

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ



**Μελέτη της ετεροπλασμίας του μιτοχονδριακού DNA σε
εργαστηριακά στελέχη *Drosophila* και σε φυσικούς υβριδικούς
πληθυσμούς.**

Μαρία-Ελένη Παρακατσελάκη

Διδακτορική Διατριβή
Ηράκλειο, 2022

Η παρούσα διδακτορική διατριβή εκπονήθηκε στο εργαστήριο Πληθυσμιακής Γενετικής και Εξέλιξης του τμήματος Βιολογίας του Πανεπιστημίου Κρήτης.

Επιβλέπων Καθηγητής

Λαδουκάκης Εμμανουήλ (Αναπληρωτής Καθηγητής, Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Κρήτης)

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή

Λαδουκάκης Εμμανουήλ (Αναπληρωτής Καθηγητής, Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Κρήτης)

Πουλακάκης Νίκος (Καθηγητής, Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Κρήτης)

Δελιδάκης Χρήστος (Καθηγητής, Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Κρήτης)

Επταμελής Εξεταστική Επιτροπή

Λαδουκάκης Εμμανουήλ (Αναπληρωτής Καθηγητής, Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Κρήτης)

Πουλακάκης Νίκος (Καθηγητής, Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Κρήτης)

Δελιδάκης Χρήστος (Καθηγητής, Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Κρήτης)

Παυλίδης Παύλος (Ερευνητής Β, Ινστιτούτο Πληροφορικής, Ίδρυμα Τεχνολογίας και Έρευνας)

Ηλιόπουλος Ιωάννης (Αναπληρωτής Καθηγητής, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Κρήτης)

Κωτούλας Γεώργιος (Ερευνητής, Ινστιτούτο Θαλάσσιας Βιολογίας, Βιοτεχνολογίας και Υδατοκαλλιεργειών, ΕΛΚΕΘΕ)

Παρμακέλης Αριστείδης (Αναπληρωτής Καθηγητής, ΕΚΠΑ, Τμήμα Βιολογίας)



Περίληψη

Στα ζώα η κληρονομηση του μιτοχονδριακού DNA (mtDNA) είναι μητρική, δηλαδή όλοι οι απόγονοι φέρουν μόνο το μητρικό μιτοχονδριακό απλότυπο, ή αλλιώς μιτότυπο. Ως αποτέλεσμα της μητρικής κληρονομησης του mtDNA, όλοι οι απόγονοι αναμένεται να φέρουν ένα μόνο μιτότυπο, μια κατάσταση που ονομάζεται ομοπλασμία. Ωστόσο, είναι αρκετά συχνή η παρατήρηση ατόμων που φέρουν παραπάνω από έναν μιτότυπους, είναι δηλαδή ετεροπλασμικοί. Η ετεροπλασμία μπορεί να προκύψει με δύο διαφορετικούς τρόπους. Ο πρώτος είναι μέσω μεταλλαγών που συμβαίνουν στο mtDNA. Ο δεύτερος είναι μέσω περιστασιακής κληρονομησης του mtDNA από τον αρσενικό γονέα, ταυτόχρονα με την κληρονομηση του μητρικού mtDNA, ένα φαινόμενο που ορίζεται ως διαρροή πατρικού mtDNA. Η μελέτη της διαρροής του πατρικού mtDNA παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον, καθώς μπορεί να έχει σημαντικό αντίκτυπο στην αρμοστικότητα του mtDNA, αλλά και γενικότερα στην εξέλιξή του. Πιο συγκεκριμένα, λόγω του αφυλετικού τρόπου μεταβίβασής του το mtDNA συσσωρεύει γρηγορότερα μεταλλαγές σε σχέση με το πυρηνικό DNA (nDNA), παρ' όλα αυτά το mtDNA παραμένει λειτουργικό. Η διαρροή μπορεί να συμβάλλει στη διατήρηση της λειτουργικότητας του mtDNA, καθώς η συνύπαρξη δύο διαφορετικών μιτότυπων μέσα σε ένα άτομο δημιουργεί τις κατάλληλες προϋποθέσεις για ανασυνδυασμό, ο οποίος αναστρέφει τη συσσώρευση επιβλαβών μεταλλαγών σε αυτό. Συνεπώς, η μελέτη της διαρροής και των προτύπων που τη χαρακτηρίζουν κρίνεται ιδιαίτερα σημαντική.

Στην πρώτη ενότητα πειραμάτων της διατριβής αυτής, χρησιμοποιήθηκαν για τη μελέτη της ετεροπλασμίας χιμαιρικές γραμμές *Drosophila*, που δηλαδή έφεραν nDNA από το είδος *D. simulans* και mtDNA από το είδος *D. melanogaster*. Οι γραμμές, που έχουν ένα συγκεκριμένο πυρηνικό υπόβαθρο, βρέθηκαν μετά από μία διαδικασία αντικατάστασης του mtDNA τους να είναι ετεροπλασμικές (*si* και *mel* μιτότυποι), ενώ γραμμές με άλλα πυρηνικά υπόβαθρα ήταν ομοπλασμικές για το μιτότυπο που εισάχθηκε. Μετά από μια σειρά πειραμάτων φάνηκε ότι η εμφάνιση του μιτότυπου *mel* στα άτομα σχετιζόταν με το X χρωμόσωμα της γραμμής *DGRP-820*, και μάλιστα με την περιοχή που ορίζεται από τους φαινοτυπικούς δείκτες *f* και *mal*. Ωστόσο, το γεγονός ότι από τις χιμαιρικές και ετεροπλασμικές γραμμές φαινόταν να διαρρέει πάντα μόνο ο μιτότυπος *mel*, και όχι ο μιτότυπος *si*, οδήγησε στην υπόθεση ότι τα παρατηρούμενα πρότυπα

δεν οφείλονται σε πραγματική ετεροπλασμία, αλλά σε τμήμα του mtDNA που έχει εντεθεί στο nDNA (Nuclear Mitochondrial, NUMT). Για την επίλυση αυτού του ζητήματος σχεδιάστηκε μία σειρά διαφορετικών πειραμάτων. Τελικά, φάνηκε ότι τα παρατηρούμενα πρότυπα οφείλονται σε μια ένθεση NUMT σε μια περιοχή μεγέθους 3,15Mb, μεταξύ των δεικτών *f* και *mal* του *X* χρωμοσώματος. Υπολογίστηκε ότι η ένθεση που βρέθηκε είναι τουλάχιστον 16225bp, γεγονός που το καθιστά το μεγαλύτερου μεγέθους NUMT που έχει βρεθεί για το είδος *D. melanogaster*. Τέλος, συμπεράναμε ότι επειδή NUMTs απαντώνται ολοένα και πιο συχνά στα γονιδιώματα, δεδομένα ετεροπλασμίας πρέπει να αναλύονται με προσοχή προκειμένου να αποφεύγεται η σύγχυση πραγματικής ετεροπλασμίας και πλασματικής ετεροπλασμίας λόγω NUMT.

Στην επόμενη ενότητα πειραμάτων, έγινε προσπάθεια να ανιχνευθεί το NUMT που αναφέρεται παραπάνω στο πλήρως αλληλουχημένο γονιδίωμα της γραμμής *DGRP-820* με μια βιοπληροφορική προσέγγιση. Ειδικότερα, χρησιμοποιήθηκαν δεδομένα αλληλούχησης της γραμμής *DGRP-820* κατατεθειμένα σε βάση δεδομένων με σκοπό την αναζήτηση χιμαιρικών αναγνώσμάτων που ένα μέρος τους στοιχίζεται στο *X* χρωμόσωμα και ένα άλλο μέρος τους στοιχίζεται στο mtDNA. Τέτοια αναγνώσματα αναμένεται να αντιστοιχούν στα άκρα της ένθεσης που αναζητείται. Για την ανάλυση χρησιμοποιήθηκαν τα αχαρτογράφητα αναγνώσματα που προέκυψαν μετά από στοίχιση με γονιδίωμα αναφοράς. Σε αυτά τα αναγνώσματα εφαρμόστηκε ο αλγόριθμος BLAST, ώστε να βρεθούν εκείνα που έχουν ομοιότητες και με το *X* χρωμόσωμα και με το mtDNA. Στα αποτελέσματα που προέκυψαν εφαρμόστηκαν φίλτρα προκειμένου να χαρακτηριστούν ζεύγη χιμαιρικών αναγνώσμάτων που θα αντιστοιχούσαν στα άκρα της ένθεσης. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν, ωστόσο, δεν ήταν δυνατό να περιοριστούν σε σημαντικό βαθμό ώστε να προκύψουν αναγνώσματα που θα είχαν τα χαρακτηριστικά που αναμένεται να έχουν όντας στα άκρα της ένθεσης. Επιπλέον, θετικός μάρτυρας που αναλύθηκε παράλληλα με τα άλλα αναγνώσματα, έδειξε ότι πιθανότατα τα χιμαιρικά αναγνώσματα που αντιστοιχούν στην ένθεση απορρίπτονται σε κάποιο σημείο της ανάλυσης. Υποθέτουμε ότι κύριος υπαίτιος για την αποτυχία της μεθόδου είναι το πολύ μικρό μέγεθος των αναγνώσμάτων που χρησιμοποιήθηκαν σε συνδυασμό με το μεγάλο μέγεθος της ένθεσης.

Στην τελευταία ενότητα πειραμάτων χρησιμοποιήθηκαν μύγες *Drosophila* συλλεγμένες από φυσικό πληθυσμό προκειμένου να διαπιστώσουμε αν υπάρχουν διαφορές στη συχνότητα

που παρατηρείται διαρροή λόγω του διαφορετικού υπόβαθρου που έχουν οι μύγες. Για το σκοπό αυτό κατασκευάστηκαν ισοθλυκές γραμμές του είδους *D. simulans*, θηλυκά από τις οποίες διασταυρώθηκαν με αρσενικά άτομα του εργαστηριακού είδους *D. mauritiana*. Συνολικά, ελέγχθηκαν για ετεροπλασμία 2292 άτομα που προέρχονταν από 15 ισοθλυκές γραμμές. Από τη στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων προέκυψε ότι στα αρσενικά από τρεις ισοθλυκές γραμμές απαντάται διαρροή με μεγαλύτερη συχνότητα σε σχέση με κάποιες άλλες γραμμές. Αντίστοιχη διαφορά παρατηρήθηκε και μετά την ανάλυση της συχνότητας της διαρροής αυτή τη φορά στο σύνολο των απογόνων. Επιπλέον, στους απογόνους που προέρχονταν από δύο συγκεκριμένες ισοθλυκές γραμμές δεν παρατηρήθηκε διαφορά στα ποσοστά ετεροπλασμίας μεταξύ θυληκών και αρσενικών, όπως αναμενόταν από προηγούμενες μελέτες. Από τα αποτελέσματα συμπεράναμε ότι η διαρροή πατρικού mtDNA σχετίζεται άμεσα με τα διαφορετικά πυρηνικά υπόβαθρα των ισοθλυκών γραμμών *D. simulans*, υποδεικνύοντας ότι η διαρροή δεν είναι ένα τυχαίο γεγονός που προκύπτει από την αποτυχία των μηχανισμών που αποκλείουν την κληρονόμηση του πατρικού mtDNA, αλλά μια διαδικασία που ελέγχεται από το nDNA.

Λέξεις-κλειδιά

μιτοχονδριακό DNA, ένθεση, ετεροπλασμία, αμφιγονεϊκή κληρονόμηση, *Drosophila melanogaster*

Abstract

In animals, mtDNA is maternally transmitted, therefore all progeny carries one single mitochondrial haplotype, or otherwise mitotype. As a result, all progeny is expected to carry only one mitotype, a condition described as homoplasmy. However, more and more individuals are found to carry more than one mitotypes, namely they are heteroplasmic. Heteroplasmy can emerge in two different ways. The first one is due to mutations. The second one is due to circumstantial transmission of paternal mtDNA, along with the inheritance of maternal mtDNA, which is described by the term 'paternal leakage'. Studying paternal leakage is interesting, since it can have great impact on mtDNA fitness and on its evolution, in general. Specifically, mtDNA accumulates deleterious mutations faster compared to nDNA, because of its asexual mode of transmission, however mtDNA remains functional. Leakage may contribute to mtDNA's preservation, since when two mitotypes are co-existing in an individual, recombination between the different mtDNA molecules may occur. In turn, the detrimental accumulation of mutations can be mitigated. Consequently, studying heteroplasmy and its pattern is of great significance.

In the first set of experiments, we used chimeric *Drosophila* lines that possess nDNA from *D. melanogaster* and mtDNA from *D. simulans*, to study heteroplasmy. The lines used carry a specific nuclear background (*DGRP-820*) and have been found to be heteroplasmic after replacing their original mtDNA with mtDNA from *D. simulans*. On the contrary, other lines that did not carry this particular nuclear background were homoplasmic for the inserted mitotype. After the first series of experiments, we deduced that the emergence of the *mel* mitotype from the *DGRP-820* line was associated with the X chromosome, and specifically with the region between the phenotypic markers *f* and *mal*. However, the fact that only the *mel* mitotype leaked to the next generation from the heteroplasmic lines, and not the *si* mitotype, led to the hypothesis the observed patterns were not due to true heteroplasmy, but due to a mtDNA fragment embedded in the nDNA (Nuclear Mitochondrial, NUMT). In order to resolve this issue, we designed another set of experiments and found that there is a large NUMT embedded in a 3.15Mb region of the X chromosome, between *f* and *mal* markers. We estimated that the NUMT should be at least 16225bp in size, which is the largest NUMT found in the *D. melanogaster* species. Given the

abundance of NUMTs among genomes, heteroplasmy data should be handled with caution, so they are not interpreted as heteroplasmy, while they are truly NUMTs.

In the next set of experiments, we tried to resolve the problem that arose with heteroplasmy in chimeric lines, using a bioinformatic approach. Specifically, whole-genome sequencing data were used in order to detect the presence of chimeric reads that align in both the mtDNA and the X chromosome. For the analysis, we used reads that were flagged as unmapped after mapping with a reference genome and we performed a BLAST search in order to find reads with similarities with the X chromosome and the mtDNA. Several filters were applied, so that we could detect pairs of reads that correspond to the junctions of the NUMT. However, BLAST hits were hard to reduce even after filtering and, furthermore, positive control showed that reads that correspond to the junctions are probably eliminated during the filtering process. We assumed that the major cause for the inability to detect chimeric reads is the relatively short reads that were used, compared to the large size of the NUMT that we were trying to locate.

In the last set of experiments, we used *Drosophila* collected from a wild population to assess if paternal leakage happens with a different frequency, dependent on the nuclear genome. For this purpose, we constructed isofemale lines of *D. simulans* and we crossed females from these lines with *D. mauritiana* males. In total, we analysed 2292 individuals for the presence of the paternal mtDNA, which came from 15 different isofemale lines. Statistical analysis of the results showed that paternal leakage is more frequently detected in males from three specific lines compared to the other lines. A similar difference was detected when analysing all progeny, regardless of sex. Interestingly, we found two lines where there was no difference in leakage detected between males and females, opposed to what was expected from previous studies. We deduced that paternal leakage is associated with the nuclear background of the *D. simulans* lines, suggesting that leakage does not happen randomly due to failure of mechanisms that eliminate paternal mtDNA from transmitting to the next generation, but it is a process controlled by the nDNA.

Keywords

mtDNA, NUMT, heteroplasmy, biparental transmission, *Drosophila melanogaster*

Πίνακας Περιεχομένων

1	Εισαγωγή	11
1.1	Το μιτοχόνδριο και η προέλευσή του	11
1.2	Το μιτοχονδριακό DNA.....	12
1.3	Η κληρονόμηση του mtDNA	13
1.4	Μηχανισμοί εξάλειψης του πατρικού mtDNA	14
1.5	Αρμοστικότητα του mtDNA	17
1.6	Πηγές ετεροπλασμίας mtDNA	19
1.6.1	Ετεροπλασμία λόγω μεταλλαγών.....	20
1.6.2	Ετεροπλασμία λόγω διαρροής πατρικού mtDNA	21
1.7	Επιπτώσεις της ετεροπλασμίας στους οργανισμούς	23
1.8	Επίπεδα μελέτης της ετεροπλασμίας	25
1.9	Δυναμική της ετεροπλασμίας	26
1.9.1	Δυναμική της ετεροπλασμίας στα κύτταρα της γαμετικής σειράς.....	26
1.9.2	Δυναμική της ετεροπλασμίας στους σωματικούς ιστούς.....	29
1.10	Τεχνικές ανίχνευσης της ετεροπλασμίας	30
1.11	Ενθέσεις του mtDNA στον πυρήνα	32
1.12	Η ετεροπλασμία και το mtDNA ως γενετικός δείκτης	35
2	Μελέτη της ετεροπλασμίας σε χιμαιρικές γραμμές <i>D. melanogaster</i> και περιγραφή ενός νέου NUMT	37
2.1	Σκοπός	37
2.2	Στελέχη και συνθήκες διασταυρώσεων.....	38
2.3	Γενική μεθοδολογία ανίχνευσης των διαφορετικών μιτότυπων	40
2.3.1	Εξαγωγή γενωμικού DNA (gDNA)	40
2.3.2	Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR).....	40
2.3.3	Απομόνωση και ανίχνευση mtDNA σε αγονιμοποίητα αυγά	42
2.3.4	Δοκιμές long PCR	42

2.4	Προσδιορισμός του χρωμοσώματος που είναι υπεύθυνο για την ετεροπλασμία	47
2.4.1	Περιγραφή διασταυρώσεων για την αντικατάσταση των χρωμοσωμάτων της <i>DGRP-820</i>	47
2.4.2	Έλεγχος για ετεροπλασμία στις σταθερές γραμμές 1 έως 3	52
2.5	Διερεύνηση της δημιουργίας της ετεροπλασμίας στις χιμαιρικές γραμμές <i>DGRP-820</i>	54
2.6	Χαρτογράφηση των γενετικών τόπων που σχετίζονται με την ετεροπλασμία πάνω στο Χ χρωμόσωμα.....	56
2.7	Διερεύνηση του πρότυπου διατήρησης της ετεροπλασμίας στις χιμαιρικές γραμμές <i>820sil</i> και <i>820sill</i>	61
2.8	Σύνοψη και συζήτηση των μέχρι τώρα αποτελεσμάτων.....	63
2.9	Διερεύνηση πιθανότητας ύπαρξης NUMT στη γραμμή <i>DGRP-820</i>	65
2.9.1	Σχεδιασμός νέων εκκινητών, ειδικών για τον <i>mel</i> μιτότυπο	65
2.9.2	Ανίχνευση ετεροπλασμίας σε αγονιμοποίητα αυγά των χιμαιρικών γραμμών <i>820sil</i> και <i>820sill</i>	66
2.9.3	Δοκιμές long PCR	67
2.10	Συζήτηση.....	71
3	Μέθοδος ανίχνευσης NUMT με χρήση δεδομένων αλληλούχησης.....	75
3.1	Σκοπός	75
3.2	Θεωρητικό υπόβαθρο.....	76
3.3	Διαδικασία	77
3.4	Αποτελέσματα και συζήτηση	81
4	Μελέτη της ετεροπλασμίας σε υβριδικούς φυσικούς πληθυσμούς	86
4.1	Σκοπός	86
4.2	Υλικά και Μέθοδοι	87
4.2.1	Συλλογή μυγών και κατασκευή ισοθλυκών γραμμών	87

4.2.2	Διαειδικές διασταυρώσεις	89
4.2.3	Εξαγωγή γενωμικού DNA (gDNA) και αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR).....	90
4.2.4	Στατιστική ανάλυση αποτελεσμάτων.....	93
4.3	Αποτελέσματα.....	94
4.3.1	Διαειδικές διασταυρώσεις και αριθμός απογόνων που ελέγχθηκαν.....	94
4.3.2	Διαρροή πατρικού mtDNA και ετεροπλασμία	95
4.3.3	Στατιστική ανάλυση.....	101
4.4	Συζήτηση	107
5	Αναφορές.....	113
6	Παράρτημα.....	142

1 Εισαγωγή¹

1.1 Το μιτοχόνδριο και η προέλευσή του

Τα μιτοχόνδρια είναι κυτταρικά οργανίδια, των οποίων η διάμετρος κυμαίνεται από 0,5 έως 1μm. Η κύρια λειτουργία τους είναι η παραγωγή της απαραίτητης ενέργειας για τη λειτουργία των κυττάρων. Αυτό γίνεται μέσω της διαδικασίας της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης (Oxidative Phosphorylation, OXPHOS), η οποία έχει ως τελικό αποτέλεσμα την παραγωγή τριφωσφορικής αδενοσίνης (ATP) (Campbell 2006). Εκτός από την παραγωγή ενέργειας, συμμετέχουν σε πληθώρα άλλων διεργασιών, όπως είναι η απόπτωση, η γήρανση και η σηματοδότηση του ασβεστίου, των ελεύθερων ριζών οξυγόνου και του ανοσοποιητικού (Tait and Green 2012; Jang et al. 2018; Modesti et al. 2021). Τέλος, τα μιτοχόνδρια εμπλέκονται σε πολλές ανθρώπινες ασθένειες, όπως μυοπάθειες και μιτοχονδριακές διαταραχές (McBride et al. 2006).

Η θεωρία που επικρατεί μέχρι σήμερα, όσον αφορά την προέλευση των μιτοχονδρίων, είναι η ενδοσυμβιωτική θεωρία, η οποία διατυπώθηκε για πρώτη φορά το 1967 (Sagan 1967). Σύμφωνα με αυτή τη θεωρία, τα μιτοχόνδρια είναι αποτέλεσμα της συμβίωσης ενός α-πρωτεοβακτηρίου με ένα αναερόβιο κύτταρο-ξενιστή, ο οποίος σήμερα πιστεύεται ότι ήταν κάποιο αρχαιοβακτήριο (Martin et al. 2015). Αυτό το α-πρωτεοβακτήριο θεωρείται ότι ήταν ένα αερόβιο και κινητικό βακτήριο και έφερε τριχίδια και πρωτεΐνες στην επιφάνειά του για αλληλεπίδραση με κύτταρα-ξενιστές και με το περιβάλλον του. Επιπλέον, υπολογίζεται ότι περιείχε από 3000 έως 5000 γονίδια (Boussau et al. 2004). Με την ενσωμάτωσή τους, τα βακτήρια προσέφεραν νέες ιδιότητες στον ξενιστή τους, ενώ τα ίδια επωφελήθηκαν από κάποιες λειτουργίες του κυττάρου-ξενιστή, με αποτέλεσμα τη δημιουργία των ευκαρυωτικών κυττάρων.

¹ Μέρος του κεφαλαίου έχει δημοσιευθεί.

Parakatselaki, M.-E., & Ladoukakis, E. D. (2021). mtDNA Heteroplasmy: Origin, Detection, Significance, and Evolutionary Consequences. *Life* 2021, Vol. 11, Page 633, 11(7), 633. <https://doi.org/10.3390/LIFE11070633>

1.2 Το μιτοχονδριακό DNA

Τα μιτοχόνδρια περιέχουν το δικό τους γενετικό υλικό, το μιτοχονδριακό DNA (mtDNA). Το mtDNA των ζώων είναι συνήθως ένα κυκλικό και δίκλωνο μόριο DNA, με μέγεθος που συνήθως κυμαίνεται από 16 έως 20kb (Garesse and Kaguni 2005). Ωστόσο, έχουν καταγραφεί και μεγαλύτερα μεγέθη, όπως για παράδειγμα σε κάποια κολεόπτερα του γένους *Pissodes*, όπου το μέγεθος του mtDNA τους φτάνει τα 36kb (Boyce et al. 1989). Ως προς τη δομή, απαντώνται και πιο σπάνιες καταστάσεις, όπου το mtDNA είναι είτε διασπασμένο σε μικρότερα κυκλικά μόρια (Watanabe et al. 1999; Armstrong et al. 2000; Gibson et al. 2007; Shao et al. 2009; Cameron et al. 2011), είτε είναι ένα ευθύγραμμο μόριο (Nosek et al. 1998; Burger et al. 2003; Stampar et al. 2019). Ιδιαίτερο χαρακτηριστικό του mtDNA είναι ότι δε φέρει ιντρόνια, ενώ φέρει μόνο ελάχιστες διαγονιδιακές περιοχές, των οποίων το μήκος περιορίζεται σε μερικές βάσεις (Taanman 1999).

Στη συνηθέστερη μορφή του, ένα μόριο mtDNA αποτελείται από 37 γονίδια, εκ των οποίων τα 22 κωδικοποιούν tRNAs, τα δύο κωδικοποιούν rRNAs και τα άλλα 13 κωδικοποιούν μερικές από τις απαραίτητες πρωτεΐνες για τη μεταφορά ηλεκτρονίων και την οξειδωτική φωσφορυλίωση. Η σύνθεση των μιτοχονδριακών πρωτεϊνών πραγματοποιείται μέσα στα ίδια τα μιτοχόνδρια από τα ριβοσώματα που αυτά διαθέτουν. Οι πρωτεΐνες που συντίθενται μέσα στα μιτοχόνδρια είναι οι τρεις υπομονάδες της κυτοχρωμικής οξειδάσης *CoxI*, *CoxII* και *CoxIII*, το κυτόχρωμα B (*CytB*), οι ATP συνθάσες 6 και 8 (*ATPase 6* και *ATPase 8*) και οι υπομονάδες της αφυδρογονάσης του NADH (*ND1* έως *ND6* και *ND4L*) (Mwinyi et al. 2009).

Για την ολοκλήρωση όλων των βιοχημικών διεργασιών στο μιτοχόνδριο, συμπεριλαμβανομένων των διαδικασιών της αντιγραφής, της μεταγραφής και της μετάφρασης, είναι αναγκαία η παρουσία ενζύμων που κωδικοποιούνται από τον πυρήνα, όπως είναι το κυτόχρωμα C (*CytC*) και οι DNA πολυμεράσες. Τα πυρηνικά γονίδια που χρειάζονται για τη λειτουργία του μιτοχονδρίου είναι είτε γονίδια μιτοχονδριακής προέλευσης που έχουν μεταφερθεί στον πυρήνα, είτε πυρηνικά γονίδια που δε βρίσκονταν ποτέ στο μιτοχόνδριο και εκφράζονται σε μιτοχονδριακούς στόχους (Ballard and Rand 2005).

1.3 Η κληρονόμηση του mtDNA

Γενικά, η κληρονόμηση του mtDNA ακολουθεί μη μεντελικά πρότυπα. Στην περίπτωση των ζώων, η κληρονόμηση του mtDNA είναι μητρική, δηλαδή τα μιτοχόνδρια των απογόνων προέρχονται μόνο από τη μητέρα (Dawid and Blackler 1972). Η μητρική κληρονόμηση ή SMI (Strictly Maternal Inheritance) αποτελεί τον κανόνα και οι γνωστές εξαιρέσεις είναι λίγες. Η μητρική κληρονόμηση του mtDNA εξασφαλίζεται μέσω μηχανισμών που αποτρέπουν τη μεταβίβαση του πατρικού mtDNA στην επόμενη γενιά και διακρίνονται ανάλογα με το αν δρουν πριν ή μετά τη γονιμοποίηση (Birky 1995; Sato and Sato 2013). Απόρροια της μητρικής κληρονόμησης του mtDNA είναι ότι όλοι οι απόγονοι φέρουν έναν μόνο μιτότυπο, μια κατάσταση που ονομάζεται ομοπλασμία. Αντιθέτως, η κατάσταση κατά την οποία σε έναν οργανισμό βρίσκονται δύο ή περισσότεροι μιτότυποι, ονομάζεται ετεροπλασμία (Rokas et al. 2003). Για να προκύψει ένα ετεροπλασμικό άτομο πρέπει είτε να γίνουν νέες μεταλλαγές, είτε να κληροδοτηθούν οι μιτότυποι και των δύο γονέων (Rokas et al. 2003; Nunes et al. 2013).

Οι υποθέσεις για το λόγο που το mtDNA κληρονομείται μονογονεϊκά είναι αρκετές. Γενικά, υπάρχουν αρκετές πειραματικές και θεωρητικές προσεγγίσεις που δείχνουν ότι η μονογονεϊκή κληρονόμηση αυξάνει την αρμοστικότητα, ενώ λόγω αυτών έχει προταθεί ότι η ανισογαμία και η εξέλιξη των φύλων έχει συμβεί για την εξασφάλιση της μονογονεϊκής κληρονόμησης. Μια διαφορετική υπόθεση είναι ότι μέσω της μονογονεϊκής κληρονόμησης αποφεύγονται οι επιβλαβείς συνέπειες που προκύπτουν από την συνύπαρξη διαφορετικών μιτότυπων. Συγκεκριμένα, έχει δειχθεί ότι η ετεροπλασμία επηρεάζει τις κυτταρικές λειτουργίες προκαλώντας δυσλειτουργία σε επίπεδο οργανισμού (Sharpley et al. 2012; Nissanka and Moraes 2020; Lechuga-Vieco et al. 2022). Μια άλλη υπόθεση για τη διατήρηση της μονογονεϊκής κληρονόμησης είναι ότι η ετεροπλασμία μειώνει τη διαφοροποίηση μεταξύ των ωοκυττάρων, ενώ αυξάνει τον κίνδυνο μεταβίβασης επιβλαβών μιτοχονδριακών μεταλλαγών σε συγκεκριμένους ιστούς, επειδή μειώνεται η αποτελεσματικότητα της επιλογής (Radzvilavicius et al. 2016). Επιπρόσθετα, υπόθεση που στηρίζεται σε μαθηματικά μοντέλα υποδεικνύει ότι η συνεργασία μεταξύ mtDNA και πυρηνικού DNA (nDNA) βελτιώνεται όταν το mtDNA μεταβιβάζεται μόνο από τον ένα γονέα (Hadjivasiliou et al. 2012). Άλλες υποθέσεις για τη μονογονεϊκή κληρονόμηση του mtDNA περιλαμβάνουν την αποφυγή εξάπλωσης εγωιστικών

μεταλλαγών που απειλούν την αρμοστικότητα του πληθυσμού (Hoekstra 2000), καθώς και την αποφυγή των κατεστραμμένων από τις ενεργές ρίζες οξυγόνου (Reactive Oxygen Species, ROS) που παράγονται κατά τη σπερματογένεση και κατά τη μετακίνηση του σπερματοζωαρίου προς το ωάριο (Sato and Sato 2011).

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει και η περίπτωση ενός ειδικού τρόπου κληρονομής του mtDNA που ονομάζεται διπλή μονογονεϊκή κληρονομία (Doubly Uniparental Inheritance, DUI) (Skibinski et al. 1994; Zouros et al. 1994). Στη διπλή μονογονεϊκή κληρονομία, το σπέρμα είναι ομοπλασμικό για έναν μιτοχονδριακό απλότυπο, ή αλλιώς μιτότυπο, ο οποίος ονομάζεται M, ενώ τα ωάρια είναι ομοπλασμικά για τον μητρικό μιτότυπο, που ονομάζεται F (Venetis et al. 2006). Κατά τη γονιμοποίηση και την ανάπτυξη του εμβρύου, ο F μιτότυπος είναι εκείνος που απαντάται στους σωματικούς ιστούς και των δύο φύλων, καθώς επίσης και στα κύτταρα της γαμετικής σειράς των θηλυκών ατόμων. Η παρουσία του M μιτότυπου περιορίζεται στη γαμετική σειρά των αρσενικών ατόμων, το οποίο έχει ως αποτέλεσμα τα αρσενικά να φέρουν το μιτότυπο F στο σώμα τους και το μιτότυπο M στα γαμετικά τους κύτταρα. Ο διαχωρισμός αυτός δεν είναι πολύ αυστηρός καθώς υπάρχουν περιπτώσεις όπου ο M μιτότυπος έχει βρεθεί στα σωματικά κύτταρα. Η περίπτωση αυτή ετεροπλασμίας που παρατηρείται στα δίθυρα είναι αποτέλεσμα της ύπαρξης δύο διακριτών γραμμών κληρονομής mtDNA μέσα στο ίδιο είδος, μία μέσω του αυγού και μία μέσω του σπέρματος. Συνεπώς, η παρουσία πατρικού mtDNA σε αρσενικά δίθυρα οφείλεται σε πατρική κληρονομία του M μιτότυπου μόνο στα αρσενικά. Ωστόσο, υπάρχουν σπάνιες περιπτώσεις όπου έχει καταγραφεί μεταβίβαση πατρικού mtDNA και σε θηλυκά άτομα διθύρων (Zouros 2013).

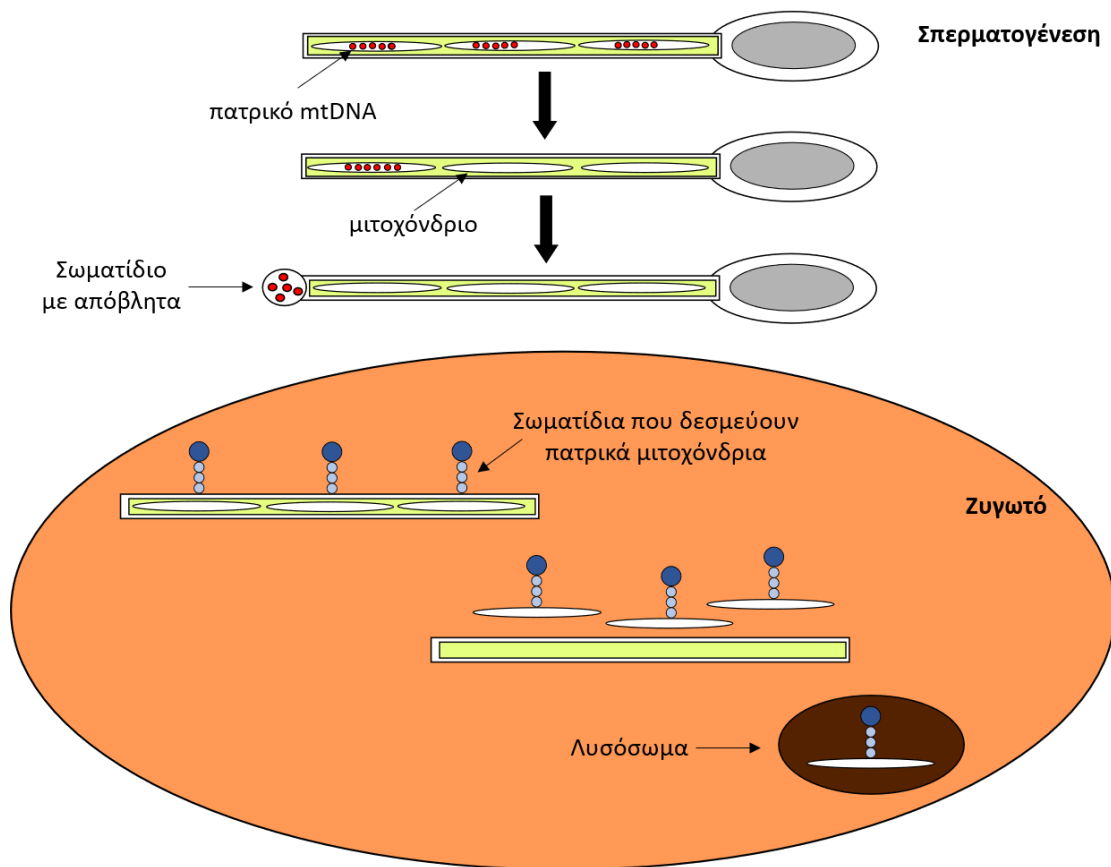
1.4 Μηχανισμοί εξάλειψης του πατρικού mtDNA

Υπάρχουν δύο τύποι μηχανισμών περιορισμού του πατρικού mtDNA στα ζώα: οι προζυγωτικοί και οι μεταζυγωτικοί. Οι προζυγωτικοί μηχανισμοί δρουν πριν τη γονιμοποίηση και σχετίζονται με τη διαδικασία της δημιουργίας των σπερματοζωαρίων. Στη *Drosophila*, η εξάλειψη του πατρικού mtDNA ξεκινάει κατά τη διαδικασία της σπερματογένεσης (Εικόνα 1. 1), και συγκεκριμένα στο στάδιο ανάπτυξης των σπερματίδων, με δύο διαφορετικούς τρόπους. Ο πρώτος τρόπος είναι μέσω της δράσης μιας ενδονουκλεάσης G, η οποία δρα κατά την κυτταρική

αναδιάταξη, όπου διαμορφώνονται οι ουρές των σπερματίδων. Κατά τη διάρκεια της διαδικασίας αυτής εξαλείφεται προοδευτικά το mtDNA από το κεφάλι προς την ουρά των σπερματίδων. Ο δεύτερος τρόπος δρα σε επόμενη φάση της ωρίμανσης του σπερματοζωαρίου, κατά την οποία το mtDNA αποβάλλεται σε σωματίδια με απόβλητα της διαδικασίας ωρίμανσης που βρίσκονται κοντά στην ουρά (DeLuca and O'Farrell 2012). Επιπλέον, έχει βρεθεί ότι και η mtDNA πολυμεράση γ σχετίζεται με την αφαίρεση του mtDNA από το σπέρμα της *Drosophila* (Yu et al. 2017). Η διαδικασία αυτή καταλήγει σε ώριμο σπέρμα που περιέχει μόνο ένα έως δύο αντίγραφα mtDNA (DeLuca and O'Farrell 2012). Η παρουσία μικρής ποσότητας μόνο mtDNA στο σπέρμα σε σχέση με τα ωκύτταρα έχει περιγραφεί και για άλλα είδη, όπως είναι ο βασιλικός σολομός (Wolff and Gemmell 2008).

Η πλειοψηφία των μηχανισμών που έχουν βρεθεί και μελετηθεί είναι μεταζυγωτικοί (Chan and Schon 2012), δρουν δηλαδή μετά τη γονιμοποίηση και αφού έχει σχηματιστεί το ζυγωτό. Οι Sutovsky et al. (1999) παρατήρησαν ότι σε γονιμοποιημένα αυγά πρωτεύοντων και αγελάδας τα μιτοχόνδρια των σπερματοζωαρίων «σημαίνονται» με ουμπικουϊτίνη για να καταστραφούν από τα πρωτεασώματα που την αναγνωρίζουν. Επίσης, έχουν χαρακτηριστεί στα θηλαστικά και κάποιοι παράγοντες αυτοφαγίας που συνεργάζονται με παράγοντες του παραπάνω συστήματος για τη μιτοφαγία των μιτοχονδρίων του σπέρματος (Song et al. 2016). Αντίστοιχος μηχανισμός με σήμανση ουμπικουϊτίνης κατά τη σπερματογένεση έχει παρατηρηθεί, επίσης, στα καβούρια (Hou et al. 2017; Xu et al. 2017), αλλά και στους νηματώδεις *Phascolosoma esculenta* (Hou et al. 2018) και *Caenorhabditis elegans* (Molina et al. 2019). Επιπρόσθετα, στο ψάρι του είδους *Oryzias latipes* συμβαίνει ενζυματική πέψη του mtDNA πριν την καταστροφή των μιτοχονδρίων (Nishimura et al. 2006). Δύο ανεξάρτητες μελέτες (Al Rawi et al. 2011; Sato and Sato 2011) υποδεικνύουν ένα μονοπάτι αυτοφαγίας ως υπεύθυνο για την αποικοδόμηση των πατρικών μιτοχονδρίων από τα λυσοσώματα σε πρώιμα έμβρυα του *C. elegans*. Αργότερα, οι Zhou et al. (2016) ταυτοποίησαν τη μιτοχονδριακή ενδονουκλεάση G CPS-6, ως υπεύθυνη για την καταστροφή των πατρικών μιτοχονδρίων στο ζυγωτό. Ένας άλλος τρόπος περιορισμού του mtDNA του σπέρματος είναι η μεταγραφική του απενεργοποίηση, ένας μηχανισμός που έχει παρατηρηθεί σε ένα πρώιμο αναπτυξιακό στάδιο ψαριών της οικογένειας Cyprinidae, ενώ η εξάλειψή του γινόταν σε μεταγενέστερο αναπτυξιακό στάδιο (Wen et al. 2016).

Τέλος, έχει περιγραφεί και ένας μεταζυγωτικός μηχανισμός που δρα για την αφαίρεση των πατρικών μιτοχονδρίων από το σπέρμα στη *Drosophila* (Politi et al. 2014). Ειδικότερα, σωματίδια που λειτουργούν αντίστοιχα με εκείνα που συμμετέχουν σε αυτοφαγικά μονοπάτια συνδέονται με την ουρά του σπερματοζωαρίου και επάγουν την αποσταθεροποίηση της κυτταρικής του μεμβράνης. Στη συνέχεια, τα πατρικά μιτοχόνδρια διαχωρίζονται από το αξόνημα και απομονώνονται από αυτοφαγοσώματα έως ότου καταστραφούν στα λυσοσώματα. Επιπλέον, οι ερευνητές παρέχουν στοιχεία και για τη συμμετοχή του μονοπατιού της ουμπικουιτίνης στην παραπάνω διαδικασία (Εικόνα 1. 1).



Εικόνα 1. 1: Μηχανισμοί για την εξάλειψη του πατρικού mtDNA στη *Drosophila*. Αρχικά, το mtDNA αφαιρείται στη φάση ωρίμανσης των σπερματίδων κατά τη σπερματογένεση, όπου στο τέλος το mtDNA συγκεντρώνεται σε σωματίδια με απόβλητα της διαδικασίας (DeLuca & O'Farrell 2012). Στη συνέχεια, τα μιτοχόνδρια δεσμεύονται από ειδικά σωματίδια στο στάδιο του ζυγωτού και μεταφέρονται στα λυσοσώματα για την καταστροφή τους (Politi et al. 2014).

1.5 Αρμοστικότητα του mtDNA

Γενικά, η άποψη που επικρατούσε έως πρόσφατα είναι ότι το mtDNA των ζώων δεν ανασυνδυάζεται, ως επακόλουθο του μονογονεϊκού τρόπου κληρονομιάς του (Rokas et al. 2003), σε αντίθεση με το mtDNA των φυτών, των μυκήτων και των πρώτιστων, το οποίο υπόκειται σε ανασυνδυασμό (Gillham 1994).

Στην αφυλετική αναπαραγωγή, την οποία πρακτικά ακολουθεί και το mtDNA, αντίγραφα των πατρικών γονιδιωμάτων μεταβιβάζονται στα θυγατρικά κύτταρα. Με δεδομένο αριθμό επιβλαβών μεταλλαγών στα γονιδιώματα ενός πληθυσμού, τα θυγατρικά μόρια που προέρχονται από αυτά θα περιέχουν τουλάχιστον τον ίδιο αριθμό μεταλλαγών, αφού είναι κλώνοι των πατρικών, ή και περισσότερες ανάλογα με τον μεταλλακτικό ρυθμό. Συνεπώς, μετά από κάποιες διαδοχικές γενιές ο πληθυσμός θα έχει συσσωρεύσει επιβλαβείς μεταλλαγές, οι οποίες μπορεί να οδηγήσουν στην κατάρρευσή του. Το φαινόμενο αυτό δε μπορεί να αναστραφεί σε μη ανασυνδυαζόμενες εξελικτικές γραμμές, γιατί είναι αδύνατο να προκύψει μία γενιά με λιγότερες επιβλαβείς μεταλλαγές από την προηγούμενη (Muller 1964). Η παρατήρηση αυτή ονομάστηκε Muller's Ratchet από τον Felsenstein (1974). Συγκριτικές μελέτες που έχουν γίνει σε γονιδιώματα φυτών, ζώων και μυκήτων έχουν δείξει ότι τα μιτοχονδριακά γονιδιώματα συσσωρεύουν επιβλαβείς μεταλλαγές με μεγαλύτερο ρυθμό σε σχέση με τα πυρηνικά γονιδιώματα (Lynch 1997; Lynch and Blanchard 1998; Neiman and Taylor 2009). Παρ' όλα αυτά, το mtDNA παραμένει υγιές και λειτουργικό (Rand 2001). Επιπλέον, η δράση της επιλογής είναι ισχυρή στο μόριο, όπως υποδεικνύεται και από την πολύ μικρή τιμή που έχει ο λόγος μη συνώνυμων μεταλλαγών προς τις συνώνυμες μεταλλαγές (dN/dS ratio), κυρίως στα ζώα (Soares et al. 2013). Η κατάσταση αυτή συχνά περιγράφεται από τον όρο «μιτοχονδριακό παράδοξο» (Loewe 2006).

Υπάρχουν θεωρίες που έχουν διατυπωθεί για να εξηγήσουν τον τρόπο που το mtDNA παραμένει λειτουργικό παρά τον αφυλετικό τρόπο αναπαραγωγής του (Loewe 2006). Αρχικά, έχει υποτεθεί ότι το Muller's Ratchet είναι μια αργή διαδικασία, τόσο που υπάρχει επαρκής χρόνος ώστε να προκύψουν αντισταθμιστικές μεταλλαγές (compensatory mutations) που θα προσαρμόζουν τη μοριακή δομή και θα αναιρούν την επίδραση των συσσωρευμένων επιβλαβών μεταλλαγών (Kern and Kondrashov 2004; Birky 2008). Οι αντισταθμιστικές αυτές

μεταλλαγές μπορεί να συμβαίνουν και στα πυρηνικά γονίδια που συμμετέχουν στα μιτοχονδριακά σύμπλοκα, όπως έχει βρεθεί ότι συμβαίνει σε πρωτεύοντα (Osada and Akashi 2012). Επιπλέον, το mtDNA μπορεί να αποφεύγει την κατάρρευσή του λόγω της στενωπού από την οποία διέρχεται, δηλαδή λόγω δραματικής μείωσης του αριθμού αντιγράφων του, κατά την ωογένεση (Rebolledo-Jaramillo et al. 2014). Η στενωπός αυτή αυξάνει τη διαφοροποίηση μεταξύ των κυττάρων και, άρα, την αποτελεσματικότητα με την οποία η επιλογή αφαιρεί τις επιβλαβείς μεταλλαγές (Radzvilavicius et al. 2016). Τέλος, ένας άλλος τρόπος που μπορεί να αναστρέψει τις επιβλαβείς συνέπειες του Muller's Ratchet είναι τα σπάνια γεγονότα ανασυνδυασμού του mtDNA.

Γενικά, η άποψη ότι το mtDNA δεν ανασυνδυάζεται έχει πλέον ανατραπεί, καθώς η αναλυτικότερη μελέτη ζωικών μιτοχονδριακών γονιδιωμάτων έχει αναδείξει υπογραφές ανασυνδυασμού, υποδηλώνοντας την ιδιαίτερη σημασία που μπορεί να έχει η περιστασιακή μεταβίβαση πατρικού mtDNA στην εξέλιξη του mtDNA (Camus et al. 2022). Άλλωστε, οι ενζυματικοί μηχανισμοί που είναι απαραίτητοι για τον ανασυνδυασμό έχουν βρεθεί στα μιτοχόνδρια (White et al. 2008), ενώ είναι γνωστό ότι τα μιτοχόνδρια είναι δυνατό να συντηχθούν (Cortese 1999). Πιο συγκεκριμένα, ανασυνδυασμένοι μιτότυποι έχουν ανιχνευθεί σε αρκετά ζώα που ακολουθούν την κλασική μητρική κληρονομία, όπως είναι τα ψάρια (Hoarau et al. 2002; Guo et al. 2006; Ciborowski et al. 2007), οι νηματώδεις (Lunt and Hyman 1997; Hoolahan et al. 2012), οι σαύρες (Ujvari et al. 2007), το καρκινοειδές *Daphnia obtusa* (Ye et al. 2022) και ο άνθρωπος (Kraytsberg et al. 2004; Dahal et al. 2018). Μάλιστα, οι Dahal et al. (2018) τονίζουν τη μεγάλη αξία του ομόλογου ανασυνδυασμού για τη συντήρηση της σταθερότητας του μιτοχονδριακού γονιδιώματος. Τέλος, ανασυνδυασμένα μόρια έχουν βρεθεί και στα δίθυρα του είδους *Mytilus galloprovincialis* (Ladoukakis and Zouros 2001), στα οποία το mtDNA μεταβιβάζεται με διπλή μονογονεϊκή κληρονομία.

Η ανίχνευση ανασυνδυασμένων μορίων έχει γίνει και για τη *Drosophila*, το οποίο κατέστη δυνατό μέσω κατασκευής τεχνητών ετεροπλασμικών γραμμών και άσκησης επιλογής που θα ευνοούσε την ύπαρξη ενός ανασυνδυασμένου μορίου (Ma and O'Farrell 2015). Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι το ανασυνδυασμένο μόριο έγινε το μοναδικό ή το

κυρίαρχο μόριο στους απογόνους. Πρόκειται για την πρώτη αναφορά ανασυνδυασμού στο mtDNA της *Drosophila*.

Οι εξελικτικές συνέπειες και τα οφέλη που προκύπτουν από τον ανασυνδυασμό του mtDNA είναι μεγάλης σημασίας. Ο ανασυνδυασμός αποτελεί ένα φραγμό κατά της συσσώρευσης επιβλαβών μεταλλαγών (White et al. 2008), ενώ ευνοεί την εμφάνιση ωφέλιμων μεταλλαγών και την απομάκρυνση των επιβλαβών μεταλλαγών, χωρίζοντας ουσιαστικά τις μεταλλαγές από τα πυρηνικά υπόβαθρά τους (Neiman and Taylor 2009). Οι Charlesworth et al. (1993) υπολόγισαν ότι χρειάζεται ένα γεγονός ανασυνδυασμού ανά χρωμόσωμα και ανά γενιά (10^{-5} γεγονότα/τόπο/γενιά) για έναν πληθυσμό με 100 διπλοειδή άτομα και με ένα χρωμόσωμα με 1000 γενετικούς τόπους. Η ετεροπλασμία μπορεί να δημιουργήσει τις κατάλληλες προϋποθέσεις για να έχει όφελος ο ανασυνδυασμός, που είναι το να υπάρχουν τουλάχιστον δύο μιτότυποι διαφορετικοί μεταξύ τους. Ωστόσο, όπως θα περιγραφεί και παρακάτω, η εκτεταμένη ετεροπλασμία προκαλεί σε γενικές γραμμές προβλήματα στους οργανισμούς που τη φέρουν. Συνεπώς, ένας τρόπος ώστε το mtDNA να επωφελείται του ανασυνδυασμού και να αποφεύγει τις επιβλαβείς συνέπειες της ετεροπλασμίας θα μπορούσε να αποτελεί η περιστασιακή μεταβίβαση πατρικού mtDNA στο ζυγωτό και η εμφάνιση ετεροπλασμίας σε μικρή συχνότητα.

1.6 Πηγές ετεροπλασμίας mtDNA

Η ετεροπλασμία σε ένα άτομο μπορεί να προκύψει με δύο διαφορετικούς τρόπους. Ο πρώτος είναι από μεταλλαγές που συμβαίνουν σε σωματικά ή γαμετικά κύτταρα κατά τη διάρκεια ζωής ενός ατόμου. Ο δεύτερος τρόπος είναι μέσω της περιστασιακής μεταβίβασης πατρικού mtDNA στο ζυγωτό κατά τη γονιμοποίηση, ένα φαινόμενο που ονομάζεται διαρροή πατρικού mtDNA. Ωκύτταρα στα οποία υπάρχει ήδη ετεροπλασμία με έναν από τους δύο παραπάνω τρόπους μπορούν επίσης να οδηγήσουν σε ετεροπλασμικά άτομα, ένα φαινόμενο που ονομάζεται μητρική κληρονόμηση της ετεροπλασμίας. Μητρική κληρονόμηση της ετεροπλασμίας έχει παρατηρηθεί σε πληθώρα οργανισμών, όπως είναι τα καρκινοειδή (Doublet et al. 2008), η *Drosophila* (Polovina et al. 2020), οι μέλισσες *Amphylaeus morosus* (Davies et al.

2022), τα μυρμήγκια της οικογένειας Formicidae (Meza-Lázaro et al. 2018), οι κάβουρες *Maja brachydactyla* (Rodríguez-Pena et al. 2020) και ο άνθρωπος (Li et al. 2016).

1.6.1 Ετεροπλασμία λόγω μεταλλαγών

Η χρήση νέας γενιάς τεχνικών αλληλούχησης (Next Generation Sequencing, NGS) αποκάλυψαν ότι η ετεροπλασμία λόγω μεταλλαγών είναι ένα πολύ κοινό φαινόμενο στον ανθρώπινο πληθυσμό (Payne et al. 2013; Ye et al. 2014; Stewart and Chinnery 2021). Ο υψηλότερος μεταλλακτικός ρυθμός που απαντάται στο ζωικό mtDNA, σε συνδυασμό με τον τεράστιο αριθμό αντιγράφων mtDNA σε σχέση με το nDNA, οδηγεί στη δημιουργία διαφορετικών μιτοχονδριακών απλότυπων, οι οποίοι θα συνυπάρχουν με τον πιο κοινό, μητρικό απλότυπο. Αυτοί οι απλότυποι αναμένεται να διαφέρουν σε ένα ή περισσότερα νουκλεοτίδια (Single Nucleotide Polymorphisms, SNPs) και να απαντώνται σε πολύ χαμηλή συχνότητα (Payne et al. 2013; Li et al. 2015a). Πράγματι, μια λεπτομερής μελέτη σε ανθρώπους έδειξε ότι όλα σχεδόν τα άτομα ήταν ετεροπλασμικά για διαφορετικούς απλότυπους, οι οποίοι βρίσκονταν σε πολύ χαμηλή συχνότητα (1,5%) (Payne et al. 2013).

Οι μεταλλαγές στο mtDNA, οι οποίες αυξάνονται σε αριθμό με την αύξηση της ηλικίας (Arbeithuber et al. 2022), προκύπτουν κυρίως για δύο διαφορετικούς λόγους. Πρώτον, το mtDNA βρίσκεται πολύ κοντά στην εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη, από την οποία προέρχονται κυρίως οι ROS, χωρίς να έχει τη δυνατότητα να προστατευτεί, σε αντίθεση με το nDNA στο οποίο δρουν οι ιστόνες και πληθώρα επιδιορθωτικών μηχανισμών (Ames et al. 1995; Duran et al. 2011). Ο δεύτερος λόγος, που αποτελεί και την κυριότερη πηγή μεταλλαγών, είναι τα λάθη που συμβαίνουν κατά την αντιγραφή του mtDNA, η οποία συμβαίνει και αρκετά συχνότερα σε σχέση με το nDNA (Kauppila et al. 2017; Hood et al. 2019). Η σταθερή συσσώρευση μεταλλαγών προκαλεί μείωση στην αποδοτικότητα με την οποία παράγεται ATP και οδηγεί στην «γήρανση» των μιτοχονδρίων (Monaghan and Metcalfe 2019). Εκτεταμένη ετεροπλασμία λόγω μεταλλαγών έχει παρατηρηθεί τόσο σε σωματικά κύτταρα (Ames et al. 1995; Li et al. 2015a; Palozzi et al. 2018), όσο και σε κύτταρα της γαμετικής σειράς και των δύο φύλων (Aitken 2017; Floros et al. 2018; Woods et al. 2018; Ma et al. 2020).

