



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

**ΟΙ ΕΠΙΠΤΩΣΕΙΣ ΤΟΥ ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΟΥ ΤΟΥ
ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΟΥ DNA ΣΤΗ ΔΥΝΑΜΙΚΗ ΤΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ
ΤΗΣ ΔΙΠΛΗΣ ΜΟΝΟΓΟΝΙΚΗΣ ΚΛΗΡΟΝΟΜΗΣΗΣ (DUI) ΤΟΥ
mtDNA ΤΟΥ ΜΥΔΙΟΥ *Mytilus galloprovincialis***

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΗΣ ΘΕΟΛΟΓΙΔΗΣ

ΗΡΑΚΛΕΙΟ 2002

Η μεταπτυχιακή διατριβή εκπονήθηκε στο **Εργαστήριο Πληθυσμιακής Γενετικής και Εξέλιξης** του Τμήματος Βιολογίας του Πανεπιστημίου Κρήτης.

Επιβλέπων Καθηγητής:

Ε. Ζούρος (Καθηγητής Πανεπιστημίου Κρήτης)

Β' Εξεταστής:

Ν. Μοσχονάς (Καθηγητής Πανεπιστημίου Κρήτης)

...Στο Γιώργο

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Πρόλογος	1
Περίληψη	2
Abstract	4
Κεφάλαιο 1 - Εισαγωγή	6
1.1. Μιτοχόνδρια: δομή και λειτουργία	7
1.2. Η προέλευση των μιτοχονδρίων	8
1.3. Το μιτοχονδριακό DNA	9
1.4. Η κληρονόμηση του μιτοχονδριακού DNA	11
1.5. Ανασυνδυασμός του DNA	12
1.6. Μιτοχονδριακό DNA και ανασυνδυασμός	13
1.7. Ο οργανισμός	14
1.8. Η κληρονόμηση του mtDNA στο μύδι	15
1.9. Σκοπός της διατριβής	20
Κεφάλαιο 2 – Υλικά και Μέθοδοι	23
2.1. Συλλογή και φύλαξη των δειγμάτων	24
2.2. Επεξεργασία δειγμάτων	24
2.3. Μελέτη του γονιδίου COIII	25
2.4. Μελέτη του γονιδίου COI	30
2.5. RFLPs (Restriction Fragment Length Polymorphisms)	31
Κεφάλαιο 3 – Αποτελέσματα	32
ΜΕΡΟΣ Α’: Αναζήτηση ανασυνδυασμένων μορίων τύπου F	33
3.A.1. Ο απλότυπος C13	33
3.A.2. Αλληλούχιση του γονιδίου COIII	34
ΜΕΡΟΣ Β’: Αναζήτηση ανασυνδυασμένων μορίων τύπου M	39
3.B.1. Τα δεδομένα της προηγούμενης μελέτης	39
3.B.2. Μελέτη του γονιδίου της COI	42
Κεφάλαιο 4 – Συζήτηση	46
Βιβλιογραφία	52

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Νοιώθω την ανάγκη να ευχαριστήσω όλους εκείνους που συνέβαλλαν στην ολοκλήρωση τούτης της διατριβής.

Πρώτο από όλους ευχαριστώ τον Καθηγητή Ε. Ζούρο για την πολύτιμη βοήθεια που μου παρείχε. Γιατί μου έδωσε την ευκαιρία να ασχοληθώ με ένα τόσο συναρπαστικό θέμα και να διευρύνω την επιστημονική μου σκέψη. Τον ευχαριστώ ακόμη περισσότερο για την άποψη συνεργασία μας και για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε. Ήταν τιμή μου να δουλεύω μαζί του.

Όλα έμοιαζαν (και τελικά ήταν) ευκολότερα, χάρη στη συμβολή δύο ανθρώπων τους οποίους θέλω να ευχαριστήσω μαζί (άλλωστε, ακόμα και η απόσταση μίας παραγράφου ίσως να τους φαινόταν αβάσταχτη). Τη Μαρία Δραμουντάνη και το Μανόλη Λαδουκάκη. Η βοήθειά τους ήταν πολύπλευρη και η παρουσία τους αναντικατάστατη από την πρώτη κιόλας στιγμή που βρέθηκα στο εργαστήριο. Δεν έχω λόγια.

Κοντά σε εκείνους, απευθύνω ένα μεγάλο ευχαριστώ στο Γιώργο Γουλιέλμο, ο οποίος ήταν πάντα πρόθυμος να προσφέρει τη βοήθειά του και την πολύτιμη για μένα γνώση του. Χωρίς τις συμβουλές του, ίσως να «έτρεχα» gels ακόμη και μέχρι τούτη τη στιγμή (!!!).

Ευχαριστώ επίσης όλα τα άλλα παιδιά του εργαστηρίου, το Δευκαλίωνα Τσαγκαράκη, τη Jelena Radojicic και τη Γεωργία Δημητρίου, για τη βοήθειά τους, την καλή τους διάθεση και την άριστη επικοινωνία μας, τόσο μέσα όσο και έξω από το χώρο του εργαστηρίου.

Ευχαριστώ τον Αλέκο, το Λευτέρη, το Σταμάτη και τη Νικόλ (ξέρουν αυτοί).

Τελευταίους, αλλά περισσότερο από όλους, ευχαριστώ τους γονείς μου. Τη Μαίρη και τον Αρτέμη, που όλα αυτά τα χρόνια βρίσκονται πάντοτε ένα βήμα μπροστά από τις ανάγκες και τις προσδοκίες μου.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα δίδυρα της οικογένειας Mytilidae εμφανίζουν έναν ξεχωριστό τρόπο κληρονόμησης του μιτοχονδριακού τους DNA. Τα θηλυκά άτομα κληρονομούν έναν τύπο mtDNA που προέρχεται από τη μητέρα τους. Τα αρσενικά άτομα, όμως, εκτός από το mtDNA από της μητέρας τους (F τύπος) κληρονομούν και το mtDNA του πατέρα τους (M τύπος). Κατά συνέπεια, μέσα στο ίδιο είδος συνυπάρχουν δύο εξελικτικές γραμμές mtDNA: εκείνη που μεταβιβάζεται μέσω των ωαρίων (γραμμή F) και εκείνη που μεταβιβάζεται μέσω των σπερματοζωαρίων (γραμμή M). Ο ιδιαίτερος αυτός τύπος κληρονόμησης του mtDNA ονομάστηκε Διπλή Μονογονική κληρονόμηση (ΔΜΚ, Doubly Uniparental Inheritance - DUI).

Δύο φαινόμενα της DUI έχουν ιδιαίτερη σημασία για την παρούσα διατριβή. Το πρώτο είναι η πρόσφατη διαπίστωση ότι υφίσταται ανασυνδυασμός μεταξύ μορίων mtDNA στις γονάδες αρσενικών ατόμων. Το δεύτερο είναι το φαινόμενο της αρρενοποίησης. Σε κάποιες περιπτώσεις μόρια F τύπου εισέρχονται στην αρσενική γραμμή κληρονόμησης εκτοπίζοντας τα M τύπου μόρια και μηδενίζοντας το χρόνο διαφοροποίησης των δύο γραμμών κληρονόμησης. Το φαινόμενο αυτό περιγράφεται με τον όρο «αρρενοποίηση» και τα αρρενοποιημένα μόρια συμβολίζονται ως M^F .

Η παρούσα διατριβή είχε δύο επί μέρους σκοπούς:

A) Η πρόσφατη ανακάλυψη του ανασυνδυασμού δημιούργησε το ερώτημα αν τα ανασυνδυασμένα μόρια mtDNA μεταβιβάζονται στις επόμενες γενιές και διασπείρονται στους φυσικούς πληθυσμούς. Εξετάσαμε ξεχωριστά την περίπτωση των μητρικά κληρονομούμενων μορίων από την περίπτωση των πατρικά κληρονομούμενων μορίων. Για την πρώτη περίπτωση, εστιαστήκαμε σε ένα θηλυκό άτομο, το οποίο φαινόταν σύμφωνα με προηγούμενη μελέτη με τη βοήθεια περιοριστικών ενδονουκλεασών να φέρει ανασυνδυασμένο μόριο mtDNA στην περιοχή του γονιδίου COIII. Η αλληλούχιση του γονιδίου έδειξε ότι το μόριο αυτό δεν ήταν ανασυνδυασμένο, αλλά εμφάνιζε περιοριστικά πρότυπα τύπου M γιατί απλώς έφερε μεταλλάξεις σε συγκεκριμένες περιοριστικές θέσεις. Για τη δεύτερη περίπτωση, εξετάσαμε όλα τα αρσενικά άτομα μίας προηγούμενης μελέτης, η οποία είχε χαρακτηρίσει τα άτομα αυτά βάσει των περιοριστικών προτύπων που εμφάνιζαν δύο περιοχές των mtDNA μορίων τους. Η παρούσα μελέτη πρόσθεσε μία νέα περιοχή, που αντιστοιχούσε σε τμήμα μεγέθους 900bp του γονιδίου της COI. Σύμφωνα με

τα αποτελέσματα φαίνεται ότι υπάρχουν όντως ανασυνδυσασμένα μόρια πατρικής προέλευσης τα οποία μεταβιβάζονται στις επόμενες γενιές.

Β) Πριν την ανακάλυψη του ανασυνδυσασμού, αρκούσε η μελέτη μίας περιοχής για να χαρακτηριστεί ένα μόριο ως αρρενοποιημένο. Η ανακάλυψη του ανασυνδυσασμού έθεσε το ζήτημα της επανεξέτασης του φαινομένου της αρρενοποίησης, με το σκεπτικό ότι η περιοχή διάγνωσης και χαρακτηρισμού ενός μορίου μπορεί να ήταν προϊόν ανασυνδυσασμού. Βρέθηκε ένας σημαντικός αριθμός πατρικών μορίων, τα οποία έφεραν F τύπου αλληλουχία σε τουλάχιστον τρεις διακριτές περιοχές. Η πιθανότητα ότι τέτοια μόρια μπορεί να προέκυψαν από πολλαπλά συμβάντα ανασυνδυσασμού και ότι τα ανασυνδυσασμένα μόρια διατηρήθηκαν στον πληθυσμό είναι πολύ μικρή. Τούτη η παρατήρηση είναι συμβατή με την ύπαρξη της αρρενοποίησης.

Συμπερασματικά:

- Δεν υπάρχουν ανασυνδυσασμένα μόρια μητρικής προέλευσης στους πληθυσμούς.
- Παρέχονται ισχυρές ενδείξεις ότι υπάρχουν ανασυνδυσασμένα μόρια πατρικής προέλευσης, τα οποία διασπείρονται στους φυσικούς πληθυσμούς.
- Το φαινόμενο της αρρενοποίησης ισχύει.

ABSTRACT

The bivalves of family Mytilidae show an unusual pattern of mtDNA inheritance. Female individuals inherit an mtDNA type that derives from their mother. Male individuals, however, inherit also their father's mtDNA (M type). Therefore, two evolutionary lineages of mtDNA coexist in the same species: the one that is transmitted through the eggs (F lineage) and the one that is transmitted through sperm (M lineage). This system of mtDNA transmission has become known as Doubly Uniparental Inheritance (DUI).

The present thesis focused in two separate aspects of DUI. The first concerned the recent evidence that mtDNA molecules in male gonads undergo homologous recombination. The second is related to the phenomenon of "masculinization". In certain cases, F type molecules enter the male lineage displacing M type molecules and setting the differentiation time of the two lineages to zero. This phenomenon is described by the term "masculinization" and the masculinized molecules are symbolized as M^F.

The present thesis had two separate aims:

A) The recent discovery of recombination raised the question whether the recombinant mtDNA molecules are transmitted in the next generations and they pass on natural populations. We examined separately the case of maternally transmitted molecules and the case of paternally transmitted molecules. With respect to the first case, we were focused in a female individual, which appeared to carry a recombinant mtDNA molecule, according to a previous restriction analysis of its COIII gene. The analysis of the recovered sequence of this gene revealed that this molecule was not recombinant, but instead typical F type molecule with specific mutations at some restriction sites that made it resemble an M type molecule. Relatively to the second case, we examined all the male individuals of a previous study, which had characterized these individuals according to the restriction patterns of two segments of their mtDNA molecules. We added a new segment that corresponded to a fragment of 900bp of the COI gene. According to the results, it appears that recombinant molecules of paternal origin do exist and they are transmitted to the next generations, as well.

B) Until the discovery of recombination, the study of a segment was enough in order to characterize a molecule as masculinized. The discovery of recombination imposed the review of the phenomenon of masculinization, with the rationale that the diagnostic

segment that characterized a molecule could be a result of recombination. An important number of paternal molecules, which carried F type sequences at least in three distinguishable segments, were found. The probability that such molecules could result from multiple recombination events and that these recombinant molecules were fixed in the population is very small. This observation is compatible with the existence of masculinization.

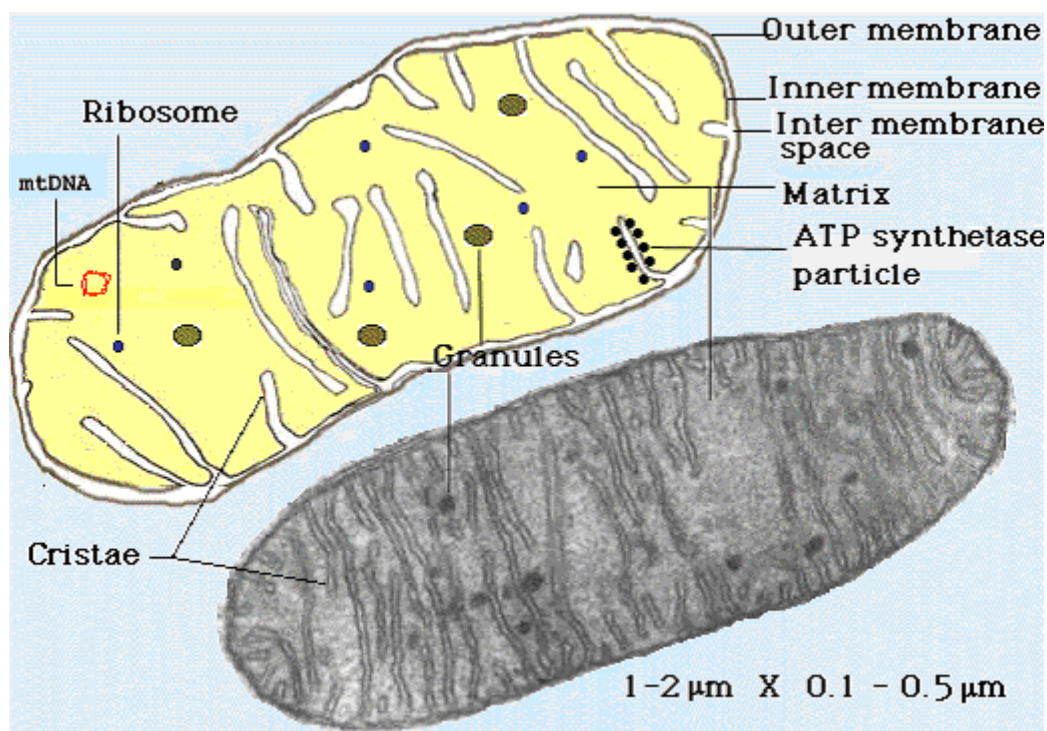
Conclusively:

- Recombinant molecules of maternal origin do not exist in populations.
- Powerful evidence is provided that recombinant molecules of paternal origin do exist and do pass on natural populations.
- The phenomenon of masculinization does occur.

Κεφάλαιο 1
ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1. Μιτοχόνδρια: δομή και λειτουργία

Τα μιτοχόνδρια είναι οργανίδια που θεωρούνται ως τα "ενεργειακά κέντρα" του κυττάρου. Η εμφάνιση των μιτοχονδρίων διαφέρει σημαντικά μεταξύ των διαφόρων κυτταρικών τύπων. Τα μιτοχόνδρια είναι συνήθως ωοειδή ή κυλινδρικά, με πλάτος 0,2μm και μήκος μέχρι και 7μm, ενώ υπάρχουν και σφαιρικά μιτοχόνδρια με διάμετρο 0,5 - 5 μm.



Σχήμα 1.1. Ηλεκτρονιοφωτογραφία και σχηματική αναπαράσταση μιτοχονδρίου.

Τα μιτοχόνδρια είναι διπλομεμβρανικά οργανίδια (Σχήμα 1.1). Η εξωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη έχει πάχος 7 nm και διαχωρίζει το μιτοχόνδριο από το υπόλοιπο κυτταρόπλασμα, ενώ η εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη έχει πάχος 5 nm και σχηματίζει πολύπλοκες αναδιπλώσεις προς το εσωτερικό του μιτοχονδρίου οι οποίες ονομάζονται μιτοχονδριακές ακρολοφίες (cristae). Ο χώρος μεταξύ των δύο μιτοχονδριακών μεμβρανών ονομάζεται διαμεμβρανικός χώρος (intermembrane space), ενώ ο χώρος που περικλείεται από την εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη ονομάζεται μιτοχονδριακή μήτρα (matrix). Μέσα στη μιτοχονδριακή μήτρα βρίσκονται τα ενδομιτοχονδριακά κοκκία (granules), τα οποία αποτελούν θέσεις δέσμευσης δισθενών ιόντων (κυρίως Ca^{2+} και Mg^{2+}), και τα μιτοχονδριακά ριβοσώματα. Στα μιτοχόνδρια υπάρχει κυκλικό μιτοχονδριακό DNA (mtDNA), το οποίο συνήθως συνδέεται στην εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη σε ένα ή δύο σημεία.

Τα μιτοχόνδρια λειτουργούν κυρίως σαν οργανίδια παραγωγής ενέργειας. Επίσης συμμετέχουν στη διατήρηση της ομοιόστασης του ενδοκυτταρικού ασβεστίου και στην παραγωγή θερμότητας.

1.2. Η προέλευση των μιτοχονδρίων

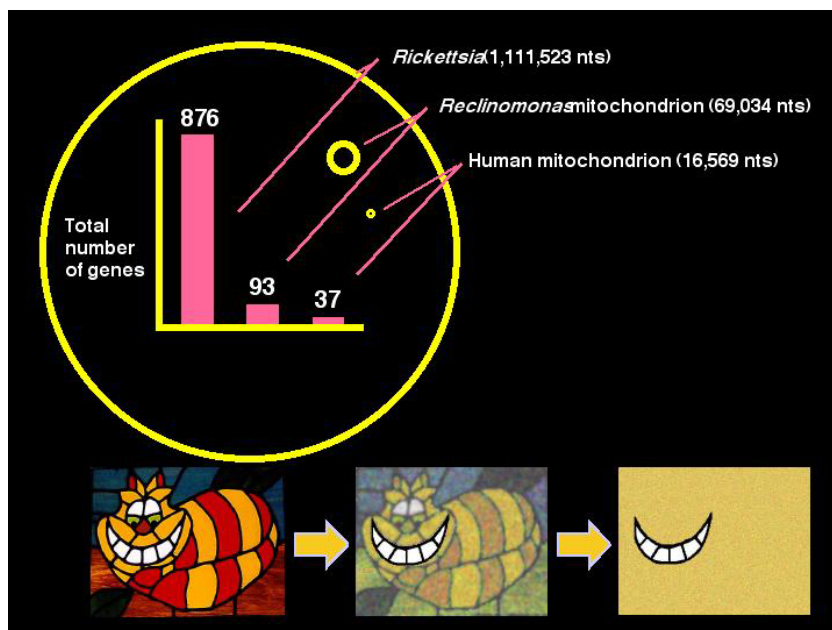
Η επικρατέστερη θεωρία για την προέλευση των μιτοχονδρίων διατυπώθηκε από τη Margulis (1970). Πρόκειται για την ενδοσυμβιωτική υπόθεση, η οποία προτείνει ότι τα μιτοχόνδρια (και οι χλωροπλάστες) προήλθαν από τη συμβίωση ενός προκαρυωτικού αερόβιου οργανισμού ραβδοειδούς σχήματος (πρωτομιτοχόνδριο) με ένα κύτταρο-ξενιστή ο οποίος ήταν αναερόβιος. Το αερόβιο βακτήριο που είχε την ικανότητα μεταφοράς ηλεκτρονίων στο οξυγόνο φαγοκυτταρώθηκε από τον αναερόβιο ξενιστή και το κυτταρόπλασμα του τελευταίου έγινε η κατοικία του (Margulis 1993). Καθώς η συμβιωτική αυτή σχέση διατηρήθηκε, ο ξενιστής αφαίρεσε αρκετές λειτουργίες από τον προκαρυώτη. Τμήμα αυτής της μεταφοράς λειτουργιών, απετέλεσε η μετακίνηση και η ενσωμάτωση πολλών γονιδίων του προκαρυώτη προς τον πυρήνα του ξενιστή. Αυτή η βαθμιαία προσαρμογή στις νέες λειτουργικές συνθήκες συνετέλεσε στη "μεταμόρφωση" των αερόβιων προκαρυωτικών οργανισμών σε μιτοχόνδρια.

Φαίνεται ότι η εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη προήλθε από την πλασματική μεμβράνη του αρχέγονου βακτηριακού ενδοσυμβιώτη. Η εξωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη πιθανόν προέρχεται από τη μεμβράνη του φαγοσώματος του κυττάρου ξενιστή. Η μεμβράνη αυτή δείχνει ορισμένες ομοιότητες με το ενδοπλασματικό δίκτυο, με το οποίο π.χ. μοιράζεται το κυτόχρωμα b_5 .

