



Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών
Σχολή Θετικών Επιστημών
Τμήμα Βιολογίας

Μοριακή προσέγγιση δομικών και
λειτουργικών στοιχείων του
μιτοχονδριακού DNA του *Mytilus
galloprovincialis*

Κυριακού Ελένη

Διδακτορική διατριβή

Αθήνα 2015

Σύντομος τίτλος (Κεφαλίδας):

Δομικά και λειτουργικά στοιχεία του mtDNA του *M. galloprovincialis*

Η παρούσα διατριβή εκπονήθηκε στον Τομέα Βιοχημείας και Μοριακής Βιολογίας του Τμήματος Βιολογίας, υπό την επίβλεψη τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής που απαρτίζουν οι εξής:

Γ. Κ. Ροδάκης, Καθηγητής ΕΚΠΑ (επιβλέπων)

Ρ. Λεκανίδου, Ομότιμη Καθηγήτρια ΕΚΠΑ

Ε. Ζούρος, Ομότιμος Καθηγητής Πανεπιστημίου Κρήτης

Και η επταμελής εξεταστική επιτροπή συμπληρώθηκε από τους εξής:

Δ. Βασιλακοπούλου, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια, ΕΚΠΑ

Δ. Σίδερης, Αναπληρωτής Καθηγητής, ΕΚΠΑ

Δ. Στραβοπόδης, Επίκουρος Καθηγητής, ΕΚΠΑ

Ι. Τρουγκάκος, Επίκουρος Καθηγητής, ΕΚΠΑ

Για την εκπόνηση της διδακτορικής διατριβής έλαβα υποτροφία από τα έσοδα της κληρονομιάς του Αντωνίου Παπαδάκη (Ιούλιος 2010 - Ιούλιος 2014).

Μέρος της έρευνας χρηματοδοτήθηκε από το Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών (Κ.Ε. #11237)

Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από το Τμήμα Βιολογίας του ΕΚΠΑ δεν υποδηλώνει αποδοχή των απόψεων του συγγραφέα [Ν. 5343/32 αρ. 202 παρ. 2]

Στους γονείς μου, Σοφία και Αλέξανδρο

Στο Χρήστο

Ευχαριστώ...

Η εισαγωγή στο Τμήμα Βιολογίας του Πανεπιστημίου Αθηνών ήταν για μένα στόχος από τα 15 μου (αφού αποφάσισα να κάνω πέρα το Ιστορικό-Αρχαιολογικό!). Όταν μπήκα, έβαλα στόχο να κάνω διδακτορικό. Όταν ξεκίνησα το διδακτορικό μου στον Τομέα Βιοχημείας και Μοριακής Βιολογίας υπό την επίβλεψη του Καθηγητή Γ. Κ. Ροδάκη, κατάλαβα ότι ο φυσικός μου χώρος είναι το εργαστήριο και η δουλειά των ονείρων μου – η έρευνα.

Τώρα, σχεδόν πέντε χρόνια μετά, και αφού το κεφάλαιο «διδακτορικό» κλείνει, θέλω να ευχαριστήσω όλους αυτούς που με βοήθησαν, πολύ ή λίγο, να γίνω καλύτερη βιολόγος, καλύτερη ερευνήτρια, καλύτερη επιστήμονας και τελικά, καλύτερος άνθρωπος.

Ευχαριστώ πρώτον από όλους και πάνω από όλα, τον Καθηγητή Γ. Ροδάκη, επιβλέποντα της διατριβής (αλλά και της διπλωματικής μου εργασίας αρχικά) για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε και μου δείχνει ακόμα, που μου επέτρεψε να εκφράζομαι ελεύθερα (π.χ. να βάψω κίτρινο το εργαστήριο!!!), για την ολιστική αντίληψη των πραγμάτων που μου δίδαξε, για την αστείρευτη θέληση να μου μάθει όλα όσα ξέρει, για όλα όσα έμαθα, επιστημονικά και μη, για τη σοφία του.

Θερμά ευχαριστώ οφείλω στα υπόλοιπα δύο μέλη της συμβουλευτικής επιτροπής. Ευχαριστώ τον Ομότιμο Καθηγητή Ε. Ζούρο για τις επιστημονικές συζητήσεις, τις καίριες παρατηρήσεις του, τις εύστοχες διορθώσεις του, για την προθυμία να βοηθήσει ακόμη και από μακριά. Είναι για μένα το πρότυπο του επιστήμονα που δεν εγκαταλείπει ποτέ την επιστήμη του. Ευχαριστώ και την Ομότιμη Καθηγήτρια Ρ. Λεκανίδου για την πιο «γυναικεία» και ευαίσθητη ματιά, αλλά παράλληλα ορθολογιστική και “to the point”.

Όταν τα πειράματα δεν πήγαιναν κατ’ευχήν ή όταν ήθελα να δοκιμάσω κάποια καινούρια τεχνική, η εμπειρία και η διάθεση να βοηθήσουν, ορισμένων επιστημόνων του Τμήματος, ήταν κομβική για την ομαλή διεξαγωγή της διατριβής. Συνεπώς, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Επίκουρο Καθηγητή Δ. Στραβοπόδη για τις υποδείξεις του στα πειράματα EMSA ανταγωνισμού· τον Καθηγητή Κ. Βοργιά για τις υποδείξεις του γύρω από τη μέθοδο Bradford, τη διάσπαση με υπερήχους αλλά και για το καλύτερο «χτενάκι» για πηκτώματα ακρυλαμίδης· τον Δρ. Θανάση

Βελέντζα και τον Δρ. (πλέον) Παντελή Λιβανό για την πολύτιμη βοήθειά τους στα πειράματα μικροσκοπίας φθορισμού· τον Επίκουρο Καθηγητή Ι. Τρουγκάκο για τις πολύ εύστοχες και χρήσιμες ερωτήσεις-παρατηρήσεις του κατά την παρουσίαση των αποτελεσμάτων της παρούσας διατριβής σε ανοιχτό σεμινάριο. Επίσης, ευχαριστώ το Κληροδότημα Αντωνίου Παπαδάκη για την οικονομική στήριξη-υπό μορφή μηνιαίας υποτροφίας (2010-2014).

Ένα πολύ μεγάλο ευχαριστώ οφείλω σε τρία άτομα του εργαστηρίου, από τα οποία έμαθα σχεδόν όλες τις εργαστηριακές μεθόδους και τεχνικές που γνωρίζω (τα «του πάγκου»), αλλά και τα οποία στάθηκαν αληθινοί φίλοι στα εύκολα και στα δύσκολα. Ευχαριστώ, λοιπόν, τη Δρ. Λάρα Κραββαρίτη για τα μυστικά της EMSA και των gel ακρυλαμίδης, τη Δρ. Εύη Χατζόγλου που με μύησε στον κόσμο του RNA και φυσικά, τον συν-υποψήφιο διδάκτορα και πλέον Δρ. (!!!) Σωτήρη Τσατσαρούνο που με βοήθησε με τα βασικά όταν πρωτο-ήρθα στο εργαστήριο και με τον οποίο μοιράστηκα ατέλειωτες εργαστηριακές ώρες με όλα τα ευχάριστα και τα δυσάρεστα της εργαστηριακής ζωής. Τους ευχαριστώ και τους τρεις για τις πολύωρες συζητήσεις, για τις συμβουλές, που ήταν εκεί όταν τους χρειαζόμουν. Ευχαριστώ επίσης τον διπλωματικό φοιτητή Θέμη Βασιλόπουλο, για τη βοήθεια με την εργαστηριακή ρουτίνα ακόμη και μετά την ολοκλήρωση της διπλωματικής του εργασίας.

Τέλος, θέλω να ευχαριστήσω τους γονείς μου που με στηρίζουν ουσιαστικά σε κάθε μου απόφαση και με ενθαρρύνουν να γίνομαι καλύτερη σε όλα· και το σύντροφό μου, Χρήστο για την υπομονή και τη συναισθηματική στήριξη όλα αυτά τα χρόνια.

Περιεχόμενα

Περιεχόμενα	vii
Συνομογραφίες	xii
Κεφάλαιο 1: Εισαγωγή	
1.1 Το μιτοχόνδριο	1
1.1.1 Η ανακάλυψη και η προέλευση των μιτοχονδρίων	1
1.1.2 Κατανομή και αριθμός ανά κύτταρο.....	8
1.1.2.1 Περιπυρηνικά μιτοχόνδρια (perinuclear mitochondria).....	9
1.1.3 Δομή και λειτουργία.....	10
1.2 Μιτοχονδριακό DNA.....	13
1.2.1 Γενικά χαρακτηριστικά	13
1.2.2 Λειτουργίες του μιτοχονδριακού DNA.....	20
1.2.2.1 Αντιγραφή	20
1.2.2.2 Μεταγραφή και ωρίμανση.....	25
1.2.2.3 Μετάφραση.....	29
1.2.3 Κληρονόμηση	31
1.3 Διπλή Μονογονεϊκή Κληρονομικότητα (ΔΜΚ).....	37
1.3.1 Ανακάλυψη.....	37
1.3.2 Τι είναι γνωστό... ..	41
1.3.2.1 ...σε επίπεδο DNA.....	41
1.3.2.2 ...σε επίπεδο RNA	49
1.3.2.3 ...σε πρωτεϊνικό επίπεδο	55
1.3.3 Η τύχη των πατρικών μιτοχονδρίων στο ζυγωτό - έμβρυο.....	56
1.3.4 Το προτεινόμενο μοντέλο της ΔΜΚ	57
1.4 Σκοπός της διατριβής	60

Κεφάλαιο 2: Υλικά και Μέθοδοι

2.1 Βιολογικό Υλικό	66
2.2 Απομόνωση ολικών νουκλεϊκών οξέων από ιστούς μυδιού	68
2.3 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA	69
2.3.1 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μικρή κλίμακα (mini prep).....	70
2.3.2 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μεσαία κλίμακα (midi prep)	71
2.4 Απομόνωση RNA από ιστούς μυδιού	72
2.5 Αντίστροφη μεταγραφή (Reverse Transcription - RT)	74
2.6 Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction – PCR)	77
2.6.1 Συστατικά και συνθήκες της αντίδρασης PCR	78
2.6.2 PCR Επέκτασης Αλληλοεπικαλυπτόμενων Τμημάτων (Overlap Extension PCR)	85
2.7 Ηλεκτροφόρηση	93
2.7.1 Ηλεκτροφόρηση νουκλεϊκών οξέων	94
2.7.1.1 Ηλεκτροφόρηση DNA σε πηκτώματα αγαρόζης	95
2.7.1.2 Ηλεκτροφόρηση RNA σε πήκτωμα αγαρόζης	98
2.7.1.3 Ηλεκτροφόρηση DNA σε αποδιατακτικά πηκτώματα πολυακρυλαμίδης	98
2.7.2 Ηλεκτροφόρηση συμπλόκων DNA-πρωτεϊνών σε μη αποδιατακτικό (native) πηκτώμα πολυακρυλαμίδης	102
2.8 Πέψη με περιοριστικές ενδονουκλεάσες	104
2.9 Απομόνωση ζώνης DNA από πήκτωμα αγαρόζης - καθαρισμός DNA	105
2.9.1 Απομόνωση ζώνης DNA με χρήση kit – Gel extraction.....	105
2.9.2 Καθαρισμός DNA.....	105
2.9.2.1 Στήλη χρωματογραφίας BioGel P-60.....	106
2.9.2.2 Στήλη φυγοκέντρησης Sephadex (spin-column chromatography)	107
2.10 Ποσοτικός φωτομετρικός προσδιορισμός νουκλεϊκών οξέων	108
2.11 Κλωνοποίηση DNA τμημάτων	109
2.11.1 Παρασκευή φορέα κλωνοποίησης	110

2.11.2 Αντίδραση συγκόλλησης μονόκλωνων συμπληρωματικών άκρων DNA – DNA Ligation	110
2.11.2.1 Σύνδεση άκρων φορέα και ενθέματος κομμένων με περιοριστικές ενδονουκλεάσες.....	111
2.11.2.2 Σύνδεση άκρων φορέα T-vector και ενθέματος – προϊόντος PCR	111
2.11.3 Παρασκευή δεκτικών κυττάρων για μακρόχρονη διατήρηση (frozen competent cells).....	112
2.11.4 Μετασηματισμός δεκτικών κυττάρων (Transformation)	113
2.11.5 Επιλογή και φύλαξη των ανασυνδυασμένων κλώνων	114
2.12 Κατασκευή δίκλωνων συνθετικών ολιγονουκλεοτιδίων	115
2.13 Προσδιορισμός πρωτοδιάταξης DNA (DNA Sequencing)	116
2.14 Ραδιοσήμανση άκρων τμημάτων DNA με τη μέθοδο “Klenow”	116
2.15 Εκχύλιση πρωτεϊνών από ιστούς μυδιού	118
2.15.1 Απομόνωση πυρηνικού και κυτταροπλασματικού πρωτεϊνικού εκχυλίσματος από ιστούς μυδιού.....	118
2.15.2 Απομόνωση ολικού πρωτεϊνικού εκχυλίσματος από ιστούς μυδιού	119
2.16 Μελέτες αλληλεπίδρασης DNA-πρωτεϊνών	120
2.16.1 Μείωση της κινητικότητας συμπλόκου DNA-πρωτεϊνών σε μη-αποδιατακτικό πήκτωμα πολυακρυλαμίδης (ΜΚΣ).....	120
2.16.2 Μέθοδος αποτυπώματος (DNase I footprinting DNA)	123
2.17 Αυτοραδιογραφία	130
2.18 Φθορίζουσα χρώση παρασκευασμάτων πυρήνων	130
2.19 Προσδιορισμός των άκρων των μεταγράφων - Rapid Amplification of cDNA Ends (RACE).....	131
2.19.1 3’RACE	132
2.19.2 5’RACE	133
2.19.3 3’RACE και 5’RACE (ενιαία διαδικασία)	134
2.20 Ανάλυση αλληλουχιών σε Η/Υ	136

Κεφάλαιο 3: Αποτελέσματα και Συζήτηση

3.1 Προσδιορισμός της περιοχής των γονιδιωμάτων F και M του <i>M. galloprovincialis</i> που πιθανόν εμπλέκεται στην πορεία κληρονόμησής τους.....	140
3.2 Υπάρχει ανοικτό πλαίσιο ανάγνωσης (ORF) στην περιοχή VD1 του CR;.....	142
3.3 Μελέτη του ρόλου της πολυαδενυλίωσης για την αποικοδόμηση των προϊόντων RNA μη-πρωτεϊνικών γονιδίων.....	150
3.3.1 Γονίδιο <i>l-rRNA</i> (16S rRNA, συστατικό της μεγάλης ριβοσωμικής υπομονάδας).....	151
3.3.2 Γονίδιο <i>s-rRNA</i> (12S rRNA, συστατικό της μικρής ριβοσωμικής υπομονάδας).....	154
3.3.3 Γονίδια tRNA.....	156
3.4 Διερεύνηση πρόσδεσης πρωτεϊνικών παραγόντων στην περιοχή VD1 του CR.....	158
3.4.1 Αναζήτηση ύπαρξης περιοχής πρόσδεσης παραγόντων στο VD1 του γονιδιώματος M.....	158
3.4.1.1 Αλληλεπίδραση τμήματος VD1 του γονιδιώματος M με πρωτεϊνικούς παράγοντες της αρσενικής γονάδας.....	159
3.4.1.2 Τα σημαντικά για την αλληλεπίδραση τμήματα του VD1-M ₁₆₁₋₃₁₂	165
3.4.1.3 Ο ρόλος της αλληλουχίας των αδενινών.....	168
3.4.1.4 Ο ρόλος των τμημάτων του VD1-M ₁₆₁₋₃₁₂ που πλαισιώνουν την αλληλουχία των αδενινών.....	171
3.4.1.5 Ο ιδιαίτερος ρόλος του πυρηνικού εκχυλίσματος.....	175
3.4.2 Αναζήτηση ύπαρξης περιοχής πρόσδεσης παραγόντων στο VD1 του γονιδιώματος F.....	177
3.5 Αρχικές προσπάθειες χαρακτηρισμού παράγοντα που εμπλέκεται στο σύμπλοκο με το VD1-M ₁₆₁₋₃₁₂	180

Κεφάλαιο 4: Γενικά Συμπεράσματα

4.1 “Αποικοδομόσωμα” (degradosome) στα μιτοχόνδρια του <i>Mytilus</i>	187
4.2 Εξεταση της πιθανότητας ύπαρξης ανοιχτού πλαισίου ανάγνωσης (ORF) στο VD1...	189
4.3 Εξέταση της πιθανότητας ύπαρξης αλληλουχιών πρόσδεσης πρωτεϊνικών παραγόντων στο VD1.....	190

Περίληψη	197
Summary	201
Βιβλιογραφία	205
Παράρτημα	227
Βιογραφικό σημείωμα	
Δημοσιεύσεις	

Συντομογραφίες

[α-³²P]dATP	— Deoxyadenosine triphosphate, labeled on the alpha phosphate group with ³² P / Τριφωσφορική δεοξαδενοσίνη με ραδιενεργό φωσφόρο στη θέση άλφα.
12S rRNA ή s-rRNA	— 12S rRNA or small subunit' rRNA / 12S-rRNA ή rRNA της μικρής ριβοσωμικής υπομονάδας.
16S rRNA ή l-rRNA	— 16S rRNA or large subunit' rRNA / 16S-rRNA ή rRNA της μεγάλης ριβοσωμικής υπομονάδας.
APS	— Ammonium persulfate / Υπερθεικό αμμώνιο.
ATP	— Adenosine triphosphate / Τριφωσφορική αδενοσίνη.
ATPase6, ATPase8	— Sixth (or eighth) subunit of ATP synthase / Έκτη (ή όγδοη) υπομονάδα της συνθετάσης του ATP.
BB	— Binding buffer / Ρυθμιστικό διάλυμα πρόσδεσης.
bp	— Base pair / Ζεύγος βάσεων.
BSA	— Bovine serum albumin / Αλβουμίνη ορού βοός.
C	— Compound genome, C genome / Σύνθετο γονιδίωμα, γονιδίωμα τύπου C.
CD	— Conserved domain of the main control region (CR) of mtDNA / Συντηρητική περιοχή της κύριας ρυθμιστικής περιοχής (CR) του mtDNA.
cDNA	— Complementary DNA / Συμπληρωματικό DNA.
Ci	— Curie, 1 Ci = $3,7 \times 10^{10}$ disintegrations per second / Μονάδα μέτρησης ραδιενέργειας, 1 Ci = $3,7 \times 10^{10}$ διασπάσεις το δευτερόλεπτο.
COI, COII, COIII	— Subunits 1 to 3 of cytochrome c oxidase / Υπομονάδες 1 έως 3 της οξειδάσης του κυτοχρώματος c.
cpDNA	— Chloroplast DNA / Χλωροπλαστικό DNA.
cps	— Counts per second / Κρούσεις ανά δευτερόλεπτο.
CR	— Main control region / Κύρια ρυθμιστική περιοχή του mtDNA.
CSB	— Conserved sequence blocks in mtDNA / Συντηρητικά τμήματα αλληλουχιών του mtDNA.
CTP	— Cytidine triphosphate / Τριφωσφορική κυτιδίνη.
Cytb	— Apoenzyme of cytochrome b, subunit of the cytochrome c reductase complex / Αποένζυμο του κυτοχρώματος b, συστατικό της αναγωγάσης του κυτοχρώματος c.
dCTP	— Deoxycytidine triphosphate / Τριφωσφορική δεοξυκυτιδίνη.
dGTP	— Deoxyguanosine triphosphate / Τριφωσφορική δεοξυγουανοσίνη.
D-loop	— Displacement loop / Θηλιά εκτόπισης.
DMSO	— Dimethyl sulfoxide / Διμεθυλοσουλφοξείδιο.
DNA	— Deoxyribonucleic acid/Δεοξυριβονουκλεϊκό οξύ.
DNase	— Deoxyribonuclease / Δεοξυριβονουκλεάση.
dNTPs	— Deoxyribonucleotides / Δεοξυριβονουκλεοτίδια.