1.6.2 Ετεροπλασμία λόγω διαρροής πατρικού mtDNA

Διαρροή πατρικού mtDNA παράλληλα με τη μεταβίβαση του μητρικού mtDNA έχει πλέον παρατηρηθεί για πολυάριθμα είδη ζώων. Οι πρώτες αναφορές σχετικά με το φαινόμενο ήταν από μελέτες υβριδισμού μεταξύ ειδών ή υποειδών ζώων, καθώς σε αυτές τις περιπτώσεις οι μηχανισμοί που αποκλείουν τη μεταβίβαση του πατρικού mtDNA είναι λιγότερο αποτελεσματικοί, γεγονός που σημαίνει ότι η διαρροή συμβαίνει συχνότερα. Η πλειοψηφία των μελετών, στις οποίες έχει παρατηρηθεί διαρροή σε υβρίδια διαφόρων ζώων, αφορούν κυρίως έντομα, όπως είναι οι πεταλούδες του γένους *Heliothis* (Lansman et al. 1983), η *Drosophila* (Kondo et al. 1992; Sherengul et al. 2006; Dokianakis and Ladoukakis 2014), οι μέλισσες του είδους *Apis mellifera* (Meusel and Moritz 1993), τα σκαθάρια του γένους *Octhebius* (Mastrantonio et al. 2019b), οι κρότνες του γένους *Rhipicephalus* (Mastrantonio et al. 2019a) και τα τζιτζίκια του γένους *Magicicada* (Fontaine et al. 2007). Διαρροή σε υβρίδια έχει παρατηρηθεί, επίσης, και σε άλλα ζώα, όπως είναι τα ποντίκια (Gyllensten et al. 1991; Shitara et al. 1998), τα ψάρια (Morgan et al. 2013; Wen et al. 2016), καθώς και τα πουλιά (Kvist et al. 2003; Gandolfi et al. 2017). Στις περιπτώσεις υβριδισμού, η ανίχνευση πατρικού mtDNA είναι ευκολότερη, όχι μόνο επειδή η διαρροή συμβαίνει συχνότερα, αλλά και επειδή ο πατρικός και ο μητρικός μιτότυπος είναι διακριτοί, και έτσι καθίσταται απλούστερος ο σχεδιασμός μιας διαδικασίας που θα τους ξεχωρίζει.

Η διαρροή πατρικού mtDNA δεν έχει παρατηρηθεί μόνο σε υβρίδια, αλλά και σε απογόνους ενδοειδικών διασταυρώσεων. Ειδικότερα, οι αναφορές για ενδοειδική διαρροή είναι πολυάριθμες και αφορούν μεγάλη ποικιλία ζώων, όπως είναι οι σκορπιοί που ανήκουν στα γένη *Buthus* και *Mesobuthus* (Gantenbein et al. 2005), οι σαύρες του είδους *Chlamydosaurus kingii* (Ujvari et al. 2007), το πρόβατο *Ovis aries* (Zhao et al. 2004), τα ρακούν του είδους *Nyctereutes procyonoides* (Nisztuk-Pacek et al. 2019), η *Drosophila* (Dean et al. 2003; Wolff et al. 2012) και ο άνθρωπος (Schwartz and Vissing 2002).

Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι υπάρχει μικρός αριθμός αναφορών για ετεροπλασμία λόγω διαρροής πατρικού mtDNA και σε φυσικούς πληθυσμούς ζώων. Ειδικότερα, οι Paduan and Ribolla (2008) ταυτοποίησαν τρία άτομα κουνουπιών *Aedes aegypti* στη Βραζιλία που έφεραν πάνω από έναν διαφορετικούς μιτότυπους, οι οποίοι έχουν προκύψει από διαρροή.

Επιπλέον, στα μισά από τα 49 είδη μελισσών του γένους *Hylaeus* που μελετήθηκαν βρέθηκε ετεροπλασμία που διατηρείται σταθερά στον πληθυσμό (Magnacca and Brown 2010). Οι Halley et al. (2015) βρήκαν ότι το 25% των ορτυκιών *Colinus virginianus* που μελετήθηκαν ήταν ετεροπλασμικά. Επιπρόσθετα, οι Robison et al. (2015) παρατήρησαν εκτεταμένη ετεροπλασμία σε πληθυσμούς κοριών του είδους *Cimex lectularius*, η οποία οφείλεται σε διαρροή πατρικού mtDNA. Συγκεκριμένα για τη *D. melanogaster*, οι Nunes et al. (2013) έδειξαν ότι η ετεροπλασμία απαντάται αρκετά συχνά σε φυσικούς πληθυσμούς, με το ποσοστό των ετεροπλασμικών ατόμων να ανέρχεται στο 14%.

Η διαρροή πατρικού mtDNA μπορεί να ερμηνευθεί ως μια αδυναμία των γενικά αυστηρών μηχανισμών που διασφαλίζουν τη μονογονεϊκή κληρονομία του mtDNA (Rokas et al. 2003), παρόμοια με την αδυναμία των επιδιορθωτικών μηχανισμών να αναιρέσουν κάποιες σωματικές μεταλλαγές. Ωστόσο, η συχνότητα με την οποία παρατηρείται πλέον ετεροπλασμία λόγω διαρροής πατρικού mtDNA υποδεικνύει ότι πρόκειται περισσότερο για ένα ελεγχόμενο φαινόμενο παρά για τυχαιότητα. Είναι πλέον αρκετά δημοφιλής η υπόθεση ότι χαμηλά επίπεδα ετεροπλασμίας μπορεί να έχουν και θετική επίδραση στους οργανισμούς και, συνεπώς η διαρροή πατρικού mtDNA να διατηρείται ως αποτέλεσμα δράσης της φυσικής επιλογής (Radzvilavicius and Johnston 2020).

Η διαρροή, όπως προαναφέρθηκε, μπορεί να έχει οφέλη για τη διατήρηση της αρμοστικότητας του mtDNA, με το να προσφέρει την ευκαιρία στο mtDNA για ανασυνδυασμό, ωστόσο η συμβολή της δε σταματάει εκεί. Ένα σημαντικό μειονέκτημα της μονογονεϊκής κληρονομίας του mtDNA είναι η συσσώρευση μεταλλαγών που είναι επιβλαβείς για τα αρσενικά, αλλά δεν απομακρύνονται από την επιλογή, γιατί μπορεί να είναι ωφέλιμες ή ουδέτερες για τα θηλυκά, φαινόμενο που περιγράφεται από τον όρο «κατάρα της μητέρας» (Gemmell et al. 2004), ενώ υπάρχουν και πειραματικές αποδείξεις για την ύπαρξη του φαινομένου (Smith et al. 2010; Innocenti et al. 2011; Patel et al. 2016). Μάλιστα, η επίδραση του και το κόστος που έχει για την αρμοστικότητα των αρσενικών μπορεί να διαφέρει σημαντικά μεταξύ ειδών που χαρακτηρίζονται από διαφορετικές δημογραφικές ιστορίες (Connallon et al. 2018). Έχει προταθεί ότι η επίδραση τέτοιων επιβλαβών μεταλλαγών μόνο στα αρσενικά μπορεί να εξομαλυνθεί μέσω της διαρροής πατρικού mtDNA, καθώς, δεδομένου ότι προέρχεται από

τον πατέρα μπορεί να φέρει ωφέλιμους για αυτά πολυμορφισμούς και να βελτιώνει την αρμοστικότητα τους (Kuijper et al. 2015).

1.7 Επιπτώσεις της ετεροπλασμίας στους οργανισμούς

Η ετεροπλασμία φαίνεται ότι σε κάποιες περιπτώσεις συμβάλλει θετικά στην αρμοστικότητα του mtDNA. Μάλιστα, μια ξεχωριστή περίπτωση περιγράφηκε πρόσφατα σε υβρίδια ψαριών από τα γένη *Megalobrama* και *Carassius*, όπου η εισαγωγή πατρικών μιτοχονδρίων ανέστρεψε την ασυμβατότητα σε υβρίδια ψαριών (Wen et al. 2022). Ωστόσο, η παρουσία της ετεροπλασμίας στους οργανισμούς συνδέεται σε γενικές γραμμές συχνά με αρνητικές επιπτώσεις. Καταρχήν, είναι γνωστό ότι η εύρυθμη λειτουργία των μιτοχονδρίων βασίζεται στη συνεργασία του mtDNA και του nDNA, ενώ οι δύο τύποι γονιδιώματος συνεξελίσσονται (Puslednik et al. 2012). Συνεπώς, είναι αναμενόμενο η ετεροπλασμία να οδηγεί και στη διάσπαση των βέλτιστων συνδυασμών απλοτύπων μεταξύ μιτοχονδριακών και πυρηνικών γονιδιωμάτων, με αποτέλεσμα τη μείωση της αρμοστικότητας του οργανισμού και του πληθυσμού (Ellison and Burton 2008; Meiklejohn et al. 2013; Zaidi and Makova 2019).

Εκτός από την αλληλεπίδραση που φαίνεται να έχουν οι εκάστοτε μιτότυποι με το nDNA, η ίδια η συνύπαρξη διαφορετικών μιτότυπων μέσα στο ίδιο κύτταρο έχει συνδεθεί με αρνητικές επιπτώσεις στην αρμοστικότητα του οργανισμού, ακόμα και όταν αυτοί δε φέρουν επιβλαβείς μεταλλαγές. Αρχικά, είναι πιθανό η συμμετοχή πρωτεϊνών που έχουν κωδικοποιηθεί από δύο διαφορετικούς μιτότυπους να παράγει ένα ελαττωματικό μιτοχονδριακό σύμπλοκο, οπότε η συνύπαρξη των διαφορετικών μιτότυπων να είναι επιβλαβής (Wallace 2007). Για την παρατήρηση των επιπτώσεων της ετεροπλασμίας, οι Sharpley et al. (2012) χρησιμοποίησαν ετεροπλασμικά ποντίκια τα οποία έφεραν δύο διαφορετικούς μιτότυπους, οι οποίοι δεν έφεραν μεταλλαγές και ήταν λειτουργικοί σε ομοπλασμική κατάσταση με δεδομένο πυρηνικό υπόβαθρο. Ωστόσο, τα ζώα που έφεραν και τους δύο μιτότυπους εμφάνισαν μεταβολικές, συμπεριφορικές και νοητικές διαταραχές. Αντίστοιχα ήταν και τα αποτελέσματα των Lechuga-Vieco et al. (2022), οι οποίοι παρατήρησαν ότι ποντίκια που έφεραν δύο μη επιβλαβείς μιτότυπους παρουσίαζαν προβλήματα στη λειτουργία της καρδιάς και τους σκελετικούς μύες. Μια θεωρία για το λόγο που η ετεροπλασμία είναι επιβλαβής διατυπώθηκε από το Lane (2012),

σύμφωνα με την οποία εάν ένα μίγμα «αργών» και «γρήγορων» ως προς τη σύνθεση ATP μιτότυπων επαρκούσε για να καλύψει τις ενεργειακές απαιτήσεις κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης, τότε δεν θα υπήρχε λόγος να αυξηθεί η μιτοχονδριακή πυκνότητα σε εκείνο το στάδιο. Έτσι, η λειτουργία των νευρώνων του εγκεφάλου, στους οποίους η βιογένεση των μιτοχονδρίων είναι περιορισμένη στο ενήλικο στάδιο, επηρεάζεται κάθε φορά που οι ενεργειακές απαιτήσεις αυξάνονται εξαιτίας της ανεπαρκούς συνεργασίας των μιτότυπων στο συγκεκριμένο στάδιο, προκαλώντας γνωστικές και συμπεριφορικές ανωμαλίες.

Η ετεροπλασμία που προκύπτει εξαιτίας επιβλαβών μεταλλαγών είναι γνωστό ότι μπορεί να προκαλέσει μια ομάδα διαταραχών που σχετίζονται με δυσλειτουργίες στα μιτοχόνδρια, οι οποίες ονομάζονται μιτοχονδριακές ασθένειες (Gorman et al. 2016). Η εμφάνιση των ασθενειών αυτών εξαιτίας νέων μεταλλαγών στο mtDNA είναι δύσκολο να προβλεφθεί, λόγω του μη μεντελικού τρόπου κληρονομής του mtDNA (Stewart and Chinnery 2015; Machado et al. 2020). Το αν όντως θα εμφανιστούν τα συμπτώματα της εκάστοτε ασθένειας εξαρτάται από την ποσότητα των μεταλλαγμένων μορίων mtDNA σε σχέση με τα αγρίου τύπου μόρια. Στην πλειοψηφία των περιπτώσεων, τα αγρίου τύπου μόρια είναι ικανά να αντισταθμίσουν την επιβλαβή δράση των μεταλλαγμένων μορίων mtDNA. Ωστόσο, αν το ποσοστό των τελευταίων ξεπεράσει ένα συγκεκριμένο «κατώφλι», τότε τα αγρίου τύπου μόρια δεν είναι ικανά πλέον να καλύψουν τις λειτουργικές απαιτήσεις των κυττάρων, με αποτέλεσμα την εμφάνιση ασθενειών (Rossignol et al. 2003; Stewart and Chinnery 2021). Το όριο πάνω από το οποίο εμφανίζεται η ασθένεια διαφέρει ανά περίπτωση και εξαρτάται κατά κύριο λόγο από τον τύπο της μεταλλαγής και τον ιστό, αλλά σε γενικές γραμμές κυμαίνεται από 70% έως 90%. Αυτό σημαίνει ότι οι περισσότερες μεταλλαγές έχουν υπολειπόμενο φαινότυπο (Schon et al. 2012; Burr et al. 2018). Η συχνότητα των ασθενειών που προκαλούνται από μεταλλαγές στο mtDNA είναι 1:4300 (Gorman et al. 2015). Τα όργανα που επηρεάζονται περισσότερο είναι εκείνα που βασίζονται σε αερόβιο μεταβολισμό, συνεπώς οι μεταλλαγές στο mtDNA σχετίζονται με καρδιαγγειακές, νευρολογικές και εκφυλιστικές ασθένειες (Mustafa et al. 2020). Τέλος, ένας ακόμα τρόπος που η ετεροπλασμία μπορεί να οδηγήσει σε εμφάνιση ασθενειών περιγράφεται από τους Korinski et al. (2019). Πιο συγκεκριμένα, οι ερευνητές συσχέτισαν την παρουσία επιβλαβών μεταλλαγών και τα επίπεδα της ετεροπλασμίας με επιγενετικές αλλαγές στο nDNA, όπως είναι η μεθυλίωση

και η ακετυλίωση των ιστονών, ενώ συμπέραναν ότι αυτή η συσχέτιση μπορεί να εξηγήσει την πληθώρα φαινότυπων που εμφανίζονται στις μιτοχονδριακές ασθένειες.

1.8 Επίπεδα μελέτης της ετεροπλασμίας

Η ετεροπλασμία είναι δυνατό να μελετηθεί σε διαφορετικά ιεραρχικά επίπεδα (Πίνακας 1. 1). Το πρώτο επίπεδο είναι αυτό του πληθυσμού. Ένας πληθυσμός θεωρείται ετεροπλασμικός όταν υπάρχουν άτομα που φέρουν διαφορετικούς μιτότυπους (Dean et al. 2003; Ujvari et al. 2007). Το επόμενο επίπεδο είναι εκείνο του ατόμου, το οποίο είναι και το περισσότερο μελετημένο, καθώς υπάρχει πληθώρα αναφορών (Nunes et al. 2013; Mastrantonio et al. 2019a). Σε αυτό το επίπεδο διακρίνονται δύο διαφορετικές περιπτώσεις (Parakatselaki and Ladoukakis 2021). Η πρώτη περίπτωση είναι οι ιστοί του ατόμου να είναι, επίσης, ετεροπλασμικοί (Polovina et al. 2020). Η δεύτερη περίπτωση είναι το άτομο να έχει μεν ομοπλασμικούς ιστούς, αλλά για διαφορετικούς μιτότυπους. Η δεύτερη περίπτωση δεν είναι πολύ συνηθισμένη, αλλά παρατηρείται στη φύση. Για παράδειγμα, στα αρσενικά δίθυρα που ακολουθούν διπλή μονογονεϊκή κληρονομία του mtDNA το σπέρμα είναι ομοπλασμικό για το μιτότυπο M, ενώ οι σωματικοί τους ιστοί είναι ομοπλασμικοί για το μιτότυπο F (Venetis et al. 2006). Δηλαδή, τα αρσενικά είναι ετεροπλασμικά στο επίπεδο του ατόμου, αλλά οι ιστοί τους είναι ομοπλασμικοί. Αντίστοιχη παρατήρηση έχει γίνει και σε ετεροπλασμικά ποντίκια, όπου ανάλογα τον ιστό επιλέγεται διαφορετικός μιτότυπος (Jenuith et al. 1997). Το τρίτο επίπεδο μελέτης της ετεροπλασμίας είναι εκείνο του ιστού (Burgstaller et al. 2014; Naue et al. 2015). Πιο συγκεκριμένα, ο ιστός μπορεί να φέρει διαφορετικούς μιτότυπους, αλλά τα κύτταρα από τα οποία αποτελείται μπορεί να είναι ομοπλασμικά για κάποιον από αυτούς τους μιτότυπους. Το επόμενο επίπεδο είναι όταν το κύτταρο είναι ετεροπλασμικό, αλλά τα μιτοχόνδριά του είναι ομοπλασμικά για ένα μιτότυπο (Maeda et al. 2020; Jaber et al. 2020; Lareau et al. 2021). Το τελευταίο επίπεδο είναι αυτό της ετεροπλασμίας στο επίπεδο του μιτοχονδρίου (Morris et al. 2017). Είναι φανερό ότι η παρατήρηση κάποιου ανώτερου επιπέδου ετεροπλασμίας προϋποθέτει την ύπαρξη ετεροπλασμίας σε ένα τουλάχιστον από τα κατώτερα επίπεδα ετεροπλασμίας (Parakatselaki and Ladoukakis 2021).

Πίνακας 1. 1: Επίπεδα ετεροπλασμίας.

Επίπεδο ετεροπλασμίας	Περιγραφή επιπέδου	Αναφορές
Πληθυσμός	Άτομα με διαφορετικούς μιτότυπους	(Dean et al. 2003; Ujvari et al. 2007)
Άτομο	A) ετεροπλασμικοί ιστοί B) ομοπλασμικοί για διαφορετικούς μιτότυπους ιστοί	(Jenuth et al. 1997; Venetis et al. 2006; Nunes et al. 2013; Mastrantonio et al. 2019a; Polovina et al. 2020)
Ιστός	Κύτταρα με διαφορετικούς μιτότυπους	(Burgstaller et al. 2014; Naue et al. 2015)
Κύτταρο	Μιτοχόνδρια με διαφορετικό μιτότυπο	(Maeda et al. 2020; Jaber et al. 2020; Lareau et al. 2021)
Μιτοχόνδριο	Διαφορετικά mtDNA στο ίδιο οργανίδιο	(Morris et al. 2017)

1.9 Δυναμική της ετεροπλασμίας

1.9.1 Δυναμική της ετεροπλασμίας στα κύτταρα της γαμετικής σειράς

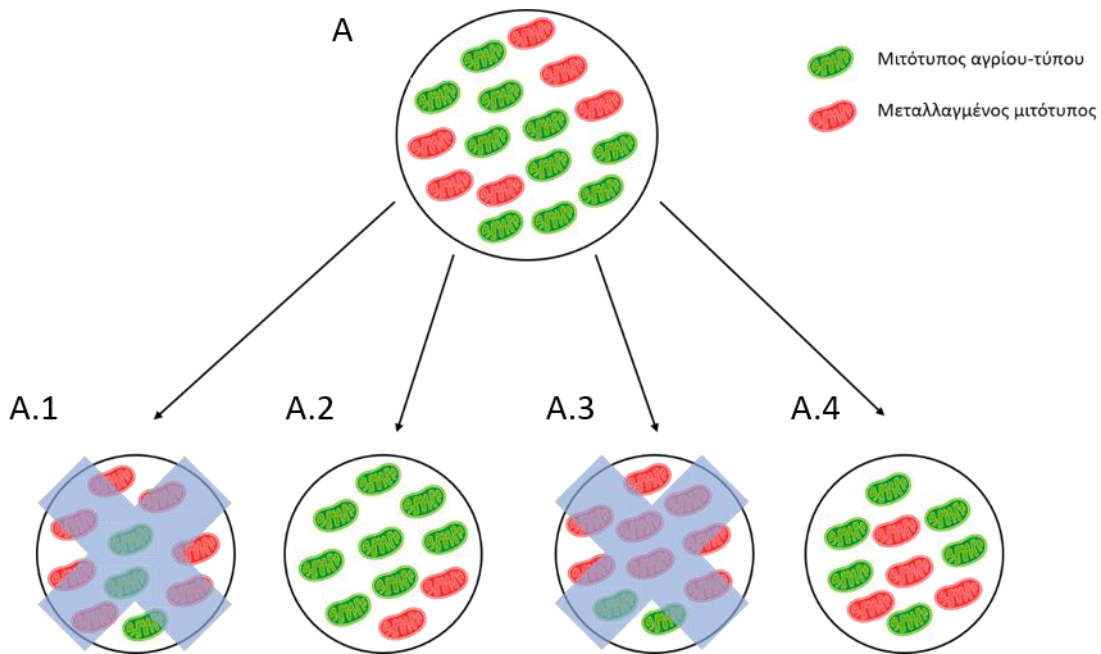
Τα επίπεδα της ετεροπλασμίας καθορίζονται σε μεγάλο βαθμό από τη στενωπό και τη δράση της τυχαίας γενετικής παρέκκλισης στη γαμετική σειρά. Η στενωπός που συμβαίνει κατά την ωογένεση παρατηρήθηκε σε αγελάδες και βρέθηκε να είναι κατά κύριο λόγο υπεύθυνη για τις μεγάλες διαφορές στα επίπεδα ετεροπλασμίας που παρατηρούνταν στη μητέρα σε σχέση με τους απογόνους (Hauswirth and Lairis 1982). Από τότε η δράση της στενωπού έχει επιβεβαιωθεί για τα ωκύτταρα πολλών σπονδυλωτών, όπως είναι τα ποντίκια (Freyer et al. 2012), ο σολομός (Wolff et al. 2011) και το ψάρι-ζέβρα (Otten et al. 2016). Στους ανθρώπους, έχει υπολογιστεί ότι μετά τη στενωπό ο αριθμός των μορίων mtDNA κυμαίνεται από 30 έως 35 (Rebolledo-Jaramillo et al. 2014). Μια επόμενη εκτίμηση υποδεικνύει μια ακόμη εντονότερη στενωπό, με μόνο 9 μόρια mtDNA κατά μέσο όρο (Li et al. 2015b).

Παρόλη την σημασία της παρέκκλισης στα επίπεδα της ετεροπλασμίας της γαμετικής σειράς, η επιλογή φαίνεται να είναι η κυρίαρχη δύναμη που καθορίζει τα επίπεδα της ετεροπλασμίας (Εικόνα 1. 2). Εκκαθαριστική επιλογή βρέθηκε να δρα για πρώτη φορά σε ποντίκια. Οι Fan et al. (2008) παρατήρησαν δραματική μείωση της συχνότητας ενός μιτότυπου που έφερε μεταλλαγή αλλαγής πλαισίου στο γονίδιο *NAD6*, από 47% σε 14% σε δύο διαδοχικές γενιές, και πλήρη εξαφάνισή του μετά από λίγες ακόμα γενιές. Μια άλλη ομάδα ερευνητών εισήγαγε μεταλλαγές στο mtDNA χρησιμοποιώντας ένα μεταλλαγμένο γονίδιο της μιτοχονδριακής πολυμεράσης γ και μελέτησε τη δυναμική τους για έξι γενιές (Stewart et al. 2008). Εκεί, παρατηρήθηκε ότι η συχνότητα μη συνώνυμων μεταλλαγών μειωνόταν συγκριτικά με αυτή των συνώνυμων, υποδεικνύοντας δράση επιλογής που εμπόδιζε τις επιβλαβείς μεταλλαγές από το να μεταβιβαστούν στην επόμενη γενιά. Αποδεικτικά στοιχεία για τη δράση επιλογής εναντίον επιβλαβών μεταλλαγών σε ωκύτταρα ποντικών παρείχαν και οι Zhang et al. (2021). Εξάλειψη επιβλαβών μεταλλαγών έχει, επίσης, παρατηρηθεί και στα ωκύτταρα της *Drosophila* μέσω εκκαθαριστικής επιλογής που δρα κατά των μεταλλαγμένων μιτότυπων (Ma et al. 2014), αλλά και μέσω επιλεκτικής αντιγραφής των αγρίου τύπου μιτότυπων (Hill et al. 2014).

Εκκαθαριστική επιλογή δρα και στα ανθρώπινα ωκύτταρα. Αλληλούχηση γονιδιωμάτων από 39 μητέρες και τα παιδιά τους έδειξε ότι οι μη συνώνυμες μεταλλαγές μεταβιβάζονταν λιγότερο συχνά στην επόμενη γενιά από τις συνώνυμες, υποδεικνύοντας τη δράση επιλογής στα ωκύτταρα (Rebolledo-Jaramillo et al. 2014). Τα ευρήματα αυτά υποστηρίζονται και από μία διαφορετική μελέτη (Li et al. 2016), όπου αναφέρεται ότι τα ωκύτταρα έχουν την ικανότητα να αναγνωρίζουν τις επιβλαβείς μεταλλαγές και να τις εμποδίζουν από το να μεταβιβαστούν. Τέλος, οι De Fanti et al. (2017) υπέδειξαν ότι η επιλογή κατά των μεταλλαγών γίνεται κατά την αποβολή των δύο πρώτων πολικών σωματίων. Αργότερα, βρέθηκε ότι το χρονικό σημείο όπου δρα η επιλογή στα ωκύτταρα είναι τα στάδια Carnegie (Floros et al. 2018).

Οι μεταλλαγμένοι μιτότυποι μπορεί να βρίσκονται υπό τη δράση της επιλογής είτε στο επίπεδο του κυττάρου, είτε στο επίπεδο του μιτοχονδρίου (Rand 2001). Γενικά, είναι γνωστό ότι γονίδια που σχετίζονται με τον οξειδωτικό μεταβολισμό, καθώς και με την αντιγραφή και μεταγραφή του mtDNA εκφράζονται περισσότερο σε πρώιμα γαμετικά κύτταρα. Έχει προταθεί ότι η αλλαγή από οξειδωτικό σε γλυκολυτικό μεταβολισμό σε αυτό το στάδιο, σε συνδυασμό με

τη δράση της στενωπού, θέτει το mtDNA υπό τη δράση της επιλογής, το οποίο έχει ως αποτέλεσμα την διατήρηση μόνο λειτουργικών μιτότυπων (Flores et al. 2018). Πράγματι, υπάρχουν και άλλα στοιχεία που αποδεικνύουν ότι ο διαχωρισμός των μιτότυπων στα κύτταρα και η «προτίμηση» σε μιτότυπο εξαρτάται από τη σηματοδότηση των ROS και τη λειτουργικότητα του OXPHOS, ενώ η ένταση της επιλογής καθορίζεται σε ένα βαθμό και από το πυρηνικό υπόβαθρο (Latorre-Pellicer et al. 2019).



Εικόνα 1. 2: Η στενωπός από την οποία διέρχεται το mtDNA κατά τη μεταβίβασή του από τα πατρικά (A) στα θυγατρικά κύτταρα (A.1-A.4) και η εκκαθαριστική επιλογή είναι οι κύριες δυνάμεις που καθορίζουν τα επίπεδα της ετεροπλασμίας στη γαμετική σειρά. Λόγω της στενωπού, τα αντίγραφα του mtDNA μειώνονται δραματικά στα θυγατρικά κύτταρα, με αποτέλεσμα να προκύπτουν και κύτταρα τα οποία φέρουν σε μεγαλύτερο ποσοστό το μεταλλαγμένο μιτότυπο (A.1 και A.3). Επειδή στα κύτταρα αυτά δεν επιτελούνται επαρκώς οι μιτοχονδριακές λειτουργίες, δρα η εκκαθαριστική επιλογή για την εξάλειψή τους.

Μια άλλη παράμετρος που ενισχύει τη δράση της εκκαθαριστικής επιλογής είναι εκείνη του φυσικού διαχωρισμού των μιτότυπων μέσα σε ένα κύτταρο. Συγκεκριμένα, τα μειωμένα επίπεδα της πρωτεΐνης Mitofusin, αποτρέπουν τη σύντηξη των μιτοχονδρίων σε πρώιμα στάδια της ωογένεσης στη *Drosophila*. Έτσι, η ελαττωματική λειτουργία των μεταλλαγμένων μιτότυπων δεν μπορεί να αντισταθμιστεί από τους λειτουργικούς μιτότυπους, κάνοντας πιο εύκολη την απομάκρυνσή τους από την επιλογή (Lieber et al. 2019).

1.9.2 Δυναμική της ετεροπλασμίας στους σωματικούς ιστούς

Γενικά, η επιλογή είναι λιγότερο αποτελεσματική στο να απομακρύνει επιβλαβείς μεταλλαγές στους σωματικούς ιστούς, ενώ φαίνεται να ακολουθούν ένα πιο ουδέτερο πρότυπο κατανομής των διαφορετικών αλληλομόρφων μεταξύ των κυττάρων (Wilton et al. 2018; Palozzi et al. 2018). Επιπλέον, οι στενωποί που λαμβάνουν χώρα στους σωματικούς ιστούς είναι λιγότερο έντονοι σε σχέση με τους αντίστοιχους της γαμετικής σειράς (Zaidi et al. 2019), ωστόσο υπάρχουν και εξαιρέσεις, όπως είναι η έντονη στενωπός από την οποία διέρχεται το mtDNA σε ανθρώπινους θύλακες τρίχας (Barrett et al. 2020). Τέτοιου είδους «χαλαροί» στενωποί έχουν ως αποτέλεσμα μειωμένη διαφοροποίηση στα επίπεδα της ετεροπλασμίας μεταξύ των κυττάρων. Συνεπώς, η κυρίαρχη δύναμη που καθορίζει τα επίπεδα της ετεροπλασμίας στους σωματικούς ιστούς είναι η γενετική παρέκκλιση, και όχι η επιλογή (Floros et al. 2018).

Ωστόσο, υπάρχουν περιπτώσεις, στις οποίες έχει παρατηρηθεί δράση επιλογής κατά ή υπέρ της ετεροπλασμίας σε σωματικούς ιστούς. Σε κύτταρα που κάνουν μίτωση, αλλαγές στα επίπεδα της ετεροπλασμίας συμβαίνουν εξαιτίας της τυχαίας κατανομής των διαφορετικών αλληλομόρφων στο mtDNA στα θυγατρικά κύτταρα, αλλά αν μια μεταλλαγή έχει μεγάλη επίδραση στην κυτταρική λειτουργία, τότε η εκκαθαριστική επιλογή θα δράσει για την εξάλειψή της. Η περίπτωση αυτή έχει περιγραφεί για τη μεταλλαγή *MTTL1* m.3243A>G στο ανθρώπινο mtDNA, της οποίας η συχνότητα μειώνεται εκθετικά στο χρόνο στα ερυθρά αιμοσφαίρια (Rajasimha et al. 2008). Επιπλέον, ασθενείς με τις επιβλαβείς μεταλλαγές m.3243A>G και m.8344A>G βρέθηκαν να έχουν λιγότερο φορτίο στα μιτωτικά γαστρεντερικά επιθηλιακά κύτταρα σε σύγκριση με κύτταρα λείου μυ, το οποίο υποδεικνύει δράση επιλογής (Su et al. 2018). Σε μη μιτωτικά κύτταρα, το mtDNA αντιγράφεται με μη αυστηρό πρότυπο αντιγραφής, εξασφαλίζοντας τη διατήρηση των επιπέδων του. Ωστόσο, εξαιτίας του τρόπου αντιγραφής του, ένας μεταλλαγμένος μιτότυπος μπορεί να αυξήσει τη συχνότητά του, οδηγώντας σε αλλαγή του κυρίαρχου μιτότυπου με την πάροδο του χρόνου (Szczerpanowska and Trifunovic 2017), κατάσταση που μπορεί να εξηγηθεί και από τη δράση της τυχαίας γενετικής παρέκκλισης (Elson et al. 2001; Durham et al. 2006; Baines et al. 2014).

Ενδείξεις δράσης θετικής επιλογής έχουν, επίσης, βρεθεί για συγκεκριμένους μιτότυπους και σε συγκεκριμένους ιστούς (Li et al. 2015b). Πρόσφατη μελέτη χαρακτήρισε βασικούς

παράγοντες που επηρεάζουν τη δυναμική της ετεροπλασμίας στους σωματικούς ιστούς. Ειδικότερα, φαίνεται ότι η επίδραση που έχουν οι διάφοροι μιτότυποι στη λειτουργία του ΟΧΡΗΟΣ εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τον κυτταρικό τύπο, οδηγώντας σε διαφορετική «προτίμηση» σε μιτότυπο και άρα σε διαφορετικά επίπεδα ετεροπλασμίας μεταξύ τους. Τέλος, προτείνεται ότι η δυναμική της ετεροπλασμίας καθορίζεται, επίσης, και από την αλληλεπίδραση μεταξύ mtDNA και nDNA με διάφορους περιβαλλοντικούς παράγοντες (Lechuga-Vieco et al. 2020).

1.10 Τεχνικές ανίχνευσης της ετεροπλασμίας

Η πρώτη αναφορά για ετεροπλασμία στο mtDNA ήταν στη *D. mauritiana*, όπου βρέθηκαν δύο διαφορετικού μεγέθους αλληλόμορφα μέσω χρήσης περιοριστικών ενζύμων (Solignac et al. 1983). Σε γενικές γραμμές, η συνηθέστερη μέθοδος ανίχνευσης ετεροπλασμίας πριν την εμφάνιση της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR) ήταν η απομόνωση του mtDNA, η πέψη του με περιοριστικά ένζυμα και η οπτικοποίηση του προτύπου πέψης με βρωμιούχο αιθίδιο ή με υβριδοποίηση σημασμένων ολιγονουκλεοτιδίων (Harrison et al. 1985; Bentzen et al. 1988; Boyce et al. 1989; Buroker et al. 1990).

Η εφαρμογή της PCR ενίσχυσε την ανίχνευση της ετεροπλασμίας, καθώς συνδυάστηκε με πιο ακριβείς τεχνικές για την ταυτοποίηση διαφορών σε επίπεδο αλληλουχίας. Για παράδειγμα, η τεχνική που είναι γνωστή ως πολυμορφισμός διαμόρφωσης μονόκλωνου DNA (Single Stranded Conformation Polymorphism, SSCP) μπορεί να ανιχνεύσει διαφορά ακόμα και σε ένα νουκλεοτίδιο μεταξύ δύο μικρών τμημάτων DNA (Tully et al. 2000; Maté et al. 2007). Άλλες μέθοδοι για την ανίχνευση της ετεροπλασμίας που βασίζονται στην PCR είναι η πέψη προϊόντων PCR (PCR-RFLP) (El-Schahawi et al. 1997; Ladoukakis et al. 2002), η κλωνοποίηση ενισχυμένων με PCR τμημάτων και η αλληλούχησή τους (Nesbø et al. 1998; Ladoukakis and Zouros 2001), καθώς και η απευθείας αλληλούχηση ενισχυμένων με PCR τμημάτων και η ανίχνευση κορυφών σε χρωματογραφήματα (Rodríguez-Pena et al. 2020). Τέτοιου είδους τεχνικές παραμένουν δημοφιλείς, επειδή είναι ακριβείς και μπορούν να εφαρμοστούν ακόμα και σε μικρά εργαστήρια. Τέλος, μέθοδοι που βασίζονται στην PCR δεν χρησιμοποιούνται μόνο για την ανίχνευση της ετεροπλασμίας, αλλά και για την ποσοτικοποίησή της. Ειδικότερα, η ποσοτική

PCR (quantitative PCR, qPCR) έχει χρησιμοποιηθεί σε περιπτώσεις ποσοτικοποίησης της ετεροπλασμίας (Bai and Wong 2004; Poe et al. 2007; Nunes et al. 2013). Με βάση την qPCR έχουν αναπτυχθεί και χρησιμοποιηθεί ευρέως και πιο σύνθετες μέθοδοι για την ποσοτικοποίηση της ετεροπλασμίας, όπως είναι η qPCR με ιχνηθέτες TaqMan (Rong et al. 2018), η ARMS-qPCR (Kang et al. 2016; Chin et al. 2018; Duan et al. 2018) και η ddPCR (Hindson et al. 2011; Trifunov et al. 2018; Maeda et al. 2020).

Παρά την ευρεία χρήση τους, οι τεχνικές που βασίζονται στην PCR έχουν κάποια μειονεκτήματα. Πρώτον, περιορίζονται στη μελέτη μικρών τμημάτων mtDNA, οπότε τυχόν διαφορές που υπάρχουν σε παρακείμενες περιοχές δεν ανιχνεύονται. Δεύτερον, είναι πιθανή η λανθασμένη εκτίμηση της ποσότητας του καθενός από τα αλληλόμορφα mtDNA, εξαιτίας μη ειδικής πρόσδεσης των εκκινητών στο υπόστρωμα. Τρίτον, για όλες τις μεθόδους που βασίζονται στην PCR είναι απαραίτητη μερική γνώση της αλληλουχίας DNA που μελετάται.

Πλέον, έχουν αναπτυχθεί αρκετές μέθοδοι νέας γενιάς αλληλούχησης, οι οποίες έχουν επιφέρει μεγάλες αλλαγές στη μελέτη της ετεροπλασμίας, επειδή μπορούν να ανιχνεύουν και να ποσοτικοποιούν ακόμα και σπάνια αλληλόμορφα mtDNA χρησιμοποιώντας σύνθετες τεχνικές και βιοπληροφορικά εργαλεία (Calabrese et al. 2014; Weissensteiner et al. 2016; Marquis et al. 2017; Dierckxsens et al. 2020; Fazzini et al. 2021). Οι μέθοδοι NGS αποκάλυψαν το εύρος της ετεροπλασμίας σε επίπεδο ιστού και οργανισμού, έδωσαν στοιχεία για τους τρόπους που προκύπτει και ανέδειξαν το ρόλο της στην εμφάνιση μιτοχονδριακών ασθενειών και τη γήρανση (Li et al. 2015a; Jaber et al. 2020; Lareau et al. 2021). Η πλειοψηφία των στρατηγικών που εφαρμόζονται είναι η δημιουργία εμπλουτισμένων σε mtDNA βιβλιοθηκών, είτε με τεχνικές «αιχμαλώτισης» του mtDNA είτε με τεχνικές που βασίζονται στην PCR, ακολουθούμενη από NGS. Στις τεχνικές «αιχμαλώτισης» του mtDNA, βιοτινυλιωμένοι μονόκλωνοι ιχνηθέτες DNA, μήκους 300-360 βάσεων, χρησιμοποιούνται ως «δόλωμα» για την απομόνωση του mtDNA. Μετά από δύο κύκλους υβριδοποίησης, η βιβλιοθήκη είναι επαρκώς εμπλουτισμένη σε mtDNA και λαμβάνει χώρα η αλληλούχηση (He et al. 2010; Zhou et al. 2020). Στις τεχνικές που βασίζονται στην PCR, ολόκληρο το mtDNA πολλαπλασιάζεται με εκκινητές ειδικά σχεδιασμένους για αυτό (He et al. 2010; Kelly et al. 2017; Mok et al. 2020). Εναλλακτικά, μία συγκεκριμένη περιοχή του mtDNA πολλαπλασιάζεται και τα τμήματα που παράγονται

αλληλουχούνται (Payne et al. 2013). Τέλος, στοιχεία για την ετεροπλασμία mtDNA μπορούν να εξαχθούν και από δεδομένα αλληλούχησης από ολόκληρα γονιδιώματα (whole-genome sequencing, WGS) μέσω διαφόρων βιοπληροφορικών εργαλείων (Grandhi et al. 2017; Duan et al. 2019).

Ενδιαφέρον επίσης παρουσιάζουν τα ευρήματα μιας ομάδας ερευνητών, οι οποίοι εκμεταλλεύτηκαν τις δυνατότητες της τεχνικής ATAC (Assay for Transposase-Accessible Chromatin) σε συνδυασμό με αλληλούχηση (ATAC-seq). Η τεχνική αυτή στοχεύει περιοχές DNA που δεν βρίσκονται σε μορφή χρωματίνης, οπότε γενικά χρησιμοποιείται για τη μελέτη περιοχών που είναι μεταγραφικά ενεργές. Το mtDNA δεν απαντάται σε μορφή χρωματίνης, οπότε οι βιβλιοθήκες που προκύπτουν από την παραπάνω τεχνική είναι αρκετά εμπλουτισμένες σε mtDNA. Με αυτή την προσέγγιση, οι ερευνητές κατάφεραν να μελετήσουν τις αλλαγές στην ετεροπλασμία σε επίπεδο κυττάρου (Xu et al. 2019). Από τότε, και άλλες ομάδες έχουν χρησιμοποιήσει την παραπάνω τεχνική για τη μελέτη της ετεροπλασμίας (Lareau et al. 2021; Marshall and Jones 2021).

1.11 Ενθέσεις του mtDNA στον πυρήνα

Μία σημαντική πηγή σφαλμάτων στη μελέτη της ετεροπλασμίας του mtDNA είναι η ένθεση μιτοχονδριακών αλληλουχιών στο πυρηνικό DNA (Bensasson et al. 2001). Οι αλληλουχίες αυτές ονομάζονται NUMTs (Nuclear Mitochondrial) (Lopez et al. 1994) και παρατηρήθηκαν για πρώτη φορά σε ποντίκια (Du and Riley 1967). Τα σφάλματα προκύπτουν από το γεγονός ότι οι εκκινητές που χρησιμοποιούνται για τον πολλαπλασιασμό του mtDNA μπορούν να προσδεθούν και στις αλληλουχίες του NUMT, λόγω της μεγάλης ομοιότητάς τους με το mtDNA. Έτσι, ενισχύονται και τα δύο μόρια, με αποτέλεσμα να δίνεται η ψευδής εντύπωση ότι υπάρχει ετεροπλασμία.

Τα NUMTs ανακαλύφθηκαν με τη χρήση συμβατικών μεθόδων αλληλούχησης, όπως είναι η αλληλούχηση κατά Sanger (Bensasson et al. 2001), οι οποίες θεωρείται ότι ανιχνεύουν με μικρότερη συχνότητα NUMTs, καθώς το mtDNA βρίσκεται σε πολύ περισσότερα αντίγραφα σε σχέση με το nDNA, συνεπώς είναι λιγότερο πιθανό να ανιχνευθεί σήμα που προέρχεται από NUMTs σε χρωματογραφήματα. Ωστόσο, η χρήση πιο μοντέρνων τεχνικών αποκάλυψε ότι η παρουσία τους στα γονιδιώματα είναι αρκετά πιο συχνή από ότι πιστευόταν. Γενικά, η

ομοιότητα μεταξύ NUMTs και mtDNA προκαλεί αρκετά προβλήματα κατά την επεξεργασία τέτοιων δεδομένων αλληλούχησης, όπου μικρού μήκους αλληλουχίες στοιχίζονται με το γονιδίωμα αναφοράς (Maude et al. 2019). Πιο συγκεκριμένα, η πραγματική προέλευση των αλληλουχιών είναι δύσκολο να χαρακτηριστεί, με αποτέλεσμα την ανίχνευση ψευδών αλληλομόρφων mtDNA. Αυτό συμβαίνει είτε επειδή οι αλληλουχίες του NUMT στοιχίζονται λανθασμένα στο mtDNA του γονιδιώματος αναφοράς, είτε επειδή τα πραγματικά αλληλόμορφα mtDNA δεν ανιχνεύονται λόγω της στοίχισης του mtDNA με αλληλουχίες NUMT (Albayrak et al. 2016). Επιπλέον, οι αλληλουχίες που αντιστοιχούν στα σημεία εισαγωγής του mtDNA στο nDNA είναι χιμαιρικές, αφού αποτελούνται από τμήματα και των δύο τύπων αλληλουχιών, και συχνά αφαιρούνται από την εκάστοτε ανάλυση ως τεχνικά σφάλματα που έχουν προκύψει από τη διαδικασία της αλληλούχησης (Tu et al. 2015).

Μια δημοφιλής προσέγγιση για την αποφυγή ανίχνευσης NUMTs είναι η απομόνωση, ο εμπλουτισμός και η αλληλούχηση μόνο του mtDNA (Weerts et al. 2018; Duan et al. 2018). Ωστόσο, ανεξαρτήτως της μεθόδου που θα εφαρμοστεί πριν τη βιοπληροφορική ανάλυση, η επιλογή του γονιδιώματος αναφοράς μπορεί να έχει μεγάλη επίδραση στο πόσα και ποια αλληλόμορφα mtDNA θα ανιχνευθούν (Santibanez-Koref et al. 2019). Επιπλέον, η αναλογία μεταξύ mtDNA και nDNA διαφέρει σημαντικά μεταξύ διαφορετικών ιστών (Goios et al. 2008; Wachsmuth et al. 2016), γεγονός που επηρεάζει και την ποσότητα του nDNA που θα εμπλουτιστεί μαζί με το mtDNA (Ring et al. 2018). Τέλος, είναι πιθανό η μεταφορά του mtDNA στον πυρήνα να είναι ένα πρόσφατο γεγονός. Αυτό πρακτικά σημαίνει ότι η παρουσία του θα είναι περιορισμένη σε μερικά μόνο άτομα του πληθυσμού, άρα το NUMT θα είναι πολυμορφικό, γεγονός που κάνει την εύρεσή του ακόμα δυσκολότερη.

Είναι φανερό η σημασία εργαλείων που μπορούν να διακρίνουν τις αλληλουχίες NUMT από την πραγματική ετεροπλάσμία. Δεδομένου ότι οι αλληλουχίες από το mtDNA ξεπερνούν κατά πολύ σε αριθμό τις αλληλουχίες από το nDNA, η εφαρμογή ενός αυστηρού ορίου όσον αφορά τη συχνότητα των αλληλομόρφων που θεωρούνται πραγματικά αλληλόμορφα mtDNA μπορεί να βοηθήσει στη διάκριση mtDNA και NUMT (González et al. 2020). Εκτός από αυτό το φίλτρο, πολλά βιοπληροφορικά εργαλεία έχουν αναπτυχθεί για να ανιχνεύουν νέα NUMTs ή για να αποφεύγουν να συγχέουν τα NUMTs με ετεροπλάσμία, καθένα από τα οποία χρησιμοποιεί

διαφορετικές στρατηγικές (Li et al. 2012; Ring et al. 2018; Roth et al. 2019; Smart et al. 2019; Laricchia et al. 2022). Για παράδειγμα, το MitoScape (Singh et al. 2021a) είναι ένας machine learning αλγόριθμος που μοντελοποιεί τα μοναδικά χαρακτηριστικά του mtDNA για την ανίχνευση πραγματικής ετεροπλασμίας, το mtDNA-Server (Weissensteiner et al. 2016) περιορίζει την ανίχνευση NUMTs αποκλείοντας περιοχές που βρίσκονται εκατέρωθεν γνωστών αλληλουχιών NUMTs, ενώ το MToolBox (Calabrese et al. 2014) αποφεύγει τη λανθασμένη στοίχιση των αλληλουχιών NUMTs με την αλληλουχία αναφοράς. Παρά τον αριθμό των εργαλείων που υπάρχουν ήδη για τη διάκριση μεταξύ mtDNA και NUMT, η πλειοψηφία αυτών είναι αποτελεσματικά μόνο στο ανθρώπινο γονιδίωμα, συνεπώς είναι απαραίτητη η ανάπτυξη εργαλείων που θα μπορούν να εφαρμοστούν σε γονιδιώματα περισσότερων ειδών.

Η ένθεση του mtDNA στον πυρήνα θεωρείται μια εξελικτικά συντηρημένη διαδικασία (Singh et al. 2021b). Με τα πρώτα NUMTs που βρέθηκαν στη *Drosophila* (Richly and Leister 2004) και στον άνθρωπο (Mourier et al. 2001) επικράτησε η άποψη ότι τα NUMTs είναι γενικά μικρού μεγέθους, κι έτσι αν παρατηρείται ετεροπλασμία σε μεγάλα μιτοχονδριακά τμήματα, τότε κατά πάσα πιθανότητα αυτή είναι πραγματική. Παρ' όλα αυτά, έχουν βρεθεί πλέον NUMTs με μέγεθος ακόμα και ίδιο με αυτό του mtDNA σε διάφορους οργανισμούς, όπως είναι η νυχτερίδα *Myotis lucifugus* (Shi et al. 2017), τα σκυλιά (Verscheure et al. 2015), τα γεράκια του γένους *Falco* (Nacer and Raposo do Amaral 2017) και ο άνθρωπος (Wei et al. 2020; Lutz-Bonengel et al. 2021). Το μήκος του NUMT και οι διαφορές που φέρει στην αλληλουχία του σε σχέση με το mtDNA εξαρτώνται από το πότε έγινε η ένθεση στον πυρήνα, το οποίο σημαίνει ότι τα παλαιότερα NUMTs είναι μικρότερα σε μήκος και πιο διαφορετικά σε σχέση με το mtDNA. Ωστόσο, αυτή είναι μια υπόθεση που πρέπει να ελεγχθεί. Αν ισχύουν τα παραπάνω, αναμένεται ότι οι πιο πρόσφατες ενθέσεις mtDNA στον πυρήνα είναι πιθανό να συγχέονται με ετεροπλασμία του mtDNA.

Τα NUMTs έχουν χαρτογραφηθεί πλέον στα πυρηνικά γονιδιώματα μιας πληθώρας οργανισμών, όπως είναι οι άνθρωποι (Ricchetti et al. 2004), τα καρκινοειδή του γένους *Daphnia* (Kowal et al. 2020), τα πτηνά του γένους *Parus* (Laine et al. 2019), οι σφήκες του σύκου που ανήκουν στην υπεριοικογένεια Chalcidoidea (Wang et al. 2020), οι πολύποδες του είδους *Hydra magnipapillata* (Song et al. 2013), ο ακανθώδης αστακός του είδους *Panulirus japonicus* (Chow

et al. 2021) και η *Drosophila* (Rogers and Griffiths-Jones 2012). Πολύ πρόσφατα ταυτοποιήθηκαν NUMTs και στο πυρηνικό γονιδίωμα της φώκιας *Arctocephalus gazella* (Vendrami et al. 2022), αλλά και στο γονιδίωμα του κουνελιού (Biró et al. 2022). Στις περισσότερες περιπτώσεις, τα NUMTs φέρουν αρκετά χαρακτηριστικά των ψευδογονιδίων, δηλαδή μπορεί να είναι τμήματα γονιδίων, να φέρουν κωδικόνια λήξης ή μεταλλαγές αλλαγής πλαισίου, και γενικά αυξημένο λόγο dN/dS σε σχέση με τον αντίστοιχο λόγο λειτουργικών μιτοχονδριακών γονιδίων (Baldo et al. 2011).

1.12 Η ετεροπλασμία και το mtDNA ως γενετικός δείκτης

Η αφυλετική κληρονομία του mtDNA αποτελεί το βασικό χαρακτηριστικό του mtDNA που το καθιστά κατάλληλο για χρήση ως γενετικό δείκτη (Avisé 1994). Η ύπαρξη ετεροπλασμίας μπορεί να επηρεάσει την αξιοπιστία του mtDNA ως γενετικό δείκτη με τρεις διαφορετικούς τρόπους. Πρώτον, στην περίπτωση που αλληλουχούνται διαφορετικοί μιτότυποι από διαφορετικά άτομα, η γενετική διαφοροποίηση μεταξύ τους θα φαινόταν λανθασμένα αυξημένη. Για παράδειγμα, έστω ότι υπάρχουν δύο άτομα που φέρουν τους μιτότυπους A και B. Αν τυχαία στο ένα άτομο ενισχυθεί και αλληλουχηθεί ο μιτότυπος A και στο άλλο ο μιτότυπος B, τότε η μεταξύ τους σύγκριση θα έδειχνε ότι τα άτομα είναι γενετικά διαφορετικά μεταξύ τους. Δεύτερον, η ετεροπλασμία μπορεί να οδηγήσει σε ανασυνδυασμό μεταξύ των διαφορετικών μιτότυπων. Ο ανασυνδυασμός αναμένεται να «αλλοιώνει» την εξελικτική ιστορία των διαφορετικών τμημάτων του mtDNA, δημιουργώντας θόρυβο στα φυλογενετικά δέντρα που κατασκευάζονται βάσει του mtDNA (Schierup and Hein 2000). Τρίτον, ψευδής ετεροπλασμία εξαιτίας ύπαρξης NUMTs μπορεί να οδηγήσει σε σύγκριση μεταξύ αλληλουχιών NUMT και mtDNA ή μεταξύ αλληλουχιών μόνο από NUMT, το οποίο προφανώς θα οδηγήσει σε λανθασμένη εκτίμηση της εξελικτικής ιστορίας των μιτοχονδριακών γραμμών.

Οι πρώτοι δύο τρόποι δεν αναμένεται να επηρεάζουν σε μεγάλο βαθμό τη χρήση του mtDNA ως γενετικό δείκτη, ειδικά σε περιπτώσεις όπου η ετεροπλασμία απαντάται σε χαμηλή συχνότητα. Επιπρόσθετα, ο ανασυνδυασμός στο mtDNA παρόλο που έχει παρατηρηθεί να συμβαίνει (Piganeau and Eyre-Walker 2004; Tsaousis et al. 2005), είναι ένα σπάνιο γεγονός. Ωστόσο, η ύπαρξη NUMTs μπορεί να επηρεάσει σημαντικά τις πληροφορίες που αντλούνται

από το mtDNA, καθώς η παρουσία τους είναι εκτεταμένη και μπορούν εύκολα να ενισχυθούν και να αλληλουχηθούν.

Όπως είναι αναμενόμενο, η ανακάλυψη των NUMTs έχει προκαλέσει μια έντονη συζήτηση σχετικά με το βαθμό στον οποίο η ύπαρξή τους επηρεάζει τη χρήση μιτοχονδριακών δεικτών σε φυλογενετικές μελέτες. Ειδικότερα, υπάρχει πιθανότητα μιτοχονδριακά ψευδογονίδια να πολλαπλασιάζονται μαζί με τα πραγματικά μιτοχονδριακά γονίδια, γεγονός που μπορεί να οδηγήσει σε λανθασμένες εκτιμήσεις χρόνων απόσχισης μεταξύ ειδών και ενδοειδικής ποικιλότητας λόγω διαφορετικών εξελικτικών ρυθμών και τρόπου κληρονομής μεταξύ mtDNA και nDNA (Bensasson et al. 2001; Hazkani-Covo et al. 2010). Πρόσφατες μελέτες υποστηρίζουν ότι ο ρυθμός ένθεσης των NUMTs μπορεί να διαφέρει ανάμεσα στα διάφορα τάξα, αλλά γενικά τείνουν να έχουν μεγαλύτερη συχνότητα εμφάνισης σε οικογένειες με μεγαλύτερου μεγέθους γονιδιώματα (Kaya and Çirplak 2018; Pereira et al. 2021).

2 Μελέτη της ετεροπλασμίας σε χιμαιρικές γραμμές *D. melanogaster* και περιγραφή ενός νέου NUMT²

2.1 Σκοπός

Σε ένα πείραμα στο εργαστήριο του David Rand (Brown University, RI, USA) κατασκευάστηκε μια σειρά χιμαιρικών γραμμών *D. melanogaster*, τα οποία έφεραν πυρηνικό γονιδίωμα από ένα είδος και μιτοχονδριακό από ένα διαφορετικό είδος, με στόχο τη μελέτη της συνεργασίας μεταξύ nDNA και mtDNA. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκαν 12 γραμμές *D. melanogaster* από την ομάδα γραμμών *DGRP* (Mackay et al. 2012), στις οποίες ο μιτότυπος αντικαταστάθηκε με τρεις μιτότυπους από το είδος *D. simulans*, τους *sil*, *sill* και *silll* (Solignac and Monnerot 1986), καταλήγοντας σε 36 χιμαιρικές γραμμές *D. melanogaster* (Mossman et al. 2016). Από αυτές τις χιμαιρικές γραμμές, εκείνες που είχαν πυρηνικό γονιδίωμα από τις 11 γραμμές *DGRP* ήταν ομοπλασμικές, έφεραν δηλαδή μόνο το μιτότυπο *si* που εισάχθηκε και όχι τον αρχικό μιτότυπο της *D. melanogaster* (μιτότυπος *mel*) που έφεραν. Ωστόσο, τρεις από τις χιμαιρικές γραμμές που έφεραν το πυρηνικό γονιδίωμα από τη γραμμή *DGRP-820* ήταν ετεροπλασμικές, έφεραν δηλαδή και τον αρχικό μιτότυπο *mel* της *DGRP-820*, αλλά και το μιτότυπο *si* που εισάχθηκε. Μάλιστα, οι τρεις αυτές γραμμές, οι οποίες θα αναφέρονται ως *820sil*, *820sill* και *820silll*, διατηρούσαν σταθερά και τους δύο μιτότυπους των πατρικών γραμμών, δηλαδή η ετεροπλασμία φαινόταν να μεταβιβάζεται από γενιά σε γενιά.