Οι περισσότερες πρωτεΐνες των μιτοχονδρίων κωδικοποιούνται από το πυρηνικό γενετικό υλικό και οι πρωτεΐνες που παράγονται στο κυτταρόπλασμα μεταφέρονται στο εσωτερικό των μιτοχονδρίων ενωμένες σε ειδικά πολυπεπτίδια (Schatz and Dobberstein 1996; Neupert 1997). Επιπλέον, σε κάποιες περιπτώσεις εισέρχονται και μικρά RNAs, κυρίως tRNAs (Dietrich et al. 1992).

Η υπόθεση της ενδοσυμβίωσης δεν μπορούσε να αποσαφηνίσει αν τα μιτοχόνδρια έχουν μονοφυλετική ή πολυφυλετική προέλευση. Σύγχρονα δεδομένα που προκύπτουν από την πλήρη αλληλούχιση μιτοχονδριακών γονιδιωμάτων ή από την αλληλούχιση

μεμονωμένων μιτοχονδριακών γονιδίων (Boore and Brown 1994; Boore et al. 1998; Lang et al. 1999) συνηγορούν στην μονοφυλετική προέλευση (Σχήμα 1.2). Οι κοντινότεροι βακτηριακοί συγγενείς των μιτοχονδρίων θεωρούνται τα μέλη της ομάδας των ρικετσιών που περιλαμβάνει ενδοκυτταρικά παράσιτα που ανήκουν στα γένη *Rickettsia*, *Anaplasma* και *Ehrlichia* (Gray and Spencer 1996; Lang et al. 1999).



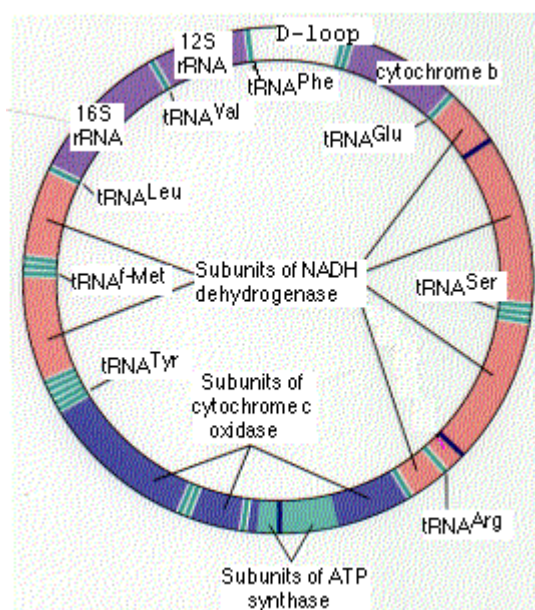
Σχήμα 1.2. Από τους οργανισμούς των οποίων τα γονιδιώματα έχουν πλήρως αλληλουχηθεί, η *Rickettsia* είναι πιθανά ο περισσότερο σχετικός με τον ενδοσυμβιώτη που δημιούργησε τα μιτοχόνδρια. Από τους οργανισμούς των οποίων τα μιτοχονδριακά γονιδιώματα έχουν πλήρως αλληλουχηθεί, η *Reclinomonas* φαίνεται να μοιάζει περισσότερο με τα βακτήρια. Εδώ παρουσιάζεται μια σύγκριση αυτών των δύο, μαζί με ένα χαρακτηριστικό ζωικό μιτοχονδριακό γονιδίωμα, σε σχέση με το μέγεθος γονιδιώματος και το περιεχόμενο. Σαφώς πολλά γονίδια έχουν χαθεί από το γονιδίωμα του πρωτόγονου ενδοσυμβιώτη.

1.3. Το μιτοχονδριακό DNA

Το μιτοχονδριακό DNA των ζωικών οργανισμών είναι ένα κυκλικό δίκλωνο μόριο, με εξαίρεση το mtDNA κάποιων ειδών, όπως εκείνο του υδρόζωου *Hydra attenuata*, το οποίο αποτελείται από δύο ευθύγραμμα μόρια DNA (Pont-Kingdon et al. 2000). Το μέσο μέγεθος του mtDNA των ζώων είναι περίπου 17Kb. Η απουσία εσωνίων και ο μικρός αριθμός γονιδίων αποτελούν χαρακτηριστικά που το καθιστούν πρότυπο οργάνωσης και οικονομίας (Attardi 1985). Ο γενετικός κώδικας των mtDNA διαφέρει από τον «παγκόσμιο» γενετικό κώδικα (Barrel et al. 1979; Wolstenholme 1992). Το κωδικόνιο UGA

χρησιμοποιείται ως κωδικόνιο λήξης στον παγκόσμιο γενετικό κώδικα, αλλά κωδικοποιεί για τρυπτοφάνη στο μιτοχονδριακό κώδικα των ζώων, μυκήτων και πρωτόζωων, αλλά όχι και των ανώτερων φυτών. Επίσης το κωδικόνιο AUA κωδικοποιεί για ισολευκίνη στον παγκόσμιο γενετικό κώδικα, αλλά κωδικοποιεί για μεθειονίνη στο mtDNA των θηλαστικών. Το κωδικόνιο AGA κωδικοποιεί για αργινίνη στον παγκόσμιο γενετικό κώδικα αλλά χρησιμοποιείται ως κωδικόνιο παύσης στο mtDNA των θηλαστικών, ενώ κωδικοποιεί για σερίνη στο mtDNA των αχινών, των σκουληκιών και των εντόμων. Στα εχινόδερμα το κωδικόνιο AAA κωδικοποιεί για ασπαραγίνη και όχι λυσίνη. Έχει προταθεί ότι η αλληλουχία GTG χρησιμοποιείται ως κωδικόνιο έναρξης στα θηλαστικά και τον αχινό, αλλά όχι στη *Drosophila*.

Όλο σχεδόν το μόριο αποτελεί κωδικοποιούσα περιοχή. Εσώνια, μεγάλες οικογένειες επαναλαμβανόμενου DNA, ευμεγέθεις παρεμβαλλόμενες αλληλουχίες (spacer DNA) και ψευδογονίδια απαντώνται σπάνια ή απουσιάζουν εντελώς (Alberts et al. 1994). Ένα τυπικό μόριο mtDNA φέρει γονίδια από τα οποία 13 κωδικοποιούν πρωτεΐνες, 2 κωδικοποιούν ριβοσωμικό RNA και 22 tRNAs (Σχήμα 1.3). Οι πρωτεΐνες που κωδικοποιούνται από το mtDNA εμπλέκονται στη μεταφορά ηλεκτρονίων και στην οξειδωτική φωσφορυλίωση (Wallace 1986). Η σύνθεσή τους γίνεται μέσα στο μιτοχόνδριο, το οποίο διαθέτει έναν αυτόνομο προτεϊνοσυνθετικό μηχανισμό. Πρόκειται για τις τρεις υπομονάδες της κυτοχρωμικής οξειδάσης (COI, COII και COIII), το κυτόχρωμα b, τις ATPάσες 6 και 8, τις υπομονάδες 1-6 της αφυδρογονάσης του NADH και την ND4L.



Σχήμα 1.3. Η δομή ενός τυπικού μορίου mtDNA.

Οι δύο αλυσίδες του mtDNA διαφέρουν σε ό,τι αφορά στην περιεκτικότητά τους σε C-G, ώστε όταν αποδιαταχθούν και φυγοκεντρηθούν σε CsCl να εμφανίζονται σε δύο ζώνες, η μία βαρύτερη της άλλης. Η βαριά αλυσίδα ονομάζεται H (heavy) και η άλλη L (light) (Taanman 1999). Έχει βρεθεί μία περιοχή πλούσια σε A-T στο μόριο του mtDNA που αποτελεί το σημείο έναρξης της αντιγραφής του μορίου και συγκεκριμένα της H αλυσίδας και καλείται replication origin ή D-loop. Στο σημείο εκείνο η H αλυσίδα αρχίζει να αντιγράφεται εκτοπίζοντας την L και δημιουργώντας μία θηλιά. Η αντιγραφή της L αλυσίδας ξεκινά αργότερα, όταν αποκαλυφθεί το δικό της σημείο έναρξης αντιγραφής (Taanman 1999).

Η δομή του mtDNA δεν παραμένει σταθερή ανάμεσα στις διάφορες ομάδες οργανισμών, αλλά αντίθετα παρουσιάζει διαφορές που αφορούν στο γονιδιακό περιεχόμενο του μορίου και στη διάταξη των γονιδίων πάνω στο μόριο (Wolstenholme 1992; Taanman 1999). Το mtDNA του μυδιού, για παράδειγμα, στερείται του γονιδίου της ATPάσης 8, ενώ περιέχει ένα επιπλέον tRNA της μεθειονίνης (Hoffmann et al. 1992) και ένα ψευδογονίδιο του tRNA της σερίνης (Beagley et al. 1999). Η ATPάση 8 απουσιάζει επίσης και από άλλους οργανισμούς, όπως τους νηματώδεις *Caenorhabditis elegans*, *Ascaris suum* και *Meloidogyne javanica* (Wolstenholme et al. 1992; Okimoto et al. 1991; 1992).

1.4. Η κληρονομηση του μιτοχονδριακού DNA

Η κληρονομηση του κυτταροπλασματικού και συνεπώς του μιτοχονδριακού DNA είναι μονογονική. Με άλλα λόγια, το mtDNA μεταβιβάζεται μόνο από τον ένα γονέα και πάντα του ίδιου φύλου στις επόμενες γενιές. Τούτο αποτελεί έναν από τους γενικότερους κανόνες στη βιολογία, με ελάχιστες εξαιρέσεις. Συνήθως μάλιστα, μεταβιβάζεται μέσω του θηλυκού γαμέτη (Birky 1995), αν και υπάρχουν οργανισμοί, όπως η σεκόια (Neale et al. 1989), το λάχανο (Erickson and Kemble 1990) και η μπανάνα (Faure et al 1994), οι οποίοι μεταβιβάζουν το μιτοχονδριακό γενετικό υλικό τους μέσω της γύρης.

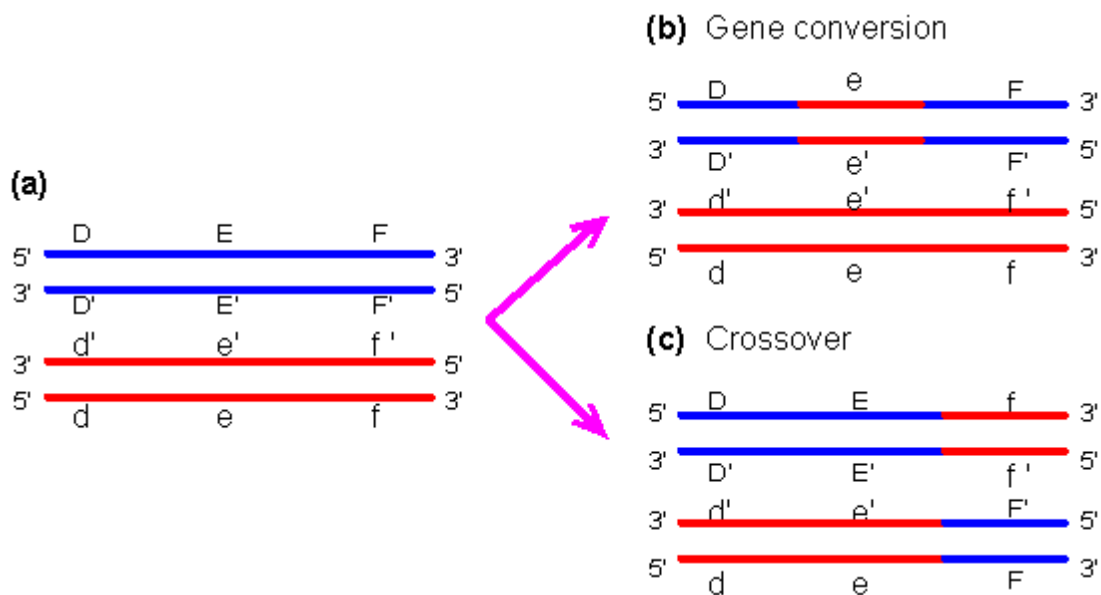
Στους ζωικούς οργανισμούς το mtDNA κληρονομείται μητρικά (Hutchison et al. 1974; Hayashi et al. 1978; Kroon et al. 1978; Shitara et al. 1998). Εξαιρέση αποτελούν τα μύδια των οικογενειών Mytilidae, Unionidae (βλ. §1.7) καθώς και το είδος *Tapes philippinarium* της οικογένειας Veneridae (Passamonti and Scali 2001).

1.5. Ανασυνδυασμός του DNA

Ανασυνδυασμός (recombination) είναι η ανταλλαγή τμημάτων γενετικού υλικού μεταξύ δύο μορίων DNA. Σαν αποτέλεσμα, νέοι γενετικοί συνδυασμοί δημιουργούνται και συνεπώς αυξάνεται η γενετική ποικιλομορφία. Διακρίνονται δύο κατηγορίες ανασυνδυασμού του DNA: ο ομόλογος (homologous) και ο μη-ομόλογος ανασυνδυασμός.

A) Ομόλογος ανασυνδυασμός

Ο ομόλογος ανασυνδυασμός συμβαίνει μεταξύ δύο ομόλογων μορίων DNA. Στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς τέτοιου είδους ανασυνδυασμός είναι αυτός που συμβαίνει κατά τη μείωση και ονομάζεται μειωτικός. Ο ομόλογος ανασυνδυασμός χωρίζεται στον αμοιβαίο ανασυνδυασμό και στη γονιδιακή μετατροπή (gene conversion). Στην πρώτη περίπτωση τα δύο μόρια DNA που ανασυνδυάζονται ανταλλάσσουν περιοχές DNA με αποτέλεσμα τα θυγατρικά μόρια που προκύπτουν να περιέχουν τμήματα και από τα δύο πατρικά μόρια χωρίς να αλλάζει το μέγεθος των μορίων. Αντίθετα στη γονιδιακή μετατροπή αλλάζει το περιεχόμενο του ενός από τα δύο μόρια DNA ενώ το άλλο παραμένει ανέπαφο (Σχήμα 1.4).



Σχήμα 1.4. Σύγκριση γονιδιακής μετατροπής (gene conversion) και αμοιβαίου ανασυνδυασμού (crossover). (a) Δύο μόρια DNA. (b) Γονιδιακή μετατροπή – το κόκκινο DNA δίνει μέρος της γενετικής πληροφορίας του (e-e' περιοχή) στο μπλε DNA. (c) Αμοιβαίος ανασυνδυασμός – τα δύο DNA μόρια ανταλλάσσουν μέρος της γενετικής πληροφορίας τους (f-f' και F-F').

B) Μη-ομόλογος ανασυνδυασμός

Ο μη-ομόλογος ανασυνδυασμός συμβαίνει σε περιοχές DNA που εμφανίζουν μικρή ή δεν εμφανίζουν καμία ομολογία. Δύο μη-ομόλογες αλληλουχίες μπορούν να ανασυνδυαστούν όταν κάποιες μικρές περιοχές τους εμφανίζουν μεγάλη ομοιότητα. Το πρώτο παράδειγμα αυτού του τύπου μη-ομόλογου ανασυνδυασμού εντοπίστηκε κατά την ενσωμάτωση του DNA του φάγου λ και του DNA της *E. coli*. Αυτός ο τύπος μη-ομόλογου ανασυνδυασμού ονομάζεται site-specific ανασυνδυασμός.

Η μετατόπιση DNA (transpositional recombination) είναι ένας άλλος τύπος μη-ομόλογου ανασυνδυασμού κατά τον οποίο ένα μεταθετό στοιχείο μετακινείται μέσα στα χρωμοσώματα. Όπως και ο site-specific ανασυνδυασμός, η μετατόπιση DNA συμβαίνει χωρίς να υπάρχει απαραίτητα ομολογία ανάμεσα στα μόρια DNA (Griffiths et al. 1996).

1.6. Μιτοχονδριακό DNA και ανασυνδυασμός

Η παρουσία του ανασυνδυασμού στα οργανιδιακά γονιδιώματα των πρωτίστων, των μυκήτων και των φυτών έχει αποδειχτεί εδώ και μία δεκαετία περίπου (Gray 1989). Αντίθετα, η άποψη που κυριαρχούσε σχετικά με το μιτοχονδριακό DNA των ζώων ήταν ότι δεν ανασυνδυάζεται (Awise 1994). Πολλοί ερευνητές προσπάθησαν να αποδείξουν το αντίθετο στηριζόμενοι σε έμμεσες μεθόδους και κατέληξαν σε ενδεικτικό συμπέρασμα (ανασυνδυασμός ανθρώπινου mtDNA, Awadalla et al. 1999; Eyre-Walker et al. 1999a,b). Οι προσπάθειες όμως αυτές αντιμετώπισαν σκληρή κριτική τόσο ως προς τις μεθόδους που χρησιμοποίησαν, όσο και ως προς τα συμπεράσματά τους (Arctander 1999; Merriweather and Kaestle 1999; Jorde and Bamshad 2000; Kivisild and Villems 2000; Kumar et al. 2000; Parsons and Irwin 2000). Παράλληλα δημοσιεύτηκαν εργασίες που μελετούσαν ολόκληρο το mtDNA από μεγαλύτερο δείγμα ανθρώπων και κατέληξαν ότι δεν υφίσταται ανασυνδυασμός στο ανθρώπινο mtDNA (Ingman et al. 2000; Elson et al. 2001). Αναμφίβολα, το θέμα είχε αρχίσει να περιπλέκεται, δεδομένης μάλιστα της προγενέστερης ανακάλυψης επιδιορθωτικού μηχανισμού σε μιτοχόνδρια κυττάρων από κυτταροκαλλιέργειες (Thyagarajan et al. 1996).

Πρόσφατα, οι Ladoukakis και Zouros (2001a), χρησιμοποιώντας ως μοντέλο το μύδι της Μεσογείου *Mytilus galloprovincialis* παρουσίασαν άμεση απόδειξη για την ύπαρξη ομόλογου ανασυνδυασμού σε ζωικό mtDNA. Τα μύδια του είδους αυτού, εξαιτίας του

ιδιαίτερου τρόπου κληρονόμησης του mtDNA τους (βλ. §1.7), φέρουν συχνά περισσότερα του ενός τύπου μόρια mtDNA (κατά κανόνα τα αρσενικά άτομα) στους ιστούς τους. Το γεγονός αυτό δίνει τη δυνατότητα στα μόρια mtDNA, τα οποία διαφέρουν ως προς την αλληλουχία τους, να βρεθούν στον ίδιο οργανισμό. Σε περίπτωση που τέτοια μόρια αλληλεπιδράσουν και ανασυνδυαστούν, το προϊόν του ανασυνδυασμού μπορεί να ανιχνευτεί άμεσα. Εφαρμόζοντας μάλιστα ανάλογη μεθοδολογία σε δημοσιευμένες αλληλουχίες mtDNA έδωσαν στοιχεία για την παρουσία ανασυνδυασμένων μορίων σε τρία ακόμα γένη ζωικών οργανισμών που απέχουν μεταξύ τους φυλογενετικά σε μεγάλο βαθμό: ένα αρθρόποδο του γένους *Gammarus*, ένα αμφίβιο του γένους *Rana* και ένα θηλαστικό του γένους *Apodemus* (Ladoukakis and Zouros 2001b).

Η απόδειξη του ανασυνδυασμού θέτει υπό αμφισβήτηση τις προγενέστερες φυλογενετικές και φυλογεωγραφικές αναλύσεις που βασίζονταν στην ανάλυση του μιτοχονδριακού γενετικού υλικού. Επιπλέον, γεννά πολλά θεμελιώδη ερωτήματα που αφορούν στην έκταση του φαινομένου στο ζωικό βασίλειο και στις συνέπειές του.

1.7. Ο οργανισμός

Το γένος *Mytilus* (Linnaeus 1758) ανήκει στην οικογένεια Mytilidae. Περιλαμβάνει τα είδη *M. edulis*, *M. galloprovincialis*, *M. trossulus*, *M. californianus*, *M. desolacionis* και *M. corsicus*. Ο παραπάνω διαχωρισμός δεν είναι απόλυτος διότι αφενός πολλά είδη υβριδίζονται μεταξύ τους, γεγονός που φανερώνει ότι δεν υπάρχει μεγάλη γενετική ασυμβατότητα, αφετέρου δεν υπάρχει ένας μορφολογικός ή ηλεκτροφορητικός χαρακτήρας που να κατατάσσει ξεκάθαρα κάθε άτομο σε ένα από τα είδη που αναφέρθηκαν.

Το είδος *Mytilus galloprovincialis* (Lamarck 1819) (Εικόνα 1.1) αναφέρεται ως «μύδι της Μεσογείου» γιατί θεωρείται ότι κοιτίδα εξάπλωσής του είναι η Μεσόγειος. Στη συνέχεια εξαπλώθηκε στη Μαύρη Θάλασσα και στις ευρωπαϊκές ακτές του Ατλαντικού. Στη Γαλλία, Βρετανία και Ιρλανδία το είδος εμφανίζεται συμπατρικά με το *M. edulis*. Τα δύο είδη υβριδίζονται εκτεταμένα στις ζώνες επαφής τους (Gosling 1994).



