκους αλλά στα δύο άκρα ενός τριγώνου.