Η αλληλούχηση τμήματος του γονιδίου της κυτοχρωμικής οξειδάσης I (*CoxI*) έδειξε ότι η αλληλουχία που πολλαπλασιάστηκε (790bp) από τις γραμμές *DGRP-820* ήταν κατά 99,5% όμοια με την αντίστοιχη αλληλουχία της γραμμής *D. melanogaster Canton S*. Ειδικότερα, διέφεραν μόνο σε δύο συνώνυμες υποκαταστάσεις. Δεδομένου ότι η ετεροπλασμία παρατηρήθηκε μόνο στις χιμαιρικές γραμμές με το πυρηνικό υπόβαθρο της γραμμής *DGRP-820*, υποτέθηκε ότι η παρατηρούμενη ετεροπλασμία σχετιζόταν με το συγκεκριμένο πυρηνικό υπόβαθρο. Αυτή η

² Μέρος των πειραμάτων του κεφαλαίου έχει δημοσιευθεί.

Parakatselaki, M. E., Zhu, C. T., Rand, D., & Ladoukakis, E. D. (2022). NUMTs Can Imitate Biparental Transmission of mtDNA- A Case in *Drosophila melanogaster*. *Genes* 2022, Vol. 13, Page 1023, 13(6), 1023. <https://doi.org/10.3390/GENES13061023>

παρατήρηση ήταν μοναδική όσον αφορά το είδος *D. melanogaster*. Από τα παραπάνω δεδομένα, φαινόταν ότι το πυρηνικό υπόβαθρο *DGRP-820* θα μπορούσε να αποτελέσει ένα σπουδαίο εργαλείο για τη μελέτη της ετεροπλασμίας και των προτύπων που τη χαρακτηρίζουν. Για τη διερεύνηση αυτής της δυνατότητας η γραμμή αυτή χρησιμοποιήθηκε για την διερεύνηση μιας σειράς ερωτημάτων, που ήταν τα εξής:

- ποιος είναι ο γενετικός τόπος (ή τόποι) που είναι υπεύθυνος για την παρατηρούμενη ετεροπλασμία στις χμαιρικές γραμμές με το πυρηνικό υπόβαθρο *DGRP-820* και πού βρίσκεται πάνω στο πυρηνικό γονιδίωμα;
- πώς προέκυψε η ετεροπλασμία στις χμαιρικές γραμμές με το πυρηνικό υπόβαθρο *DGRP-820*;
- πώς διατηρείται η ετεροπλασμία στις χμαιρικές γραμμές με το πυρηνικό υπόβαθρο *DGRP-820*;

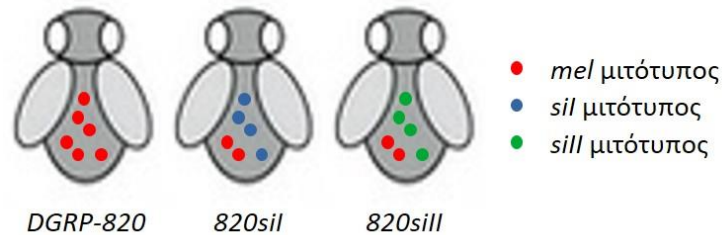
Για την απάντηση των παραπάνω ερωτημάτων έγιναν στοχευμένες διασταυρώσεις, οι οποίες έδιναν στοιχεία για ένα ή περισσότερα από τα παραπάνω ερωτήματα. Ανάλογα με τα αποτελέσματα που προέκυπταν, σχεδιάζονταν οι επόμενες σειρές διασταυρώσεων. Η κύρια μοριακή μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε ήταν η allele-specific PCR, στην οποία χρησιμοποιούνταν ζεύγη ειδικών για τον κάθε μιτότυπο εκκινητών.

2.2 Στελέχη και συνθήκες διασταυρώσεων

Όλες οι γραμμές που χρησιμοποιήθηκαν στις διασταυρώσεις είχαν πυρηνικό υπόβαθρο από το είδος *D. melanogaster*. Οι γραμμές με πυρηνικό υπόβαθρο *DGRP-820* που χρησιμοποιήθηκαν στο εργαστήριο ήταν τρεις (Εικόνα 2. 1). Η μία γραμμή που χρησιμοποιήθηκε στην πλειοψηφία των περιπτώσεων ήταν ομοπλασμική, είχε συλλεχθεί από τη φύση (Ayroles et al. 2009) και είναι εκείνη που χρησιμοποιήθηκε για την κατασκευή των χμαιρικών γραμμών. Από την παραπάνω διαδικασία προέκυψαν δύο χμαιρικές γραμμές, που ονομάστηκαν *820sil* και *820sill*, γιατί το πυρηνικό τους γονιδίωμα ήταν από τη *D. melanogaster* και το μιτοχονδριακό τους γονιδίωμα ήταν από τη *D. simulans*. Το καθένα από αυτά έφερε διαφορετικό μιτότυπο του είδους *D. simulans*, τον *sil* και τον *sill*, αντίστοιχα (Mossman et al. 2016). Όπως προαναφέρθηκε, οι δύο

αυτές γραμμές ήταν ετεροπλασμικές, καθώς εκτός από τον *si* μιτότυπο που εισάχθηκε, είχαν και τον *mel* μιτότυπο που έφεραν αρχικά.

Εκτός από τις παραπάνω γραμμές, χρησιμοποιήθηκαν σε διασταυρώσεις και χιμαιρικές γραμμές πυρηνικού υπόβαθρου w^{1118} με μιτότυπους της *D. simulans* (*sil*, *sill*, *silll*), μερικές από τις οποίες έφεραν χρωμοσώματα-ισορροπιστές (balancer chromosomes, περιγράφονται λεπτομερώς στην επόμενη ενότητα). Επιπλέον, χρησιμοποιήθηκε και η γραμμή χαρτογράφησης $\gamma \nu f mal^{bz}$. Τέλος, χρησιμοποιήθηκε και η γραμμή *D. melanogaster Oregon R*, ως θετικός μάρτυρας σε PCR, όχι όμως σε διασταυρώσεις. Όλες οι γραμμές που χρησιμοποιήθηκαν φαίνονται αναλυτικά στον Πίνακα 2. 1.



Εικόνα 2. 1: Οι γραμμές που χρησιμοποιήθηκαν με πυρηνικό υπόβαθρο *DGRP-820*.

Πίνακας 2. 1: Λίστα γραμμών που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα ενότητα και οι μιτότυποί τους.

	Γραμμές	Μιτότυπος
1	<i>DGRP-820</i>	<i>mel</i>
2	<i>820sil</i>	<i>sil(mel)</i>
3	<i>820sill</i>	<i>sill(mel)</i>
4	w^{1118}	<i>sil</i>
5	w^{1118}	<i>sill</i>
6	w^{1118}	<i>silll</i>
7	<i>D. melanogaster Oregon R</i>	<i>mel</i>
8	$\gamma \nu f mal^{bz}$	<i>mel</i>
9	<i>FM6, B¹</i>	<i>mel</i>
10	$w^{1118};CyO/Sp;TM6B/Dr$	<i>sil</i>
11	$w^{1118};CyO/Sp;TM6B/Dr$	<i>sill</i>

Για κάθε διασταύρωση χρησιμοποιούνταν τέσσερα με πέντε ζεύγη μυγών ανά σωλήνα καλλιέργειας. Παρθένα θηλυκά συλλέγονταν κάθε έξι με οκτώ ώρες και διασταυρώνονταν τουλάχιστον 48 ώρες μετά τη συλλογή τους. Αρσενικά άτομα συλλέγονταν μία φορά την ημέρα. Το φύλο των μυγών ελεγχόταν ξανά πριν την έναρξη της κάθε διασταύρωσης. Όλες οι γραμμές που χρησιμοποιήθηκαν διατηρούνταν στο εργαστήριο Πληθυσμιακής Γενετικής και Εξέλιξης σε θερμοκρασία 25°C, μέσα σε σωλήνες καλλιέργειας με τροφή και κλεισμένους με βαμβάκι. Οι διασταυρώσεις έγιναν σε θερμοκρασία 25°C με φωτοπερίοδο 12 ωρών. Το μέσο καλλιέργειας αποτελούνταν από ένα μείγμα άγαρ, σουκρόζης, μαγιάς και καλαμποκάλευρου (Ashburner et al. 2005).

2.3 Γενική μεθοδολογία ανίχνευσης των διαφορετικών μιτότυπων

2.3.1 Εξαγωγή γενωμικού DNA (gDNA)

Για όλες τις εξαγωγές γενωμικού DNA (gDNA), πλην των εξαγωγών που προορίζονταν για long PCRs, εφαρμόζοταν το Πρωτόκολλο Εξαγωγής 1 των O'Neill et al. (1992), το οποίο περιγράφεται αναλυτικά στο Παράρτημα. Πριν την εξαγωγή, προσδιοριζόταν το φύλο των μυγών, καθώς και άλλοι φαινοτυπικοί χαρακτήρες όπου ήταν απαραίτητο, ανάλογα με το πείραμα κάθε δεδομένης περιόδου, όπως θα παρουσιαστεί και παρακάτω. Η αναγνώριση των παραπάνω χαρακτηριστικών γινόταν με τη βοήθεια στερεοσκοπίου. Για την κάθε εξαγωγή χρησιμοποιούταν μία μύγα (single-fly extraction), έτσι ώστε η ετεροπλασμία να παρακολουθείται σε επίπεδο ατόμου.

2.3.2 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Η τεχνική που χρησιμοποιήθηκε για την διάκριση μεταξύ των μιτότυπων των γραμμών, και κατ' επέκταση για την ανίχνευση της ετεροπλασμίας, ήταν η PCR. Συγκεκριμένα, για κάθε άτομο γίνονταν δύο PCR, μία για την ανίχνευση του μητρικού μιτότυπου και μία για την ανίχνευση του πατρικού μιτότυπου. Για τη διάκριση μεταξύ μητρικού και πατρικού μιτότυπου χρησιμοποιούνταν σε κάθε περίπτωση ζεύγη εκκινητών, τα οποία ήταν σχεδιασμένα ειδικά για τον κάθε μιτότυπο. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για τον κάθε μιτότυπο, οι θερμοκρασίες υβριδοποίησής τους, οι αλληλουχίες τους, καθώς και το μέγεθος των παραγόμενων τμημάτων

φαίνονται στον Πίνακα 2. 2. Συγκεκριμένα για την ανίχνευση του *mel* μιτότυπου, χρησιμοποιήθηκε το ζεύγος *mel1594F/mel2385R*. Σε περιπτώσεις που χρησιμοποιήθηκε διαφορετικό ζεύγος αναφέρεται στην εκάστοτε ενότητα.

Όπως φαίνεται και στον Πίνακα 2. 2, αρκετά από τα ζεύγη εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν σε αυτή την ενότητα σχεδιάστηκαν για τις ανάγκες της παρούσας μελέτης. Αρχικά, λήφθηκαν οκτώ μιτοχονδριακά γονιδιώματα του είδους *D. melanogaster* και 12 του είδους *D. simulans* από τη βάση δεδομένων GenBank Nucleotide του NCBI και εισήχθησαν σε ένα αρχείο μορφής *fasta*. Οι αλληλουχίες του *fasta* αρχείου ευθυγραμμίστηκαν με χρήση του αλγόριθμου ClustalW (Thompson et al. 2002) που βρίσκεται στην πλατφόρμα του MEGA (v.6, Tamura et al. 2013). Μετά την στοίχιση (Εικόνα Π. 1, Παράρτημα), αναζητούνταν περιοχές που έφεραν νουκλεοτιδικές διαφορές μεταξύ των μιτότυπων που έπρεπε να διακριθούν. Στη συνέχεια, γινόταν ο σχεδιασμός των εκκινητών, οι οποίοι έπρεπε να πληρούν τις παρακάτω προϋποθέσεις:

- το μήκος του εκκινητή να είναι από 18 έως 24bp.
- να υπάρχουν όσο το δυνατόν περισσότερες διαφορές σε επίπεδο βάσεων μεταξύ του μορίου-στόχου (*mel* μιτότυπος) και των *si* μιτότυπων και κατά προτίμηση μία από τις διαφορές να βρίσκεται στο 3' άκρο, ώστε να αυξάνεται η ειδικότητα. Το βέλτιστο είναι η διαφορά στο 3' άκρο να είναι από G/C σε A/T ή το αντίστροφο. Το συγκεκριμένο κριτήριο εφαρμόστηκε μόνο στην περίπτωση που χρειάζεται διάκριση μεταξύ μιτότυπων, συνεπώς δεν εφαρμόστηκε στην περίπτωση του ζεύγους 7339+/7597-, το οποίο σχεδιάστηκε για να πολλαπλασιάζει τμήμα του mtDNA ανεξαρτήτως του μιτότυπου.

Μετά την εύρεση των κατάλληλων αλληλουχιών, γινόταν ο έλεγχος του εκκινητών με το εργαλείο OligoAnalyzer 3.1 (Owczarzy et al. 2008) ως προς τα παρακάτω χαρακτηριστικά:

- η διαφορά μεταξύ της θερμοκρασίας τήξης (T_m) των εκκινητών του ίδιου ζεύγους να μην ξεπερνάει τους 5°C.
- το περιεχόμενο του εκκινητή σε G/C να κυμαίνεται μεταξύ 40-60%.
- να μην υπάρχει πιθανότητα ομομερισμού, διμερισμού ή σχηματισμού δομών φουρκέτας μεταξύ των μορίων του κάθε εκκινητή και η πιθανότητα ετεροδιμερισμού μεταξύ μορίων των δύο εκκινητών.

Για κάθε αντίδραση PCR, πλην των long PCRs που θα περιγραφούν σε ξεχωριστή ενότητα, χρησιμοποιούνταν τα παρακάτω συστατικά: 1x *Taq* polymerase buffer (EnzyQuest Biotechnology, IMBB, Greece), 0,4mM από κάθε εκκινητή, 1,5mM MgCl₂, 0,2mM dNTPs, 0,4mg/ml BSA, 0,5U *Taq* DNA polymerase, 1μl DNA και υπερκαθαρό H₂O μέχρι τον τελικό όγκο της αντίδρασης που ήταν τα 15μl. Οι συνθήκες της αντίδρασης φαίνονται στον Πίνακα 2. 3. Σε όλες τις περιπτώσεις χρησιμοποιήθηκαν οι κατάλληλοι θετικοί και αρνητικοί μάρτυρες, έτσι ώστε να ελέγχεται κάθε φορά η ειδικότητα του εκάστοτε ζεύγους εκκινητών. Όλα τα προϊόντα της PCR ηλεκτροφορούνταν σε πήκτωμα αγαρόζης 1% βαμμένο με βρωμιούχο αιθίδιο (EtBr). Τέλος, τα προϊόντα οπτικοποιούνταν με χρήση υπεριώδους ακτινοβολίας.

2.3.3 Απομόνωση και ανίχνευση mtDNA σε αγονιμοποίητα αυγά

Για την απομόνωση καθαρού mtDNA από αγονιμοποίητα αυγά, στήθηκαν δύο κλουβιά: στο ένα τοποθετήθηκαν παρθένα θηλυκά από τη γραμμή *820sil*, ενώ το δεύτερο περιείχε παρθένα θηλυκά από τη γραμμή *820sill*. Τα κλουβιά περιείχαν θρεπτικό μέσο που διευκόλυνε τη συλλογή των αυγών (5γρ. σουκρόζη, 2,25γρ. άγαρ, 50ml χυμό από κόκκινα φρούτα και 50ml H₂O). Για κάθε αυγό γινόταν ομογενοποίηση σε 15μl διαλύματος λύσης (10mM Tris-HCl pH 8.0, 1mM EDTA, 25mM NaCl). Ακολουθούσε προσθήκη 1μl Proteinase K 20mg/ml και επώαση των δειγμάτων για 2 ώρες στους 55°C. Συνολικά, έγινε εξαγωγή από 20 αυγά, δέκα από τη γραμμή *820sil* και δέκα από τη γραμμή *820sill*. Για όλα τα αυγά η παρουσία mtDNA επιβεβαιώθηκε με δύο ζεύγη γενικών εκκινητών, τα 7339+/7597- και LCO1490/HCO2198 (Πίνακας 2. 2). Η απουσία nDNA ελεγχόταν με εκκινητές ειδικούς για το *X* χρωμόσωμα (1002(F)/2653(R), Πίνακας 2. 2). Τέλος, χρησιμοποιήθηκαν και τα δύο ζεύγη εκκινητών που είναι ειδικό για το *mel* μιτότυπο, προκειμένου να ελεγχθεί αν όντως υπήρχε ο μιτότυπος ή όχι.

2.3.4 Δοκιμές long PCR

Για τη διεξαγωγή των long PCR έγιναν εξαγωγές DNA σύμφωνα με το πρωτόκολλο εξαγωγής 2 (Παράρτημα) με τη μέγιστη προσοχή στους χειρισμούς προκειμένου το DNA να μη σπάσει. Αναλυτικότερα, έγιναν εξαγωγές από ομάδες των δέκα ατόμων (pools) από τις γραμμές *D. melanogaster Oregon R*, *DGRP-820*, *820sil*, *820sill*, *sil;w¹¹¹⁸* και *sill;w¹¹¹⁸*. Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν στις long PCR, καθώς και οι τελικές τους συγκεντρώσεις φαίνονται στον

Πίνακα 2. 4. Οι συνθήκες για το κάθε ζεύγος εκκινητών που χρησιμοποιήθηκε φαίνονται στον Πίνακα 2. 5 και στον Πίνακα 2. 6. Τα DNA από τις γραμμές *D. melanogaster Oregon R* και *DGRP-820* χρησιμοποιήθηκαν ως θετικοί μάρτυρες, ενώ τα DNA από τις γραμμές *sil;w¹¹¹⁸* και *sill;w¹¹¹⁸* χρησιμοποιήθηκαν ως αρνητικοί μάρτυρες.

Πίνακας 2. 2: Εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν, οι θερμοκρασίες υβριδοποίησής τους και το μέγεθος των παραγόμενων τμημάτων.

Αναφορά	Εκκινητές	Αλληλουχία (5' -> 3')	Ειδικότητα	Μέγεθος προϊόντος (bp)	Tm (°C)
(Dokianakis and Ladoukakis 2014)	mel1594F	GCTGAATTAGGACATCCTGGAGC	<i>mel</i> αντί <i>sil</i> , <i>sill</i> , <i>silll</i>	791	61
	mel2385R	TCGAGTATCTACATCTATTCCAACG			
Παρούσα μελέτη	mel10631F	CGAAATTCCTATCCTC	<i>mel</i> αντί <i>sil</i> , <i>sill</i> , <i>silll</i>	722	52
	mel11353R	TTATCAGGGTCTCCCA			
(Dokianakis and Ladoukakis 2014)	sil_1737F	TCCTGATATAGCATTTC	<i>sil</i> αντί <i>mel</i> , <i>silll</i>	794	58
	sil_2531R	GTTAATCCTCCTACTGTG			
(Polovina et al. 2020)	sill_1737F	CCCTGATATAGCATTCCCG	<i>sill</i> αντί <i>mel</i> , <i>silll</i>	794	58
	sill_2531R	GTTAACCCCTACTGTA			
Παρούσα μελέτη	1588+	GAATTAGGACATCCTGGAGCAT	<i>silll</i> αντί <i>mel</i> , <i>sil</i> , <i>sill</i>	786	61
	2374-	GAGTATCAACGTCTATTCCAAGTGTG			
(Μαρία Μοναστηριώτη, ΙΤΕ)	1002(F)	TCGGAATAAGTTGAAGGATG	X χρωμόσωμα	767	52
	2653(R)	TGCCATCCTGACTGCTCAGC			
Παρούσα μελέτη	7339+	AAGCATGAGTTAATAAATGAAA	mtDNA	258	54
	7597-	CCGTTTCTGCTTTAGTTC			
(Folmer et al. 1994)	LCO1490	GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG	mtDNA	708	54
	HCO2198	TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA			

Παρούσα μελέτη	7339+	AAGCATGAGTTAATAAATGAAA	<i>mel</i> αντί <i>sil</i> , <i>sill</i> , <i>silll</i>	4014	56
	mel11353R	TTATCAGGGTCTCCCA			
Παρούσα μελέτη	mel2057F	TATTATTATCACTTCCAGTAC	<i>mel</i> αντί <i>sil</i> , <i>sill</i> , <i>silll</i>	5540	54
	7597-	CCGTTTCTGCTTTAGTTC			

Πίνακας 2. 3: Συνθήκες PCR για όλα τα ζεύγη εκκινητών (πλην των long PCRs).

Στάδια	Θερμοκρασία	Χρόνος	Κύκλοι
Αρχική αποδιάταξη	95°C	2'	1
Αποδιάταξη	95°C	15''	40 για ανίχνευση πατρικού mtDNA, 35 για τις υπόλοιπες PCR
Υβριδοποίηση	Κατάλληλη για κάθε ζεύγος εκκινητών	15''	
Επιμήκυνση	72°C	30''	
Τελική επιμήκυνση	72°C	5'	1

Πίνακας 2. 4: Συγκεντρώσεις αντιδραστηρίων που χρησιμοποιήθηκαν στις long PCR.

Αντιδραστήρια	Τελική συγκέντρωση
KAPA LongRange Buffer (5x)	1x
MgCl ₂ (25mM)	1,75mM
dNTPs (10mM each)	0,3mM
primers (10pmol/μl)	0,5mM ο καθένας
BSA (10mg/ml)	0,4mg/ml
KAPA LongRange DNA Polymerase (5U/μl)	0,625U
DNA (100ng/μl)	4ng/μl
υπερκαθαρό H ₂ O	μέχρι τα 25μl

Πίνακας 2. 5: Συνθήκες long PCR για το ζεύγος 7339+/mel11353R.

Στάδια	Θερμοκρασία	Χρόνος
Επώαση	95°C	5'
Αποδιάταξη	95°C	30''
Υβριδοποίηση	56°C	15''
Επιμήκυνση	68°C	4,5'
Τελική επιμήκυνση	72°C	6'

Πίνακας 2. 6: Συνθήκες long PCR για το ζεύγος mel2057F/7597-.

Στάδια	Θερμοκρασία	Χρόνος
Επώαση	95°C	5'
Αποδιάταξη	95°C	30''
Υβριδοποίηση	54°C	15''
Επιμήκυνση	68°C	6'
Τελική επιμήκυνση	72°C	6'

2.4 Προσδιορισμός του χρωμοσώματος που είναι υπεύθυνο για την ετεροπλασμία

2.4.1 Περιγραφή διασταυρώσεων για την αντικατάσταση των χρωμοσωμάτων της *DGRP-820*

Το πρώτο ερώτημα αφορούσε στο ποιο χρωμόσωμα ήταν υπεύθυνο για την εμφάνιση της ετεροπλασμίας. Για την απάντηση του ερωτήματος αυτού κατασκευάστηκαν γραμμές, οι οποίες έφεραν μόνο ένα ζεύγος χρωμοσωμάτων της γραμμής *DGRP-820*, ενώ όλα τα υπόλοιπα ζεύγη προέρχονταν από διαφορετική γραμμή. Στη συνέχεια ελέγξαμε σε ποια από τις παραπάνω γραμμές προέκυπταν ετεροπλασμικά άτομα, ώστε να προσδιορίσουμε σε πρώτη φάση το χρωμόσωμα στο οποίο εδραζόταν ο γενετικός τόπος (ή τόποι) που εμπλεκόταν στην εμφάνιση της ετεροπλασμίας.

Το γονιδίωμα της *Drosophila* αποτελείται από τέσσερα ζεύγη χρωμοσωμάτων, εκ των οποίων το ένα είναι το φυλετικό (χρωμόσωμα 1). Τα υπόλοιπα τρία ζεύγη είναι αυτοσωμικά (χρωμοσώματα 2, 3 και 4), από τα οποία το χρωμόσωμα 4 έχει αμελητέο μέγεθος και πολύ μικρό αριθμό γονιδίων, γι'αυτό συνήθως αγνοείται από τις γενετικές μελέτες (Adams et al. 2000). Έτσι, μέσω διασταυρώσεων κατασκευάστηκαν συνολικά τρεις κατηγορίες γραμμών, από τις οποίες η μία είχε μόνο το Χ χρωμόσωμα της γραμμής *DGRP-820*, η άλλη είχε μόνο το αυτοσωμικό χρωμόσωμα 2 της γραμμής *DGRP-820*, ενώ η τελευταία είχε μόνο το χρωμόσωμα 3 της γραμμής *DGRP-820*.

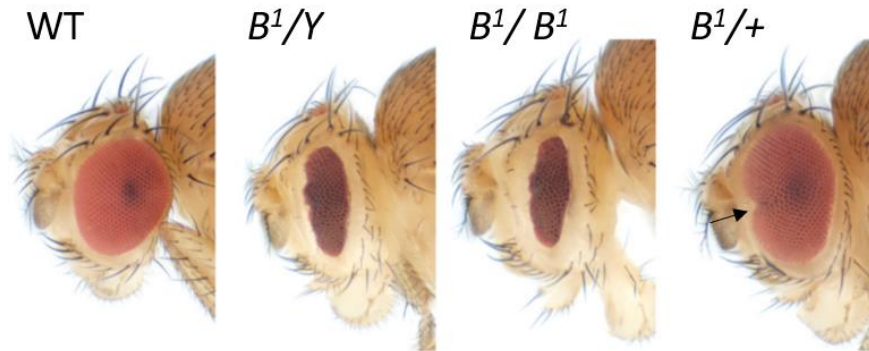
Οι χρωμοσωμικές αντικαταστάσεις ξεκινούσαν με τη διασταύρωση ατόμων της γραμμής *DGRP-820* (το οποίο είχε χρησιμοποιηθεί αρχικά για την κατασκευή των χιμαιρικών ετεροπλασμικών γραμμών) με άτομα μιας γραμμής που έφερε διαφορετικό μιτότυπο από τη γραμμή *DGRP-820* και είχε χρωμοσώματα-ισορροπιστές. Τα χρωμοσώματα-ισορροπιστές φέρουν αναστροφές, οι οποίες τα εμποδίζουν από το να ανασυνδυάζονται, με αποτέλεσμα όποιο ομόλογο χρωμόσωμα βρίσκεται απέναντί τους κατά τη μείωση να παραμένει αυτούσιο, χωρίς ανασυνδυασμό (Sturtevant 1921; Hentges and Justice 2004). Γραμμές με χρωμοσώματα-ισορροπιστές χρησιμοποιούνται γενικά για τη διατήρηση μεταλλαγών που σε ομοζυγωτία είναι θνησιγόνες. Επειδή και οι ίδιες οι αναστροφές είναι θνησιγόνες σε ομοζυγωτία, οι απόγονοι που επιβιώνουν στις γραμμές αυτές είναι όλοι ετεροζυγώτες. Το σύστημα αυτό είναι το πλέον κατάλληλο εργαλείο για τη μεταφορά ενός ολόκληρου

χρωμοσώματος από μία γραμμή σε μία άλλη, καθώς και οι αναστροφές, αλλά και οι μεταλλαγές που τις συνοδεύουν μπορούν να ταυτοποιηθούν φαινοτυπικά. Συνεπώς, είναι εύκολο να προσδιοριστεί αν έχει μεταφερθεί το επιθυμητό χρωμόσωμα, καθώς και το ποια άτομα πρέπει να διασταυρωθούν για να προκύψει ο επιθυμητός γονότυπος.

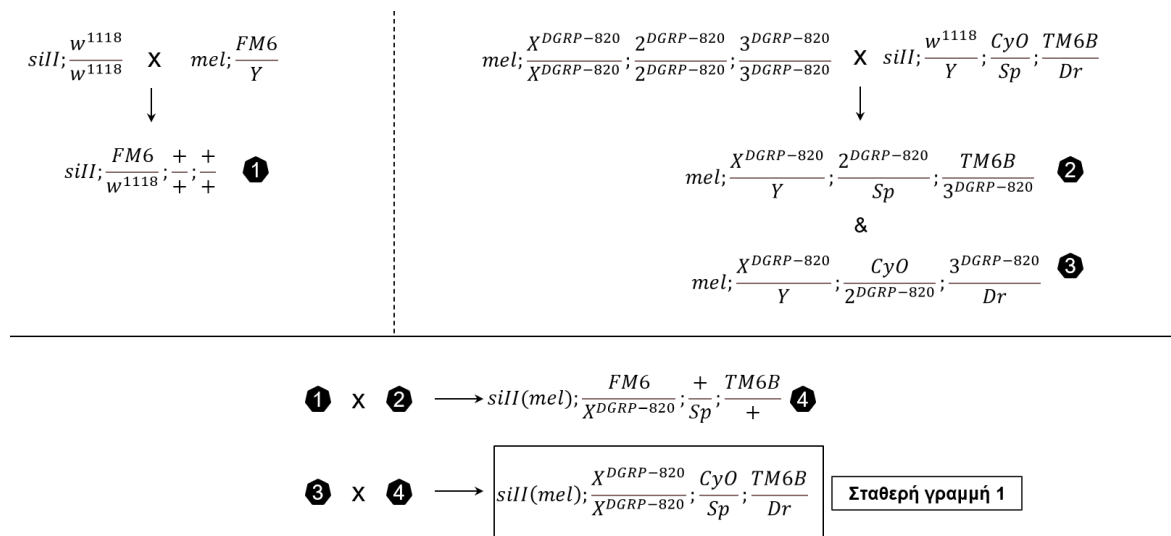
Για την αντικατάσταση του X χρωμοσώματος χρησιμοποιήθηκε γραμμή με αναστροφή στο χρωμόσωμα X ($FM6$, B^1). Φαινοτυπικά, η παρουσία τους διακρινόταν από το διαφορετικό σχήμα των ματιών, το οποίο διέφερε ανάλογα με το αν ο φαινοτυπικός δείκτης βρισκόταν σε ομοζυγωτική, ημιζυγωτική ή ετεροζυγωτική κατάσταση (Εικόνα 2. 2). Για την κατασκευή των τελικών γονότυπων χρειάστηκαν αρκετές σειρές διασταυρώσεων και η προσεκτική επιλογή των ατόμων βάσει του φαινοτύπου τους για την κάθε σειρά. Ο αριθμός των διασταυρώσεων που έγιναν ήταν διαφορετικός σε κάθε βήμα, ανάλογα με τους γονότυπους που έπρεπε να συλλεχθούν για το επόμενο βήμα, δηλαδή σε διασταυρώσεις όπου ο επιθυμητός γονότυπος αναμενόταν σε μικρότερη συχνότητα γίνονταν περισσότερες επαναλήψεις, ώστε να εξασφαλίζεται ότι θα είχαμε αρκετά άτομα για διασταυρώσεις στα επόμενα βήματα. Η παραπάνω διαδικασία έγινε δύο φορές, έτσι ώστε να προκύψουν δύο γραμμές με τον ίδιο γονότυπο πυρηνικά, αλλά με διαφορετικούς μιτότυπους, τους *sil* και *sill*. Αυτό έγινε για να αποκλειστεί η πιθανότητα εμπλοκής του είδους του μιτότυπου στην εμφάνιση της ετεροπλασμίας. Οι διασταυρώσεις που έγιναν, οι οποίες φαίνονται αναλυτικά στην Εικόνα 2. 3, καταλήγουν στη σταθερή γραμμή 1 με γονότυπο που φαίνεται στον Πίνακα 2. 7.

Για τις αντικαταστάσεις των αυτοσωμικών χρωμοσωμάτων χρησιμοποιήθηκε μία χιμαιρική γραμμή που έφερε μια αναστροφή στο χρωμόσωμα 2 (CyO , Cy^1) και μία στο χρωμόσωμα 3 ($TM6B$, Hu). Φαινοτυπικά, η παρουσία τους διακρινόταν από τα κυρτά φτερά έναντι των ίσιων που έφερε ο άγριος τύπος (Εικόνα 2. 4) και από τον διαφορετικό αριθμό σμηριγγών που έφεραν σε ένα συγκεκριμένο σημείο του θώρακα κοντά στο κεφάλι (Εικόνα 2. 5), αντιστοίχως. Οι μεταλλαγές που συνόδευαν τις παραπάνω αναστροφές είχαν να κάνουν με διαφορετικό αριθμό σμηριγγών μεταξύ των μπροστινών και μεσαίων ποδιών των μυγών (Sr , Εικόνα 2. 6), καθώς και με το μέγεθος των ματιών (Dr^1 , Εικόνα 2. 7). Όπως και για την αντικατάσταση του χρωμοσώματος X , χρειάστηκαν αρκετές σειρές διασταυρώσεων για την κατασκευή των τελικών γονότυπων, ενώ ο αριθμός των διασταυρώσεων που έγιναν ήταν διαφορετικός σε κάθε βήμα, ανάλογα με τη συχνότητα των γονότυπων που έπρεπε να συλλεχθούν για το επόμενο βήμα. Η παραπάνω διαδικασία έγινε δύο φορές, για τον ίδιο

λόγο που έγινε και στην περίπτωση της αντικατάστασης του X χρωμοσώματος, οπότε προέκυψαν δύο γραμμές με μιτότυπο *sil* και δύο γραμμές με μιτότυπο *sill*. Οι διασταυρώσεις φαίνονται αναλυτικά στην Εικόνα 2. 8 και καταλήγουν στις σταθερές γραμμές 2 και 3 (Πίνακας 2. 7).



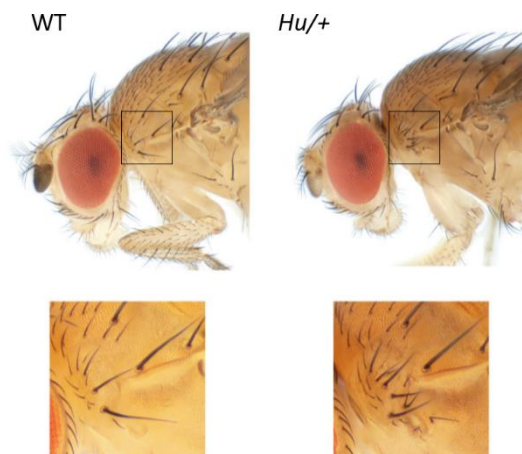
Εικόνα 2. 2: Φαινότυπος της μεταλλαγής B^1 , η οποία είναι δείκτης της παρουσίας της αναστροφής *FM6*, σε ημιζυγωτική, ομοζυγωτική και ετεροζυγωτική κατάσταση (Chyb and Gompel 2013). Ως WT (wild-type) συμβολίζεται ο αγρίου τύπου φαινότυπος.



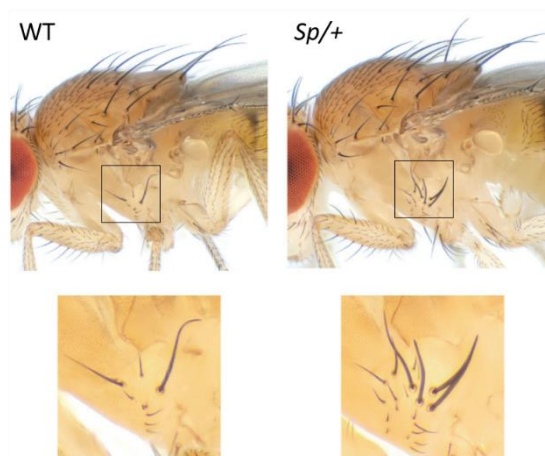
Εικόνα 2. 3: Διασταυρώσεις για την αντικατάσταση του X χρωμοσώματος του w^{1118} υπόβαθρου από το X χρωμόσωμα της γραμμής *DGRP-820*. Οι διασταυρώσεις που φαίνονται έγιναν δύο φορές, μία με τη γραμμή *sil*; w^{1118} (όπως φαίνεται στη εικόνα) και μία με τη γραμμή *sil*; w^{1118} .



Εικόνα 2. 4: Φαινότυπος της μεταλλαγής Cy^1 (Chyb and Gompel 2013), η οποία είναι δείκτης της παρουσίας της αναστροφής CyO , έναντι του αγρίου τύπου φαινοτύπου (WT). Η μεταλλαγή είναι επικρατής.



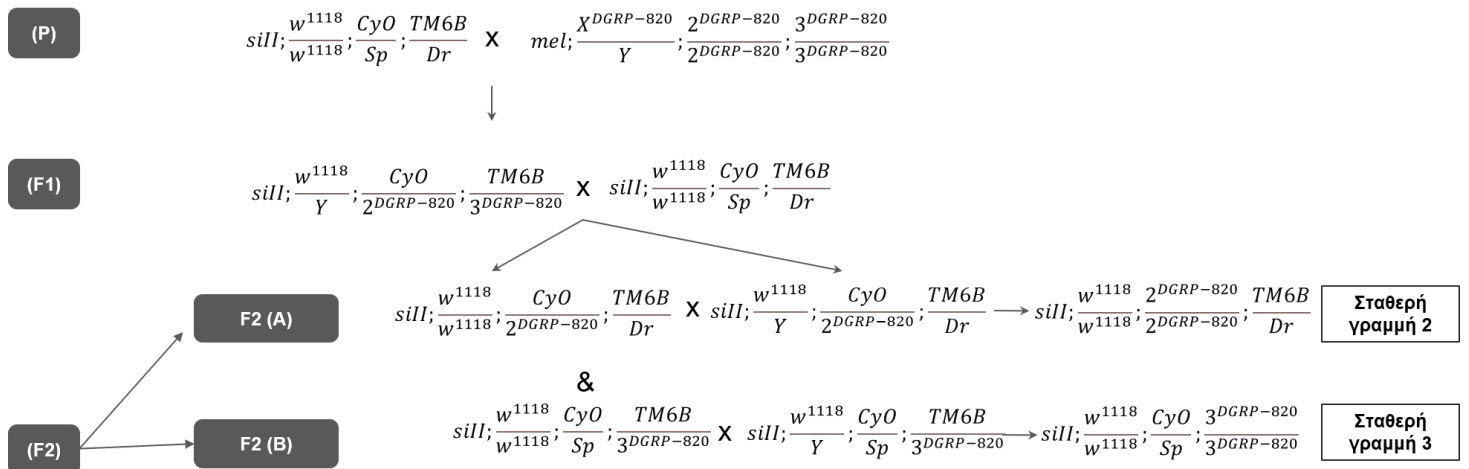
Εικόνα 2. 5: Φαινότυπος της μεταλλαγής Hu , η οποία είναι δείκτης της παρουσίας της αναστροφής $TM6B$ (Chyb and Gompel 2013), έναντι του αγρίου τύπου φαινοτύπου (WT). Η μεταλλαγή είναι επικρατής.



Εικόνα 2. 6: Φαινότυπος της μεταλλαγής Sp (Chyb and Gompel 2013), έναντι του αγρίου τύπου φαινοτύπου (WT). Η μεταλλαγή είναι επικρατής.



Εικόνα 2. 7: Φαινότυπος της μεταλλαγής Dr^1 (Chyb and Gompel 2013), έναντι του αγρίου τύπου φαινότυπου (WT). Η μεταλλαγή είναι επικρατής.



Εικόνα 2. 8: Διασταυρώσεις για την αντικατάσταση των αυτοσωμικών χρωμοσωμάτων του w^{1118} υπόβαθρου από τα αυτοσωμικά χρωμοσώματα της γραμμής $DGRP-820$. Οι διασταυρώσεις που φαίνονται έγιναν δύο φορές, μία με τη γραμμή $sill; w^{1118}$ (όπως φαίνεται στη εικόνα) και μία με τη γραμμή $sill; w^{1118}$.

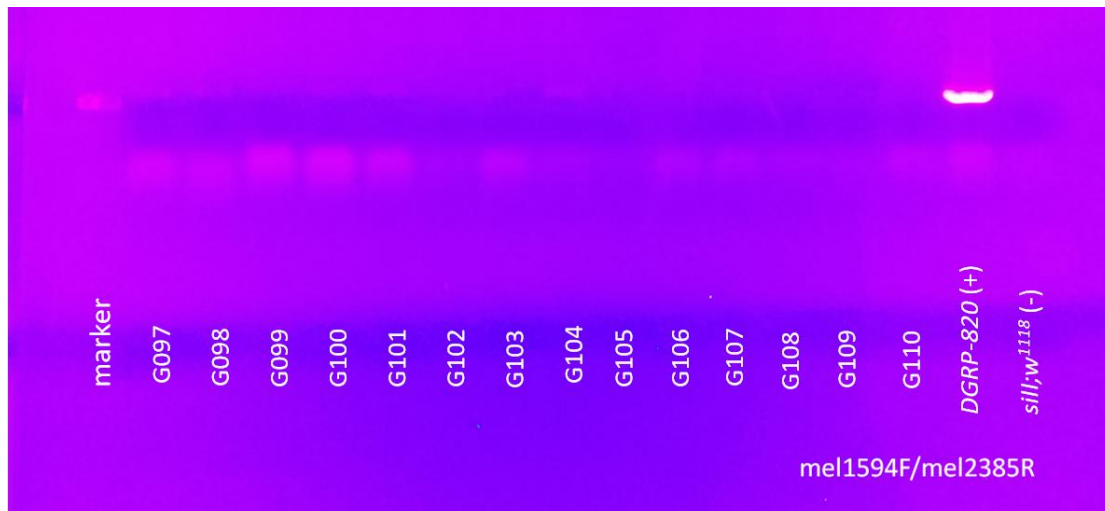
Για όλες τις παραπάνω χρωμοσωμικές αντικαταστάσεις που περιγράφηκαν, από την αρχή της διαδικασίας μέχρι την παραγωγή των τελικών γονοτύπων χρειάστηκαν συνολικά 96 διασταυρώσεις.

Πίνακας 2. 7: Γονότυποι των τριών γραμμών που κατασκευάστηκαν με τη διαδικασία των χρωμοσωμικών αντικαταστάσεων.

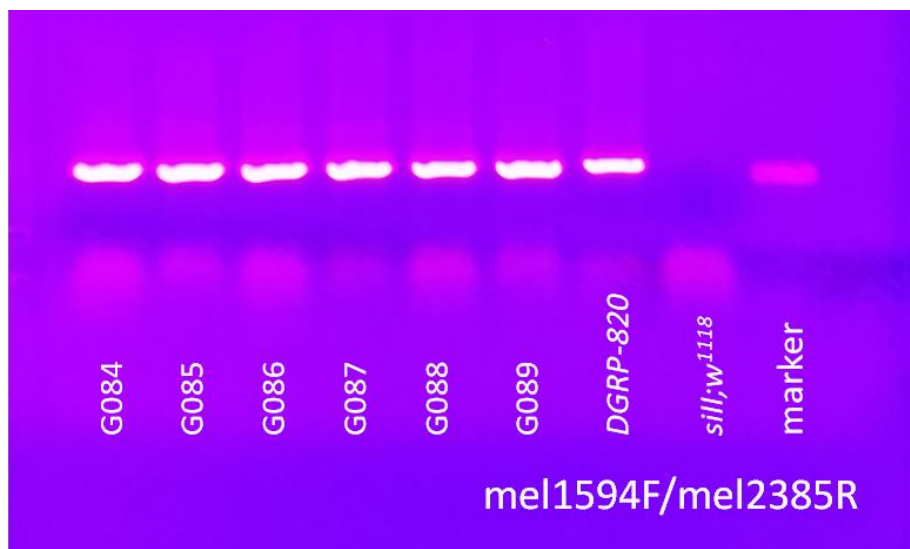
Γραμμή	Γονότυπος
Σταθερές γραμμές 1	$siII(mel); \frac{X^{DGRP-820}}{X^{DGRP-820}}; \frac{CyO}{Sp}; \frac{TM6B}{Dr} \& sil(mel) \frac{X^{DGRP-820}}{X^{DGRP-820}}; \frac{CyO}{Sp}; \frac{TM6B}{Dr}$
Σταθερές γραμμές 2	$siII; \frac{w^{1118}}{w^{1118}}; \frac{2^{DGRP-820}}{2^{DGRP-820}}; \frac{TM6B}{Dr} \& sil; \frac{w^{1118}}{w^{1118}}; \frac{2^{DGRP-820}}{2^{DGRP-820}}; \frac{TM6B}{Dr}$
Σταθερές γραμμές 3	$siII; \frac{w^{1118}}{w^{1118}}; \frac{CyO}{Sp}; \frac{3^{DGRP-820}}{3^{DGRP-820}} \& sil; \frac{w^{1118}}{w^{1118}}; \frac{CyO}{Sp}; \frac{3^{DGRP-820}}{3^{DGRP-820}}$

2.4.2 Έλεγχος για ετεροπλασμία στις σταθερές γραμμές 1 έως 3

Ο έλεγχος για ετεροπλασμία γινόταν μέσω της ενίσχυσης του μητρικού και του πατρικού μιτότυπου με την τυπική διαδικασία της allele-specific PCR, που περιγράφηκε στην προηγούμενη ενότητα. Για κάθε μία από τις έξι σταθερές γραμμές που προέκυψαν, ελέγξαμε συνολικά 20 άτομα για ετεροπλασμία, εκ των οποίων τα δέκα ήταν θηλυκά άτομα και τα δέκα αρσενικά άτομα. Στα άτομα από τις σταθερές γραμμές 2 και 3 που έφεραν τα αυτοσωμικά χρωμοσώματα της *DGRP-820*, ανιχνεύσαμε μόνο τον μητρικό μιτότυπο (*sil* ή *sill*, αναλόγως τη γραμμή), ενώ σε κανένα από τα άτομα δεν ανιχνεύθηκε ο μιτότυπος *mel*, δηλαδή τα άτομα ήταν ομοπλασμικά (Εικόνα 2. 9). Αντιθέτως, τα άτομα από τις σταθερές γραμμές 1 που έφεραν το *X* χρωμόσωμα της γραμμής *DGRP-820* ($X^{DGRP-820}$) ήταν όλα ετεροπλασμικά, δηλαδή έφεραν τον *mel* μιτότυπο και έναν *si* μιτότυπο, αναλόγως τη γραμμή (Εικόνα 2. 10). Από τα παραπάνω συμπεράναμε ότι ο γενετικός τόπος (ή τόποι) που ήταν υπεύθυνος για την εμφάνιση της ετεροπλασμίας εδράζεται στο *X* χρωμόσωμα. Επιπλέον, αποκλείσαμε την εμπλοκή του είδους του μιτότυπου *si*, καθώς η ετεροπλασμία δεν σχετίστηκε με το αν οι γραμμές έφεραν το μιτότυπο *sil* ή *sill*.



Εικόνα 2.9: PCR για τον έλεγχο παρουσίας του μιτότυπου *mel* σε άτομα που φέρουν μόνο τα αυτοσωμικά χρωμοσώματα 2 ή 3 της γραμμής *DGRP-820*. Ο marker που χρησιμοποιήθηκε είχε μέγεθος περίπου 700bp. Τα άτομα G097-G103 έφεραν μόνο το χρωμόσωμα 2 της *DGRP-820*, ενώ τα άτομα G104-G110 έφεραν μόνο το χρωμόσωμα 3 της *DGRP-820*. Ως θετικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε DNA από τη γραμμή *DGRP-820*, ενώ ως αρνητικός μάρτυρας DNA από τη γραμμή *sill;w¹¹⁸*. Σε κανένα από τα δείγματα δεν βρέθηκε ο μιτότυπος *mel*.



Εικόνα 2. 10: PCR για τον έλεγχο παρουσίας του μιτότυπου *mel* στα άτομα G084-G089 που φέρουν μόνο το X χρωμόσωμα της γραμμής *DGRP-820* ($X^{DGRP-820}$). Ο marker που χρησιμοποιήθηκε είχε μέγεθος περίπου 700bp. Ως θετικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε DNA από τη γραμμή *DGRP-820*, ενώ ως αρνητικός μάρτυρας DNA από τη γραμμή *sill;w¹¹⁸*. Σε όλα τα δείγματα ανιχνεύθηκε ο μιτότυπος *mel*.

Η παρουσία ή η απουσία των παραπάνω μιτότυπων παρακολουθούνταν και κατά τη διάρκεια διεξαγωγής των διασταυρώσεων, σε 10-15 απογόνους διαφόρων γονοτύπων ανά σειρά διασταυρώσεων. Εκεί, παρατηρήσαμε ότι στην πρώτη σειρά διασταυρώσεων της αντικατάστασης των αυτοσωμικών χρωμοσωμάτων υπήρχαν άτομα που έφεραν δύο μιτότυπους, τα οποία έφεραν ακόμα και ένα $X^{DGRP-820}$. Ωστόσο, ο μιτότυπος *mel* δεν ανιχνευόταν σε απογόνους που δεν έφεραν το $X^{DGRP-820}$, γεγονός που ενισχύει το

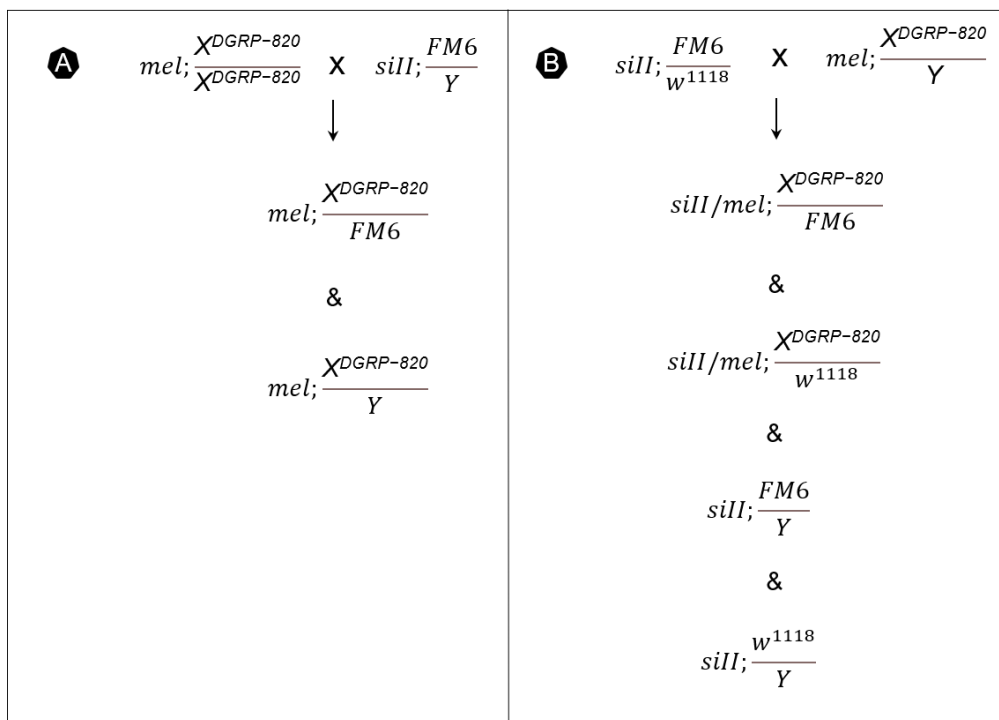
συμπέρασμα ότι η ετεροπλασμία σχετίζεται με γενετικό τόπο (ή τόπους) που εδραζόταν στο Χ χρωμόσωμα της *DGRP-820*.

2.5 Διερεύνηση της δημιουργίας της ετεροπλασμίας στις χιμαιρικές γραμμές *DGRP-820*

Οι επόμενες διασταυρώσεις που έγιναν είχαν στόχο να κατανοήσουμε το πώς προέκυψε η ετεροπλασμία στις χιμαιρικές γραμμές με το γενετικό υπόβαθρο της *DGRP-820*. Δηλαδή, θέλαμε να διευκρινίσουμε αν ο *mel* μιτότυπος μεταβιβάστηκε μία φορά μέσω διαρροής πατρικού mtDNA και συνέχιζε να μεταβιβάζεται μέσω της μητέρας (μητρική κληρονομηση της ετεροπλασμίας) ή αν συνέβαινε διαρροή πατρικού mtDNA σε κάθε γενιά. Έτσι, έγιναν δύο σειρές διασταυρώσεων, μία σειρά με άτομα της γραμμής *DGRP-820* ως θηλυκούς γονείς, και μία δεύτερη σειρά με άτομα της γραμμής *DGRP-820* ως αρσενικούς γονείς. Εδώ πρέπει να επισημανθεί ότι χρησιμοποιήθηκε η αρχική γραμμή *DGRP-820*, και όχι οι ίδιες οι χιμαιρικές γραμμές *820sil* και *820sill*, ώστε να ελεγχθεί ταυτόχρονα ότι η παρατηρούμενη ετεροπλασμία εξαρτόταν μόνο από το πυρηνικό υπόβαθρο *DGRP-820* και ότι δεν αποτελούσε παραπροϊόν της διαδικασίας με την οποία δημιουργήθηκαν οι χιμαιρικές γραμμές. Και για τις δύο σειρές διασταυρώσεων, ο δεύτερος γονέας που χρησιμοποιήθηκε είχε *sill* μιτότυπο. Για την κάθε σειρά διασταυρώσεων έγιναν δέκα επαναλήψεις. Μετά το πέρας των διασταυρώσεων, ελέγξαμε 20 άτομα από κάθε σειρά διασταυρώσεων (δέκα θηλυκά και δέκα αρσενικά άτομα), τα οποία επιλέχθηκαν τυχαία από διάφορες επαναλήψεις, για την παρουσία των *mel* και *sill* μιτότυπων.

Αναλυτικότερα, στην πρώτη σειρά διασταυρώθηκαν θηλυκά άτομα *DGRP-820* με αρσενικά άτομα *sill; FM6/Y* (Εικόνα 2. 11, Διασταυρώσεις Α). Από τον έλεγχο που έγινε στην F1 γενιά, διαπιστώσαμε ότι όλοι οι απόγονοι έφεραν τον μητρικό μιτότυπο *mel*, ενώ σε κανέναν από αυτούς δεν ανιχνεύθηκε ο πατρικός μιτότυπος *sill*, δηλαδή δεν παρατηρήθηκε διαρροή mtDNA. Στη δεύτερη σειρά διασταυρώθηκαν θηλυκά άτομα *sill; FM6/w¹¹¹⁸* με αρσενικά άτομα *DGRP-820* (Εικόνα 2. 11, Διασταυρώσεις Β). Τα παραπάνω θηλυκά επιλέχθηκαν αντί άλλων, γιατί στην επόμενη γενιά ήταν εύκολο να προσδιοριστεί ποιοι απόγονοι έχουν το $\chi^{DGRP-820}$, λόγω του διακριτού φαινοτύπου του δείκτη B^1 στην ετεροζυγωτική κατάσταση. Εδώ, παρατηρήσαμε ότι η παρουσία των μιτότυπων διέφερε ανάλογα με το φύλο. Πιο συγκεκριμένα, διαπιστώσαμε ότι όλοι οι αρσενικοί απόγονοι ήταν

ομοπλασμικοί, δηλαδή έφεραν το μητρικό μιτότυπο *sill*, ενώ οι θηλυκοί απόγονοι των διασταυρώσεων ήταν ετεροπλασμικοί, καθώς έφεραν και τον πατρικό μιτότυπο *mel* μαζί με το μητρικό μιτότυπο *sill*. Από τους γονοτύπους της F1 φάνηκε ότι τα θηλυκά άτομα ήταν ταυτόχρονα εκείνα που κληρονόμησαν ένα $X^{DGRP-820}$ από τον πατέρα τους. Αυτό σήμαινε ότι ο πατρικός μιτότυπος *mel* μεταβιβάστηκε μόνο στους απογόνους που έφεραν το $X^{DGRP-820}$, μέσω διαρροής. Τέλος, από τα παραπάνω αποτελέσματα φάνηκε ότι η εμφάνιση της ετεροπλασμίας δεν σχετιζόταν με τη διαδικασία από την οποία προέκυψαν τις χιμαιρικές γραμμές *820sil* και *820sill*, αλλά οφειλόταν αποκλειστικά στο γενετικό υπόβαθρο της *DGRP-820*.