Εικόνα 1.1. Α) Πλαγκτονική μορφή και Β) ενήλικο άτομο του είδους *Mytilus galloprovincialis*

Το *Mytilus galloprovincialis* είναι ευρύαλος και ευρύθερμος οργανισμός και απαντάται σε θερμές, σχετικά αβαθείς θάλασσες, όπου υπάρχουν ισχυρά θαλάσσια ρεύματα ή εναιωρήματα οργανικών ουσιών. Σήμερα, το δίθυρο αυτό απαντάται στις ακτές της Κίνας, στην Ιαπωνία, Αυστραλία, Νέα Ζηλανδία, στις θάλασσες της Τασμανίας, της Καλιφόρνιας, και στη Νότια Αφρική. Είναι ένα από τα πιο γνωστά δίθυρα. Καλλιεργείται συστηματικά και έχει μεγάλη οικονομική σημασία.

Είναι διηθηματοφάγος οργανισμός. Μπορεί να διηθήσει μεγάλες ποσότητες νερού και για το λόγο αυτό θεωρείται κατάλληλος βιολογικός δείκτης για την ύπαρξη βαρέων μετάλλων στο περιβάλλον.

Το είδος *Mytilus galloprovincialis* είναι γονοχωριστικό (σπάνια συναντώνται ερμαφρόδιτα άτομα). Ο τρόπος φυλοκαθορισμού στο μύδι δεν είναι όμως γνωστός. Η γονιμοποίηση είναι εξωτερική. Η πλαγκτονική προνύμφη (Εικόνα 1.1Α) που δημιουργείται αρχικά, εδραιώνεται σε σκληρό υπόστρωμα με τη βοήθεια «νημάτων» (βύσσοις), όπου και παραμένει για το υπόλοιπο της ζωής της. Οι κυριότεροι ιστοί του μυδιού είναι η γονάδα (κατά την περίοδο της αναπαραγωγής φτάνει το 90% της μάζας του οργανισμού), τα βράγχια, ο μανδύας, ο πεπτικός ιστός, οι μύες και το πόδι (Gosling 1992).

1.8. Η κληρονομηση του mtDNA στο μύδι

Ο γενικός κανόνας της μονογονικής κληρονομησης του mtDNA των ζωικών οργανισμών (Avise and Lansman 1983) τέθηκε υπό αμφισβήτηση στις αρχές της δεκαετίας του 90. Σε απογόνους υβριδίων τρωκτικών βρέθηκε με PCR ότι συνέβαινε «διαρροή» πατρικού mtDNA (Gyllensten 1991). Παρόμοιες παρατηρήσεις έγιναν στο γαύρο (Magoulas

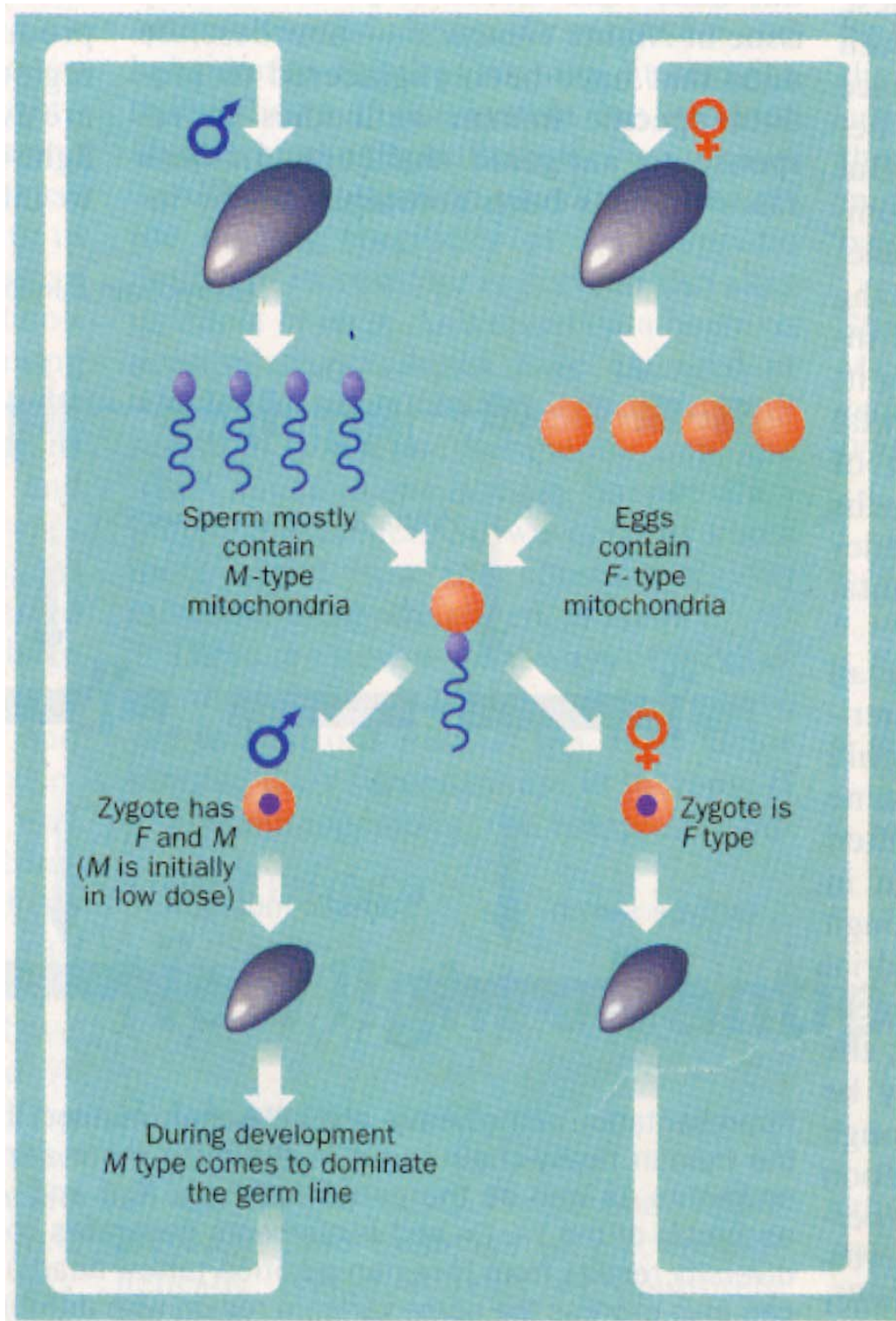
and Zouros 1993) και σε υβρίδια δροσόφιλας (Kondo et al. 1990, Satta et al. 1988). Εντούτοις, η ποσότητα του πατρικού mtDNA που ανιχνευόταν και στις δύο περιπτώσεις ήταν πολύ μικρή και το φαινόμενο εξηγήθηκε σαν μία απλή διαρροή πατρικού μιτοχονδριακού γενετικού υλικού. Στα μύδια όμως του είδους *Mytilus edulis* βρέθηκε εκτεταμένη ετεροπλασμία¹, η οποία μάλιστα συσχετιζόταν με το φύλο (Fisher and Skibinski 1990; Hoeh et al. 1991; Zouros et al. 1992). Η ετεροπλασμία αφορούσε σε μιτοχονδριακά γονιδιώματα δύο τύπων, τα οποία διέφεραν ως προς την αλληλουχία τους. Η γενετική τους απόσταση προσδιορίστηκε στο 20%.

Οι παρατηρήσεις στα μύδια συνηγορούσαν στην αμφιγονική κληρονόμηση του mtDNA, καθώς δεν ήταν δυνατό να εξηγηθεί με συσσώρευση μεταλλαγών η μεγάλη γενετική απόσταση των μορίων που συνυπήρχαν στα ετεροπλασμικά άτομα. Περαιτέρω μελέτες (Skibinski et al. 1994a,b; Zouros et al. 1994a,b) έφεραν στο φως ότι τα θηλυκά άτομα, τα οποία σε αντίθεση με τα αρσενικά εμφανίζονται ομοπλασμικά, μεταβιβάζουν το mtDNA τους (τύπου F, όπως ονομάστηκε) σε όλους τους απογόνους τους ανεξαρτήτως φύλου. Τα αρσενικά άτομα περιέχουν, εκτός από το mtDNA που κληρονόμησαν από τη μητέρα τους (τύπος F), το mtDNA που κληρονόμησαν από τον πατέρα τους (τύπος M) το οποίο μεταβιβάζουν μόνο στους αρσενικούς τους απογόνους. Κατά συνέπεια, μέσα στο ίδιο είδος συνυπάρχουν δύο εξελικτικές γραμμές mtDNA: εκείνη που μεταβιβάζεται μέσω των ωαρίων (γραμμή F) και εκείνη που μεταβιβάζεται μέσω των σπερματοζωαρίων (γραμμή M). Οι δύο γραμμές εμφανίζουν μικρή ενδογενή ετερογένεια, αλλά η μεταξύ τους γενετική απόσταση μπορεί να ξεπερνά το 20%.

Η παρουσία δύο ξεχωριστών εξελικτικών γραμμών που θεωρητικά δεν αναμειγνύονται (ο ανασυνδυασμός του mtDNA δεν ήταν τότε γνωστός) φαινόταν να μην παραβιάζει τον κανόνα της μονογονικής κληρονόμησης των κυτταροπλασματικών γονιδιωμάτων. Η μεταβίβαση του mtDNA του μυδιού εξακολουθούσε να είναι φυλοεξαρτώμενη παρόλο που θύμιζε αμφιγονική κληρονόμηση. Για το λόγο αυτό ονομάστηκε Διπλή Μονογονική Κληρονόμηση (ΔΜΚ ή DUI: Doubly Uniparental Inheritance), σε αντίθεση με τη μονογονική κληρονόμηση που απαντάται στους υπόλοιπους οργανισμούς (Zouros et al. 1994a).

¹ Ετεροπλασμία καλείται η κατάσταση κατά την οποία ένας οργανισμός φέρει περισσότερα το ενός διαφορετικού τύπου μόρια mtDNA, τα οποία διαφέρουν στην αλληλουχία ή στο μήκος τους.

Η παρουσία της DUI εντοπίστηκε και στα άλλα είδη του γένους *Mytilus*, στο *M. galloprovincialis* (Rawson and Hiblish 1995; Quesada et al. 1996; Saavedra et al. 1997), στο *M. trossulus* (Geller et al. 1993; Zouros et al. 1994b; Rawson and Hiblish 1995; Stewart et al. 1995) και στο *M. californianus* (Geller et al. 1993). Έπειτα, ο ίδιος μηχανισμός βρέθηκε όχι μόνο στα είδη του γένους *Mytilus* αλλά και σε άλλα μέλη της οικογένειας Mytilidae και συγκεκριμένα στο είδος *Geukensia demissa* (Hoeh et al. 1996). Το φαινόμενο επίσης εντοπίστηκε σε τρία είδη μυδιών του γλυκού νερού που ανήκουν στην οικογένεια Unionidae και απέχουν εξελικτικά από τα Mytilidae κατά 400 εκ.χρόνια (Allen 1985; Waller 1990). Πρόκειται για τα είδη *Pyganodon* (πρώην *Anodonta*) *grandis*, *Pyganodon* (πρώην *Anodonta*) *fragilis* και *Fusconaia flava* (Hoeh et al. 1996; Liu et al. 1996).



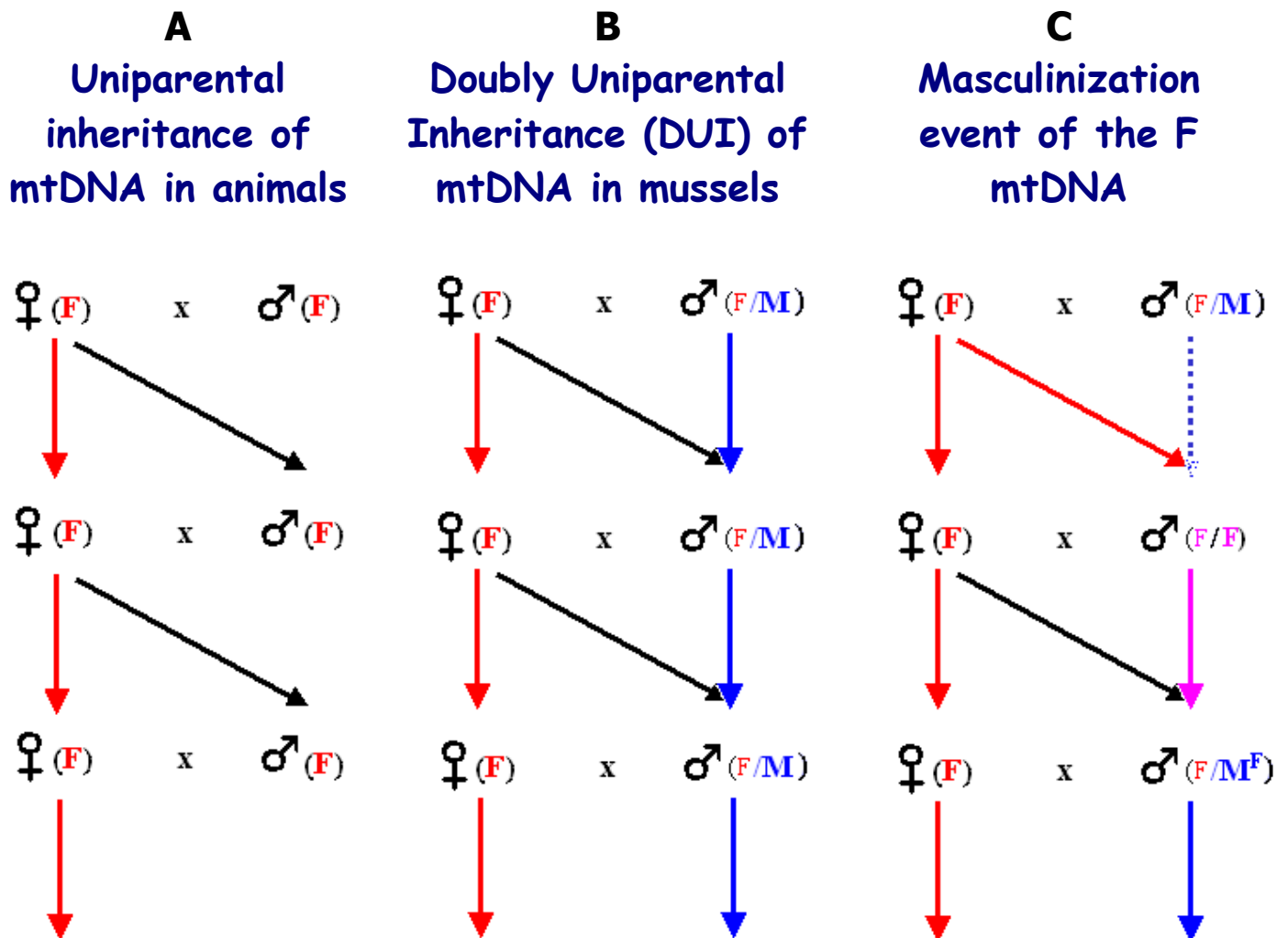
Σχήμα 1.6. Διπλή Μονογονική Κληρονόμηση (DUI, Zouros 1994a). Τα θηλυκά άτομα, τα οποία σε αντίθεση με τα αρσενικά εμφανίζονται ομοπλάσμικά, μεταβιβάζουν το mtDNA τους (τύπου F) σε όλους τους απογόνους τους ανεξαρτήτως φύλου. Τα αρσενικά άτομα περιέχουν, εκτός από το mtDNA που κληρονόμησαν από τη μητέρα τους (τύπος F), το mtDNA που κληρονόμησαν από τον πατέρα τους (τύπος M) το οποίο μεταβιβάζουν μόνο στους αρσενικούς τους απογόνους.

Τέλος, πρόσφατα διαπιστώθηκε η ύπαρξη της DUI στο χτένι *Tapes philippinarum* υποδεικνύοντας την πιθανή εξάπλωση του φαινομένου σε πολλά ή ίσως σε όλα τα δίθυρα (Passamonti and Scali 2001). Η ανακάλυψη της DUI στα είδη αυτά δεν έγινε με τον άμεσο τρόπο των διασταυρώσεων όπως στην περίπτωση των μυδιών. Στην περίπτωση αυτών των ειδών διαπιστώθηκε μέσα στον ίδιο πληθυσμό η ύπαρξη δύο εξελικτικών γραμμών mtDNA που απείχαν τόσο ώστε η διαφορά τους δεν μπορούσε να εξηγηθεί με απλή συσσώρευση μεταλλαγών μέσα σε μια γενιά.

Σε πληθυσμιακή μελέτη που έγινε για τα F και τα M γονιδιώματα, απομονώθηκαν από τις γονάδες αρσενικών ατόμων μόρια mtDNA τα οποία όταν τοποθετούνταν σε ένα φυλογενετικό δέντρο, ομαδοποιούνταν με τα F γονιδιώματα και όχι με τα M όπως συνέβαινε στα τυπικά αρσενικά (Hoeh et al. 1997). Το ποσοστό αυτών των αρσενικών κυμαινόταν στο 10%. Έμοιαζε δηλαδή σαν ένα μόριο F να έχει εισβάλει στην γραμμή μεταβίβασης του M γονιδιώματος. Έτσι ενώ από πλευράς αλληλουχίας το περιεχόμενο mtDNA του σπέρματος έμοιαζε με τα F γονιδιώματα, από πλευράς λειτουργίας έμοιαζε με τα M. Το φαινόμενο αυτό ονομάστηκε «αρρενοποίηση» (masculinization) του F mtDNA και τα αρρενοποιημένα F μόρια ονομάστηκαν M^F (Ladoukakis and Zouros 2001). Το φαινόμενο της αρρενοποίησης μορίων mtDNA αποτελεί το συνδετικό κρίκο μεταξύ των δύο εξελικτικών γραμμών F και M που ακολουθούν παράλληλες πορείες και θεωρητικά δεν συναντώνται πουθενά. Κάθε φορά όμως που μια F εξελικτική γραμμή υποκαθιστά μια M εκτοπίζοντάς την μηδενίζεται ο χρόνος διαφοροποίησης των δύο μορίων M και F, τα οποία αρχίζουν να διαφοροποιούνται ξανά από το μηδέν (Σχήμα 1.7). Επειδή ο εξελικτικός χρόνος μηδενίζεται κάθε φορά που συμβαίνει ένα φαινόμενο αρρενοποίησης δίδεται η εικόνα ότι η DUI έχει πολλαπλές, ανεξάρτητες εμφανίσεις στον εξελικτικό χρόνο όταν μελετούνται είδη τα οποία απέχουν μεγάλα χρονικά διαστήματα.

Θεωρητικά, το φαινόμενο της αλλαγής των ρόλων των μιτοχονδριακών γονιδιωμάτων μπορεί να συμβαίνει και στα θηλυκά. Δηλαδή M γονιδιώματα να περνούν στη γραμμή μεταβίβασης του F και να κληρονομούνται μέσω των ωαρίων. Το φαινόμενο αυτό της “θηλεοποίησης” του M mtDNA (Ladoukakis et al. 2002) αποτελεί προς το παρόν μία θεωρητική σύλληψη. Αν και έχουν διαπιστωθεί στη φύση θηλυκά άτομα ετεροπλασμικά για ένα F κι ένα M γονιδίωμα, τα ετεροπλασμικά αυτά θηλυκά εμφανίζονται σε πολύ μικρή συχνότητα και δεν είναι γνωστό αν μεταβιβάζουν στους απογόνους τους το M mtDNA τους. Οι Rawson and Hilbish (1995) παρατήρησαν ομοπλασμικά θηλυκά για ένα

M γονιδίωμα. Οι παρατηρήσεις τους όμως αυτές δεν αποκλείουν την παρουσία του F στα ίδια αυτά θηλυκά επειδή οι εκκινητές που χρησιμοποίησαν πολλαπλασιάζουν επιλεκτικά το M γονιδίωμα.



Σχήμα 1.7. (A) Μονογονική κληρονόμηση, (B) DUI και (C) αρρενοποίηση (masculinization). Αντίθετα με ό,τι συμβαίνει στους υπόλοιπους ζωικούς οργανισμούς, στα μύδια συνυπάρχουν στο ίδιο είδος δύο εξελικτικές γραμμές mtDNA. Σε ορισμένες περιπτώσεις ένα μόριο από τη Γραμμή F εισβάλλει στη Γραμμή M, μηδενίζοντας το χρόνο διαφοροποίησης των μορίων M και F, δίνοντας την εντύπωση ότι η DUI έχει πολλαπλές ανεξάρτητες εμφανίσεις.

1.9. Σκοπός της διατριβής

Η πρόσφατη ανακάλυψη ότι το mtDNA ανασυνδυάζεται, πέρα από τα θεμελιώδη ερωτήματα που γέννησε σχετικά με την έκταση του φαινομένου στο ζωικό βασίλειο και του χρήση του mtDNA ως μοριακό εργαλείο, θέτει ένα βασικό ερώτημα που προηγείται

των υπολοίπων: το ερώτημα αυτό αφορά στη δυναμική του φαινομένου από εξελικτική σκοπιά, δηλαδή στο κατά πόσο αυτά τα ανασυνδυασμένα μόρια, τα οποία δημιουργούνται στις γονάδες ορισμένων αρσενικών μυδιών, μεταβιβάζονται στις επόμενες γενιές και διασπείρονται στους πληθυσμούς.