DTT	— Dithiothreitol / Διθειοθρεϊτόλη.
dTTP	— Deoxythymidine triphosphate / Τριφωσφορική δεοξυθυμιδίνη.
DUI	— Doubly Uniparental Inheritance / Διπλή Μονογονεϊκή Κληρονομικότητα.
EDTA	— Ethylene diamino tetraacetic acid / Αιθυλενο-διαμινο-τετραοξικό οξύ.
EMSA	— Electrophoretic mobility shift assay / Έλεγχος μείωσης της κινητικότητας συμπλόκου.
EndoG	— Endonuclease G / Ενδονουκλεάση G.
EST	— Expressed sequence tag / Ετικέτα εκφρασμένης αλληλουχίας.
F	— Female genome, F genome, F type, F molecule / Γονιδίωμα θηλυκού ατόμου, γονιδίωμα F, τύπος F, μόριο F.
FADH₂	— Flavin adenine dinucleotide reduced by accepting two hydrogen atoms / φλαβινο-αδενινο-δινουκλεοτίδιο ανηγμένο με δύο άτομα υδρογόνου.
fMet-tRNA	— Formyl-methionyl initiator tRNA / Εναρκτήριο tRNA με φορμυλιωμένη μεθειονίνη.
FoxI2	— Forkhead box I2 protein / πρωτεΐνη I2 με περιοχή forkhead.
g	— Gravitational acceleration unit / Μονάδα επιτάχυνσης της βαρύτητας.
gp1, gp4, gp5	— Virus envelope glycoproteins / Γλυκοπρωτεΐνες ιικού ελύτρου.
GSP	— Gene specific primer / Ειδικός εκκινητής γονιδίου (ως προς συγκεκριμένη αλληλουχία του).
H	— mtDNA heavy strand / Βαριά αλυσίδα του mtDNA.
HEPES	— 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid / 4-(2-υδροξυαιθυλο)-1-πιπεραζινοαιθανοσουλφονικό οξύ.
HSP	— mtDNA heavy strand promoter / Υποκινητής της μεταγραφής της βαριάς αλυσίδας του mtDNA.
Kb	— Kilobase / Χιλιάδα βάσεων.
L	— mtDNA light strand / Ελαφριά αλυσίδα του mtDNA.
LSP	— mtDNA light strand promoter / Υποκινητής της μεταγραφής της ελαφριάς αλυσίδας του mtDNA.
M	— Male genome, M genome, M type, M molecule / Γονιδίωμα αρσενικού ατόμου, γονιδίωμα M, τύπος M, μόριο M.
MBA	— N,N'-Methylenebisacrylamide / N,N'-Μεθυλενοδισακρυλαμίδη.
MO	— Membranous organelles / Μεμβρανώδη οργανίδια.
mRNA	— Messenger RNA / Μήνυμα RNA.
mtDNA	— Mitochondrial DNA / Μιτοχονδριακό DNA.
mtRNApol	— Mitochondrial RNA polymerase / Μιτοχονδριακή RNA πολυμεράση.
mtSSB	— Mitochondrial single-strand binding proteins / Πρωτεΐνες που προσδέονται σε μονόκλωνο μιτοχονδριακό DNA (για να το προστατέψουν από την αποικοδόμηση από

	νουκλεάσες).
NADH	— Nicotinamide adenine dinucleotide reduced by accepting one hydrogen atom / Νικοτιναμιδο-αδενιν-δινουκλεοτίδιο ανηγμένο με ένα άτομο υδρογόνου.
NCBI	— National center for biotechnology information / Εθνικό κέντρο βιοτεχνολογικής πληροφορίας.
ND1-6 και ND4-L	— Subunits 1-6 and 4L of NADH dehydrogenase complex / Υπομονάδες 1-6 και 4L της αφυδρογονάσης του NADH.
NP-40	— Nonyl phenoxy polyethoxy ethanol, detergent / Εννεύλο-φαινοξυπολυαιθοξυλαιθανόλη, απορρυπαντικός παράγοντας.
nt	— Nucleotides / Νουκλεοτίδια.
OD	— Optical density / Οπτική πυκνότητα.
O_L	— Light strand origin of replication / Σημείο έναρξης της αντιγραφής της ελαφριάς αλυσίδας.
ORF	— Open reading frame / Ανοικτό πλαίσιο ανάγνωσης.
OXPHOS	— Oxidative phosphorylation / Οξειδωτική φωσφορυλίωση.
O_H	— Heavy strand origin of replication / Σημείο έναρξης της αντιγραφής της βαριάς αλυσίδας.
PAP	— Poly(A) polymerase / Πολυ-αδενοσινική πολυμεράση.
PBS	— Phosphate buffered saline / Ισότονο φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα.
PCR	— Polymerase chain reaction / Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης.
PEG	— Polyethylene glycol / Πολυαιθυλενογλυκόλη.
PGC	— Primordial germ cell / Αρχέγονο γαμετικό κύτταρο.
pH	— Power of hydrogen or potential hydrogen / Δύναμη υδρογόνου ή δυναμικό υδρογόνου.
PMSF	— Phenylmethanesulfonyl fluoride / Φαινυλομεθανοσουλφονυλοφθορίδιο.
PNPase	— Polynucleotide phosphorylase / Πολυνουκλεοτιδική φωσφορυλάση.
poly(A)	— Poly-adenosine / Πολυ-αδενοσίνη, πολλά νουκλεοτίδια αδενίνης στη σειρά (συνήθως πάνω από 10).
Poly(dIdC)	— Poly(deoxyinosinic-deoxycytidylic) acid / Πολύ(δεοξυινοσινικό-δεοξυκυτιδυλικό) οξύ.
poly	— mitochondrial DNA polymerase γ/Μιτοχονδριακή DNA πολυμεράση γ.
RACE	— Rapid amplification of cDNA ends / Ταχεία ενίσχυση των άκρων των cDNA.
RITOLS	— RNA incorporated throughout the lagging strand, an mtDNA replication model / Μοντέλο αντιγραφής του mtDNA με ενσωμάτωση RNA κατά μήκος της ελαφριάς αλυσίδας.
RNA	— Ribonucleic acid / Ριβονουκλεϊκό οξύ.
RNase	— Ribonuclease / Ριβονουκλεάση.
ROS	— Reactive oxygen species / Ελεύθερες ρίζες οξυγόνου.
rpm	— Revolutions per minute / Στροφές ανά λεπτό.
rRNA	— Ribosomal RNA / Ριβοσωμικό RNA.
RT	— Reverse transcription / Αντίστροφη μεταγραφή.

S	— Svedberg, sedimentation rate unit / Μονάδα ρυθμού καθίζησης Svedberg (10^{-13} sec).
SDS	— Sodium dodecyl sulfate / Θειοδωδεκυλικό νάτριο.
SMI	— Strictly Maternal Inheritance / Αυστηρά μητρική κληρονομηση.
STE	— Sperm transmitted element / Στοιχείο που μεταβιβάζεται από το σπέρμα.
T7	— Bacteriophage type 7 / Βακτηριοφάγος τύπου 7
Taq	— <i>Thermus aquaticus</i>
TAS	— Termination-associated sequence / Αλληλουχία σηματοδότησης της λήξης στην αντιγραφή της βαριάς αλυσίδας του mtDNA.
TEMED	— Tetramethylethylenediamine, / Τετραμεθυλαιθυλενοδιαμίνη.
Tm	— Melting temperature / Θερμοκρασία τήξης.
Tris	— Tris hydroxymethyl-aminomethane / Τρις υδροξυμεθυλο-αμινομεθάνιο.
tRNA	— Transfer RNA / Μεταφορικό RNA.
u	— Unit, amount that catalyzes the conversion of 1 micro mole of substrate per minute / Μονάδα μέτρησης ενζυμικής ενεργότητας, ποσότητα ενζύμου που καταλύει τη μετατροπή 1 μικρο-γραμμομορίου (μmol) υποστρώματος ανά λεπτό.
UR	— Unassigned region/ Άγνωστης λειτουργίας μη-κωδική περιοχή.
VD1, VD2	— Variable domain 1 and 2 of the main control region (CR) of mtDNA / Μεταβλητή περιοχή 1 και 2 της κύριας ρυθμιστικής περιοχής (CR) του mtDNA.
X-gal	— 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranoside / 5-βρωμο-4-χλωρο-3-ινδυλυλο-β-D-γαλακτοπυρανοσίδιο.
ΔG	— Gibbs free energy, free enthalpy / Ελεύθερη ενέργεια διαμόρφωσης δευτεροταγών δομών (J/mol ή kcal/mol).
ΔMK	— Διπλή Μονογονεϊκή Κληρονομικότητα.

1. Εισαγωγή

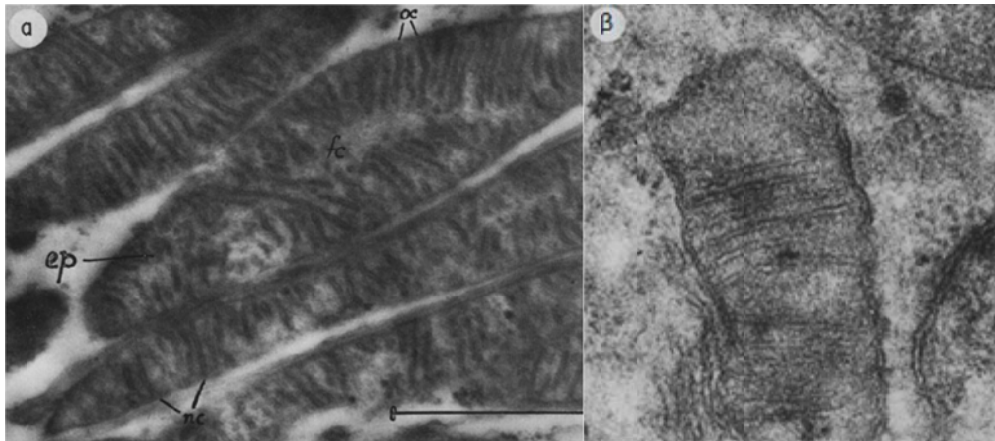
1.1 Το μιτοχόνδριο

Το μιτοχόνδριο είναι ένα οργανίδιο που περιέχεται κατά κανόνα στα ευκαρυωτικά κύτταρα και αποτελεί το «εργοστάσιο παραγωγής ενέργειας» του κυττάρου. Ο όρος «μιτοχόνδριο» προέρχεται από τις ελληνικές λέξεις «μίτος», δηλ. κλωστή, και «χονδρίον», δηλ. κόκκος. Εισήχθη από τον Benda το 1898 (Benda 1898) ο οποίος κατά τη μελέτη της σπερματογένεσης σε σπονδυλωτά και ανώτερα ασπόνδυλα, παρατήρησε την ύπαρξη μικροσκοπικών σωματίων («χονδρία») εντός του κυτταροπλάσματος, τα οποία, κατά την εκτίμησή του, είχαν την τάση να σχηματίζουν νημάτια («μίτο»).

1.1.1 Η ανακάλυψη και η προέλευση των μιτοχονδρίων

Οι πρώτες καταγραφές ενδοκυτταρικών δομών που πιθανότατα να αντιπροσωπεύουν μιτοχόνδρια, χρονολογούνται στη δεκαετία του 1840 (Henle 1841), λίγα μόλις χρόνια μετά την ανακάλυψη του πυρήνα (Brown 1833). Παρόλα αυτά, ο Richard Altman ήταν ο πρώτος που αναγνώρισε την καθολική παρουσία τους στα ζωικά ευκαρυωτικά κύτταρα (Altman 1890). Ονόμασε τις δομές αυτές «βιοβλάστες» και κατέληξε στο συμπέρασμα ότι ήταν «στοιχειώδεις οργανισμοί» που ζουν μέσα στα κύτταρα και διεκπεραιώνουν ζωτικές λειτουργίες. Όπως αναφέρθηκε πιο πάνω, ο όρος «μιτοχόνδρια» εισήχθη από τον Benda το 1898. Το 1900 ο Michaelis (Michaelis 1900) ανακάλυψε ότι η οξειδοαναγωγική χρωστική Janus Green B μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως ειδική βιώσιμη χρωστική των μιτοχονδρίων. Το μικρό μέγεθος του οργανιδίου σε σχέση με τη διακριτική ικανότητα του φωτονικού μικροσκοπίου και τα προβλήματα στερέωσης του ιστού, περιόριζαν για αρκετά χρόνια τη διερεύνηση των μικρών αυτών δομών που μόλις διακρίνονται ως κηλίδες με τη μέγιστη μεγέθυνση του φωτονικού μικροσκοπίου. Τα φυτικά μιτοχόνδρια περιγράφηκαν για πρώτη φορά από τον Meves (1908). Οι Bensley and Hoerr (1934) απομόνωσαν για πρώτη φορά μιτοχόνδρια από ήπαρ ινδικού χοιριδίου με υπερφυγοκέντρηση. Η λεπτομερειακή λεπτή δομή όμως, έγινε γνωστή

αρκετά χρόνια αργότερα, μετά την κατασκευή του ηλεκτρονικού μικροσκοπίου και χάρη στις πρωτοποριακές έρευνες των [Palade \(1952, 1953\)](#), [Sjostrand \(1953a και 1953b\)](#) και επέτρεψε την κατανόηση των βιοχημικών μηχανισμών και τη συσχέτιση δομής και λειτουργίας του τόσο σημαντικού αυτού κυτταρικού οργανιδίου ([Εικόνα 1.1](#)).



Εικόνα 1.1. Ηλεκτρονιογραφίες ηπατικών μιτοχονδρίων. **(α)** Από [Palade \(1953\)](#), 45.700. **(β)** Από [Sjöstrand \(1953a\)](#), 120.000X· από [Ernster and Schatz \(1981\)](#).

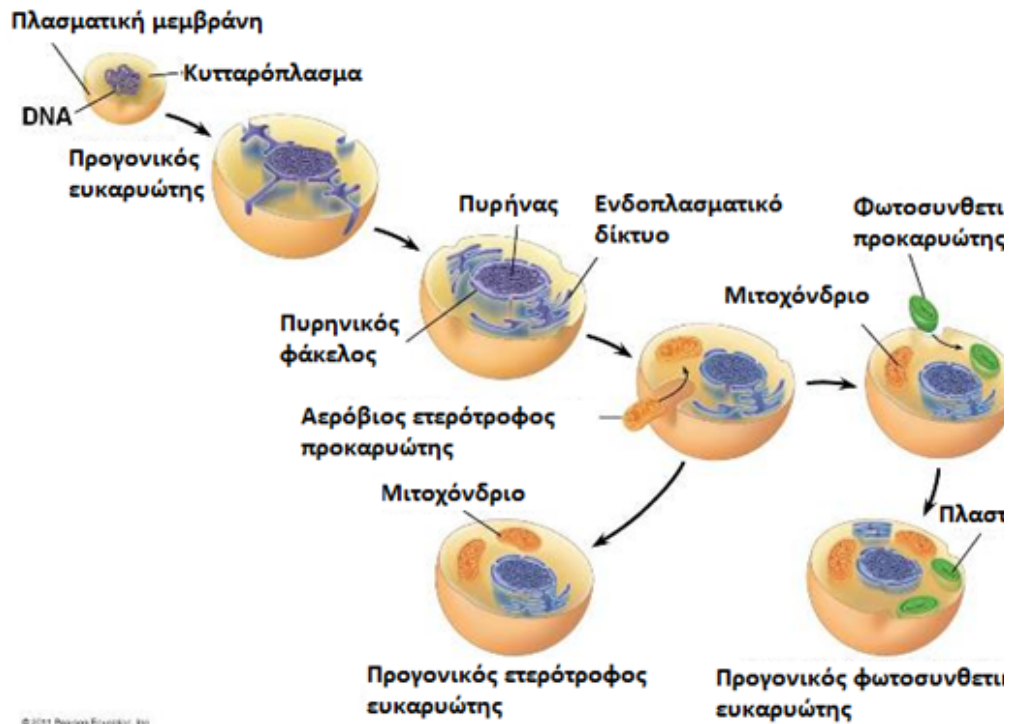
Η επικρατέστερη σήμερα άποψη για την προέλευση των μιτοχονδρίων είναι η ενδοσυμβιωτική θεωρία. Ενδοσυμβιωτικές υποθέσεις προτάθηκαν για πρώτη φορά από τον ρώσο βοτανικό [Mereschkowsky \(Mereschkowsky 1910\)](#), που βασίστηκε σε παλαιότερη δουλειά του [Schimper](#), ο οποίος παρατήρησε ότι η διαίρεση των χλωροπλαστών στα φυτά, μοιάζει πολύ με τη διαίρεση ελεύθερων κυανοβακτηρίων ([Schimper 1883](#)). Αργότερα ο [Wallin](#) επεξέτεινε την ιδέα μιας ενδοσυμβιωτικής προέλευσης, στα μιτοχόνδρια ([Wallin 1923, 1927](#)). Συγκεκριμένα, πρότεινε ότι τα μιτοχόνδρια είναι βακτήρια, τα οποία εισήλθαν στο κύτταρο-ξενιστή και έκτοτε ζουν συμβιωτικά εντός αυτού. Σε μια σειρά εννιά δημοσιεύσεων ο [Wallin](#) προσπάθησε να εξηγήσει τις θεωρίες και τα πειράματά του, που κυρίως εστιάζονταν στις μακροχρόνιες προσπάθειές του να καλλιεργήσει μιτοχόνδρια εκτός κυττάρου. Σε μία από τις τελευταίες δημοσιεύσεις του, υποστήριξε ότι πράγματι κατάφερε να δημιουργήσει καλλιέργεια μιτοχονδρίων, πράγμα το οποίο αποτελεί οριστική απόδειξη ότι τα μιτοχόνδρια είναι βακτήρια. Κανείς όμως δεν πίστεψε τους ισχυρισμούς αυτούς, καθότι θεωρήθηκε ότι οι καλλιέργειες

του Wallin είχαν μολυνθεί από βακτήρια. Σήμερα γνωρίζουμε ότι είναι αδύνατο να καλλιεργηθούν μιτοχόνδρια έξω από τα κύτταρα, καθώς το 95% των πρωτεϊνών τους κωδικοποιούνται από το πυρηνικό DNA. Για τους λόγους αυτούς, οι θεωρίες αυτές απορρίφθηκαν ή αγνοήθηκαν, μέχρι την αναβίωσή τους τη δεκαετία του 1960 μετά από πιο λεπτομερή σύγκριση στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο της δομής των κυανοβακτηρίων και χλωροπλαστών αλλά και μετά την ανακάλυψη DNA σε πλαστίδια και μιτοχόνδρια (Ris and Plaut 1962, Sager and Ishida 1963 και Nass and Nass 1963, Haslbrunner et al. 1964 αντίστοιχα).

Η προέλευση των μιτοχονδρίων μέσω ενδοσυμβίωσης βακτηρίων σε αρχαιοκαρυωτικά κύτταρα (urkaryotes), τεκμηριώθηκε και ενισχύθηκε με μικροβιολογικές ενδείξεις από τη Lynn Margulis (Sagan 1967). Σύμφωνα με τη θεωρία αυτή, αλλά και μετέπειτα βελτιώσεις και προσθήκες, τα μιτοχόνδρια εξελίχθηκαν από βακτήρια που εισέβαλαν σε ένα πρωτόγονο ευκαρυωτικό κύτταρο («αρχαιοκαρυωτικό») με ενδοκύτωση πριν από τουλάχιστον 2 δισεκατομμύρια χρόνια.

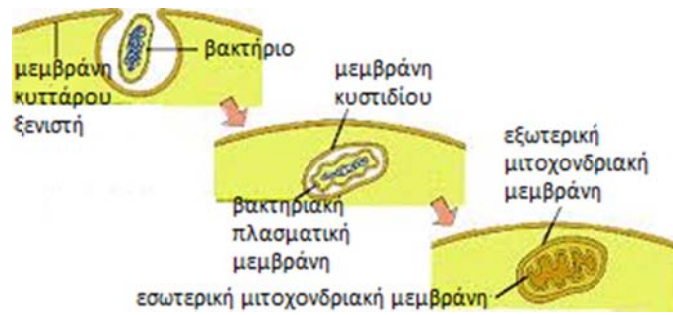
Όσον αφορά στο είδος του κυττάρου-εισβολέα, φυλογενετικά δέντρα που κατασκευάστηκαν χρησιμοποιώντας αλληλουχίες μιτοχονδριακών rRNA (Gray et al. 1984, 1989, Cedergren et al. 1988) υπέδειξαν εξαρχής την α κλάση των πρωτεοβακτηρίων ως πρόγονο των μιτοχονδρίων. Από την άλλη, οι απόψεις δίστανται ως προς το είδος του κυττάρου-ξενιστή. Σύμφωνα με τα «χιμαιρικά μοντέλα», αρχικά υπήρχαν δύο προκαρυωτικά κύτταρα: το αρχαιοβακτήριο και το βακτήριο. Τα κύτταρα αυτά υπέστησαν μια διαδικασία συγχώνευσης, είτε με φυσική σύντηξη (Zillig et al. 1989) ή με ενδοσυμβίωση, οδηγώντας με αυτόν τον τρόπο στο σχηματισμό του ευκαρυωτικού κυττάρου. Η κλασική ενδοσυμβιωτική υπόθεση της Margulis εντάσσεται στο «σενάριο του αρχαιοζώου» (archezoan scenario), σύμφωνα με το οποίο ο ξενιστής του πρωτο-μιτοχονδριακού ενδοσυμβιώτη είναι ένας υποθετικός πρωτόγονος αμιτοχονδριακός ευκαρυώτης που ονομάζεται αρχαιοζώο (archezoan) (Margulis 1970, Koonin 2010). Η ίδια η Margulis σε πιο πρόσφατη μελέτη της (Margulis et al. 2000) προτείνει μια θεωρία (σειριακή ενδοσυμβιωτική θεωρία) σύμφωνα με την οποία ένα πρώτο συμβιωτικό γεγονός μεταξύ ενός κινητού αναερόβιου βακτηρίου και ενός θερμο-οξεόφιλου αρχαιοβακτηρίου οδήγησε στη δημιουργία του πυρήνα και σε ένα

δεύτερο βήμα ενδοσυμβίωσης, ένα α-πρωτεοβακτήριο εισήλθε στον πρωτο-ευκαρυώτη και μετεξελίχτηκε σε μιτοχόνδριο. Από την άλλη, σύμφωνα με την «υπόθεση υδρογόνου» (Martin and Müller 1998), που ακολουθεί το «συμβιογενετικό σενάριο», μόνο ένα βήμα ενδοσυμβίωσης μεταξύ ενός αναερόβιου και αυτότροφου μεθανογόνου αρχαιοβακτηρίου (ξενιστής) και ενός α-πρωτεοβακτηρίου, απαιτήθηκε για τη δημιουργία των ευκαρυωτικών κυττάρων. Στην εγκαθίδρυση της σχέσης αυτής, κύριο ρόλο διαδραμάτισε το υδρογόνο, το οποίο αποβαλλόταν από τον «εισβολέα» κατά τη διαδικασία της αναερόβιας ζύμωσης και χρησιμοποιείτο από τον ξενιστή για την παραγωγή μεθανίου. Σε παρόμοια λογική βασίζεται και η «συν-τροφική υπόθεση» (syntrophy hypothesis), που ομοίως αξιοποιεί το υδρογόνο ως τη δύναμη που διατηρεί την ενδοσυμβίωση. Σύμφωνα με τη «συν-τροφική υπόθεση» πραγματοποιήθηκαν δύο ενδοσυμβιώσεις: (α) μια μεταβολική συμβίωση (συν-τροφία) μεταξύ ενός μεθανογόνου αρχαιοβακτηρίου και ενός δ-πρωτεοβακτηρίου (ξενιστής), που οδήγησε σε ευκαρυογένεση, και έπειτα (β) μια ενδοσυμβίωση με ένα α-πρωτεοβακτήριο, το οποίο αποτέλεσε μετέπειτα το σημερινό μιτοχόνδριο (Lopez-Garcia and Moriera 1999, Lopez-Garcia and Moriera 2006). Τέλος, σε αντίθεση με τις ενδοσυμβιωτικές θεωρίες, το «αυτογενές μοντέλο» (autogenous model) προτείνει ότι τα ευκαρυωτικά κύτταρα προέκυψαν απευθείας από έναν μοναδικό προκαρυωτικό πρόγονο με διαμερισματοποίηση (compartmentalization) των λειτουργιών που επήλθε με εγκολλώσεις της πλασματικής μεμβράνης του προκαρυώτη (Stanier 1970, Blobel 1980, Cavalier-Smith 1987, 2002). Το μοντέλο αυτό είναι συνήθως αποδεκτό ως εξήγηση της δημιουργίας του ενδοπλασματικού δικτύου, της συσκευής Golgi και της πυρηνικής μεμβράνης, καθώς και οργανιδίων που περιβάλλονται από απλή μεμβράνη (π.χ., λυσοσώματα) (Εικόνα 1.2). Λιγότερο αποδεκτό είναι το αυτογενές μοντέλο για τα μιτοχόνδρια, σύμφωνα με το οποίο τα μιτοχόνδρια εξελίχθηκαν εντός ενός πρωτο-ευκαρυωτικού κυττάρου, μετά από διαμερισματοποίηση πλασμιδίων σε μία εγκόλλωση της κυτταρικής μεμβράνης.