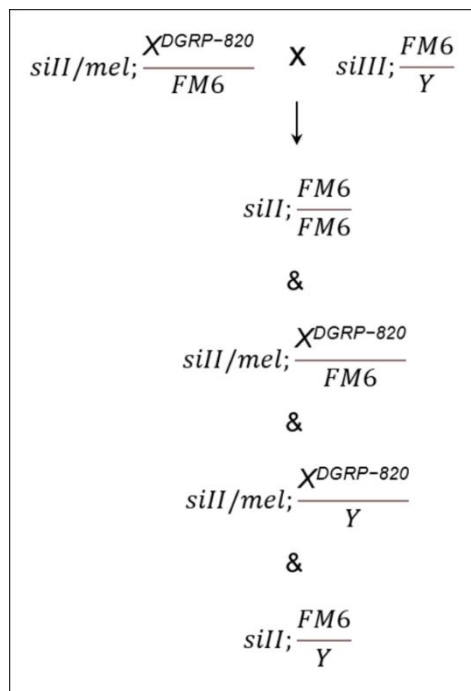


Εικόνα 2. 11: Διασταυρώσεις που έγιναν για να κατανοήσουμε το πως προέκυψε η ετεροπλασμία στις χιμαιρικές γραμμές με το γενετικό υπόβαθρο της γραμμής *DGRP-820*. (A) Όλοι οι απόγονοι ήταν ομοπλασμικοί για το μητρικό μιτότυπο *mel*. (B) Οι απόγονοι που έφεραν ένα $X^{DGRP-820}$ ήταν επίσης ετεροπλασμικοί για τους μιτότυπους *mel* και *sill*.

Τα ετεροπλασμικά θηλυκά που προέκυψαν από τις διασταυρώσεις B (Εικόνα 2. 11) χρησιμοποιήθηκαν σε νέες διασταυρώσεις, προκειμένου να διαπιστωθεί πώς μεταβιβάζονταν οι δύο μιτότυποι που έφεραν στην επόμενη γενιά. Για το σκοπό αυτό, τα θηλυκά με γονότυπο *mel/sill; X^{DGRP-820}/FM6* διασταυρώθηκαν με αρσενικά γονότυπου *sill;FM6/Y*. Ο συγκεκριμένος γονότυπος θηλυκών επιλέχθηκε αντί του άλλου, καθώς στο επόμενο βήμα θα ήταν δυνατό να προσδιορίσουμε φαινοτυπικά αν οι απόγονοι έφεραν ή όχι το $X^{DGRP-820}$, βάσει του διακριτού φαινοτύπου που παρουσίαζε ο δείκτης *B¹* ανάλογα με

το αν ήταν σε ομοζυγωτία, ετεροζυγωτία ή ημιζυγωτία (Εικόνα 2. 2). Επιπλέον, τα αρσενικά που χρησιμοποιήθηκαν στη διασταύρωση είχαν διακριτό μιτότυπο σε σχέση με τα θηλυκά, ώστε να μπορεί να ελεγχθεί και το ενδεχόμενο διαρροής πατρικού mtDNA από αυτά.

Από τον έλεγχο που έγινε για ετεροπλασμία στους απογόνους προέκυψε ότι όλοι οι απόγονοι έφεραν το μητρικό μιτότυπο *siII*, αλλά μόνο το 50% των απογόνων έφερε και το δεύτερο μητρικό μιτότυπο *mel*. Οι ίδιοι απόγονοι που έφεραν το *mel* μιτότυπο ήταν ταυτόχρονα αυτοί που είχαν κληρονομήσει από τη μητέρα τους το $X^{DGRP-820}$. Τέλος, δεν ανιχνεύθηκε σε κανέναν απόγονο ο πατρικός μιτότυπος *siIII*, συνεπώς δεν συνέβη διαρροή πατρικού mtDNA. Τα αποτελέσματα αυτά συνοψίζονται στην Εικόνα 2. 12. Συνολικά, από τις διασταυρώσεις που έγιναν σε αυτή την ενότητα φάνηκε ότι η ετεροπλασμία δημιουργήθηκε επειδή ο *mel* μιτότυπος της *DGRP-820* κληρονομήθηκε μαζί με το $X^{DGRP-820}$.



Εικόνα 2. 12: Διασταυρώσεις για να ελεγχθεί αν η ετεροπλασμία των θηλυκών που προέκυψαν από τις διασταυρώσεις Β της Εικόνας 2.11 μεταβιβάζεται στην επόμενη γενιά. Μόνο οι απόγονοι που κληρονόμησαν το $X^{DGRP-820}$ από τη μητέρα τους ήταν ετεροπλασματικοί.

2.6 Χαρτογράφηση των γενετικών τόπων που σχετίζονται με την ετεροπλασμία πάνω στο X χρωμόσωμα

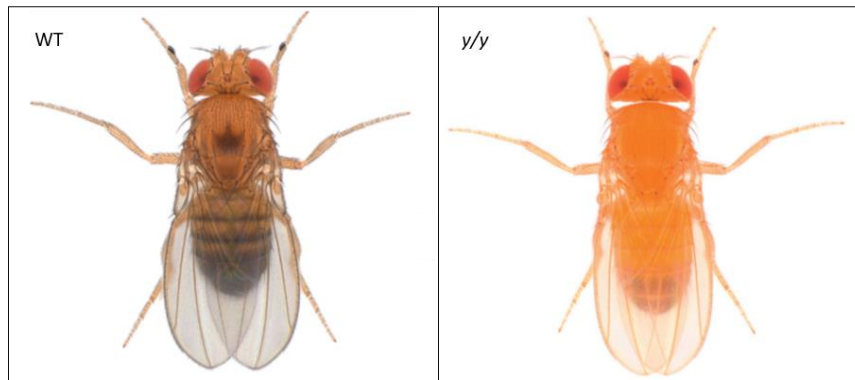
Οι διασταυρώσεις αυτής της ενότητας είχαν ως στόχο να προσδιορίσουμε συγκεκριμένες περιοχές στις οποίες βρισκόταν ο τόπος (ή οι τόποι) που σχετίζονταν με την ετεροπλασμία πάνω στο X χρωμόσωμα. Ο σχεδιασμός των διασταυρώσεων για την χαρτογράφηση των

σχετιζόμενων με την ετεροπλασμία γενετικών τόπων βασίστηκε σε δύο γεγονότα. Πρώτον, στις διασταυρώσεις χρωμοσωμικών αντικαταστάσεων παρατηρήθηκε ετεροπλασμία μόνο στις γραμμές που έφεραν το χρωμόσωμα *X* της γραμμής *DGRP-820* ($X^{DGRP-820}$), όπως περιγράφηκε στην Ενότητα 2.4. Δεύτερον, παρατηρήθηκε ότι συνέβαινε διαρροή πατρικού mtDNA όταν οι αρσενικοί γονείς φέρουν το $X^{DGRP-820}$ (Ενότητα 2.5).

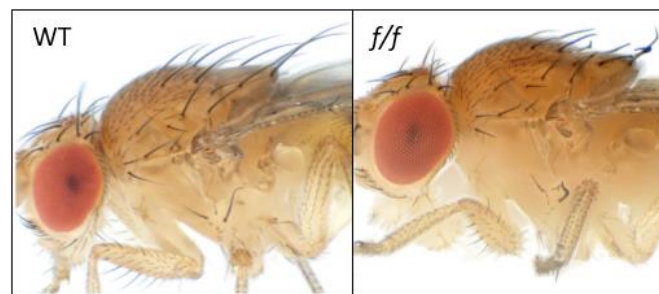
Με βάση την αρχή της κλασικής γενετικής χαρτογράφησης, χρησιμοποιήθηκε μία γραμμή που έφερε τέσσερις υπολειπόμενες μεταλλαγές σε γνωστές θέσεις πάνω στο *X* χρωμόσωμα, καθεμιά από τις οποίες μπορούσε να διακριθεί φαινοτυπικά. Αναλυτικότερα, η πρώτη μεταλλαγή είχε να κάνει με το χρώμα του σώματος (yellow, *y*) (Εικόνα 2. 13), η δεύτερη με την κυρτότητα στις σμήριγγες (forked, *f*) (Εικόνα 2. 14) και οι άλλες δύο με το χρώμα των ματιών (*v* για vermillion και *mal^{bz}* για maroon-like) (Εικόνα 2. 15). Με τη χρήση αυτού του χρωμοσώματος (*y v f mal^{bz}*) και της γραμμής *DGRP-820* παράχθηκαν μετά από αρκετές σειρές διασταυρώσεων αρσενικά που έφεραν ένα ανασυνδυασμένο *X* χρωμόσωμα, το οποίο έφερε μερικούς από τους προαναφερόμενους φαινοτυπικούς δείκτες και τμήματα του $X^{DGRP-820}$ (*recX^{DGRP-820}*). Όπως αναμενόταν, τα αρσενικά αυτά είχαν διαφορετικούς φαινότυπους ανάλογα με τους δείκτες που έφεραν στο *X* χρωμόσωμα, συνεπώς μπορούσαμε να προσδιορίσουμε τις περιοχές του $X^{DGRP-820}$ που έφεραν. Παράδειγμα ενός τέτοιου ανασυνδυασμού φαίνεται στην Εικόνα 2. 16.

Τα παραπάνω αρσενικά με γονότυπο *recX^{DGRP-820}/Y*, που έφεραν το *mel* μιτότυπο, διασταυρώθηκαν με θηλυκά γονότυπου *silll;FM6/w¹¹¹⁸*. Τα θηλυκά αυτά επιλέχθηκαν αντί άλλων, γιατί στην επόμενη γενιά ήταν εύκολο να προσδιοριστεί ποιοι απόγονοι είχαν το $X^{DGRP-820}$, λόγω του διακριτού φαινοτύπου του δείκτη *B¹* στην ετεροζυγωτική κατάσταση (Εικόνα 2. 2). Οι θηλυκοί απόγονοι αυτής της διασταύρωσης που θα βρίσκονταν ετεροπλασμικοί θα είχαν κληρονομήσει από τον πατέρα τους το *recX^{DGRP-820}* που έφερε τον σχετιζόμενο με την ετεροπλασμία γενετικό τόπο. Από τον φαινότυπο του πατέρα των ετεροπλασμικών θηλυκών της F1 γενιάς μπορούσαμε να καταλάβουμε μεταξύ ποιων φαινοτυπικών δεικτών βρισκόταν ο παραπάνω τόπος. Οι διασταυρώσεις που έγιναν φαίνονται στην Εικόνα 2. 17. Με την παραπάνω λογική έγιναν 80 διασταυρώσεις με αρσενικά διαφόρων φαινοτύπων (αναλόγως του ανασυνδυασμού που είχε συμβεί), χρησιμοποιώντας πάντα μόνο ένα αρσενικό σε κάθε διασταύρωση, καθώς ακόμα και στα αρσενικά ίδιου φαινοτύπου ο ανασυνδυασμός μπορούσε να έχει συμβεί σε διαφορετικά

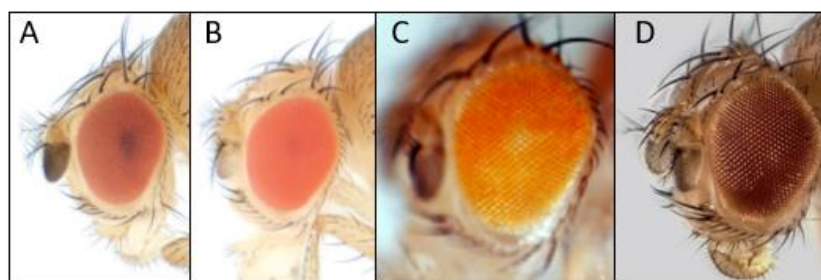
σημεία. Οι γονότυποι των αρσενικών που χρησιμοποιήθηκαν φαίνονται στον Πίνακα 2. 8. Τέλος, στις διασταυρώσεις χρησιμοποιούνταν κάθε φορά 1 έως 3 θηλυκά.



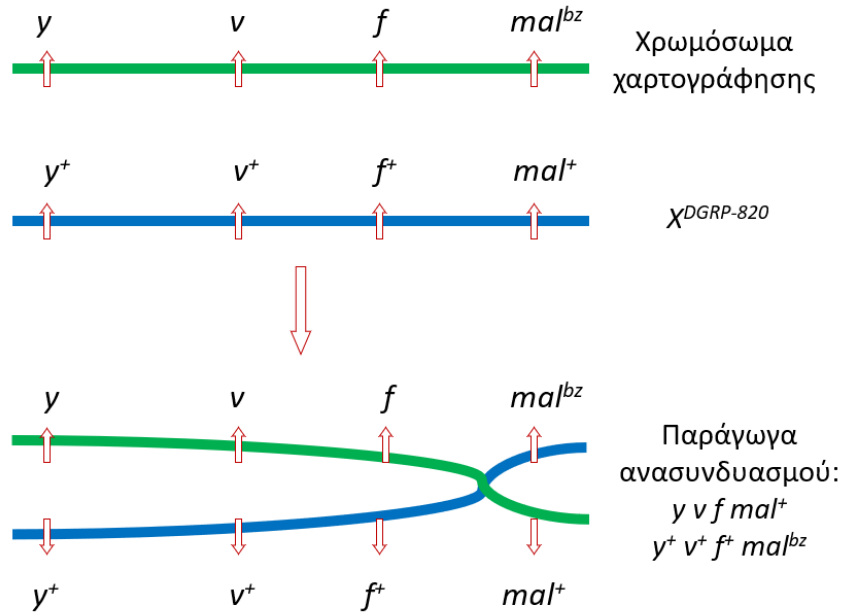
Εικόνα 2. 13: Φαινότυπος της υπολειπόμενης μεταλλαγής *yellow* (*y*) έναντι του αγρίου τύπου (WT) φαινοτύπου (Chyb and Gompel 2013).



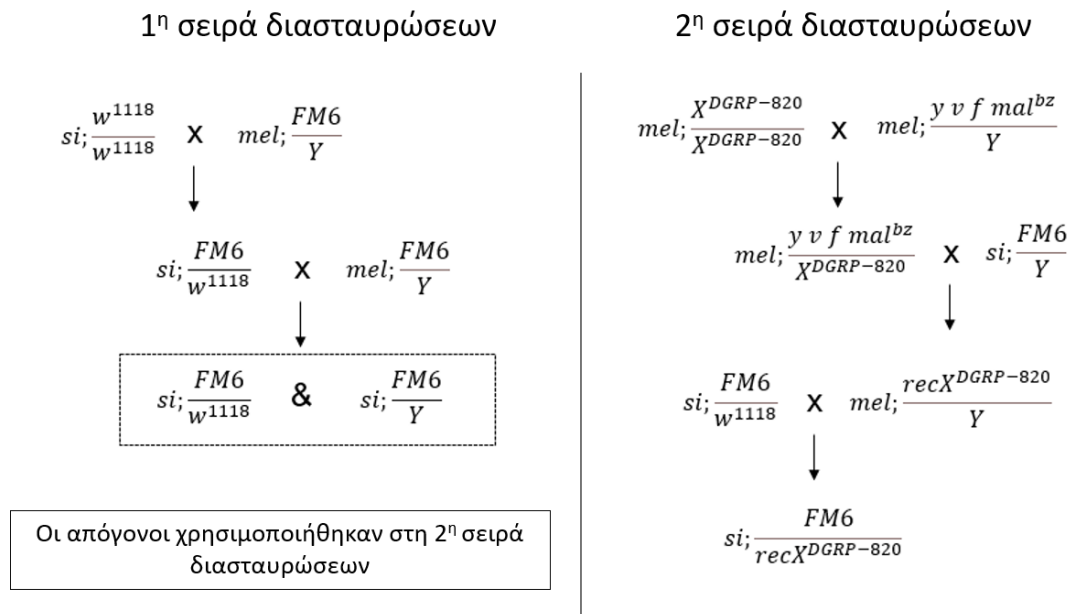
Εικόνα 2. 14: Φαινότυπος της υπολειπόμενης μεταλλαγής *forked* (*f*) έναντι του αγρίου τύπου (WT) φαινοτύπου (Chyb and Gompel 2013).



Εικόνα 2. 15: Φαινότυπος των υπολειπόμενων μεταλλαγών *vermillion* (*v*) (Chyb and Gompel 2013) και *maroon-like* (*mal^{bz}*) (Dolgin 2019), καθώς και του συνδυασμού τους (Eusebio and Pereira 2017), έναντι του αγρίου τύπου (WT) φαινοτύπου. (A) WT φαινότυπος, (B) *v/v* φαινότυπος, (C) *v mal^{bz}/v mal^{bz}* φαινότυπος, (D) *mal^{bz}/mal^{bz}* φαινότυπος.



Εικόνα 2. 16: Παράδειγμα ανασυνδυασμού μεταξύ του χρωμοσώματος χαρτογράφησης $y v f mal^{bz}$ και του $\chi^{DGRP-820}$.



Εικόνα 2. 17: Διασταυρώσεις για την παραγωγή αρσενικών με ανασυνδυασμένα χ χρωμοσώματα ($rec\chi^{DGRP-820}$).

Από τις 80 διασταυρώσεις που έγιναν, έδωσαν απογόνους οι 67. Θηλυκά από αυτές τις διασταυρώσεις ελέγχθηκαν για την παρουσία των μιτότυπων $silll$ και mel , με τη διαδικασία που περιγράφηκε στην υποενότητα 2.3.2. Ανά διασταύρωση, ελέγχσαμε 3 με 5 θηλυκούς απογόνους για την ύπαρξη ετεροπλασμίας, στο σύνολο 250 άτομα. Σε 24 από τις παραπάνω διασταυρώσεις προέκυψαν ετεροπλασμικά θηλυκά, στο σύνολό τους 90, ενώ τα θηλυκά των

υπόλοιπων 43 διασταυρώσεων ήταν ομοπλασικά για το μιτότυπο *silll*. Από την ανάλυση των αποτελεσμάτων της ετεροπλασμίας στους θηλυκούς απογόνους σε σχέση με τους γονότυπους των αρσενικών γονέων τους προέκυψε ότι η πλειοψηφία των θηλυκών (24/37, 64,9%) που έφεραν ένα χρωμόσωμα με γονότυπο $y\ v\ f\ mal^+$, δηλαδή το χρωμόσωμα που προέκυψε μετά από ανασυνδυασμό μεταξύ του $X^{DGRP-820}$ και του χρωμοσώματος $y\ v\ f\ mal^{bz}$ δεξιά του δείκτη *f*, ήταν ετεροπλασμικοί. Αντιθέτως, η πλειοψηφία των θηλυκών (37/43, 86%) που έφεραν ένα χρωμόσωμα με γονότυπο $y^+\ v^+\ f^+\ mal^{bz}$, το αντίθετο αποτέλεσμα δηλαδή του παραπάνω ανασυνδυασμού, έφεραν μόνο τον μιτότυπο *silll* της μητέρας τους.

Πίνακας 2. 8: Οι γονότυποι των αρσενικών που χρησιμοποιήθηκαν για τη χαρτογράφηση του σχετιζόμενου με την ετεροπλασμία γενετικού τόπου.

Γονότυπος αρσενικών γονέων	Αριθμός διασταυρώσεων	Αριθμός διασταυρώσεων που έδωσαν ετεροπλασμικά θηλυκά
$y\ v\ f\ mal^+$	11	7
$y^+\ v^+\ f^+\ mal^{bz}$	13	2
$y\ v\ f^+\ mal^+$	7	7
$y^+\ v^+\ f\ mal^{bz}$	8	0
$y^+\ v^+\ f^+\ mal^+$	2	2
$y\ v\ f\ mal^{bz}$	8	0
$y^+\ v\ f\ mal^{bz}$	6	0
$y\ v^+\ f^+\ mal^+$	3	3
$y\ v^+\ f\ mal^{bz}$	4	0
$y^+\ v\ f^+\ mal^+$	3	3
$y^+\ v\ f\ mal^+$	2	0

Τα παραπάνω αποτελέσματα υποδεικνύουν ότι ο γενετικός τόπος που αναζητούσαμε εδραζόταν στην περιοχή μεταξύ των δεικτών *f* και *mal*, η οποία ήταν μία περιοχή μεγέθους περίπου 3,15Mb. Το συμπέρασμα αυτό ενισχύθηκε και από την ανάλυση των θηλυκών απογόνων με τους υπόλοιπους γονότυπους. Πιο συγκεκριμένα, όλα τα θηλυκά που έφεραν τμήμα του $X^{DGRP-820}$ μεταξύ των δεικτών *f* και *mal* ήταν ετεροπλασμικά. Αντιθέτως, τα υπόλοιπα θηλυκά που δεν έφεραν την παραπάνω περιοχή στο *X* χρωμόσωμά τους ήταν ομοπλασικά για τον *silll*. Το γεγονός ότι δεν είναι όλα τα θηλυκά με το χρωμόσωμα $y\ v\ f$

*mal**ετροπλασμικά οφειλόταν στο διαφορετικό σημείο που είχε γίνει ο ανασυνδυασμός μέσα στο τμήμα που ορίζουν οι δείκτες *f* και *mal* στον εκάστοτε αρσενικό γονέα, καθώς ανάλογα με το που θα συμβεί, το ανασυνδυασμένο χρωμόσωμα που θα προκύψει μπορεί είτε να έχει είτε να μην έχει τον υπεύθυνο για την ετεροπλασμία γενετικό τόπο.

2.7 Διερεύνηση του πρότυπου διατήρησης της ετεροπλασμίας στις χιμαιρικές γραμμές *820sil* και *820sill*

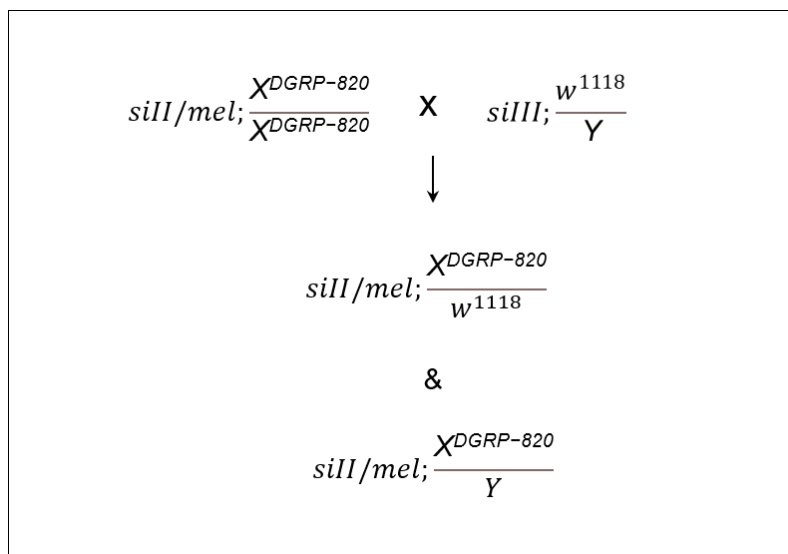
Το επόμενο ερώτημα που θέλαμε να απαντήσουμε ήταν αν η ετεροπλασμία στις χιμαιρικές γραμμές *820sil* και *820sill* διατηρούνταν μέσω και των δύο γονέων. Για το σκοπό αυτό, έγιναν τέσσερις σειρές διασταυρώσεων, στις οποίες χρησιμοποιήθηκαν οι δύο παραπάνω χιμαιρικές γραμμές. Η γραμμή *820sil* έφερε τους μιτότυπους *sil* και *mel*, ενώ η γραμμή *820sill* διατηρούσε τους μιτότυπους *sill* και *mel*. Και οι δύο αυτές γραμμές διασταυρώθηκαν με τη γραμμή *silll;w¹¹¹⁸*, η οποία είχε διαφορετικό πυρηνικό υπόβαθρο και διακριτό μιτότυπο, ώστε να είναι δυνατό να ελέγξουμε και για διαρροή πατρικού mtDNA. Για όλες τις σειρές διασταυρώσεων έγιναν πέντε επαναλήψεις, ενώ από κάθε σειρά διασταυρώσεων ελέγχθηκαν δέκα θηλυκά και δέκα αρσενικά άτομα. Η παρουσία όλων των μιτότυπων ελέγχθηκε με τη διαδικασία που περιγράφηκε στην υποενότητα 2.3.2.

Στην πρώτη σειρά διασταυρώσεων χρησιμοποιήθηκε η γραμμή *820sil* ως θηλυκός γονέας και η γραμμή *silll;w¹¹¹⁸* ως αρσενικός γονέας. Όλοι οι απόγονοι της παραπάνω διασταύρωσης ήταν ετεροπλασμικοί, καθώς έφεραν και τους δύο μητρικούς μιτότυπους *sil* και *mel*, ενώ σε κανέναν από αυτούς δεν παρατηρήθηκε μεταβίβαση του πατρικού μιτότυπου *silll*. Στη δεύτερη σειρά διασταυρώσεων χρησιμοποιήθηκε η γραμμή *820sill* ως θηλυκός γονέας και η γραμμή *silll;w¹¹¹⁸* ως αρσενικός γονέας. Τα αποτελέσματα ήταν αντίστοιχα με αυτά της πρώτης σειράς διασταυρώσεων, δηλαδή όλοι οι απόγονοι ήταν ετεροπλασμικοί για τους μητρικούς μιτότυπους *sill* και *mel*, ενώ σε κανέναν από αυτούς δεν παρατηρήθηκε διαρροή πατρικού mtDNA. Όλα τα παραπάνω συνοψίζονται στην Εικόνα 2. 18.

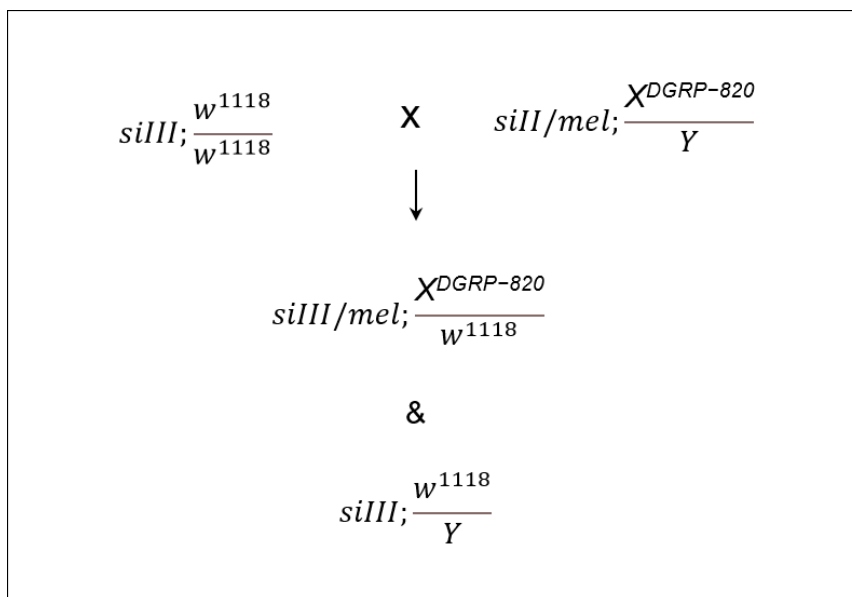
Στην τρίτη σειρά διασταυρώσεων χρησιμοποιήθηκε η γραμμή *820sil* ως αρσενικός γονέας με θηλυκούς γονείς από τη γραμμή *silll;w¹¹¹⁸*. Όλοι οι απόγονοι της παραπάνω διασταύρωσης έφεραν τον μητρικό μιτότυπο *silll*, όπως αναμενόταν λόγω της μητρικής κληρονομιάς του mtDNA. Ωστόσο, οι θηλυκοί απόγονοι αυτής της διασταύρωσης έφεραν τον πατρικό μιτότυπο *mel*, αλλά όχι τον δεύτερο πατρικό μιτότυπο *sil*. Αντιστοίχως, στην

τέταρτη σειρά διασταυρώσεων χρησιμοποιήθηκε η γραμμή *820sill* ως αρσενικός γονέας και η γραμμή *sill/w¹¹¹⁸* ως θηλυκός γονέας. Το πρότυπο της ετεροπλασμίας που παρατηρήθηκε σε αυτούς τους απογόνους ήταν αντίστοιχο με αυτό της τρίτης σειράς διασταυρώσεων, δηλαδή όλοι οι απόγονοι έφεραν τον μητρικό μιτότυπο *sill*, ενώ οι θηλυκοί απόγονοι έφεραν επιπλέον τον πατρικό μιτότυπο *mel*. Όλα τα παραπάνω συνοψίζονται στην Εικόνα 2. 19.

Από τα αποτελέσματα της παρούσας ενότητας φαίνεται ότι ο *mel* μιτότυπος ανιχνεύεται πάντα ταυτόχρονα με το $\chi^{DGRP-820}$, ενώ δεν ανιχνεύεται σε καμία περίπτωση που δεν είναι το $\chi^{DGRP-820}$ παρόν, με ένα πρότυπο που υποδεικνύει αμφιγονεϊκή κληρονομία, σε αντίθεση με τους μιτότυπους *sil* και *sill*, που μεταβιβάζονται μονογονεϊκά.



Εικόνα 2. 18: Διασταύρωση που έγινε για να διερευνηθεί αν και οι δύο μιτότυποι μεταβιβάζονται στην επόμενη γενιά μέσω των θηλυκών από τις χιμαιρικές γραμμές *820sil* και *820sill*. Οι δύο μιτότυποι ανιχνεύονται σε όλους τους απογόνους της επόμενης γενιάς. Η ίδια διασταύρωση επαναλήφθηκε για τη χιμαιρική γραμμή *820sil* (*sil/mel; $\chi^{DGRP-820}/Y$*) και έδωσε αντίστοιχα αποτελέσματα με αυτά που παρουσιάζονται παραπάνω.



Εικόνα 2. 19: Διασταύρωση που έγινε για να διερευνηθεί αν και οι δύο μιτότυποι μεταβιβάζονται στην επόμενη γενιά μέσω των αρσενικών από τις χιμαιρικές γραμμές *820sil* και *820sill*, μαζί με το $X^{DGRP-820}$. Μόνο ο μιτότυπος *mel* ανιχνεύεται στην επόμενη γενιά, και συγκεκριμένα ανιχνεύεται μόνο στους απογόνους που κληρονόμησαν και το $X^{DGRP-820}$. Η ίδια διασταύρωση επαναλήφθηκε για τη χιμαιρική γραμμή *820sil* (*sil/mel*; $X^{DGRP-820}/Y$) και έδωσε αντίστοιχα αποτελέσματα με αυτά που παρουσιάζονται παραπάνω.

2.8 Σύνοψη και συζήτηση των μέχρι τώρα αποτελεσμάτων

Όλες οι διασταυρώσεις που περιγράψαμε στις προηγούμενες ενότητες μας οδήγησαν στο συμπέρασμα ότι κάθε φορά που το $X^{DGRP-820}$ μεταβιβαζόταν σε απογόνους της επόμενης γενιάς, μεταβιβαζόταν ταυτόχρονα και ο μιτότυπος *mel*, δηλαδή παρατηρούσαμε συγκληρονόμηση. Ωστόσο, από τα πειράματα της προηγούμενης ενότητας, αλλά και από τα πειράματα της ενότητας 2.5, φαίνεται ότι η ετεροπλασμία δεν κληρονομούταν αυτούσια, δηλαδή δεν κληρονομούνταν και οι δύο μιτότυποι και από τους δύο γονείς, όπως αρχικά πιστεύαμε, αλλά ο ένας (*si*) μεταβιβαζόταν μητρικά, ενώ ο άλλος (*mel*) μεταβιβαζόταν αμφιγονεϊκά, δηλαδή και από τους δύο γονείς. Μάλιστα, ο γενετικός τόπος που σχετιζόταν με την ανίχνευση του *mel* μιτότυπου πρέπει να εδράζεται στην περιοχή μεταξύ των δεικτών *f* και *mal*, η οποία είναι μία περιοχή μεγέθους περίπου 3,15Mb.

Τα πιθανά σενάρια που μπορούν να εξηγήσουν το παραπάνω πρότυπο μεταβίβασης είναι δύο. Το πρώτο σενάριο ήταν η κληρονόμηση του *mel* μιτότυπου να είναι όντως αμφιγονεϊκή, οπότε η παρατηρούμενη ετεροπλασμία να είναι πραγματική. Αυτό θα μπορούσε να συμβαίνει αν υπήρχε κάποια μεταλλαγή σε ένα γονίδιο του $X^{DGRP-820}$ που σχετίζεται με την αφαίρεση του πατρικού mtDNA από το σπέρμα, και λόγω της μεταλλαγής

αυτής να παρεμποδίζεται αυτή η διαδικασία. Το δεύτερο σενάριο ήταν να έχει συμβεί μεταφορά ενός τμήματος mtDNA από το μιτοχόνδριο στον πυρήνα, δηλαδή να έχουμε μια περίπτωση NUMT. Σε αυτή την περίπτωση το NUMT 'μμιείται' την πατρική κληρονομία του *mel* μιτότυπου, το οποίο θα οδηγούσε σε ψευδή ετεροπλάσμια. Η πιθανότητα αυτή ήταν πολύ σημαντικό να διερευνηθεί, καθώς η επιβεβαίωση ή μη αυτού του σεναρίου θα καθόριζε την πορεία και τον σχεδιασμό όλων των επόμενων πειραμάτων. Η διερεύνηση της πιθανότητας ύπαρξης NUMT στη γραμμή *DGRP-820* έγινε προτεραιότητα μετά τα αποτελέσματα της προηγούμενης ενότητας. Πιο συγκεκριμένα, το γεγονός ότι τα ετεροπλασμικά αρσενικά των χιμαιρικών γραμμών *820sil* και *820sill* μεταβίβαζαν μόνο το *mel* μιτότυπό τους στα θηλυκά της επόμενης γενιάς αποτέλεσε ένα μη αναμενόμενο εύρημα. Μάλιστα, αυτό αποτέλεσε μια ισχυρή ένδειξη υπέρ της ύπαρξης NUMT, καθώς θεωρήσαμε απίθανο να μπορεί να διαρρέει ο ένας μιτότυπος στην επόμενη γενιά (*mel*) και όχι ο άλλος (*si*).

Ο αποκλεισμός του ενός από τα δύο σενάρια δεν ήταν εύκολη υπόθεση. Το πρώτο σενάριο της αμφιγονεϊκής κληρονομίας παρατηρείται σπάνια στη φύση, ωστόσο τη χρονική περίοδο διεξαγωγής των προαναφερόμενων πειραμάτων υπήρχε πρόσφατη μελέτη, η οποία ανέφερε αμφιγονεϊκή κληρονομία mtDNA σε ανθρώπους (Luo et al. 2018). Επιπλέον, όπως αναφέρθηκε και στην Ενότητα 2.1, το τμήμα του *mel* μιτότυπου που αλληλουχήθηκε ήταν κατά 99,5% όμοιο με το αντίστοιχο τμήμα της γραμμής *D. melanogaster Canton-S*, ενώ δεν περιείχε κωδικόνια λήξης ή μεταλλαγές αλλαγής πλαισίου (indel mutations), όπως αναμένεται σε αλληλουχίες NUMT. Επίσης, η περιοχή που πολλαπλασιαζόταν για την ανίχνευση του *mel* μιτότυπου (1594-2385bp) δεν ανήκει ούτε στα ήδη χαρακτηρισμένα NUMTs του γονιδιώματος αναφοράς της *D. melanogaster* (Rogers and Griffiths-Jones 2012), αλλά ούτε στα χαρακτηρισμένα NUMTs στο γονιδίωμα της γραμμής *DGRP-820* (Bever et al. 2019). Τέλος, το μήκος των γνωστών NUMTs στη *D. melanogaster* κυμαινόταν από 19bp έως 371bp (Rogers and Griffiths-Jones 2012; Bever et al. 2019), ενώ το τμήμα που πολλαπλασιάσαμε έχει πάνω από διπλάσιο μήκος από το μεγαλύτερο γνωστό NUMT (791bp). Συνεπώς, η ύπαρξη NUMT δεν θεωρούνταν πιθανή μέχρι τη διεξαγωγή των διασταυρώσεων των ενοτήτων 2.5 και 2.7. Ωστόσο, τα αποτελέσματα από αυτές τις διασταυρώσεις έδειξαν ότι έπρεπε να σχεδιαστούν πειράματα ώστε να δούμε αν ο *mel* μιτότυπος που ανιχνεύαμε είναι όντως mtDNA ή αν επρόκειτο για ένα νέο, μη

χαρακτηρισμένο NUMT. Στην επόμενη ενότητα παρουσιάζονται τα πειράματα που έγιναν για τη διερεύνηση αυτού του ερωτήματος.

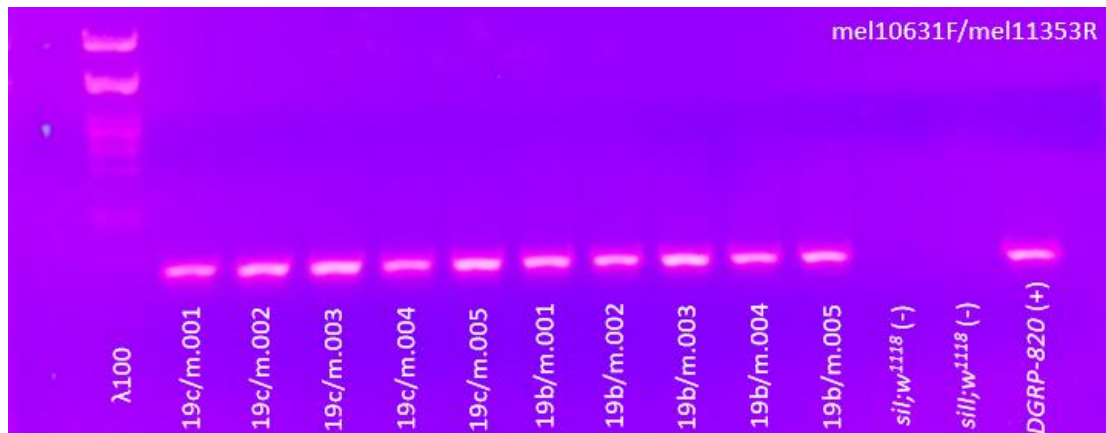
2.9 Διερεύνηση πιθανότητας ύπαρξης NUMT στη γραμμή *DGRP-820*

2.9.1 Σχεδιασμός νέων εκκινητών, ειδικών για τον *mel* μιτότυπο

Προκειμένου να επιβεβαιώσουμε την παρουσία του *mel* μιτότυπου στους απογόνους που είχαμε χαρακτηρίσει ετεροπλασμικούς, σχεδιάστηκε ένα νέο ζεύγος εκκινητών, που πολλαπλασίαζε μόνο το *mel* μιτότυπο, αλλά δεν πολλαπλασίαζε κανέναν από τους *si* μιτότυπους. Με την εφαρμογή της διαδικασίας που περιγράφηκε στην υποενότητα 2.3.2 για το σχεδιασμό εκκινητών, σχεδιάστηκαν οι εκκινητές *mel10631F* και *mel11353R*, οι οποίοι πολλαπλασίαζαν ένα τμήμα μήκους 722bp του γονιδίου του κυτοχρώματος Β (*CytB*) στον *mel* μιτότυπο, αλλά όχι στους *si* μιτότυπους. Η περιοχή έχει απόσταση 8kb από την περιοχή που πολλαπλασιαζόταν με το ειδικό ζεύγος εκκινητών που χρησιμοποιούσαμε έως τώρα (*mel1594F/mel2385R*). Η αλληλουχία τους, καθώς και η θερμοκρασία υβριδοποίησής τους φαίνεται στον Πίνακα 2. 2.

Με τη χρήση του ζεύγους εκκινητών *mel10631F/ mel11353R* ελέγξαμε για την παρουσία του *mel* μιτότυπου τους ετεροπλασμικούς απογόνους των διασταυρώσεων των ενοτήτων 2.5 και 2.7 που είχαν ταυτοποιηθεί με το ζεύγος εκκινητών *mel1594F/mel2385R*. Από τον έλεγχο αυτό μπορούσαμε να εξάγουμε διαφορετικά συμπεράσματα, αναλόγως με το αν θα προέκυπτε προϊόν PCR ή όχι. Αναλυτικότερα, αν δεν προέκυπτε προϊόν από το νέο ζεύγος *mel* εκκινητών, τότε αυτό θα σήμαινε με βεβαιότητα ότι η παρατηρούμενη ετεροπλασμία στη γραμμή *DGRP-820* οφείλεται σε ύπαρξη NUMT, και όχι σε πραγματική παρουσία του μιτότυπου *mel*. Αντιθέτως, αν προέκυπτε προϊόν, τότε δε θα μπορούσε να αποκλειστεί η πιθανότητα αμφιγονεϊκής κληρονομής του mtDNA, αλλά ούτε και η ύπαρξη ενός μεγάλου σε μέγεθος, μη χαρακτηρισμένου NUMT. Σε όλους τους ετεροπλασμικούς απογόνους που εξετάσαμε προέκυψε προϊόν PCR (Εικόνα 2. 20). Συνεπώς, σχεδιάστηκαν κι άλλα πειράματα

προκειμένου να διαπιστωθεί αν όντως συνέβαινε αμφιγονεϊκή κληρονομηση του mtDNA ή αν υπήρχε ένα μεγάλο μεγέθους NUMT.



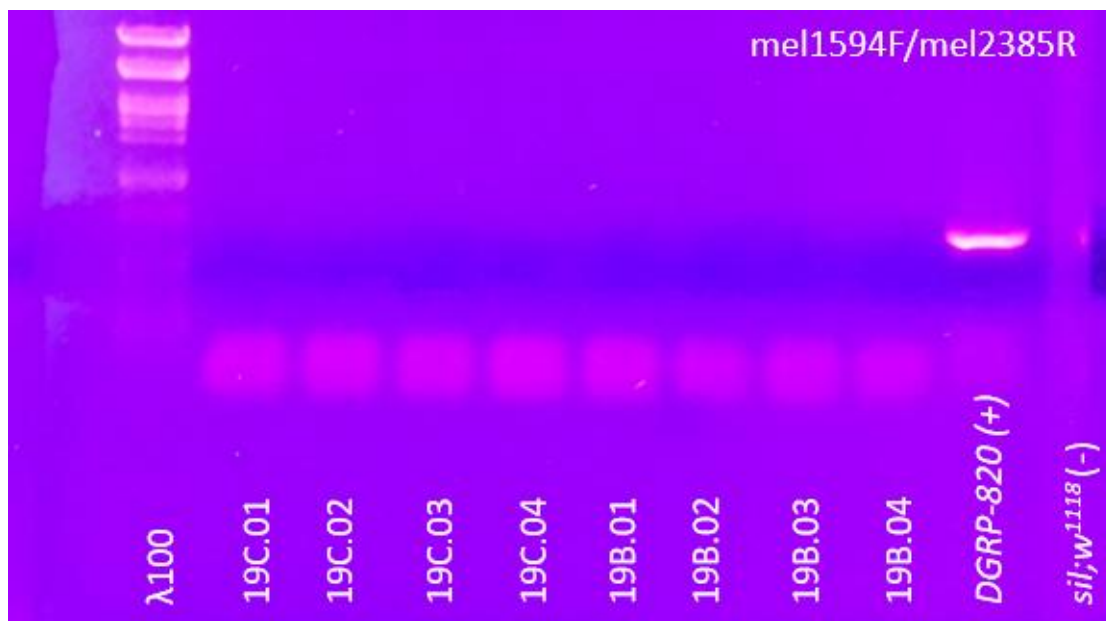
Εικόνα 2. 20: PCR για τον έλεγχο παρουσίας του μιτότυπου *mel* με το ζεύγος εκκινητών *mel10631F/mel11353R* στους ετεροπλάσμικούς απογόνους των διασταυρώσεων της ενότητας 2.7. 19c/m.001-19c/m.005 αρσενικά από τη διασταύρωση *silll;w¹¹⁸ x 820sill*. 19b/m.001-19b/m.005 αρσενικά από τη διασταύρωση *silll;w¹¹⁸ x 820sil*. Ο marker είναι ο λ100 (*PstI* digest). Ως αρνητικοί μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν τα DNA των γραμμών *sil; w¹¹⁸* και *sill; w¹¹⁸*. Ως θετικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε DNA από τη γραμμή *DGRP-820*. Σε όλα τα δείγματα ανιχνεύθηκε το προϊόν που πολλαπλασιάζει το ζεύγος *mel10631F/mel11353R*.

2.9.2 Ανίχνευση ετεροπλάσμιας σε αγονιμοποίητα αυγά των χιμαιρικών γραμμών *820sil* και *820sill*

Σε συνέχεια της προσπάθειας να κατανοήσουμε αν η παρατηρούμενη ετεροπλάσμια ήταν πραγματική ή όχι ήταν απαραίτητο να διευκρινίσουμε αν ο *mel* μιτότυπος μπορούσε να ανιχνευθεί σε καθαρές εξαγωγές mtDNA, δηλαδή που δεν είχαν nDNA. Για αυτό το λόγο, χρησιμοποιήθηκαν αγονιμοποίητα αυγά από τις χιμαιρικές γραμμές *820sil* και *820sill*. Η λογική πίσω από αυτό το πείραμα βασίστηκε σε δύο γεγονότα. Πρώτον, κάθε αγονιμοποίητο αυγό περιέχει μια πολύ μεγάλη ποσότητα mtDNA, η οποία κυμαίνεται από 8 έως 12 εκατομμύρια αντίγραφα, αλλά εξαιρετικά μικρή ποσότητα nDNA. Αυτό πρακτικά σημαίνει ότι μετά από εξαγωγή DNA από αυτά τα αυγά προκύπτει καθαρό mtDNA με ελάχιστη επιμόλυνση από nDNA (Ma and O'Farrell 2015). Έτσι, τα αγονιμοποίητα αυγά είναι το ιδανικό υπόστρωμα προκειμένου να διαπιστωθεί αν ο *mel* μιτότυπος που ανιχνεύεται είναι πράγματι mtDNA ή αν είναι NUMT στο nDNA. Δεύτερον, παρθένα θηλυκά *D. melanogaster* παράγουν ένα μικρό αριθμό αγονιμοποίητων αυγών ανά ημέρα (Wolfner 2002). Δεδομένων των παραπάνω, αν ο *mel* μιτότυπος ανιχνευόταν στα αγονιμοποίητα αυγά, τότε αυτό θα

σήμαινε ότι η ετεροπλασμία ήταν πραγματική, ενώ αν δεν ανιχνευόταν τότε θα σήμαινε την ύπαρξη ενός NUMT.

Σε όλα τα αυγά που ελέγχθηκαν, ανιχνεύθηκε παντού ο *si* μιτότυπος, το οποίο σήμαινε την παρουσία mtDNA στα δείγματα. Αντιθέτως, δεν προέκυψαν ορατές ζώνες PCR προϊόντος με τους εκκινητές για το *X* χρωμόσωμα, το οποίο σήμαινε ότι από τις εξαγωγές προέκυψε καθαρό mtDNA χωρίς ανιχνεύσιμη επιμόλυνση από nDNA. Από τις PCR με τα δύο ζεύγη *mel* εκκινητών, δεν προέκυψε προϊόν σε κανένα από τα 20 δείγματα που εξετάστηκαν (Εικόνα 2. 21). Αν το *mel* προϊόν που ανιχνευόταν στα ετεροπλασμικά άτομα ήταν όντως mtDNA τότε θα έπρεπε να ανιχνεύεται στα αυγά δεδομένης της μεγάλης ποσότητας mtDNA που φέρουν. Η αδυναμία πολλαπλασιασμού στα αυγά, ωστόσο, των *mel* τμημάτων αποτελεί ένδειξη ότι στην πραγματικότητα τα πολλαπλασιαζόμενα *mel* τμήματα στους απογόνους από τις διασταυρώσεις βρίσκονται στο nDNA και όχι στο mtDNA.

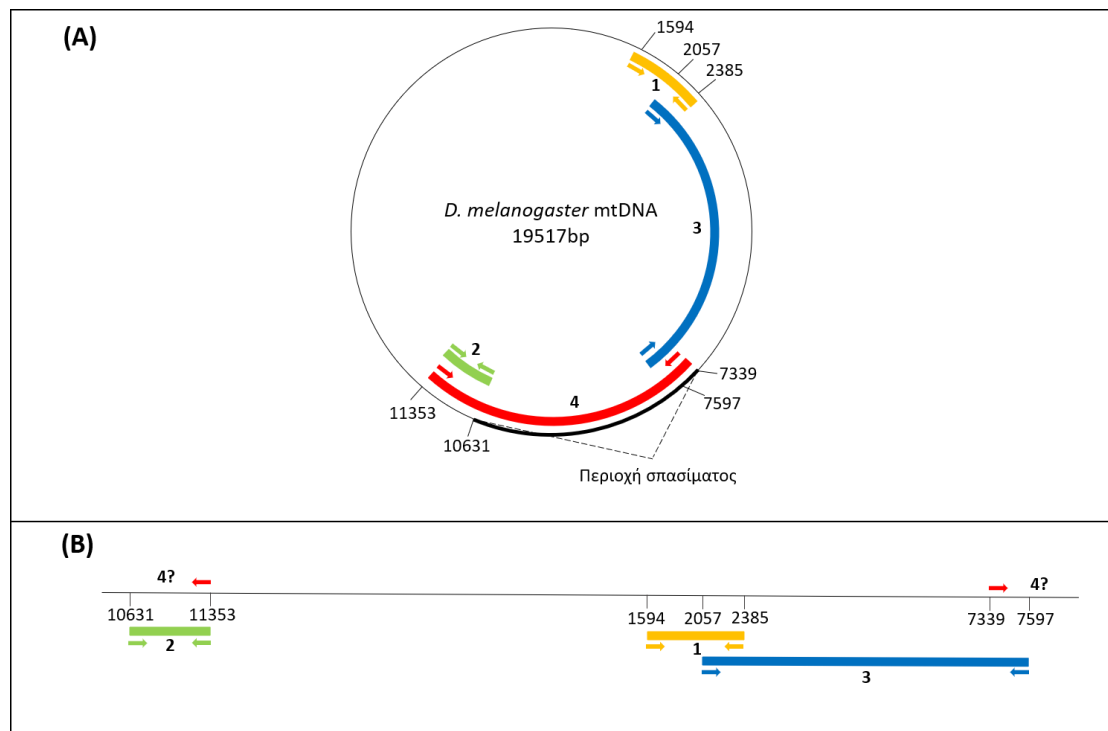


Εικόνα 2. 21: PCR για τον έλεγχο παρουσίας του μιτότυπου *mel* με το ζεύγος εκκινητών *mel1594F/mel2385R* σε αγονιμοποίητα αυγά των χμαιρικών γραμμών *820sil* και *820sill*. 19B.001-19B.005 DNA από αυγά της γραμμής *820sil*. 19C.001-19C.005 DNA από αυγά της γραμμής *820sill*. Ο marker είναι ο λ100 (*PstI* digest). Ως αρνητικοί μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν τα DNA των γραμμών *sil; w¹¹¹⁸* και *sill; w¹¹¹⁸*. Ως θετικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε DNA από τη γραμμή *DGRP-820*. Σε όλα τα δείγματα ανιχνεύθηκε το προϊόν που πολλαπλασιάζει το ζεύγος *mel1594F/mel2385R*.

2.9.3 Δοκιμές long PCR

Προκειμένου να διερευνήσουμε περαιτέρω αν ο *mel* μιτότυπος που ανιχνευόταν ήταν πραγματικά mtDNA ή ήταν NUMT, δηλαδή nDNA, σχεδιάσαμε δοκιμές long PCR εκμεταλλευόμενοι μια βασική διαφορά μεταξύ των δύο τύπων αλληλουχιών. Πιο συγκεκριμένα, το *mel* mtDNA στην περίπτωση της πραγματικής ετεροπλασμίας θα ήταν ένα

κυκλικό μόριο, ενώ στην περίπτωση ύπαρξης NUMT, το μόριο θα ήταν γραμμικό. Με βάση αυτή τη διαφορά, έγιναν δύο long PCR δοκιμές, οι οποίες σχεδιάστηκαν με τέτοιο τρόπο ώστε να ενισχύονται δύο αλληλεπικαλυπτόμενα τμήματα του *mel* μιτότυπου, δηλαδή οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν υβριδοποιούνταν μόνο στο συγκεκριμένο μιτότυπο και όχι στους *si* μιτότυπους. Αν η παρατηρούμενη ετεροπλασμία ήταν πραγματική, τότε θα έπρεπε να είναι δυνατός ο πολλαπλασιασμός και των δύο παραπάνω τμημάτων. Αντιθέτως, αν η παρατηρούμενη ετεροπλασμία ήταν NUMT, τότε δεν θα ήταν δυνατός ο πολλαπλασιασμός του ενός από τα προαναφερόμενα τμήματα γιατί δεν θα ήταν δυνατή η υβριδοποίηση των εκκινητών στη σωστή κατεύθυνση, προκειμένου να πολλαπλασιαστεί το τμήμα (Εικόνα 2.22).

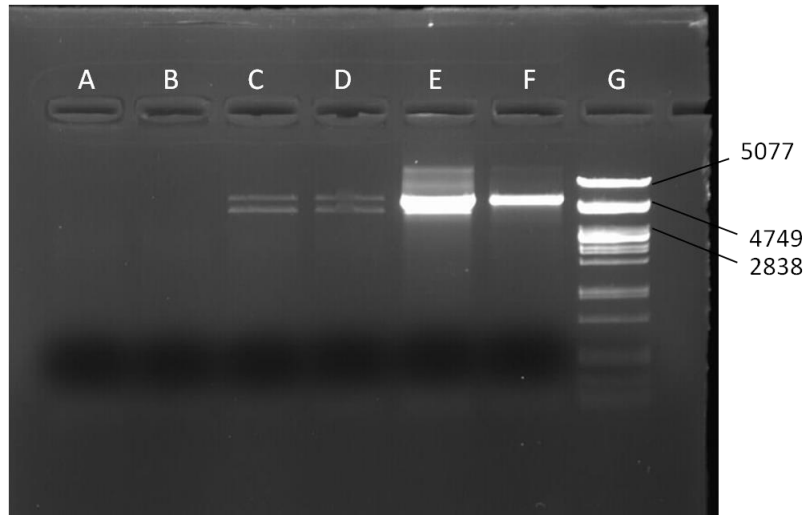


Εικόνα 2. 22: Δοκιμές long PCR σχεδιασμένες για να διακρίνουμε την ύπαρξη NUMT από την πραγματική ετεροπλασμία. (A) Ο κύκλος αναπαριστά το μιτοχονδριακό γονιδίωμα αναφοράς της *D. melanogaster*. Τα βέλη δείχνουν την κατεύθυνση των εκκινητών και τα χρωματισμένα τμήματα μέσα στον κύκλο δείχνουν τα προς πολλαπλασιασμό τμήματα. Οι συντεταγμένες υποδεικνύονται από τα νούμερα. Τα δύο μικρά σε μέγεθος τμήματα (τμήμα 1 *CoxI* από τη θέση 1594 έως τη θέση 2385, μεγέθους 790bp, και τμήμα 2 *Cytb* από τη θέση 10631 έως τη θέση 11353, μεγέθους 722bp) αντιστοιχούν στα τμήματα που χρησιμοποιήθηκαν εξ αρχής για την ανίχνευση της υποτιθέμενης ετεροπλασμίας. Τα δύο μεγάλα σε μέγεθος τμήματα (τμήματα 3 και 4) χρησιμοποιήθηκαν για τη διάκριση μεταξύ ετεροπλασμίας και NUMT. Η έντονη μαύρη γραμμή πάνω στον κύκλο οριοθετεί την περιοχή μέσα στην οποία έχει συμβεί το σπάσιμο. (B) Αναπαράσταση του NUMT όπως αναμένεται να έχει εντεθεί στο πυρηνικό γονιδίωμα. Οι χρωματιστές γραμμές αναπαριστούν τα τμήματα που έχουν πολλαπλασιαστεί και είναι αντίστοιχα με τα τμήματα που αναφέρθηκαν στο Α μέρος της εικόνας. Η κατεύθυνση των εκκινητών του τμήματος 4 υποδεικνύει το λόγο που το τμήμα 7339-11353 δεν πολλαπλασιάζεται στο γραμμικό μόριο. Οι συντεταγμένες των εκκινητών του τμήματος που δεν πολλαπλασιάστηκε χρησιμοποιήθηκαν για την εκτίμηση του μεγέθους του NUMT.