Επιπλέον, η ανακάλυψη του ανασυνδυασμού στο mtDNA του μυδιού επιβάλλει την αναθεώρηση και επανεξέταση ορισμένων πτυχών της DUI, όπως είναι το φαινόμενο της αρρενοποίησης. Πριν την ανακάλυψη του ανασυνδυασμού, η μελέτη μίας και μόνο περιοχής του μορίου αρκούσε θεωρητικά για να το χαρακτηρίσει σαν M ή F. Όμως, από τη στιγμή που ο ανασυνδυασμός προβλέπει την ύπαρξη μωσαϊκών² M, F μορίων, είναι απαραίτητη η μελέτη περισσότερων περιοχών για το χαρακτηρισμό τους.

Σκοπός της παρούσας διατριβής ήταν να διερευνηθεί τα δύο παραπάνω σημεία. Αν ήταν δυνατό να αποδειχτεί ότι υπάρχουν άτομα που φέρουν στις γονάδες τους μωσαϊκά μόρια ενώ ταυτόχρονα είναι ομοπλάσμικά για αυτόν τον τύπο γονιδιώματος (αποκλείοντας έτσι το ενδεχόμενο να παράχθηκε ένα τέτοιο μόριο μέσα τους), τότε αυτομάτως θα συνεπαγόταν ότι τα ανασυνδυασμένα μόρια διασπείρονται στους φυσικούς πληθυσμούς. Για το σκοπό αυτό μελετήθηκε το γονίδιο της τρίτης υπομονάδας της κυτοχρωμικής οξειδάσης (COIII) του mtDNA που ελήφθη από τη γονάδα ενός θηλυκού ατόμου του είδους *Mytilus galloprovincialis* (Sp41). Το συγκεκριμένο άτομο, σύμφωνα με τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την ανάλυση με RFLPs (Λαδουκάκης 1998), εμφάνιζε έναν μοναδικό απλότυπο (C13). Ο απλότυπος αυτός φαινόταν ότι αντιστοιχούσε σε ανασυνδυασμένο μόριο. Για να ελεγχθεί αν το μόριο αυτό ήταν ανασυνδυασμένο προχωρήσαμε σε κλωνοποίηση και αλληλούχιση του γονιδίου της COIII του θηλυκού ατόμου Sp41 και στη σύγκριση της αλληλουχίας του με άλλες που ήταν ήδη γνωστές.

Η δεύτερη προσέγγιση αφορούσε όχι μόνο στη διερεύνηση για τη διασπορά ανασυνδυασμένων μορίων στη φύση, αλλά και στο κατά πόσο ο ανασυνδυασμός του mtDNA μπορεί να «απειλήσει» το φαινόμενο της αρρενοποίησης. Με τη χρήση περιοριστικών ενδονουκλεασών μελετήθηκε ένα τμήμα του γονιδίου της πρώτης υπομονάδας της κυτοχρωμικής οξειδάσης (COI) μεγέθους 900bp από 139 αρσενικά άτομα. Τα άτομα ανήκαν στο είδος *Mytilus galloprovincialis* και προέρχονταν από πληθυσμούς της Μεσογείου και της Μαύρης Θάλασσας. Είχαν ήδη μελετηθεί με την ίδια μεθοδολογία για

² Με τον όρο μωσαϊκά προσδιορίζουμε τα μόρια mtDNA που κατά μήκος της αλληλουχίας τους εμφανίζουν περιοχές τύπου F και M, λόγω ανασυνδυασμού.

δύο άλλες περιοχές του mtDNA των γονάδων τους (COIII και 16sRNA, Ladoukakis et al. 2002).

Κεφάλαιο 2

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1. Συλλογή και φύλαξη των δειγμάτων

Τα δείγματα που αναλύθηκαν στην παρούσα μελέτη προέρχονταν από περιοχές του Ατλαντικού, της Μεσογείου και της Μαύρης Θάλασσας (Πίνακας 2.1). Ανήκαν όλα στο είδος *Mytilus galloprovincialis* (Gosling 1992).

Περιοχή δειγματοληψίας	Κωδικός	Αριθμός ατόμων	Ιδιότητα πληθυσμού
Χαλάστρα (Θεσσαλονίκη)	HAL	20	Εκτρεφόμενος
Μεγάλο Πεύκο (Αττική)	MP	12	Εκτρεφόμενος
Φάρος (Λιμάνι Ηρακλείου)	FAR	15	Άγριος
Κεφαλονιά	CEF	34	Άγριος
Βενετία (Αδριατική)	PAD	27	Εκτρεφόμενος
Κριμαία (Μαύρη Θάλασσα)	BS	31	Άγριος
Ισπανία (Ατλαντικός)	SP	1	Εκτρεφόμενος

Πίνακας 2.1. Περιγραφή των δειγμάτων της παρούσας μελέτης

Ο προσδιορισμός του φύλου των ατόμων είχε γίνει με μικροσκοπική μελέτη των γονάδων τους στο οπτικό μικροσκόπιο Zeiss σε μεγέθυνση προσοφθάλμιου φακού x10 και αντικειμενικού x40 (Λαδουκάκης 1998). Στη συνέχεια, οι ιστοί των οργανισμών τεμαχίζονταν και φυλάσσονταν στους -80°C .

2.2. Επεξεργασία δειγμάτων

2.2.1. Εξαγωγή Ολικού DNA

Η εξαγωγή ολικού DNA έγινε από τμήμα της γονάδας κάθε ατόμου με τη μέθοδο της πρωτεΐνάσης K (Miller et al. 1988).

Σύμφωνα με τη μέθοδο αυτή, μικρή ποσότητα ιστού κονιορτοποιούταν με υγρό άζωτο και τοποθετούταν σε σωλήνα eppendorf που περιείχε 400μl lysis buffer, 10μl proteinase K 20mg/l, 32μl SDS 10% w/v. Το lysis buffer αποτελείται από 10mM Tris pH 8, 10mM EDTA pH 8 και 400mM NaCl. Το μείγμα επωζόταν σε υδατόλουτρο 55°C για τουλάχιστο 4h και ακολουθούσε προσθήκη 280μl κορεσμένου διαλύματος NaCl (6M),

vortex για 15min και φυγοκέντρηση στις 13000rpm για 30min. Το υπερκείμενο διάλυμα λαμβανόταν προσεκτικά και μεταφερόταν σε άλλο σωλήνα, όπου το DNA κατακρυμνιζόταν με προσθήκη ισοπροπανόλης στους -20°C . Μετά από 30min ακολουθούσε νέα φυγοκέντρηση στις 13000rpm για 15min και έπειτα προσθήκη 100μl οξικού νατρίου (0.3M, pH 5.2) και 250μl absolute αιθανόλης. Νέα φυγοκέντρηση για 10min, αφαίρεση του υπερκείμενου και ξέπλυμα του ίζηματος με 200μl αιθανόλης 70% w/w. Η αιθανόλη αφαιρούταν προσεκτικά, το ίζημα στέγνωσε στους 37°C ή σε θερμοκρασία δωματίου. Η πελλέτα του DNA επαναδιαλυόταν με προσθήκη 100-200μl nanopure H_2O . Τέλος, ο έλεγχος της ύπαρξης και της ποιότητας του εξαγόμενου DNA γινόταν με ηλεκτροφόρηση μίας μικρής ποσότητας του διαλύματος (1μl) σε πήκτωμα αγαρόζης 1% w/v.

2.3. Μελέτη του γονιδίου COIII

2.3.1. Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction)

Το τμήμα του mtDNA που επιλέχτηκε για τη μελέτη αντιστοιχεί σε μία περιοχή μεγέθους 860 bp περίπου του γονιδίου της υπομονάδας III της κυτοχρωμικής οξειδάσης (COIII). Για τον πολλαπλασιασμό του τμήματος αυτού χρησιμοποιήθηκε ένα ζευγάρι εκκινητών (primers) FOR 5'-TAT GTA CCA GGT CCA AGT CCG TG -3' και REV 5'-ATG CTC TTC TTG AAT ATA AGC GTA CC-3' (Stewart et al. 1996).

Οι τελικές συγκεντρώσεις των αντιδρώντων της PCR ήταν: MgCl_2 3mM, dNTPs 0.2mM, primer COI-F 0.5mM, primer F 0.5mM και *Taq* DNA πολυμεράση (Minotech ή BRL) 0.03u/μl, σε τελικό όγκο αντίδρασης 15μl. Ως DNA μήτρα (template DNA) προσθέταμε 1.5μl ολικού DNA. Οι συνθήκες της αντίδρασης PCR ήταν οι εξής: αρχική αποδιάταξη (pre-denaturation) του DNA στους 94°C για 2min και ακολούθως 35 επαναλαμβανόμενοι κύκλοι, καθένας εκ των οποίων περιλάμβανε τα εξής τρία στάδια: 1) αποδιάταξη (denaturation) του DNA για 1min, 2) πρόσδεση (annealing) των εκκινητών στους 54°C για 1min και 3) επιμήκυνση (extension) στους 72°C για 1min. Μετά τη συμπλήρωση των 35 κύκλων ακολουθούσε η τελική επιμήκυνση (final extension) στους 72°C για 5min.

Μετά από την PCR ακολουθούσε έλεγχος του προϊόντος της, ώστε να διαπιστωθεί η απόδοσή της. Τούτο γινόταν με ηλεκτροφόρηση 2-3μl του προϊόντος της PCR σε

πήκτωμα αγαρόζης 1% που περιείχε βρωμιούχο αιθίδιο και εμφάνιση - φωτογράφιση του ηλεκτροφορήματος κάτω από έκθεσή του σε UV ακτινοβολία.

2.3.2. Προετοιμασία του προϊόντος της PCR για κλωνοποίηση

Πριν κλωνοποιηθεί το προϊόν της PCR γινόταν καθαρισμός του από τα περισσεύματα των dNTPs και των εκκινητών καθώς και καθαρισμός από τα άλατα ($MgCl_2$) για να είναι απρόσκοπτη η δράση της λιγάσης. Ο καθαρισμός γινόταν με ιζηματοποίηση του DNA με αιθανόλη (Maniatis et al. 1982). Στο προϊόν της PCR προσθέτονταν 12μl διαλύματος οξικού νατρίου 3M (pH 5,2) (1/10 του τελικού όγκου) και νερό μέχρι τα 120 μl. Στη συνέχεια προσθέτονταν 2 όγκοι παγωμένης απόλυτης αιθανόλης και μετά από ανακίνηση, το μίγμα τοποθετούνταν στους $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ για 15- 30 min για να ιζηματοποιηθεί το DNA. Ακολουθούσε φυγοκέντρηση στις 13000 στροφές για 15 min, απόρριψη του υπερκείμενου, ξέπλυμα του ιζήματος με παγωμένη αιθανόλη 70%. Το ίζημα αφήνονταν O/N για να εξατμισθεί η αιθανόλη, επαναδιαλυόταν σε 10-20μl H_2O και φυλασσόταν στους -20°C . Ακολουθούσε ποσοτικοποίηση του καθαρού προϊόντος της PCR με οπτικό προσδιορισμό αφού είχε αναλυθεί σε πήκτωμα αγαρόζης μαζί με ένα μάρτυρα DNA γνωστής συγκέντρωσης.

2.3.3. Κλωνοποίηση του προϊόντος της PCR

Η κλωνοποίηση του προϊόντος της PCR γινόταν σε φορέα κλωνοποίησης ειδικό για την κλωνοποίηση προϊόντων PCR. Ο φορέας αυτός ήταν ο pGEM T vector της Promega. Ο φορέας είχε γίνει γραμμικός και στα 3' άκρα του είχε προστεθεί ένα επιπλέον T νουκλεοτίδιο (θυμίνη). Είναι γνωστό ότι η *Taq* πολυμεράση αφήνει στο 5' άκρο του DNA που παράγει ένα προεξέχον A νουκλεοτίδιο (Αδενίνη). Η αδενίνη ενώνεται με τη συμπληρωματική της θυμίνη που υπάρχει στα 3' άκρα του φορέα και η κλωνοποίηση γίνεται ευκολότερα. Επιπλέον, με το να υπάρχει ένα προεξέχον νουκλεοτίδιο στα 3' άκρα του φορέα, αυτός παραμένει γραμμικός ακόμα και με την παρουσία της λιγάσης και η απόδοση της κλωνοποίησης είναι μεγαλύτερη. Το μίγμα της αντίδρασης της λιγάσης γινόταν σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή σε τελικό όγκο 10μl και περιείχε:

5μl ligation buffer (2X)

- 1 μl pGEM - T vector (50ng)
- 1 μl T4 ligase (που συνόδευε το φορέα)
- 3 μl καθαρού προϊόντος PCR

Το ligation buffer περιείχε ATP. Το ligation mix επωαζόταν στους 4°C O/N και αποθηκεύονταν στους -20°C.

2.3.4. Μετασχηματισμός των βακτηριακών κυττάρων

Τα κύτταρα που χρησιμοποιήθηκαν για την κλωνοποίηση των προϊόντων PCR ήταν το στέλεχος DH5α του βακτηρίου *Escherichia coli*. Τα κύτταρα αυτά γίνονταν δεκτικά μετασχηματισμού (competent) και αποθηκεύονταν στους -80°C. Ένας σωλήνας erppendorf 1,5ml για κάθε προϊόν PCR που επρόκειτο να κλωνοποιηθεί και περιείχε περίπου 250 μl κυττάρων αφηνόταν να ξεπαγώσει μέσα σε πάγο. Στα κύτταρα αυτά προσθέτονταν 4-5 μl από προϊόν της ligation και ανακινούνταν ελαφρά με το χέρι χωρίς να μείνουν τα κύτταρα για πολύ χρόνο εκτός πάγου. Μετά την ανακίνηση παρέμεναν ακίνητα στον πάγο για 20 min και στη συνέχεια δέχονταν θερμικό σοκ στους 42°C για 45sec. Μετά το θερμικό σοκ τοποθετούνταν αμέσως στον πάγο για 2 min και ακολουθούσε προσθήκη 800 μl θρεπτικού μέσου (LB) σε κάθε σωλήνα. Οι σωλήνες με τα μετασχηματισμένα κύτταρα επωάζονταν υπό ανακίνηση στους 37°C για 45 min με 1 h. Φυγονεντρούνταν στις 3000 στροφές για 5 min και απλώνονταν σε τριβλία που περιείχαν στερεό θρεπτικό (LB + άγαρ) μαζί με αμπικιλίνη ως επιλεκτικό παράγοντα. Ο φορέας κλωνοποίησης (pGEM T vector) εκτός από το γονίδιο ανθεκτικότητας στην αμπικιλίνη εμπεριέχει και το γονίδιο μεταβολισμού της λακτόζης το οποίο διακόπτεται από το ένθεμα (Σχήμα 2.1). Γι' αυτό στα ίδια τριβλία είχε επιστρωθεί X-gal (Sigma) 40μl (20%). Αυτό δίνει τη δυνατότητα να ελεγχθούν οι αποικίες που περιέχουν το ένθεμα από αυτές που περιέχουν μόνο το φορέα. Τα βακτήρια αφήνονταν να αναπτυχθούν O/N και ακολουθούσε η συλλογή των λευκών αποικιών. Όταν η απόδοση του μετασχηματισμού ήταν μεγάλη δεν συλλέγονταν όλες οι λευκές αποικίες αλλά ένας μεγάλος αριθμός από αυτές.

Η συλλογή των αποικιών γινόταν με αποστειρωμένα tips. Η κάθε λευκή αποικία μεταφερόταν σε αριθμημένη θέση ενός τριβλίου που περιείχε LB, άγαρ και αμπικιλίνη. Το νέο τριβλίο με τις αριθμημένες αποικίες επωαζόταν O/N στους 37°C.

2.3.5. Έλεγχος θετικών κλώνων

Ελάχιστη ποσότητα από την κάθε αριθμημένη αποικία μεταφερόταν σε αποστειρωμένο erpendorf 0,5 ml που περιείχε 20-100 μ l STE buffer (100mM NaCl, 10mM Tris-HCl pH 8, 1mM EDTA pH 8). Αφού ανακινούνταν ισχυρά με πιπέτα Gilson για να διασπαστεί η μάζα των κυττάρων, οι σωλήνες τοποθετούνταν στους 94°C για 15-30 min. Στη συνέχεια αφήνονταν να κρυώσουν. 1 μ l από αυτό το μίγμα αποτελούσε το DNA μήτρα για την PCR που θα ακολουθούσε. Οι εκκινητές που χρησιμοποιούνταν κάθε φορά καθώς και οι συνθήκες της PCR ήταν ίδιες με αυτές που είχαν χρησιμοποιηθεί για να πολλαπλασιαστεί το ένθεμα με PCR από το ολικό DNA. Ο τελικός όγκος της αντίδρασης ήταν 10 μ l. 3 μ l από το προϊόν ηλεκτροφορούνταν σε πήκτωμα αγαρόζης 1% για να διαπιστωθεί ποιοι από τους κλώνους περιείχαν το σωστό ένθεμα.

Προηγούμενη φυλογεωγραφική μελέτη (Λαδουκάκης 1998) είχε δείξει ότι η περιοχή της COIII που μελετούνταν αποκάλυπτε πολυμορφισμό όταν κοβόταν με την περιοριστική ενδονουκλεάση *RsaI* (που κόβει στη θέση 5'GT-AC3') ή σε λιγότερο βαθμό όταν κοβόταν με την περιοριστική ενδονουκλεάση *HaeIII* (που κόβει στη θέση CC/GG). Οι πέψεις των θετικών κλώνων με αυτά τα ένζυμα χρησιμοποιήθηκαν ως διαγνωστικό των διαφορετικών κλώνων που προέκυπταν.

Οι πέψεις με τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες γινόταν σε τελικό όγκο 20 μ l που περιείχαν:

- 2 μ l buffer 10X (το buffer αυτό είναι ειδικό για το κάθε ένζυμο και παρέχεται μαζί με το ένζυμο από τον προμηθευτή.
- 0,2 μ l *RsaI* (Minotech 10 μ l)
- 7,5 μ l προϊόντος PCR
- 10 μ l H₂O.

Το μίγμα αφού ανακινούνταν αρκετά επωζόταν στους 37°C για 3 h έως O/N. Στη συνέχεια ηλεκτροφορούνταν σε πήκτωμα αγαρόζης 1,5 % που περιείχε βρωμιούχο αιθίδιο και το πήκτωμα φωτογραφιζόταν.

2.3.6. Καθαρισμός πλασμιδίων για αλληλούχιση

Βρέθηκαν 8 θετικοί κλώνοι, οι οποίοι έδωσαν ακριβώς τα ίδια περιοριστικά πρότυπα έπειτα από την πέψη με τα ένζυμα *RsaI* και *HaeIII* (τα αναμενόμενα που έδινε και ο απλότυπος C13). Για το λόγο αυτό επιλέχτηκε τυχαία ένας από αυτούς προκειμένου να αλληλουχηθεί το ένθεμα που περιείχε.

Κύτταρα του κλώνου που επιλέχτηκε απλώνονταν σε τριβλίο με στερεό θρεπτικό (LB + άγαρ) και αμπικιλίνη. Μετά από επώαση O/N λαμβάνονταν μοναδικές αποικίες και καλλιεργούνταν σε υγρό θρεπτικό O/N. Τα κύτταρα αυτά χρησιμοποιούνταν για την παραλαβή καθαρού πλασμιδιακού DNA. Το πλασμιδιακό DNA καθαριζόταν με κλώνες QIAGEN σύμφωνα με το πρωτόκολλο του κατασκευαστή. Ένα δείγμα από το καθαρισμένο πλασμιδιακό DNA ηλεκτροφορούνταν σε αгарόζη 1% για να ποσοτικοποιηθεί, ενώ το υπόλοιπο δινόταν για αλληλούχιση.

2.3.7. Αλληλούχιση του ενθέματος

Η πρωτοταγής δομή των τμημάτων DNA που είχαν κλωνοποιηθεί γινόταν σε αυτόματο sequencer PT100 της MG Research. Για να αυξηθεί η ακρίβεια και η αξιοπιστία των αποτελεσμάτων, η ανάγνωση των αλληλουχιών γινόταν και για τις δύο αλυσίδες του DNA. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν εκκινητές που είχαν ομόλογες περιοχές πάνω στο πλασμίδιο φορέα pGEM T. Για την ανάγνωση της μίας αλυσίδας χρησιμοποιήθηκε ο εκκινητής SP6 (5'-ATT TAG GTG ACA CTA TAG- 3') ενώ για την ανάγνωση της άλλης αλληλουχίας ο εκκινητής T7 (5'-GTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG C-3'). Οι θέσεις που βρίσκονται οι εκκινητές πάνω στο φορέα φαίνονται στην Σχήμα 2.1. Γινόταν δηλαδή ανάγνωση του ενθέματος και για τους δύο κλώνους DNA, για να είναι αξιόπιστα και ακριβή τα αποτελέσματα.

Οι αλληλουχίες λαμβάνονταν με τη μορφή χρωματογραφημάτων και η επεξεργασία γινόταν με το πρόγραμμα CHROMAS 1.4. Το πρόγραμμα αυτό επιτρέπει τη διόρθωση λαθών του αυτόματου μηχανήματος. Η επεξεργασία των αλληλουχιών, η εύρεση των διαφορετικών νουκλεοτιδίων καθώς και η ομαδοποίηση των αλληλουχιών (όπου χρειαζόταν) έγινε στο πρόγραμμα MEGA (Kumar et al. 1994).