Εικόνα 1.2. Αυτογενές μοντέλο για τη δημιουργία πυρήνα και ενδοκυτταρικών μεμβρανών σε συνδυασμό με ενδοσυμβιωτικό μοντέλο για τη δημιουργία μιτοχονδρίων και χλωροπλαστών. Μεταφρασμένο από http://www.esu7.org/~leiweb/Staff/DSchmidt/Biology/Internet/Cellular_Energy/Endosymbiosis.htm

Συνοψίζοντας, σύμφωνα με τις επικρατέστερες εκδοχές της ενδοσυμβιωτικής θεωρίας, κάποια κύτταρα που ήταν αρχικά αναερόβιοι οργανισμοί χωρίς μιτοχόνδρια (π.χ. μεθανογόνα ή αρχαιοβακτήρια τύπου *Thermoplasma* (Embley and Martin 2006)) κάποτε δημιούργησαν μία σταθερή ενδοσυμβιωτική σχέση με ένα α -πρωτεοβακτήριο, του οποίου το σύστημα της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης χρησιμοποίησαν προς όφελός τους (Gray 1999, Andersson et al. 2003). Φαίνεται ότι η εσωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων προήλθε από την πλασματική μεμβράνη του αρχέγονου βακτηρίου, ενώ η εξωτερική προέκυψε πιθανότατα από τη μεμβράνη του φαγοσώματος του κυττάρου ξενιστή (Εικόνα 1.3).



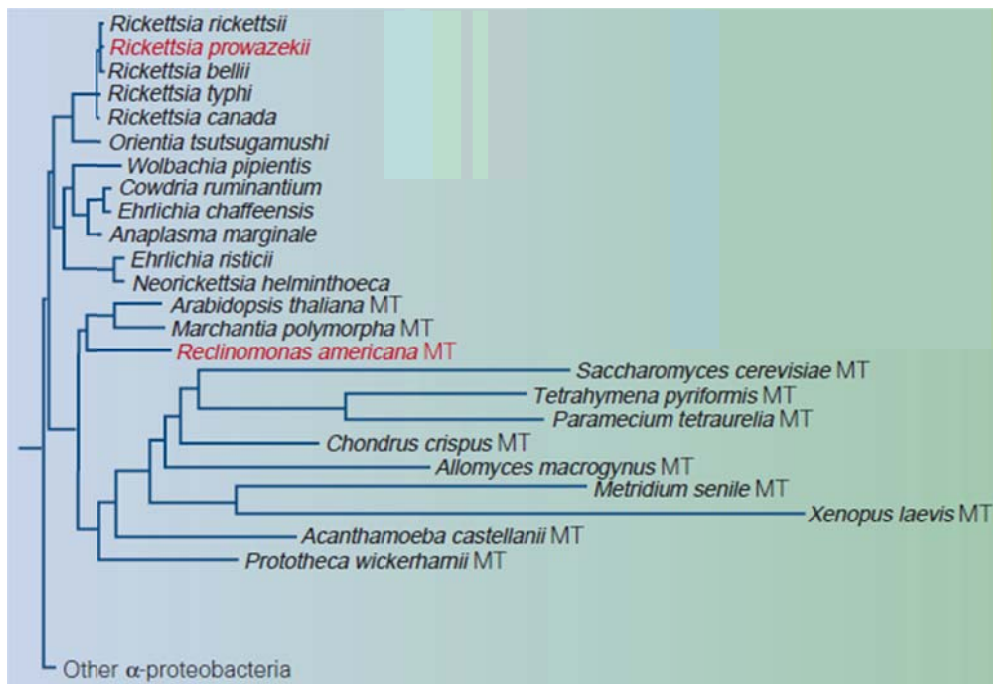
Εικόνα 1.3. Προέλευση μεμβρανών μιτοχονδρίου. Μεταφρασμένο από <http://www.biology.iupui.edu/biocourses/N100/2k2endosymb.html>

Καθώς η συμβιωτική σχέση διατηρήθηκε, ο προκαρυώτης «εισβολέας» απώλεσε πολλές από τις αρχικές λειτουργίες του, όπως π.χ. τη δυνατότητα αυτόνομης μετακίνησης, όπως και πολλά γονίδια τα οποία, είτε χάθηκαν είτε ενσωματώθηκαν στον πυρήνα του ξενιστή. Χαρακτηριστικές από τις ενδείξεις υπέρ της θεωρίας αυτής είναι οι εξής:

1. Τα μιτοχόνδρια παράγονται από προϋπάρχοντα μιτοχόνδρια μέσω διαίρεσης του οργανιδίου.
2. Τα μιτοχόνδρια περιέχουν κυκλικό DNA όπως οι προκαρυωτικοί οργανισμοί και τα γονίδιά τους παρουσιάζουν μεγαλύτερη ομοιότητα με τα αντίστοιχα προκαρυωτικά παρά με τα γονίδια του πυρήνα.
3. Η πρωτεϊνοσυνθετική μηχανή των μιτοχονδρίων μοιάζει περισσότερο με αυτή των προκαρυωτικών οργανισμών, παρά με την αντίστοιχη στο κυτταρόπλασμα των ευκαρυωτικών κυττάρων.
4. Αν αφαιρεθούν τα μιτοχόνδρια ενός κυττάρου, το κύτταρο δεν έχει τρόπο να δημιουργήσει νέα.
5. Οι μεταφορικές πρωτεΐνες πορίνες ανιχνεύονται στην εξωτερική μεμβράνη τόσο των μιτοχονδρίων όσο και των βακτηρίων.

Η ενδοσυμβιωτική προέλευση των μιτοχονδρίων ενισχύεται και από το γεγονός ότι μερικοί προκαρυωτικοί οργανισμοί έχουν σημαντικές ομοιότητες με τα κυτταρικά οργανίδια παραγωγής ενέργειας. Το αερόβιο βακτήριο *Paracoccus denitrificans*, διαθέτει μια αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων όμοια με του μιτοχονδρίου (van Verseveld and Bosna 1987). Επιπλέον, στη γιγαντιαία αμοιβάδα *Pelomyxa palustris*, απουσιάζουν τα μιτοχόνδρια, αλλά υπάρχουν ενδοσυμβιωτικά αναπνευστικά βακτήρια (Whatley 1976).

Το ενδοσυμβιωτικό γεγονός που οδήγησε στην εμφάνιση/δημιουργία των μιτοχονδρίων θεωρείται ότι συνέβη πριν από την απόκλιση ζώων και φυτών. Εντούτοις, δεν είναι ακόμα απόλυτα τεκμηριωμένο αν τα μιτοχόνδρια έχουν μονοφυλετική προέλευση. Σύγχρονα δεδομένα που προκύπτουν από τον προσδιορισμό και τη σύγκριση της πλήρους πρωτοδιάταξης μιτοχονδριακών γονιδιωμάτων από διαφορετικές ομάδες οργανισμών συνηγορούν υπέρ της μονοφυλετικότητας των μιτοχονδρίων και ορίζουν ως κοντινότερους συγγενείς τους τα ενδοκυτταρικά παράσιτα που ανήκουν στα α -πρωτεοβακτήρια της τάξης των Rickettsiales (Εικόνα 1.4) (Lang et al. 1999, Gray 1999, Emelyanov 2001a, 2001b, Andersson et al. 2003, Emelyanov 2003, Burger et al. 2003, Fitzpatrick et al. 2006).



Εικόνα 1.4. Φυλογενετικό δέντρο που δημιουργήθηκε με βάση την αλληλουχία του γονιδίου της μικρής ριβοσωμικής υπομονάδας α -πρωτεοβακτηρίων και μιτοχονδριακού DNA (MT) διάφορων φυτικών και ζωικών ειδών. Σύμφωνα με αυτό, οι κοντινότεροι συγγενείς των μιτοχονδρίων είναι τα είδη της τάξης Rickettsiales των α -πρωτεοβακτηρίων, που περιλαμβάνει τα υποχρεωτικά παράσιτα *Rickettsia*, *Anaplasma* και *Ehrlichia* (από Gray 1998)

1.1.2 Κατανομή και αριθμός ανά κύτταρο

Η κατανομή και ο αριθμός των μιτοχονδρίων διαφέρει σημαντικά μεταξύ των διάφορων κυτταρικών τύπων και σχετίζεται άμεσα με τη λειτουργία τους ως κέντρα παραγωγής ενέργειας.

Όλα τα ευκαρυωτικά κύτταρα έχουν μιτοχόνδρια με εξαίρεση ορισμένους μονοκύτταρους οργανισμούς (γνωστοί ως «αμιτοχονδριακοί» οργανισμοί), αλλά και τα ερυθροκύτταρα των ανώτερων σπονδυλοζώων, τα οποία χάνουν δευτερογενώς τα μιτοχόνδριά τους κατά τη διαφοροποίηση. Επίσης δευτερογενής απώλεια, συνέπεια παρασιτισμού, θεωρείται και η απουσία μιτοχονδρίων στους αμιτοχονδριακούς οργανισμούς (Vanacova et al. 2003). Ο αριθμός των μιτοχονδρίων είναι μεγαλύτερος σε κύτταρα ιστών με αυξημένες ενεργειακές απαιτήσεις, όπως οι νευρώνες, οι σκελετικοί μύες, ο καρδιακός μυς και το ήπαρ. Σε ένα ηπατικό κύτταρο εντοπίζονται περισσότερα από 1.000 ή 1.500 μιτοχόνδρια (Μαργαρίτης και συνεργάτες 2004). Ο αριθμός των μιτοχονδρίων στα θηλυκά γενετικά κύτταρα των μεταζώων (ωάρια) είναι πολύ μεγαλύτερος (~100.000 στα θηλαστικά, μέχρι και 10.000.000 στα αμφίβια) σε σχέση με τους αρσενικούς γαμέτες (σπερματοζωάρια) όπου ο αριθμός τους είναι πολύ μικρός (Jansen and de Boer 1998, Birky 2001). Στα φυτικά κύτταρα, ο αριθμός των μιτοχονδρίων είναι μικρότερος συγκριτικά με τα ζωικά.

Η κατανομή των μιτοχονδρίων στα κύτταρα σχετίζεται με την κατανομή των μικροσωληνίσκων ενώ έχει διαπιστωθεί διαρκής κίνηση και αλλαγή του σχήματός τους (Μαργαρίτης και συνεργάτες 2004). Σε πολλά κύτταρα τα μιτοχόνδρια κατανέμονται τυχαία στο κυτταρόπλασμα ενώ σε αρκετές περιπτώσεις συγκεντρώνονται σε συγκεκριμένες περιοχές. Χαρακτηριστικό είναι το παράδειγμα των σπερματοζωαρίων, όπου τα μιτοχόνδρια περιβάλλουν το αξόνημα των μαστιγίων (Alberts et al. 2002, Μαργαρίτης και συνεργάτες 2004). Κατά τη μίτωση, τα μιτοχόνδρια συγκεντρώνονται κοντά στη μιτωτική άτρακτο και στο τέλος της διαίρεσης κατανέμονται σχεδόν εξίσου στα θυγατρικά κύτταρα.

Τα μιτοχόνδρια είναι δυναμικά οργανίδια, τα οποία υπόκεινται σε συνεχείς συντήξεις και διαιρέσεις, είναι δυνατό να σχηματίζουν δίκτυα, ενώ η θέση τους στο κυτταρόπλασμα μπορεί να μην είναι σταθερή

(Bereiter-Hann and Voth 1994, Karbowski and Youle 2003). Το μέγεθος των μιτοχονδρίων ποικίλλει από 1 μm ως 10 μm σε μήκος και από 0,3 μm ως 1 μm σε διάμετρο. Το σχήμα τους μπορεί να είναι κυλινδρικό, σφαιρικό και στις περισσότερες περιπτώσεις επίμηκες (Μαργαρίτης και συνεργάτες 2004). Πολύ μεγάλα μιτοχόνδρια, τα οποία ονομάζονται μεγαμιτοχόνδρια και έχουν μήκος μέχρι και 30 μm, παρατηρούνται σε παθολογικές καταστάσεις. Η πλαστικότητα του σχήματος των μιτοχονδρίων και η ικανότητά τους να αλλάζουν θέση είναι ιδιότητες που οφείλονται πιθανότατα στις αλληλεπιδράσεις τους με τον κυτταροσκελετό, με τον οποίο φαίνεται ότι βρίσκονται σε επαφή (Chen and Butow 2005).

1.1.2.1 Περιπυρηνικά μιτοχόνδρια (perinuclear mitochondria)

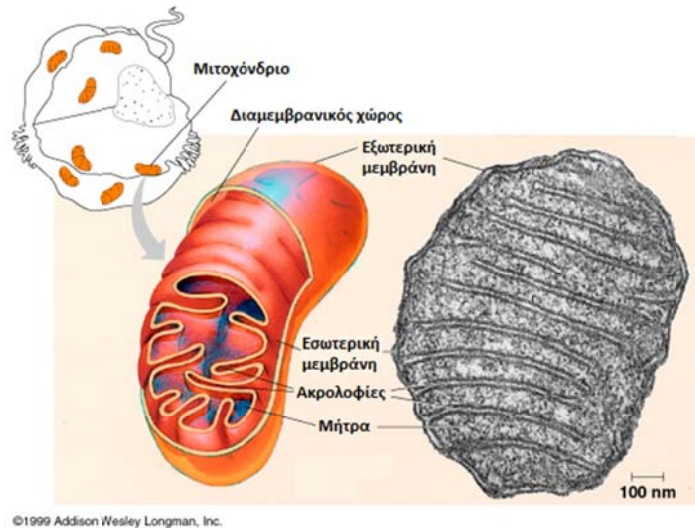
Το 2001 οι Park et al. (2001) βρήκαν ότι στα παγκρεατικά κυψελοειδή κύτταρα, τα μιτοχόνδρια ομαδοποιούνται με βάση τον κυτταρικό τους εντοπισμό. Οι τρεις ομάδες που σχηματίζονται (perinuclear, perigranular, subplasmalemmal) έχουν διαφορετικό ρόλο στη ρύθμιση του ενδοκυτταρικού ασβεστίου. Κάποιες μετέπειτα μελέτες επικεντρώθηκαν στον ξεχωριστό ρόλο των περιπυρηνικών (perinuclear) μιτοχονδρίων, δηλαδή εκείνων που βρίσκονται γύρω από τον πυρήνα. Σε παρωτιδικά κυψελοειδή κύτταρα ποντικού (Bruce et al. 2004), τα περιπυρηνικά μιτοχόνδρια εμπλέκονται στη δημιουργία σημάτων ασβεστίου και ιδιαίτερα στη διέγερση του μιτοχονδριακού μεταβολισμού προς δημιουργία ATP γύρω από τον πυρήνα με απώτερο στόχο τη διευκόλυνση της αποτελεσματικής έκκρισης βλέννας (να σημειωθεί ότι ο παρωτιδικός αδένας είναι ένας μείζων σιελογόνος αδένας). Παρόμοια λειτουργία αποδόθηκε στα περιπυρηνικά μιτοχόνδρια κυττάρων ουρήθρας κουνελιού (Hashiatni et al. 2010), τα οποία ρυθμίζουν τη δημιουργία κύματος ιόντων ασβεστίου ελέγχοντας τη συχνότητα απελευθέρωσης ιόντων ασβεστίου από το ενδοπλασματικό δίκτυο. Τα κύματα ιόντων ασβεστίου προκαλούν συσπάσεις του λείου μυός της ουρήθρας για τη διατήρηση αυθόρμητου τόνου που ελέγχει την απελευθέρωση των ούρων. Οι ίδιοι συγγραφείς προτείνουν γενικά ότι τα περιπυρηνικά μιτοχόνδρια μπορούν να λειτουργούν ως αισθητήρες ενδοκυττάρων μεταβολιτών. Οι μελέτες που αφορούν τα περιπυρηνικά μιτοχόνδρια είναι προς το παρόν λίγες και σχετικά πρόσφατες. Από αυτές όμως διαφαίνεται ότι τα περιπυρηνικά μιτοχόνδρια εκτελούν ιδιαίτερες

λειτουργίες, πέραν την οξειδωτικής φωσφορυλίωσης, τις οποίες φαίνεται να μην εκτελούν τα υπόλοιπα μιτοχόνδρια του κυτταροπλάσματος.

1.1.3 Δομή και λειτουργία

Κάθε μιτοχόνδριο περιβάλλεται από δύο μεμβράνες, οι οποίες έχουν διαφορετική σύσταση, επιτελούν διαφορετικές λειτουργίες και δημιουργούν δύο ξεχωριστά μιτοχονδριακά διαμερίσματα: μεταξύ των δύο μεμβρανών ορίζεται ο διαμεμβρανικός χώρος, ενώ η εσωτερική μεμβράνη περικλείει τη μιτοχονδριακή μήτρα (matrix). Στην επιφάνεια της εσωτερικής μεμβράνης και στη μήτρα επιτελούνται οι βασικές λειτουργίες του μιτοχονδρίου.

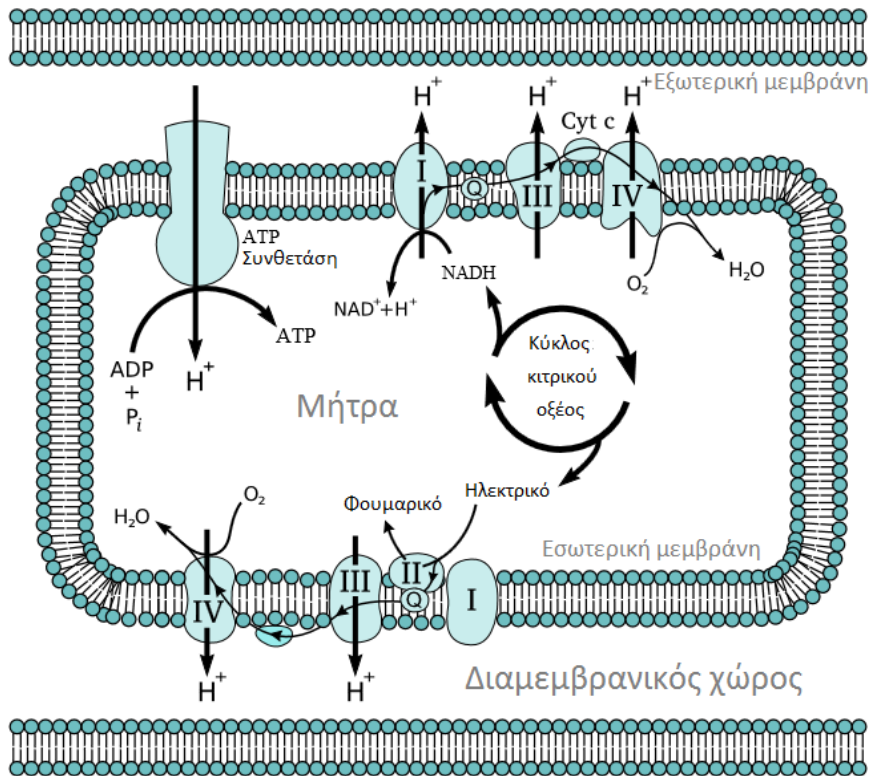
Η εξωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη έχει πάχος 7 nm και χαρακτηρίζεται από την παρουσία ευμεγέθων πόρων, οι οποίοι επιτρέπουν την είσοδο σε όλα τα μόρια μεγέθους ως και 5 – 6 kDa προς το διαμεμβρανικό χώρο. Τα μόρια αυτά, που περιλαμβάνουν και μικρές πρωτεΐνες δεν μπορούν στην πλειοψηφία τους να εισχωρήσουν στη μήτρα. Η εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη έχει πάχος 5 nm και σχηματίζει πολύπλοκες αναδιπλώσεις προς το εσωτερικό του μιτοχονδρίου οι οποίες ονομάζονται μιτοχονδριακές ακρολοφίες ή πτυχώσεις (cristae) και αυξάνουν σε μεγάλο βαθμό την επιφάνειά της (Εικόνα 1.5). Στις αναδιπλώσεις της εσωτερικής μεμβράνης εντοπίζονται διαμεμβρανικές πρωτεΐνες που συμμετέχουν στην αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων (ενζυμικά σύμπλοκα I, II, III, IV, V) και στην οξειδωτική φωσφορυλίωση (αναπνευστική αλυσίδα). Μέσα στη μιτοχονδριακή μήτρα βρίσκονται τα ενδομιτοχονδριακά κοκκία (τα οποία αποτελούν θέσεις δέσμευσης δισθενών ιόντων, κυρίως Ca^{++} και Mg^{++}), τα μιτοχονδριακά ριβοσώματα, το μιτοχονδριακό DNA (mtDNA), τα μιτοχονδριακά tRNA και ένζυμα που συμμετέχουν στον κύκλο του κιτρικού οξέος (κύκλος του Krebs).