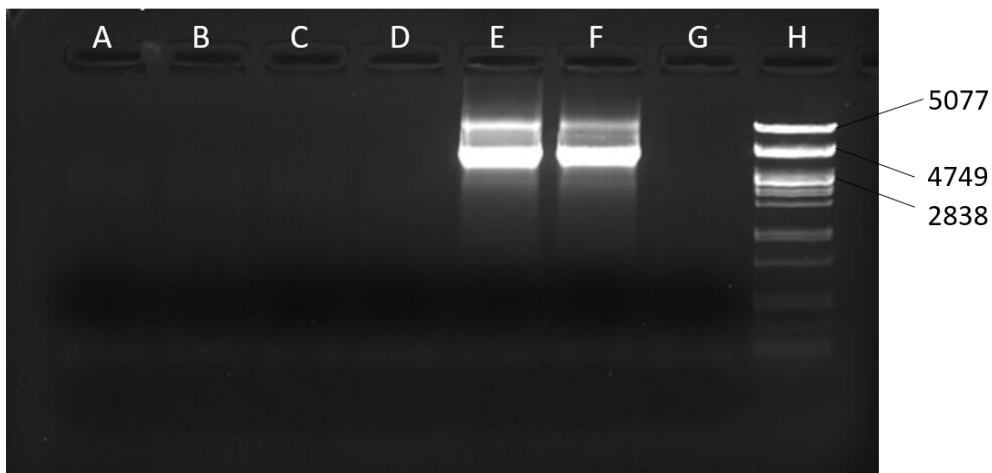
Το πρώτο κομμάτι που επιχειρήσαμε να πολλαπλασιάσουμε με το ζεύγος εκκινητών *mel2057F/7597*- ήταν από τη θέση 2057 έως τη θέση 7597 του *mel* mtDNA, με μέγεθος 5,5kb. Το συγκεκριμένο κομμάτι πολλαπλασιάστηκε στις γραμμές *820sil* και *820sill* (Εικόνα 2. 23). Το δεύτερο κομμάτι που θέλαμε να πολλαπλασιάσουμε με το ζεύγος *7339+/mel11353R* ήταν από τη θέση 7339 έως τη θέση 11353 του *mel* mtDNA, μεγέθους 4kb, και με αλληλεπικάλυψη σε σχέση με το πρώτο σε 258bp. Ενώ ο πολλαπλασιασμός αυτού του κομματιού ήταν επιτυχής για τους θετικούς μάρτυρες, δεν προέκυψαν ορατές ζώνες από τις γραμμές *820sil* και *820sill*, δηλαδή δεν ήταν δυνατή η ενίσχυση του τμήματος του *mel* mtDNA (Εικόνα 2. 24).

Το γεγονός ότι το ένα από τα δύο τμήματα mtDNA δεν πολλαπλασιάστηκε στη long PCR δείχνει ότι η παρατηρούμενη ετεροπλασμία στις χιμαιρικές γραμμές *820sil* και *820sill* οφειλόταν σε ένθεση ενός μεγάλου τμήματος mtDNA στο nDNA της γραμμής *DGRP-820*, και όχι σε πραγματική ετεροπλασμία. Η αδυναμία πολλαπλασιασμού του συγκεκριμένου κομματιού οφειλόταν σε αδυναμία υβριδοποίησης των εκκινητών στη σωστή κατεύθυνση προκειμένου να ξεκινήσει ο πολυμερισμός, λόγω του ότι το κομμάτι δεν ανήκε σε κυκλικό μόριο (mtDNA), αλλά σε γραμμικό (NUMT).

Το παραπάνω αποτέλεσμα υποδεικνύει ότι το σπάσιμο από το οποίο προέκυψε το NUMT έγινε μέσα στην περιοχή που δεν πολλαπλασιάστηκε. Πιο αναλυτικά, σε προηγούμενες PCR είχε ήδη πολλαπλασιαστεί το κομμάτι 10631-11353 με ειδικούς για τον *mel* μιτότυπο εκκινητές, το οποίο αποτελεί μέρος του δεύτερου κομματιού που δεν πολλαπλασιάστηκε με την long PCR, οπότε το σπάσιμο δεν μπορεί να έγινε στο παραπάνω κομμάτι. Συνεπώς, το σπάσιμο πρέπει να έγινε σε ένα τμήμα μεγέθους 3292bp, μεταξύ των θέσεων 7339 και 10631. Δεδομένου ότι το συνολικό μέγεθος του mtDNA στη *D. melanogaster* είναι 19517bp και το σπάσιμο έχει γίνει μέσα στην παραπάνω περιοχή, υπολογίσαμε ότι το μέγεθος του NUMT πρέπει να είναι τουλάχιστον 16225bp. Τέλος, σε συνδυασμό με τα πειράματα χαρτογράφησης που περιγράφηκαν σε προηγούμενες ενότητες, προκύπτει το συμπέρασμα ότι η ένθεση του NUMT έγινε μεταξύ των δεικτών *f* και *mal* του Χ χρωμοσώματος, μια περιοχή μεγέθους 3,15Mb.



Εικόνα 2. 23: Long PCR για το τμήμα 3 του *mel* μιτότυπου με το ζεύγος εκκινητών *mel2057F/7597-*. (A) *sil;w¹¹¹⁸*, (B) *sill;w¹¹¹⁸*, (C) *820sil*, (D) *820sill*, (E) *DGRP-820*, (F) *D. melanogaster Oregon R*, (G) λ100 marker (*PstI* digest). Τα (A) και (B) χρησιμοποιήθηκαν ως αρνητικοί μάρτυρες, ενώ τα (E) και (F) χρησιμοποιήθηκαν ως θετικοί μάρτυρες. Όπως φαίνεται στα (C) και (D), το τμήμα 3 πολλαπλασιάστηκε στις χιμαιρικές γραμμές *820sil* και *820sill*.



Εικόνα 2. 24: Long PCR για το τμήμα 4 του *mel* μιτότυπου με το ζεύγος εκκινητών *7339+/mel11353R*. (A) *sil;w¹¹¹⁸*, (B) *sill;w¹¹¹⁸*, (C) *820sil*, (D) *820sill*, (E) *DGRP-820*, (F) *D. melanogaster Oregon R*, (G) αρνητικός μάρτυρας χωρίς DNA υπόστρωμα, (H) λ100 marker (*PstI* digest). Τα (A) και (B) χρησιμοποιήθηκαν ως αρνητικοί μάρτυρες, ενώ τα (E) και (F) χρησιμοποιήθηκαν ως θετικοί μάρτυρες. Όπως φαίνεται στα (C) και (D), το τμήμα 4 δεν πολλαπλασιάστηκε στις χιμαιρικές γραμμές *820sil* και *820sill*.

2.10 Συζήτηση

Μέχρι πρόσφατα τα NUMTs θεωρούνταν αλληλουχίες μικρού μήκους, με το μέσο μέγεθός τους να κυμαίνεται από 100 έως 300bp (Richly and Leister 2004; Pamilo et al. 2007). Οπότε, για τον αποκλεισμό τους θεωρητικά αρκούσε η ενίσχυση και αλληλούχηση μεγαλύτερων τμημάτων mtDNA, καθώς και η αναζήτηση στα αλληλουχημένα τμήματα για κωδικόνια λήξης και μεταλλαγές αλλαγής πλαισίου (Calvignac et al. 2011). Πριν την έναρξη των πειραμάτων που περιγράφηκαν σε αυτό το κεφάλαιο, είχε αλληλουχηθεί τμήμα του DNA της γραμμής *DGRP-820* μήκους 790bp με τους ειδικούς για το *mel* μιτότυπο εκκινητές *mel1594F/mel2385R*, όπως αναφέρθηκε και στην ενότητα 2.1. Από εκεί είδαμε ότι η αλληλουχία που προέκυψε, ήταν κατά 99,5% όμοια με την αντίστοιχη αλληλουχία της γραμμής *D. melanogaster Canton S*, ενώ οι δύο αλληλουχίες διέφεραν μόνο σε δύο συνώνυμες υποκαταστάσεις. Κατά συνέπεια, κατά την έναρξη των πειραμάτων θεωρούσαμε ότι η πιθανότητα ύπαρξης NUMT στη γραμμή *DGRP-820* είχε αποκλειστεί.

Ωστόσο, λίγο αργότερα ανακαλύφθηκαν NUMTs αρκετά μεγάλα σε μήκος σε νυχτερίδες (Shi et al. 2017), πουλιά (Nacer and Raposo do Amaral 2017), θηλαστικά (Verscheure et al. 2015; Wang et al. 2015a), ακόμα και σε ανθρώπους (Lutz-Bonengel et al. 2021). Το γεγονός αυτό, σε συνδυασμό και με τα αποτελέσματα της παρούσας ενότητας που δείχνουν την ύπαρξη ενός αρκετά μεγάλου NUMT στη *D. melanogaster*, υποδεικνύει ότι το μέγεθος της εκάστοτε αλληλουχίας mtDNA που πολλαπλασιάζεται δεν αρκεί για να διαχωριστεί μια πραγματική μιτοχονδριακή αλληλουχία από ένα NUMT. Επιπρόσθετα, αν η ένθεση του mtDNA στον πυρήνα είναι πρόσφατη, τότε υπάρχει περίπτωση το τμήμα που εντέθηκε να μην έχει γίνει ακόμα ψευδογονίδιο, και έτσι η αλληλουχία να μη φέρει κωδικόνια λήξης και μεταλλαγές αλλαγής πλαισίου, όπως παρατηρήθηκε και στην δική μας περίπτωση.

Όπως είναι αναμενόμενο, τα NUMTs μπορούν να προκαλέσουν αρκετά προβλήματα σε μελέτες κληρονομής και ετεροπλασμίας του mtDNA. Πιο αναλυτικά, μπορεί από τα υπάρχοντα δεδομένα να φαίνεται ότι το mtDNA κληρονομείται αμφιγονεϊκά, δημιουργώντας τη λανθασμένη εντύπωση ότι ένα άτομο φέρει και τον πατρικό μιτότυπο ταυτόχρονα με τον μιτότυπο της μητέρας. Στην πραγματικότητα όμως, τα NUMTs, ως πυρηνικά τμήματα DNA, μεταβιβάζονται και από τους δύο γονείς, συνεπώς είναι πιθανότερο να είναι υπεύθυνα για την παρατηρούμενη ψευδή ετεροπλασμία, όπως άλλωστε

αποδείχθηκε και στην παρούσα μελέτη. Παρόμοιο πρόβλημα αντιμετώπισαν και οι Luo et al. (2018). Εκεί οι ερευνητές ανέφεραν ότι παρατηρήθηκε αμφιγονεϊκή κληρονομία του mtDNA σε τρεις οικογένειες ανθρώπων, ενώ παρείχαν και επιχειρήματα για να δείξουν ότι το παρατηρούμενο πρότυπο κληρονομίας δεν μπορεί να οφείλεται σε παρουσία NUMTs (Luo et al. 2019). Ωστόσο, μερικοί ερευνητές υποστηρίζουν ότι η πιθανότητα τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται να είναι εξαιτίας ύπαρξης NUMTs δεν μπορεί να αποκλειστεί βάσει των δεδομένων που παρέχονται από την αρχική μελέτη, καθώς το παρατηρούμενο πρότυπο αμφιγονεϊκής κληρονομίας του mtDNA θα μπορούσε να οφείλεται και σε μιτοχονδριακές αλληλουχίες που έχουν πρόσφατα ενταχθεί στο πυρηνικό γονιδίωμα (Balciuniene and Balciunas 2019; Vissing 2019; Lutz-Bonengel and Parson 2019). Πράγματι, ανεξάρτητη μελέτη που έγινε σε ανθρώπινα γονιδιώματα επιβεβαίωσε γενικά την ύπαρξη mega-NUMTs που θα μπορούσαν να δίνουν την λανθασμένη εικόνα ύπαρξης αμφιγονεϊκής κληρονομίας του mtDNA (Lutz-Bonengel et al. 2021).

Η συζήτηση περί πραγματικής ετεροπλάσμιας ή ύπαρξης NUMT σε μελέτες κληρονομίας του mtDNA που ξεκίνησε με τη μελέτη των Luo et al. (2018) συνεχίζεται έως και σήμερα και έχει ωθήσει πολλούς ερευνητές να μελετήσουν σε βάθος δεδομένα που σχετίζονται με ετεροπλάσμια, καθώς η παρουσία NUMTs είναι εύκολο να ερμηνευθεί ως αμφιγονεϊκή κληρονομία του mtDNA. Αρχικά, οι Salas et al. (2020), όταν ανέλυσαν τα δεδομένα των Luo et al. (2018), υπολόγισαν ότι η πιθανότητα να ισχύει το σενάριο της αμφιγονεϊκής κληρονομίας είναι μικρότερη από 10^{-37} . Επιπρόσθετα, οι Bai et al. (2021) παρατήρησαν σε τέσσερις ανθρώπινες οικογένειες ότι ετεροπλάσμιοι πατεράδες μεταβίβαζαν στους απογόνους τους μόνο τον ένα τους μιτότυπο, το οποίο είναι ένα αντίστοιχο πρότυπο μεταβίβασης με αυτό που παρατηρήθηκε στην παρούσα μελέτη. Οι ερευνητές κατέληξαν ότι στην περίπτωση που μελετούσαν, το παρατηρούμενο πρότυπο οφείλεται σε ύπαρξη NUMTs στον πυρήνα. Μια άλλη ομάδα ερευνητών παρατήρησε μεταβίβαση mega-NUMTs (NUMTs μεγάλου μεγέθους) από πατεράδες επτά οικογενειών, η οποία θα μπορούσε εσφαλμένα να οδηγήσει στο συμπέρασμα ότι το mtDNA κληρονομείται αμφιγονεϊκά Wei et al. (2020). Τέλος, με αφορμή την υπόθεση των Luo et al. (2018), μια άλλη ομάδα μελέτησε τους μιτοχονδριακούς απλότυπους που απαντώνταν σε 41 παιδιατρικούς ασθενείς και στους γονείς τους (Rius et al. 2019). Κατέληξαν ότι όλοι οι μιτοχονδριακοί απλότυποι που βρέθηκαν στα παιδιά είτε προήλθαν από τη μητέρα είτε προέκυψαν de novo, ενώ αναφέρεται ότι δε βρέθηκε κανένας απλότυπος που να μεταβιβάστηκε από τον πατέρα.

Η παρούσα μελέτη στη *D. melanogaster* συνεισφέρει στην παραπάνω συζήτηση που αφορά τους ανθρώπους. Όλες οι παραπάνω μελέτες αναδεικνύουν το γεγονός ότι πρόσφατες μετακινήσεις του mtDNA στον πυρήνα είναι περισσότερο συχνές από ότι πιστευόταν έως πρόσφατα. Το σημαντικότερο συμπέρασμα που προκύπτει από όλες τις παραπάνω μελέτες, συμπεριλαμβανομένης και της παρούσας, είναι ότι ενώ το σενάριο της αμφιγονεϊκής κληρονομιάς του mtDNA δεν μπορεί να αποκλειστεί εντελώς, πρώτα πρέπει να αποκλείεται η πιθανότητα ύπαρξης NUMTs, τα οποία μιμούνται την αμφιγονεϊκή κληρονομιά, προκειμένου να εξασφαλιστεί ότι η παρατηρούμενη ετεροπλασμία και η αμφιγονεϊκή κληρονομιά του mtDNA σε κάθε περίπτωση είναι πραγματική. Παραδείγματος χάριν, έχει περιγραφεί περίπτωση πραγματικής αμφιγονεϊκής κληρονομιάς (και όχι διαρροής πατρικού mtDNA), η οποία παρατηρήθηκε στο είδος *D. paulistorum* (C. Baião et al. 2021). Πιο συγκεκριμένα, οι ερευνητές παρατήρησαν τη σταθερή κληρονομιά ενός εγωιστικού μιτότυπου και από τους δύο γονείς, ενώ έλεγξαν ενδελεχώς και παρέιχαν αρκετά στοιχεία για να δείξουν ότι οι παρατηρήσεις τους δεν οφείλονταν σε ύπαρξη NUMT.

Όσον αφορά τη *D. melanogaster*, έχουν βρεθεί εννιά μοναδικά NUMTs (που δεν αφορούν δηλαδή τις ίδιες μιτοχονδριακές αλληλουχίες) στο πυρηνικό γονιδίωμα, τα οποία κυμαίνονται σε μέγεθος από 19bp έως 371bp (Rogers and Griffiths-Jones 2012; Bevers et al. 2019). Με εξαίρεση το είδος *D. simulans*, όλα τα άλλα είδη του γένους *Drosophila* έχουν περισσότερα και, κατά μέσο όρο, μεγαλύτερα NUMTs. Το μεγαλύτερο σε μήκος NUMT που έχει βρεθεί στο γένος είναι στο είδος *D. mojavensis*, το οποίο ξεπερνά σε μέγεθος τα 3kb (Rogers and Griffiths-Jones 2012). Το συνολικό μήκος των διαφορετικών NUMTs στο πυρηνικό γονιδίωμα της *D. melanogaster* έχει υπολογιστεί περίπου στα 10,3kb (Hazkani-Covo et al. 2010), κυρίως επειδή τα NUMTs μπορούν να πολλαπλασιαστούν μετά την εισχώρησή τους στο γονιδίωμα (Richly and Leister 2004). Το μέγεθος του NUMT που αναφέρουμε στην παρούσα μελέτη είναι μεγαλύτερο από 16,2kb, το οποίο κατά περισσότερο από πέντε φορές μεγαλύτερο από το μεγαλύτερο NUMT που έχει περιγραφεί στο γένος, ενώ καλύπτει σχεδόν όλο το μιτοχονδριακό γονιδίωμα που έχει μήκος 19517bp (Lewis et al. 1995). Η εκτίμηση αυτή αφορά αλληλουχία σε ένα αντίγραφο. Δεν μπορούμε να αποκλείσουμε την πιθανότητα το NUMT που περιγράφεται στην παρούσα μελέτη να έχει διπλασιαστεί μετά την είσοδό του στο nDNA, σχηματίζοντας ένα mega-NUMT, όπως έχει προταθεί και από τους Balciuniene and Balciunas (2019). Επιπλέον, με βάση τις

παρατηρήσεις μας, ο αναφερόμενος στη βιβλιογραφία ρυθμός εισδοχής μιτοχονδριακών αλληλουχιών στον πυρήνα, ο οποίος έχει υπολογιστεί ότι είναι 0,12 ανά ένα εκατομμύριο χρόνια (Rogers and Griffiths-Jones 2012), πρέπει να επανεξεταστεί. Τέλος, καταλήξαμε στο συμπέρασμα ότι το NUMT που περιγράφουμε στην παρούσα μελέτη έχει εισαχθεί σχετικά πρόσφατα στο πυρηνικό γονιδίωμα, πρώτον επειδή βρέθηκε μόνο σε μία από τις δώδεκα χμαιρικές γραμμές που κατασκευάστηκαν από τους Mossman et al. (2016), και δεύτερον επειδή η διαφορά μεταξύ της αλληλουχίας του NUMT και του mtDNA ήταν αμελητέα.

Μια πρόσφατη μελέτη αναζήτησε νέα, άγνωστα NUMTs σε αλληλουχημένα γονιδιώματα *D. melanogaster* της ομάδας *DGRP* (Mackay et al. 2012), χρησιμοποιώντας μια βιοπληροφορική προσέγγιση (Bever et al. 2019). Η μέθοδός τους αποκάλυψε συνολικά την ύπαρξη έξι NUMTs σε όλα τα *DGRP* γονιδιώματα που μελετήθηκαν. Από αυτά, τα δύο ήταν ήδη γνωστά (Rogers and Griffiths-Jones 2012), ενώ τα άλλα τέσσερα περιγράφονταν για πρώτη φορά. Είναι ενδιαφέρον το γεγονός ότι η παραπάνω μέθοδος δεν κατάφερε να ανιχνεύσει τρία άλλα ήδη γνωστά NUMTs, όπως επίσης και αυτό που αναφέρεται στην παρούσα μελέτη. Αυτό μπορεί να οφείλεται στη διαδικασία που εφαρμόστηκε, που αναγνωρίζει χμαιρικές αλληλουχίες στα σημεία εισαγωγής του μετατοπισμένου mtDNA. Συγκεκριμένα, οι ερευνητές αναφέρουν ότι τέτοιες αλληλουχίες κατηγοριοποιούνται από διάφορες χαρτογραφικές μεθόδους ως αχαρτογράφητες (unmapped), εξαιτίας αδυναμίας αντιστοίχισης με παρόμοιες αλληλουχίες στο γονιδίωμα αναφοράς (Bever et al. 2019). Συνεπώς, αναδεικνύεται η δυσκολία ανίχνευσης νέων NUMT ακόμα και με βιοπληροφορικές μεθόδους σχεδιασμένες για να τα εντοπίζουν. Στη δική μας περίπτωση, η δυσκολία να καταλήξουμε στην ύπαρξη NUMT στη χμαιρική γραμμή *DGRP-820* σχετιζόταν με το επίπεδο ομοιότητας μεταξύ της αλληλουχίας του NUMT και του mtDNA. Ο χαρακτηρισμός αυτού του νέου NUMT που περιγράφεται κατέστη δυνατός μόνο εξαιτίας της αντικατάστασης του mtDNA της γραμμής *DGRP-820* με το mtDNA της *D. simulans*. Το NUMT που περιγράφεται εδώ μπορεί να χαρακτηριστεί ως πολυμορφικό, καθώς έχει βρεθεί προς το παρόν σε μία μόνο γραμμή *D. melanogaster*. Τέτοιου είδους πολυμορφικά NUMTs έχουν περιγραφεί και σε άλλα είδη, όπως οι νυχτερίδες (Zhang et al. 2021a), τα άλογα (Nergadze et al. 2010), τα γουρούνια (Schiavo et al. 2017), αλλά και στον άνθρωπο (Lang et al. 2012; Dayama et al. 2014).

3 Μέθοδος ανίχνευσης NUMT με χρήση δεδομένων αλληλούχησης

3.1 Σκοπός

Κατά τη διάρκεια της μελέτης της υποτιθέμενης ετεροπλασμίας στις χιμαιρικές γραμμές *DGRP-820*, ήταν σημαντικό να διευκρινιστεί αν η παρατηρούμενη ετεροπλασμία, και συγκεκριμένα αν η παρουσία του μιτότυπου *mel*, ήταν πραγματική ή αν οφειλόταν σε παρουσία NUMT στο nDNA της *DGRP-820*. Κατά την παραπάνω διερεύνηση, και εκτός των πειραμάτων που παρουσιάστηκαν στην προηγούμενη ενότητα, που τελικά έδειξαν την παρουσία ενός μεγάλου μεγέθους NUMT στη γραμμή *DGRP-820*, έγινε προσπάθεια προσέγγισης του προβλήματος και με διάφορες άλλες τεχνικές.

Όπως έγινε φανερό από την προηγούμενη ενότητα, η συλλογή πειραματικών στοιχείων υπέρ ή κατά της ύπαρξης ήταν αρκετά δύσκολη και χρονοβόρα. Συνεπώς, κατά τη διάρκεια των πειραμάτων αυτών, έγινε απόπειρα επίλυσης του ζητήματος αυτού με μια βιοπληροφορική προσέγγιση. Το γονιδίωμα της γραμμής *DGRP-820* είναι αλληλουχημένο και κατατεθειμένο σε διαδικτυακή βάση δεδομένων. Τη χρονική περίοδο ανάπτυξης του συγκεκριμένου βιοπληροφορικού εργαλείου υπήρχαν δύο βασικά πειραματικά ευρήματα που εκμεταλλευτήκαμε για τους σκοπούς της βιοπληροφορικής ανάλυσης. Το πρώτο ήταν ότι αν όντως η ανίχνευση του *mel* μιτότυπου οφειλόταν σε NUMT, τότε με βάση τα πειράματα κλασικής γενετικής χαρτογράφησης αυτό θα έπρεπε να βρίσκεται μεταξύ των φαινοτυπικών δεικτών *forked (f)* και *maroon-like (mal^{b2})*, που εδράζονται στο Χ χρωμόσωμα, καθώς οι γραμμές που φέρουν την περιοχή αυτή της γραμμής *DGRP-820* φέρουν και το μιτότυπο *mel*. Το δεύτερο εύρημα ήταν ότι είχαν ενισχυθεί δύο μικρά τμήματα του *mel* μιτότυπου, με συντεταγμένες 1594-2385 και 10631-11353. Συνεπώς τα άκρα της ένθεσης θα μπορούσαν να είναι οπουδήποτε πάνω στο mtDNA, εκτός των παραπάνω περιοχών, διαφορετικά θα ήταν αδύνατο να ενισχυθούν με PCR. Τα παραπάνω αποτελέσματα χρησιμοποιήθηκαν ως κριτήρια για το σχεδιασμό μιας βιοπληροφορικής μεθόδου που θα ανίχνευε μία νέα, μη χαρακτηρισμένη ένθεση NUMT στο πυρηνικό γονιδίωμα, και συγκεκριμένα στο Χ χρωμόσωμα της γραμμής *DGRP-820*. Η ανάλυση αυτή φιλοδοξούσε να αποτελέσει τη βάση για την ανίχνευση παρόμοιων NUMTs σε αλληλουχημένα γονιδιώματα. Η ανάλυση που παρουσιάζεται στην παρούσα ενότητα πραγματοποιήθηκε σε συνεργασία

με τον ερευνητή Παύλο Παυλίδη (Ερευνητής, Ινστιτούτο Πληροφορικής, Ίδρυμα Τεχνολογίας και Έρευνας).

3.2 Θεωρητικό υπόβαθρο

Οι μέθοδοι αλληλούχησης νέας γενιάς, όπως είναι η τεχνολογία Illumina, παράγουν αναγνώσματα (reads) μικρού μεγέθους (από 100-500 βάσεις). Η διαδικασία στοίχισης αυτών των αναγνωσμάτων (reads) σε γονιδίωμα αναφοράς τα διακρίνει σε τρεις κατηγορίες. Η πρώτη κατηγορία περιλαμβάνει αναγνώσματα που χαρτογραφούνται πολλές φορές πάνω στο γονιδίωμα. Αυτό συμβαίνει, κυρίως, εξαιτίας παρουσίας επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών στο γονιδίωμα. Η δεύτερη κατηγορία είναι αναγνώσματα που αποτελούν επιμόλυνση από βακτήρια ή ιούς που αλληλουχήθηκαν ταυτόχρονα με τον υπό μελέτη οργανισμό. Αυτά τα αναγνώσματα είναι αδύνατο να χαρτογραφηθούν, αφού κατά τη στοίχιση χρησιμοποιείται μόνο το γονιδίωμα αναφοράς του υπό μελέτη είδους. Η τρίτη κατηγορία είναι αναγνώσματα που αποτυγχάνουν να στοιχηθούν σωστά στο γονιδίωμα αναφοράς. Η αδυναμία στοίχισης οφείλεται είτε σε τεχνικά σφάλματα της διαδικασίας αλληλούχησης, είτε σε μεγάλη διαφοροποίηση των αναγνωσμάτων σε σχέση με το γονιδίωμα αναφοράς (Sangiovanni et al. 2019).

Αν έχει συμβεί κάποια ένθεση NUMT στο nDNA της γραμμής *DGRP-820*, τότε αναμένεται να υπάρχουν στα δεδομένα αλληλούχησης του γονιδιώματος κάποια αναγνώσματα που να αντιστοιχούν στις περιοχές της ένωσης του πυρηνικού DNA με το μιτοχονδριακό DNA (junctions). Ένα τμήμα αυτών των αναγνωσμάτων θα πρέπει να χαρτογραφείται στο πυρηνικό γονιδίωμα, ενώ το υπόλοιπο τμήμα τους θα πρέπει να χαρτογραφείται στο μιτοχονδριακό γονιδίωμα. Τα αναγνώσματα αυτά που χαρτογραφούνται σε παραπάνω από μία αλληλουχίες του γονιδιώματος αναφοράς ορίζονται ως χιμαιρικά (Fonseca et al. 2012). Η πλειοψηφία τέτοιων χιμαιρικών αναγνωσμάτων ανήκουν στην τρίτη κατηγορία αναγνωσμάτων, που περιγράφηκαν παραπάνω, και αποκλείονται κατά τη διαδικασία χαρτογράφησης με χρήση γονιδιώματος αναφοράς, καθώς θεωρούνται παραπροϊόν της διαδικασίας αλληλούχησης. Ωστόσο, τα αναγνώσματα αυτά μπορεί να φέρουν πληροφορίες για ενθέσεις αλληλουχιών που έχουν συμβεί στο υπό μελέτη γονιδίωμα. Ενδεχόμενες νέες ενθέσεις που έχουν γίνει στο πυρηνικό γονιδίωμα δεν υπάρχουν στο γονιδίωμα αναφοράς και, άρα, τα χιμαιρικά αναγνώσματα διαφέρουν σε μεγάλο βαθμό με αυτό. Έτσι, τα

αναγνώσματα που αντιστοιχούν σε τέτοια σημεία ένωσης είναι πιθανότερο να σημαίνονται από τα εκάστοτε εργαλεία στοίχισης ως αχαρτογράφητα (unmapped).

Παρά την πληροφορία που μπορεί να κρύβουν τα αχαρτογράφητα αναγνώσματα, δεν αποτελούν συχνά αντικείμενο μελέτης. Ωστόσο, έχουν χρησιμοποιηθεί σε μερικές περιπτώσεις, καθώς η ανάλυσή τους μπορεί να αποκαλύψει σημαντικές πληροφορίες για τα υπό μελέτη γονιδιώματα (Liu et al. 2014; Whitacre et al. 2015; Faber-Hammond and Brown 2016b, a). Για παράδειγμα, μέσω χρήσης αχαρτογράφητων αναγνωσμάτων έχουν ανιχνευθεί τμήματα γονιδιωμάτων παθογόνων ιών (Mwesigwa et al. 2021; Gurgul et al. 2022), ενώ τονίζεται η αξία χρήσης τους για την ανακάλυψη νέων και άγνωστων ιών (Lambert et al. 2018). Επιπλέον, μέσω αυτών των αναγνωσμάτων έχει γίνει δυνατή και η χαρτογράφηση άγνωστων περιοχών και πολυμορφισμών στο εκάστοτε γονιδίωμα μελέτης (Faber-Hammond and Brown 2016b; Holden et al. 2018).

Στο παρελθόν, άλλες ομάδες έχουν ερευνήσει τις μετατοπίσεις που έχουν συμβεί στο γονιδίωμα των γραμμών *DGRP* (Huang et al. 2014), ενώ έχει γίνει και πιο στοχευμένη αναζήτηση νέων NUMTs σε αυτές (Bever et al. 2019). Παρ' όλα αυτά και στις δύο περιπτώσεις δεν υπάρχει αναφορά για NUMT με τα χαρακτηριστικά που περιγράφηκαν παραπάνω. Στην παρούσα ενότητα γίνεται προσπάθεια ανίχνευσης ενός NUMT στη γραμμή *DGRP-820* μέσω βιοπληροφορικής αναζήτησης χιμαιρικών αναγνωσμάτων που αντιστοιχούν στα άκρα του NUMT, χρησιμοποιώντας εξειδικευμένα φίλτρα, έτσι ώστε διαπιστώσουμε αν υπάρχει κάποιο NUMT στην περιοχή μελέτης που ορίζουν οι φαινοτυπικοί δείκτες *f* και *mal*.

3.3 Διαδικασία

Τα δεδομένα αλληλούχησης για τη γραμμή *DGRP-820* βρίσκονται κατατεθειμένα στη βάση ENA του EMBL-EBI, με κωδικό τρεξίματος SRR933598 ([https://www.ncbi.nlm.nih.gov/sra/SRX006174\[accn\]](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/sra/SRX006174[accn])). Το σετ δεδομένων είναι αποθηκευμένο σε μορφή fastq και αποτελείται από περίπου 37 εκατομμύρια αναγνώσματα μεγέθους 75bp, οι οποίες παράχθηκαν από Illumina paired-end αλληλούχηση (Mackay et al. 2012), και συγκεκριμένα από την πλατφόρμα Illumina's Genome Analyzer Ix system. Σε γενικές γραμμές, η στρατηγική που ακολουθήθηκε βασίστηκε στον αλγόριθμο BLAST (Camacho et al. 2009), ο οποίος συγκρίνει και αναφέρει όλες τις ομοιότητες που υπάρχουν σε μια σειρά από νουκλεοτίδια μεταξύ ενός ή περισσότερων αναγνωσμάτων (query) και μιας

βάσης δεδομένων (database). Η βάση δεδομένων μπορεί να αποτελείται είτε από ένα ολόκληρο γονιδίωμα αναφοράς, είτε από ένα μέρος αυτού.

Στην παρούσα περίπτωση, εφόσον θέλαμε να εντοπίσουμε χιμαιρικά αναγνώσματα, στα οποία το ένα άκρο χαρτογραφείται στο *X* χρωμόσωμα και το άλλο άκρο χαρτογραφείται στο mtDNA, χρησιμοποιήσαμε ως μια πρώτη βάση δεδομένων την αλληλουχία του *X* χρωμοσώματος που βρίσκεται ανάμεσα στους φαινοτυπικούς δείκτες *f* και *mal* (περιοχή μεταξύ των βάσεων 17280964 και 20429675) και ως μια δεύτερη βάση δεδομένων ολόκληρη την αλληλουχία του mtDNA. Ως υποψήφια για χιμαιρικήτητα αναγνώσματα δε χρησιμοποιήθηκαν όλα από το σετ δεδομένων της γραμμής *DGRP-820*, αλλά μόνο εκείνα που δεν χαρτογραφούνταν στο γονιδίωμα αναφοράς, καθώς όσα αναγνώσματα χαρτογραφούνταν επιτυχώς σε κάποιο σημείο του γονιδιώματος αναφοράς, δεν ήταν δυνατό να είναι χιμαιρικά.

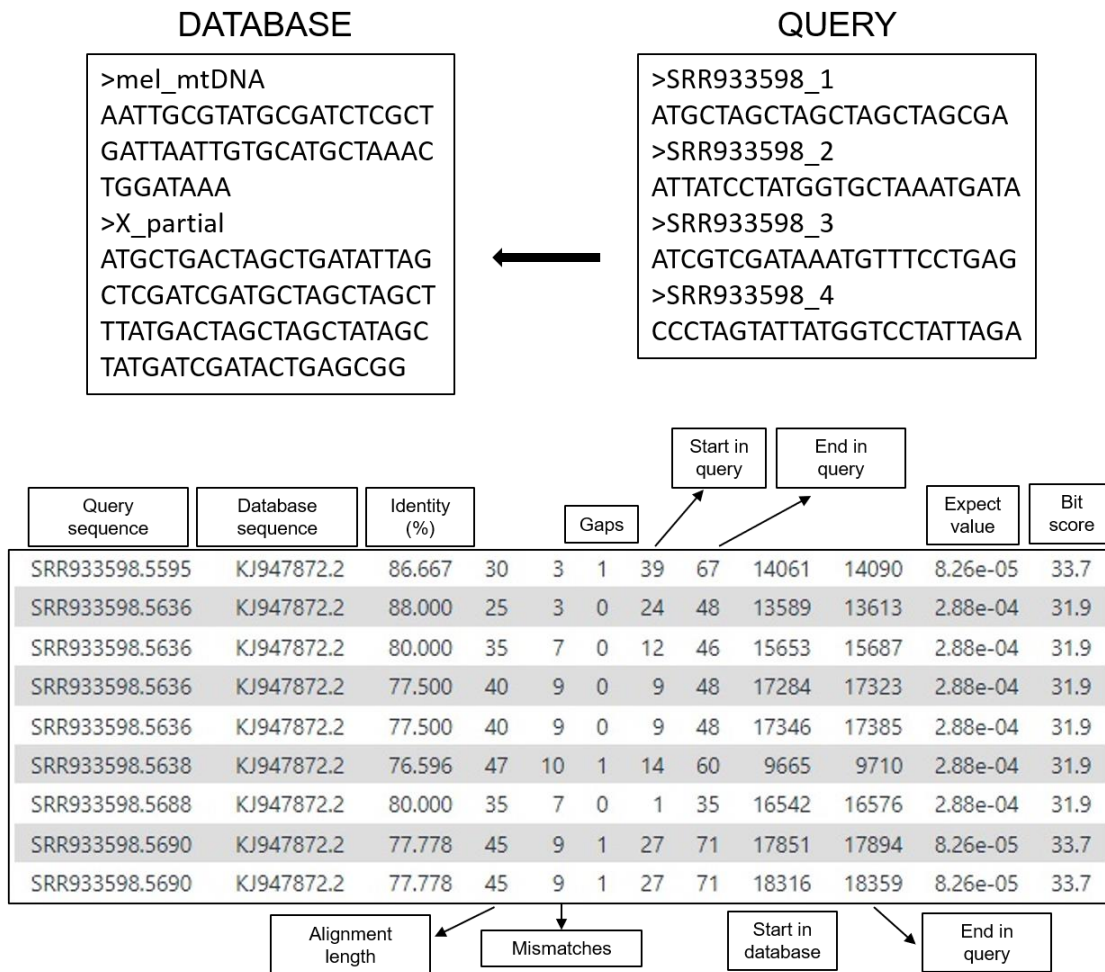
Τα αποτελέσματα που προκύπτουν από το BLAST (hits) περιλαμβάνουν μια σειρά πληροφοριών όπως το όνομα του αναγνώσματος, τις συντεταγμένες του αναγνώσματος στη βάση δεδομένων, καθώς και τον αριθμό των βάσεων του αναγνώσματος που βρέθηκε να είναι όμοιος με την αλληλουχία της βάσης δεδομένων (Εικόνα 3. 1). Αυτές οι πληροφορίες χρησιμοποιούνταν για να φιλτραριστούν τα αποτελέσματα, προκειμένου να ικανοποιούνται κάποιες προϋποθέσεις που πρέπει να πληρούν τα χιμαιρικά αναγνώσματα που αναζητούνταν, προκειμένου να περιγράψουν το NUMT που αναζητούσαμε (Εικόνα 3. 2). Οι προϋποθέσεις που ελέγχονταν είναι οι παρακάτω:

- τμήμα του αναγνώσματος να εντοπίζεται και στις δύο αλληλουχίες της βάσης δεδομένων, δηλαδή και στο *X* χρωμόσωμα και στο mtDNA.
- τα αναγνώσματα που αντιστοιχούν στο σημείο εισαγωγής του NUMT πρέπει να παραμένουν αχαρτογράφητα, εφόσον το NUMT δεν υπάρχει στο γονιδίωμα αναφοράς. Ωστόσο, τα αναγνώσματα που αντιστοιχούν στην άλλη κατεύθυνση (*mate*) πρέπει να είναι χαρτογραφημένα είτε στο *X* χρωμόσωμα είτε στο mtDNA, ανάλογα για το αν πρόκειται για το αριστερό ή για το δεξί άκρο του NUMT.
- οι συντεταγμένες των αναγνωσμάτων στο mtDNA πρέπει να είναι εκτός των περιοχών που έχουμε ενισχύσει με PCR (1594-2385, 10631-11353), καθώς αν τα άκρα του NUMT βρίσκονταν μέσα σε αυτά τα τμήματα, τότε ο ένας από τους δύο εκκινητές του εκάστοτε ζεύγους δεν θα μπορούσε να υβριδιστεί και συνεπώς δε θα προέκυπτε προϊόν.

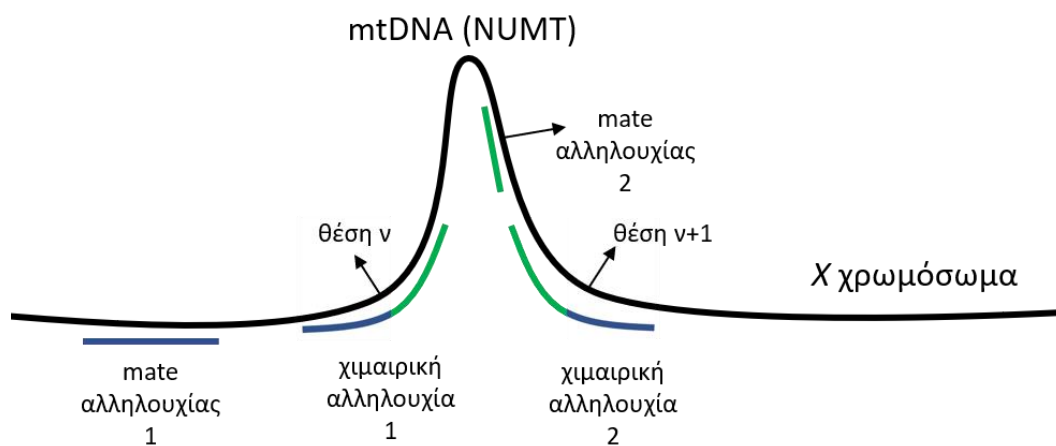
- η αρχή του αναγνώσματος να εντοπίζεται στο X χρωμόσωμα (αριστερό άκρο του NUMT) και το τέλος του αναγνώσματος να εντοπίζεται στο mtDNA (δεξί άκρο του NUMT), ή αντίστροφα. Μάλιστα, το τμήμα που εντοπίζεται στο mtDNA πρέπει να ξεκινάει ακριβώς μετά την τελευταία βάση που εντοπίζεται στο X χρωμόσωμα, ή αντίστροφα.
- και τα δύο άκρα του NUMT πρέπει να εμφανίζουν συγκεκριμένες συντεταγμένες πάνω στο πυρηνικό γονιδίωμα, καθώς το NUMT αντιπροσωπεύει ένα σπάσιμο που έχει γίνει στο X χρωμόσωμα και μέσα στο οποίο έχει γίνει η ένθεση του τμήματος mtDNA. Δηλαδή, αν το σπάσιμο για την ένθεση του NUMT έγινε στη βάση n του πυρηνικού γονιδιώματος, τότε το τμήμα του αναγνώσματος του αριστερού άκρου πρέπει να εμφανίζει τη θέση n , ενώ το τμήμα του αναγνώσματος του δεξιού άκρου πρέπει να εμφανίζει τη θέση $n+1$ στο πυρηνικό γονιδίωμα, αντίστοιχα. Συνεπώς, το σπάσιμο πρέπει να αντιπροσωπεύεται από ένα ζεύγος αναγνωσμάτων, με τις θέσεις n και $n+1$.

Πριν την εφαρμογή των παραπάνω, έπρεπε να καθοριστεί ποια από τα αναγνώσματα του σετ δεδομένων της γραμμής *DGRP-820* δεν χαρτογραφούνταν σε καμία περιοχή του γονιδιώματος αναφοράς και ποιες χαρτογραφούνταν στο mtDNA και στην περιοχή του X χρωμοσώματος που ορίζεται από τους δείκτες *f* και *mal*. Για το λόγο αυτό έγινε χαρτογράφηση των αναγνωσμάτων στην έκδοση γονιδιώματος αναφοράς για τη *D. melanogaster* dm3 (BDGP Release 5) με το εργαλείο στοίχισης BWA, έκδοσης v.0.7.17 (Li 2013). Πριν τη στοίχιση, έγινε έλεγχος της ποιότητας των αναγνωσμάτων με το εργαλείο *usearch* (v.11) (Edgar and Flyvbjerg 2015), όπου η παράμετρος *E* (αναμενόμενος αριθμός σφαλμάτων) ρυθμίστηκε στο 1,5 για να επιτρέπονται αναγνώσματα με μέγιστο αριθμό λαθών δύο με τρία. Μετά τη στοίχιση, τα διπλά αναγνώσματα (duplicate reads) αφαιρέθηκαν με την επιλογή *MarkDuplicates* της σουίτας εργαλείων *Picard* (v.1.96) (Wysokar et al. 2014).

Τα δεδομένα της στοίχισης εξάγονταν σε αρχείο *bam*. Από εκεί και πέρα, χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό *SAMtools* (v.1.3.1) (Li et al. 2009), με σκοπό την ανάκτηση των αναγνωσμάτων που χαρτογραφούνταν στο υπό μελέτη τμήμα του X χρωμοσώματος και στο mtDNA, καθώς και των αχαρτογράφητων αναγνωσμάτων σε ξεχωριστά αρχεία μορφής *fasta*. Στη συνέχεια, εφαρμόστηκε ο αλγόριθμος *BLAST* όπως περιγράφηκε παραπάνω και τα *hits* που προέκυψαν φιλτραρίστηκαν με βάση τις παραμέτρους που περιγράφηκαν.



Εικόνα 3. 1: Εφαρμογή αλγόριθμου BLAST για την εύρεση ομοιοτήτων μεταξύ των αλληλουχιών του σετ δεδομένων της γραμμής *DGRP-820* (query) στο τμήμα του *X* χρωμοσώματος μεταξύ των δεικτών *f* και *mal* και στο mtDNA (database). Τα αποτελέσματα εξάγονται σε πίνακα, με πληροφορίες όπως ο αριθμός των ομοιοτήτων και οι συντεταγμένες της ομοιότητας των αλληλουχιών στις αλληλουχίες της βάσης δεδομένων.



Εικόνα 3. 2: Αναπαράσταση της ένθεσης NUMT και του τρόπου που στοιχίζονται οι χμαιρικές αλληλουχίες στην αλληλουχία της βάσης δεδομένων, αλλά και του τρόπου που στοιχίζονται οι αλληλουχίες mate των χμαιρικών αλληλουχιών.

Για τον έλεγχο της αποτελεσματικότητας της παραπάνω διαδικασίας, ήταν απαραίτητη η χρήση και ενός θετικού μάρτυρα. Για το λόγο αυτό, κατασκευάστηκαν δέκα αναγνώσματα μήκους 75bp, όσο είναι και το μήκος των αναγνωσμάτων του υπό μελέτη σετ δεδομένων. Από αυτά, τα μισά είχαν ομολογία κατά 50% με το mtDNA και κατά 50% με το nDNA, ενώ τα άλλα μισά είχαν αντίστροφη ομολογία, ώστε να αντιπροσωπεύονται και τα δύο άκρα του NUMT. Τα αναγνώσματα αφορούσαν ένθεση σε συγκεκριμένο σημείο του X χρωμοσώματος και, συγκεκριμένα, το αριστερό άκρο του υποθετικού NUMT βρισκόταν μετά τη θέση 20000000 του X χρωμοσώματος, ενώ το δεξιό άκρο του NUMT βρισκόταν πριν τη θέση 20000001 του X χρωμοσώματος. Η αλληλουχία που χρησιμοποιήθηκε για το mtDNA ήταν τμήμα του γονιδίου *CoxI*. Στα αναγνώσματα αυτά εφαρμόστηκαν τα ίδια φίλτρα που περιγράφηκαν παραπάνω και ελέγχθηκε αν ανιχνεύονται από τη διαδικασία ως πιθανά χμαιρικά αναγνώσματα που αντιστοιχούν σε NUMT.

3.4 Αποτελέσματα και συζήτηση

Από τη διαδικασία της στοίχισης στο γονιδίωμα αναφοράς υπήρχαν 5119412 αναγνώσματα που σημάνθηκαν ως αχαρτογράφητα από το εργαλείο στοίχισης. Τα hits που προέκυψαν μετά την εφαρμογή του αλγόριθμου BLAST σε αυτά τα αναγνώσματα ήταν της τάξης των μερικών εκατοντάδων χιλιάδων. Μετά την εφαρμογή των τριών πρώτων φίλτρων, τα αχαρτογράφητα αναγνώσματα που τμήμα τους βρισκόταν και στο X χρωμόσωμα και στο mtDNA (εκτός των περιοχών που είχαν ενισχυθεί με PCR), αλλά και που είχαν mate ανάγνωσμα είτε στο X χρωμόσωμα είτε στο mtDNA ήταν συνολικά 588.

Σε αυτά τα αναγνώσματα αναζητήθηκαν εκείνα που πληρούσαν τα δύο τελευταία κριτήρια που είχαν τεθεί σε σχέση με τη θέση της ένθεσης στο X χρωμόσωμα, αλλά και σε σχέση με τις ομοιότητες που είχε το κάθε ανάγνωσμα με τις δύο αλληλουχίες της βάσης δεδομένων. Από αυτό το σημείο και κάτω, το περαιτέρω φιλτράρισμα των αναγνωσμάτων και η επιλογή αυτών που θα μπορούσαν να αντιστοιχούν σε κάποια αλληλουχία NUMT ήταν ιδιαίτερα δύσκολη. Αρχικά, εφαρμόστηκε το κριτήριο που απαιτούσε ένα τμήμα του αναγνώματος να βρίσκεται στο X χρωμόσωμα και όλο το υπόλοιπο να βρίσκεται στο mtDNA. Στη συνέχεια εφαρμόστηκε το κριτήριο που σχετιζόταν με το σημείο ένθεσης στο X χρωμόσωμα. Από αυτό το κριτήριο προέκυψαν αρκετές θέσεις *n*, οποίες θα μπορούσαν να αποτελούν το ένα άκρο του NUMT, καθώς βρέθηκαν ως κοινό χαρακτηριστικό μεταξύ μερικών αναγνωσμάτων. Ωστόσο, σε καμία περίπτωση δε βρέθηκε σε κάποιο ανάγνωσμα η

θέση n+1 που θα αντιπροσώπευε το άλλο άκρο της ένθεσης του NUMT. Σε αυτό το σημείο θεωρήσαμε ότι το πρώτο κριτήριο που εφαρμόστηκε ήταν αρκετά συντηρητικό. Συνεπώς, το φίλτρο επαναπροσαρμόστηκε, ώστε να επιτρέπεται αλληλεπικάλυψη έως τρεις βάσεις στις συντεταγμένες ομοιότητας του εκάστοτε αναγνώσματος με τις αλληλουχίες της βάσης δεδομένων, αλλά και αντίστοιχο κενό έως τρεις βάσεις. Μετά την εφαρμογή αυτού του κριτηρίου, οι πιθανές θέσεις ένθεσης στο X χρωμόσωμα ήταν περισσότερες, ωστόσο εξακολουθούσε να μην εμφανίζεται η θέση n+1.

Από τα παραπάνω είναι φανερό ότι ο αριθμός των hits από το BLAST ήταν αδύνατο να περιοριστεί από ένα σημείο και μετά σε σημαντικό βαθμό, παρά τα αυστηρά φίλτρα που χρησιμοποιήθηκαν. Επιπλέον, παρά τον μεγάλο αριθμό των hits που παρέμειναν στο σετ δεδομένων μετά την εφαρμογή των κριτηρίων, δε βρέθηκε κανένα υποψήφιο ανάγνωσμα που να τηρεί το κριτήριο της θέσης της ένθεσης στο X χρωμόσωμα. Δηλαδή, η διαδικασία φαινόταν να δίνει πολλά ψευδή αποτελέσματα. Εκτός αυτών, τα αποτελέσματα από την ανάλυση των αναγνωσμάτων που κατασκευάστηκαν ως θετικοί μάρτυρες ήταν, επίσης, αρκετά αποθαρρυντικά. Πιο συγκεκριμένα, η προκαθορισμένη θέση 20000000 που έπρεπε να εμφανίζεται ως θέση στα hits, εμφανίστηκε μόνο στα τέσσερα από τα δέκα χιμαιρικά αναγνώσματα που κατασκευάστηκαν, ενώ η θέση 20000001 δεν εμφανίστηκε σε κανένα από τα hits. Συνεπώς, από την ανάλυση του θετικού μάρτυρα φάνηκε ότι ένα σημαντικό μέρος των θέσεων στις οποίες γίνονται πιθανές ενθέσεις χάνονται σε κάποιο σημείο της ανάλυσης.

Η παραπάνω ανάλυση δε συνεχίστηκε περαιτέρω, καθώς φαινόταν αδύνατο να περιοριστεί άμεσα ο μεγάλος αριθμός των hits με τα πειραματικά δεδομένα και κριτήρια που χρησιμοποιούσαμε το συγκεκριμένο χρονικό διάστημα και η αναζήτηση συνεχίστηκε με άλλα πειράματα που παρουσιάστηκαν στην προηγούμενη ενότητα. Θεωρούμε ότι ένα πολύ βασικό μειονέκτημα της μεθόδου είναι ότι χρησιμοποιήθηκαν αναγνώσματα με πολύ μικρό μέσο μήκος (75bp). Γενικά, οι ελλείψεις (deletions) ή οι ενθέσεις (insertions) μεγαλύτερες των 20 νουκλεοτιδίων, όπως είναι και το NUMT που αναζητείται στην παρούσα ενότητα, ορίζονται ως δομικά αλληλόμορφα (structural variants, Zverinova and Guryev 2021) και αποτελούν μεγάλο μέρος της ποικιλομορφίας που απαντάται σε ένα γονιδίωμα (Weischenfeldt et al. 2013). Η δυσκολία ανίχνευσης αλληλομόρφων αυτής της κατηγορίας είναι ευρέως καταγεγραμμένη στη βιβλιογραφία (Goodwin et al. 2016; Ashley 2016).

Η αλληλούχηση ολόκληρων γονιδιωμάτων (WGS) είναι μία πάγια τακτική για την ανίχνευση πολυμορφισμών σε αυτά, ωστόσο σε σύγκριση με τους μικρού μεγέθους

πολυμορφισμούς, η ακριβής ανίχνευση και ταυτοποίηση δομικών αλληλομόρφων παραμένει δύσκολη (Goodwin et al. 2016; Ashley 2016). Το πρόβλημα είναι ακόμα μεγαλύτερο σε περιπτώσεις όπου το μέγεθος του δομικού αλληλομόρφου είναι μεγαλύτερο από το μέγεθος των παραγόμενων αναγνωσμάτων, το οποίο για πολλές ευρέως χρησιμοποιούμενες τεχνικές αλληλούχησης είναι 100-150bp. Σε αυτές τις περιπτώσεις τα σφάλματα που προκύπτουν από τη χαρτογράφηση των αναγνωσμάτων είναι πολυάριθμα, κάνοντας δύσκολη την εύρεση δομικών αλληλομόρφων (Simpson et al. 2009; Li et al. 2010).

Στην παρούσα ενότητα η προσπάθεια εστιάστηκε στο να ταυτοποιήσουμε χιμαιρικά αναγνώσματα μεταξύ των αλληλουχιών που έχουν παραμείνει αχαρτογράφητα. Σε άλλες μελέτες, ωστόσο, τα αχαρτογράφητα αναγνώσματα έχουν χρησιμοποιηθεί για την ταυτοποίηση άγνωστων περιοχών στα γονιδιώματα με μία τελείως διαφορετική προσέγγιση. Ειδικότερα, οι Holden et al. (2018) χρησιμοποίησαν αχαρτογράφητα αναγνώσματα για να φτιάξουν contigs. Τα contigs είναι αλληλουχίες που παράγονται από την αλληλεπικάλυψη μικρότερων αναγνωσμάτων, χωρίς χρήση γονιδιώματος αναφοράς (de novo assembly). Τα contigs που παράχθηκαν από το de novo assembly αναγνωσμάτων με μέσο μήκος τα 100bp χαρτογραφήθηκαν στο γονιδίωμα αναφοράς με αποτέλεσμα την ανακάλυψη μιας ένθεσης 447bp. Η προσέγγιση αυτή χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά από μία άλλη ομάδα ερευνητών, η οποία κατάφερε με αυτό τον τρόπο την ανακάλυψη νέων δομικών αλληλομόρφων στον άνθρωπο (Faber-Hammond and Brown 2016a) και στο ψάρι-ζέβρα (Faber-Hammond and Brown 2016b). Ενδεχομένως, η προσέγγιση αυτή να ήταν καταλληλότερη δεδομένων των μικρού μήκους αναγνωσμάτων που είχαμε διαθέσιμες. Ωστόσο, η μεγάλου μήκους ένθεση που αναζητάμε εδώ πιθανόν να μην αναδεικνυόταν ούτε με την παραπάνω τεχνική.