2.4. Μελέτη του γονιδίου COI

2.4.2. Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction)

Το τμήμα του mtDNA που επιλέχτηκε για τη μελέτη αντιστοιχεί σε μία περιοχή μεγέθους 900 bp περίπου του γονιδίου της υπομονάδας I της κυτοχρωμικής οξειδάσης (COI). Για τον πολλαπλασιασμό του τμήματος αυτού χρησιμοποιήθηκε ένα ζευγάρι εκκινητών (primers) COI-F και F που σχεδιάστηκαν με βάση την αλληλουχία της *Albinaria coerulea*. Οι αλληλουχίες των εκκινητών είναι οι εξής: COI-F: 5'- GGT AA(AG) GAT ATA ATT TA(CT) CC(AG) CGG – 3' και F: 5'- TGT GCT AC(AC) AC(AG) TA(AG) TAA GTA TCA T – 3'. Οι εκκινητές αυτοί πολυμερίζουν τόσο τις M όσο και τις F τύπου αλληλουχίες.

Οι τελικές συγκεντρώσεις των αντιδρώντων της PCR ήταν: MgCl₂ 3mM, dNTPs 0.2mM, primer COI-F 0.5mM, primer F 0.5mM και *Taq* DNA πολυμεράση (Minotech ή BRL) 0.03u/μl, σε τελικό όγκο αντίδρασης 15μl. Ως DNA μήτρα (template DNA) προσθέταμε 1.5μl ολικού DNA. Οι συνθήκες της αντίδρασης PCR ήταν οι εξής: αρχική αποδιάταξη (pre-denaturation) του DNA στους 94°C για 2min και ακολούθως 35 επαναλαμβανόμενοι κύκλοι, καθένας εκ των οποίων περιλάμβανε τα εξής τρία στάδια: 1) αποδιάταξη (denaturation) του DNA για 1min, 2) πρόσδεση (annealing) των εκκινητών στους 54°C για 1min και 3) επιμήκυνση (extension) στους 72°C για 1min. Μετά τη συμπλήρωση των 35 κύκλων ακολουθούσε η τελική επιμήκυνση (final extension) στους 72°C για 5min.

Μετά από κάθε PCR ακολουθούσε έλεγχος του προϊόντος της, ώστε να διαπιστωθεί η απόδοσή της. Τούτο γινόταν με ηλεκτροφόρηση 2-3μl του προϊόντος της PCR σε πήκτωμα αγαρόζης 1% που περιείχε βρωμιούχο αιθίδιο και εμφάνιση - φωτογράφιση του ηλεκτροφορήματος κάτω από έκθεσή του σε UV ακτινοβολία.

2.4.3. Πέψη του Προϊόντος της PCR με Περιοριστικές Ενδονουκλεάσες

Κάθε προϊόν PCR, του οποίου η ποιότητα είχε προηγουμένως ελεγχθεί, υποβαλλόταν σε πέψη από περιοριστικά ένζυμα. Τα ένζυμα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν το *Rsa* I και το *Nco* I (Πίνακας 2.2). Η επιλογή των συγκεκριμένων ενζύμων έγινε αφού προηγήθηκε μελέτη των προτύπων πέψης μίας σειράς περιοριστικών ενδονουκλεασών στο

συγκεκριμένο τμήμα του γονιδίου της COI (Δημητρίου 2002), ώστε να είναι δυνατή η ανίχνευση και η ταυτοποίηση των M και F απλοτύπων.

Περιοριστικά ένζυμα	Πηγή απομόνωσης	Αλληλουχία αναγνώρισης	Θερμοκρασία δράσης	Παρασκευαστική εταιρία
<i>Rsa</i> I	<i>Rhodopseudomonas sphaeroides</i>	5'GT●AC 3'	37°C	Minotech
<i>Nco</i> I	<i>Nocardia corallina</i>	5'C●CATGG 3'	37°C	Minotech

Πίνακας 2.2. Περιοριστικά ένζυμα που χρησιμοποιήθηκαν για την ανάλυση τμήματος του γονιδίου COI.

Ο τελικός όγκος της αντίδρασης πέψης ήταν 20μl, εκ των οποίων 12μl ήταν DNA από το προϊόν της PCR, 2μl buffer (10x), 0.2μl ένζυμο (10units/μl) και 5.8μl nanopure H₂O. Η διαδικασία διαρκούσε 3-6h σε θάλαμο σταθερής θερμοκρασίας 37°C. Μετά την επώαση σειρά είχε η ηλεκτροφόρηση του συνόλου του δείγματος σε πήκτωμα αγαρόζης 1.5% (που περιείχε βρωμιούχο αιθίδιο) για 2h 15min σε χαμηλή τάση (~60V). Οι ζώνες του DNA στο ηλεκτροφόρημα γίνονταν ορατές με τη διέλευση UV ακτινοβολίας και φωτογραφίζονταν.

2.5. RFLPs (Restriction Fragment Length Polymorphisms)

Η τεχνική των RFLPs (Botstein et al. 1980) περιλαμβάνει την πέψη του DNA με ένα ή περισσότερα περιοριστικά ένζυμα, διαχωρισμό των τμημάτων DNA με βάση το μοριακό τους βάρος σε πήκτωμα αγαρόζης ή ακρυλαμίδης και ανάγνωση του περιοριστικού προτύπου.

Οι διαφορές που παρατηρούνται μεταξύ των περιοριστικών προτύπων διαφορετικών αλληλουχιών μπορεί να οφείλονται σε αντικαταστάσεις βάσεων, σε ενθέσεις ή σε ελλείματα τμημάτων DNA ή σε ανακατατάξεις αλληλουχιών DNA. Η κάθε περίπτωση δίνει τις δικές της χαρακτηριστικές αλλαγές στο περιοριστικό πρότυπο, αποκαλύπτοντας πολυμορφισμούς.

Κεφάλαιο 3

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

ΜΕΡΟΣ Α': Αναζήτηση ανασυνδυασμένων μορίων τύπου F

3.A.1. Ο απλότυπος C13

Σε μία φυλογεωγραφική μελέτη, στην οποία μεταξύ άλλων αναλύθηκε με RFLPs το γονίδιο της τρίτης υπομονάδας της κυτοχρωμικής οξειδάσης του mtDNA μυδίων από πληθυσμούς της Μεσογείου, της Μαύρης Θάλασσας και του Ατλαντικού, αποκαλύφθηκε σε θηλυκό άτομο ένας ξεχωριστός, από την άποψη του περιοριστικού προτύπου του, απλότυπος (Ladoukakis et al. 2002). Ο απλότυπος C13 παρατηρήθηκε αποκλειστικά σε ένα θηλυκό άτομο (Sp41), αλλά εντούτοις ομαδοποιούταν με τους απλοτύπους που προέκυπταν από μόρια τύπου M, τα οποία υπό κανονικές συνθήκες δεν παρατηρούνται σε θηλυκά άτομα (Πίνακας 3.A.1).

		Enzymes R H H R H H E H B R R H R R H R R R R R																			
		Sites: 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20																			
Απλότυποι τύπου F	C1	1	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	1	1
	C2	1	1	0	0	0	1	0	1	0	1	0	1	1	0	0	1	0	0	1	1
	C3	1	1	0	0	0	1	0	1	0	1	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1
	C4	1	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	1	0	0	1	1	0	1	1
	C5	1	1	0	0	0	1	0	1	0	1	0	1	1	0	0	1	1	0	1	1
	C6	1	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1
	C7	1	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	1	1
	C8	1	1	0	0	0	1	1	1	0	1	0	1	1	0	0	1	0	0	1	1
	C9	1	1	0	0	0	1	1	1	0	1	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1
	C10	1	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1	1	0	0	1	1	0	1	1
	C11	1	1	0	0	0	1	1	1	0	1	0	1	1	0	0	1	1	0	1	1
	C12	1	1	0	1	0	1	1	1	0	1	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1
Απλότυποι τύπου M	C13	1	1	0	0	0	1	1	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0
	C14	1	0	1	0	0	1	0	1	0	1	1	1	0	1	1	0	0	1	1	1
	C15	1	0	1	0	0	1	0	1	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	1
	C16	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0	1	0	0	0	1	1	1
	C17	1	0	0	0	0	1	0	1	0	1	1	1	0	1	1	0	0	1	1	1
	C18	1	0	1	0	1	1	0	1	0	1	1	1	0	1	1	0	0	1	1	1
	C19	1	0	1	0	0	1	0	1	0	1	1	1	0	0	1	0	0	1	1	0
	C20	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0
	C21	1	0	1	0	0	1	0	1	1	1	1	1	0	0	1	0	0	1	1	0
	C22	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0

Πίνακας 3.A.1. Περιοριστικοί απλότυποι του τμήματος γονιδίου της COIII. Πάνω από της θέσεις κοπής (sites) σημειώνονται τα ένζυμα που τις αναγνωρίζουν (R: *Rsa*I, H: *Hae*III, E: *Eco*RI, B: *Bam*HI). Ο αριθμός 1 μαρτυρά κοπή, ενώ ο 0 το αντίθετο. Ο απλότυπος C13 ομαδοποιείται με τα μόρια τύπου M, ενώ βρέθηκε σε θηλυκό άτομο.

Οι συγγραφείς εξέφρασαν την ακόλουθη υπόθεση προκειμένου να εξηγήσουν την παραπάνω παρατήρηση: ότι, επρόκειτο είτε για περίπτωση «θηλεοποίησης», δηλαδή το μόριο είχε ειβάλει στη θηλυκή γραμμή κληρονόμησης ενώ προερχόταν από την Μ γραμμή, είτε αποτελούσε μία περίπτωση ανασυνδυασμού στην περιοχή της COIII μεταξύ ενός F και ενός Μ μορίου. Η δεύτερη περίπτωση θεωρήθηκε πιθανότερη, καθώς από την μελέτη του γονιδίου του 16s RNA του ίδιου προέκυψε ότι ο απλότυπος του εν λόγω γονιδίου αντιστοιχούσε σε τυπικό μόριο F τύπου.

3.A.2. Αλληλούχιση του γονιδίου COIII

Θέλοντας να ελέγξουμε την παραπάνω υπόθεση, προχωρήσαμε στην κλωνοποίηση και στην αλληλούχιση του γονιδίου COIII που εμφάνιζε τον απλότυπο C13, με τον τρόπο που περιγράφηκε στο προηγούμενο κεφάλαιο. Το αποτέλεσμα αποτυπώνεται στο Σχήμα 3.A.1.

```

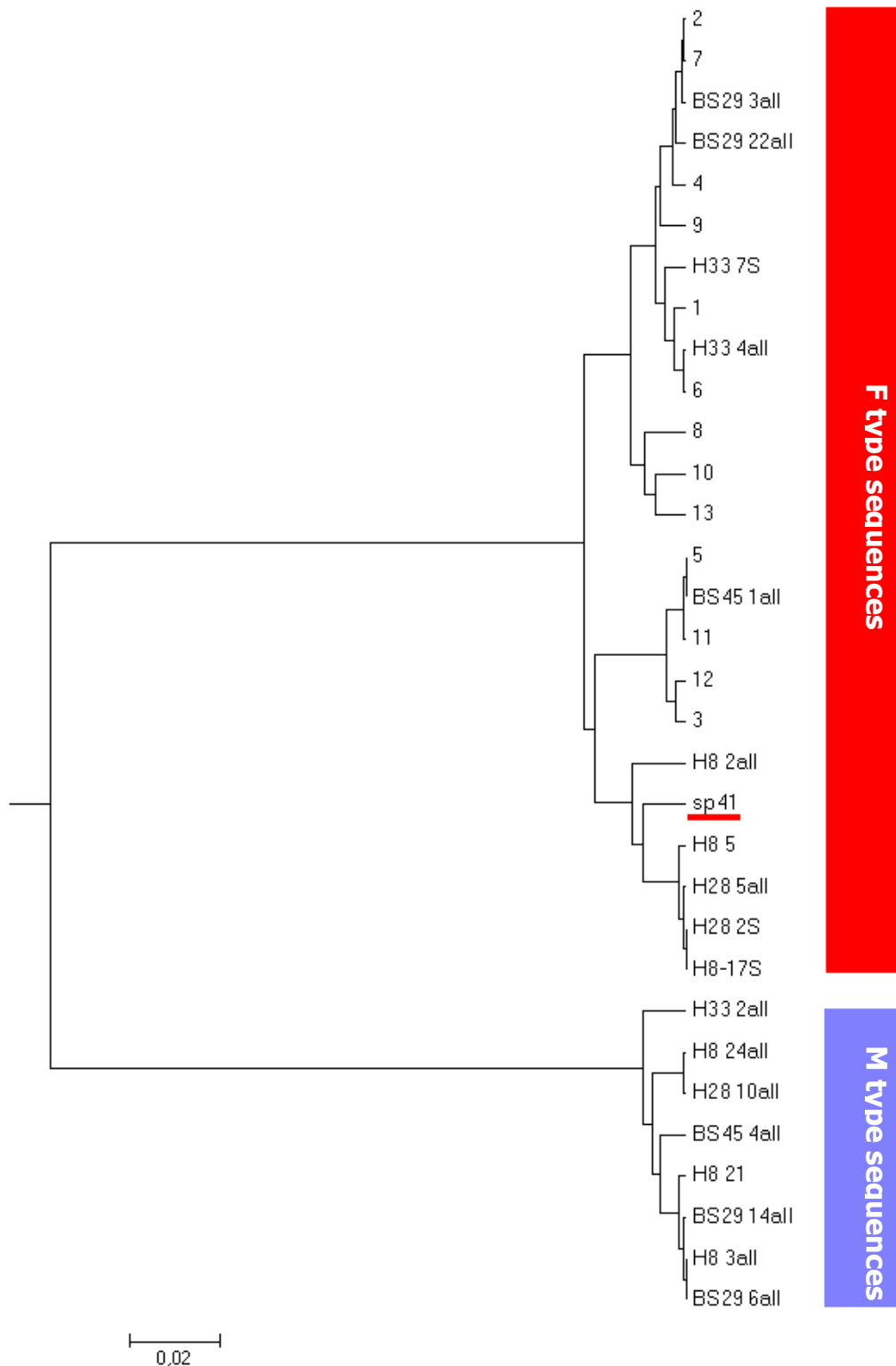
1      TATGTACCAGGTCCAAGTCCGTGGCCATTTTTTGTGGCTATTCGGCTAACGGAATAGCG
61     GTAGGGTTAATTTTGTGACTGCATCGAACCCCCAGATTTTTATTAATAGGTATGAGTCTG
121    GTTTGCATACTATTTGAGAACTTTTAGATGGTGACGCGATTTAATTCGTGAAGGAGACATT
181    GGGTTTCACACTCGTTTTGTAATCAAAGATTTTCGAGATGGCGTTGCCTTGTTTTATCTG
241    TCTGAAGTGATATTTTTCTTCACTTTTTTTTGGACTTTTTTCCATAATGCTTTAAGGCC
301    TCGTGTGAGCTAGGAATACGGTGGCCTCCTCCTGGAATTCGTACGCCAAACCCGTATCT
361    ACTAGTCTGTTTGAGACAGGTCTTCTAATTAGAAGAGGGCTGTTTGTAACCAAGCCAT
421    AAGAGGATGCGCTTGAAGGATTACGACGTAGGGCCATTCATCGGCCTAGTGGTGACAATC
481    GTATGCGGGACTGTGTTTTCTTGGTACAACGCGGGAATATTAATGAAACTCCTATACT
541    ATTGCAGATAGGGTTTATGGTAGGGTTTTTTACTTACTAACTGGATTCCACGGGATACAC
601    GTTGTTCGTAGGGACTATTTGGCTAATGGTAAGGTTAGTTCGACTATGACGCGGGAGTTT
661    TCTAGTCAACGACACTTCGGGTTTGAGGCTTGTATTTGGTATTGACATTTTCGTAGATGTG
721    GTATGAGTGGCATTTGTGGTGCCTAGTGTATGTGTGGTTTGGAGGATGATTATATATGTGA
781    TGGTTTAAGATATGGGATGGGGATGTTTACACATTTAAGTCCCCGGATGCCAAACCTTCT
841    TGGTACGCTTATATCAAGAAGAGCAT

```

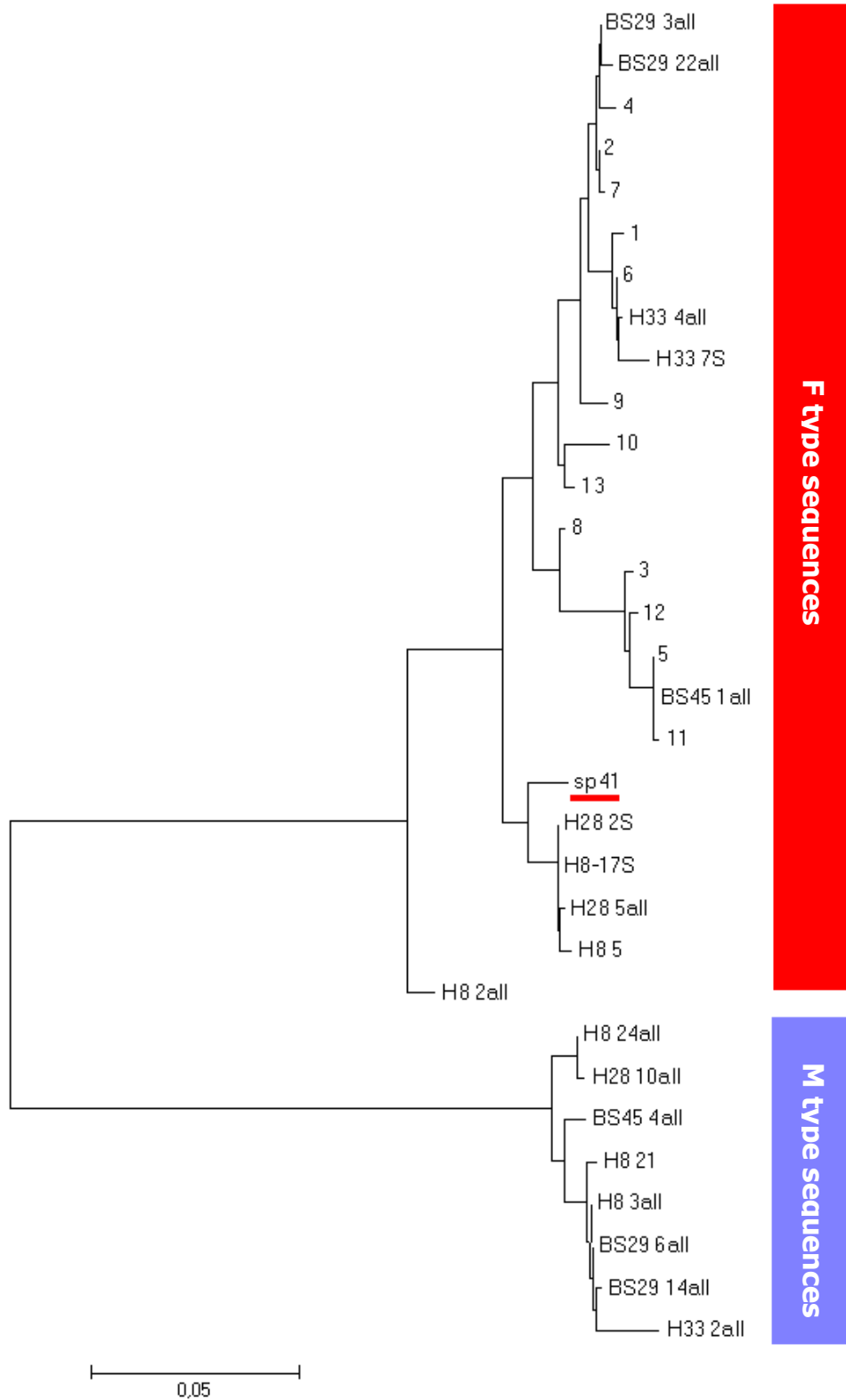
Σχήμα 3.A.1. Η αλληλουχία του γονιδίου COIII.

Η αλληλουχία αυτή στοιχήθηκε με γνωστές αλληλουχίες Μ και F τύπου του είδους *M. galloprovincialis* και ελέγχθηκε αν έφερε ανασυνδυασμένα τμήματα. Επιπλέον,

κατασκευάστηκαν δέντρα με φαινητικές μεθόδους που περιλάμβαναν τις παραπάνω αλληλουχίες (Σχήματα 3.A.2, 3.A.3).