Εικόνα 1.5. Διαγραμματική απεικόνιση και ηλεκτρονιογραφία ενός μιτοχονδρίου σε αντιπαραβολή. Τροποποιημένο από: <http://www.bio.uni-kl.de/en/pflanzenphysiologie/forschung/aqn-research-mcf/>.

Οι βασικές λειτουργίες που επιτελούνται στη μήτρα των μιτοχονδρίων είναι η διάσπαση του πυροσταφυλικού και των λιπαρών οξέων για την παραγωγή CO_2 και NADH και ο κύκλος του κιτρικού οξέος (ή κύκλος Krebs) για την παραγωγή FADH_2 . Στη συνέχεια τα NADH και FADH_2 αξιοποιούνται ως υποστρώματα για την παραγωγή ενέργειας με τη μορφή του ATP μέσω της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης (OXPHOS) που λαμβάνει χώρα στην εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη. Στη μεταβολική αυτή διαδικασία συμμετέχουν τα ενζυμικά σύμπλοκα I – V της αναπνευστικής αλυσίδας (Εικόνα 1.6):

Σύμπλοκο I	αφυδρογονάση του NADH ή οξειδοαναγωγή του NADH -ουβικινόνης (Q)	$\text{NADH dehydrogenase (ubiquinone) or NADH:ubiquinone oxidoreductase}$
Σύμπλοκο II	αφυδρογονάση του ηλεκτρικού ή αναγωγή του ζεύγους ηλεκτρικού-ουβικινόνης (Q)	$\text{succinate dehydrogenase or succinate-coenzyme Q reductase (SQR)}$
Σύμπλοκο III	αναγωγή του κυτοχρώματος c ή οξειδοαναγωγή του ζεύγους ουβικινόνης-κυτοχρώματος c	$\text{cytochrome bc1 complex or coenzyme Q:cytochrome c - oxidoreductase}$
Σύμπλοκο IV	οξειδάση του κυτοχρώματος c	$\text{cytochrome c oxidase}$
Σύμπλοκο V	Συνθετάση του ATP	ATP synthase



Εικόνα 1.6. Συνοπτική απεικόνιση της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων στο μιτοχόνδριο, που είναι η θέση όπου πραγματοποιείται η οξειδωτική φωσφορυλίωση στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς. Το NADH και το ηλεκτρικό που δημιουργούνται στον κύκλο του κιτρικού οξέος οξειδώνονται, απελευθερώνοντας ενέργεια που χρειάζεται η συνθετάση του ATP για τη σύνθεση του ATP (εικόνα μεταφρασμένη από Wikimedia Commons).

Τα NADH και FADH₂ είναι ανηγμένες μορφές που διαθέτουν ένα ζεύγος ηλεκτρονίων υψηλού δυναμικού μεταφοράς. Κατά την οξειδωτική φωσφορυλίωση, αυτά τα ηλεκτρόνια μεταφέρονται από τις ομάδες-δότες προς τις ομάδες-δέκτες ηλεκτρονίων των συμπλόκων της αναπνευστικής αλυσίδας, ώστε να καταλήξουν στο μοριακό οξυγόνο προκειμένου να σχηματιστεί νερό. Αυτές οι αντιδράσεις απελευθερώνουν ενέργεια, ένα μέρος της οποίας χρησιμοποιείται για τη σύνθεση του ATP.

Αρχικά, τα δύο ηλεκτρόνια του NADH εισέρχονται στην αλυσίδα μέσω του Συμπλόκου I, το οποίο τα μεταφέρει από το NADH στην ουβικινόνη (ή συνένζυμο Q), η οποία μετατρέπεται σε ουβιϋδροκινόνη. Τα ηλεκτρόνια υψηλού δυναμικού του FADH₂ από την άλλη, μεταφέρονται στην ουβικινόνη μέσω του Συμπλόκου II.

Στη συνέχεια, η ουβιϋδροκινόνη προωθεί τα ηλεκτρόνια προς το κυτόχρωμα c του Συμπλόκου III. Τέλος, τα δύο ηλεκτρόνια από το κυτόχρωμα c μεταβιβάζονται στο Σύμπλοκο IV, όπου το οξυγόνο αλληλεπιδρά με τα ηλεκτρόνια και παράγεται νερό.

Η φύση της ροής και η διάταξη των εμπλεκόμενων μορίων είναι τέτοια ώστε η μεταφορά ηλεκτρονίων μέσω της αναπνευστικής αλυσίδας να προκαλεί άντληση πρωτονίων από τη μήτρα. Η άντληση αυτή, σε συνδυασμό με την εκλεκτική διαπερατότητα της εσωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης στα πρωτόνια, δημιουργεί διαφορά χημικού και ηλεκτρικού δυναμικού, που μπορεί να εκτονωθεί μόνο από ειδικές πρωτεϊνικές πύλες, όπως είναι η συνθετάση του ATP (Σύμπλοκο V). Καθώς τα πρωτόνια διατρέχουν το ένζυμο, χρησιμοποιούνται για να προωθήσουν τη μη ευνοϊκή ενεργειακά αντίδραση μεταξύ ADP και φωσφορικής ομάδας για τη σύνθεση ATP.

Κατά τη διαδικασία της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης τα μιτοχόνδρια παράγουν, ως τοξικά παραπροϊόντα, ένα πολύ μεγάλο μέρος των ενδογενών ελεύθερων ριζών (Reactive Oxygen Species - ROS) του κυττάρου. Επιπλέον στα μιτοχόνδρια αποδίδεται η έναρξη του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου (απόπτωση), η οποία σχετίζεται με τη μιτοχονδριακή ενεργειακή ανεπάρκεια και το οξειδωτικό στρες καθώς και με τη δράση των ελεύθερων ριζών. Για το λόγο αυτό οι τρεις κύριες μιτοχονδριακές λειτουργίες της παραγωγής ενέργειας, της παραγωγής ελεύθερων ριζών και της έναρξης της απόπτωσης, θεωρούνται υπεύθυνες και για την πρόκληση διαφόρων ασθενειών (Wallace 2000). Τα μιτοχόνδρια συμμετέχουν επίσης στη διατήρηση της ομοιόστασης του ενδοκυτταρικού ασβεστίου και στην παραγωγή θερμότητας (Alberts et al. 2002, Ballard and Whitlock 2004).

1.2 Μιτοχονδριακό DNA

1.2.1 Γενικά χαρακτηριστικά

Η ύπαρξη DNA στα μιτοχόνδρια ανακαλύφθηκε τη δεκαετία του 1960 με ηλεκτρονική μικροσκοπία ως ευαίσθητο στη DNase ινίδιο μέσα

στα μιτοχόνδρια (Nass and Nass 1963) και με βιοχημικές αναλύσεις μιτοχονδριακών κλασμάτων υψηλής καθαρότητας (Halsbrunner et al. 1964). Παρόλα αυτά, η ύπαρξη DNA στα μιτοχόνδρια προτάθηκε αρκετά νωρίτερα, όταν κάποια κληρονομήσιμα χαρακτηριστικά αποδείχτηκε ότι μεταβιβάζονται από το κυτταρόπλασμα και όχι από τον πυρήνα (Ephrussi 1953, Caspari 1955).

Το μιτοχονδριακό DNA (mtDNA) παρουσιάζει εξαιρετική ποικιλομορφία στη δομή και γονιδιακή οργάνωση, το γονιδιακό περιεχόμενο, τη μεταγραφή και την αντιγραφή μεταξύ των διάφορων οργανισμών. Κάθε μιτοχόνδριο έχει ένα ή περισσότερα κυκλικά (συνήθως) ή γραμμικά μόρια DNA που βρίσκονται στη μιτοχονδριακή μήτρα. Το μέγεθος ποικίλλει από 6.000 ζεύγη βάσεων για τα μιτοχόνδρια του πρωτοζώου *Plasmodium falciparum* μέχρι 300.000 ζεύγη βάσεων για τα μιτοχόνδρια μερικών φυτικών κυττάρων. Ο αριθμός των αντιγράφων mtDNA σε κάθε μιτοχόνδριο, όπως και ο αριθμός των μιτοχονδρίων σε κάθε κύτταρο, ποικίλλει ανάμεσα σε διαφορετικούς οργανισμούς και εξαρτάται από τον τύπο του κυττάρου, το στάδιο ανάπτυξης και τις μεταβολικές του απαιτήσεις (Howell 1999). Το μιτοχονδριακό DNA έχει βρεθεί σε πολλά ίδια αντίγραφα (5 – 10) σε κάθε μιτοχόνδριο (π.χ. για ζωικά κύτταρα) ή διαφορετικά (π.χ. για ανώτερα φυτά). Σε μερικά πρωτόζωα (π.χ. *Paramecium* και *Tetrahymena*), το DNA είναι γραμμικό, χωρίς ακόμα να υπάρχει λογική εξήγηση για την ιδιομορφία αυτή. Η ποσότητα του συνολικού DNA των μιτοχονδρίων είναι συνήθως μικρό ποσοστό του συνολικού DNA του κυττάρου. Το ποσοστό αυτό είναι 1 – 2% για τα μιτοχόνδρια των ζωικών κυττάρων και 10 – 20% για τα μιτοχόνδρια του ζυμομύκητα (Μαργαρίτης και συνεργάτες 2004).

Στα ζωικά κύτταρα το mtDNA είναι εξαιρετικά φειδωλό ως προς τη γενετική πληροφορία και η γονιδιακή σύσταση είναι εξελικτικά σταθερή. Πρόκειται για ένα κυκλικό μόριο μεγέθους 13 – 19 kb (Εικόνα 1.7β). Εξάιρεση, ως προς το μέγεθος αποτελεί το mtDNA του δίθυρου *Placopecten magellanicus* που φτάνει τα 42 kb (La Roche et al. 1990), ενώ όσον αφορά στη δομή, ορισμένα Υδρόζωα (π.χ., *Hydra fusca*, *Hydra attenuate*), Σκυφόζωα (π.χ. *Cassiopea* sp.) και Κυβόζωα (π.χ., *Carybdea marsupialis*) περιέχουν ένα γραμμικό μόριο μεγέθους 16 kb ή δύο γραμμικά των 8 kb (Θεολογίδης 2007). Ένα τυπικό μόριο mtDNA κωδικοποιεί:

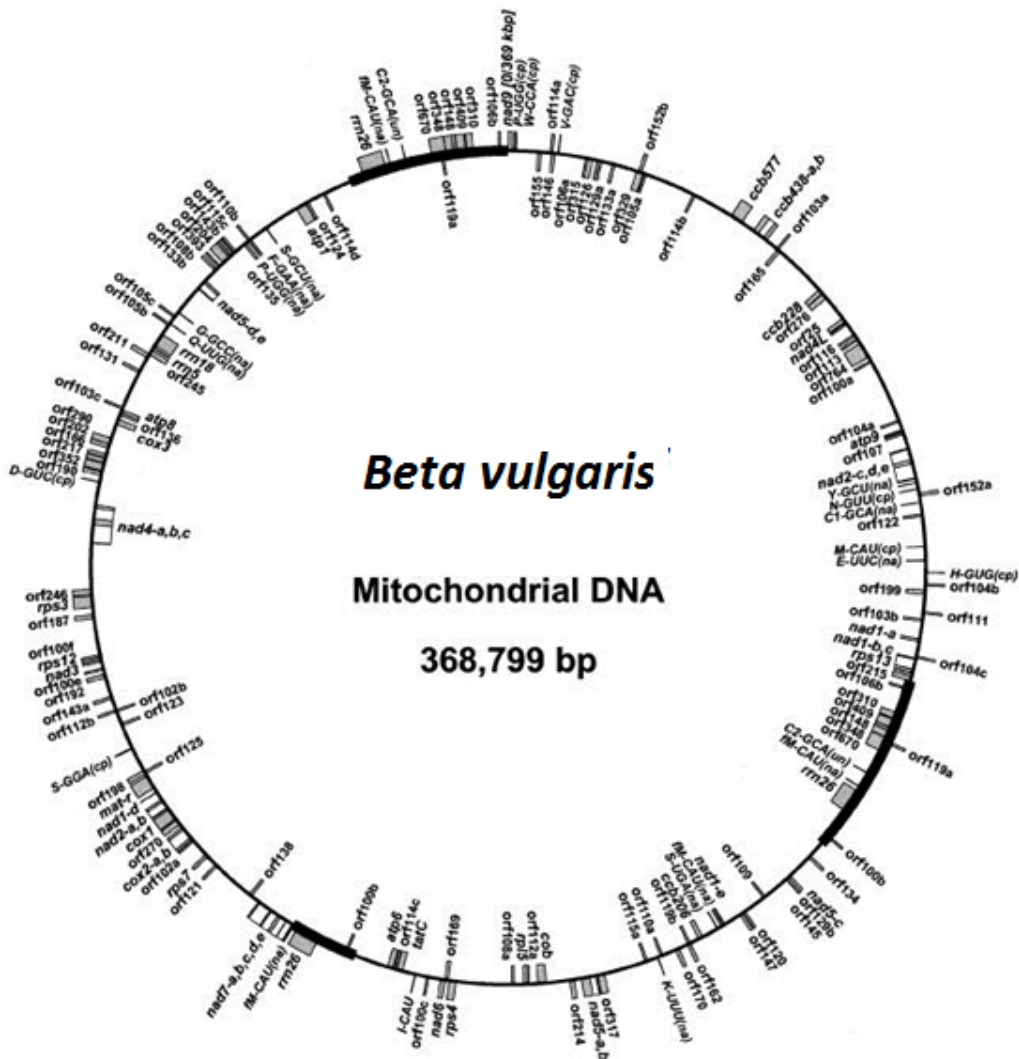
- 2 ριβοσωμικά RNA (16S rRNA και 12S rRNA)
- 22 μεταφορικά RNA (tRNA)
- 13 πολυπεπτίδια των συμπλόκων της αναπνευστικής αλυσίδας:
 - 7 υπομονάδες αφυδρογονάσης του NADH [*ND1*, *ND2*, *ND3*, *ND4*, *ND4L*, *ND5*, *ND6*]
 - 3 υπομονάδες οξειδάσης του κυτοχρώματος c [*COI*, *COII*, *COIII*]
 - 2 υπομονάδες συνθετάσης του ATP [*ATPase6*, *ATPase8*]
 - 1 υπομονάδα αναγωγάσης του κυτοχρώματος c [*Cytb*]

Για τη δομή και τη λειτουργία των μιτοχονδρίων απαιτείται πλήθος άλλων πρωτεϊνών, οι οποίες στη μεγάλη πλειονότητά τους, κωδικοποιούνται από το πυρηνικό DNA. Σύμφωνα με τον [Wallace \(2005\)](#), συνολικά, μόλις το 5% των μιτοχονδριακών πρωτεϊνών κωδικοποιείται από το αντίστοιχο mtDNA. Όμως, πρόσφατα δεδομένα υποδεικνύουν ότι το ανθρώπινο μιτοχόνδριο περιλαμβάνει 1.100 – 1.400 πρωτεΐνες ([Calvo and Mootha 2010](#)), από τις οποίες μόνο οι 13 κωδικοποιούνται από το mtDNA, δηλαδή ένα ποσοστό γύρω στο 1%. Σε γενικές γραμμές, οι υπόλοιπες μιτοχονδριακές πρωτεΐνες, που λαμβάνουν μέρος στην οξειδωτική φωσφορυλίωση, οι DNA και RNA πολυμεράσες, οι ριβοσωμικές πρωτεΐνες, καθώς και οι απαραίτητοι ρυθμιστικοί παράγοντες -όπως ο μιτοχονδριακός μεταγραφικός παράγοντας A- κωδικοποιούνται από το πυρηνικό DNA και εισάγονται από το κυτταρόπλασμα. Η εισαγωγή αυτών των κυτταροπλασματικών πρωτεϊνών στη μιτοχονδριακή μήτρα γίνεται σε εξειδικευμένες περιοχές, όπου η εσωτερική και η εξωτερική μεμβράνη βρίσκονται σε στενή επαφή ([Wallace 1999](#)).

Στο μιτοχονδριακό γονιδίωμα εντοπίζονται ορισμένες μη κωδικές περιοχές. Στην περίπτωση των σπονδυλοζώων και των εχινόδεσμων, έχει διαπιστωθεί ότι οι περιοχές αυτές έχουν λειτουργικό ρόλο στη ρύθμιση της αντιγραφής και της μεταγραφής του mtDNA. Η μεγαλύτερη από τις μη κωδικές περιοχές του mtDNA ονομάζεται D-loop (displacement loop) ή κύρια ρυθμιστική περιοχή (main control region, CR) ([Wolstenholme 1992](#), [Saccone et al. 1999](#)). Στα θηλαστικά η περιοχή αυτή χαρακτηρίζεται από τριμερή δομή και περιλαμβάνει ρυθμιστικά στοιχεία για την αντιγραφή και τη μεταγραφή του mtDNA ([Chang and Clayton 1985](#), [Stoneking et al. 1991](#), [Stoneking 2000](#)). Στην κύρια ρυθμιστική περιοχή εντοπίζεται το σημείο έναρξης της

αντιγραφής της βαριάς αλυσίδας (O_H) όπως και οι υποκινητές για τη μεταγραφή της βαριάς (heavy strand promoter, HSP) και της ελαφριάς αλυσίδας (light strand promoter, LSP). Σε μια δεύτερη, μικρότερη, μη κωδική περιοχή εντοπίζεται το σημείο έναρξης της αντιγραφής της ελαφριάς αλυσίδας (O_L) (Shadel and Clayton 1997).

α

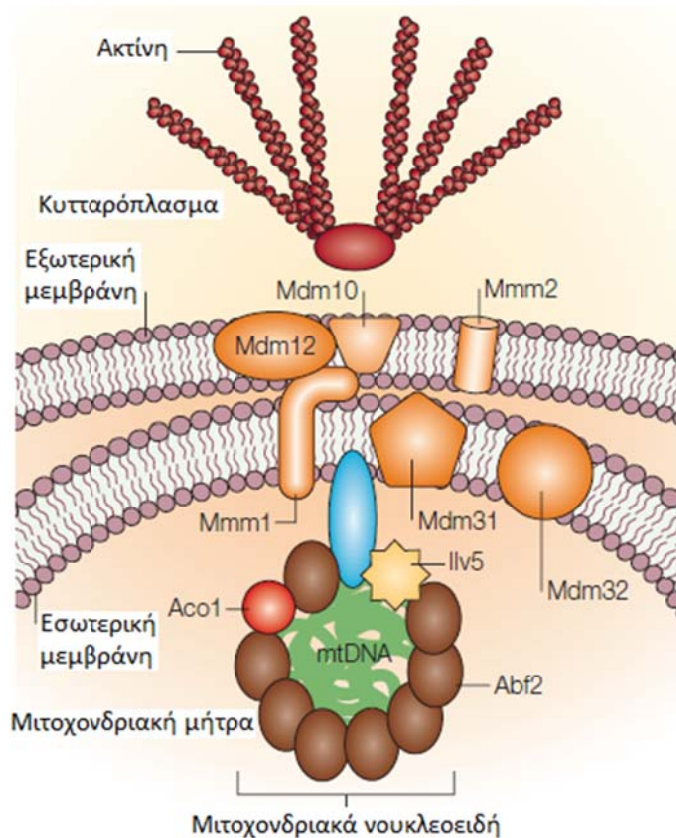


Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως ([Ενότητα 1.1.1](#)), το μιτοχονδριακό DNA θεωρείται ότι έχει προέλθει από ένα ενδοσυμβιωτικό προγονικό α -πρωτεοβακτήριο ([Yang et al. 1985](#)). Εντούτοις, το γενετικό περιεχόμενο των μιτοχονδρίων αποτελεί ένα μικρό κλάσμα σε σχέση με το περιεχόμενο του υποτιθέμενου προγονικού βακτηριακού ενδοσυμβιώτη. Η μείωση του γονιδιακού περιεχομένου του μιτοχονδριακού γονιδιώματος αποτελεί γενική αρχή για όλους τους ευκαρυωτικούς οργανισμούς και αποδίδεται σε δύο διαδικασίες. Η πρώτη αφορά στη βαθμιαία απώλεια γονιδίων που κωδικοποιούσαν βιοσυνθετικές διεργασίες, οι οποίες πλέον μπορούσαν να καλυφθούν με την εισαγωγή μεταβολιτών από το κυτταρόπλασμα του ξενιστή και η δεύτερη αφορά στη μεταφορά και ενσωμάτωση γονιδίων από το μιτοχόνδριο προς τον πυρήνα του ξενιστή ([Gray et al. 1999](#), [Kurland and Andersson 2000](#), [Schneider and Ebert 2004](#)). Ο λόγος για τον οποίο συντελέστηκε αυτή η μεταφορά είναι πιθανότατα η εξελικτική πίεση για την προστασία του DNA από μεταλλαξογένεση μέσα στο μιτοχόνδριο, εφόσον ο ρυθμός μεταλλαξογένεσης, για παράδειγμα, του ανθρώπινου mtDNA είναι 10 – 17 φορές μεγαλύτερος σε σύγκριση με το πυρηνικό DNA ([Wallace 2007](#), [Tuppen et al. 2010](#)).

Υποστηρίζεται ότι το mtDNA έχει εξελιχτεί με τέτοιο τρόπο ώστε το ελάχιστο μέγεθός του να είναι συμβατό με τις λειτουργίες που επιτελούνται σε αυτό. Ο λόγος για τον οποίο τα μιτοχόνδρια εξακολουθούν να διατηρούν ένα μικρό γονιδίωμα που κωδικοποιεί έναν περιορισμένο μόνο αριθμό συστατικών των συμπλόκων της αναπνευστικής αλυσίδας, δεν είναι ξεκάθαρος. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι όλες οι πρωτεΐνες που κωδικοποιούνται από το ανθρώπινο mtDNA είναι τα υδρόφοβα συστατικά των συμπλόκων. Μάλιστα, τα γονίδια *COI* και *Cytb*, που υπάρχουν σε όλα τα πλήρως αλληλουχημένα μιτοχονδριακά γονιδιώματα, είναι τα πιο υδρόφοβα όλων ([Wallace 2007](#)). Συνεπώς, έχει προταθεί ότι η δυσκολία εισαγωγής αυτών των υδρόφοβων πρωτεϊνών κατά μήκος της μεμβράνης, μπορεί να είναι και ο λόγος για τον οποίο οι πρωτεΐνες αυτές εξακολουθούν να εκφράζονται εντός του μιτοχονδρίου. Όσον αφορά το πώς διατηρήθηκε το mtDNA στα μιτοχόνδρια, υπάρχει η πιθανότητα αυτό απλώς να “πάγωσε” στη θέση του μόλις απέκτησε το δικό του γενετικό κώδικα (βλέπε [Ενότητα 1.2.2.3](#)).