Υπάρχουν πιθανοί τρόποι που θα μπορούσαν να βελτιώσουν την απόδοση της προσέγγισης που παρουσιάζεται στην παρούσα μελέτη. Ένας από αυτούς θα ήταν να χρησιμοποιηθεί ένα άλλο διαθέσιμο σετ δεδομένων αλληλούχησης που έχει παραχθεί από το σύστημα αλληλούχησης 454 GS FLX Titanium, το οποίο παράγει αναγνώσματα μήκους περίπου 300bp. Ένας δεύτερος τρόπος που θα μπορούσε να βοηθήσει είναι η στοίχιση των αχαρτογράφητων αναγνωσμάτων στο γονιδίωμα αναφοράς του βακτηρίου *Wolbachia*. Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, ένα μέρος των αχαρτογράφητων αναγνωσμάτων αντιστοιχούν σε γονιδιώματα βακτηρίων που είναι παρόντα στους οργανισμούς που αλληλουχούνται (Sangiovanni et al. 2019). Η παρουσία του βακτηρίου *Wolbachia* έχει

παρατηρηθεί σε πολλά είδη εντόμων, συμπεριλαμβανομένης και της *Drosophila* (Dean et al. 2003). Με βάση τα παραπάνω, η στοίχιση των αχαρτογράφητων αναγνωσμάτων στο γονιδίωμα του *Wolbachia* θα μείωνε τον αριθμό των αχαρτογράφητων αναγνωσμάτων και κατ' επέκταση θα διευκόλυνε το φιλτράρισμα των hits από τον αλγόριθμο BLAST. Επιπρόσθετα, η βιοπληροφορική προσέγγιση που παρουσιάζουμε εδώ θα μπορούσε να ωφεληθεί σε μεγάλο βαθμό από τα νέα δεδομένα που υπάρχουν σχετικά με την ένθεση του NUMT στη γραμμή *DGRP-820*. Πιο συγκεκριμένα, μετά την παύση της παρούσας ανάλυσης, έγινε γνωστό μέσω των δοκιμών long PCRs (υποενότητα 2.9.3) ότι το σπάσιμο του mtDNA βρίσκεται μεταξύ των μιτοχονδριακών θέσεων 7339 και 10631, ενώ υπολογίστηκε ότι το μέγεθος της ένθεσης πρέπει να είναι τουλάχιστον 16225bp. Αυτά τα δεδομένα θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ώστε η αλληλουχία του mtDNA στη βάση δεδομένων να είναι κατά πολύ μικρότερη, μειώνοντας ταυτόχρονα τα hits που προκύπτουν από το BLAST. Επιπλέον, το εκτιμώμενο μέγεθος του NUMT θα μπορούσε να βοηθήσει στον προσδιορισμό πιθανών ζευγών χιμαιρικών αναγνωσμάτων, καθένα από τα οποία θα αντιστοιχεί σε ένα άκρο του NUMT. Τέλος, όλα τα παραπάνω θα έπρεπε να συνδυαστούν με λιγότερο συντηρητικά φίλτρα, καθώς από το θετικό μάρτυρα φάνηκε ότι το πρόβλημα δεν ήταν μόνο ο μεγάλος αριθμός hits, αλλά και το ότι τα αναγνώσματα ενδιαφέροντος αποκλείονται σε κάποιο σημείο της ανάλυσης.

Ακόμα και με την εφαρμογή όλων των παραπάνω, εξακολουθεί να είναι μεγάλη η πιθανότητα η ανίχνευση του NUMT να μην ήταν δυνατή λόγω του μικρού μεγέθους των αναγνωσμάτων που υπάρχουν στα διαθέσιμα σετ δεδομένων. Χαρακτηριστική είναι η περίπτωση των Bevers et al. (2019) που χρησιμοποίησαν αναγνώσματα από δύο συστήματα αλληλούχησης Illumina και ένα σύστημα αλληλούχησης 454 προκειμένου να εντοπίσουν νέα NUMTs σε 169 γραμμές *DGRP*. Οι ερευνητές χρησιμοποίησαν συνδυαστικά τα αναγνώσματα που παράχθηκαν προκειμένου να εντοπίσουν χιμαιρικά αναγνώσματα, μέσω χρήσης της παραμέτρου CIGAR, που προκύπτει από τη στοίχιση στο γονιδίωμα αναφοράς. Η παράμετρος CIGAR (Compact Idiosyncratic Gapped Alignment Report) αποτελεί μια αναπαράσταση του τρόπου που έχει γίνει η στοίχιση ενός αναγνώματος στο γονιδίωμα αναφοράς. Παραδείγματος χάριν, σε ένα ανάγνωσμα 75bp, η ένδειξη 75M στην παράμετρο CIGAR υποδηλώνει ότι όλο το ανάγνωσμα έχει βρεθεί και στοιχηθεί στο γονιδίωμα αναφοράς. Με βάση αυτή την παράμετρο, οι ερευνητές εντόπισαν αναγνώσματα που μέρος τους δεν είχε τέλεια στοίχιση με το γονιδίωμα αναφοράς και που θα μπορούσαν να

αντιστοιχούν σε άκρα NUMTs. Με τη χρήση αυτής της μεθόδου οι ερευνητές εντόπισαν τέσσερα νέα NUMTs με μέγιστο μέγεθος τα 152bp. Ωστόσο, η μέθοδος δεν ανίχνευσε NUMT αντίστοιχου μεγέθους με αυτό που αναζητάμε εμείς, γεγονός που υποδεικνύει ότι η προσέγγιση σε περιπτώσεις αναζήτησης μεγάλου μεγέθους NUMTs πρέπει να είναι διαφορετική.

Πλέον, η ανίχνευση μεγάλων ενθέσεων έχει γίνει αρκετά απλούστερη και πιο ακριβής με τη χρήση μεθόδων αλληλούχησης που παράγουν αναγνώσματα μεγάλου μήκους 10–50 kbp (Pacific Biosciences και Oxford Nanopore Technologies). Οι τεχνολογίες αυτές είναι καταλληλότερες γιατί μπορούν να αλληλουχήσουν ολόκληρη ή σχεδόν ολόκληρη την ένθεση, σε αντίθεση με τις τεχνολογίες που παράγουν μικρού μήκους αναγνώσματα (Loomis et al. 2013; Sedlazeck et al. 2018; Chen et al. 2019). Οι τεχνολογίες αυτές χρησιμοποιούνται ήδη ευρέως για την ανίχνευση μεγάλων δομικών αλληλομόρφων (Wang et al. 2015b; Fatima et al. 2020; Sakamoto et al. 2021). Θεωρούμε ότι δεδομένου του εκτιμώμενου μεγέθους του NUMT που αναζητούμε οι τεχνολογίες αυτές είναι οι καταλληλότερες για την εύρεση των συντεταγμένων της ένθεσης του mtDNA στο Χ χρωμόσωμα της γραμμής *DGRP-820*.

4 Μελέτη της ετεροπλασμίας σε υβριδικούς φυσικούς πληθυσμούς

4.1 Σκοπός

Η διαρροή πατρικού mtDNA είναι ένα φαινόμενο που όπως φαίνεται δεν είναι τόσο σπάνιο όσο πιστευόταν παλαιότερα. Η διαρροή αυτή απαντάται συχνότερα, ή τουλάχιστον ανιχνεύεται συχνότερα, σε φυσικές ζώνες υβριδισμού ή πειραματικές διαειδικές διασταυρώσεις. Ο υβριδισμός είναι μεγάλης σημασίας για τα μιτοχονδριακά γονιδιώματα, καθώς δίνει την ευκαιρία σε έναν απλότυπο να βρεθεί στο ίδιο κύτταρο με έναν δεύτερο διαφορετικό και να ανασυνδυαστεί, αναστρέφοντας έτσι τις δυσμενείς συνέπειες της συσσώρευσης επιβλαβών μεταλλαγών (Muller's Ratchet). Επιπλέον, είναι ένα φαινόμενο που έχει βρεθεί να συμβαίνει σε αρκετές περιπτώσεις φυσικών πληθυσμών (Radojčić et al. 2015; Gandolfi et al. 2017), ενώ έχει αποδειχθεί και διαφορετική αναλογία στην ετεροπλασμία ως προς το φύλο (Dokianakis and Ladoukakis 2014). Κατά συνέπεια, η μελέτη της διαρροής πατρικού mtDNA μέσω υβριδίων είναι ιδιαίτερης σημασίας.

Η επικρατέστερη άποψη για την ετεροπλασμία είναι ότι πρόκειται για ένα τυχαίο φαινόμενο, που εμφανίζεται είτε λόγω μεταλλαγών είτε λόγω δυσλειτουργίας των μηχανισμών που προστατεύουν τη μονογονεϊκή κληρονομηση (Hauswirth and Lairis 1982; Jenuth et al. 1997; Wonnarini et al. 2008). Παρ' όλα αυτά, υπάρχουν θεωρητικές μελέτες που υποστηρίζουν ότι η ετεροπλασμία υπόκειται σε δράση φυσικής επιλογής και ότι αποτελεί ένα χαρακτηριστικό που εξελίσσεται (Hoekstra 2000; Radzvilavicius et al. 2017). Αν όντως η ετεροπλασμία αποτελεί στόχο της φυσικής επιλογής, τότε αυτό συνεπάγεται ότι σε κάποιο βαθμό, τουλάχιστον, ελέγχεται γενετικά και, άρα, τα πρότυπα που εμφανίζει είναι μη τυχαία.

Για τη μελέτη της δυναμικής της ετεροπλασμίας και των προτύπων που τη χαρακτηρίζουν είναι απαραίτητος μεγάλος αριθμός ετεροπλασμικών ατόμων. Ωστόσο, δεδομένης της σπανιότητας της ετεροπλασμίας σε φυσικούς πληθυσμούς και της χαμηλής της συχνότητας στα άτομα (Nunes et al. 2013; Li et al. 2015b), η εύρεση μεγάλου αριθμού ετεροπλασμικών ατόμων καθίσταται ιδιαίτερα δύσκολη. Συνεπώς, για τη μελέτη της δυναμικής της ετεροπλασμίας είναι απαραίτητη η χρήση διαφορετικών συστημάτων μελέτης που χαρακτηρίζονται από υψηλά επίπεδα ετεροπλασμίας. Ένα τέτοιο σύστημα μελέτης

αποτελούν τα υβρίδια από διαειδικές διασταυρώσεις. Στα υβρίδια αυτά συμβαίνει διαρροή πατρικού mtDNA με αρκετά μεγαλύτερη συχνότητα σε σχέση με απογόνους ενδοειδικών διασταυρώσεων (Dokianakis and Ladoukakis 2014; Radojčić et al. 2015), γεγονός που τα καθιστά ένα σπουδαίο εργαλείο για τη μελέτη της δυναμικής της ετεροπλασμίας. Η μελέτη της ετεροπλασμίας σε υβρίδια έχει επίσης το πλεονέκτημα ότι η ανίχνευση των δύο διαφορετικών μιτότυπων είναι ευκολότερη, καθώς οι μιτότυποι προέρχονται από διαφορετικά είδη και συνεπώς φέρουν περισσότερες διαφορές σε επίπεδο νουκλεοτιδικής αλληλουχίας (Ladoukakis and Zouros 2017).

Στο παρόν κεφάλαιο, χρησιμοποιήσαμε υβρίδια από τα είδη *D. simulans* και *D. mauritiana* για να μελετήσουμε τη δυναμική της ετεροπλασμίας μεταξύ οικογενειών με διαφορετικό γενετικό υπόβαθρο, που αντιπροσωπεύουν την ποικιλομορφία στη φύση, και τις διαφορές που παρατηρούνται μεταξύ αυτών. Η μελέτη αυτή θα δώσει νέα στοιχεία για το αν η διαρροή πατρικού mtDNA και η ετεροπλασμία που προκύπτει από αυτή είναι ένα τυχαίο γεγονός ή ένα φαινόμενο που υπόκειται σε κάποιου είδους γενετικό έλεγχο.

4.2 Υλικά και Μέθοδοι

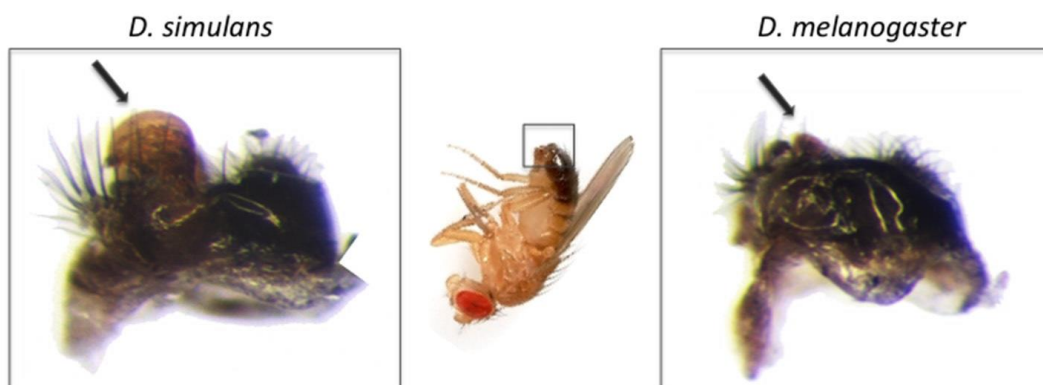
4.2.1 Συλλογή μυγών και κατασκευή ισοθηλικών γραμμών

Οι γραμμές των μυγών που χρησιμοποιήθηκαν προέρχονται από μύγες που συλλέχθηκαν από τη φύση και συγκεκριμένα από την περιοχή Βούτες του Ηρακλείου. Για τη συλλογή τους χρησιμοποιήθηκαν πλαστικές παγίδες με φρούτα, οι οποίες αφήνονταν στο χώρο της δειγματοληψίας τουλάχιστον για 24 ώρες.

Την επόμενη μέρα, οι μύγες συλλέγονταν από τις παγίδες και τοποθετούνταν σε σωλήνες καλλιέργειας, έως ότου γινόταν σε πρώτη φάση ο διαχωρισμός των ατόμων *Drosophila* που ανήκαν στην ομάδα ειδών *melanogaster* (*melanogaster* species subgroup) και μετά σε δεύτερη φάση ο διαχωρισμός τους σε αρσενικά και θηλυκά. Για την κατασκευή των ισοθηλικών γραμμών, τα παραπάνω θηλυκά, τα περισσότερα από τα οποία αναμενόταν να είναι γονιμοποιημένα, μπήκαν ατομικά σε σωλήνες καλλιέργειας προκειμένου να αφήσουν απογόνους. Τα παραπάνω θηλυκά αναμενόταν να ανήκουν είτε στο είδος *D. simulans* είτε στο είδος *D. melanogaster* (Triantafyllidis and Tsacas 1981). Τα θηλυκά που τελικά χρησιμοποιήθηκαν ανήκαν στο είδος *D. simulans*, καθώς οι διασταυρώσεις μεταξύ θηλυκών *D. melanogaster* και αρσενικών *D. mauritiana* έχουν σχετικά μικρό ποσοστό επιτυχίας (38%)

και παράγουν μόνο στείρα αρσενικά (Lee and Watanabe 1987). Ωστόσο, επειδή η μορφολογική διάκριση μεταξύ *D. simulans* και *D. melanogaster* γίνεται από τα αρσενικά και όχι από τα θηλυκά άτομα (Εικόνα 4. 1), οι γραμμές που χρησιμοποιήθηκαν για τις διαειδικές διασταυρώσεις επιλέχθηκαν μετά την παραγωγή απογόνων από τα παραπάνω θηλυκά. Συνεπώς, στην F1 γενιά καθορίσαμε το είδος των γραμμών με βάση τη μορφολογία των γεννητικών οργάνων των αρσενικών μυγών με τη βοήθεια στερεοσκοπίου και κρατήσαμε τις γραμμές που ήταν του είδους *D. simulans*.

Πριν τη διεξαγωγή των πειραμάτων ήταν απαραίτητος ο έλεγχος των μυγών για την παρουσία του ενδοσυμβιωτικού βακτηρίου *Wolbachia*. Το βακτήριο *Wolbachia* προκαλεί ένα φαινόμενο που ονομάζεται κυτταροπλασματική ασυμβατότητα και έχει παρατηρηθεί σε πολλά είδη εντόμων (Dean et al. 2003). Στην πιο απλή της μορφή, η κυτταροπλασματική ασυμβατότητα συμβαίνει όταν σπέρμα από ένα προσβεβλημένο αρσενικό γονιμοποιεί αυγά ενός μη προσβεβλημένου θηλυκού, το οποίο έχει ως αποτέλεσμα τη μειωμένη εκκόλαψη αυγών (Zhou et al. 1998). Επιπλέον, το βακτήριο *Wolbachia* κληρονομείται μητρικά στη *D. simulans*, όπως και το mtDNA (Dean et al. 2003). Ο μιτότυπος που συσχετίζεται με την προσβολή αυξάνει τη συχνότητά του, το οποίο συνεπάγεται και μείωση της ποικιλομορφίας των μιτότυπων (Turelli et al. 1992). Συνεπώς, η εξάλειψη του βακτηρίου από τις ισοθηλικές γραμμές είναι σημαντική, καθώς η παρουσία του μπορεί να επηρεάσει τη συχνότητα με την οποία παρατηρείται ετεροπλάσμια στα υπό μελέτη υβρίδια.



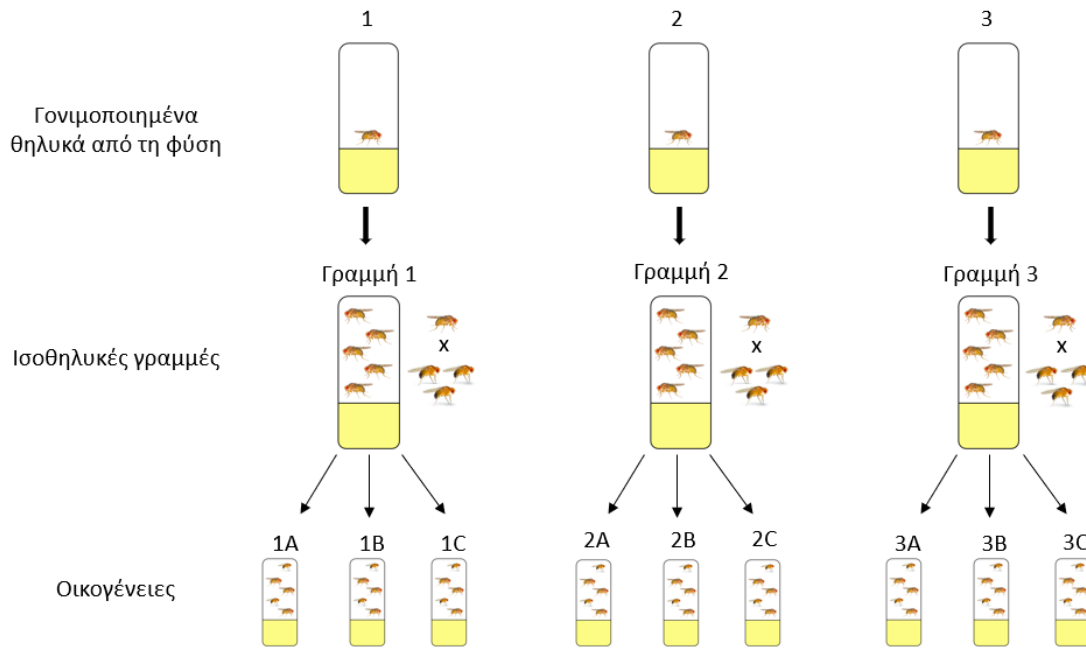
Εικόνα 4. 1: Γεννητικά όργανα αρσενικών του είδους *D. simulans* (αριστερά) και αρσενικών του είδους *D. melanogaster* (δεξιά) (Ashburner et al. 2011).

Για τον έλεγχο της παρουσίας του βακτηρίου *Wolbachia*, χρησιμοποιήθηκαν οι ειδικοί για το βακτήριο εκκινητές *wolF* και *wolR* (με αλληλουχίες 5'-TTGTAGCCTGCTATGGTATAACT-3' και 5'-GAATAGGTATGATTTTCATGT-3', αντίστοιχα) με τις συνθήκες που περιγράφηκαν από τους O'Neill et al. (1992), όπου διαπιστώθηκε η παρουσία του σε όλες τις γραμμές που

ελέγχθηκαν. Για τη θεραπεία των γραμμών χρησιμοποιήθηκε τετρακυκλίνη στο μέσο καλλιέργειας των μυγών σε συγκέντρωση 0,25mg/ml για δύο γενιές (Brennan et al. 2012). Μετά το πέρας της θεραπείας με τετρακυκλίνη, οι γραμμές ελέγχθηκαν ξανά για την παρουσία του βακτηρίου με τη διαδικασία που περιγράφηκε παραπάνω, όπου και διαπιστώθηκε ότι οι γραμμές είχαν καθαρίσει πλήρως από την παρουσία του βακτηρίου. Συνεπώς, οι γραμμές ήταν έτοιμες για να χρησιμοποιηθούν σε διασταυρώσεις.

4.2.2 Διαειδικές διασταυρώσεις

Όλες οι γραμμές των ειδών *Drosophila* που χρησιμοποιήθηκαν στο παρόν κεφάλαιο διατηρούνται στο εργαστήριο Πληθυσμιακής Γενετικής και Εξέλιξης σε θερμοκρασία 25°C, μέσα σε σωλήνες καλλιέργειας με τροφή και κλεισμένους με βαμβάκι. Η τροφή τους αποτελείται από ένα μείγμα άγαρ, σουκρόζης, μαγιάς και καλαμποκάλευρου (Ashburner et al. 2005). Για τη μελέτη της ετεροπλασμίας μεταξύ οικογενειών με διαφορετικό γενετικό υπόβαθρο πραγματοποιήθηκαν διαειδικές διασταυρώσεις μεταξύ θηλυκών από τις παραπάνω ισοθηλικές γραμμές και αρσενικών από το εργαστηριακό είδος *D. mauritiana* με μιτότυπο *mall* (Fauron and Wolstenholme 1980). Από τη βιβλιογραφία είναι γνωστό ότι από τη συγκεκριμένη διασταύρωση παράγονται γόνιμα θηλυκά και στείρα αρσενικά (Lee and Watanabe 1987). Παρθένα θηλυκά συλλέγονταν από τις ισοθηλικές γραμμές κάθε έξι με οκτώ ώρες και διασταυρώνονταν τουλάχιστον 48 ώρες μετά τη συλλογή τους. Αρσενικά άτομα συλλέγονταν μία φορά την ημέρα. Πριν τη διεξαγωγή της διασταύρωσης το φύλο των μυγών ελεγχόταν ξανά προς αποφυγή λαθών. Σε κάθε διασταύρωση χρησιμοποιούνταν ένα θηλυκό από τις ισοθηλικές γραμμές και τρία αρσενικά *D. mauritiana* (αναλογία 1:3), καθώς η χρήση περισσότερων του ενός αρσενικού αυξάνει την αρμοστικότητα του θηλυκού και κατ' επέκταση την επιτυχία της διασταύρωσης (Taylor et al. 2008). Οι απόγονοι από κάθε θηλυκό αποτελούσαν μια οικογένεια (Εικόνα 4. 2). Μετά από κάθε διασταύρωση οι απόγονοι φυλάσσονταν σε απόλυτη αιθανόλη (EtOH 100%) μέχρι την περαιτέρω ανάλυσή τους.



Εικόνα 4. 2: Κατασκευή ισοθηλικών γραμμών και διασταυρώσεις για την παραγωγή οικογενειών υβριδίων. Καθένα από τα θηλυκά των γραμμών διασταυρώνεται με τρία αρσενικά *D. mauritiana*, δίνοντας οικογένειες υβριδίων. Ο αριθμός στις οικογένειες αντιπροσωπεύει την ισοθηλική γραμμή από την οποία προήλθε η οικογένεια.

4.2.3 Εξαγωγή γενωμικού DNA (gDNA) και αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Για όλες τις εξαγωγές γενωμικού DNA (gDNA) εφαρμοζόταν το Πρωτόκολλο Εξαγωγής 1 των O'Neill et al. (1992), το οποίο περιγράφεται αναλυτικά στο Παράρτημα. Για την κάθε εξαγωγή χρησιμοποιούσαμε μία μύγα (single-fly extraction), έτσι ώστε η ετεροπλάσμία να παρακολουθείται σε επίπεδο ατόμου. Πριν την εξαγωγή, προσδιοριζόταν το φύλο των μυγών με τη βοήθεια στερεοσκοπίου και στη συνέχεια τα άτομα τοποθετούνταν σε σωλήνες erpendorf 1,5ml. Επιπλέον, πριν την εφαρμογή του πρωτόκολλου εξαγωγής οι σωλήνες με τις μύγες τοποθετούνταν σε heatblock στους 37°C για 20 με 30 λεπτά προκειμένου να εξατμιστεί όλη η αιθανόλη από τους ιστούς, καθώς αποτελεί ισχυρό ανασταλτικό παράγοντα για την PCR. Σε όποιες οικογένειες δεν υπήρχε επάρκεια ατόμων, γινόταν εξαγωγή από τον μέγιστο δυνατό αριθμό ατόμων.

Η τεχνική που χρησιμοποιήθηκε για την ανίχνευση των μιτότυπων που έφεραν τα υβρίδια, ήταν η allele-specific PCR. Πιο συγκεκριμένα, για κάθε άτομο γίνονταν δύο PCR, μία για την ανίχνευση του μητρικού μιτότυπου και μία για την ανίχνευση του πατρικού μιτότυπου (leakage PCR). Για τη διάκριση μεταξύ μητρικού και πατρικού μιτότυπου

χρησιμοποιούνταν σε κάθε περίπτωση ζεύγη εκκινητών, τα οποία ήταν σχεδιασμένα ειδικά για τον κάθε μιτότυπο (allele-specific PCR). Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για τον κάθε μιτότυπο, οι θερμοκρασίες υβριδοποίησής τους, οι αλληλουχίες τους, καθώς και το μέγεθος των παραγόμενων τμημάτων φαίνονται στον Πίνακα 4. 1. Όλα τα ζεύγη πολλαπλασιάζουν τμήμα του γονιδίου της κυτοχρωμικής οξειδάσης I (*CoxI*).

Για κάθε αντίδραση PCR για το μητρικό μιτότυπο χρησιμοποιούνταν τα παρακάτω συστατικά: 1x *Taq* polymerase buffer (EnzyQuest Biotechnology, IMBB, Greece), 0,4mM από κάθε εκκινητή, 1,5mM MgCl₂, 0,2mM dNTPs, 0,4mg/ml BSA, 0,5U *Taq* DNA polymerase, 1μl DNA και υπερκαθαρό H₂O μέχρι τον τελικό όγκο της αντίδρασης που ήταν τα 15μl. Για τις leakage PCR χρησιμοποιήθηκαν οι ίδιες συγκεντρώσεις αντιδραστηρίων με τις PCR για το μητρικό μιτότυπο, αλλά με 2mM MgCl₂ αντί για 1,5mM. Οι συνθήκες της αντίδρασης για το μητρικό μιτότυπο φαίνονται στον Πίνακα 4. 2, ενώ οι συνθήκες για τις leakage PCR φαίνονται στον Πίνακα 4. 3. Σε όλες τις περιπτώσεις χρησιμοποιήθηκαν οι κατάλληλοι θετικοί και αρνητικοί μάρτυρες, έτσι ώστε να ελέγχεται κάθε φορά η ειδικότητα του εκάστοτε ζεύγους εκκινητών. Συγκεκριμένα, στις PCR για το μητρικό μιτότυπο, ο θετικός μάρτυρας ήταν DNA από το είδος *D. simulans* και ο αρνητικός μάρτυρας ήταν DNA από το είδος *D. mauritiana*. Όλα τα προϊόντα της PCR ηλεκτροφορούνταν σε πήκτωμα αγαρόζης 1% βαμμένο με βρωμιούχο αιθίδιο (EtBr). Τέλος, τα προϊόντα οπτικοποιούνταν με χρήση υπεριώδους ακτινοβολίας.

Γενικά, το είδος *D. simulans* φέρει τρεις διαφορετικούς μιτότυπους, τους *sil*, *sill* και *silll* (Solignac and Monnerot 1986). Πριν την έναρξη των διασταυρώσεων ήταν απαραίτητος ο καθορισμός των μιτότυπων που φέρει η κάθε γραμμή, για να είναι εφικτή η επιλογή των σωστών εκκινητών για τις PCR για το μητρικό μιτότυπο, αλλά και η χρήση των κατάλληλων θετικών και αρνητικών μαρτύρων. Συγκεκριμένα, ελέγχθηκαν πέντε άτομα από κάθε γραμμή για την παρουσία των παραπάνω μιτότυπων με εκκινητές ειδικούς για τον καθένα από αυτούς (Πίνακας 4. 1). Οι συνθήκες της PCR σε αυτή την περίπτωση ήταν οι ίδιες που περιγράφηκαν παραπάνω για τις PCR του μητρικού μιτότυπου, εκτός του ζεύγους 1588+/2374- που είχε διαφορά στη θερμοκρασία υβριδοποίησης, η οποία ήταν στους 61°C (Πίνακας 4. 2). Όλες οι γραμμές έφεραν το μιτότυπο *sill*, το οποίο αναμενόταν λόγω της παγκόσμιας κατανομής του, αλλά και συγκεκριμένα της γνωστής του παρουσίας στον ελλαδικό χώρο (Ballard and James 2004; Ballard et al. 2007).

Πίνακας 4. 1: Εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν, οι θερμοκρασίες υβριδοποίησής τους και το μέγεθος των παραγόμενων τμημάτων.

Αναφορά	Εκκινητές	Αλληλουχία (5' -> 3')	Ειδικότητα	Μέγεθος προϊόντος PCR (bp)	Tm (°C)
(Dokianakis and Ladoukakis, 2014)	sil_1737F	TCCTGATATAGCATTTCCA	<i>sil</i> αντί <i>sill</i> , <i>silll</i> , <i>mall</i>	794	58
	sil_2531R	GTTAATCCTCCTACTGTG			
(Polovina et al., 2020)	sill_1737F	CCCTGATATAGCATTTCCCG	<i>sill</i> αντί <i>sil</i> , <i>silll</i> , <i>mall</i>	794	58
	sill_2531R	GTTAACCCCCCTACTGTA			
(Parakatselaki et al., 2022)	1588+	GAATTAGGACATCCTGGAGCAT	<i>silll</i> αντί <i>sil</i> , <i>sill</i> , <i>mall</i>	786	61
	2374-	GAGTATCAACGTCTATTCCAAGTGTG			
(Polovina et al., 2020)	sil_1737F	TCCTGATATAGCATTTCCA	<i>mall</i> αντί <i>sil</i> , <i>sill</i> , <i>silll</i>	794	58
	maur1_2531R	CATGATGCAAAGGTACGAG			

Πίνακας 4. 2: Συνθήκες PCR για τα ζεύγη εκκινητών για τους *si* μιτότυπους.

Στάδια	Θερμοκρασία	Χρόνος	Κύκλοι
Αρχική αποδιάταξη	95°C	5'	1
Αποδιάταξη	95°C	15''	35
Υβριδοποίηση	58°C (61°C για τον <i>silll</i>)	15''	
Επιμήκυνση	72°C	40''	
Τελική επιμήκυνση	72°C	5'	1

Πίνακας 4. 3: Συνθήκες PCR για το ζεύγος εκκινητών *sil_1737F/ maurI_2531R* που χρησιμοποιείται για τον πατρικό μιτότυπο *mall*.

Στάδια	Θερμοκρασία	Χρόνος	Κύκλοι
Αρχική αποδιάταξη	95°C	5'	1
Αποδιάταξη	95°C	15''	42
Υβριδοποίηση	58°C	20''	
Επιμήκυνση	72°C	40''	
Τελική επιμήκυνση	72°C	5'	1

4.2.4 Στατιστική ανάλυση αποτελεσμάτων

Για να διαπιστωθεί αν υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές στη διαρροή μεταξύ των διασταυρώσεων εξαιτίας του διαφορετικού γενετικού υπόβαθρου μεταξύ των διαφορετικών ισοθηλικών γραμμών, έγινε ανάλυση των αποτελεσμάτων της διαρροής με χρήση του προγραμματιστικού περιβάλλοντος της R (RStudio Team 2020). Πριν την εισαγωγή των δεδομένων στην R, τα αποτελέσματα της διαρροής εισάχθηκαν σε πίνακα ως συχνότητες ατόμων με διαρροή, δηλαδή αν σε μια διασταύρωση υπήρχαν 2 στα 10 υβρίδια που εξετάστηκαν με διαρροή, τότε η τιμή που εισαγόταν ήταν 0,2. Οι συχνότητες που εισήχθησαν υπολογίστηκαν τόσο για το σύνολο των ατόμων ανά οικογένεια όσο και ξεχωριστά για τα αρσενικά και τα θηλυκά.

Κατά συνέπεια, το σετ δεδομένων που αναλύθηκε αποτελούνταν από την ισοθηλική γραμμή, που αποτέλεσε την κατηγορική μεταβλητή, και τρεις συνεχείς μεταβλητές που ήταν

η συχνότητα διαρροής στα αρσενικά, η συχνότητα διαρροής στα θηλυκά και η συχνότητα διαρροής στο σύνολο των απογόνων. Οι συνεχείς μεταβλητές ελέγχθηκαν για την κανονικότητά τους (Shapiro-Wilk test), αλλά και για την ομοιογένεια των διασπορών μεταξύ των ισοθηλικών γραμμών (Fligner-Killeen test). Όπου κρίθηκε απαραίτητο αφαιρέθηκαν παράτυπες παρατηρήσεις. Από τον παραπάνω έλεγχο προέκυψε ότι ο μη παραμετρικός έλεγχος Kruskal-Wallis είναι ο καταλληλότερος για την αναζήτηση διαφορών στις συχνότητες διαρροής ανά φύλο ή στο σύνολο των απογόνων μεταξύ των ισοθηλικών γραμμών. Όπου προέκυπταν στατιστικά σημαντικές διαφορές από τους ελέγχους Kruskal-Wallis γίνονταν έλεγχοι Wilcoxon Rank Sum, οι οποίοι ενδείκνυνται για ανά ζεύγη συγκρίσεις μεταξύ των γραμμών, με προσαρμογή των p -values για πολλαπλές συγκρίσεις, με τη μέθοδο διόρθωσης των Benjamini & Hochberg.

Στη συνέχεια, έγιναν έλεγχοι Mann-Whitney U για να διαπιστωθεί εάν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά στη συχνότητα διαρροής πατρικού mtDNA σε κάθε γραμμή μεταξύ αρσενικών και θηλυκών. Τέλος, έγινε ανάλυση διασταυρωμένης πινακοποίησης χ^2 (Chi-square test) για να επιβεβαιωθεί ότι η διαφορά που παρατηρήθηκε συνολικά μεταξύ αρσενικών και θηλυκών στη διαρροή είναι στατιστικά σημαντική. Το επίπεδο σημαντικότητας που επιλέχθηκε για όλους τους στατιστικούς ελέγχους ήταν p -value < 0,05.

4.3 Αποτελέσματα

4.3.1 Διαειδικές διασταυρώσεις και αριθμός απογόνων που ελέγχθηκαν

Οι ισοθηλικές γραμμές που κατασκευάστηκαν ήταν συνολικά 30, ενώ μετά τον μορφολογικό και μοριακό έλεγχο που έγινε για το είδος της εκάστοτε γραμμής διατηρήθηκαν 25 γραμμές *D. simulans*. Οι 20 από αυτές χρησιμοποιήθηκαν περαιτέρω για διασταυρώσεις. Από κάθε ισοθηλική γραμμή απομονώθηκαν 15 θηλυκά καθένα από τα οποία διασταυρώθηκε με τρία αρσενικά *D. mauritiana*, οπότε συνολικά πραγματοποιήθηκαν 300 διασταυρώσεις. Εφόσον οι απόγονοι κάθε θηλυκού ατόμου αποτελούν μια οικογένεια και από τις παραπάνω διασταυρώσεις έδωσαν απογόνους οι 250, η όλη διαδικασία των διασταυρώσεων κατέληξε στο σχηματισμό 250 οικογενειών.

Για τη μελέτη των προτύπων της ετεροπλάσμιας, χρησιμοποιήθηκαν συνολικά 113 οικογένειες, οι οποίες προέρχονταν από 15 διαφορετικές ισοθηλικές γραμμές. Ειδικότερα, από κάθε ισοθηλική γραμμή αναλύθηκαν 4 με 10 οικογένειες, με μέσο αριθμό οικογενειών

που αναλύθηκαν τις 7. Από κάθε οικογένεια δεν αναλύθηκε ο ίδιος αριθμός ατόμων, καθώς κάποιες οικογένειες είχαν μικρότερο αριθμό απογόνων σε σχέση με άλλες. Κατά μέσο όρο ελέγχονταν 20 απόγονοι από κάθε οικογένεια, με εύρος που κυμαίνονταν από 9 έως 41 άτομα. Σε σχέση με το φύλο, ελέγχονταν κατά μέσο όρο 11 θηλυκά άτομα (με εύρος από 5 έως 26) και 9 αρσενικά άτομα (με εύρος 2 έως 16) ανά οικογένεια. Συνολικά ελέγχθηκαν για ετεροπλασμία 2292 άτομα, εκ των οποίων τα 1273 ήταν θηλυκά και τα 1019 ήταν αρσενικά.

4.3.2 Διαρροή πατρικού mtDNA και ετεροπλασμία

Από τα 1019 αρσενικά άτομα που ελέγχθηκαν, είχε συμβεί διαρροή πατρικού mtDNA στα 520, δηλαδή στο 51,03% των αρσενικών που ελέγχθηκαν. Αντιθέτως, το ποσοστό των θηλυκών ατόμων στα οποία ανιχνεύθηκε ο πατρικός μιτότυπος ήταν αρκετά μικρότερο (1,26%), καθώς μόνο τα 16 από τα 1273 θηλυκά που ελέγχθηκαν ήταν ετεροπλασμικά. Συνολικά, το ποσοστό των ετεροπλασμικών ατόμων, ανεξαρτήτως γραμμής ανέρχεται σε 23,38% (Πίνακας 4. 4).

Πίνακας 4. 4: Αριθμός ετεροπλασμικών και ομοπλασμικών ατόμων ανά φύλο, στο σύνολο των ισοθηλυκών γραμμών.

Άτομα	Αριθμός ετεροπλασμικών ατόμων	Αριθμός ομοπλασμικών ατόμων	Ποσοστό ατόμων με ετεροπλασμία
Αρσενικά	520	499	51,03%
Θηλυκά	16	1257	1,26%
Συνολικά	536	1756	23,38%

Όσον αφορά τη διαρροή πατρικού mtDNA που παρατηρήθηκε ανά ισοθηλυκή γραμμή, το ποσοστό των ετεροπλασμικών θηλυκών ήταν κατά μέσο όρο 1,22% (με εύρος από 0% έως 6,8%), ενώ το αντίστοιχο ποσοστό για τα αρσενικά άτομα ήταν κατά μέσο όρο 48,92% (με εύρος από 26% έως 95,65%). Στο σύνολο των απογόνων ανά ισοθηλυκή γραμμή, η συχνότητα της ετεροπλασμίας κυμάνθηκε από 10,56% έως 47,4%, με το μέσο όρο να είναι 22,73%. Τα ποσοστά ετεροπλασμίας ανά ισοθηλυκή γραμμή παρουσιάζονται στον Πίνακα 4. 5, τόσο για κάθε φύλο ξεχωριστά, όσο και για το σύνολο των απογόνων.

Σχετικά με τη διαρροή πατρικού mtDNA που παρατηρήθηκε ανά οικογένεια, το ποσοστό των θηλυκών ατόμων με διαρροή πατρικού mtDNA ήταν κατά μέσο όρο 1,15% (με εύρος από

0% έως 53.85%), ενώ το αντίστοιχο ποσοστό για τα αρσενικά άτομα ήταν κατά μέσο όρο 50,36% (με εύρος από 0% έως 100%). Συνολικά στους απογόνους ανά οικογένεια, η συχνότητα της ετεροπλασμίας είχε εύρος από 0% έως 65%, με το μέσο όρο να είναι 23,45%. Τα αποτελέσματα της ετεροπλασμίας ανά οικογένεια παρουσιάζονται στον Πίνακα 4. 6, τόσο για κάθε φύλο ξεχωριστά, όσο και για το σύνολο των απογόνων. Παράδειγμα από PCR για έλεγχο διαρροής πατρικού mtDNA φαίνεται στην Εικόνα 4. 3.

Πίνακας 4. 5: Αριθμός ετεροπλασμικών ατόμων για κάθε ισοθλυκή γραμμή, ανά φύλο και στο σύνολο των απογόνων.

Ισοθλυκή γραμμή	Θηλυκά (%)	Αρσενικά (%)	Σύνολο (%)
1	0/113 (0%)	36/94 (38,3%)	36/207 (17,39%)
2	2/137 (1,46%)	55/87 (63,22%)	57/224 (25,45%)
3	1/60 (1,67%)	32/64 (50%)	33/124 (26,61%)
4	7/103 (6,8%)	31/78 (39,74%)	38/181 (20,99%)
5	3/100 (3%)	88/92 (95,65%)	91/192 (47,4%)
6	0/63 (0%)	16/47 (34,04%)	16/110 (14,55%)
7	1/88 (1,14%)	82/100 (82%)	83/188 (44,15%)
8	0/93 (0%)	32/59 (54,24%)	32/152 (21,05%)
10	0/40 (0%)	24/40 (60%)	24/80 (30%)
11	1/50 (2%)	13/50 (26%)	14/100 (14%)
14	0/61 (0%)	19/47 (40,43%)	19/108 (17,59%)
15	0/107 (0%)	19/73 (26,03%)	19/180 (10,56%)
16	1/101 (0,99%)	22/80 (27,5%)	23/181 (12,71%)
17	0/81 (0%)	35/51 (68,63%)	35/132 (26,52%)
21	0/76 (0%)	16/57 (28,07%)	16/133 (12,03%)

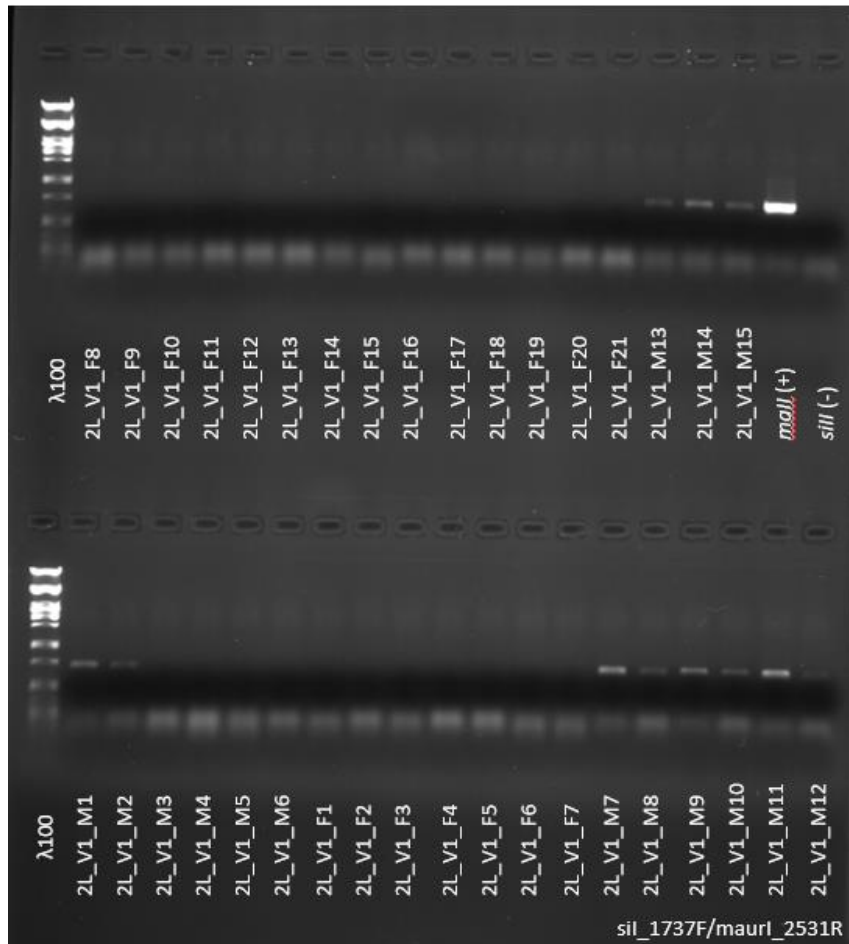
Πίνακας 4. 6: Αριθμός ετεροπλασμικών ατόμων για κάθε οικογένεια, ανά φύλο και στο σύνολο των απογόνων.

Οικογένεια	Θηλυκά (%)	Αρσενικά (%)	Σύνολο (%)
1I	0/19 (0%)	8/15 (53,3%)	8/34 (23,53%)
1J	0/7 (0%)	5/10 (50%)	5/17 (29,41%)
1O	0/15 (0%)	5/10 (50%)	5/25 (20%)
1T	0/7 (0%)	5/10 (50%)	5/17 (29,41%)
1C	0/15 (0%)	5/10 (50%)	5/25 (20%)
1H	0/15 (0%)	5/9 (55,56%)	5/24 (20,83%)
1A	0/14 (0%)	0/10 (0%)	0/24 (0%)
1P	0/9 (0%)	0/10 (0%)	0/19 (0%)
1S	0/12 (0%)	3/10 (30%)	3/22 (13,64%)
2G	0/26 (0%)	10/15 (66,67%)	10/41 (24,39%)
2P	0/13 (0%)	5/10 (50%)	5/23 (21,74%)
2L	0/25 (0%)	11/15 (73,33%)	11/40 (27,5%)
2O	2/24 (8,33%)	12/15 (80%)	14/39 (35,9%)
2D	0/11 (0%)	5/5 (100%)	5/16 (31,25%)
2E	0/15 (0%)	5/7 (71,43%)	5/22 (22,73%)
2C	0/14 (0%)	7/10 (70%)	7/24 (29,17%)
2H	0/9 (0%)	0/10 (0%)	0/19 (0%)
4D	0/15 (0%)	5/10 (50%)	5/25 (20%)
4F	7/13 (53,85%)	5/10 (50%)	12/23 (52,17%)
4M	0/15 (0%)	5/10 (50%)	5/25 (20%)
4Q	0/15 (0%)	5/10 (50%)	5/25 (20%)
4P	0/10 (0%)	1/9 (11,11%)	1/19 (5,26%)
4T	0/9 (0%)	0/9 (0%)	0/18 (0%)
4L	0/11 (0%)	5/10 (50%)	5/21 (23,81%)
4B	0/15 (0%)	5/10 (50%)	5/25 (20%)
6G	0/15 (0%)	0/9 (0%)	0/24 (0%)
6J	0/14 (0%)	0/8 (0%)	0/22 (0%)
6A	0/6 (0%)	5/10 (50%)	5/16 (31,25)

6M	0/8 (0%)	5/5 (100%)	5/13 (38,46%)
6R	0/5 (0%)	6/8 (75%)	6/13 (46,15%)
6O	0/6 (0%)	0/5 (0%)	0/11 (0%)
6S	0/9 (0%)	0/2 (0%)	0/11 (0%)
8A	0/10 (0%)	8/10 (80%)	8/20 (40%)
8F	0/15 (0%)	3/7 (42,86%)	3/22 (13,64%)
8L	0/15 (0%)	4/10 (40%)	4/25 (16%)
8G	0/14 (0%)	1/8 (12,5%)	1/22 (4,55%)
8M	0/15 (0%)	5/10 (50%)	5/25 (20%)
8I	0/6 (0%)	3/3 (100%)	3/9 (33,33%)
8O	0/7 (0%)	3/6 (50%)	3/13 (23,08%)
8Q	0/11 (0%)	5/5 (100%)	5/16 (31,25%)
14H	0/10 (0%)	3/10 (30%)	3/20 (15%)
14J	0/10 (0%)	5/10 (50%)	5/20 (25%)
14R	0/10 (0%)	5/10 (50%)	5/20 (25%)
14A	0/8 (0%)	2/7 (28,57%)	2/15 (13,33%)
14D	0/10 (0%)	3/4 (75%)	3/14 (21,43%)
14M	0/13 (0%)	1/6 (16,67%)	1/19 (5,26%)
15D	0/13 (0%)	3/10 (30%)	3/23 (13,04%)
15E	0/14 (0%)	4/10 (40%)	4/24 (16,67%)
15G	0/15 (0%)	5/10 (50%)	5/25 (20%)
15K	0/15 (0%)	2/10 (20%)	2/25 (8%)
15R	0/10 (0%)	5/10 (50%)	5/20 (25%)
15H	0/14 (0%)	0/10 (0%)	0/24 (0%)
15S	0/15 (0%)	0/8 (0%)	0/23 (0%)
15J	0/11 (0%)	0/5 (0%)	0/16 (0%)
16F	1/16 (6,25%)	2/15 (16,33%)	3/31 (9,67%)
16G	0/10 (0%)	5/10 (50%)	5/20 (25%)
16L	0/8 (0%)	5/9 (55,56%)	5/17 (29,41%)
16K	0/7 (0%)	5/9 (55,56%)	5/16 (31,25%)
16S	0/15 (0%)	5/9 (55,56%)	5/24 (20,83%)

16C	0/15 (0%)	0/10 (0%)	0/25 (0%)
16O	0/13 (0%)	0/10 (0%)	0/23 (0%)
16E	0/10 (0%)	0/3 (0%)	0/13 (0%)
16H	0/7 (0%)	0/5 (0%)	0/12 (0%)
17B	0/14 (0%)	7/7 (100%)	7/21 (33,33%)
17C	0/8 (0%)	10/10 (100%)	10/18 (55,56%)
17N	0/15 (0%)	6/10 (60%)	6/25 (24%)
17P	0/9 (0%)	8/9 (88,89%)	8/18 (44,44%)
17O	0/14 (0%)	4/5 (80%)	4/19 (21,05%)
17L	0/13 (0%)	0/5 V	0/18 (0%)
17T	0/8 (0%)	0/5 (0%)	0/13 (0%)
21F	0/10 (0%)	5/10 (50%)	5/20 (25%)
21I	0/11 (0%)	5/10 (50%)	5/21 (23,81%)
21K	0/7 (0%)	3/4 (75%)	3/11 (27,27%)
21B	0/12 (0%)	0/10 (0%)	0/22 (0%)
21M	0/14 (0%)	0/5 (0%)	0/19 (0%)
21D	0/5 (0%)	0/10 (0%)	0/15 (0%)
21E	0/7 (0%)	0/5 (0%)	0/12 (0%)
21L	0/10 (0%)	3/3 (100%)	3/13 (23,08%)
3F	0/10 (0%)	6/10 (60%)	6/20 (30%)
3G	0/10 (0%)	8/8 (100%)	8/18 (44,44%)
3L	1/10 (10%)	8/16 (50%)	9/26 (34,62%)
3M	0/10 (0%)	4/10 (40%)	4/20(20%)
3N	0/10 (0%)	4/10 (40%)	4/20 (20%)
3T	0/10 (0%)	2/10 (20%)	2/20 (1%)
5B	0/10 (0%)	10/10 (100%)	10/20 (50%)
5H	0/10 (0%)	9/10 (90%)	9/19 47,37%
5D	3/10 (30%)	10/10 (100%)	13/20 (65%)
5F	0/10 (0%)	10/10 (100%)	10/20 (50%)
5Q	0/10 (0%)	9/9 (100%)	9/19 (47,37%)
5P	0/10 (0%)	10/10 (100%)	10/20 (50%)

5T	0/10 (0%)	10/10 (100%)	10/20 (50%)
5I	0/10 (0%)	9/10 (90%)	9/20 (45%)
5E	0/10 (0%)	6/7 (85,71%)	6/17 (35,29%)
5J	0/10 (0%)	5/7 (71,43%)	5/17 (29,41)
7A	0/8 (0%)	9/10 (90%)	9/18 (50%)
7B	0/6 (0%)	6/13 (46,15%)	6/19 (31,58%)
7D	0/9 (0%)	6/8 (75%)	6/17 (35,29%)
7E	0/10 (0%)	7/10 (70%)	7/20 (35%)
7F	0/8 (0%)	10/10 (100%)	10/18 (55,56%)
7G	0/10 (0%)	8/10 (80%)	8/20 (40%)
7I	0/9 (0%)	6/9 (66,67%)	6/18 (33,33%)
7L	1/9 (11,11%)	10/10 (100%)	11/19 (57,89%)
7N	0/10 (0%)	10/10 (100%)	10/20 (50%)
7R	0/9 (0%)	10/10 (100%)	10/19 (52,63%)
10E	0/10 (0%)	8/10(80%)	8/20 (40%)
10H	0/10 (0%)	8/10 (80%)	8/20 (40%)
10F	0/10 (0%)	7/10 (70%)	7/20 (35%)
10Q	0/10 (0%)	1/10 (10%)	1/20(5%)
11A	1/10 (10%)	7/10 (70%)	8/20 (40%)
11E	0/10 (0%)	6/10 (60%)	6/20 (30%)
11J	0/10 (0%)	0/10 (0%)	0/20 (0%)
11M	0/10 (0%)	0/10 (0%)	0/20 (0%)
11P	0/10 (0%)	0/10 (0%)	0/20 (0%)



Εικόνα 4. 3: PCR για έλεγχο διαρροής πατρικού mtDNA στην οικογένεια 2L. Τα δείγματα 2L_V1_M1-2L_V1_M15 είναι από αρσενικά άτομα, ενώ τα 2L_V1_F1-2L_V1_F20 είναι από θηλυκά άτομα. Ως αρνητικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε DNA από το μητρικό στέλεχος με μιτότυπο *sil* και ως θετικός μάρτυρας DNA από το πατρικό στέλεχος με μιτότυπο *mall*. Ο μιτότυπος *mall* ανιχνεύεται στα 11 από τα 15 αρσενικά που ελέγχθηκαν.

4.3.3 Στατιστική ανάλυση

Το πρώτο ερώτημα που διερευνήθηκε ήταν αν υπάρχει διαφορά στη διαρροή πατρικού mtDNA στα θηλυκά άτομα σε συνάρτηση με την ισοθηλική γραμμή από την οποία προέρχονται. Ο έλεγχος Kruskal-Wallis έδειξε ότι δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά (Kruskal-Wallis chi squared= 8,3794, df= 14, p -value= 0,8686), δηλαδή τα επίπεδα της διαρροής στα θηλυκά άτομα είναι παρόμοια σε όλες τις οικογένειες, ανεξαρτήτως ισοθηλικής γραμμής.