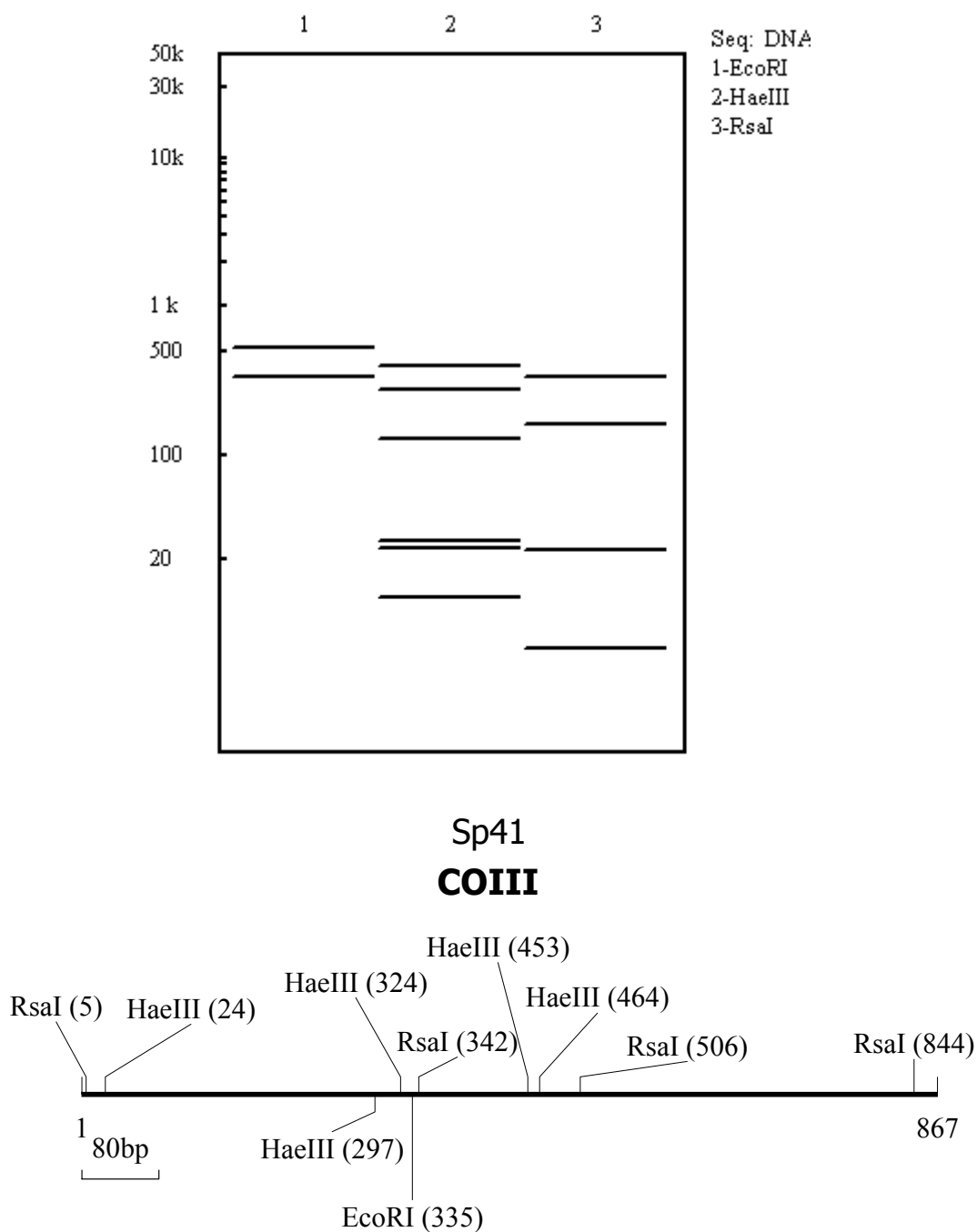


Σχήμα 3.A.2. Φυλογενετικό δέντρο των γνωστών αλληλουχιών με τη μέθοδο UPGMA. Η αλληλουχία του ατόμου Sp41 (υπογραμμισμένη) τοποθετείται στον κλάδο F.



Σχήμα 3.A.3. Φυλογενετικό δέντρο των γνωστών αλληλουχιών με τη μέθοδο NJ. Η αλληλουχία του ατόμου Sp41 (υπογραμμισμένη) τοποθετείται στον κλάδο F.

Σύμφωνα με παραπάνω αναλύσεις, η αλληλουχία που αντιστοιχούσε στον απλότυπο C13 φαινόταν να μην είναι ούτε ανασυνδυασμένη, ούτε «θηλεοποιημένη», αλλά αντίθετα ήταν τυπική F. Για να εξηγηθεί, λοιπόν, η ιδιαιτερότητα του απλότυπου C13, αναλύθηκε το περιοριστικό πρότυπο της αλληλουχίας με τη βοήθεια του ηλεκτρονικού προγράμματος DNAMAN (Σχήμα 3.A.4).



Σχήμα 3.A.4. Το περιοριστικό πρότυπο και ο περιοριστικός χάρτης του γονιδίου COIII του ατόμου Sp41.

Όπως προέκυψε από την ανάλυση, η αλληλουχία C13 φαινόταν ξεχωριστή όταν εξετάστηκε με RFLPs για δύο λόγους. Ο πρώτος είναι ότι το μόριο φέρει αντικαταστάσεις νουκλεοτιδίων σε θέσεις κοπής και ο δεύτερος είναι ότι έγιναν λάθη κατά την προηγούμενη ανάλυση με RFLPs. Συγκεκριμένα, οι θέσεις 700 (site 16) και 748 (site 17, Πίνακας 3.A.1) κόβονται από το ένζυμο *RsaI* σε όλους τους θηλυκούς τύπους (εκτός από 4 στις 12 περιπτώσεις μόνο στη θέση 748) ενώ δεν κόβονται σε κανέναν αρσενικό, πράγμα που τις καθιστά διαγνωστικές. Η αλληλουχία C13, όμως, εξαιτίας δύο σημειακών μεταλλαγών δεν αναγνωρίζεται στις δύο αυτές θέσεις από το *RsaI*, παράγοντας παραπλανητικά αποτελέσματα όταν εξετάζεται με RFLPs. Το ίδιο συμβαίνει με τη θέση 24 (site 2, Πίνακας 3.A.1, Σχήμα 3.A.4), η οποία είναι διαγνωστική για το ένζυμο *HaeIII*.

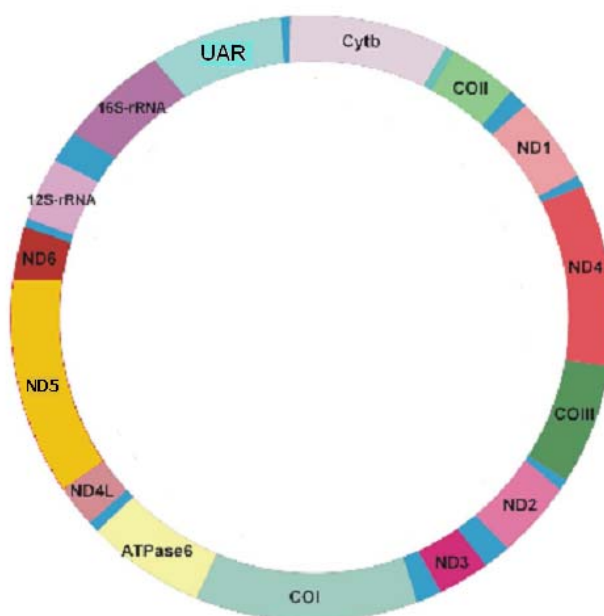
Φαίνεται, επιπλέον, ότι έγιναν δύο κρίσιμα σφάλματα κατά την ανάγνωση των περιοριστικών προτύπων της αλληλουχίας του ατόμου Sp41 σε δύο διαγνωστικές θέσεις. Στη θέση 428 (site 11) και στη θέση 506 (site 13), όπου εκτιμήθηκε ότι η αλληλουχία κόβεται από το *RsaI*, ενώ όπως φάνηκε μετά την αλληλούχιση, κάτι τέτοιο δεν συμβαίνει.

Η αλληλούχιση του μορίου Sp41 και η ανάλυση των περιοριστικών προτύπων της με το πρόγραμμα DNAMAN αποκάλυψε δύο περιοριστικές θέσεις που δεν υπάρχουν σε κανένα άλλο μόριο από τα άτομα που εξέτασαν οι Ladoukakis et al. 2002. Πρόκειται για τις θέσεις 335 (πέψη από το *EcoRI*) και 464 (*HaeIII*).

ΜΕΡΟΣ Β': Αναζήτηση ανασυνδυασμένων μορίων τύπου M

3.B.1. Τα δεδομένα της προηγούμενης μελέτης

Στο Σχήμα 3.B.1 παρουσιάζεται ο χάρτης του mtDNA του μυδιού. Η διεύθετηση των γονιδίων πάνω στο μόριο διαφέρει από τα τυπικά μόρια mtDNA των ζωικών οργανισμών (βλ. ΕΙΣΑΓΩΓΗ). Ανάμεσα στα γονίδια του 16S rRNA και του Cytb παρεμβάλλεται μία μη κωδικοποιούσα περιοχή άγνωστης λειτουργίας (unassigned region – UAR, Σχήμα 3.B.1), της οποίας το μέγεθος διαφοροποιείται μεταξύ των μορίων της γραμμής F και της γραμμής M. Θεωρείται ότι είναι αντίστοιχη με την περιοχή έναρξης της αντιγραφής του mtDNA (D-loop) των θηλαστικών. Υπάρχουν ενδείξεις ότι η περιοχή αυτή μπορεί να καθορίζει τη «συμπεριφορά» των μορίων mtDNA του μυδιού, αν δηλαδή μεταβιβάζονται μέσω των ωαρίων ή αν μεταβιβάζονται μέσω των σπερματοζωαρίων (Ladoukakis et al. 2002).



Σχήμα 3.B.1. Χάρτης του mtDNA του μυδιού

Οι Ladoukakis et al. (2002) μελέτησαν τα περιοριστικά πρότυπα δύο περιοχών του mtDNA αρσενικών ατόμων της Μεσογείου και τις Μαύρης Θάλασσας. Η πρώτη αντιστοιχούσε σε ένα τμήμα του γονιδίου COIII μήκους 860bp και η δεύτερη σε ένα τμήμα

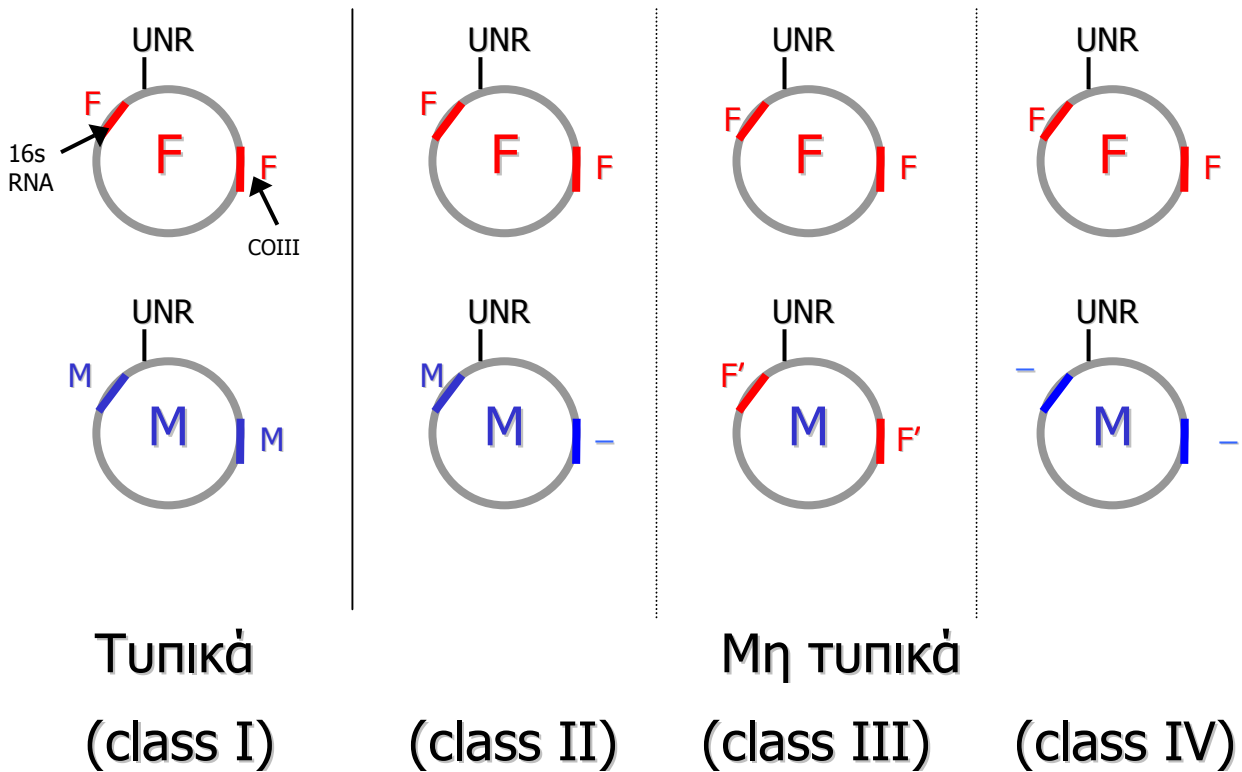
του γονιδίου 16s RNA μεγέθους 527bp. Βάσει των ευρημάτων τους, τα άτομα κατατάσσονταν σε τέσσερις ομάδες (classes, πίνακας 3.B.1).

Η πρώτη και πολυπληθέστερη ομάδα (class I) περιλάμβανε τα τυπικά αρσενικά άτομα, δηλαδή εκείνα που στις γονάδες τους περιείχαν μόρια μητρικής προέλευσης που εμφάνιζαν δύο αλληλουχίες F τύπου (μία για τη COIII και μία για το 16s RNA) και μόρια πατρικής προέλευσης με δύο αλληλουχίες M τύπου αντίστοιχα. Η δεύτερη (class II) αποτελούταν από άτομα που εμφάνιζαν δύο F μιτοτύπους, έναν για κάθε γονίδιο που εξετάστηκε, αλλά μόνο έναν M μιτότυπο που αφορούσε στο γονίδιο του 16s RNA. Δεν ανιχνευόταν M τύπου αλληλουχία για το γονίδιο της COIII. Τα άτομα αυτά θεωρήθηκε τότε ότι περιείχαν την M τύπου αλληλουχία για τη COIII, η οποία όμως δεν πολλαπλασιαζόταν από την αντίδραση της PCR. Η τρίτη ομάδα (class III) περιλάμβανε τα άτομα που έφεραν ένα τυπικό μόριο μητρικής προέλευσης με αλληλουχία τύπου F και ένα αρρενοποιημένο M^F μόριο. Η τελευταία ομάδα (class IV) αποτελούταν από άτομα που εμφάνιζαν τους δύο F τύπους του μητρικού μορίου αλλά κανέναν M τύπο. Όπως και για την δεύτερη ομάδα η απουσία M τύπου αλληλουχιών αποδιδόταν σε αδυναμία της PCR (Σχήμα 3.B.2). Μετά την ανακάλυψη του ανασυνδυασμού έγινε αντιληπτό ότι η απουσία M τύπου αλληλουχιών σε κάποια περιοχή του μιτοχονδριακού γονιδιώματος μπορεί να μην οφείλεται στην PCR, αλλά στην ύπαρξη μωσαϊκών μορίων.

Ομάδες	Απλότυποι
Class I	FF / MM
ClassII	FF / - M
ClassIII	FF / F'F'
Class IV	FF/ - -

Πίνακας 3.B.1. Οι ομάδες (classes) στις οποίες οι Ladoukakis et al. (2002) κατέταξαν τα άτομα σύμφωνα με τα περιεχόμενα μόρια mtDNA των γονάδων τους. Τα πρώτα δύο γράμματα υποδηλώνουν τον τύπο της αλληλουχίας των μορίων μητρικής προέλευσης (γραμμή F) για τα γονίδια COIII και 16s RNA, αντίστοιχα. Ομοίως, τα επόμενα δύο γράμματα φανερώνουν τον τύπο της αλληλουχίας που ανιχνευόταν στα μόρια πατρικής προέλευσης για τα ίδια τμήματα γονιδίων. Οι μπάρες (-) υποδηλώνουν ότι ανιχνευόταν μόνο ένας τύπος αλληλουχίας.

ΑΡΣΕΝΙΚΑ (γονάδα)



Σχήμα 3.B.2. Οι ομάδες αρσενικών ατόμων που προέκυψαν έπειτα από ανάλυση δύο περιοχών των μορίων mtDNA που έφεραν στη γονάδα τους. Οι κύκλοι παριστάνουν τα μόρια mtDNA και οι χρωματισμένες περιοχές πάνω τους παριστάνουν τα τμήματα των γονιδίων που αναλύθηκαν. Τα γράμματα μέσα στους κύκλους φανερώνουν την προέλευση του κάθε μορίου (F: μητρική / M: Πατρική), ενώ τα γράμματα δίπλα από τα γονίδια φανερώνουν τον τύπο της αλληλουχίας (τύπος F ή M).

3.B.2. Μελέτη του γονιδίου της COI

Το γονίδιο που επιλέχτηκε ήταν η πρώτη υπομονάδα της κυτοχρωμικής οξειδάσης. Κριτήριο για την επιλογή ήταν κυρίως το να απέχει αρκετά από τα δύο άλλα που είχαν εξεταστεί από τους Ladoukakis et al. (2002), ώστε καλυφθεί θεωρητικά μία μεγάλη περιοχή του μορίου. Η μελέτη του γονιδίου της COI στηρίχτηκε στη μέθοδο των RFLPs. Ένα τμήμα του γονιδίου μεγέθους 900bp πολλαπλασιαζόταν με PCR και το προϊόν υποβαλλόταν σε πέψη με ένζυμα περιορισμού. Τα ένζυμα που χρησιμοποιήθηκαν προκειμένου να εντοπιστούν οι αλληλουχίες F και M τύπου ήταν τα *RsaI* και *NcoI*. Η επιλογή τους έγινε μετά από λεπτομερή έλεγχο των περιοριστικών προτύπων που έδιναν 11 περιοριστικές ενδονουκλεάσες στο συγκεκριμένο τμήμα DNA (Δημητρίου 2002) και με κριτήριο την καλύτερη δυνατή διάγνωση του τύπου των αλληλουχιών. Στον Πίνακα 3.B.2 παρουσιάζεται ο αριθμός των ατόμων που συμπεριλήφθηκαν στη μελέτη κατά περιοχή δειγματοληψίας και κατά ομάδα κατάταξης. Πρόκειται για τα ίδια άτομα που μελετήθηκαν από τους Ladoukakis et al. (2002, βλ. προηγούμενη παράγραφο).

Ομάδες/ Πληθυσμοί	Class I	Class II	Class III	Class IV	TOTAL
Padova	9	15	0	3	27
Cefalonia	24	9	0	1	34
Faros	6	9	0	0	15
Halastra	16	3	0	1	20
MegPefko	8	3	0	1	12
BlackSea	10	2	11	8	31
TOTAL	73	41	11	14	139

Πίνακας 3.B.2. Συνοπτική παρουσίαση των ατόμων που συμπεριλήφθηκαν στη μελέτη κατά ομάδα και πληθυσμό.

COIII 16s RNA COI			
	Μητρικό Μόριο (γραμμή F)	Πατρικό μόριο (γραμμή M)	Αριθμός Ατόμων
i	FFF / MMM		73
	FFF/ F'MM		0
ii	FFF / - MM		37
	FFF / MF'M		0
iii	FFF / M - M		0
	FFF / MMF'		3
iv	FFF / MM -		2
	FFF / MF'F'		0
v	FFF / M - -		0
	FFF / F'MF'		0
vi	FFF / - M -		4
	FFF / F'F'M		0
vii	FFF / - - M		2
	FFF / F'F'F'		9
viii	FFF / - - -		9
TOTAL			139