Το mtDNA φυτικών κυττάρων είναι πολύ μεγαλύτερο (200.000 μέχρι 2.500.000 ζεύγη βάσεων) και παρουσιάζει μεγαλύτερη ποικιλομορφία σε σχέση με το mtDNA των ζωικών κυττάρων (Εικόνα 1.7). Ακόμη και σε είδη της ίδιας οικογένειας έχουν παρατηρηθεί μέχρι και οκταπλάσιες διαφορές μεγέθους του mtDNA. Το φυτικό mtDNA περιέχει κάποια γονίδια που δεν υπάρχουν σε mtDNA άλλων ειδών (Levings and Brown 1989). Επίσης τα μιτοχονδριακά rRNA είναι σημαντικά μεγαλύτερα σε σχέση με τα αντίστοιχα μόρια στα μιτοχόνδρια των ζωικών κυττάρων και των μυκήτων .

Τα μόρια του μιτοχονδριακού DNA είναι πακεταρισμένα μέσα σε δομές πρωτεϊνικής σύστασης, τα νουκλεοειδή (Εικόνα 1.8).



Εικόνα 1.8. Σχηματική απεικόνιση νουκλεοειδούς που περικλείει το μιτοχονδριακό DNA (mtDNA). Το νουκλεοειδές βρίσκεται σε επαφή με την εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη μέσω πρωτεϊνών, οι οποίες θεωρείται ότι επικοινωνούν με πρωτεΐνες του κυτταροσκελετού (μεταφρασμένο από [Chen and Butow \(2005\)](#)).

Τα νουκλεοειδή συνδέονται με την εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη, ενώ υπάρχουν ενδείξεις ότι μπορεί να συνδέονται, μέσω πρωτεϊνικών συμπλόκων, και με στοιχεία του κυτταροσκελετού (Chen and Butow 2005, Dimmer et al. 2005).

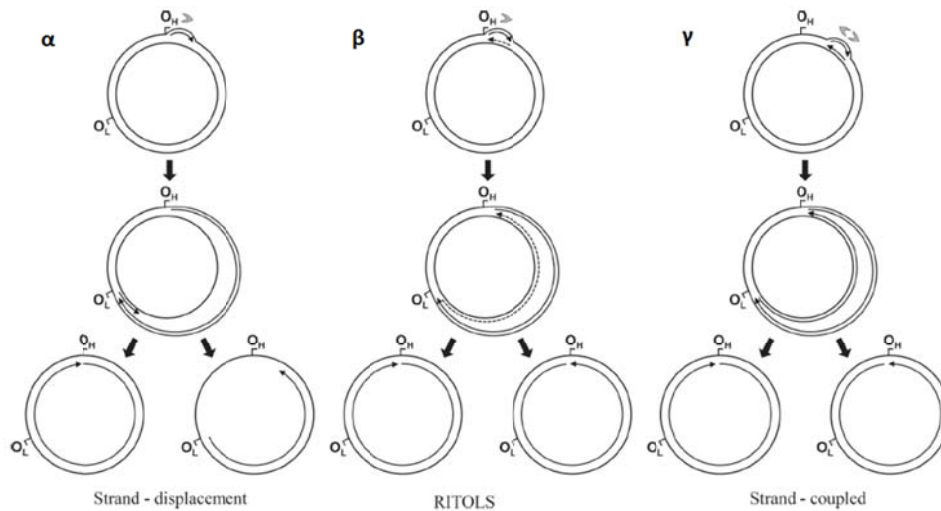
1.2.2 Λειτουργίες του μιτοχονδριακού DNA

1.2.2.1 Αντιγραφή

Οι δύο αλυσίδες του mtDNA διαφέρουν σε ότι αφορά την περιεκτικότητά τους σε G και C, ώστε όταν αποδιαταχθούν και φυγοκεντρηθούν σε CsCl να εμφανίζονται σε δύο ζώνες, η μία βαρύτερη της άλλης. Η μία αλυσίδα είναι πλούσια σε G+T και ονομάζεται H (heavy-βαριά) ενώ η άλλη είναι πλούσια σε C+A και ονομάζεται L (light-ελαφριά) (Wolstenholme 1992). Οι πρώτες μελέτες αντιγραφής του mtDNA έγιναν με παρατήρηση μιτοχονδριακού DNA απομονωμένου με CsCl σε ηλεκτρονικό μικροσκόπιο (Robberson et al. 1972). Με πειράματα που ακολούθησαν την επόμενη δεκαετία έγινε εφικτή η διατύπωση του πρώτου και ίσως επικρατέστερου σήμερα μοντέλου αντιγραφής του μιτοχονδριακού DNA, το οποίο αναφέρεται ως "ασύμμετρο" μοντέλο αντιγραφής ή αντιγραφή με εκτόπιση αλυσίδας (strand asymmetric model ή strand-displacement model) (Clayton 1982, Shadel and Clayton 1997). Σύμφωνα με το μοντέλο αυτό (Εικόνα 1.10α), η αντιγραφή του mtDNA αρχίζει από μία ειδική θέση της βαριάς αλυσίδας (H), που ονομάζεται θέση έναρξης της αντιγραφής της βαριάς αλυσίδας (O_H, Εικόνα 1.9). Αυτό γιατί αρχικά, μόνο η μία από τις προγονικές αλυσίδες (η H αλυσίδα στο μιτοχονδριακό DNA των θηλαστικών) χρησιμοποιείται ως καλούπι για τη σύνθεση μιας νέας αλυσίδας. Το O_H στον άνθρωπο βρίσκεται στην κύρια μη-κωδική / ρυθμιστική περιοχή του mtDNA, που ονομάζεται D-loop, δίπλα σε τρεις εξελικτικά συντηρημένες νουκλεοτιδικές αλληλουχίες, τις CSB1, CSB2 και CSB3 (conserved sequence blocks, Walberg and Clayton 1981, Chang and Clayton 1985). Για την έναρξη της αντιγραφής της βαριάς αλυσίδας είναι απαραίτητο να προηγηθεί η έναρξη της μεταγραφής της ελαφριάς αλυσίδας (L) από τον υποκινητή της μεταγραφής της ελαφριάς αλυσίδας (LSP, Εικόνα 1.9) και τη μιτοχονδριακή RNA πολυμεράση (mtRNApol). Στη συνέχεια γίνεται θραύση του συντιθέμενου RNA σε συγκεκριμένο σημείο, ώστε να δημιουργηθεί το πρωταρχικό τμήμα RNA (RNA primer) για την αντιγραφή του DNA. Η θραύση

Έπειτα η μιτοχονδριακή DNA πολυμεράση γ (polγ) προσδένεται στο O_H και ξεκινάει τη σύνθεση της νέας βαριάς αλυσίδας, εκτοπίζοντας τη συμπληρωματική προγονική αλυσίδα (L αλυσίδα), η οποία παραμένει σε μονόκλωνη κατάσταση. Η εικόνα που έχει το μόριο σε αυτό το στάδιο αποδίδεται με τον όρο D-loop (displacement loop, θηλιά εκτόπισης). Καθώς προχωρεί η σύνθεση της αλυσίδας που είναι συμπληρωματική προς την προγονική H αλυσίδα, μεγαλώνει η θηλιά εκτόπισης της προγονικής L αλυσίδας. Η διαδικασία αυτή συνεχίζεται μέχρι την αποκάλυψη του σημείου έναρξης της μεταγραφής της ελαφριάς αλυσίδας (O_L , [Εικόνα 1.9](#)). Μόλις η αλληλουχία του O_L βρεθεί σε μονόκλωνη κατάσταση αποκτά χαρακτηριστική δομή «μίσχου-θηλιάς», την οποία αναγνωρίζει κάποια DNA πριμάση. Η δημιουργία ενός πρωταρχικού μορίου RNA επιτρέπει την έναρξη της σύνθεσης και της δεύτερης θυγατρικής αλυσίδας (L) από την polγ, προς την αντίθετη κατεύθυνση. Εξ' αιτίας αυτού του μηχανισμού έναρξης, είναι προφανές ότι η σύνθεση της νέας L αλυσίδας τελειώνει μετά τη σύνθεση της νέας H αλυσίδας. Η λήξη της αντιγραφής της βαριάς αλυσίδας σηματοδοτείται από μια αλληλουχία που ονομάζεται TAS (termination-associated sequence, [Doda et al. 1981](#), [Shadel and Clayton 1997](#)) και εντοπίζεται στο τέλος του D-loop. Ο αριθμός των TAS στοιχείων ποικίλλει ανάλογα με το είδος του οργανισμού. Στο ανθρώπινο D-loop εντοπίζεται ένα μόνο TAS ([Doda et al. 1981](#)). Είναι δυνατό η αντιγραφή να μη σταματήσει στην αλληλουχία TAS αλλά να συνεχιστεί κατά μήκος ολόκληρου του μορίου. Η ρύθμιση της σχετικής ισορροπίας μεταξύ των στοιχείων TAS και της πλήρους αντιγραφής της βαριάς αλυσίδας οφείλεται σε trans-παράγοντες που κωδικοποιούνται από τον πυρήνα και αλληλεπιδρούν με τις αλληλουχίες TAS ([Roberti et al. 1998](#), [Madsen et al. 1993](#)). Πιθανότατα η ρύθμιση αυτή αντανακλά τις διαφορετικές απαιτήσεις σε αντίγραφα του mtDNA στους διαφορετικούς κυτταρικούς τύπους. Η διαδικασία της αντιγραφής του mtDNA δεν περιλαμβάνει κομμάτια Okazaki· εν συντομία, η αντιγραφή είναι προς μία κατεύθυνση, συνεχής, ασύμμετρη και ασύγχρονη. Πρόσφατα, το μοντέλο αυτό εμπλουτίστηκε με δεδομένα από μικροσκοπία ατομικής δύναμης που αποκάλυψαν εναλλακτικές θέσεις έναρξης της αντιγραφής της L αλυσίδας ([Brown et al. 2005](#)). Επιπλέον, βιοχημικά δεδομένα έδειξαν ότι η μιτοχονδριακή RNA πολυμεράση μπορεί να δημιουργήσει ένα πρωταρχικό τμήμα RNA συγκεκριμένα στο O_L , το οποίο μπορεί να χρησιμοποιηθεί από τη DNA πολυμεράση γ για την έναρξη της σύνθεσης της ελαφριάς αλυσίδας L

(Fuste et al. 2010). Όπως έχει φανεί άλλωστε και από τα πιο πάνω, οι μηχανισμοί της αντιγραφής και της μεταγραφής του mtDNA θεωρούνται στενά συνδεδεμένοι (Clayton 1992).



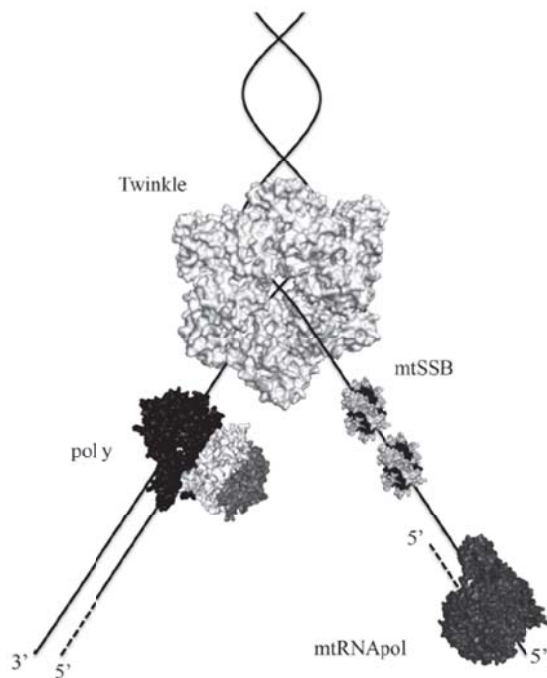
Εικόνα 1.10. Προτεινόμενα μοντέλα της αντιγραφής του mtDNA στα θηλαστικά. **(α)** το πρότυπο της «ασύμμετρης» αντιγραφής ή αντιγραφής με εκτόπιση αλυσίδας (*strand asymmetric* ή *strand-displacement model*). **(β)** αντιγραφή με ενσωμάτωση RNA κατά μήκος της ελαφριάς αλυσίδας (*RNA incorporated throughout the lagging strand - RITOLS*). **(γ)** το πρότυπο της «συμμετρικής» αντιγραφής ή αντιγραφής με σύζευξη αλυσίδας (*strand symmetric* ή *strand-coupled model*). Σε όλα τα μοντέλα, σημειώνονται οι θέσεις O_H και O_L. Τα βέλη που υποδεικνύουν την αντιγραφή του mtDNA ακολουθούν την 5' προς 3' κατεύθυνση· οι συμπαγείς και οι διακεκομμένες γραμμές αντιπροσωπεύουν DNA και RNA αντίστοιχα. Οι γκρι αιχμές βελών υποδηλώνουν τον αριθμό και την κατεύθυνση των διχάλων αντιγραφής που δημιουργούνται στη θέση έναρξης της αντιγραφής, σύμφωνα με το κάθε μοντέλο. Από McKinney and Oliveira (2013).

Το 2000 προτάθηκε από τον Ian Holt (Holt et al. 2000) ένα μοντέλο «συμμετρικής» αντιγραφής ή αντιγραφής με σύζευξη αλυσίδας (*strand symmetric* ή *strand-coupled model*) (Εικόνα 1.10γ), με βάση πρότυπα που παρατηρήθηκαν μετά από ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης δύο διαστάσεων. Σύμφωνα με το μοντέλο αυτό, και οι δύο αλυσίδες του mtDNA αντιγράφονται ταυτόχρονα, η μία συνεχώς και η άλλη με κομμάτια Okazaki. Μάλιστα, σε αυτή την περίπτωση, η αντιγραφή ξεκινάει σε μία ευρεία ζώνη έναρξης, σε μια περιοχή που περιλαμβάνει τα γονίδια *Cytb*, *ND5* και *ND6* του mtDNA των θηλαστικών (και όχι στο O_H) και προχωράει και προς τις δύο

κατευθύνσεις μέχρι τη λήξη της στην περιοχή του D-loop ([Bowmaker et al. 2003](#)). Την ίδια εποχή, προτάθηκε και μια παραλλαγή του μοντέλου της «συμμετρικής» αντιγραφής, το μοντέλο αντιγραφής με ενσωμάτωση RNA κατά μήκος της ελαφριάς αλυσίδας (RNA incorporated throughout the lagging strand - RITOLS). Σύμφωνα με αυτό ([Εικόνα 1.10β](#)), η αντιγραφή του mtDNA ξεκινάει από το D-loop (O_H) και προχωράει προς μία κατεύθυνση συνθέτοντας τη νέα Η αλυσίδα, όπως στην περίπτωση του «ασύμμετρου» μοντέλου, ενώ για τη σύνθεση της ελαφιάς (L) αλυσίδας προηγείται η σύνθεση RNA, το οποίο στη συνέχεια αντικαθίσταται με DNA. Το μοντέλο αυτό υποστηρίζεται από αποτελέσματα πειραμάτων ηλεκτοφόρησης δύο διαστάσεων αλλά και από δεδομένα μικροσκοπίας διέλευσης ηλεκτρονίων και ανοσοκατακρήμνιση χρησιμοποιώντας αντισώματα ειδικά προς υβρίδια DNA/RNA ([Yang et al. 2002](#), [Yasukawa et al. 2006](#), [Pohjoismaki et al. 2010](#)). Τα αποτελέσματα από την ομάδα του Ian Holt και άλλων υποστηρικτών της συμμετρικής αντιγραφής, δεν μπορούν να αποκλείσουν την ύπαρξη της ασύμμετρης αντιγραφής ούτε αποτελούν από μόνα τους απόδειξη για άλλους πιθανούς τρόπους αντιγραφής. Μάλιστα, οι [Brown et al. \(2005\)](#) έδειξαν ότι η ύπαρξη εναλλακτικών θέσεων έναρξης αντιγραφής της ελαφριάς αλυσίδας, καθώς και η ομαδική μετανάστευση των αντιγραφόμενων αλυσίδων DNA κατά την ανάλυση πηκτώματος δύο διαστάσεων, μπορεί να ευθύνονται για το εσφαλμένο συμπέρασμα ότι η συμμετρική αντιγραφή είναι ο κύριος τρόπος αντιγραφής του μιτοχονδριακού DNA.

Εκτός από τη μιτοχονδριακή DNA πολυμεράση (polγ) που είναι το βασικό ένζυμο της αντιγραφής του mtDNA, και τη μιτοχονδριακή RNA πολυμεράση (mtRNApol) που πιθανότατα απαιτείται για τη σύνθεση πρωταρχικών τμημάτων (δράση πριμάσης), στο «αντιγραφόσωμα» του mtDNA συμμετέχει επίσης μια ελικάση, η Twinkle, η οποία αποελίσσει το δίκλωνο mtDNA προς μονόκλωνο καθώς και μία πρωτεΐνη που προσδέεται σε μονόκλωνο μιτοχονδριακό DNA (mtSSB) και το προστατεύει από νουκλεόλυση ([Εικόνα 1.11](#)). Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι το μιτοχονδριακό αντιγραφόσωμα είναι μία «χιμαιρική μηχανή» που αποτελείται από πρωτεΐνες διαφορετικής εξελικτικής προέλευσης. Η πρωτεΐνη Twinkle, η καταλυτική υπομονάδα της polγ (polγ-α) και η mtRNApol έχουν κοινό πρόγονο με τη gr4 πριμάση-ελικάση, τη gr5 DNA πολυμεράση

και τη gp1 RNA πολυμεράση του βακτηριοφάγου T7, αντίστοιχα, ενώ η mtSSB είναι ομόλογη των ομο-τετραμερών πρωτεϊνών SSB των ευβακτηρίων (Shutt and Gray 2006). Η βοηθητική υπομονάδα της polγ (polγ-β) εμφανίζεται αποκλειστικά στα μετάζωα και εξελίχθηκε από τις αμινοακυλο-tRNA συνθετάσες τάξης II των ευβακτηρίων (Fan et al. 1999, 2006). Το πώς αυτές οι πρωτεΐνες με ξεχωριστές λειτουργίες εξελίχθηκαν ώστε να συμμετέχουν στην αντιγραφή του mtDNA δεν είναι ακόμη σαφές, παρόλο που η λειτουργική επανένταξη προγονικών πρωτεϊνών φαίνεται ότι συμβαίνει συχνά στη μιτοχονδριακή ιστορία (Shutt and Gay 2006, Camara et al. 2011).



Εικόνα 1.11. Πρωτεΐνες στη διχάλα αντιγραφής του ανθρώπινου mtDNA. polγ είναι η μιτοχονδριακή DNA πολυμεράση γ. Twinkle είναι η ελικάση που ξετυλίγει το δίκλωνο mtDNA μετατρέποντάς το σε μονόκλωνο. mtSSB είναι η μιτοχονδριακή πρωτεΐνη που προσδένει μονόκλωνο DNA για να το προστατέψει από νουκλεόλυση. mtRNApol είναι η μιτοχονδριακή RNA πολυμεράση που πιθανότατα δρα ως mtDNA πριμάση. Οι συμπαγείς γραμμές αντιπροσωπεύουν DNA, ενώ οι διακεκομμένες γραμμές αντιπροσωπεύουν RNA. Από McKinney and Oliveira (2013).

1.2.2.2 Μεταγραφή και ωρίμανση

Τα γονίδια στο mtDNA μπορεί να εδράζονται, είτε στη μία ή και στις δύο αλυσίδες, επομένως οι θέσεις έναρξης της μεταγραφής μπορεί να είναι μία ή περισσότερες. Κατά τη μεταγραφή, που διεξάγεται κυκλικά γύρω από το mtDNA, δημιουργείται ένα (ή περισσότερα, αναλόγως με τον αριθμό των θέσεων έναρξης της μεταγραφής) πολυσιστρονικό mRNA. Τα tRNA, τα οποία βρίσκονται διάσπαρτα στο mtDNA και κατά συνέπεια μεταγράφονται στο

ενιαίο πολυσιστρονικό mRNA, αναδιπλώνονται στη χαρακτηριστική δομή τους, αποκόπτονται από αυτό και τα μετάγραφα των γονιδίων πολυαδενυλιώνονται. Η δευτεροταγής δομή που αποκτούν τα tRNA στο πρωτογενές μετάγραφο, λειτουργεί ως υπόστρωμα για την ενδονουκλεολυτική δράση της RNase P ή άλλων μορίων RNase και η τομή πραγματοποιείται και στα δύο άκρα του tRNA («tRNA punctuation model», [Ojala et al. 1980, 1981](#), [Montoya et al. 1983](#), [Rossmann et al. 1995](#)). Ο μηχανισμός αυτός είναι συντηρητικός ανάμεσα στα μιτοχονδριακά γονιδιώματα των μεταζώων. Τόσο σε σπονδυλόζωα όσο και σε ασπόνδυλα, σε περιπτώσεις όπου δεν παρεμβάλλεται tRNA ανάμεσα σε πρωτεϊνικά γονίδια, ο ρόλος τους φαίνεται να αντικαθίσταται από πιθανές δευτεροταγείς δομές, που μοιάζουν με tRNA (tRNA-like structures) ή απλώς δομές τύπου «μίσχου-θηλιάς» ([Bibb et al. 1981](#), [Clary and Wolstenholme 1985](#), [Okimoto et al. 1992](#), [Boore and Brown 1994](#), [Hatzoglou et al. 1995](#), [Asakawa et al. 1995](#), [Taanman 1999](#), [Roe et al. 1985](#), [Sasuga et al. 1999](#)). Αυτές οι δευτεροταγείς δομές μπορούν να θεωρηθούν εκφυλισμένα αντίγραφα γονιδίων tRNA ([Cantatore et al. 1987, 1989](#), [De Giorgi and Saccone 1989](#)) και εκτός από διαγονιδιακές περιοχές, παρατηρούνται και σε κωδικές περιοχές γονιδίων. Εξαιρεση στον κανόνα της παραγωγής μονοσιστρονικών μεταγράφων με ενδονουκλεολυτική πέψη, αποτελούν οι περιπτώσεις διιστρινικών μεταγράφων, που έχουν περιγραφεί για τα ζεύγη γονιδίων *ATPase6-ATPase8* και *ND4-ND4L* ([Ojala et al. 1981](#), [De Giorgi et al. 1996](#), [Sasuga et al. 1999](#)).