Το δεύτερο ερώτημα ήταν αν υπάρχει διαφορά στη διαρροή πατρικού mtDNA στα αρσενικά άτομα αυτή τη φορά σε συνάρτηση με την ισοθηλική γραμμή από την οποία προέρχονται. Ο έλεγχος Kruskal-Wallis εδώ έδειξε ότι υπάρχει στατιστικά σημαντική

διαφορά (Kruskal-Wallis chi squared= 49,04, df= 14, p -value< 0,001), δηλαδή τα επίπεδα της διαρροής των αρσενικών ατόμων διαφέρουν μεταξύ των οικογενειών, ανάλογα με την ισοθληκή γραμμή από την οποία προέρχονται (Εικόνα 4. 4). Τα αποτελέσματα από τους ανά ζεύγη ελέγχους Wilcoxon Rank Sum που έγιναν προκειμένου να διαπιστώσουμε σε ποιες ισοθληκές γραμμές εντοπίζονται στατιστικά σημαντικές διαφορές συνοψίζονται στον Πίνακα 4. 7. Εκεί φαίνεται πως απαντάται περισσότερη διαρροή πατρικού mtDNA στα αρσενικά άτομα από τις οικογένειες που προέρχονται από την ισοθληκή γραμμή 5 σε σχέση με τα αρσενικά οικογενειών που προέρχονται από τις 11 από τις 14 ισοθληκές γραμμές (γραμμές 1, 2, 3, 4, 6, 10, 11, 14, 15, 16, 21). Επιπλέον, στις οικογένειες από την ισοθληκή γραμμή 7 παρατηρούνται μεγαλύτερα επίπεδα διαρροής στα αρσενικά άτομα σε σχέση με τις οικογένειες από άλλες 7 ισοθληκές γραμμές (γραμμές 1, 3, 4, 11, 14, 15, 16). Τέλος, μεγαλύτερα επίπεδα διαρροής στα αρσενικά άτομα παρατηρούνται και στις οικογένειες της ισοθληκής γραμμής 2 σε σχέση με τις οικογένειες από άλλες 4 ισοθληκές γραμμές (γραμμές 1, 4, 15, 16). Από την παρούσα ανάλυση αποκλείστηκαν οι οικογένειες 2H και 3G ως παράτυπα σημεία.

Το τρίτο ερώτημα ήταν αν υπάρχει διαφορά στη διαρροή πατρικού mtDNA στο σύνολο των απογόνων, ανεξαρτήτως φύλου, πάλι σε συνάρτηση με την ισοθληκή γραμμή από την οποία προέρχονται. Ο έλεγχος Kruskal-Wallis εδώ έδειξε ότι υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά (Kruskal-Wallis chi squared= 52,487, df= 14, p -value< 0,001), συνεπώς τα επίπεδα της διαρροής στο σύνολο των ατόμων διαφέρουν μεταξύ των οικογενειών, ανάλογα με την ισοθληκή γραμμή από την οποία προέρχονται (Εικόνα 4. 5). Από τους ανά ζεύγη ελέγχους Wilcoxon Rank Sum που έγιναν προέκυψε ότι στην ισοθληκή γραμμή 5 παρατηρείται μεγαλύτερη συχνότητα διαρροής πατρικού mtDNA σε σχέση με άλλες 11 ισοθληκές γραμμές (γραμμές 1, 2, 3, 4, 6, 8, 11, 14, 15, 16, 21). Επίσης, στις οικογένειες από την ισοθληκή γραμμή 7 ανιχνεύεται περισσότερη διαρροή σε σχέση με 8 από τις 14 ισοθληκές γραμμές (γραμμές 1, 2, 4, 8, 14, 15, 16, 21). Τέλος, μεγαλύτερα επίπεδα διαρροής παρατηρούνται και στις οικογένειες της ισοθληκής γραμμής 2 σε σχέση με τις οικογένειες από άλλες 2 ισοθληκές γραμμές (γραμμές 4, 15). Τα αποτελέσματα των ανά ζεύγη ελέγχων Wilcoxon Rank Sum συνοψίζονται στον Πίνακα 4. 8. Από την παρούσα ανάλυση αποκλείστηκαν οι οικογένειες 2H και 4F ως παράτυπα σημεία.

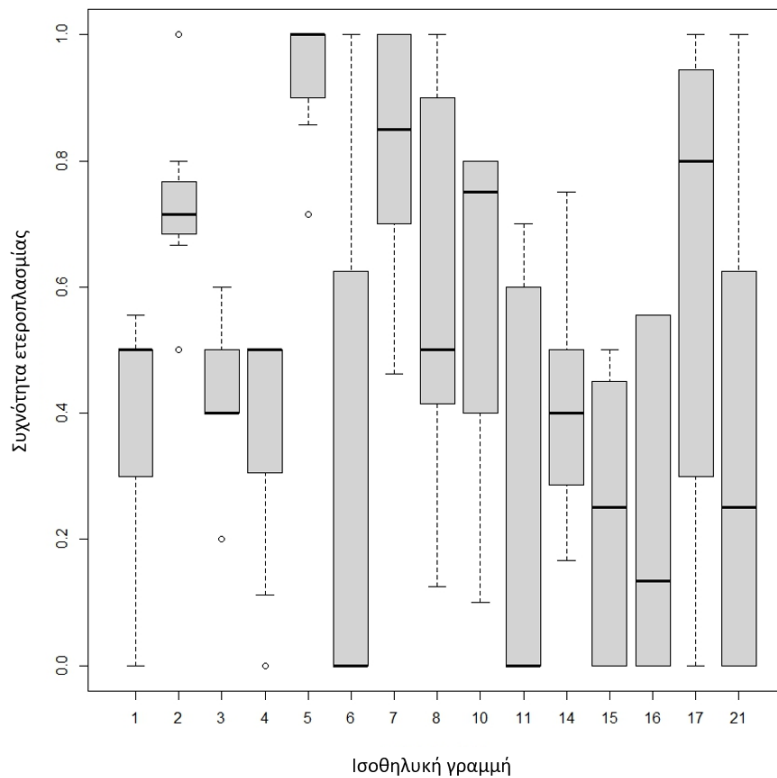
Πίνακας 4. 7: Αποτελέσματα από τους ελέγχους Mann-Whitney U για την εύρεση διαφορών στη συχνότητα διαρροής πατρικού mtDNA μεταξύ αρσενικών και θηλυκών ατόμων ανά ισοθηλική γραμμή. Τονισμένες φαίνονται οι στατιστικά σημαντικές συγκρίσεις ($\alpha=0,05$).

	1	2	3	4	5	6	7	8	10	11	14	15	16	17
2	0,0242	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3	1,0000	0,0527	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4	0,9609	0,0210	1,0000	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5	0,0076	0,0431	0,0162	0,0076	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6	0,8983	0,3016	0,8075	0,8164	0,0314	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7	0,0162	0,4915	0,0314	0,0201	0,3016	0,1112	-	-	-	-	-	-	-	-
8	0,6089	0,5664	0,5501	0,6089	0,0675	0,3774	0,3016	-	-	-	-	-	-	-
10	0,2822	1,0000	0,4821	0,3016	0,0431	0,4112	0,4604	1,0000	-	-	-	-	-	-
11	1,0000	0,1090	0,8248	0,9431	0,0162	0,9990	0,0436	0,3518	0,2356	-	-	-	-	-
14	1,0000	0,1349	1,0000	1,0000	0,0162	0,6792	0,0431	0,5501	0,5501	0,6089	-	-	-	-
15	0,3076	0,0192	0,3774	0,3016	0,0076	1,0000	0,0145	0,1258	0,2275	1,0000	0,4451	-	-	-
16	0,9431	0,0227	0,5918	0,9613	0,0076	1,0000	0,0145	0,3076	0,1708	1,0000	0,5870	0,9293	-	-
17	0,2950	1,0000	0,4953	0,3076	0,1708	0,4374	0,6274	0,9613	0,9559	0,3369	0,4935	0,2534	0,2087	-
21	0,9293	0,2356	0,9293	0,9283	0,0210	1,0000	0,0790	0,4255	0,3976	0,9613	0,8248	0,9289	1,0000	0,4112

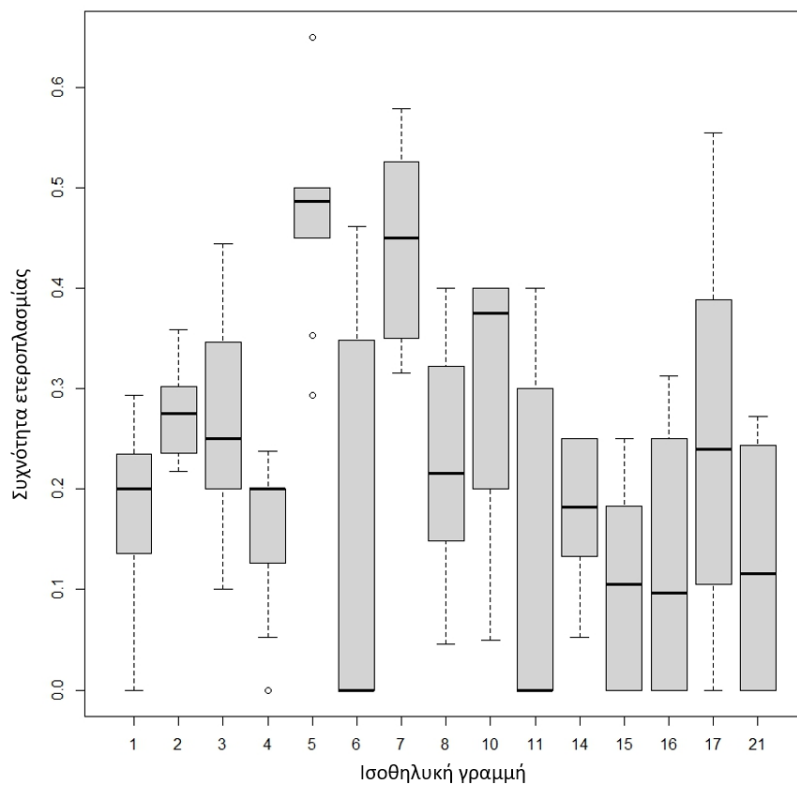
Πίνακας 4. 8: Αποτελέσματα από τους ελέγχους Mann-Whitney U για την εύρεση διαφορών στη συχνότητα διαρροής πατρικού mtDNA στο σύνολο των ατόμων ανά ισοθλητική γραμμή. Τονισμένες φαίνονται οι στατιστικά σημαντικές συγκρίσεις ($\alpha=0,05$).

	1	2	3	4	5	6	7	8	10	11	14	15	16	17
2	0,1534	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3	0,5001	0,8786	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4	0,8176	0,0261	0,3733	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5	0,0057	0,0148	0,0276	0,0073	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6	1,0000	0,7963	0,6660	0,9587	0,0267	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7	0,0057	0,0190	0,0635	0,0073	0,9587	0,0584	-	-	-	-	-	-	-	-
8	0,6786	0,6642	0,8457	0,6381	0,0122	0,6642	0,0190	-	-	-	-	-	-	-
10	0,2931	0,5201	0,8176	0,3654	0,1427	0,4448	0,5001	0,5001	-	-	-	-	-	-
11	0,9587	0,6642	0,5001	0,9238	0,0380	0,9464	0,0629	0,5201	0,3807	-	-	-	-	-
14	1,0000	0,1427	0,5201	0,7963	0,0118	0,8786	0,0118	0,7262	0,4902	0,8457	-	-	-	-
15	0,3733	0,0261	0,1277	0,5169	0,0057	0,9464	0,0057	0,1784	0,2100	1,0000	0,3913	-	-	-
16	0,8623	0,1855	0,2987	1,0000	0,0057	0,9170	0,0057	0,3654	0,1646	1,0000	0,7565	0,8623	-	-
17	0,5169	0,9238	1,0000	0,4341	0,1132	0,7565	0,1784	0,8786	0,8457	0,6642	0,8401	0,3654	0,4869	-
21	0,8457	0,1484	0,3577	1,0000	0,0057	0,8457	0,0057	0,4448	0,1571	0,9260	0,7963	0,8854	0,9464	0,5001

Στη συνέχεια ελέγχθηκε αν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά στη συχνότητα της διαρροής πατρικού mtDNA μεταξύ αρσενικών και θηλυκών ατόμων σε κάθε γραμμή με τους ελέγχους Mann-Whitney U. Τα αποτελέσματα συνοψίζονται στον Πίνακα 4. 9 ανά ισοθηλική γραμμή. Διαπιστώσαμε ότι στις 13 από τις 15 ισοθηλικές γραμμές η διαρροή είναι συχνότερη στα αρσενικά από ότι στα θηλυκά άτομα. Ωστόσο, στις γραμμές 6 και 11 δεν υπήρχε στατιστικά σημαντική διαφορά στη διαρροή μεταξύ αρσενικών και θηλυκών. Τέλος, από τον έλεγχο για διαφορά στη συχνότητα διαρροής ανάλογα με το φύλο στο σύνολο των απογόνων προέκυψε ότι η συχνότητα διαρροής στα αρσενικά άτομα είναι αρκετά μεγαλύτερη από ότι στα θηλυκά άτομα ($\chi^2 = 782,5734$, $p\text{-value} < 0,001$).



Εικόνα 4. 4: Κατανομή της συχνότητας της ετεροπλασμίας που παρατηρήθηκε σε αρσενικά άτομα ανά ισοθηλική γραμμή.



Εικόνα 4. 5: Κατανομή της συχνότητας της ετεροπλάσμιας που παρατηρήθηκε στο σύνολο των ατόμων ανά ισοθηλική γραμμή.

Πίνακας 4. 8: Αποτελέσματα από τους ελέγχους Mann-Whitney U για την εύρεση διαφορών στη συχνότητα διαρροής πατρικού mtDNA μεταξύ αρσενικών και θηλυκών ατόμων ανά ισοθηλική γραμμή. Τονισμένες φαίνονται οι στατιστικά σημαντικές συγκρίσεις ($\alpha=0,05$).

Ισοθηλική γραμμή	W	p-value
1	9	0,001721
2	4,5	0,002455
3	0	0,003601
4	11,5	0,02075
5	0	<0,001
6	14	0,07541
7	0	<0,001
8	0	<0,001
10	0	0,02021
11	9	0,4407

14	0	0,002725
15	12	0,01268
16	20	0,03488
17	7	0,01124
21	16	0,03225

4.4 Συζήτηση

Σε αυτή την ενότητα, έγινε μια σειρά διασταυρώσεων για να διαπιστωθεί αν η διαρροή πατρικού mtDNA και η επακόλουθη ετεροπλάσμία παρουσιάζει κάποιο πρότυπο ή εάν η εμφάνισή της είναι τυχαία. Για την απάντηση του ερωτήματος αυτού, χρησιμοποιήσαμε υβρίδια του γένους *Drosophila*, τα οποία σε επίπεδο γενετικού υλικού αντιπροσωπεύουν τη γενετική ποικιλότητα που απαντάται στη φύση. Από την ανάλυση προέκυψαν τρεις ισοθελυκές γραμμές (γραμμές 2, 5, και 7), των οποίων οι αρσενικοί απόγονοι εμφάνιζαν σημαντικά μεγαλύτερη συχνότητα διαρροής σε σχέση με αρκετές άλλες γραμμές, ενώ αντίστοιχες διαφορές παρατηρήθηκαν και στο σύνολο των απογόνων. Επιπλέον, διαπιστώθηκε ότι σε όλες τις γραμμές που μελετήθηκαν, εκτός των γραμμών 6 και 11, η διαρροή απαντάται σε σημαντικά μεγαλύτερο βαθμό στα αρσενικά άτομα από ότι στα θηλυκά.

Η διαρροή που παρατηρήθηκε στα υβρίδια του παρόντος κεφαλαίου είναι πραγματική, δηλαδή το προϊόν που έχει παραχθεί από την PCR προέρχεται όντως από τον πατρικό μιτότυπο *mall*. Αρχικά, σε όλες τις PCR χρησιμοποιούνταν οι κατάλληλοι αρνητικοί και θετικοί μάρτυρες, με τους οποίους ήταν δυνατό να διαπιστώνεται κάθε φορά ότι οι εκκινητές πολλαπλασιάζαν μόνο τον πατρικό μιτότυπο *mall* και όχι το μητρικό μιτότυπο *sill*. Επιπλέον, τα παρατηρούμενα πρότυπα ετεροπλάσμις δεν μπορούν να οφείλονται σε παρουσία NUMT στην πατρική γραμμή *D. mauritiana* διότι εάν πολλαπλασιάζαμε NUMT σε αυτοσωμικό χρωμόσωμα τότε θα αναμέναμε προϊόν PCR από τον *mall* μιτότυπο στο 50% των απογόνων, ανεξαρτήτως του φύλου, ενώ αν πολλαπλασιάζαμε NUMT σε κάποιο φυλετικό χρωμόσωμα τότε θα αναμέναμε προϊόν PCR από τον *mall* μιτότυπο μόνο στα θηλυκά ή μόνο στα αρσενικά άτομα, αναλόγως με το αν το NUMT βρίσκεται στο X ή στο Y χρωμόσωμα, αντίστοιχα. Τέλος, η αδυναμία ανίχνευσης διαρροής πατρικού mtDNA στα 1257 από τα 1273 θηλυκά που ελέγχθηκαν θα μπορούσε να οφείλεται σε αδυναμία πολλαπλασιασμού του επιθυμητού υποστρώματος λόγω παρουσίας αναστολέων. Ωστόσο, η πιθανότητα αυτή έχει

αποκλειστεί, καθώς για όλα τα άτομα γίνονταν PCR και για το μητρικό μιτότυπο. Έτσι, η παρουσία πιθανών αναστολέων της PCR θα διαπιστωνόταν σε αυτό το στάδιο, αφού δε θα παραγόταν προϊόν. Σε όλα τα θηλυκά που εξετάστηκαν ενισχύθηκε ο μητρικός μιτότυπος, ενώ βρέθηκαν και 16 ετεροπλασμικά θηλυκά, γεγονός που καθιστά την απουσία του πατρικού μιτότυπου από τα θηλυκά και τη συχνότερη διαρροή στα αρσενικά πραγματικά γεγονότα, και όχι γεγονότα που προέκυψαν λόγω τεχνικών λόγων.

Το ζεύγος εκκινητών *sil_1737F/maurI_2531R* έχει αρκετά ικανοποιητικό διακριτικό όριο ανίχνευσης, καθώς μπορεί να ενισχύσει τον πατρικό μιτότυπο *mall* σε αραιώση 10^{-4} σε σχέση με το μητρικό μιτότυπο (Polovina et al. 2020). Έτσι, η πιθανότητα να υπήρχε κάποιο ετεροπλασμικό άτομο στους απογόνους των διασταυρώσεων και να μην εντοπίστηκε είναι σχετικά μικρή. Επιπλέον, είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι κατά την έναρξη των πειραμάτων του παρόντος κεφαλαίου δοκιμάστηκαν και λιγότερο αυστηρές συνθήκες PCR για τον πατρικό μιτότυπο *mall* από αυτές που τελικά χρησιμοποιήθηκαν (Πίνακας 4. 3), οι οποίες βελτίωναν λίγο μεν το διακριτικό όριο ανίχνευσης των εκκινητών, αλλά μείωναν την ειδικότητά τους. Τελικά, προτιμήθηκαν οι συνθήκες που εξασφάλιζαν μεγάλη ειδικότητα των εκκινητών, συνεπώς η ανίχνευση της ετεροπλασμίας ήταν συντηρητική. Ωστόσο, η ικανότητα των εκκινητών να ενισχύουν τον πατρικό μιτότυπο *mall* ακόμα και όταν αυτός είναι πολύ αραιωμένος σε σχέση με το μητρικό μιτότυπο δείχνει ότι, παρόλο που δεν μπορεί να αποκλειστεί η πιθανότητα να υπήρχαν ετεροπλασμικά άτομα που δεν εντοπίστηκαν, αν υπάρχουν θα φέρουν απειροελάχιστα ποσά του πατρικού μιτότυπου.

Από τις 300 διασταυρώσεις που έγιναν, έδωσαν απογόνους οι 250, δηλαδή περίπου το 83%. Το ποσοστό επιτυχίας των διασταυρώσεων ήταν αρκετά υψηλό, ωστόσο είναι χαμηλότερο σε σχέση με αντίστοιχα ποσοστά που αναφέρονται για τη διασταύρωση μεταξύ θηλυκών *D. simulans* και αρσενικών *D. mauritiana* σε άλλες μελέτες (Lee and Watanabe 1987; Polovina et al. 2020). Ωστόσο, στις άλλες δύο μελέτες χρησιμοποιούνται μόνο εργαστηριακές γραμμές των παραπάνω ειδών, ενώ οι γραμμές *D. simulans* που χρησιμοποιήθηκαν εδώ προέρχονται από τη φύση. Συνεπώς, η παρατηρούμενη διαφορά στο ποσοστό επιτυχίας των διασταυρώσεων μεταξύ της παρούσας μελέτης και των προηγούμενων μελετών μπορεί να οφείλεται σε αυτό το γεγονός.

Στο σύνολο των απογόνων, παρατηρήθηκε σημαντικά μεγαλύτερη συχνότητα διαρροής πατρικού mtDNA στα αρσενικά άτομα από ότι στα θηλυκά άτομα. Τα αποτελέσματα αυτά είναι άμεσα συγκρίσιμα με τις μελέτες των Dokianakis and Ladoukakis (2014) και των

Poiovinia et al. (2020), καθώς είναι οι μόνες μελέτες όπου γίνεται διαχωρισμός μεταξύ αρσενικών και θηλυκών απογόνων. Συγκεκριμένα, οι Dokianakis and Ladoukakis (2014) αναφέρουν ότι στους απογόνους της διασταύρωσης μεταξύ θηλυκών *D. simulans* και αρσενικών *D. mauritiana* παρατήρησαν διαρροή στο 100% των αρσενικών υβριδίων που μελέτησαν, ενώ το αντίστοιχο ποσοστό για τα θηλυκά υβρίδια ήταν στο 3%. Αντίστοιχα, στην μελέτη των Poiovinia et al. (2020), παρατηρήθηκε διαρροή στο 100% των αρσενικών ατόμων, ενώ το ποσοστό για τα θηλυκά άτομα ήταν στο 5,3%. Στην παρούσα μελέτη, τα ποσοστά διαρροής που παρατηρήθηκαν ήταν μικρότερα σε σχέση με τις δύο παραπάνω μελέτες, καθώς παρατηρήθηκε διαρροή μόνο στο 51,03% των αρσενικών ατόμων και στο 1,26% των θηλυκών ατόμων που ελέγχθηκαν. Δεδομένου ότι το πατρικό είδος που χρησιμοποιήθηκε και στις τρεις μελέτες είναι το ίδιο και ότι τα στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν στις παραπάνω μελέτες ήταν εργαστηριακά, η διαφορά που παρατηρήθηκε μπορεί να οφείλεται στα διαφορετικά γενετικά υπόβαθρα των μητρικών γραμμών *D. simulans* που χρησιμοποιήθηκαν για τις διασταυρώσεις.

Η διαφορά στη συχνότητα διαρροής στην παρούσα μελέτη σε σχέση με τις προηγούμενες μελέτες αναδεικνύεται και από τα ποσοστά διαρροής που παρατηρήθηκαν σε κάθε ισοθηλική γραμμή χωριστά, ανά φύλο. Ειδικότερα, τα ποσοστά διαρροής ήταν σημαντικά διαφορετικά μεταξύ των δύο φύλων στις 13 από τις 15 γραμμές που αναλύθηκαν και όχι σε όλες, όπως αρχικά αναμενόταν. Συνεπώς, οι μηχανισμοί που αποκλείουν τη μεταβίβαση του πατρικού mtDNA στα έμβρυα *Drosophila* φαίνεται να είναι πιο αποτελεσματικοί σε κάποιες περιπτώσεις σε σχέση με κάποιες άλλες, με ένα τρόπο που εξαρτάται από τον τρόπο που συνδυάζονται οι υπεύθυνοι για τον αποκλεισμό τόποι των γραμμών *D. simulans* με τους αντίστοιχους της *D. mauritiana*.

Μελέτη με τη χρήση παρόμοιων μεθόδων για τον υπολογισμό ποσοστών διαρροής σε διαειδικές διασταυρώσεις μεταξύ των ειδών *D. simulans* και *D. mauritiana* έχουν γίνει και από τους Kondo et al. (1992), με τη διαφορά ότι η διαρροή δεν ανιχνευόταν σε επίπεδο ατόμου ή φύλου, αλλά σε pools των 50 ατόμων. Πιο συγκεκριμένα, οι ερευνητές ανίχνευσαν διαρροή στο 87,5% των διασταυρώσεων που μελέτησαν. Το αντίστοιχο ποσοστό διασταυρώσεων που διαπιστώθηκε διαρροή πατρικού mtDNA στην παρούσα μελέτη είναι 77,88%, το οποίο είναι αρκετά κοντά συγκριτικά με το ποσοστό που υπολόγισαν οι Kondo et al. (1992).

Έως σήμερα, ετεροπλασμία σχετιζόμενη με το φύλο (sex-linked heteroplasmy) έχει αναφερθεί μόνο σε είδη στα οποία έχει παρατηρηθεί διπλά μονογονεϊκή κληρονομία του mtDNA (DUI). Πιο συγκεκριμένα, σε είδη με το παραπάνω πρότυπο κληρονομίας, όλα τα αρσενικά είναι ετεροπλασμικά, ενώ τα θηλυκά είναι ομοπλασμικά. Ωστόσο, όλα τα είδη στα οποία έχει παρατηρηθεί το πρότυπο αυτό ανήκουν σε τέσσερις τάξεις δίθυρων (Mytiloidea, Nuculanoida, Unionoida και Veneroida) (Gusman et al. 2016). Ετεροπλασμία σχετιζόμενη με το φύλο θα μπορούσε να υπάρχει και σε άλλες περιπτώσεις υβριδίων στα οποία έχει ανιχνευθεί διαρροή πατρικού mtDNA και ετεροπλασμία (Radojčić et al. 2015; Wen et al. 2016; Mastrantonio et al. 2019a), ωστόσο η πιθανότητα αυτή μένει να διερευνηθεί.

Στην παρούσα μελέτη φάνηκε ότι η συχνότητα της διαρροής πατρικού mtDNA που ανιχνεύεται στους απογόνους, και κυρίως στα αρσενικά άτομα, είναι σημαντικά μεγαλύτερη σε κάποιες ισοθηλικές γραμμές. Ειδικότερα, στη γραμμή 5 απαντάται συχνότερη ετεροπλασμία σε σχέση με άλλες 12 γραμμές, όπως επίσης η γραμμή 7 διαφέρει σημαντικά με άλλες 10 γραμμές, αλλά και η γραμμή 2 με άλλες 4 γραμμές. Η διαφορά αυτή αποδίδεται στην ποικιλότητα που έχουν μεταξύ τους τα διαφορετικά γενετικά υπόβαθρα που φέρουν οι ισοθηλικές γραμμές *D. simulans* μεταξύ τους. Πρόσφατη μελέτη συσχέτισε, επίσης, το πυρηνικό υπόβαθρο με την εμφάνιση της ετεροπλασμίας στους ανθρώπους. Πιο συγκεκριμένα, οι ερευνητές συσχέτισαν 20 πυρηνικούς τόπους με την ετεροπλασμία, γεγονός από το οποίο έβγαλαν το συμπέρασμα ότι η ετεροπλασμία αποτελεί ένα πυρηνικά κληρονομήσιμο χαρακτηριστικό (Nandakumar et al. 2021).

Επιπρόσθετα, μαθηματικά μοντέλα έχουν καταφέρει να δείξουν ότι η διαρροή πατρικού mtDNA μπορεί να ευνοείται και να ρυθμίζεται από πυρηνικούς τόπους, ιδιαίτερα σε γρήγορα μεταβαλλόμενα περιβάλλοντα (Radzvilavicius and Johnston 2020). Ειδικότερα για περιπτώσεις υβριδισμού, η διαρροή, και η ετεροπλασμία που προκύπτει από αυτή, έχει προταθεί μαθηματικά ότι ευνοείται αντί της αυστηρής μονογονεϊκής κληρονομίας, καθώς έτσι δίνεται η δυνατότητα να αποφευχθούν επιβλαβείς αλληλεπιδράσεις μεταξύ mtDNA και nDNA. Μάλιστα, η υπόθεση αυτή υποστηρίζεται και από πειραματικά δεδομένα, καθώς η εισαγωγή πατρικών μιτοχονδρίων σε μη βιώσιμα έμβρυα υβριδίων μεταξύ των ειδών ψαριών *Megalobrama amblycephala* και *Carassius auratus* μείωσε σε ένα βαθμό τις παρατηρούμενες ανωμαλίες, ενώ τα έμβρυα παρουσίασαν σε γενικές γραμμές βελτιωμένη δραστηριότητα (Wen et al. 2022). Μάλιστα, προτείνεται ότι αυτό το πρότυπο κληρονομίας

του mtDNA μπορεί να είναι περισσότερο κανόνας, παρά εξαίρεση, σε πληθυσμούς όπου παρατηρείται υβριδισμός (Allison et al. 2021).

Υπάρχουν αρκετές περιπτώσεις διαρροής που έχουν περιγραφεί σε ενδοειδικές διασταυρώσεις, και όχι σε περιπτώσεις υβριδισμού, οι οποίες ενισχύουν την υπόθεση ότι η διαρροή δεν είναι ένα τυχαίο φαινόμενο που οφείλεται στην κατάρρευση των μηχανισμών που ρυθμίζουν τη μονογονεϊκή κληρονόμηση, αλλά ελέγχεται μέσω δράσης της φυσικής επιλογής σε πυρηνικούς γενετικούς τόπους. Μια μελέτη που δείχνει ότι η διαρροή διατηρείται με κάποιο τρόπο δυναμικά και δεν είναι τυχαία, είναι εκείνη των Nunes et al. (2013), στην οποία προσδιορίστηκε ότι σε όλα τα ετεροπλασμικά άτομα ο ένας μιτότυπος ήταν πάντα σε μικρότερη ποσότητα, με μέση συχνότητα γύρω στο 0,8%. Επιπλέον, οι Wolff et al. (2012) υπολόγισαν ότι η συχνότητα με την οποία συμβαίνει διαρροή στο είδος *D. simulans* είναι 0,66% και πρότειναν με βάση τα ευρήματά τους ότι η διαρροή είναι ένα φαινόμενο που αποτελεί αναπόσπαστο κομμάτι της κληρονόμησης του mtDNA.

Συνοψίζοντας, ο στόχος των πειραμάτων της παρούσας ενότητας ήταν να διερευνηθεί η τυχειότητα ή μη της εμφάνισης διαρροής πατρικού mtDNA σε υβρίδια του γένους *Drosophila*. Η ανάλυση των αποτελεσμάτων έδειξε ότι η συχνότητα με την οποία απαντάται η διαρροή δεν είναι τυχαία, αλλά εξαρτάται από το γενετικό υπόβαθρο, δηλαδή είναι με κάποιο τρόπο πυρηνικά καθορισμένη. Το συμπέρασμα αυτό ενισχύεται και από το γεγονός ότι δεν παρατηρήθηκε σχετιζόμενη με το φύλο ετεροπλασμία σε όλες τις ισοθηλικές γραμμές, όπως αρχικά αναμενόταν. Συνεπώς, τα δεδομένα της παρούσας μελέτης, σε συνδυασμό με δεδομένα από προηγούμενες μελέτες, οδηγούν στο συμπέρασμα ότι η μέχρι τώρα αντίληψη ότι η διαρροή προέρχεται από αποτυχία των μηχανισμών που εμπλέκονται στη μητρική κληρονόμηση του mtDNA δεν ανταποκρίνεται στην πραγματικότητα. Αντιθέτως, φαίνεται ότι η διαρροή πατρικού mtDNA, και η ετεροπλασμία που προκύπτει, εφόσον ρυθμίζεται πυρηνικά, μπορεί να έχει και ευνοϊκή επίδραση για τους οργανισμούς, ιδιαίτερα σε περιπτώσεις υβριδισμού, όπου μπορεί να συμβάλλει σε αποφυγή επιβλαβών αλληλεπιδράσεων μεταξύ mtDNA και nDNA. Επιπλέον, οφέλη από διαρροή πατρικού mtDNA υπάρχουν και σε άλλες περιπτώσεις που δε σχετίζονται με υβριδισμό, καθώς η διαρροή δίνει την ευκαιρία στο mtDNA να ανασυνδυαστεί και να απομακρύνει τυχόν επιβλαβείς μεταλλαγές που έχουν συσσωρευτεί. Τέλος, η εμφάνιση διαρροής πατρικού mtDNA στα υβρίδια σχετίζεται με αποτυχία των μεταζυγωτικών μηχανισμών που δρουν για την εξάλειψή του στη *Drosophila* (Politi et al. 2014), δηλαδή στο στάδιο του ζυγωτού δεν είναι δυνατή η

αναγνώριση των πατρικών μιτοχονδρίων και η καταστροφή τους από τα λυσοσώματα, με αποτέλεσμα την παρουσία πατρικού mtDNA στα ενήλικα άτομα.

5 Αναφορές

- Adams MD, Celniker SE, Holt RA, et al (2000) Linked references are available on JSTOR for this article : The Genome Sequence of *Drosophila mel.* *Science* (80-) 287:2185–2195
- Aitken RJ (2017) Reactive oxygen species as mediators of sperm capacitation and pathological damage. *Mol Reprod Dev* 84:1039–1052. <https://doi.org/10.1002/MRD.22871>
- Al Rawi S, Louvet-Vallée S, Djeddi A, et al (2011) Postfertilization autophagy of sperm organelles prevents paternal mitochondrial DNA transmission. *Science* 334:1144–7. <https://doi.org/10.1126/science.1211878>
- Albayrak L, Khanipov K, Pimenova M, et al (2016) The ability of human nuclear DNA to cause false positive low-abundance heteroplasmy calls varies across the mitochondrial genome. *BMC Genomics* 17:1–10. <https://doi.org/10.1186/s12864-016-3375-x>
- Allison TM, Radzvilavicius AL, Dowling DK (2021) Selection for biparental inheritance of mitochondria under hybridization and mitonuclear fitness interactions. <https://doi.org/10.1098/rspb.2021.1600>
- Ames BN, Shigenaga MK, Hagen TM (1995) Mitochondrial decay in aging. *Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis* 1271:165–170. [https://doi.org/10.1016/0925-4439\(95\)00024-X](https://doi.org/10.1016/0925-4439(95)00024-X)
- Arbeithuber B, Cremona MA, Hester J, et al (2022) Advanced age increases frequencies of de novo mitochondrial mutations in macaque oocytes and somatic tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A* 119:. <https://doi.org/10.1073/PNAS.2118740119>
- Armstrong MR, Blok VC, Phillips MS (2000) A multipartite mitochondrial genome in the potato cyst nematode *Globodera pallida*. *Genetics* 154:181–192. <https://doi.org/10.1093/GENETICS/154.1.181>
- Ashburner M, Golic KG, Hawley RS (2005) *Drosophila: a laboratory handbook*. Second edition. Ashburner M, Golic KG, Hawley RS (2011) *Drosophila: A Laboratory Handbook*. Cold Spring Harbor Laboratory Press
- Ashley EA (2016) Towards precision medicine. *Nat. Rev. Genet.* 17:507–522
- Avise JC (1994) Introduction. In: *Molecular Markers, Natural History and Evolution*. Springer US, pp 3–15
- Ayroles JF, Anna Carbone M, Stone EA, et al (2009) Systems Genetics of Complex Traits in *Drosophila melanogaster*. *Nat Genet* 41:299–307. <https://doi.org/10.1038/ng.332>
- Bai R, Cui H, Devaney JM, et al (2021) Interference of nuclear mitochondrial DNA segments in

- mitochondrial DNA testing resembles biparental transmission of mitochondrial DNA in humans. *Genet Med* 2021 238 23:1514–1521. <https://doi.org/10.1038/s41436-021-01166-1>
- Bai RK, Wong LJC (2004) Detection and quantification of heteroplasmic mutant mitochondrial DNA by real-time amplification refractory mutation system quantitative PCR analysis: A single-step approach. *Clin Chem* 50:996–1001. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2004.031153>
- Baines HL, Stewart JB, Stamp C, et al (2014) Similar patterns of clonally expanded somatic mtDNA mutations in the colon of heterozygous mtDNA mutator mice and ageing humans. *Mech. Ageing Dev.* 139:22–30
- Balciuniene J, Balciunas D (2019) A nuclear mtDNA concatemer (Mega-NUMT) could mimic paternal inheritance of mitochondrial genome. *Front Genet* 10:2018–2020. <https://doi.org/10.3389/fgene.2019.00518>
- Baldo L, de Queiroz A, Hedin M, et al (2011) Nuclear–Mitochondrial Sequences as Witnesses of Past Interbreeding and Population Diversity in the Jumping Bristletail *Mesomachilis*. *Mol Biol Evol* 28:195–210. <https://doi.org/10.1093/MOLBEV/MSQ193>
- Ballard JWO, James AC (2004) Differential fitness of mitochondrial DNA in perturbation cage studies correlates with global abundance and population history in *Drosophila simulans*. *Proc R Soc B Biol Sci* 271:1197–1201. <https://doi.org/10.1098/rspb.2004.2709>
- Ballard JWO, Melvin RG, Katewa SD, Maas K (2007) Mitochondrial DNA variation is associated with measurable differences in life-history traits and mitochondrial metabolism in *Drosophila simulans*. *Evolution (N Y)* 61:1735–1747. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.2007.00133.x>
- Ballard JWO, Rand DM (2005) The population biology of mitochondrial DNA and its phylogenetic implications. *Annu Rev Ecol Evol S* 36:621–642. <https://doi.org/10.1146/annurev.ecolsys.36.091704.175513>
- Barrett A, Arbeithuber B, Zaidi A, et al (2020) Pronounced somatic bottleneck in mitochondrial DNA of human hair. *Philos Trans R Soc B Biol Sci* 375:. <https://doi.org/10.1098/rstb.2019.0175>
- Bensasson D, Zhang DX, Hartl DL, Hewitt GM (2001) Mitochondrial pseudogenes: Evolution’s misplaced witnesses. *Trends Ecol. Evol.* 16:314–321
- Bentzen SM, Poulsen HS, Kaae S, et al (1988) Prognostic factors in osteosarcomas. A

- regression analysis. *Cancer* 62:194–202. [https://doi.org/10.1002/1097-0142\(19880701\)62:1<194::AID-CNCR2820620129>3.0.CO;2-8](https://doi.org/10.1002/1097-0142(19880701)62:1<194::AID-CNCR2820620129>3.0.CO;2-8)
- Bevers RPJ, Litovchenko M, Kapopoulou A, et al (2019) Mitochondrial haplotypes affect metabolic phenotypes in the *Drosophila* Genetic Reference Panel. *Nat Metab* 2019 112 1:1226–1242. <https://doi.org/10.1038/s42255-019-0147-3>
- Birky CW (2008) Uniparental inheritance of organelle genes. *Curr Biol* 18:692–695. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2008.06.049>
- Birky CW (1995) Uniparental inheritance of mitochondrial and chloroplast genes: mechanisms and evolution. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:11331–11338. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.25.11331>
- Biró B, Gál Z, Schiavo G, et al (2022) Nuclear mitochondrial DNA sequences in the rabbit genome. *Mitochondrion* 66:1–6. <https://doi.org/10.1016/J.MITO.2022.07.003>
- Boussau B, Karlberg EO, Frank a C, et al (2004) Computational inference of scenarios for alpha-proteobacterial genome evolution. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:9722–9727. <https://doi.org/10.1073/pnas.0400975101>
- Boyce TM, Zwick ME, Aquadro CF (1989) Mitochondrial DNA in the bark weevils: Size, structure and heteroplasmy. *Genetics* 123:825–836
- Brennan LJ, Haukedal JA, Earle JC, et al (2012) Disruption of redox homeostasis leads to oxidative DNA damage in spermatocytes of *Wolbachia*-infected *Drosophila simulans*. *Insect Mol Biol* 21:510–520. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2583.2012.01155.x>
- Burger G, Forget L, Zhu Y, et al (2003) Unique mitochondrial genome architecture in unicellular relatives of animals. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:892–897. <https://doi.org/10.1073/pnas.0336115100>
- Burgstaller JP, Johnston IG, Jones NS, et al (2014) MtDNA segregation in heteroplasmic tissues is common in vivo and modulated by haplotype differences and developmental stage. *Cell Rep* 7:2031–2041. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.05.020>
- Buroker NE, Brown JR, Gilbert TA, et al (1990) Length heteroplasmy of sturgeon mitochondrial DNA: an illegitimate elongation model. *Genetics* 124:
- Burr SP, Pezet M, Chinnery PF (2018) Mitochondrial DNA Heteroplasmy and Purifying Selection in the Mammalian Female Germ Line. *Dev Growth Differ* 60:21–32. <https://doi.org/10.1111/dgd.12420>
- C. Baião G, Strunov A, Heyworth E, et al (2021) Persistence and invasiveness of high-level

- heteroplasmy through biparental transmission of a selfish mitochondrial genome in *Drosophila*. bioRxiv. <https://doi.org/10.1101/2020.09.17.301572>
- Calabrese C, Simone D, Diroma MA, et al (2014) MToolBox: a highly automated pipeline for heteroplasmy annotation and prioritization analysis of human mitochondrial variants in high-throughput sequencing. *Bioinformatics* 30:3115–3117. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu483>
- Calvignac S, Konecny L, Malard F, Douaby C (2011) Preventing the pollution of mitochondrial datasets with nuclear mitochondrial paralogs (numts). *Mitochondrion* 11:246–254. <https://doi.org/10.1016/J.MITO.2010.10.004>
- Camacho C, Coulouris G, Avagyan V, et al (2009) BLAST+: Architecture and applications. *BMC Bioinformatics* 10:421. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-10-421>
- Cameron SL, Yoshizawa K, Mizukoshi A, et al (2011) Mitochondrial genome deletions and minicircles are common in lice (Insecta: Phthiraptera). *BMC Genomics* 12:1
- Campbell NA (2006) *Biology : exploring life*. Student text. Needham, Mass. : Pearson : Prentice Hall, [2004] ©2004
- Camus MF, Alexander-Lawrie B, Sharbrough J, Hurst GDD (2022) Inheritance through the cytoplasm. *Hered* 2022 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41437-022-00540-2>
- Chan DC, Schon EA (2012) Eliminating Mitochondrial DNA from Sperm. *Dev Cell* 22:469–470. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2012.02.008>
- Charlesworth D, Morgan MT, Charlesworth B (1993) Mutation accumulation in finite outbreeding and inbreeding populations. *Genet Res (Camb)* 61:39–56
- Chen S, Krusche P, Dolzhenko E, et al (2019) Paragraph: A graph-based structural variant genotyper for short-read sequence data. *Genome Biol* 20:1–13. <https://doi.org/10.1186/s13059-019-1909-7>
- Chin RM, Panavas T, Brown JM, Johnson KK (2018) Patient - derived lymphoblastoid cell lines harboring mitochondrial DNA mutations as tool for small molecule drug discovery. *BMC Res Notes* 4–9. <https://doi.org/10.1186/s13104-018-3297-6>
- Chow S, Yanagimoto T, Takeyama H (2021) Detection of heteroplasmy and nuclear mitochondrial pseudogenes in the Japanese spiny lobster *Panulirus japonicus*. *Sci Reports* 2021 111 11:1–10. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-01346-8>
- Chyb S, Gompel N (2013) *Atlas of Drosophila Morphology*
- Ciborowski KL, Consuegra S, García de Leániz C, et al (2007) Rare and fleeting: an example of

- interspecific recombination in animal mitochondrial DNA. *Biol Lett* 3:554–557. <https://doi.org/10.1098/rsbl.2007.0290>
- Connallon T, Camus MF, Morrow EH, Dowling DK (2018) Coadaptation of mitochondrial and nuclear genes, and the cost of mother’s curse. *Proc R Soc B Biol Sci* 285:20172257. <https://doi.org/10.1098/rspb.2017.2257>
- Cortese JD (1999) Rat liver GTP-binding proteins mediate changes in mitochondrial membrane potential and organelle fusion. *Am J Physiol Physiol* 276:C611–C620
- Dahal S, Dubey S, Raghavan SC (2018) Homologous recombination-mediated repair of DNA double-strand breaks operates in mammalian mitochondria. *Cell Mol Life Sci* 75:1641–1655. <https://doi.org/10.1007/s00018-017-2702-y>
- Davies OK, Dorey JB, Stevens MI, et al (2022) Unparalleled mitochondrial heteroplasmy and Wolbachia co-infection in the non-model bee, *Amphylaeus morosus*. *Curr Res Insect Sci* 2:100036. <https://doi.org/10.1016/J.CRIS.2022.100036>
- Dawid IB, Blackler AW (1972) Maternal and cytoplasmic inheritance of mitochondrial DNA in *Xenopus*. *Dev Biol* 29:152–161. [https://doi.org/10.1016/0012-1606\(72\)90052-8](https://doi.org/10.1016/0012-1606(72)90052-8)
- Dayama G, Emery SB, Kidd JM, Mills RE (2014) The genomic landscape of polymorphic human nuclear mitochondrial insertions. *Nucleic Acids Res* 42:12640–12649. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKU1038>
- De Fanti S, Vicario S, Lang M, et al (2017) Intra-individual purifying selection on mitochondrial DNA variants during human oogenesis. *Hum Reprod* 32:1100–1107. <https://doi.org/10.1093/humrep/dex051>
- Dean MD, Ballard KJ, Glass A, Ballard JWO (2003) Influence of Two Wolbachia Strains on Population Structure of East African *Drosophila simulans*. *Genetics* 165:1959–1969. [https://doi.org/mitochondrial-dna heteroplasmy; melanogaster species subgroup; cytoplasmic incompatibility; background selection; natural- populations; genetic-variation; comparative genomics; sequence variation; polymorphism; evolution](https://doi.org/mitochondrial-dna%20heteroplasmy%3B%20melanogaster%20species%20subgroup%3B%20cytoplasmic%20incompatibility%3B%20background%20selection%3B%20natural-%20populations%3B%20genetic-variation%3B%20comparative%20genomics%3B%20sequence%20variation%3B%20polymorphism%3B%20evolution)
- DeLuca SZ, O’Farrell PH (2012) Barriers to Male Transmission of Mitochondrial DNA in Sperm Development. *Dev Cell* 22:660–668. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2011.12.021>
- Dierckxsens N, Mardulyn P, Smits G (2020) Unraveling heteroplasmy patterns with NOVOPlasty. *NAR Genomics Bioinforma* 2:. <https://doi.org/10.1093/nargab/lqz011>
- Dokianakis E, Ladoukakis ED (2014) Different degree of paternal mtDNA leakage between male and female progeny in interspecific *Drosophila* crosses. *Ecol Evol* 4:2633–2641.

<https://doi.org/10.1002/ece3.1069>

- Dolgin E (2019) The brain's traffic problems. *Science* (80-) 363:221–223
- Doublet V, Souty-Grosset C, Bouchon D, et al (2008) A thirty million year-old inherited heteroplasmy. *PLoS One* 3:2938. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0002938>
- Du HG, Riley FL (1967) HYBRIDIZATION BETWEEN THE NUCLEAR AND KINETOPLAST DNA'S OF LEISHMANIA ENRIETTIH AND BETWEEN NUCLEAR AND MITOCHONDRIAL DNA'S OF MOUSE LIVER. *Proc Natl Acad Sci* 57:790–797
- Duan M, Chen L, Ge Q, et al (2019) Evaluating heteroplasmic variations of the mitochondrial genome from whole genome sequencing data. *Gene* 699:145–154. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2019.03.016>
- Duan M, Tu J, Lu Z (2018) Recent Advances in Detecting Mitochondrial DNA Heteroplasmic Variations. *Molecules* 23:323. <https://doi.org/10.3390/molecules23020323>
- Duran HE, Simsek-Duran F, Oehninger SC, et al (2011) The association of reproductive senescence with mitochondrial quantity, function, and DNA integrity in human oocytes at different stages of maturation. *Fertil Steril* 96:384–388. <https://doi.org/10.1016/J.FERTNSTERT.2011.05.056>
- Durham SE, Samuels DC, Chinnery PF (2006) Is selection required for the accumulation of somatic mitochondrial DNA mutations in post-mitotic cells? *Neuromuscul Disord* 16:381–386. <https://doi.org/10.1016/j.nmd.2006.03.012>
- Edgar RC, Flyvbjerg H (2015) Error filtering, pair assembly and error correction for next-generation sequencing reads. *Bioinformatics* 31:3476–3482. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btv401>
- El-Schahawi M, De López Munain A, Sarrazin AM, et al (1997) Two large Spanish pedigrees with nonsyndromic sensorineural deafness and the mtDNA mutation at nt 1555 in the 12s rRNA gene: Evidence of heteroplasmy. *Neurology* 48:453–456. <https://doi.org/10.1212/WNL.48.2.453>
- Ellison CK, Burton RS (2008) Interpopulation hybrid breakdown maps to the mitochondrial genome. *Evolution (N Y)* 62:631–638. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.2007.00305.x>
- Elson JL, Andrews RM, Chinnery PF, et al (2001) Analysis of European mtDNAs for recombination. *Am J Hum Genet* 68:145–153. <https://doi.org/10.1086/316938>
- Eusebio N, Pereira PS (2017) An eye-targeted double-RNAi screen reveals negative roles for

- the Archipelago ubiquitin ligase and CtBP in *Drosophila* Dpp-BMP2/4 signaling. *bioRxiv*.
<https://doi.org/10.1101/233791>
- Faber-Hammond JJ, Brown KH (2016a) Anchored pseudo-de novo assembly of human genomes identifies extensive sequence variation from unmapped sequence reads. *Hum Genet* 135:727–740. <https://doi.org/10.1007/S00439-016-1667-5>
- Faber-Hammond JJ, Brown KH (2016b) Pseudo-De Novo Assembly and Analysis of Unmapped Genome Sequence Reads in Wild Zebrafish Reveal Novel Gene Content. *Zebrafish* 13:95–102. <https://doi.org/10.1089/ZEB.2015.1154>
- Fan W, Waymire KG, Narula N, et al (2008) A mouse model of mitochondrial disease reveals germline selection against severe mtDNA mutations. *Science* 319:958–62. <https://doi.org/10.1126/science.1147786>
- Fatima N, Petri A, Gyllensten U, et al (2020) Evaluation of Single-Molecule Sequencing Technologies for Structural Variant Detection in Two Swedish Human Genomes. *Genes* 2020, Vol 11, Page 1444 11:1444. <https://doi.org/10.3390/GENES11121444>
- Fauron CM, Wolstenholme DR (1980) Intraspecific diversity of nucleotide sequences within the adenine + thymine-rich region of mitochondrial DNA molecules of *Drosophila mauritiana*, *Drosophila melanogaster* and *Drosophila simulans*. *Nucleic Acids Res* 8:5391–410
- Fazzini F, Fendt L, Schönherr S, et al (2021) Analyzing Low-Level mtDNA Heteroplasmy—Pitfalls and Challenges from Bench to Benchmarking. *Int J Mol Sci* 22:935. <https://doi.org/10.3390/ijms22020935>
- Felsenstein J (1974) The evolutionary advantage of recombination. *Genetics* 78:737–756
- Floros VI, Pyle A, Dletmann S, et al (2018) Segregation of mitochondrial DNA heteroplasmy through a developmental genetic bottleneck in human embryos. *Nat Cell Biol* 20:144–151. <https://doi.org/10.1038/s41556-017-0017-8>
- Folmer O, Black M, Hoeh W, et al (1994) DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Mol Mar Biol Biotechnol* 3:294–9
- Fonseca VG, Nichols B, Lallias D, et al (2012) Sample richness and genetic diversity as drivers of chimera formation in nSSU metagenetic analyses. *Nucleic Acids Res* 40:1–9. <https://doi.org/10.1093/nar/gks002>
- Fontaine KM, Cooley JR, Simon C (2007) Evidence for paternal leakage in hybrid periodical

- cicadas (Hemiptera: Magicicada spp.). PLoS One. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0000892>
- Freyer C, Cree LM, Mourier A, et al (2012) Variation in germline mtDNA heteroplasmy is determined prenatally but modified during subsequent transmission. *Nat Genet* 44:1282–1285. <https://doi.org/10.1038/ng.2427>
- Gandolfi A, Crestanello B, Fagotti A, et al (2017) New Evidences of Mitochondrial DNA Heteroplasmy by Putative Paternal Leakage between the Rock Partridge (*Alectoris graeca*) and the Chukar Partridge (*Alectoris chukar*). *PLoS One* 12:e0170507. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0170507>
- Gantenbein B, Fet V, Gantenbein-Ritter I a, Balloux F (2005) Evidence for recombination in scorpion mitochondrial DNA (Scorpiones: Buthidae). *Proc Biol Sci* 272:697–704. <https://doi.org/10.1098/rspb.2004.3017>
- Garesse R, Kaguni LS (2005) A Drosophila model of mitochondrial DNA replication: proteins, genes and regulation. *IUBMB Life* 57:555–61. <https://doi.org/10.1080/15216540500215572>
- Gemmell NJ, Metcalf VJ, Allendorf FW (2004) Mother's curse: The effect of mtDNA on individual fitness and population viability. *Trends Ecol Evol* 19:238–244. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2004.02.002>
- Gibson T, Blok VC, Phillips MS, et al (2007) The mitochondrial subgenomes of the nematode *Globodera pallida* are mosaics: Evidence of recombination in an animal mitochondrial genome. *J Mol Evol* 64:463–471. <https://doi.org/10.1007/s00239-006-0187-7>
- Gillham NW (1994) *Organelle Genes and Genomes*. Oxford University Press
- Goios A, Prieto L, Amorim A, Pereira L (2008) Specificity of mtDNA-directed PCR-influence of NUClear MTDNA insertion (NUMT) contamination in routine samples and techniques. *Int J Legal Med* 122:341–345. <https://doi.org/10.1007/s00414-007-0191-5>
- González M del M, Ramos A, Aluja MP, Santos C (2020) Sensitivity of mitochondrial DNA heteroplasmy detection using Next Generation Sequencing. *Mitochondrion* 50:88–93. <https://doi.org/10.1016/J.MITO.2019.10.006>
- Goodwin S, McPherson JD, McCombie WR (2016) Coming of age: Ten years of next-generation sequencing technologies. *Nat. Rev. Genet.* 17:333–351
- Gorman GS, Chinnery PF, DiMauro S, et al (2016) Mitochondrial diseases. *Nat Rev Dis Prim* 2:1–23. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2016.80>

- Gorman GS, Schaefer AM, Ng Y, et al (2015) Prevalence of nuclear and mitochondrial DNA mutations related to adult mitochondrial disease. *Ann Neurol* 77:753–759. <https://doi.org/10.1002/ana.24362>
- Grandhi S, Bosworth C, Maddox W, et al (2017) Heteroplasmic shifts in tumor mitochondrial genomes reveal tissue-specific signals of relaxed and positive selection. *Hum Mol Genet* 26:2912–2922. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddx172>
- Guo X, Liu S, Liu Y (2006) Evidence for recombination of mitochondrial DNA in triploid crucian carp. *Genetics* 172:1745–1749. <https://doi.org/10.1534/genetics.105.049841>
- Gurgul A, Szmatoła T, Ochoń E, et al (2022) Another lesson from unmapped reads: in-depth analysis of RNA-Seq reads from various horse tissues. *J Appl Genet* 1–11. <https://doi.org/10.1007/s13353-022-00705-z>
- Gusman A, Lecomte S, Stewart DT, et al (2016) Pursuing the quest for better understanding the taxonomic distribution of the system of doubly uniparental inheritance of mtDNA. *PeerJ*. <https://doi.org/10.7717/peerj.2760>
- Gyllensten U, Wharton D, Josefsson a, Wilson a C (1991) Paternal Inheritance of Mitochondrial-Dna in Mice. *Nature* 352:255–257
- Hadjivasiliou Z, Pomiankowski A, Seymour RM, Lane N (2012) Selection for mitonuclear co-adaptation could favour the evolution of two sexes. *Proc R Soc B Biol Sci* 279:1865–1872. <https://doi.org/10.1098/RSPB.2011.1871>
- Halley YA, Oldeschulte DL, Bhattarai EK, et al (2015) Northern Bobwhite (*Colinus virginianus*) Mitochondrial Population Genomics Reveals Structure, Divergence, and Evidence for Heteroplasmy. *PLoS One* 10:e0144913. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0144913>
- Harrison RG, Rand DM, Wheeler WC (1985) Mitochondrial DNA size variation within individual crickets. *Science (80-)* 228:1446–1448. <https://doi.org/10.1126/science.228.4706.1446>
- Hauswirth W, Laipis P (1982) Mitochondrial DNA polymorphism in a maternal lineage of Holstein cows. *Proc Natl Acad Sci* 79:4686–4690
- Hazkani-Covo E, Zeller RM, Martin W (2010) Molecular Poltergeists: Mitochondrial DNA Copies (numts) in Sequenced Nuclear Genomes. *PLOS Genet* 6:e1000834. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PGEN.1000834>
- He Y, Wu J, Dressman DC, et al (2010) Heteroplasmic mitochondrial DNA mutations in normal and tumour cells. *Nature* 464:610–614. <https://doi.org/10.1038/nature08802>
- Hentges KE, Justice MJ (2004) Checks and balancers: Balancer chromosomes to facilitate

- genome annotation. Trends Genet 20:252–259.
<https://doi.org/10.1016/j.tig.2004.04.004>
- Hill JH, Chen Z, Xu H (2014) Selective propagation of functional mitochondrial DNA during oogenesis restricts the transmission of a deleterious mitochondrial variant. *Nat Genet* 46:389–92. <https://doi.org/10.1038/ng.2920>
- Hindson BJ, Ness KD, Masquelier DA, et al (2011) High-throughput droplet digital PCR system for absolute quantitation of DNA copy number. *Anal Chem* 83:8604–8610. <https://doi.org/10.1021/ac202028g>
- Hoarau G, Holla S, Lescasse R, et al (2002) Heteroplasmy and Evidence for Recombination in the Mitochondrial Control Region of the Flatfish *Platichthys flesus*. *Mol Biol Evol* 19:2261–2264. <https://doi.org/10.1093/OXFORDJOURNALS.MOLBEV.A004049>
- Hoekstra RF (2000) Evolutionary origin and consequences of uniparental mitochondrial inheritance. *Hum Reprod* 15 Suppl 2:102–111. https://doi.org/10.1093/humrep/15.suppl_2.102
- Holden LA, Arumilli M, Hytönen MK, et al (2018) Assembly and Analysis of Unmapped Genome Sequence Reads Reveal Novel Sequence and Variation in Dogs. *Sci Rep* 8:1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-29190-3>
- Hood WR, Williams AS, Hill GE (2019) An Ecologist’s Guide to Mitochondrial DNA Mutations and Senescence. *Integr Comp Biol* 59:970–982. <https://doi.org/10.1093/ICB/ICZ097>
- Hoolahan AH, Blok VC, Gibson T, Dowton M (2012) Evidence of animal mtDNA recombination between divergent populations of the potato cyst nematode *Globodera pallida*. *Genetica* 140:19–29. <https://doi.org/10.1007/s10709-012-9651-z>
- Hou CC, Gao XM, Ni J, et al (2018) The expression pattern and potential functions of PHB in the spermiogenesis of *Phascolosoma esculenta*. *Gene* 652:25–38. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2018.01.056>
- Hou CC, Wei CG, Lu CP, et al (2017) Prohibitin-mediated mitochondrial ubiquitination during spermiogenesis in Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis*. *Oncotarget* 8:98782–98797. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.21961>
- Huang W, Massouras A, Inoue Y, et al (2014) Natural variation in genome architecture among 205 *Drosophila melanogaster* Genetic Reference Panel lines. *Genome Res* 24:1193–1208. <https://doi.org/10.1101/gr.171546.113>
- Innocenti P, Morrow EH, Dowling DK (2011) Experimental Evidence Supports a Sex-Specific

Selective Sieve in Mitochondrial Genome Evolution.
<https://doi.org/10.1126/science.1203866>

Jaberi E, Tresse E, Grønbaek K, et al (2020) Identification of unique and shared mitochondrial DNA mutations in neurodegeneration and cancer by single-cell mitochondrial DNA structural variation sequencing (MitoSV-seq). *EBioMedicine* 57:102868.
<https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2020.102868>

Jang JY, Blum A, Liu J, Finkel T (2018) The role of mitochondria in aging. *J Clin Invest* 128:3662–3670. <https://doi.org/10.1172/JCI120842>

Jenuth JP, Peterson AC, Shoubridge EA (1997) Tissue-specific selection for different mtDNA genotypes in heteroplasmic mice. *Nat Genet* 1997 161 16:93–95.
<https://doi.org/10.1038/ng0597-93>

Kang E, Wu J, Gutierrez NM, et al (2016) Mitochondrial replacement in human oocytes carrying pathogenic mitochondrial DNA mutations. *Nature* 540:270–275.
<https://doi.org/10.1038/nature20592>

Kauppila TES, Kauppila JHK, Larsson NG (2017) Mammalian Mitochondria and Aging: An Update. *Cell Metab* 25:57–71. <https://doi.org/10.1016/j.CMET.2016.09.017>

Kaya S, Çıplak B (2018) Possibility of numt co-amplification from gigantic genome of Orthoptera: testing efficiency of standard PCR protocol in producing orthologous COI sequences. *Heliyon* 4:e00929. <https://doi.org/10.1016/J.HELIYON.2018.E00929>

Kelly PS, Clarke C, Costello A, et al (2017) Ultra-deep next generation mitochondrial genome sequencing reveals widespread heteroplasmy in Chinese hamster ovary cells. *Metab Eng* 41:11–22. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2017.02.001>

Kern AD, Kondrashov FA (2004) Mechanisms and convergence of compensatory evolution in mammalian mitochondrial tRNAs. *Nat Genet* 36:1207–1212

Kondo R, Matsuura ET, Chigusa SI (1992) Further observation of paternal transmission of *Drosophila* mitochondrial DNA by PCR selective amplification method. *Genet Res* 59:81–84

Kopinski PK, Janssen KA, Schaefer PM, et al (2019) Regulation of nuclear epigenome by mitochondrial DNA heteroplasmy. *Proc Natl Acad Sci* 116:16028–16035.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1906896116>

Kowal K, Tkaczyk A, Pierzchała M, et al (2020) Identification of Mitochondrial DNA (NUMTs) in the Nuclear Genome of *Daphnia magna*. *Int J Mol Sci* 2020, Vol 21, Page 8725 21:8725.