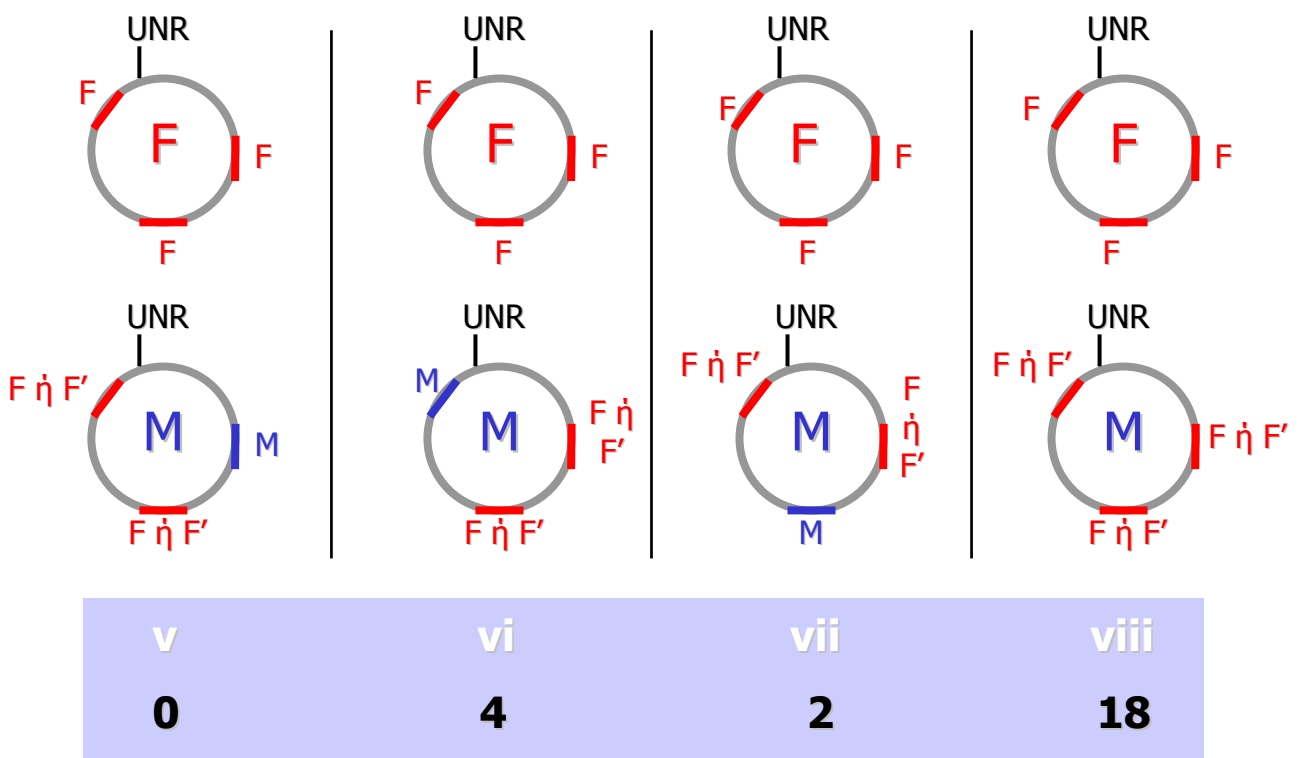
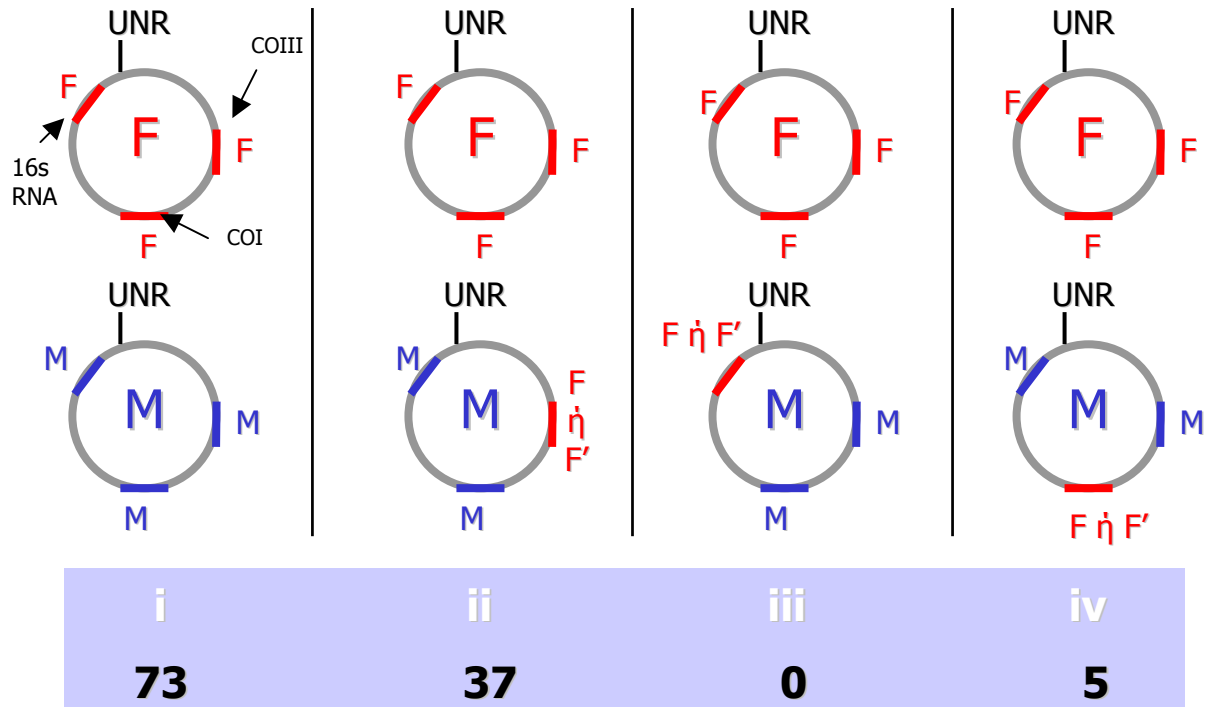
Πίνακας 3.Β.3. Οι νέα ομαδοποίηση και τα αποτελέσματα μετά την προσθήκη της πληροφορίας για τη COI. Τα πρώτα τρία γράμματα υποδηλώνουν τον τύπο της αλληλουχίας των μορίων μητρικής προέλευσης (γραμμή F) για τα γονίδια COIII, 16s RNA και COI, αντίστοιχα. Ομοίως, τα επόμενα τρία γράμματα φανερώνουν τον τύπο της αλληλουχίας που ανιχνευόταν στα μόρια πατρικής προέλευσης για τα ίδια τμήματα γονιδίων. Οι μπάρες (-) υποδηλώνουν ότι ανιχνευόταν μόνο ένας τύπος αλληλουχίας, γεγονός που αποδόθηκε στο ότι τα δύο μόρια περιείχαν αλληλουχίες που έδιναν το ίδιο περιοριστικό πρότυπο. Σημειώνεται ότι οι συμβολισμοί F και F' δεν αντιστοιχούν σε συγκεκριμένους μιτοτύπους, αλλά απλώς υποδηλώνουν ότι οι δύο F τύποι είναι διαφορετικοί μεταξύ τους.

Τα αποτελέσματα της ανάλυσης των περιοριστικών προτύπων του τμήματος του γονιδίου της COI αποτυπώνονται στον Πίνακα 3.B.3., μαζί με τα ήδη γνωστά που αφορούν στη COIII και στο 16s RNA. Προφανώς, με την προσθήκη της νέας πληροφορίας, οι πιθανές ομάδες κατάταξης άλλαξαν.

Η ομάδα i περιλαμβάνει, με βάση τις τρεις πλέον περιοχές, τα τυπικά αρσενικά άτομα, δηλαδή εκείνα που φέρουν αμιγή μόρια μητρικής και πατρικής προέλευσης (τύπου F και τύπου M, αντίστοιχα). Η ομάδα viii τοποθετείται στο άλλο άκρο των παρατηρήσεων και απαρτίζεται από άτομα που περιέχουν αμιγή μόρια μητρικής προέλευσης (τύπου F) και αρρενοποιημένα μόρια (M^F) πατρικής προέλευσης. Οι ομάδες ii, iii, iv, v, vi και vii αποτελούνται από μη-τυπικά αρσενικά, των οποίων τα μόρια πατρικής προέλευσης εμφανίζονται μωσαϊκά προφανώς λόγω ανασυνδυασμού.

Η ομάδα i εξακολουθεί να είναι η πολυπληθέστερη με ποσοστό 52.5%, ενώ αξιοσημείωτα μεγάλη είναι και η ομάδα ii που αφορά σε μη-τυπικά αρσενικά, των οποίων τα πατρικά μόρια εμφανίζονται ανασυνδυασμένα σε ένα τμήμα του mtDNA τους που περιλαμβάνει το γονίδιο της COIII. Σημαντικό νέο δεδομένο αποτελεί η ομάδα iv. Πρόκειται για 5 μη-τυπικά αρσενικά (ποσοστό 3.6%) που φέρουν ανασυνδυασμένα πατρικής προέλευσης μόρια στην περιοχή του γονιδίου της COI. Τα άτομα αυτά εμφανίζονταν ως τυπικά στην προηγούμενη μελέτη (Ladoukakis et al. 2002). Άξια λόγου και ερμηνείας είναι επίσης η παρατήρηση ότι η συχνότητα παρουσίας μη-τυπικών αρσενικών με ανασυνδυασμένα πατρικά μόρια στο τμήμα που περιλαμβάνει το γονίδιο του 16s RNA - ομάδες iii, v και vii - είναι πολύ μικρή (1.3%). Πρόκειται για 2 άτομα που ανήκουν στη ομάδα vii, τα οποία στην προηγούμενη μελέτη θεωρούνταν ότι περιέχουν μόρια αρρενοποιημένα. Βρέθηκαν, τέλος, 4 μη-τυπικά άτομα που περιέχουν ανασυνδυασμένα μόρια σε δύο περιοχές που περιλαμβάνουν τα γονίδια της COIII και της COI (ομάδα vi, Πίνακας 3.B.3., Σχήμα 3.B.3.).

Αποτελέσματα



Σχήμα 3.B.3. Σχηματική παρουσίαση των αποτελεσμάτων. Χρησιμοποιούνται οι ίδιοι συμβολισμοί με το Σχήμα 3.B.2.

Κεφάλαιο 4
ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η παρούσα διατριβή έχει σκοπό να διερευνήσει τις επιπτώσεις του ανασυνδυασμού του μιτοχονδριακού DNA στο σύστημα της διπλής μονογονικής κληρονόμησης (DUI) του mtDNA του μυδιού, εστιαζόμενη σε δύο βασικά ερωτήματα. Το πρώτο αφορά στη διερεύνηση για το αν τα ανασυνδυασμένα mtDNA μόρια διασπείρονται στους φυσικούς πληθυσμούς, ενώ το δεύτερο στην επανεξέταση του φαινομένου της αρρενοποίησης. Οι Ladoukakis και Zouros (2001a) εντόπισαν ανασυνδυασμένα μόρια σε γονάδες αρσενικών ατόμων. Εντούτοις, δεν ήταν σε θέση να δώσουν απάντηση στο ερώτημα αν τα μόρια αυτά περνούν από το σπέρμα των αρσενικών μυδιών στους απογόνους τους ή αν «γενιούνται» και «πεθαίνουν» μαζί με το άτομο στο οποίο βρέθηκαν.

Στην παρούσα εργασία το πρόβλημα προσεγγίστηκε με δύο τρόπους. Ο πρώτος αφορούσε στην εξέταση ενός θηλυκού ατόμου (Sp41), το οποίο, όπως φαινόταν από προηγούμενη ανάλυση με RFLPs σε μία περιοχή 860bp του γονιδίου της COIII, υπήρχε πιθανότητα να φέρει ανασυνδυασμένο μόριο mtDNA. Από τη στιγμή που τα θηλυκά μύδια – όπως και το άτομο που μελετήθηκε - είναι κατά κανόνα ομοπλασμικά, γεγονός που αποκλείει την πιθανότητα να δημιουργηθεί μέσα σε αυτά μωσαϊκό FM μόριο, ο εντοπισμός τέτοιου μορίου σε θηλυκό άτομο θα αποτελούσε άμεση απόδειξη ότι τα ανασυνδυασμένα μόρια περνούν στους φυσικούς πληθυσμούς. Το μόριο αυτό θα είχε δημιουργηθεί προφανώς στο παρελθόν μέσα σε αρσενική γονάδα και με κάποιο τρόπο εισέβαλε στη θηλυκή γραμμή κληρονόμησης. Είναι γνωστό ότι κατά τη γονιμοποίηση, το mtDNA του σπέρματος του μυδιού εισβάλλει σε όλα τα έμβρυα (Longo and Dornfeld 1967; Longo and Anderson, 1969) και ότι εξαφανίζεται μέσα στις πρώτες 24 ώρες μετά τη γονιμοποίηση στα άτομα που πρόκειται να γίνουν θηλυκά (Sutherland et al. 1998). Αν για κάποιο λόγο το mtDNA του σπέρματος δεν καταστραφεί, αλλά αντίθετα καταφέρει να πολλαπλασιαστεί, τότε μπορεί, θεωρητικά τουλάχιστο, να εισβάλει στη θηλυκή γραμμή κληρονόμησης (θηλεοποίηση).

Εντούτοις, η εξέταση του τμήματος της COIII του ατόμου αυτού έδειξε ότι η αλληλουχία του δεν ήταν ανασυνδυασμένη, αλλά ότι ήταν ξεκάθαρα τύπου F. Η ομοιότητα του περιοριστικού της προτύπου με τα περιοριστικά πρότυπα M αλληλουχιών, ήταν αποτέλεσμα ομοπλασιών σε συγκεκριμένες θέσεις στο μόριο του μιτοχονδριακού DNA. Συνεπώς, η προσέγγιση αυτή δεν παρείχε ενδείξεις ότι τα ανασυνδυασμένα μόρια περνούν στους φυσικούς πληθυσμούς. Επιπλέον, το φαινόμενο της θηλεοποίησης εξακολουθεί να στερείται ισχυρών ενδείξεων ύπαρξης, παραμένοντας ουσιαστικά μία θεωρητική σύλληψη.

Το γεγονός, πάντως, ότι εξακολουθούν να μην εντοπίζονται ανασυνδυασμένα μόρια που μεταβιβάζονται μητρικά δεν αποτελεί έκπληξη. Είναι σαφές ότι ανασυνδυασμένα μόρια που φέρουν νησίδες τύπου F και τύπου M μπορούν να δημιουργηθούν μόνο σε ιστούς όπου συνυπάρχουν αμιγή μόρια τύπου F και M. Οπότε, είναι απίθανο να δημιουργηθεί μέσα σε θηλυκό άτομο ένα τέτοιο μωσαϊκό μόριο, καθώς τα θηλυκά άτομα είναι ομοπλασματικά για ένα F τύπου γονιδίωμα. Οι μόνοι ιστοί, στους οποίους είναι δυνατή η δημιουργία τέτοιων μωσαϊκών μορίων, είναι οι γονάδες των αρσενικών ατόμων. Από τη στιγμή όμως που ένα μόριο - είτε ανασυνδυασμένο, είτε αμιγές - βρεθεί στην αρσενική γονάδα, η μόνη γραμμή κληρονόμησης που μπορεί να ακολουθήσει είναι η πατρική (Σχήμα 1.7).

Αντίθετα με την πρώτη προσέγγιση, η δεύτερη παρέχει ισχυρή ένδειξη ότι τα ανασυνδυασμένα μόρια περνούν μέσω του σπέρματος στον πληθυσμό. Συγκεκριμένα, τα αρσενικά άτομα της ομάδας iv, τα οποία φέρουν μιτότυπους της μορφής FFF / MMF' (βλ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ, Πίνακας 3.B.3) φαίνεται ότι περιέχουν ανασυνδυασμένα μόρια πατρικής προέλευσης, τα οποία δεν δημιουργήθηκαν στις γονάδες τους. Το συμπέρασμα αυτό συνάγεται από την παρατήρηση ότι το μόριο μητρικής προέλευσης των εν λόγω ατόμων εμφανίζει στην περιοχή της COI διαφορετικό περιοριστικό πρότυπο (F) από εκείνο που υπάρχει στο μόριο πατρικής προέλευσης (F'). Άρα, φαινομενικά, ο μιτότυπος FFF / MMF' δεν μπορεί να προέκυψε από ομόλογο ανασυνδυασμό μορίων του τύπου FFF και MMM στην περιοχή της COI, διότι αν συνέβαινε κάτι τέτοιο τα παραγόμενα μόρια θα έπρεπε να είχαν τη μορφή FFM και MMF. Το γεγονός ότι εντοπίστηκαν μόρια με μιτότυπο MMF' υποδηλώνει ότι τα μόρια αυτά δεν μπορεί να δημιουργήθηκαν στα άτομα που εξετάστηκαν, αλλά ότι μεταβιβάστηκαν σε αυτά από τους αρσενικούς γονείς τους.

Το θέμα βέβαια δεν κλείνει σε αυτό το σημείο. Όπως αναφέρθηκε εξάλλου, η παραπάνω παρατήρηση αποτελεί ισχυρή ένδειξη, αλλά όχι απόδειξη της υπόθεσης. Η πιθανότητα ότι η μέθοδος των RFLPs έδωσε παραπλανητικά αποτελέσματα είναι υπαρκτή. Είναι πιθανό, για παράδειγμα, αναφορικά πάντα με τη COI, ότι η αλληλουχία που αντιστοιχεί στο ένα από τα δύο πρότυπα προέκυψε από σημειακές μεταλλαγές της αλληλουχίας που δίνει το άλλο πρότυπο. Ή ότι η μία από τις δύο αλληλουχίες που εντοπίστηκαν περιέχει, εντελώς τυχαία, το σημείο του ανασυνδυασμού και συνεπώς είναι επόμενο να εμφανίζεται διαφορετική από την άλλη. Αν όντως έχει συμβεί κάτι τέτοιο, τότε το αρχικό ερώτημα εξακολουθεί να μένει αναπάντητο. Θα πρέπει σε αυτό όμως το σημείο να τονιστεί ότι η πιθανότητα να συμβαίνει κάτι από τα παραπάνω ελαττώνεται ακόμη

περισσότερο αν αναλογιστεί κανείς ότι τα πρότυπα που δίνουν οι δύο διαφορετικές αλληλουχίες τύπου F των ατόμων της ομάδας iv στην περιοχή της COI είναι τα πιο κοινά που παρατηρούνται στους πληθυσμούς, τόσο στην παρούσα εργασία, όσο και στην ανάλυση του mtDNA γονάδων από θηλυκά άτομα των ίδιων πληθυσμών (Δημητρίου 2002). Δεν πρόκειται δηλαδή για δύο σπάνιους F τύπους που υπάρχουν μόνο σε αυτά τα 3 άτομα, αλλά για τους πιο κοινούς.

Συνεπώς, παρόλο που φαίνεται ότι υπάρχουν μωσαϊκά μόρια πατρικής προέλευσης που εμφανίζουν F τύπους αλληλουχίας που διαφέρουν από εκείνους των μορίων μητρικής προέλευσης για την ίδια περιοχή του γονιδιώματος, κρίνεται απαραίτητη η περαιτέρω μελέτη των ατόμων της ομάδας iv. Η μελέτη αυτή θα αφορά στην αλληλούχιση των δύο γονιδιωμάτων τύπου F που βρέθηκαν στις γονάδες, ώστε να ελεγχθεί άμεσα το αν πρόκειται για διαφορετικές αλληλουχίες και ακολούθως να αποκλειστεί ή όχι το ενδεχόμενο ότι τα πατρικής προέλευσης μωσαϊκά μόρια που φέρουν τη μία από αυτές δημιουργήθηκαν στα άτομα που εξετάστηκαν. Επιπλέον, θα πρέπει να ελεγχθεί με RFLPs το mtDNA των σωματικών ιστών των συγκεκριμένων ατόμων, ώστε να ταυτοποιηθεί ο τύπος της αλληλουχίας των μητρικής προέλευσης μορίων τους.

Το δεύτερο βασικό ερώτημα της διατριβής αφορά στο αν καταρρέει το φαινόμενο της αρρενοποίησης των F γονιδιωμάτων μετά την ανακάλυψη του ανασυνδυασμού του mtDNA και τη διαπίστωση ότι η μελέτη μίας περιοχής του mtDNA των μυδίων δεν είναι αρκετή για να χαρακτηρίσει από πλευράς αλληλουχίας το σύνολο του μορίου. Έχοντας την πληροφορία για δύο περιοχές του μορίου (COIII και 16s RNA, Λαδουκάκης 1998) μελετήσαμε με τη χρήση περιοριστικών ενδονουκλεασών μία τρίτη περιοχή (COI) από τα ίδια άτομα, καταλήγοντας στο συμπέρασμα ότι υπάρχουν με μεγάλη πιθανότητα αρρενοποιημένα μόρια. Τα άτομα της ομάδας viii φαίνεται ότι περιέχουν τέτοια μόρια. Τα μισά μάλιστα από αυτά εμφανίζουν δύο διαφορετικούς F τύπους σε καθεμιά από τις τρεις περιοχές που εξετάστηκαν. Αν τα μόρια αυτά δεν είναι αρρενοποιημένα, αλλά είναι μωσαϊκά λόγω ανασυνδυασμού, τότε θα πρέπει να περιέχουν νησίδες M τύπου σε άλλα σημεία. Δηλαδή, οι τρεις F τύπου περιοχές που εντοπίσαμε θα πρέπει να υπάρχουν στο πατρικό μόριο ως αποτέλεσμα ανασυνδυασμών. Όμως, η πιθανότητα να συμβαίνει κάτι τέτοιο φαίνεται να είναι πολύ μικρή. Τούτο αποδεικνύεται με τον ακόλουθο τρόπο:

Έστω f_{COIII} η συχνότητα ανασυνδυασμού στην περιοχή του γονιδίου COIII. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα του Πίνακα 3.B.3 θα ισούται με,

$$f_{COIII} = \frac{37 + 4 + 2}{139} = 0.309$$

Οι συχνότητες ανασυνδυασμού f_{16sRNA} και f_{COI} στις περιοχές των γονιδίων 16s RNA και COI, αντίστοιχα θα είναι:

$$f_{16sRNA} = \frac{2}{139} = 0.014 \text{ και}$$

$$f_{COI} = \frac{9}{139} = 0.064$$

Ο αριθμός ατόμων (N_a) που αναμένεται να φέρουν μόρια στα οποία έχουν συμβεί τρεις ανασυνδυασμοί σε αυτά τα τμήματα θα ισούται με:

$$N_a = 139 f_{COIII} f_{16sRNA} f_{COI} = 0.038$$

Όμως τα άτομα στα οποία παρατηρήθηκαν τρία διαφορετικά F γονιδιώματα για κάθε τόπο ήταν $N = 9$ (Πίνακας 3.B.3, ομάδα viii).

Όπως προκύπτει από τούτη την απλή απόδειξη, επειδή $N \gg N_a$, δεχόμαστε με μεγάλη ασφάλεια ότι τα μόρια πατρικής προέλευσης που βρίσκουμε στα άτομα της ομάδας viii δεν έχουν προκύψει από ανασυνδυασμούς και συνεπώς είναι αρρενοποιημένα. Μάλιστα, η τιμή N_a πρέπει να είναι κατά πολύ μικρότερη από αυτήν που υπολογίσαμε διότι όπως θα συζητηθεί στη συνέχεια ο αριθμός των ανασυνδυασμένων μορίων στην περιοχή COIII φαίνεται πως είναι υπερεκτεταμένος. (Ενδεικτικά, αν δεχτούμε ότι $f_{COIII} = f_{COI}$, τότε η τιμή του αριθμού N_a θα είναι $N_a = 0.008$).