Η ωρίμανση των tRNA ολοκληρώνεται με την προσθήκη της αλληλουχίας CCA στο 3' άκρο, η οποία καταλύεται από την ATP (CTP)-tRNA νουκλεοτιδική τρανσφεράση ([Rossmann et al. 1995](#)). Η πολυαδενυλίωση των μιτοχονδριακών mRNA πραγματοποιείται από τη μιτοχονδριακή poly(A)-πολυμεράση αμέσως μετά τη θραύση του πρωτογενούς προϊόντος της μεταγραφής ([Rose et al. 1975](#)). Εκτός από τα μιτοχονδριακά mRNA, αδενυλίωση έχει παρατηρηθεί σε rRNA και tRNA. Στα δύο μιτοχονδριακά rRNA, η έκταση της αδενυλίωσης ποικίλλει. Έχει παρατηρηθεί ολιγοαδενυλίωση (δηλαδή προσθήκη το πολύ 10 αδενινών) στον άνθρωπο ([Dubin et al. 1982](#), [Temperley et al. 2010](#)), στον ποντικό ([Van Etten et al. 1983](#)) και στον μπακαλιάρο ([Bakke and Johansen 2002](#), [Coucheron et al. 2011](#)), και πολυαδενυλίωση (προσθήκη πάνω από 10 αδενινών) στον άνθρωπο ([Ojala et al. 1981](#), [Slomovic et al. 2005](#), [Mercer et al. 2011](#)) και στη δροσόφιλα

(Spradling et al. 1977, Berthier et al. 1986, Benkel et al. 1988). Επίσης, έχει παρατηρηθεί και πλήρης απουσία αδενυλίωσης στη δροσόφιλα (Berthier et al. 1986). Έχει προταθεί ότι η ολιγοαδενυλίωση στο 3' άκρο προηγείται της πολυαδενυλίωσης, αλλά δεν είναι ακόμη ξεκάθαρο το πώς γίνεται αυτή η επέκταση (Piwowarski et al. 2003). Σε ορισμένες περιπτώσεις, μιτοχονδριακά γονίδια tRNA που έχουν ατελή 3' άκρα, συμπληρώνονται μετα-μεταγραφικά με πολυαδενυλίωση (Hatzoglou et al. 1995, Yokobori and Pääbo 1995). Ο ρόλος της πολυαδενυλίωσης του 3' άκρου των μεταγράφων, παρότι σημαντικός, δεν έχει ακόμη διασαφηνιστεί (Bobrowicz et al. 2008). Η πολυαδενυλίωση είναι σίγουρα απαραίτητη για τη συμπλήρωση του κωδικονίου λήξης της μετάφρασης όταν το γονίδιο κωδικοποιεί μόνο το πρώτο ή τα δύο πρώτα νουκλεοτίδια του κωδικονίου λήξης (Ojala et al. 1981, Stewart and Beckenbach 2009, Coucheron et al. 2011), αλλά πρόκειται για μια μειοψηφία περιπτώσεων. Υπάρχουν ισχυρές ενδείξεις ότι η πολυαδενυλίωση έχει διπλό ρόλο: από τη μία προωθεί τη σταθερότητα του μεταγράφου και από την άλλη, λειτουργεί ως επισήμανση για την έναρξη της αποικοδόμησης. Ο ρόλος της σταθεροποίησης έχει εδραιωθεί καλά για τα mRNA, όπου είναι απαραίτητος για την αποτελεσματική μετάφραση. Ο ρόλος της αποικοδόμησης έχει επίσης επιβεβαιωθεί για διάφορους τύπους RNA, συμπεριλαμβανομένης της μετα-μεταφραστικής αποικοδόμησης των mRNA (Blum et al. 1999, Bollenbach et al. 2004, Steege 2000).

Αποικοδόμηση RNA

Στα ευκάρια και στα αρχαία, την αποικοδόμηση του RNA αναλαμβάνει ένα πολύ-πρωτεϊνικό σύμπλοκο, γνωστό ως εξώσωμα (exosome). Στα βακτήρια υπάρχει ένα παρόμοιο αλλά απλούστερο σύμπλοκο, γνωστό ως αποικοδομοσώμα (degradosome) (Mitchell et al. 1997, LaCava et al. 2005, Carpousis 2007, Malecki et al. 2007, Rorbach and Minczuk 2012). Τα αποικοδομοσώματα έχουν περιγραφεί στην *Escherichia coli* (Carpousis 2007) καθώς και σε μιτοχόνδρια ζυμομύκητα (Malecki et al. 2007). Εντούτοις, η ύπαρξη μιτοχονδριακών αποικοδομοσωμάτων δεν έχει ακόμη διασαφηνιστεί για την πλειοψηφία των ειδών. Αυτό συμβαίνει επειδή η σύνθεση υπομονάδων των αποικοδομοσωμάτων δεν είναι συντηρητική. Τα κύρια συστατικά τους θεωρείται ότι είναι: μια RNA ελικάση, για το ξετύλιγμα δίκλωνων περιοχών του RNA, μια PNPase (πολυνουκλεοτιδική φωσφορυλάση) και μια 3' → 5' εξωνουκλεάση

(Bobrowicz et al. 2008). Επίσης, μια ενδοριβονουκλεάση (RNase E) θεωρείται μέρος του αποικοδομοσώματος της *E. coli* (O'Hara et al. 1995, Coburn et al. 1999). Όπως αναφέρθηκε πιο πάνω, η απαραίτητη συνθήκη για τη δράση του αποικοδομοσώματος είναι η ύπαρξη μιας poly(A) ουράς, την προσθήκη της οποίας αναλαμβάνει η poly(A) πολυμεράση (PAP), ή η ίδια η PNPase (Slomovic et al. 2005). Ομόλογα συστατικά κάποιων από τα πιο πάνω, έχουν βρεθεί και σε ανθρώπινα μιτοχόνδρια (Shu et al. 2004, Wang et al. 2009), αλλά ο ακριβής τους ρόλος παραμένει άγνωστος (Bobrowicz et al. 2008). Σύμφωνα με την επικρατούσα άποψη, το εξώσωμα ή το αποικοδομόσωμα αλληλεπιδρά με την poly(A) ουρά του πολυαδενυλιωμένου μεταγράφου και προκαλεί μια τομή αριστερά της poly(A) ουράς. Ως αποτέλεσμα, προκύπτουν δύο τμήματα που υπόκεινται σε γρήγορη εξωνουκλεολυτική αποικοδόμηση, αλλά το αριστερό τμήμα μπορεί να πολυαδενυλιωθεί εκ νέου ώστε να ακολουθήσει ένας δεύτερος γύρος της ίδιας διαδικασίας. Με αυτόν τον τρόπο επιτυγχάνεται η πλήρης αποικοδόμηση του RNA (O'Hara et al. 1995, Coburn and Mackie 1999, Dreyfus and Regnier 2002, Slomovic et al. 2005). Αυτή η διαδικασία ευθύνεται για την ύπαρξη μεγάλης ποικιλίας ενδιαμέσων αποικοδόμησης: πολυαδενυλιωμένα μετάγραφα διάφορων μηκών και κομμένα ή πλήρους μήκους μετάγραφα που δεν έχουν ακόμη αδενυλιωθεί ή που οδηγούνται προς αποικοδόμηση χωρίς πολυαδενυλίωση. Όλα αυτά τα είδη έχουν παρατηρηθεί σε ανθρώπινα μιτοχόνδρια (Slomovic et al. 2005). Οι ίδιοι συγγραφείς βρήκαν κομμένα μη-αδενυλιωμένα και πολυαδενυλιωμένα mRNA, rRNA και tRNA μετάγραφα σε ανθρώπινα μιτοχόνδρια, ερμηνεύοντάς τα ως ενδιάμεσα προϊόντα αποικοδόμησης. Επίσης, βρήκαν πολυαδενυλιωμένα RNA κατάλοιπα της κύριας ρυθμιστικής περιοχής (D-loop) του ανθρώπινου mtDNA. Αυτά πιθανότατα να προέκυψαν μετά την αποκοπή από το πρωτογενές μετάγραφο και στη συνέχεια σημάνθηκαν με poly(A) ουρά για αποικοδόμηση, καθώς δεν έχουν κάποιον προφανή λειτουργικό ρόλο στο μιτοχόνδριο. Οι συγγραφείς αναζήτησαν τέτοια απομεινάρια αποικοδόμησης και σε EST (Expressed Sequence Tags) βιβλιοθήκες, που βρίθουν κομμένων πολυαδενυλιωμένων μεταγράφων από κωδικές ή μη-κωδικές περιοχές του μιτοχονδριακού γονιδιώματος.

1.2.2.3 Μετάφραση

Τα μιτοχονδριακά ριβοσώματα βρίσκονται στη μιτοχονδριακή μήτρα, ενώ σε ορισμένες περιπτώσεις συνδέονται και με την εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη. Ο συντελεστής καθίζησης (S) των μιτοχονδριακών ριβοσωμάτων μεταζώων είναι 55S, δηλαδή μικρότερος από τον αντίστοιχο συντελεστή των προκαρυωτικών ριβοσωμάτων, που είναι 70S. Αντιθέτως, τα φυτικά μιτοχονδριακά ριβοσώματα είναι 70S, δηλαδή όσο και τα προκαρυωτικά ριβοσώματα. Από την άλλη, τα ιδιαίτερα, από πολλές απόψεις, μιτοχόνδρια μαστιγοφόρων πρωτοζώων έχουν συντελεστή καθίζησης όμοιο με τα κυτταροπλασματικά μιτοχόνδρια ευκαρυωτικών κυττάρων, δηλαδή 80S (Chi and Suyama 1970, Tait and Knowles 1977, Kitakawa and Isono 1991). Ο μικρότερος συντελεστής καθίζησης των μιτοχονδριακών ριβοσωμάτων των μεταζώων σε σχέση με τα προκαρυωτικά ριβοσώματα, δεν συνεπάγεται και μικρότερο μέγεθός τους. Στην πραγματικότητα, τα μιτοχονδριακά ριβοσώματα των μεταζώων έχουν περίπου την ίδια μάζα με τα βακτηριακά, αλλά περιέχουν σχεδόν τη μισή ποσότητα rRNA και διπλάσια ποσότητα πρωτεϊνών. Αυτή η διαφορετική σύσταση δημιουργεί τη δυσαναλογία των συντελεστών καθίζησης (O'Brien 2003). Για τη συγκρότηση των μιτοχονδριακών ριβοσωμάτων το rRNA (16S – μεγάλης υπομονάδας και 12S – μικρής υπομονάδας) μεταγράφεται από το mtDNA ενώ οι ριβοσωμικές πρωτεΐνες κωδικοποιούνται από το πυρηνικό DNA, συντίθενται στα κυτταροπλασματικά ριβοσώματα και κατόπιν εισέρχονται στα μιτοχόνδρια. Εκτιμάται ότι ο αριθμός πρωτεϊνών σε μιτοχονδριακά ριβοσώματα θηλαστικών ποικίλλει από 85 έως πάνω από 100. Όσον αφορά στα ανθρώπινα μιτοχονδριακά ριβοσώματα, είναι γνωστή η αμινοξική αλληλουχία για 30 πρωτεΐνες της μικρής ριβοσωμικής υπομονάδας και 48 πρωτεΐνες της μεγάλης ριβοσωμικής υπομονάδας. Συνεπώς, ο συνολικός αριθμός των πρωτεϊνών στα ανθρώπινα μιτοχονδριακά ριβοσώματα είναι 78. Φαίνεται ότι τα μιτοχονδριακά ριβοσώματα του ανθρώπου απέκτησαν επιπλέον 34 πρωτεΐνες σε σύγκριση με τους βακτηριακούς προγόνους τους (O'Brien 2003).

Ο γενετικός κώδικας των μιτοχονδρίων

Ο μιτοχονδριακός γενετικός κώδικας διαφέρει συστηματικά από το γενικευμένο και εμφανίζει περιορισμένες διαφορές μεταξύ μεγάλων ταξινομικών μονάδων οργανισμών (Anderson et al. 1981, Wallace 1982, βλέπε Πίνακα Πλαισίου) Το mtDNA κωδικοποιεί 22 tRNA, αριθμός που είναι πολύ κοντά στο απόλυτο ελάχιστο. Υπάρχει ένα tRNA για κάθε αμινοξύ, εκτός από τις περιπτώσεις των αμινοξέων σερίνη και λευκίνη, για τα οποία υπάρχουν δύο tRNA. Κατά συνέπεια το φαινόμενο της αστάθειας, που περιγράφει την αναγνώριση περισσότερων από ένα κωδικονίων από το ίδιο tRNA, αποκτά τη μέγιστη τιμή και αναφέρεται ως υπεραστάθεια (super wobble, Bonitz et al. 1980). Συνεπώς, στο mtDNA η τρίτη βάση ενός κωδικονίου μπορεί να είναι, είτε οποιοδήποτε νουκλεοτίδιο, οπότε η συγκεκριμένη νουκλεοτιδική θέση χαρακτηρίζεται ως τετράκις εκφυλισμένη είτε οποιαδήποτε πουρίνη ή πυριμιδίνη, οπότε η θέση χαρακτηρίζεται ως δις εκφυλισμένη. Λόγω αυτής της ιδιαιτερότητας, ο τυπικός γενετικός κώδικας των μιτοχονδρίων περιλαμβάνει εννέα οικογένειες κωδικονίων με τετράκις εκφυλισμένη τη θέση του τρίτου νουκλεοτιδίου, καθώς και δεκατρία ζεύγη κωδικονίων με δις εκφυλισμένη επίσης την τρίτη νουκλεοτιδική θέση.

Πίνακας πλαισίου: Διαφορές του μιτοχονδριακού γενετικού κώδικα από τον γενικευμένο, σε διάφορες κατηγορίες οργανισμών

Κωδικόνιο	Γενετικός κώδικας πυρήνα	Γενετικός κώδικας μιτοχονδρίων			
		Θηλαστικά	Δροσόφιλα	Ζύμη	Ασπόνδυλα
UGA	ΛΗΞΗ	Θρυπτοφάνη	Θρυπτοφάνη	Θρυπτοφάνη	Θρυπτοφάνη
AGA, AGG	Αργινίνη	ΛΗΞΗ	Σερίνη	Αργινίνη	Σερίνη
AUA	Ισολευκίνη	Μεθειονίνη	Μεθειονίνη	Μεθειονίνη	Μεθειονίνη
AUU	Ισολευκίνη	Μεθειονίνη	Μεθειονίνη	Μεθειονίνη	Ισολευκίνη
CUU, CUC, CUA, CUG	Λευκίνη	Λευκίνη	Λευκίνη	Θρεονίνη	Λευκίνη

Επιπρόσθετα, έχουν διαπιστωθεί και περιπτώσεις κατά τις οποίες χρησιμοποιούνται εναλλακτικά κωδικόνια για την έναρξη της μετάφρασης αντί για τα τυπικά AUA και AUG: για παράδειγμα στη μέλισσα εμφανίζεται το κωδικόνιο AUC (Crozier and Crozier 1993), στα γένη των νηματώδων *Ascaris* και *Caenorhabditis* το UUG, σε πολυπλακοφόρα μαλάκια το GUG (Boore and Brown 1994) όπως, πιθανώς, και στη *Drosophila* (Clary and Wolstenholme 1985, Gadaleta et al. 1988).

Χαρακτηριστικό των μιτοχονδρίων αποτελεί επίσης η παρουσία ειδικού tRNA με φορμυλιωμένη μεθειονίνη (fMet-tRNA) που φέρει το αντικωδικόνιο για την έναρξη της μετάφρασης (Smith and Marcker 1968, Halbreich and Rabinowitz 1971, Lynch and Attardi 1976). Η εναρκτήρια μεθειονίνη φορμυλιώνεται επίσης σε βακτήρια και χλωροπλάστες, όχι όμως στη μεταφραστική μηχανή των γονιδίων του πυρήνα ευκαρυωτικών κυττάρων (Kozak 1983).

1.2.3 Κληρονόμηση

Τα μη πυρηνικά γονιδιώματα μεταβιβάζονται κατά κανόνα μέσω ενός από τους δύο γονείς, του ίδιου φύλου, στις επόμενες γενιές. Η πρώτη άμεση ένδειξη της μονογονεϊκής και μητρικής κληρονομικότητας του mtDNA στα ζώα, εμφανίστηκε το 1972 (Dawid and Blackler 1972). Στα επόμενα χρόνια, το σενάριο της αυστηρά μητρικής κληρονομότητας στα ζώα κέρδισε έδαφος και υποστηρίχθηκε περαιτέρω από μεγάλο αριθμό μελετών οι οποίες απέτυχαν να εντοπίσουν πατρικό mtDNA σε ευρύ φάσμα ειδών. (Hutchison et al. 1974, Hayashi et al. 1978, Kroon et al. 1978, Avise et al. 1979, Francisco et al. 1979, Giles et al. 1980, Reilly and Thomas 1980, Gyllensten et al. 1985).

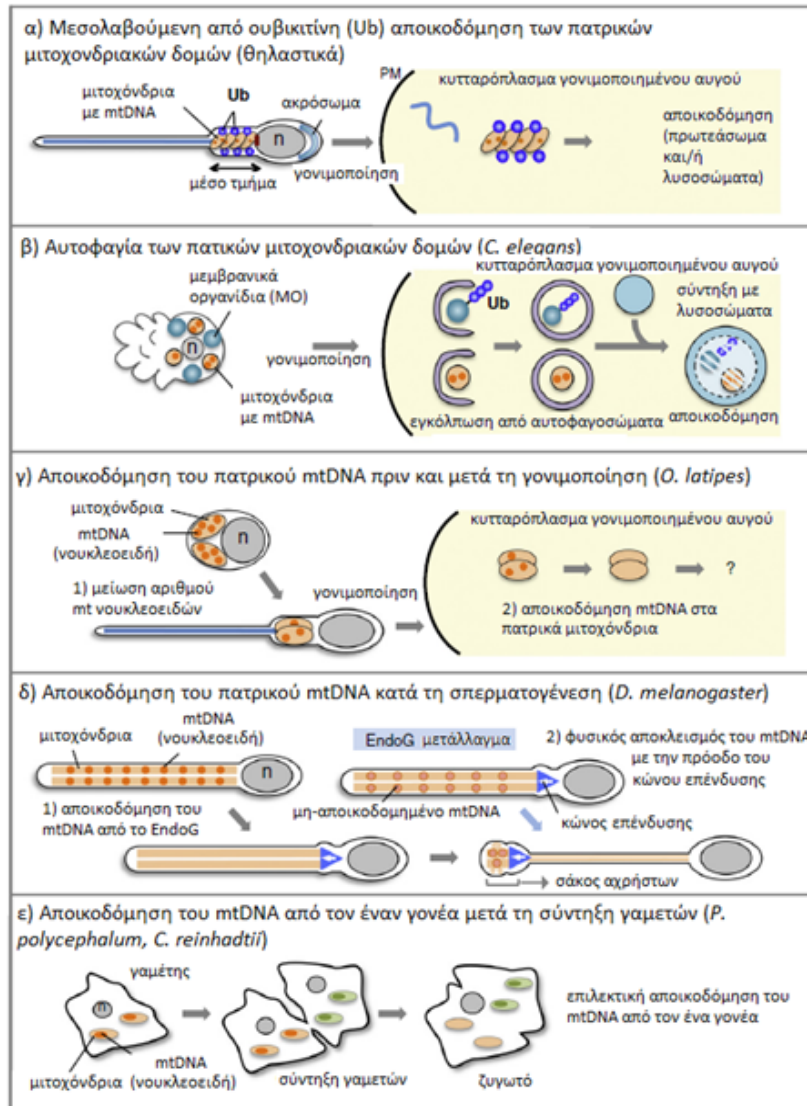
Δύο υποθέσεις έχουν προταθεί για την εξήγηση του μηχανισμού που ευθύνεται για τη μητρική κληρονόμηση του mtDNA. Σύμφωνα με το «μοντέλο της απλής αραιώσης», το πατρικό mtDNA που υπάρχει σε πολύ μικρότερο αριθμό αντιγράφων (στα σπερματοζώαρια υπάρχουν 50–70 αντίγραφα του mtDNA (Hecht et al. 1984, Chen et al. 1995) ενώ στα ωάρια εντοπίζονται 10^5 ή και περισσότερα αντίγραφα του mtDNA (Pikó and Matsumoto 1976, Michaels et al. 1982)), απλά «χάνεται» στοχαστικά στην περίσσεια του mtDNA του ωοκυττάρου και συνεπώς δεν ανιχνεύεται στον απόγονο (Gyllensten et al. 1991). Από την άλλη, στο «μοντέλο της δραστηκής αποικοδόμησης», το πατρικό mtDNA ή τα μιτοχόνδρια αυτά καθαυτά θεωρείται ότι αποικοδομούνται επιλεκτικά, είτε πριν ή μετά τη γονιμοποίηση, για την πρόληψη της μεταβίβασης του πατρικού mtDNA στην επόμενη γενιά. Αρκετές μελέτες που έχουν διεξαχθεί σε διάφορα ζωικά είδη υποστηρίζουν το δεύτερο μοντέλο. Σύμφωνα με τις μελέτες αυτές, διάφορα είδη φαίνεται να χρησιμοποιούν διακριτούς μηχανισμούς για την πρόληψη της κληρονομότητας του πατρικού mtDNA, όπως:

1. Μεσολαβούμενη από ουβικιτίνη αποικοδόμηση των πατρικών μιτοχονδρίων (Εικόνα 1.12α)

Στα θηλαστικά, τα πατρικά μιτοχόνδρια βρίσκονται πακεταρισμένα στο μέσο τμήμα του σπερματοζωαρίου, που είναι η δομή που συνδέει την κεφαλή με την ουρά του. Αν και στα κινέζικα χάμστερ (*Cricetulus griseus*) έχει δειχθεί ότι το μέσο τμήμα μαζί με τα πατρικά μιτοχόνδρια και την ουρά δεν εισέρχονται στο κυτταρόπλασμα του ωοκυττάρου κατά τη γονιμοποίηση (Pickworth and Change 1969, Yanagimachi et al. 1983), στα περισσότερα θηλαστικά, συμπεριλαμβανομένου του ανθρώπου, τα πατρικά μιτοχόνδρια και το mtDNA τους εισέρχονται στο ωοκύτταρο και καταστρέφονται εκεί με κάποιους ειδο-ειδικούς/ιστο-ειδικούς μηχανισμούς κατά τα πρώιμα στάδια της εμβρυογένεσης (Kaneda et al. 1995, Shitara et al. 2000). Πιο συγκεκριμένα, έχει διαπιστωθεί ότι τα πατρικά μιτοχόνδρια του σπερματοζωαρίου σημαίνονται με ουβικιτίνη κατά τη διαδικασία της σπερματογένεσης (Sutovsky et al. 1999). Μετά τη γονιμοποίηση, τα ουβικιτινυλιωμένα πατρικά μιτοχόνδρια φαίνεται πως αποικοδομούνται από τα πρωτεασώματα και/ή λυσοσώματα. (Sutovsky et al. 2000, 2003).