<https://doi.org/10.3390/IJMS21228725>

- Kraytsberg Y, Schwartz M, Brown T a, et al (2004) Recombination of human mitochondrial DNA. *Science* (80-) 304:981. <https://doi.org/10.1126/science.1096342>
- Kuijper B, Lane N, Pomiankowski A (2015) Can paternal leakage maintain sexually antagonistic polymorphism in the cytoplasm? *J Evol Biol* 28:468–480. <https://doi.org/10.1111/jeb.12582>
- Kvist L, Martens J, Nazarenko AA, Orell M (2003) Paternal leakage of mitochondrial DNA in the great tit (*Parus major*). *Mol Biol Evol* 20:243–247. <https://doi.org/10.1093/molbev/msg025>
- Ladoukakis E d., Saavedra C, Magoulas A, Zouros E (2002) Mitochondrial DNA variation in a species with two mitochondrial genomes: the case of *Mytilus galloprovincialis* from the Atlantic, the Mediterranean and the Black Sea. *Mol Ecol* 11:755–769. <https://doi.org/10.1046/j.1365-294X.2002.01473.x>
- Ladoukakis ED, Zouros E (2001) Direct evidence for homologous recombination in mussel (*Mytilus galloprovincialis*) mitochondrial DNA. *Mol Biol Evol* 18:1168–1175. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a003904>
- Ladoukakis ED, Zouros E (2017) Evolution and inheritance of animal mitochondrial DNA: Rules and exceptions. *J. Biol. Res.*
- Laine VN, Gossmann TI, Van Oers K, et al (2019) Exploring the unmapped DNA and RNA reads in a songbird genome. *BMC Genomics* 20:1–12. <https://doi.org/10.1186/s12864-018-5378-2>
- Lambert C, Braxton C, Charlebois RL, et al (2018) Considerations for optimization of high-throughput sequencing bioinformatics pipelines for virus detection. *Viruses* 10:528
- Lane N (2012) The problem with mixing mitochondria. *Cell* 151:246–8. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.09.028>
- Lang M, Sazzini M, Calabrese FM, et al (2012) Polymorphic NumtS trace human population relationships. *Hum Genet* 131:757–771. <https://doi.org/10.1007/S00439-011-1125-3>
- Lansman RA, Avise JC, Huettel MD (1983) Critical experimental test of the possibility of “paternal leakage” of mitochondrial DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 80:1969–1971. <https://doi.org/10.1073/pnas.80.7.1969>
- Lareau CA, Ludwig LS, Muus C, et al (2021) Massively parallel single-cell mitochondrial DNA genotyping and chromatin profiling. *Nat Biotechnol* 39:451–461.

<https://doi.org/10.1038/s41587-020-0645-6>

Laricchia KM, Lake NJ, Watts NA, et al (2022) Mitochondrial DNA variation across 56,434 individuals in gnomAD. *Genome Res* 32:569–582.

<https://doi.org/10.1101/GR.276013.121/-/DC1>

Latorre-Pellicer A, Lechuga-Vieco AV, Johnston IG, et al (2019) Regulation of Mother-to-Offspring Transmission of mtDNA Heteroplasmy. *Cell Metab* 30:1120-1130.e5.

<https://doi.org/10.1016/j.cmet.2019.09.007>

Lechuga-Vieco AV, Latorre-Pellicer A, Calvo E, et al (2022) Heteroplasmy of Wild-Type Mitochondrial DNA Variants in Mice Causes Metabolic Heart Disease with Pulmonary Hypertension and Frailty. *Circulation* 145:1084–1101.

<https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.121.056286>

Lechuga-Vieco AV, Latorre-Pellicer A, Johnston IG, et al (2020) Cell identity and nucleomitochondrial genetic context modulate OXPHOS performance and determine somatic heteroplasmy dynamics. *Sci Adv* 6:1–14. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aba5345>

Lee WH, Watanabe TK (1987) Evolutionary genetics of the *Drosophila melanogaster* subgroup. I. Phylogenetic relationships based on matings, hybrids and proteins. *Japanese J Genet* 62:225–239

Lewis OL, Farr CL, Kaguni LS (1995) *Drosophila melanogaster* mitochondrial DNA: completion of the nucleotide sequence and evolutionary comparisons. *Insect Mol Biol* 4:263–278.

<https://doi.org/10.1111/J.1365-2583.1995.TB00032.X>

Li H (2013) Aligning sequence reads, clone sequences and assembly contigs with BWA-MEM.

<https://doi.org/10.48550/arxiv.1303.3997>

Li H, Handsaker B, Wysoker A, et al (2009) The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics* 25:2078–2079.

<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp352>

Li M, Rothwell R, Vermaat M, et al (2016) Transmission of human mtDNA heteroplasmy in the genome of the Netherlands families: Support for a variable-size bottleneck. *Genome Res* 26:417–426. <https://doi.org/10.1101/gr.203216.115>

Li M, Schröder R, Ni S, et al (2015a) Extensive tissue-related and allele-related mtDNA heteroplasmy suggests positive selection for somatic mutations. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112:2491–2496. <https://doi.org/10.1073/pnas.1419651112>

Li M, Schröder R, Ni S, et al (2015b) Extensive tissue-related and allele-related mtDNA

- heteroplasmy suggests positive selection for somatic mutations. *Proc Natl Acad Sci* 112:.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1419651112>
- Li M, Schroeder R, Ko A, Stoneking M (2012) Fidelity of capture-enrichment for mtDNA genome sequencing: influence of NUMTs. *Nucleic Acids Res* 40:e137–e137.
<https://doi.org/10.1093/NAR/GKS499>
- Li R, Zhu H, Ruan J, et al (2010) De novo assembly of human genomes with massively parallel short read sequencing. *Genome Res* 20:265–272.
<https://doi.org/10.1101/gr.097261.109>
- Lieber T, Jeedigunta SP, Palozzi JM, et al (2019) Mitochondrial fragmentation drives selective removal of deleterious mtDNA in the germline. *Nature* 570:380–384.
<https://doi.org/10.1038/s41586-019-1213-4>
- Liu Y, Koyutürk M, Maxwell S, et al (2014) Discovery of common sequences absent in the human reference genome using pooled samples from next generation sequencing. *BMC Genomics* 15:1–14. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-685/FIGURES/7>
- Loewe L (2006) Quantifying the genomic decay paradox due to Muller ' s ratchet in human mitochondrial DNA Quantifying the genomic decay paradox due to Muller ' s ratchet in human mitochondrial DNA. *Genet Res* 87:133–159.
<https://doi.org/10.1017/S0016672306008123>
- Loomis EW, Eid JS, Peluso P, et al (2013) Sequencing the unsequenceable: Expanded CGG-repeat alleles of the fragile X gene. *Genome Res* 23:121–128.
<https://doi.org/10.1101/gr.141705.112>
- Lopez J V, Yuhki N, Masuda R, et al (1994) Numt, a Recent Transfer and Tandem Amplification of Mitochondrial DNA to the Nuclear Genome of the Domestic Cat
- Lunt DH, Hyman BC (1997) Animal mitochondrial DNA recombination. *Nature* 387:247.
<https://doi.org/10.1038/387247a0>
- Luo S, Valencia CA, Zhang J, et al (2019) Reply to Lutz-Bonengel et al.: Biparental mtDNA transmission is unlikely to be the result of nuclear mitochondrial DNA segments. *Proc Natl Acad Sci* 116:1823–1824. <https://doi.org/10.1073/PNAS.1821357116>
- Luo S, Valencia CA, Zhang J, et al (2018) Biparental Inheritance of Mitochondrial DNA in Humans. *Proc Natl Acad Sci U S A* 115:13039–13044.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1810946115>
- Lutz-Bonengel S, Niederstätter H, Naue J, et al (2021) Evidence for multi-copy Mega-NUMT s

- in the human genome . *Nucleic Acids Res.* <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa1271>
- Lutz-Bonengel S, Parson W (2019) No further evidence for paternal leakage of mitochondrial DNA in humans yet. *Proc Natl Acad Sci* 116:1821–1822. <https://doi.org/10.1073/PNAS.1820533116>
- Lynch M (1997) Mutation accumulation in nuclear, organelle, and prokaryotic transfer RNA genes. *Mol Biol Evol* 14:914–925
- Lynch M, Blanchard JL (1998) Deleterious mutation accumulation in organelle genomes. *Genetica* 102–103:25–33. <https://doi.org/10.1023/a:1017022522486>
- Ma H, Hayama T, Van Dyken C, et al (2020) Deleterious mtDNA mutations are common in mature oocytes. *Biol Reprod* 102:607–619. <https://doi.org/10.1093/BIOLRE/IOZ202>
- Ma H, O’Farrell PH (2015) Selections that isolate recombinant mitochondrial genomes in animals. *Elife* 4:1–16. <https://doi.org/10.7554/eLife.07247>
- Ma H, Xu H, O’Farrell PH (2014) Transmission of mitochondrial mutations and action of purifying selection in *Drosophila melanogaster*. *Nat Genet* 46:393–7. <https://doi.org/10.1038/ng.2919>
- Machado TS, Macabelli CH, Collado M Del, et al (2020) Evidence of Selection Against Damaged Mitochondria During Early Embryogenesis in the Mouse. *Front Genet* 11:1–9. <https://doi.org/10.3389/fgene.2020.00762>
- Mackay TFC, Richards S, Stone EA, et al (2012) The *Drosophila melanogaster* Genetic Reference Panel. *Nature* 482:173–178. <https://doi.org/10.1038/nature10811>
- Maeda R, Kami D, Maeda H, et al (2020) High throughput single cell analysis of mitochondrial heteroplasmy in mitochondrial diseases. *Sci Rep* 10:1–10. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-67686-z>
- Magnacca KN, Brown MJF (2010) Tissue segregation of mitochondrial haplotypes in heteroplasmic Hawaiian bees: Implications for DNA barcoding. *Mol Ecol Resour* 10:60–68. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2009.02724.x>
- Marquis J, Lefebvre G, Kourmpetis YAI, et al (2017) MitoRS, a method for high throughput, sensitive, and accurate detection of mitochondrial DNA heteroplasmy. *BMC Genomics* 18:326. <https://doi.org/10.1186/s12864-017-3695-5>
- Marshall AS, Jones NS (2021) Discovering Cellular Mitochondrial Heteroplasmy Heterogeneity with Single Cell RNA and ATAC Sequencing. *Biol* 2021, Vol 10, Page 503 10:503. <https://doi.org/10.3390/BIOLOGY10060503>

- Martin WF, Garg S, Zimorski V (2015) Endosymbiotic theories for eukaryote origin. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 370:20140330. <https://doi.org/10.1098/rstb.2014.0330>
- Mastrantonio V, Latrofa MS, Porretta D, et al (2019a) Paternal leakage and mtDNA heteroplasmy in *Rhipicephalus* spp. ticks. *Sci Rep* 9:1460. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-38001-8>
- Mastrantonio V, Urbanelli S, Porretta D (2019b) Ancient hybridization and mtDNA introgression behind current paternal leakage and heteroplasmy in hybrid zones. *Sci Reports* 2019 9:1–9. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-55764-w>
- Maté ML, Di Rocco F, Zambelli A, Vidal-Rioja L (2007) Mitochondrial heteroplasmy in Control Region DNA of South American camelids. *Small Rumin Res* 71:123–129. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2006.04.016>
- Maude H, Davidson M, Charitakis N, et al (2019) NUMT Confounding Biases Mitochondrial Heteroplasmy Calls in Favor of the Reference Allele. *Front cell Dev Biol* 7:. <https://doi.org/10.3389/FCELL.2019.00201>
- McBride HM, Neuspiel M, Wasiak S (2006) Mitochondria: More Than Just a Powerhouse. *Curr Biol* 16:551–560. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2006.06.054>
- Meiklejohn CD, Holmbeck MA, Siddiq MA, et al (2013) An Incompatibility between a Mitochondrial tRNA and Its Nuclear-Encoded tRNA Synthetase Compromises Development and Fitness in *Drosophila*. *PLoS Genet* 9:e1003238. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003238>
- Meusel MS, Moritz RF (1993) Transfer of paternal mitochondrial DNA during fertilization of honeybee (*Apis mellifera* L.) eggs. *Curr Genet* 24:539–543. <https://doi.org/10.1007/BF00351719>
- Meza-Lázaro RN, Poteaux C, Bayona-Vásquez NJ, et al (2018) Extensive mitochondrial heteroplasmy in the neotropical ants of the *Ectatomma ruidum* complex (Formicidae: Ectatomminae). *Mitochondrial DNA Part A, DNA mapping, Seq Anal* 29:1203–1214. <https://doi.org/10.1080/24701394.2018.1431228>
- Modesti L, Danese A, Vitto VAM, et al (2021) Mitochondrial Ca²⁺ Signaling in Health, Disease and Therapy. *Cells* 10:. <https://doi.org/10.3390/CELLS10061317>
- Mok BY, de Moraes MH, Zeng J, et al (2020) A bacterial cytidine deaminase toxin enables CRISPR-free mitochondrial base editing. *Nature* 583:631–637. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2477-4>

- Molina P, Lim Y, Boyd L (2019) Ubiquitination is required for the initial removal of paternal organelles in *C. elegans*. *Dev Biol* 453:168–179. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2019.05.015>
- Monaghan P, Metcalfe NB (2019) The deteriorating soma and the indispensable germline: Gamete senescence and offspring fitness. *Proc R Soc B Biol Sci* 286:. <https://doi.org/10.1098/rspb.2019.2187>
- Morgan JAT, Macbeth M, Broderick D, et al (2013) Hybridisation, paternal leakage and mitochondrial DNA linearization in three anomalous fish (Scombridae). *Mitochondrion* 13:852–61. <https://doi.org/10.1016/j.mito.2013.06.002>
- Morris J, Na YJ, Zhu H, et al (2017) Pervasive within-Mitochondrion Single-Nucleotide Variant Heteroplasmy as Revealed by Single-Mitochondrion Sequencing. *Cell Rep* 21:2706–2713. <https://doi.org/10.1016/j.CELREP.2017.11.031>
- Mossman JA, Biancani LM, Zhu C-T, Rand DM (2016) Mitonuclear Epistasis for Development Time and its Modification by Diet in *Drosophila*. *Genetics* 203:463–484. <https://doi.org/10.1534/genetics.116.187286>
- Mourier T, Hansen AJ, Willerslev E, Arctander P (2001) The Human Genome Project Reveals a Continuous Transfer of Large Mitochondrial Fragments to the Nucleus. *Mol Biol Evol* 18:1833–1837. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a003971>
- Muller HJ (1964) The relation of recombination to mutational advance. *Mutat Res Mol Mech Mutagen* 1:2–9. [https://doi.org/10.1016/0027-5107\(64\)90047-8](https://doi.org/10.1016/0027-5107(64)90047-8)
- Mustafa MF, Fakurazi S, Abdullah MA, Maniam S (2020) Pathogenic Mitochondria DNA Mutations: Current Detection Tools and Interventions. *Nature* 388:192
- Mwesigwa S, Williams L, Retshabile G, et al (2021) Unmapped exome reads implicate a role for Anelloviridae in childhood HIV-1 long-term non-progression. *npj Genomic Med* 6:1–9. <https://doi.org/10.1038/s41525-021-00185-w>
- Mwinyi A, Meyer A, Bleidorn C, et al (2009) Mitochondrial genome sequence and gene order of *Sipunculus nudus* give additional support for an inclusion of Sipuncula into Annelida. *BMC Genomics* 10:27. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-10-27>
- Nacer DF, Raposo do Amaral F (2017) Striking pseudogenization in avian phylogenetics: Numts are large and common in falcons. *Mol Phylogenet Evol* 115:1–6. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2017.07.002>
- Nandakumar P, Tian C, O'connell J, et al (2021) Nuclear genome-wide associations with

mitochondrial heteroplasmy. *Sci Adv* 7:7520–7537

Naue J, Hörer S, Sängler T, et al (2015) Evidence for frequent and tissue-specific sequence heteroplasmy in human mitochondrial DNA. *Mitochondrion* 20:82–94. <https://doi.org/10.1016/J.MITO.2014.12.002>

Neiman M, Taylor DR (2009) The causes of mutation accumulation in mitochondrial genomes. *Proc Biol Sci* 276:1201–9. <https://doi.org/10.1098/rspb.2008.1758>

Nergadze SG, Lupotto M, Pellanda P, et al (2010) Mitochondrial DNA insertions in the nuclear horse genome. *Anim Genet* 41:176–185. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2052.2010.02130.X>

Nesbø CL, Arab MO, Jakobsen KS (1998) Heteroplasmy, length and sequence variation in the mtDNA control regions of three percid fish species (*Perca fluviatilis*, *Acerina cernua*, *Stizostedion lucioperca*). *Genetics* 148:1907–1919

Nishimura Y, Yoshinari T, Naruse K, et al (2006) Active digestion of sperm mitochondrial DNA in single living sperm revealed by optical tweezers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:1382–1387. <https://doi.org/10.1073/pnas.0506911103>

Nissanka N, Moraes CT (2020) Mitochondrial DNA heteroplasmy in disease and targeted nuclease-based therapeutic approaches. *EMBO Rep* 21:1–12. <https://doi.org/10.15252/embr.201949612>

Nisztuk-Pacek S, Ślaska B, Grzybowska-Szatkowska L, Babicz M (2019) Paternal leakage of mitochondrial dna in the raccoon dog (*Nyctereutes procyonoides gray 1834*). *Anim Sci* 19:61–69. <https://doi.org/10.2478/aoas-2018-0049>

Nosek J, Fukuhara H, Suyama Y, et al (1998) Linear mitochondrial genomes: 30 years down the line. *Trends Genet* 14:184–188

Nunes MDS, Dolezal M, Schlötterer C (2013) Extensive paternal mtDNA leakage in natural populations of *Drosophila melanogaster*. *Mol Ecol* 22:2106–2117. <https://doi.org/10.1111/mec.12256>

O’neill SL, Giordano R, Colbert AME, et al (1992) 16S rRNA phylogenetic analysis of the bacterial endosymbionts associated with cytoplasmic incompatibility in insects

Osada N, Akashi H (2012) Mitochondrial–Nuclear Interactions and Accelerated Compensatory Evolution: Evidence from the Primate Cytochrome c Oxidase Complex. *Mol Biol Evol* 29:337–346. <https://doi.org/10.1093/MOLBEV/MSR211>

Otten ABC, Stassen APM, Adriaens M, et al (2016) Replication errors made during oogenesis

lead to detectable De novo mtDNA mutations in zebrafish oocytes with a low mtDNA copy number. *Genetics* 204:1423–1431. <https://doi.org/10.1534/genetics.116.194035>

Owczarzy R, Tataurov A V., Wu Y, et al (2008) IDT SciTools: a suite for analysis and design of nucleic acid oligomers. *Nucleic Acids Res* 36:163–169. <https://doi.org/10.1093/nar/gkn198>

Paduan K dos S, Ribolla PEM (2008) Mitochondrial DNA polymorphism and heteroplasmy in populations of *Aedes aegypti* in Brazil. *J Med Entomol* 45:59–67. [https://doi.org/10.1603/0022-2585\(2008\)45](https://doi.org/10.1603/0022-2585(2008)45)

Palozzi JM, Jeedigunta SP, Hurd TR (2018) Mitochondrial DNA Purifying Selection in Mammals and Invertebrates. *J. Mol. Biol.* 430:4834–4848

Pamilo P, Viljakainen L, Vihavainen A (2007) Exceptionally High Density of NUMTs in the Honeybee Genome. *Mol Biol Evol* 24:1340–1346. <https://doi.org/10.1093/MOLBEV/MSM055>

Parakatselaki M-E, Ladoukakis ED (2021) mtDNA Heteroplasmy: Origin, Detection, Significance, and Evolutionary Consequences. *Life* 2021, Vol 11, Page 633 11:633. <https://doi.org/10.3390/LIFE11070633>

Patel MR, Miriyala GK, Littleton AJ, et al (2016) A mitochondrial DNA hypomorph of cytochrome oxidase specifically impairs male fertility in *Drosophila melanogaster*. *Elife* 5:. <https://doi.org/10.7554/eLife.16923>

Payne BAI, Wilson IJ, Yu-Wai-Man P, et al (2013) Universal heteroplasmy of human mitochondrial DNA. *Hum Mol Genet* 22:384–390. <https://doi.org/10.1093/hmg/dds435>

Pereira RJ, Ruiz-Ruano FJ, Thomas CJE, et al (2021) Mind the numt: Finding informative mitochondrial markers in a giant grasshopper genome. *J Zool Syst Evol Res* 59:635–645. <https://doi.org/10.1111/JZS.12446>

Piganeau G, Eyre-Walker a (2004) A reanalysis of the indirect evidence for recombination in human mitochondrial DNA. *Heredity (Edinb)* 92:282–8. <https://doi.org/10.1038/sj.hdy.6800413>

Poe BG, Navratil M, Arriaga EA (2007) Absolute quantitation of a heteroplasmic mitochondrial DNA deletion using a multiplex three-primer real-time PCR assay. *Anal Biochem* 362:193–200. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2006.12.035>

Politi Y, Gal L, Kalifa Y, et al (2014) Paternal mitochondrial destruction after fertilization is mediated by a common endocytic and autophagic pathway in *drosophila*. *Dev Cell*.

<https://doi.org/10.1016/j.devcel.2014.04.005>

Polovina ES, Parakatselaki ME, Ladoukakis ED (2020) Paternal leakage of mitochondrial DNA and maternal inheritance of heteroplasmy in *Drosophila* hybrids. *Sci Rep* 10:1–9. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-59194-x>

Puslednik L, Yeates DK, Faith DP, Ballard JWO (2012) Protein-protein interactions of the cytochrome c oxidase DNA barcoding region. *Syst Entomol* 37:229–236. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3113.2011.00597.x>

Radojčić JM, Krizmanić I, Kasapidis P, Zouros E (2015) Extensive mitochondrial heteroplasmy in hybrid water frog (*Pelophylax* spp.) populations from Southeast Europe. *Ecol Evol* 5:4529–4541. <https://doi.org/10.1002/ece3.1692>

Radzvilavicius A, Johnston IG (2020) Paternal leakage of organelles can improve adaptation to changing environments. *bioRxiv*. <https://doi.org/10.1101/2020.12.18.423500>

Radzvilavicius AL, Hadjivasiliou Z, Pomiankowski A, Lane N (2016) Selection for Mitochondrial Quality Drives Evolution of the Germline. *PLoS Biol* 14:e2000410. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.2000410>

Radzvilavicius AL, Lane N, Pomiankowski A (2017) Sexual conflict explains the extraordinary diversity of mechanisms regulating mitochondrial inheritance. *BMC Biol* 15:. <https://doi.org/10.1186/s12915-017-0437-8>

Rajasimha HK, Chinnery PF, Samuels DC (2008) Selection against Pathogenic mtDNA Mutations in a Stem Cell Population Leads to the Loss of the 3243A→G Mutation in Blood. *Am J Hum Genet* 82:333–343. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2007.10.007>

Rand DM (2001) The Units of Selection on Mitochondrial DNA. *Annu Rev Ecol Syst* 32:415–448. <https://doi.org/10.1146/annurev.ecolsys.32.081501.114109>

Rebolledo-Jaramillo B, Su MSW, Stoler N, et al (2014) Maternal age effect and severe germline bottleneck in the inheritance of human mitochondrial DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111:15474–15479. <https://doi.org/10.1073/pnas.1409328111>

Ricchetti M, Tekaia F, Dujon B (2004) Continued Colonization of the Human Genome by Mitochondrial DNA. *PLOS Biol* 2:e273. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PBIO.0020273>

Richly E, Leister D (2004) NUMTs in sequenced eukaryotic genomes. *Mol Biol Evol* 21:1081–1084. <https://doi.org/10.1093/molbev/msh110>

Ring JD, Sturk-Andreaggi K, Alyse Peck M, Marshall C (2018) Bioinformatic removal of NUMT-associated variants in mitotiling next-generation sequencing data from whole blood

- samples. *Electrophoresis* 39:2785–2797. <https://doi.org/10.1002/ELPS.201800135>
- Rius R, Cowley MJ, Riley L, et al (2019) Biparental inheritance of mitochondrial DNA in humans is not a common phenomenon. *Genet Med* 2019 2112 21:2823–2826. <https://doi.org/10.1038/s41436-019-0568-0>
- Robison GA, Balvin O, Schal C, et al (2015) Extensive Mitochondrial Heteroplasmy in Natural Populations of a Resurging Human Pest, the Bed Bug (Hemiptera: Cimicidae). *J Med Entomol* 52:734–738. <https://doi.org/10.1093/jme/tjv055>
- Rodríguez-Pena E, Verísimo P, Fernández L, et al (2020) High incidence of heteroplasmy in the mtDNA of a natural population of the spider crab *Maja brachydactyla*. *PLoS One* 15:e0230243. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0230243>
- Rogers HH, Griffiths-Jones S (2012) Mitochondrial Pseudogenes in the Nuclear Genomes of *Drosophila*. *PLoS One* 7:e32593. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0032593>
- Rokas A, Ladoukakis E, Zouros E (2003) Animal mitochondrial DNA recombination revisited. *Trends Ecol Evol* 18:411–417. [https://doi.org/10.1016/S0169-5347\(03\)00125-3](https://doi.org/10.1016/S0169-5347(03)00125-3)
- Rong E, Wang H, Hao S, et al (2018) Heteroplasmy Detection of Mitochondrial DNA A3243G Mutation Using Quantitative Real-Time PCR Assay Based on TaqMan-MGB Probes. *Biomed Res Int* 2018:. <https://doi.org/10.1155/2018/1286480>
- Rossignol R, Faustin B, Rocher C, et al (2003) Mitochondrial threshold effects. 751–762
- Roth C, Parson W, Strobl C, et al (2019) MVC: an integrated mitochondrial variant caller for forensics. <https://doi.org/10.1080/0045061820191569150> 51:S52–S55. <https://doi.org/10.1080/00450618.2019.1569150>
- RStudio Team (2020) RStudio: Integrated Development Environment for R
- Sagan L (1967) On the origin of mitosing cells. *J Theor Biol* 14:255–274. [https://doi.org/10.1016/0022-5193\(67\)90079-3](https://doi.org/10.1016/0022-5193(67)90079-3)
- Sakamoto Y, Zaha S, Suzuki Y, et al (2021) Application of long-read sequencing to the detection of structural variants in human cancer genomes. *Comput Struct Biotechnol J* 19:4207–4216. <https://doi.org/10.1016/J.CSBJ.2021.07.030>
- Salas A, Schönherr S, Bandelt HJ, et al (2020) Extraordinary claims require extraordinary evidence in asserted mtDNA biparental inheritance. *Forensic Sci Int Genet* 47:102274. <https://doi.org/10.1016/J.FSIGEN.2020.102274>
- Sangiovanni M, Granata I, Thind AS, Guarracino MR (2019) From trash to treasure: Detecting unexpected contamination in unmapped NGS data. *BMC Bioinformatics* 20:1–12.

<https://doi.org/10.1186/S12859-019-2684-X/FIGURES/5>

- Santibanez-Koref M, Griffin H, Turnbull DM, et al (2019) Assessing mitochondrial heteroplasmy using next generation sequencing: A note of caution. *Mitochondrion* 46:302–306. <https://doi.org/10.1016/j.mito.2018.08.003>
- Sato M, Sato K (2013) Maternal inheritance of mitochondrial DNA by diverse mechanisms to eliminate paternal mitochondrial DNA. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res* 1833:1979–1984. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2013.03.010>
- Sato M, Sato K (2011) Degradation of paternal mitochondria by fertilization-triggered autophagy in *C. elegans* embryos. *Science* 334:1141–4. <https://doi.org/10.1126/science.1210333>
- Schiavo G, Hoffmann OI, Ribani A, et al (2017) A genomic landscape of mitochondrial DNA insertions in the pig nuclear genome provides evolutionary signatures of interspecies admixture. *DNA Res* 24:487–498. <https://doi.org/10.1093/DNARES/DSX019>
- Schierup MH, Hein J (2000) Consequences of recombination on traditional phylogenetic analysis. *Genetics* 156:879–891. <https://doi.org/10.1093/genetics/156.2.879>
- Schon EA, DiMauro S, Hirano M (2012) Human mitochondrial DNA: roles of inherited and somatic mutations. *Nat Rev Genet* 13:878–890. <https://doi.org/10.1038/nrg3275.Human>
- Schwartz M, Vissing J (2002) Paternal Inheritance of Mitochondrial DNA. *N Engl J Med* 347:576–580. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa020350>
- Sedlazeck FJ, Rescheneder P, Smolka M, et al (2018) Accurate detection of complex structural variations using single-molecule sequencing. *Nat Methods* 2018 156 15:461–468. <https://doi.org/10.1038/s41592-018-0001-7>
- Shao R, Kirkness EF, Barker SC (2009) The single mitochondrial chromosome typical of animals has evolved into 18 minichromosomes in the human body louse, *Pediculus humanus*. *Genome Res* 19:904–912. <https://doi.org/10.1101/gr.083188.108>
- Sharpley MS, Marciniak C, Eckel-mahan K, et al (2012) Heteroplasmy of Mouse mtDNA Is Genetically Unstable and Results in Altered Behavior and Cognition. *Cell* 151:333–343. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.09.004.Heteroplasmy>
- Sherengul W, Kondo R, Matsuura ET (2006) Analysis of paternal transmission of mitochondrial DNA in *Drosophila*. *Genes Genet Syst.* <https://doi.org/10.1266/ggs.81.399>
- Shi H, Xing Y, Mao X (2017) The little brown bat nuclear genome contains an entire

- mitochondrial genome: Real or artifact? *Gene* 629:64–67.
<https://doi.org/10.1016/j.gene.2017.07.065>
- Shitara H, Hayashi JI, Takahama S, et al (1998) Maternal inheritance of mouse mtDNA in interspecific hybrids: Segregation of the leaked paternal mtDNA followed by the prevention of subsequent paternal leakage. *Genetics* 148:851–857.
<https://doi.org/10.1093/nar/17.18.7325>
- Simpson JT, Wong K, Jackman SD, et al (2009) ABySS: A parallel assembler for short read sequence data. *Genome Res* 19:1117–1123. <https://doi.org/10.1101/gr.089532.108>
- Singh LN, Ennis Id B, Id BL, et al (2021a) MitoScape: A big-data, machine-learning platform for obtaining mitochondrial DNA from next-generation sequencing data. *Plos Comput Biol* 17:1–20. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1009594>
- Singh LN, Kao S-H, Wallace DC, et al (2021b) Unlocking the Complexity of Mitochondrial DNA: A Key to Understanding Neurodegenerative Disease Caused by Injury. *Cells* 10:1–17.
<https://doi.org/10.3390/cells10123460>
- Skibinski DO, Gallagher C, Beynon CM (1994) Sex-limited mitochondrial DNA transmission in the marine mussel *Mytilus edulis*. *Genetics* 138:
- Smart U, Budowle B, Ambers A, et al (2019) A novel phylogenetic approach for de novo discovery of putative nuclear mitochondrial (pNumt) haplotypes. *Forensic Sci Int Genet* 43:. <https://doi.org/10.1016/J.FSIGEN.2019.102146>
- 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. <https://doi.org/10.1111/J.1365-294X.2009.04444.X>
- Soares P, Abrantes D, Rito T, et al (2013) Evaluating Purifying Selection in the Mitochondrial DNA of Various Mammalian Species. *PLoS One* 8:e58993.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0058993>
- Solignac M, Monnerot M (1986) Race formation, speciation, and introgression within *Drosophila simulans*, *D. mauritiana*, and *D. sechellia* inferred from mitochondrial DNA analysis
- Solignac M, Monnerott M, Mounolout J (1983) Mitochondrial DNA heteroplasmy in *Drosophila mauritiana*. *Genetics* 80:6942–6946
- Song S, Jiang F, Yuan J, et al (2013) Exceptionally high cumulative percentage of NUMTs originating from linear mitochondrial DNA molecules in the *Hydra magnipapillata*

- genome. *BMC Genomics* 2013 14:1–13. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-14-447>
- Song W-H, Yi Y-J, Sutovsky M, et al (2016) Autophagy and ubiquitin-proteasome system contribute to sperm mitophagy after mammalian fertilization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1–10. <https://doi.org/10.1073/pnas.1605844113>
- Stampar SN, Broe MB, Macrander J, et al (2019) Linear Mitochondrial Genome in Anthozoa (Cnidaria): A Case Study in Ceriantharia. *Sci Reports* 2019 9:1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-42621-z>
- Stewart JB, Chinnery PF (2021) Extreme heterogeneity of human mitochondrial DNA from organelles to populations. *Nat. Rev. Genet.* 22:106–118
- Stewart JB, Chinnery PF (2015) The dynamics of mitochondrial DNA heteroplasmy: implications for human health and disease. *Nat Rev Genet* 16:530–542. <https://doi.org/10.1038/nrg3966>
- Stewart JB, Freyer C, Elson JL, Larsson NG (2008) Purifying selection of mtDNA and its implications for understanding evolution and mitochondrial disease. *Nat Rev Genet* 9:657–662. <https://doi.org/10.1038/nrg2396>
- Sturtevant AH (1921) A CASE OF REARRANGEMENT OF GENES IN DROSOPHILA
- Su T, Grady JP, Afshar S, et al (2018) Inherited pathogenic mitochondrial DNA mutations and gastrointestinal stem cell populations. *J Pathol* 246:427–432. <https://doi.org/10.1002/path.5156>
- Sutovsky P, Moreno RD, Ramalho-Santos J, et al (1999) Ubiquitin tag for sperm mitochondria. *Nature* 402:371–372. <https://doi.org/10.1038/46466>
- Szczepanowska K, Trifunovic A (2017) Origins of mtDNA mutations in ageing. *Essays Biochem* 61:325–337. <https://doi.org/10.1042/EBC20160090>
- Taanman JW (1999) The mitochondrial genome: structure, transcription, translation and replication. *Biochim Biophys Acta* 1410:103–123. [https://doi.org/10.1016/S0005-2728\(98\)00161-3](https://doi.org/10.1016/S0005-2728(98)00161-3)
- Tait SWG, Green DR (2012) Mitochondria and cell signalling. *J Cell Sci* 125:807–815. <https://doi.org/10.1242/JCS.099234>
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, et al (2013) MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol Biol Evol* 30:2725–2729. <https://doi.org/10.1093/molbev/mst197>
- Taylor ML, Wigmore C, Hodgson DJ, et al (2008) Multiple mating increases female fitness in

- Drosophila simulans*. *Anim Behav* 76:963–970.
<https://doi.org/10.1016/J.ANBEHAV.2008.05.015>
- Thompson JD, Gibson TJ, Higgins DG (2002) Multiple Sequence Alignment Using ClustalW and ClustalX. In: *Current Protocols in Bioinformatics*. John Wiley & Sons, Inc.
- Triantafyllidis CD, Tsacas L (1981) Distribution of different species of *Drosophila* in Greece. *Sci Ann Fac Phys Mathem, Univ Thessaloniki* 21:69–78
- Trifunov S, Pyle A, Valentino ML, et al (2018) Clonal expansion of mtDNA deletions: different disease models assessed by digital droplet PCR in single muscle cells. *Sci Rep* 8:1–10.
<https://doi.org/10.1038/s41598-018-30143-z>
- Tsaousis AD, Martin DP, Ladoukakis ED, et al (2005) Widespread recombination in published animal mtDNA sequences. *Mol Biol Evol* 22:925–933.
<https://doi.org/10.1093/molbev/msi084>
- Tu J, Guo J, Li J, et al (2015) Systematic Characteristic Exploration of the Chimeras Generated in Multiple Displacement Amplification through Next Generation Sequencing Data Reanalysis. *PLoS One* 10:e0139857. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0139857>
- Tully LA, Parsons TJ, Steighner RJ, et al (2000) A sensitive denaturing gradient-gel electrophoresis assay reveals a high frequency of heteroplasmy in hypervariable region 1 of the human mtDNA control region. *Am J Hum Genet* 67:432–443.
<https://doi.org/10.1086/302996>
- Turelli M, Hoffmann AA, Mckechie SW (1992) Dynamics of Cytoplasmic Incompatibility and mtDNA Variation in Natural *Drosophila simulans* Populations. *Genetics* 132:713–723
- Ujvari B, Downton M, Madsen T (2007) Mitochondrial DNA recombination in a free-ranging Australian lizard. *Biol Lett* 3:189–192. <https://doi.org/10.1098/rsbl.2006.0587>
- Vendrami DLJ, Gossmann TI, Chakarov N, et al (2022) Signatures of Selection on Mitonuclear Integrated Genes Uncover Hidden Mitogenomic Variation in Fur Seals. *Genome Biol Evol* 14:. <https://doi.org/10.1093/GBE/EVAC104>
- Venetis C, Theologidis I, Zouros E, Rodakis GC (2006) No evidence for presence of maternal mitochondrial DNA in the sperm of *Mytilus galloprovincialis* males. *Proc R Soc B Biol Sci* 273:2483–2489. <https://doi.org/10.1098/rspb.2006.3607>
- Verscheure S, Backeljau T, Desmyter S (2015) In silico discovery of a nearly complete mitochondrial genome Numt in the dog (*Canis lupus familiaris*) nuclear genome. *Genet* 2015 1434 143:453–458. <https://doi.org/10.1007/S10709-015-9844-3>

- Vissing J (2019) Paternal comeback in mitochondrial DNA inheritance. *Proc Natl Acad Sci* 116:1475–1476. <https://doi.org/10.1073/pnas.1821192116>
- Wachsmuth M, Hübner A, Li M, et al (2016) Age-Related and Heteroplasmy-Related Variation in Human mtDNA Copy Number. *PLoS Genet* 12:e1005939. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1005939>
- Wallace DC (2007) Why do we still have a maternally inherited mitochondrial DNA? Insights from evolutionary medicine. *Annu Rev Biochem* 76:781–821. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.76.081205.150955>
- Wang B, Zhou X, Shi F, et al (2015a) Full-length Numt analysis provides evidence for hybridization between the Asian colobine genera *Trachypithecus* and *Semnopithecus*. *Am J Primatol* 77:901–910. <https://doi.org/10.1002/AJP.22419>
- Wang J-X, Liu J, Miao Y-H, et al (2020) Tracking the Distribution and Burst of Nuclear Mitochondrial DNA Sequences (NUMTs) in Fig Wasp Genomes. *Insects* 2020, Vol 11, Page 680 11:680. <https://doi.org/10.3390/INSECTS111100680>
- Wang M, Beck CR, English AC, et al (2015b) PacBio-LITS: A large-insert targeted sequencing method for characterization of human disease-associated chromosomal structural variations. *BMC Genomics* 16:1–12. <https://doi.org/10.1186/S12864-015-1370-2/FIGURES/3>
- Watanabe KI, Bessho Y, Kawasaki M, Hori H (1999) Mitochondrial genes are found on minicircle DNA molecules in the mesozoan animal *Dicyema*. *J Mol Biol* 286:645–650
- Weerts MJA, Timmermans EC, Vossen RHAM, et al (2018) Sensitive detection of mitochondrial DNA variants for analysis of mitochondrial DNA-enriched extracts from frozen tumor tissue. *Sci Rep* 8:1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-20623-7>
- Wei W, Pagnamenta AT, Gleadall N, et al (2020) Nuclear-mitochondrial DNA segments resemble paternally inherited mitochondrial DNA in humans. *Nat Commun* 11:1–11. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-15336-3>
- Weischenfeldt J, Symmons O, Spitz F, Korb J (2013) Phenotypic impact of genomic structural variation: Insights from Weischenfeldt, J., Symmons, O., Spitz, F., & Korb, J. O. (2013). Phenotypic impact of genomic structural variation: Insights from and for human disease. In *Nature Reviews Genetics* (Vol. 14, Nat. Rev. Genet. 14:125–138
- Weissensteiner H, Forer L, Fuchsberger C, et al (2016) mtDNA-Server: next-generation sequencing data analysis of human mitochondrial DNA in the cloud. *Nucleic Acids Res*

- 44:W64–W69. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw247>
- Wen M, Peng L, Hu X, et al (2016) Transcriptional quiescence of paternal mtDNA in cyprinid fish embryos. *Sci Rep* 6:1–7. <https://doi.org/10.1038/srep28571>
- Wen M, Zhang Y, Wang S, et al (2022) Exogenous paternal mitochondria rescue hybrid incompatibility and the destiny of exogenous mitochondria. *Reprod Breed* 2:83–88. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.repbre.2022.06.003>
- Whitacre LK, Tizioto PC, Kim J, et al (2015) What’s in your next-generation sequence data? An exploration of unmapped DNA and RNA sequence reads from the bovine reference individual. <https://doi.org/10.1186/s12864-015-2313-7>
- White DJ, Wolff JN, Pierson M, Gemmell NJ (2008) Revealing the hidden complexities of mtDNA inheritance. *Mol Ecol* 17:4925–4942. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2008.03982.x>
- Wilton PR, Zaidi A, Makova K, Nielsen R (2018) A population phylogenetic view of mitochondrial heteroplasmy. *Genetics*. <https://doi.org/10.1534/genetics.118.300711>
- Wolff JN, Gemmell NJ (2008) Lost in the zygote: the dilution of paternal mtDNA upon fertilization. *Hered* 101:429–434. <https://doi.org/hdy200874> [pii]r10.1038/hdy.2008.74
- Wolff JN, Nafisinia M, Sutovsky P, Ballard JWO (2012) Paternal transmission of mitochondrial DNA as an integral part of mitochondrial inheritance in metapopulations of *Drosophila simulans*. *Heredity (Edinb)* 110:57–62. <https://doi.org/10.1038/hdy.2012.60>
- Wolff JN, White DJ, Woodhams M, et al (2011) The Strength and Timing of the Mitochondrial Bottleneck in Salmon Suggests a Conserved Mechanism in Vertebrates. *PLoS One* 6:e20522. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0020522>
- Wolfner MF (2002) The gifts that keep on giving: Physiological functions and evolutionary dynamics of male seminal proteins in *Drosophila*. *Heredity (Edinb)* 88:85–93. <https://doi.org/10.1038/sj.hdy.6800017>
- Wonnapijit P, Chinnery PF, Samuels DC (2008) The Distribution of Mitochondrial DNA Heteroplasmy Due to Random Genetic Drift. *Am J Hum Genet* 83:582–593. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2008.10.007>
- Woods D, Khrapko K, Tilly J (2018) Influence of Maternal Aging on Mitochondrial Heterogeneity, Inheritance, and Function in Oocytes and Preimplantation Embryos. *Genes (Basel)* 9:265. <https://doi.org/10.3390/genes9050265>

- Wysokar A, Tibbetts K, McCown M, et al (2014) Picard: A set of tools for working with next generation sequencing data in BAM format
- Xu J, Nuno K, Litzenger UM, et al (2019) Single-cell lineage tracing by endogenous mutations enriched in transposase accessible mitochondrial DNA. *Elife* 8:1–14. <https://doi.org/10.7554/eLife.45105>
- Xu YR, Fan YS, Yang WX (2017) Mitochondrial prohibitin and its ubiquitination during spermatogenesis of the swimming crab *Charybdis japonica*. *Gene* 627:137–148. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2017.06.025>
- Ye K, Lu J, Ma F, et al (2014) Extensive pathogenicity of mitochondrial heteroplasmy in healthy human individuals. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111:10654–9. <https://doi.org/10.1073/pnas.1403521111>
- Ye Z, Zhao C, Raborn RT, et al (2022) Genetic Diversity, Heteroplasmy, and Recombination in Mitochondrial Genomes of *Daphnia pulex*, *Daphnia pulex*, and *Daphnia obtusa*. *Mol Biol Evol* 39:. <https://doi.org/10.1093/MOLBEV/MSAC059>
- Yu Z, O'Farrell PH, Yakubovich N, DeLuca SZ (2017) The Mitochondrial DNA Polymerase Promotes Elimination of Paternal Mitochondrial Genomes. *Curr Biol* 27:1033–1039. <https://doi.org/10.1016/J.CUB.2017.02.014>
- Zaidi AA, Makova KD (2019) Investigating mitonuclear interactions in human admixed populations. *Nat Ecol Evol* 3:213–222. <https://doi.org/10.1038/s41559-018-0766-1>
- Zaidi AA, Wilton PR, Su MSW, et al (2019) Bottleneck and selection in the germline and maternal age influence transmission of mitochondrial DNA in human pedigrees. *Proc Natl Acad Sci U S A* 116:25172–25178. <https://doi.org/10.1073/pnas.1906331116>
- Zhang G, Geng D, Guo Q, et al (2021a) Genomic landscape of mitochondrial DNA insertions in 23 bat genomes: characteristics, loci, phylogeny, and polymorphism. *Integr Zool*. <https://doi.org/10.1111/1749-4877.12582>
- Zhang H, Esposito M, Pezet MG, et al (2021b) Mitochondrial DNA heteroplasmy is modulated during oocyte development propagating mutation transmission. *Sci Adv* 7:5657. https://doi.org/10.1126/SCIADV.ABI5657/SUPPL_FILE/SCIADV.ABI5657_SOURCE_DATA_EXCEL_FILE.ZIP
- Zhao X, Li N, Guo W, et al (2004) Further evidence for paternal inheritance of mitochondrial DNA in the sheep (*Ovis aries*). *Hered* 2004 934 93:399–403. <https://doi.org/10.1038/sj.hdy.6800516>

- Zhou K, Mo Q, Guo S, et al (2020) A Novel Next-Generation Sequencing–Based Approach for Concurrent Detection of Mitochondrial DNA Copy Number and Mutation. *J Mol Diagnostics* 22:1408–1418. <https://doi.org/10.1016/j.jmoldx.2020.09.005>
- Zhou Q, Li H, Li H, et al (2016) Mitochondrial endonuclease G mediates breakdown of paternal mitochondria upon fertilization. *Science* 11:25–44. <https://doi.org/10.1126/science.aaf4777>
- Zhou W, Ois Rousset F, O’neill S (1998) Phylogeny and PCR-based classification of Wolbachia strains using wsp gene sequences. *Proc R Soc B Biol Sci* 265:509–515
- Zouros E (2013) Biparental Inheritance Through Uniparental Transmission: The Doubly Uniparental Inheritance (DUI) of Mitochondrial DNA. *Evol Biol* 40:1–31. <https://doi.org/10.1007/s11692-012-9195-2>
- Zouros E, Ball AO, Saavedra C, Freeman KR (1994) An unusual type of mitochondrial DNA inheritance in the blue mussel *Mytilus*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:7463–7467. <https://doi.org/10.1073/pnas.91.16.7463>
- Zverinova S, Guryev V (2021) Variant calling: Considerations, practices, and developments. *Hum Mutat*. <https://doi.org/10.1002/HUMU.24311>

6 Παράρτημα

Πρωτόκολλο εξαγωγής 1 (O'Neill et al. 1992)

1. Ομογενοποίηση εντόμου σε σωλήνα erpendorf 1,5ml με χρήση pestle σε 50μl διαλύματος STE (10mM Tris-HCl pH 8.0, 1mM EDTA, 25mM NaCl).
2. Προσθήκη 2μl Proteinase K (20mg/ml).
3. Επώαση στους 55°C για 3 ώρες.
4. Επώαση στους 95°C για 5-6 λεπτά.
5. Φυγοκέντρηση σε μέγιστη ταχύτητα για 5 λεπτά (13000rpm) πριν τη χρήση.

Πρωτόκολλο εξαγωγής 2 (Miller et al. 1988)

1. Ομογενοποίηση 10 εντόμων σε 400μl διαλύματος λύσης (10mM Tris-HCl pH 8.0, 10mM EDTA, 400mM NaCl) μέσα σε σωλήνα erpendorf 1,5ml με χρήση pestle.
2. Προσθήκη 10μl SDS 10% και 10μl Proteinase K (20mg/ml).
3. Επώαση στους 55°C για 3 ώρες.
4. Προσθήκη 280μl υπέρκορου NaCl (6M).
5. Απαλή ανάδευση για 10 λεπτά.
6. Φυγοκέντρηση για 30 λεπτά σε μέγιστη ταχύτητα στους 4°C.
7. Αφαίρεση υπερκείμενου και τοποθέτησή του σε καθαρό σωλήνα erpendorf 1,5ml με κομμένο μπλε tip.
8. Προσθήκη 500μl χλωροφορμίου (CHCl₃) και απαλή ανάδευση με το χέρι για 5-10 δευτερόλεπτα.
9. Φυγοκέντρηση για 5 λεπτά σε μέγιστη ταχύτητα στους 4°C.
10. Λαμβάνεται η υδατική φάση (υπερκείμενο) με κομμένο μπλε tip και τοποθετείται σε καθαρό σωλήνα erpendorf 1,5ml.
11. Προσθήκη 600μl ισοπροπανόλης (CH₃CHOHCH₃) και καλή ανάδευση με το χέρι.
12. Επώαση στους -20°C για 30 λεπτά.
13. Φυγοκέντρηση για 15 λεπτά σε μέγιστη ταχύτητα στους 4°C.
14. Αφαίρεση υπερκείμενου με προσοχή για να μην ξεκολλήσει η πελέτα DNA.
15. Προσθήκη 200μl παγωμένης αιθανόλης (EtOH) 70% για να ξεπλυθεί η πελέτα.
16. Φυγοκέντρηση για 2 λεπτά σε μέγιστη ταχύτητα στους 4°C.
17. Απομάκρυνση της αιθανόλης. Η πελέτα αφήνεται να στεγνώσει.
18. Μετά το στέγνωμα, η πελέτα επαναδιαλύεται σε 50-60μl H₂O στους 4°C.



Εικόνα Π. 1 Στοιχισή μιτοχονδριακών γονιδιωμάτων από το είδος *D. simulans* (μυτότυποι sil, sill και silll) και από το είδος *D. melanogaster* για το σχεδιασμό ειδικών εκκινητών για το *mel* μυτότυπο.