Στην προηγούμενη παράγραφο αναφέρθηκε ότι ο αριθμός των ανασυνδυασμένων μορίων στην περιοχή του γονιδίου COIII φαίνεται πολύ μεγάλος για να είναι πραγματικός. Είναι μάλιστα αξιοσημείωτο ότι δεν εντοπίζονται σε καμία περίπτωση δύο διαφορετικές F τύπου αλληλουχίες στο ίδιο άτομο, γεγονός που ενισχύει την παραπάνω άποψη. Οι Ladoukakis και Zouros (2002) που μελέτησαν αυτήν την περιοχή στα συγκεκριμένα άτομα θεωρούν ότι είναι πολύ πιθανό να υπάρχουν M τύπου αλληλουχίες στα mtDNA μόρια αυτών των ατόμων, τις οποίες δεν πολλαπλασίασε η τεχνική της PCR. Για να ελεχθεί τούτη η υπόθεση κρίνεται απαραίτητη η δοκιμή πολλαπλασιασμού της COIII των συγκεκριμένων ατόμων με τη μέθοδο της PCR όπου θα χρησιμοποιηθούν ειδικά σχεδιασμένοι εκκινητές για M τύπου αλληλουχίες. Ίσως με τον τρόπο αυτό εξηγηθεί η παρατηρούμενη ιδιομορφία που εμφανίζει η COIII. Διαφορετικά θα πρέπει να αναζητηθούν άλλες αιτίες για την

παρουσία τόσο μεγάλου αριθμού ανασυνδυασμένων μορίων σε τούτη την περιοχή του μιτοχονδριακού γονιδιώματος.

Εύλογα θα αναρωτιώταν κάποιος γιατί εφόσον ο ανασυνδυασμός είναι, όπως φάνηκε, δυναμικό φαινόμενο δεν έχει προκαλέσει την ομογενοποίηση των γονιδιωμάτων των δύο εξελικτικών γραμμών κληρονομησης του μυδιού; Γιατί, από τη στιγμή που οι δύο γραμμές δείχνουν να έχουν σημεία επαφής και ανταλλαγής τμημάτων DNA εξακολουθούν να διατηρούν την ατομικότητά τους; Όπως αναφέρθηκε (Κεφάλαιο 3, §B.1) τα σύγχρονα δεδομένα συντείνουν στο συμπέρασμα ότι η «συμπεριφορά» των μορίων mtDNA του μυδιού, δηλαδή το αν μεταβιβάζονται πατρικά ή μητρικά καθορίζεται από την περιοχή άγνωστης λειτουργίας (UAR) και όχι από ολόκληρη την αλληλουχία του. Όταν περιέχει F τύπου UAR αλληλουχία, τότε το μόριο μεταβιβάζεται μητρικά. Αντίστοιχα, ένα μόριο μεταβιβάζεται μέσω του σπέρματος, όταν η περιοχή άγνωστης λειτουργίας του είναι τύπου M. Επειδή τα ανασυνδυασμένα μόρια που είναι μωσαϊκά για F και M τύπου τμήματα δημιουργούνται στη γονάδα των αρσενικών ατόμων και μόνο, θα πρέπει να διατηρήσουν και μετά τον ανασυνδυασμό την αλληλουχία M τύπου στη UAR ώστε να μπορούν να μεταβιβαστούν στις επόμενες γενιές μέσω του σπέρματος.

Αυτός είναι ίσως και ο λόγος που παρατηρήθηκαν πολύ λίγα μη-τυπικά αρσενικά άτομα που έφεραν ανασυνδυασμένο πατρικό μόριο στην περιοχή του 16s RNA σε σχέση με τα υπόλοιπα (Πίνακας 3.B.3, ομάδες iii, v και vii). Εφόσον το 16s RNA γειτονεύει με τη UAR είναι πολύ πιθανό, αν η περιοχή 16s RNA είναι τύπου F, να είναι και η UAR τύπου F. Ένα τέτοιο μόριο, σύμφωνα με την υπόθεση, αποτυγχάνει να μεταβιβαστεί μέσω του σπέρματος στις επόμενες γενιές. Ακριβώς επειδή είναι μικρή η πιθανότητα να υπάρχουν μόρια που φέρουν M τύπου UAR και F τύπου 16s RNA, τα εντοπίζουμε σπανιότερα από τα υπόλοιπα μωσαϊκά μόρια.

Επιστρέφοντας στο ερώτημα της ομογενοποίησης των μιτοχονδριακών γονιδιωμάτων, και με την προϋπόθεση ότι η UAR έχει τις παραπάνω ιδιότητες, μπορούμε να ισχυριστούμε ότι είναι μικρός ο αριθμός των ανασυνδυασμένων μορίων που περνούν στους φυσικούς πληθυσμούς, σαν συνέπεια της ιδιότητας της UAR. Εξαιτίας του γεγονότος αυτού, η ομογενοποίηση δεν επιτυγχάνεται. Όλα αυτά βέβαια απομένει να αποδειχθούν με επισταμένη και συγκριτική μελέτη της UAR ανάμεσα σε τυπικά αρσενικά, σε μη-τυπικά αρσενικά, σε αρσενικά που περιέχουν αρρενοποιημένα μόρια και σε θηλυκά άτομα.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- ALBERTS, B., D. BRAY, J. LEWIS, M. RAFF, K. ROBERTS & J. D. WATSON (1994). Molecular Biology of the Cell. Garland Publishing, USA.
- ALLEN, J. A., (1985). The recent Bivalbia: Their form and evolution., pp. 337-403 in The molusca, edited by E. R. Trueman and M. R. Clarke. Academic Press, Orlando, FL.
- ARCTANDER, P., (1999). Mitochondrial recombination? Science 284: 2090-1.
- ATTARDI, G., (1985). Animal mitochondrial DNA: an extreme example of genetic economy. Int Rev Cytol 93: 93-145.
- AVISE, J. C. and LANSMAN, R. A., (1983). Evolution of genes and proteins. Eds. Nei, M and Koehn, R. K., 147-164. Sinauer, Sunderland, Mass.
- AVISE, J. C., (1994). Molecular markers, natural history and evolution. Chapman and Hall, London.
- AWADALLA, P., A. EYRE-WALKER and J. M. SMITH, (1999). Linkage disequilibrium and recombination in hominid mitochondrial DNA. Science 286: 2524-5.
- BARRELL, G. B., BANKIER, A. T. and DROUIN, J., (1979). A different genetic code in human mitochondria. Nature (London) 182: 189 – 194.
- BEAGLEY, C. T., R. OKIMOTO and D. R. WOLSTENHOLME, (1999). Mytilus mitochondrial DNA contains a functional gene for a tRNASer(UCN) with a dihydrouridine arm-replacement loop and a pseudo-tRNASer(UCN) gene. Genetics 152: 641-52.
- BIRKY, C. W., JR., (1995). Uniparental inheritance of mitochondrial and chloroplast genes: mechanisms and evolution. Proc Natl Acad Sci U S A 92: 11331-8.
- BOORE, J. L., and M. W. BROWN, (1994). Mitochondrial genomes and the phylogeny of mollusks. The nautilus **2**: 61-78.
- BOORE, J. L., D. V. LAVROV and W. M. BROWN, (1998). Gene translocation links insects and crustaceans. Nature 392: 667-8.
- DIETRICH, A., J. H. WEIL and L. MARECHAL-DROUARD, (1992). Nuclear-encoded transfer RNAs in plant mitochondria. Annu Rev Cell Biol 8: 115-31.
- ELSON, J. L., R. M. ANDREWS, P. F. CHINNERY, R. N. LIGHTOWLERS, D. M. TURNBULL and N. HOWELL, (2001). Analysis of European mtDNAs for recombination. Am J Hum Genet 68: 145-153.
- ERICKSON, L., and R. KEMBLE, (1990). Paternal inheritance of mitochondria in rapeseed (*Brassica napus*). Mol Gen Genet 222: 135-9.

- EYRE-WALKER, A., and P. D. KEIGHTLEY, (1999). High genomic deleterious mutation rates in hominids. *Nature* 397: 344-7.
- EYRE-WALKER, A., N. H. SMITH and J. M. SMITH, (1999a). How clonal are human mitochondria? *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 266: 477-83.
- EYRE-WALKER, A., N. H. SMITH and J. M. SMITH, 1999b. Replay to Macaulay et al. (1999b): mitochondrial DNA recombination-reasons to panic. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 266: 2041-2042.
- FAURE, S., J. L. NOYER, F. CARREEL, J. P. HORRY, F. BAKRY and C. LANAUD, (1994). Maternal inheritance of chloroplast genome and paternal inheritance of mitochondrial genome in bananas (*Musa acuminata*). *Curr Genet* 25: 265-9.
- FISHER, C., and D. O. F. SKIBINSKI, (1990). Sex-biased mitochondrial DNA heteroplasmy in the marine mussel *Mytilus*. *Proc. R. Soc. Lond.* 242: 149-156.
- GELLER, J. B., J. T. CARLTON and D. A. POWERS, (1993). Interspecific and intrapopulation variation in mitochondrial ribosomal DNA sequences of *Mytilus spp.* (Bivalvia: Mollusca). *Mol Mar Biol Biotechnol* 2: 44-50.
- GOSLING, E., (Editor) (1992). The mussel *Mytilus*: ecology, physiology, genetics and culture. *Development in Aquaculture and Fisheries Science*, vol. 25. Elsevier, Amsterdam.
- GRAY, M. W., (1989). Origin and evolution of mitochondrial DNA. *Annu Rev Cell Biol* 5: 25-50.
- GRAY, M. D., and D. F. SPENCER, (1996). *Evolution of microbial life*. Cambridge Univ. Press, Cambridge.
- GRIFFITHS A. J., J. H. MILLER, T. D. SUZUKI, R. C. LEWONTIN and W. M. GELBART, (1996). *An introduction to genetic analysis*. Freeman, W. H., New York.
- GYLLENSTEN, U., D. WHARTON, A. JOSEFSSON and A. C. WILSON, (1991). Paternal inheritance of mitochondrial DNA in mice. *Nature* 352: 255-7.
- HAYASHI, J. I., H. YONEKAWA, O. GOTOH, J. WATANABE and Y. TAGASHIRA, (1978). Strictly maternal inheritance of rat mitochondrial DNA. *Biochem Biophys Res Commun* 83: 1032-8.
- HOEH, W. R., K. H. BLAKLEY and W. M. BROWN, (1991). Heteroplasmy suggests limited biparental inheritance of *Mytilus* mitochondrial DNA. *Science* 251: 1488-90.
- HOEH, W. R., D. T. STEWART, B. W. SUTHERLAND and E. ZOUROS, (1996). Cytochrome c oxidase sequence comparisons suggest an unusually high rate of mitochondrial DNA evolution in *Mytilus* (Mollusca: Bivalvia). *Mol Biol Evol* 13: 418-21.

- HOEH, W. R., D. T. STEWART, C. SAAVEDRA, B. W. SUTHERLAND and E. ZOUROS, (1997). Phylogenetic evidence for role-reversals of gender-associated mitochondrial DNA in *Mytilus* (Bivalvia: Mytilidae). *Mol Biol Evol* 14: 959-67.
- HOFFMANN, R. J., J. L. BOORE and W. M. BROWN, (1992). A novel mitochondrial genome organization for the blue mussel, *Mytilus edulis*. *Genetics* 131: 397-412.
- HUTCHISON, C. A. D., J. E. NEWBOLD, S. S. POTTER and M. H. EDGELL, (1974). Maternal inheritance of mammalian mitochondrial DNA. *Nature* 251: 536-8.
- INGMAN, M., H. KAESMANN, S. PAABO and U. GYLLENSTEN, (2000). Mitochondrial genome variation and the origin of modern humans. *Nature* 408: 708-13.
- JORDE, L. B., and M. BAMSHAD, (2000). Questioning evidence for recombination in human mitochondrial DNA. *Science* 288: 1931.
- KIVISILD, T., and R. VILLEMS, (2000). Questioning evidence for recombination in human mitochondrial DNA. *Science* 288: 1931.
- KROON, A. M., W. M. DE VOS and H. BAKKER, (1978). The heterogeneity of rat-liver mitochondrial DNA. *Biochim Biophys Acta* 519: 269-73.
- KUMAR, S., K. TAMURA and M. NEI, (1994). MEGA: Molecular Evolutionary Genetics Analysis software for microcomputers. *Comput Appl Biosci* 10: 189-91.
- KUMAR, S., P. HEDRICK, T. DOWLING and M. STONEKING, (2000). Questioning evidence for recombination in human mitochondrial DNA. *Science* 288: 1931.
- LADOUKAKIS, E. D. and E. ZOUROS, (2001a). Direct evidence of homologous recombination in mussel (*Mytilus galloprovincialis*) mitochondrial DNA. *Mol. Bio. Evol.* 18(7): 1168-1175.
- LADOUKAKIS, E. D. and E. ZOUROS, (2001b). Recombination in animal mitochondrial DNA: Evidence from published sequences. *Mol. Biol. Evol.* 18(11): 2127-2131.
- LADOUKAKIS, E. D., SAAVEDRA, A., MAGOULAS A. and E. ZOUROS, (2002). Mitochondrial DNA variation in species with two mitochondrial genomes: the case of *Mytilus galloprovincialis* from the Atlantic, the Mediterranean and the Black Sea. *Molecular Ecology*, Volume 11, Issue 4, Page 775.
- LAMARCK, J. B. P. A. de, (1819). *Histoire naturelle des animaux sans vertebres*. Vol. 6. A. S. B. Verdiere Libraire, Paris.
- LANG, B. F., M. W. GRAY and G. BURGER, (1999). Mitochondrial genome evolution and the origin of eukaryotes. *Annu Rev Genet* 33: 351-97.
- LINNAEUS, C., (1758). *Systema naturae per regna tria naturae*. Laurentii Salvi, Stockholm.
- LIU, H.-P., J. B. MITTON and S.-K. WU, (1996). Paternal mitochondrial DNA differentiation far exceeds maternal mitochondrial DNA and allozyme differentiation in the

- freshwater mussel, *Anodonta grandis grandis*. *Evolution Int J Org Evolution* 50: 952-957.
- LONGO, F. J., and E. J. DORNFELD, (1967). The fine structure of spermatid differentiation in the mussel, *Mytilus edulis*. *J Ultrastruct Res* 20: 462-80.
- LONGO, F. J., and E. ANDERSON, (1969). Cytological aspects of fertilization in the lamellibranch, *Mytilus edulis*. II. Development of the male pronucleus and the association of the maternally and paternally derived chromosomes. *J Exp Zool* 172: 97-119.
- MAGOULAS, A., and E. ZOUROS, (1993). Restriction-site heteroplasmy in anchovy (*Engraulis encrasicolus*) indicates incidental biparental inheritance of mitochondrial DNA. *Mol. Biol. Evol.* 10: 319-325.
- MANIATIS, T., E. F. FRITSCH and J. SAMBROOK, (1982). *Molecular cloning, a laboratory manual.*, New York.
- MARGULIS, L., (1970). *Origin of eucariotic cells.* Yale Univ. Press, New Heaven.
- MARGULIS, L., (1993). *Symbiosis in cell evolution.* Freeman, W. H., New York.
- MERRIWEATHER, D. A., and F. A. KAESTLE, (1999). Mitochondrial recombination? *Science* 285: 837.
- MILLER, S. A., DYKES, D. D. and POLESKY, H. F., (1988). simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res.* 16: 1215.
- NEALE, D. B., K. A. MARSHALL and R. R. SEDEROFF, (1989). Chloroplast and mitochondrial DNA are paternally inherited in *Sequoia sempervirens*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86: 9347-9349.
- NEUPERT, W., (1997). Protein import into mitochondria. *Annu. Rev. Biochem.*, 66: 863-917.
- OKIMOTO, R., CHAMBERLIN, H. M., MACFARLANE, J. L. and WOLSTENHOLME, D. R., (1991). *Nucleic Acid Res.* 19: 1619-1626.
- OKIMOTO, R., MACFARLANE, J. L., CLARY, D. O. and WOLSTENHOLME, D. R., (1992). The mitochondrial genomes of two nematodes, *Caenorhabditis elegans* and *Ascaris suum*. *Genetics* 130: 471-498.
- PASSAMONTI, M., and V. SCALI, (2001). Gender-associated mitochondrial DNA heteroplasmy in the venerid clam *Tapes philippinarum* (Mollusca Bivalvia). *Curr Genet* 9: 117-124.
- PARSONS, T. J., and J. A. IRWIN, (2000). Questioning evidence for recombination in human mitochondrial DNA. *Science* 288: 1931.

- PONT-KINGDON, G., C. G. VASSORT, R. WARRIOR, R. OKIMOTO, C. T. BEAGLEY and D. R. WOLSTENHOLME, (2000). Mitochondrial DNA of *Hydra attenuata* (Cnidaria): a sequence that includes an end of one linear molecule and the genes for l-rRNA, tRNA(f- Met), tRNA(Trp), COII, and ATPase8. *J Mol Evol* 51: 404-15.
- QUESADA, H., D. A. SKIBINSKI and D. O. SKIBINSKI, (1996). Sex-biased heteroplasmy and mitochondrial DNA inheritance in the mussel *Mytilus galloprovincialis* Lmk. *Curr Genet* 29: 423-6.
- RAWSON, P. D., and T. J. HILBISH, (1995). Evolutionary relationships among the male and female mitochondrial DNA lineages in the *Mytilus edulis* species complex. *Mol Biol Evol* 12: 893-901.
- SAAVEDRA, C., M. I. REYERO and E. ZOUROS, (1997). Male-dependent doubly uniparental inheritance of mitochondrial DNA and female-dependent sex-ratio in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Genetics* 145: 1073-82.
- SATTA, Y., and N. TAKAHATA, (1990). Evolution of Drosophila mitochondrial DNA and the history of the melanogaster subgroup. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87: 9558-62.
- SCHATZ, G., and B. DOBBERSTEIN, (1996). Common principles of protein translocation across membranes. *Science* 271: 1519-26.
- SHITARA, H., J. I. HAYASHI, S. TAKAHAMA, H. KANEDA and H. YONEKAWA, (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: 851-7.
- SKIBINSKI, D. O., C. GALLAGHER and C. M. BEYNON, (1994a). Mitochondrial DNA inheritance . *Nature* 368: 817-8.
- SKIBINSKI, D. O., C. GALLAGHER and C. M. BEYNON, (1994b). Sex-limited mitochondrial DNA transmission in the marine mussel *Mytilus edulis*. *Genetics* 138: 801-9.
- STEWART, D. T., C. SAAVEDRA, R. R. STANWOOD, A. O. BALL and E. ZOUROS, (1995). Male and female mitochondrial DNA lineages in the blue mussel (*Mytilus edulis*) species group. *Mol Biol Evol* 12: 735-47.
- STEWART, D. T., E. R. KENCHINGTON, R. K. SINGH and E. ZOUROS, (1996). Degree of selective constraint as an explanation of the different rates of evolution of gender-specific mitochondrial DNA lineages in the mussel *Mytilus*. *Genetics* 143: 1349-57.
- SUTHERLAND, B., D. STEWART, E. R. KENCHINGTON and E. ZOUROS, (1998). The fate of paternal mitochondrial DNA in developing female mussels, *Mytilus edulis*: implications for the mechanism of doubly uniparental inheritance of mitochondrial DNA. *Genetics* 148: 341-7.

- TAANMAN, J. W., (1999). The mitochondrial genome: structure, transcription, translation and replication. *Biochim Biophys Acta* 1410: 103-23.
- THYAGARAJAN, B., R. A. PADUA and C. CAMPBELL, (1996). Mammalian mitochondria possess homologous DNA recombination activity. *J Biol Chem* 271: 27536 - 43.
- WALLACE, D. C., (1986). Mitochondrial genes and disease. *Hospital practice* 21: 77-92.
- WALLER, T. R., (1990). The evolution of ligament systems in the Bivalvia, pp. 49-71 in *The Bivalvia-Proceedings of a memorial symposium in honour of Sir Charles Maurice Yonge*, Edinburgh, edited by B. Morton. Hong Kong Univ. Press, Hong Kong.
- WOLSTENHOLME, D. R., (1992). Animal mitochondrial DNA: structure and evolution. *Int Rev Cytol* 141: 173-216.
- ZOUROS, E., K. R. FREEMAN, A. O. BALL and G. H. POGSON, (1992). Direct evidence for extensive paternal mitochondrial DNA inheritance in the marine mussel *Mytilus*. *Nature* 359: 412-4.
- ZOUROS, E., A. O. BALL, C. SAAVEDRA and K. R. FREEMAN, (1994a). Mitochondrial DNA inheritance. *Nature* 368: 818.
- ZOUROS, E., A. OBERHAUSER BALL, C. SAAVEDRA and K. R. FREEMAN, (1994b). An unusual type of mitochondrial DNA inheritance in the blue mussel *Mytilus*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91: 7463-7.
- ΔΗΜΗΤΡΙΟΥ, Γ., (2002). Ανίχνευση μωσαϊκών μορίων μιτοχονδριακού DNA εξ ανασυνδιασμού στο Μύδι. Πτυχιακή εργασία. Τμήμα Βιολογίας. Πανεπιστήμιο Κρήτης.
- ΛΑΔΟΥΚΑΚΗΣ, Ε. Δ., (1998). Μία φυλογεωγραφική μελέτη του μυδιού της Μεσογείου *Mytilus galloprovincialis*. Διατριβή για το Μεταπτυχιακό Τίτλο Ειδίκευσης. Τμήμα Βιολογίας. Πανεπιστήμιο Κρήτης.