2. Αυτοφαγία πατρικών μιτοχονδρίων (Εικόνα 1.12β)

Στο νηματώδη σκώληκα *C. elegans*, τα σπερματοζωάρια δεν διαθέτουν ουρά και συνεπώς, ούτε μέσο τμήμα, διαθέτουν όμως 50-70 μιτοχόνδρια με τη μορφή κόκκων γύρω από τον πυρήνα (L'Hernault 2006). Τα μιτοχόνδρια του σπέρματος εισέρχονται στο ωοκύτταρο κατά τη γονιμοποίηση αλλά καταστρέφονται άμεσα με αυτοφαγία. Η αυτοφαγία είναι μία διαδικασία κατά την οποία αυτοφαγοσωμικές μεμβράνες διαχωρίζουν κυτταροπλασματικά συστατικά (πρωτεΐνες και οργανίδια) από το υπόλοιπο κυτταρόπλασμα και οδηγούν το περιεχόμενό τους στα λυσοσώματα για αποικοδόμηση (Nakatogawa et al. 2009, Mizushima and Komatsu 2011). Έχει επίσης δειχθεί ότι σε σωματικά κύτταρα η αυτοφαγία διευκολύνει την επιλεκτική αποικοδόμηση μιτοχονδρίων υπό συγκεκριμένες συνθήκες για τη διατήρηση της ποιότητας ή της ποσότητας των μιτοχονδρίων (μιτοφαγία) (Youle and Narendra 2011).



Εικόνα 1.12. Μηχανισμοί εξάλειψης του πατρικού mtDNA. **(α)** Στα θηλαστικά, τα πατρικά μιτοχόνδρια σημαίνονται με ουβικιτίνη κατά τη σπερματογένεση και αποικοδομούνται από τα πρωτεασώματα και/ή από τα λυσοσώματα μετά τη γονιμοποίηση. **(β)** Στο *Caenorhabditis elegans*, τα πατρικά μιτοχόνδρια και μεμβρανώδη οργανίδια (MO) εγκολλώνονται από αυτοφαγοσώματα και ακολουθεί λυσοσωμική αποικοδόμηση μετά τη γονιμοποίηση. **(γ)** Στο *Oryzias latipes*, ο αριθμός των mtDNA νουκλεοειδών μειώνεται κατά τη σπερματογένεση. Μετά τη γονιμοποίηση, το πατρικό mtDNA αποικοδομείται περαιτέρω, πριν την καταστροφή της μιτοχονδριακής δομής. **(δ)** Στο *Drosophila melanogaster*, το πατρικό mtDNA αποικοδομείται από το EndoG κατά τη σπερματογένεση. Σε μεταλλάγματα EndoG, τα εναπομείναντα mtDNA νουκλεοειδή εξαλείφονται από τους κώνους επένδυσης (investment cones) και τοποθετούνται σε σάκο ακρήστων. **(ε)** Στα ισογαμετικά είδη *Physarum polycephalum* και *Chlamydomonas reinhardtii*, το mtDNA από τον γονέα 1 αποικοδομείται επιλεκτικά στα μιτοχόνδρια μετά τη σύντηξη γαμετών. Μεταφρασμένο από [Sato and Sato 2013](#).

Συνεπώς, στο *C. elegans*, τα πατρικά μιτοχόνδρια εγκολπώνονται από αυτοφαγοσώματα και έπειτα παραδίδονται στα λυσοσώματα για αποικοδόμηση κατά τα πρώιμα στάδια της εμβρυογένεσης. Με αυτοφαγία απομακρύνονται επίσης προερχόμενα από το σπέρμα μεμβρανώδη οργανίδια (ΜΟ), που είναι εξειδικευμένα κυστίδια προερχόμενα από το Ενδοπλασματικό Δίκτυο ή τη συσκευή Golgi, απαραίτητα για τη γονιμότητα του σπέρματος. Τα αυτοφαγοσώματα φαίνεται πως είναι ικανά να διαχωρίζουν τα πατρικά μιτοχόνδρια από τα μητρικά, που είναι άφθονα στο γονιμοποιημένο έμβρυο, και εγκολπώνουν επιλεκτικά μόνο τα πατρικά μιτοχόνδρια (Sato and Sato 2011, Al Rawi et al. 2011). Ο μηχανισμός αναγνώρισης των πατρικών μιτοχονδρίων δεν είναι γνωστός, αλλά υπάρχουν υπόνοιες για εμπλοκή της ουβικιτινυλίωσης ως επισήμανσης για επιλεκτική αυτοφαγία, συμπεριλαμβανομένης της μιτοφαγίας, όπως συμβαίνει στα θηλαστικά (Mizushima and Komatsu 2011). Παρόλο που στα πατρικά μιτοχόνδρια του *C. elegans* δεν έχει παρατηρηθεί ουβικιτινυλίωση, τα ΜΟ του σπέρματος ουβικιτινυλιώνονται τόσο πριν όσο και μετά τη γονιμοποίηση, πράγμα που σημαίνει ότι ίσως αυτή η ουβικιτινυλίωση να στοχοποιεί τα ΜΟ για αυτοφαγική αποικοδόμηση (Sato and Sato 2011).

3. Αποικοδόμηση πατρικού mtDNA πριν την καταστροφή της μιτοχονδριακής δομής (Εικόνα 1.12γ, Εικόνα 1.12δ)

Σε ένα μικρό ψάρι, το *Oryzias latipes*, η εξάλειψη του πατρικού mtDNA από το κυτταρόπλασμα του αυγού επιτυγχάνεται με 2 βήματα (Nishimura et al. 2006). Πρώτα, ο αριθμός των πατρικών mtDNA νουκλεοειδών (δομές που περιέχουν DNA και σχετιζόμενες πρωτεΐνες) μειώνεται σταδιακά κατά τη σπερματογένεση. Περίπου 50 mtDNA νουκλεοειδή παραμένουν στο κυτταρόπλασμα στο στάδιο της σφαιρικής σπεματίδας, αλλά ο αριθμός των mtDNA νουκλεοειδών μειώνεται στα 10 στο ώριμο σπέρμα. Μετά τη γονιμοποίηση, πραγματοποιείται πλήρης αποικοδόμηση του πατρικού mtDNA πριν την καταστροφή της δομής των πατρικών μιτοχονδρίων (Εικόνα 1.12γ). Ωστόσο δεν έχει ταυτοποιηθεί ακόμη η νουκλεάση που είναι υπεύθυνη για αυτή την αποικοδόμηση.

Στη φρουτόμυγα *Drosophila melanogaster*, οι σπερματίδες αλλάζουν μορφή καθώς ωριμάζουν κατά τη σπερματογένεση. Σε σπερματίδες

πρώιμου σταδίου, το mtDNA ανιχνεύεται στο nebenkern, που είναι ένα σφαιρικό συσσωμάτωμα μιτοχονδρίων. Κατά το σχηματισμό της ουράς των σπερματίδων, τα μιτοχόνδρια συντήκονται το ένα με το άλλο για το σχηματισμό 2 επιμηκών μιτοχονδρίων (πάνω από 1.800 μm) κατά μήκος του ακρονήματος μικροσωληνίσκων. Αρχικά, πολλά mtDNA νουκλεοειδή ανιχνεύονται στα επιμήκη μιτοχόνδρια, αλλά αυτά εξαφανίζονται σταδιακά. Τελικά το πατρικό mtDNA απουσιάζει σχεδόν πλήρως από το ώριμο σπέρμα. (Εικόνα 1.12δ, DeLuca and O'Farrell 2012). Η ενδονουκλεάση που είναι κατά πάσα πιθανότητα υπεύθυνη για την αποικοδόμηση του mtDNA είναι η Ενδονουκλεάση G (EndoG).

4. Αποικοδόμηση του mtDNA από τον ένα γονέα μετά τη σύντηξη γαμετών (Εικόνα 1.12ε)

Στο βλεννομόκητα *Physarum polycephalum*, οι γαμέτες έχουν ίδιο μέγεθος. Σε αυτόν τον οργανισμό μία απλοειδής μυξαμοιβάδα έχει πάνω από 13 γαμετικούς τύπους και ζευγαρώνει με διάφορους γαμετικούς τύπους για το σχηματισμό διπλοειδών ζυγωτών. Στις 39 από τις 60 διασταυρώσεις μεταξύ αυτών των απλοειδών τύπων, επιβεβαιώθηκε η μονογονεϊκή κληρονομία του mtDNA. Σε τέτοια ζυγωτά, τα mtDNA νουκλεοειδή στα μιτοχόνδρια του ενός μόνο γονέα αποικοδομούνται επιλεκτικά περίπου 3 ώρες μετά τη σύντηξη των γαμετών. Οι μιτοχονδριακές δομές που χάνουν τα mtDNA τους, εξαλείφονται τελικά από το κυτταρόπλασμα του ζυγωτού 60 ώρες μετά τη σύζευξη, με κάποιον άγνωστο μηχανισμό (Moriyama and Kawano 2003).

Στο μονοκύτταρο χλωροφύκος *Chlamydomonas reinhardtii*, το χλωροπλαστικό DNA (cpDNA) κληρονομείται από τον θετικό τύπο γαμέτη (mt^+) ενώ το mtDNA κληρονομείται από τον αρνητικό τύπο γαμέτη (mt^-). Εντός μίας ώρας μετά τη σύζευξη αυτών των γαμετών, το cpDNA αποικοδομείται επιλεκτικά στους mt^- χλωροπλάστες των ζυγωτών και οι mt^- χλωροπλάστες χωρίς cpDNA συντήκονται με τους mt^+ χλωροπλάστες (Sager and Lane 1972, Kuroiwa et al. 1982). Σε αντίθεση με την άμεση αποικοδόμηση του cpDNA, το mtDNA και των δύο γονέων ανιχνεύεται σε πρώιμα ζυγωτά. Μετά την επαγωγή μείωσης από το φως, το mt^+ mtDNA εξαλείφεται επιλεκτικά από τα ζυγωτά, και μόνο το mt^- mtDNA κληρονομείται (Nakamura et al. 2003, Aoyama et al. 2006).

Ο λόγος για τον οποίο υπάρχουν μηχανισμοί που αποτρέπουν τη μεταβίβαση του πατρικού mtDNA δεν είναι πλήρως κατανοητός. Οι [Bromham et al. \(2003\)](#) αναφέρουν δυο πιθανούς λόγους. Η πρώτη και πιο πιθανή εξήγηση, είναι η αποτροπή της εγωιστικής συμπεριφοράς από ανταγωνιζόμενα mtDNA ([Hastings 1992](#)). Εναλλακτικά, θα μπορούσε να είναι ένας τρόπος προσαρμογής στην ανισογαμία, η οποία αποτρέπει την είσοδο στο αυγό του mtDNA του σπέρματος, το οποίο έχει πιθανόν υποστεί βλάβες από την έντονη αναπνευστική λειτουργία ([Allen 1996](#)). Πιο συγκεκριμένα, τα μιτοχόνδρια των σπερματοζωαρίων, πρέπει να παράγουν μεγάλα ποσά ενέργειας για την κάλυψη των ενεργειακών αναγκών που προκύπτουν λόγω της κινητικότητας των τελευταίων. Όμως κατά την οξειδωτική φωσφορυλίωση, ως παραπροϊόν, παράγονται ενεργές ρίζες οξυγόνου (ROS), οι οποίες προκαλούν μεταλλάξεις στο DNA. Προφανώς, μεγαλύτερες θα είναι οι επιπτώσεις στο mtDNA, εφόσον αυτό βρίσκεται μέσα στο μιτοχόνδριο, στο οποίο «εγκλωβίζονται» και οι ROS. Θεωρείται λοιπόν, ότι λόγω έντονης οξειδωτικής φωσφορυλίωσης και συνεπώς παραγωγής μεγάλων ποσοτήτων ROS, το mtDNA των σπερματοζωαρίων μπορεί να υφίσταται πολλές μεταλλαγές. Επομένως, η μητρική κληρονομία αποτρέπει τη μεταβίβαση σε επόμενες γενιές ενός mtDNA που φέρει πολλές μεταλλαγές. Σε κάθε περίπτωση, η μονογονεϊκή κληρονομία μπορεί να είναι ένας μηχανισμός διατήρησης της ομοπλασμίας του κυτταροπλασματικού DNA ([Sato and Sato 2013](#)).

Η καθολικότητα του κανόνα της Αυστηρής Μητρικής Κληρονομίας (SMI – Strict Maternal Inheritance) του mtDNA έχει τεθεί υπό αμφισβήτηση ([Birky 2001](#), [Korpelainen 2004](#)). Οι βασικότερες εξαιρέσεις του κανόνα αφορούν είδη τα οποία αναπαράγονται κυρίως αφυλετικά ([Xu et al. 2005](#)). Περιστασιακά, έχουν αναφερθεί περιπτώσεις κατά τις οποίες έχει διαπιστωθεί περιορισμένη πατρική κληρονομία του mtDNA σε ασπόνδυλα και σε σπονδυλόζωα (*Drosophila melanogaster*: [Kondo et al. 1992](#), *Homo sapiens*: [Schwartz and Vissing 2002](#), [Bromham et al. 2003](#), *Mus musculus*: [Gyllensten et al. 1991](#), [Shitara et al. 1998](#), *Bos taurus*: [Steinborn et al. 1998](#), *Ovis aries*: [Zhao et al. 2001](#), *Engraulis encrasicolus*: [Magoulas and Zouros 1993](#), *Parus major*: [Kvist et al. 2003](#), κλπ). Εντούτοις οι περιπτώσεις αυτές ερμηνεύονται ως «διαρροές» του πατρικού μιτοχονδριακού DNA ([Korpelainen 2004](#)). Η μόνη περίπτωση εκτεταμένης και συστηματικής

μεταβίβασης του πατρικού μιτοχονδριακού DNA στα μετάζωα παρατηρείται σε ορισμένες οικογένειες δίθυρων μαλακίων, τα οποία διαθέτουν ένα ξεχωριστό σύστημα κληρονομής γνωστό ως διπλή μονογονεϊκή κληρονομικότητα (ΔΜΚ). Η ΔΜΚ θα αναλυθεί περαιτέρω στη επόμενη ενότητα, εφόσον αποτέλεσε αντικείμενο μελέτης της παρούσας διδακτορικής διατριβής.

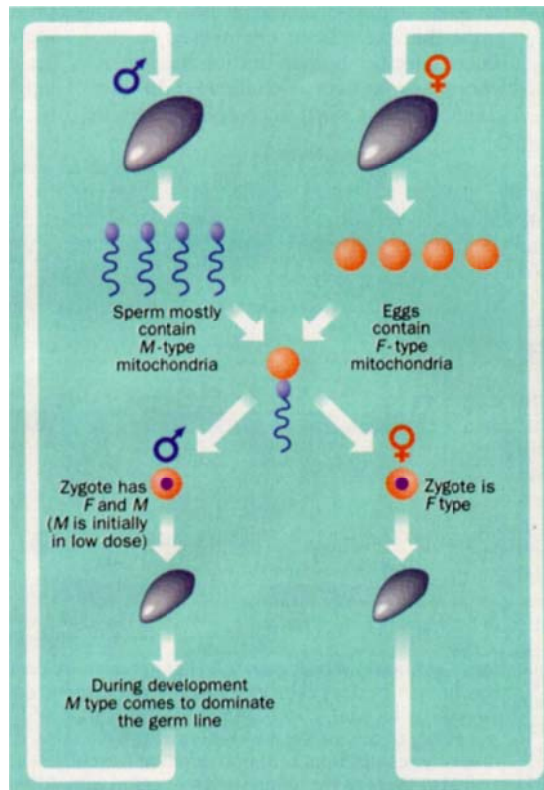
1.3 Διπλή Μονογονεϊκή Κληρονομικότητα (ΔΜΚ)

1.3.1 Ανακάλυψη

Δεδομένης της οικουμενικότητας του κανόνα της μονογονεϊκής μεταβίβασης του οργανιδιακού DNA στα μετάζωα, η ανακάλυψη ότι σε πειραματικές διασταυρώσεις στο μύδι *Mytilus edulis*, μεγάλο μέρος των απογόνων περιείχαν mtDNA και των δυο γονέων αποτέλεσε έκπληξη (Zouros et al. 1992). Σε προηγούμενη μελέτη παρατηρήθηκε ότι η ετεροπλασμία είναι κοινή σε πληθυσμούς του είδους αυτού και ότι τα περιστατικά ετεροπλασμίας ήταν περισσότερα στα αρσενικά άτομα. (Fisher and Skibinski 1990). Η ετεροπλασμία είναι γνωστή από πολλά ζωικά είδη, αλλά η επίδραση του φύλου στη συχνότητα εμφάνισής της είναι μια σχετικά πρόσφατη παρατήρηση. Μια δεύτερη έρευνα δεν εξέτασε την ετεροπλασμία σε σχέση με το φύλο, αλλά αντί αυτού εστίασε στο μέγεθος της μοριακής διαφοροποίησης ανάμεσα στα μόρια, για την οποία ένα άτομο ήταν ετεροπλασμικό (Hoeh et al. 1991). Το μέγεθος αυτό ήταν ασυνήθιστα μεγάλο (πάνω από 20%) και δεν μπορούσε να εξηγηθεί με σταδιακή συσσώρευση μεταλλαγών στα δυο γονιδιώματα, αλλά με περίπτωση διγονεϊκής κληρονομής. Φαινόταν πιο λογικό να υποτεθεί ότι τα δύο μόρια στο ίδιο άτομο προέρχονταν από δυο προϋπάρχουσες γραμμές που διαφοροποιούνταν για πολύ καιρό. Όλες αυτές οι παρατηρήσεις οδήγησαν στην υπόθεση ότι η διγονεϊκή κληρονομικότητα ήταν κάτι κοινό στα μύδια αλλά για κάποιο λόγο, ήταν πιο κοινό στα αρσενικά παρά στα θηλυκά.

Ένα μεγάλο μέρος του προβληματισμού αυτού επιλύθηκε με τις μελέτες των Skibinski et al. (1994a) και Zouros et al. (1994a). Οι πρώτοι συγγραφείς εξέτασαν το περιεχόμενο σε mtDNA των σωματικών ιστών αρσενικών και θηλυκών ατόμων καθώς και των αρσενικών και θηλυκών

γονάδων. Παρατήρησαν ότι τα αρσενικά περιείχαν το mtDNA των θηλυκών (τύπος F) αλλά περιείχαν επιπλέον ένα άλλο μιτοχονδριακό γονιδίωμα το οποίο δεν υπήρχε στα θηλυκά (τύπος M). Η θηλυκή γονάδα περιείχε τον τύπο F, αλλά η αρσενική περιέργως περιείχε τον τύπο M. Για να εξηγηθεί η ομοπλασμία των θηλυκών και η ετεροπλασμία των αρσενικών έπρεπε να υποτεθεί ότι το mtDNA του σπέρματος δεν μεταδιδόταν στις κόρες ενός ζεύγους, αλλά μεταδιδόταν στους γιους. Οι δεύτεροι συγγραφείς παρείχαν άμεσες αποδείξεις αυτής της υπόθεσης. Δημιούργησαν πειραματικές διασταυρώσεις στις οποίες τα τρία γονεϊκά μιτοχονδριακά γονιδιώματα, το ένα από τον θηλυκό γονέα και τα άλλα δύο από τον αρσενικό γονέα μπορούσαν να διακριθούν το ένα από το άλλο. Μπορούσαν ακόμη να αναγνωρίσουν το γονιδίωμα που ο αρσενικός γονέας είχε κληρονομήσει από τον πατέρα του. Όταν κατέγραψαν το φύλο και το γονότυπο των απογόνων αυτών των διασταυρώσεων παρατήρησαν ότι σχεδόν χωρίς καμία εξαίρεση, όλοι οι θηλυκοί απόγονοι κληρονόμησαν το μοναδικό γονιδίωμα της μητέρας, ενώ όλοι οι αρσενικοί απόγονοι κληρονόμησαν δύο γονιδιώματα: το μητρικό και το πατρικό γονιδίωμα. Το μητρικό γονιδίωμα του πατέρα (F) δεν μεταβιβάστηκε σε κανέναν απόγονο, αρσενικό ή θηλυκό. Αυτό το σύστημα μεταβίβασης του mtDNA αρχικά φάνηκε να παραβιάζει τον κανόνα της μονογονεϊκής κληρονόμησης, αφού το ένα φύλο, το αρσενικό, λαμβάνει mtDNA και από τους δύο γονείς και είναι συνεπώς υποχρεωτικά ετεροπλασμικό. Στο επίπεδο του αρσενικού μυδιού η κληρονόμηση του mtDNA είναι πράγματι διγονεϊκή. Η παράβαση ωστόσο εξαφανίζεται εάν συνειδητοποιήσει κανείς ότι στα μύδια συνυπάρχουν δυο ανεξάρτητα διαχωριζόμενα mtDNA γονιδιώματα. Το F μεταβιβάζεται από τις μητέρες και στα δύο φύλα, αλλά μεταβιβάζεται στην επόμενη γενιά μόνο μέσω των θηλυκών, ακριβώς όπως στο κλασικό μοντέλο της μητρικής κληρονόμησης που είναι κοινό στο ζωικό βασίλειο. Το M μεταβιβάζεται από τους πατέρες μόνο στους γιους. Επομένως και τα δύο γονιδιώματα κληρονομούνται μονογονεϊκά, το καθένα μέσω διαφορετικού φύλου (Εικόνα 1.13). Για κάθε γονιδίωμα ισχύει ο κανόνας της μονογονεϊκής κληρονόμησης, απλά στα μύδια λειτουργεί μέσω δυο οδών. Για το λόγο αυτό, το φαινόμενο ονομάστηκε «Διπλή Μονογονεϊκή Κληρονομικότητα» (ΔΜΚ) – “Doubly Uniparental Inheritance” (DUI) (Zouros et al. 1994b, Skibinski et al. 1994b).



Εικόνα 1.13 Το φαινόμενο της Διπλής Μονογονεϊκής Κληρονομικότητας του mtDNA στα μύδια. Το ζυγωτό περιέχει τον τύπο F από το ωάριο και τον τύπο M από το σπερματοζώαριο. Ο τύπος που θα επικρατήσει στα γενετικά κύτταρα του αναπτυσσόμενου ατόμου εξαρτάται από το φύλο του. Τα ενήλικα θηλυκά άτομα εμφανίζονται ομοπλασμικά ως προς τον τύπο F, ενώ τα αρσενικά ετεροπλασμικά για τους δύο τύπους mtDNA (ο τύπος F επικρατεί στους σωματικούς ιστούς και ο τύπος M στα σπερματοζώαρια). (από [Hurst and Hoekstra 1994](#))

ΔΜΚ έχει βρεθεί σε πάνω από 50 είδη διθύρων μαλακίων ([Theologidis et al. 2008](#), [Doucet-Beaupre et al. 2010](#)) που ανήκουν σε τρεις τάξεις: Mytiloidea (μύδια της θάλασσας), Veneroidea (χτένια) και Unionoidea (μύδια του γλυκού νερού). Πρόσφατες ενδείξεις ετεροπλασμίας ([Boyle and Etter 2013](#)) μαρτυρούν την ύπαρξη ΔΜΚ σε μία ακόμη τάξη (Nuculanoida). Ακολουθεί η ταξινομική κατάταξη σύμφωνα με τη βάση Taxonomy database του NCBI, των ευρύτερων βαθμίδων στις οποίες ανήκουν τα είδη με ΔΜΚ. Σκιασμένες είναι οι ταξινομικές βαθμίδες που περιέχουν οργανισμούς με ΔΜΚ.

Bivalvia (κλάση)

- **Anomalodesmata**
- **Heteroconchia** (υποκλάση)
 - **Euheterodonta**
 - **Myoida**
 - **Veneroidea** (τάξη)
 - **Arcticoidea**
 - **Astartoidea**
 - **Cardioidea**
 - **Carditoidea**
 - **Chamoidea**
 - **Corbiculoidea**
 - **Crassatelloidea**
 - **Cyamoidea**
 - **Cyrenoidea**
 - **Dreissenoidea**
 - **Galeommatoidea**
 - **Gastrochaenoidea**
 - **Glossoidea**
 - **Lucinoidea**
 - **Mactroidea** (υπεροικογένεια)
 - **Solenoidea** (υπεροικογένεια)
 - **Tellinoidea** (υπεροικογένεια)
 - **Veneroidea** (υπεροικογένεια)
 - **unclassified Veneroidea**
- **Palaeoheterodonta** (υποκλάση)
 - **Trigonoidea**
 - **Unionoidea** (τάξη)
 - **Muteloidea**
 - **Unionoidea** (υπεροικογένεια)
- **Protobranchia** (υποκλάση)
 - **Nuculanoidea** (τάξη)
 - **Nuculoidea**
 - **Solemyoidea**
 - **unclassified Protobranchia**
- **Pteriomorpha** (υποκλάση)
 - **Arcoida**
 - **Limoida**
 - **Mytiloidea** (τάξη)
 - **Mytiloidea** (υπεροικογένεια)
 - **unclassified Mytiloidea**
 - **Ostreoida**
 - **Pectinoidea**
 - **Pterioidea**
 - **unclassified Pteriomorpha**
- **unclassified Bivalvia**
- **environmental samples**

1.3.2 Τι είναι γνωστό...

1.3.2.1 ...σε επίπεδο DNA

Πριν την ανακάλυψη της ΔΜΚ, οι Hoffman et al. (1992) δημοσίευσαν μια σχεδόν πλήρη αλληλουχία του mtDNA του *Mytilus edulis*. Αργότερα αποκαλύφθηκε ότι πρόκειται για το μιτοχονδριακό γονιδίωμα τύπου F του είδους αυτού. Στα επόμενα χρόνια κατατέθηκαν τόσο μερικές όσο και οι πλήρεις (Πίνακας 1.1) αλληλουχίες μιτοχονδριακών γονιδιωμάτων F και M από πολλά είδη των τριών τάξεων με ΔΜΚ.

Πίνακας 1.1: Όλες οι κατατεθειμένες στη GenBank πλήρεις αλληλουχίες μιτοχονδριακών γονιδιωμάτων ειδών με ΔΜΚ (Μάιος 2015)

Οικογένεια	Είδος	Τύπος	Accession No	Αναφορά
Mytilidae	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	F	AY497292	Mizi et al. 2005, Revision 12 Mar 2012
		F	FJ890849	Burzyński and Śmietanka 2009
		M	AY363687	Mizi et al. 2005, Revision 12 Mar 2012
		M	FJ890850	Burzyński and Śmietanka 2009
		C	DQ399833	Venetis et al. 2007
<i>Mytilus edulis</i>	F	AY484747	Hoffman et al. 1992, Boore et al. 2004	
	F	DQ198231 ^α	Zbawicka et al. 2007	
	F	KM192128 ^α	Zbawicka et al. 2014	
	M	AY823623	Breton et al. 2006	
	M	AY823624	Breton et al. 2006	
	M	DQ198225 ^α	Zbawicka et al. 2007	
	M	KM192129 ^α	Zbawicka et al. 2014	
<i>Mytilus trossulus</i>	F	AY823625	Breton et al. 2006	
	F	GU936625	Zbawicka et al. 2010	
	F	HM462080	Śmietanka et al. 2010	
	F	KM192133	Zbawicka et al. 2014	
	M	GU936627	Zbawicka et al. 2010	
	M	GU936626	Zbawicka et al. 2010	
	M	HM462081	Śmietanka et al. 2010	
	M	GQ438250	Kousathanas et al., αδημοσίευτο	
	M ^β	KM192124	Zbawicka et al. 2014	
	M ^β	KM192126	Zbawicka et al. 2014	
	M ^β	KM192127	Zbawicka et al. 2014	
	M ^β	KM192128	Zbawicka et al. 2014	
	M ^β	KM192131	Zbawicka et al. 2014	
	M ^β	KM192134	Zbawicka et al. 2014	

	<i>Mytilus californianus</i>	F	GQ527172	αδημοσίευτο
		F	JX486124	Beagley and Wolstenholme, αδημοσ.
		M	GQ527173	αδημοσίευτο
		M	JX486123	Beagley and Wolstenholme, αδημοσ.
	<i>Musculista senhousia</i>	F	GU001953	Passamonti et al. 2011
		M	GU001954	Passamonti et al. 2011
Unionidae	<i>Venustaconcha ellipsiformis</i>	F	FJ809753	Doucet-Beaupre et al. 2010
		M	FJ809752	Doucet-Beaupre et al. 2010
	<i>Pyganodon grandis</i>	F	FJ809754	Doucet-Beaupre et al. 2010
		M	FJ809755	Doucet-Beaupre et al. 2010
	<i>Inversidens (ή Unio) japonensis</i>	F	AB055625	Okazaki and Ueshima, αδημοσίευτο
		M	AB055624	Okazaki and Ueshima, αδημοσίευτο
	<i>Quadrula quadrula</i>	F	FJ809750	Doucet-Beaupre et al. 2010
		M	FJ809751	Doucet-Beaupre et al. 2010
	<i>Lampsilis ornata</i>	F	AY365193	Serb and Lydeard 2003
	<i>Hyriopsis cumingii</i>	F	FJ529186	Zheng and Li, αδημοσίευτο
		F	KM393224	Wei et al. 2014
		M?	HM347668	Jiang et al., αδημοσίευτο
	<i>Hyriopsis schlegelii</i>	F	HQ641406	Li et al., αδημοσίευτο
		M	HQ641407	Li et al. , αδημοσίευτο
	<i>Lamprotula gottschei</i>	F	KJ018924	He et al. 2014
	<i>Lamprotula tortuosa</i>	F	KC109779	Wang et al. 2013
	<i>Arconaia lanceolata</i>	F	KJ144818	Wang et al. 2014a
	<i>Anodonta lucida</i>	F	KF667529	Song et al. 2014
	<i>Lanceolaria grayana</i>	F	KJ495725	Wang et al. 2014b
	<i>Solenaia carinatus</i>	F	KC848654	Huang et al. 2013
		M	KC848655	Huang et al. 2013
	<i>Unio pictorum</i>	F	HM014130	Soroka et al. 2010
		F	HM014131	Soroka et al. 2010
		F	HM014132	Soroka et al. 2010
		F	HM014133	Soroka et al. 2010
		F	HM014134	Soroka et al. 2010
	<i>Cristaria plicata</i>	F	FJ986302	Jiang et al. 2010
		F	GU944476	Lee et al. 2012
		F	KM233451	Wang et al. 2014c

<i>Anodonta anatina</i>	M	KF030962	Soroka and Burzyński 2014	
	M	KF030963	Soroka and Burzyński 2014	
	F	KF030964	Soroka and Burzyński 2015	
	F	KF030965	Soroka and Burzyński 2015	
	F	KF030966	Soroka and Burzyński 2015	
	F	KF030967	Soroka and Burzyński 2015	
	F	KF030968	Soroka and Burzyński 2015	
<i>Utterbackia peninsularis</i>	F	HM856636	Breton et al. 2011b	
	M	HM856635	Breton et al. 2011b	
<i>Anodonta woodiana</i>	F	HQ283344	Soroka 2010	
	F	HQ283345	Soroka 2010	
	F	HQ283346	Soroka 2010	
	F	HQ283347	Soroka 2010	
	F	HQ283348	Soroka 2010	
Veneridae	<i>Ruditapes philippinarum</i>	F	AB065375	Okazaki and Ueshima, δημοσίευτο
	(πρώην <i>Venerupis</i>)	M	AB065374	Okazaki and Ueshima, δημοσίευτο

^α Αυτή η αλληλουχία προέρχεται από άτομο *M. trossulus* αλλά είναι τύπου *M. edulis* (βλέπε κείμενο).

^β Αυτές οι αλληλουχίες είναι αρρενοποιημένες (βλέπε κείμενο), και προέκυψαν όταν σε μια αλληλουχία τύπου F εισήχθη με ανασυνδυασμό ένα τμήμα της Κύριας Ρυθμιστικής Περιοχής (CR) τύπου M. Επομένως πλέον μεταβιβάζονται μέσω της πατρικής γραμμής όπως τα τυπικά M γονιδιώματα.

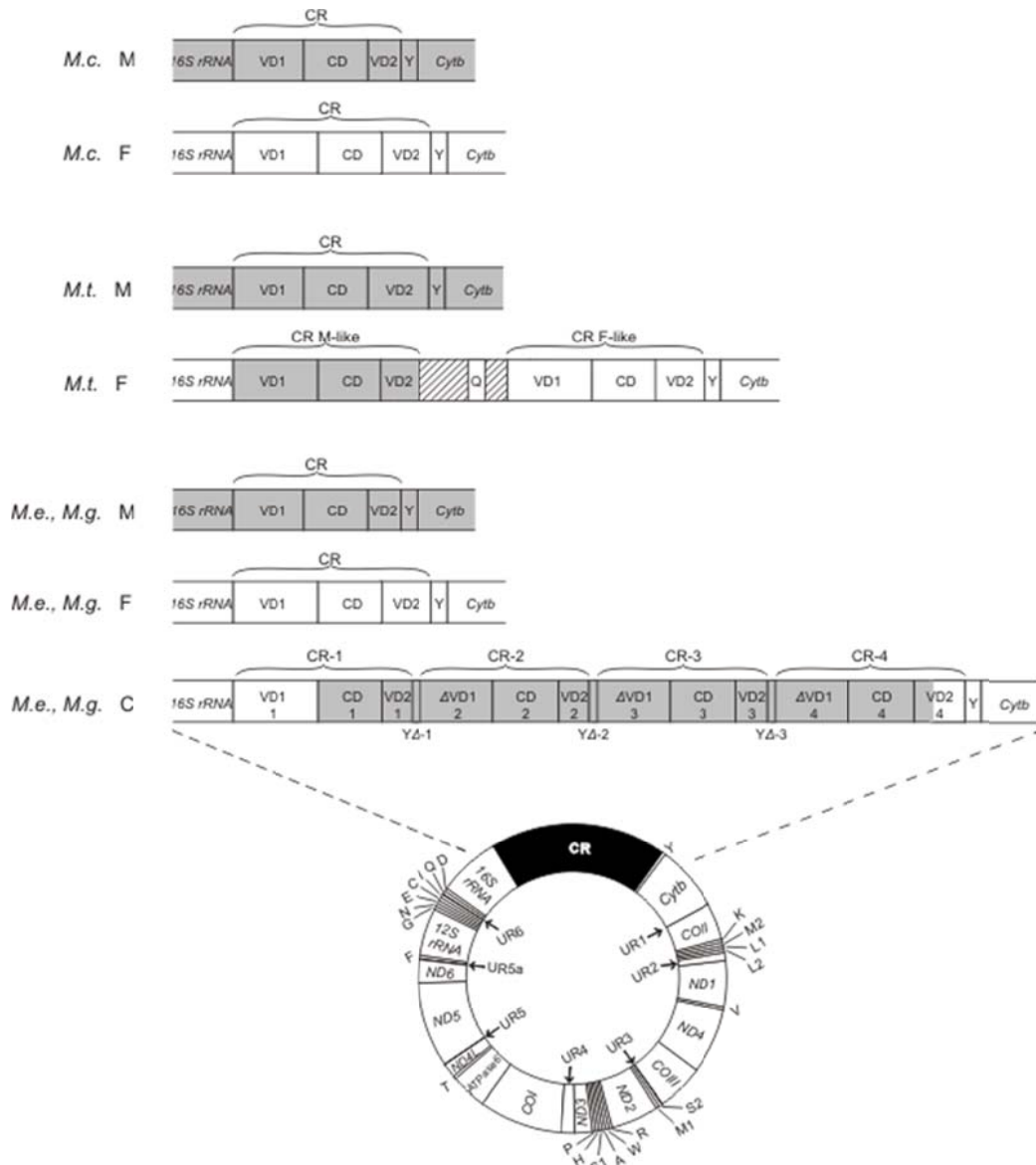
Ενδοειδικά, οι τύποι F και M κάθε είδους παρουσιάζουν ίδια γονιδιακή οργάνωση. Συγκρίσεις των γονιδιωμάτων F και M, έδειξαν άλλοτε μεγάλη νουκλεοτιδική απόκλιση εντός είδους (π.χ. στην οικογένεια των Unionidae) και άλλοτε μικρή (π.χ. σε κάποια είδη του γένους *Mytilus*). Τα γονίδια που κωδικοποιούν είναι: δύο rRNA (12S rRNA ή *l-rRNA* και 16S rRNA ή *s-rRNA*), 23 tRNA (υπάρχει ένα επιπλέον *tRNA^{met}*, δηλαδή στο σύνολο δύο) και 12 ή 13 πολυπεπτίδια που κωδικοποιούν υπομονάδες συμπλόκων της αναπνευστικής αλυσίδας. Αβεβαιότητα υπάρχει ως προς το γονίδιο *ATPase8*, καθώς επειδή εμφανίζει μεγάλη νουκλεοτιδική ετερογένεια μεταξύ διάφορων ειδών μεταζώων, δεν έχει ανευρεθεί με βεβαιότητα στα γονιδιώματα F και M κάποιων ειδών.

Πιο συγκεκριμένα:

- **στα Unionidae**, τα περισσότερα γονιδιώματα φέρουν αλληλουχία γονιδίου *ATPase8*. Εξάιρεση αποτελεί π.χ. το γονιδίωμα M του

Pyganodon grandis. Σε όλα τα mtDNA γονιδιώματα που έχουν αλληλουχηθεί, τα ίδια έντεκα γονίδια κωδικοποιούνται από τη μία αλυσίδα, ενώ τα υπόλοιπα γονίδια, από την άλλη αλυσίδα. Η γονιδιακή οργάνωση είναι συντηρητική στις περισσότερες περιπτώσεις (Breton et al. 2009, Doucet-Beaupré et al. 2010). Οι μη κωδικές περιοχές σε αυτά τα mtDNA ποικίλλουν σε αριθμό από 22 έως 33 και έχουν σε γενικές γραμμές μικρό μέγεθος. Ένα σημαντικό χαρακτηριστικό των μιτοχονδριακών γονιδιωμάτων των Unionidae, είναι μια επέκταση στο 3' άκρο του γονιδίου *COII* στα γονιδιώματα τύπου M. Η επέκταση ποικίλλει μεταξύ των ειδών από 177 έως 192 κωδικόνια (με εξαίρεση το είδος *Potamilus purpuratus*, όπου έχει μήκος 48 κωδικόνια) και συσσωρεύει μη-συνώνυμες υποκαταστάσεις με πολύ μεγαλύτερο ρυθμό από ότι το υπόλοιπο γονίδιο (Curole and Kocher 2002, 2005). Η αμινοξική διαφορά μεταξύ γονιδιωμάτων F και M του ίδιου είδους στα Unionidae είναι περίπου 51%, που αποτελεί τη μεγαλύτερη γνωστή απόκλιση F και M στο ίδιο είδος.

- **στα Veneridae**, η πλήρης αλληλουχία γονιδιωμάτων F και M σε είδος με ΔΜΚ είναι γνωστή μόνο στο είδος *Ruditapes philippinarum*. Με βάση τις αλληλουχίες αυτές προκύπτει ότι όλα τα γονίδια κωδικοποιούνται από τη μία εκ των δύο αλυσίδων του mtDNA και ότι δεν υπάρχει η ειδική επέκταση στο 3' άκρο του γονιδίου *COII* στο γονιδίωμα M, αλλά αντίθετα υπάρχει στο γονιδίωμα F. Επίσης, και τα δύο γονιδιώματα φέρουν το γονίδιο *ATPase8*. Η αμινοξική διαφορά μεταξύ γονιδιωμάτων F και M είναι 34%.
- **στα Mytilidae**, η ΔΜΚ έχει εντοπιστεί σε διάφορα γένη (*Geukensia*, *Brachidontes*, *Muscullista*, *Mytilus*). Το πιο καλά μελετημένο από αυτά είναι το γένος *Mytilus*. Είναι γνωστές οι πλήρεις αλληλουχίες F και M τεσσάρων ειδών του γένους αυτού [*M. edulis*, *M. galloprovincialis*, *M. trossulus*, *M. californianus* (Πίνακας 1.1)], από τις οποίες μπορούν να εξαχθούν τα ακόλουθα συμπεράσματα: (α) Τα γονιδιώματα F και M κάθε είδους έχουν την ίδια γονιδιακή οργάνωση (Εικόνα 1.14) και όλα τα πρωτεϊνικά και RNA γονίδια κωδικοποιούνται από την ίδια αλυσίδα (την επονομαζόμενη «βαριά» αλυσίδα – H).



Εικόνα 1.14. Γονιδιακή οργάνωση τυπικού μιτοχονδριακού γονιδιώματος του γένους *Mytilus*. Ακολουθείται η τυπική ονοματολογία για γονίδια πρωτεϊνών, rRNA και tRNA. Το «UR» συμβολίζει μικρές περιοχές άγνωστης λειτουργίας. Οι περιοχές αυτές ποικίλλουν μεταξύ των διάφορων γονιδιωμάτων. Το UR2 μπορεί να περιέχει τμήμα του γονιδίου ND1 και το UR4 μπορεί να περιέχει το γονίδιο ATPase 8. Παρουσιάζεται με λεπτομέρεια η δομή της κύριας ρυθμιστικής περιοχής (CR) των γονιδιωμάτων F (με άσπρο) και M (με γκρι) τεσσάρων ειδών του γένους: *M.e.*, *M.g.* *M.t.*, *M.c.*: *Mytilus edulis*, *Mytilus galloprovincialis*, *Mytilus trossulus*, *Mytilus californianus*. Το CR σε όλες τις περιπτώσεις εκτός του γονιδιώματος F του *M. trossulus*, έχει τριμερή δομή. Αποτελείται από μια συντηρητική περιοχή (CD) και δύο μεταβλητές περιοχές (VD1 και VD2) αριστερά και δεξιά αυτής, αντίστοιχα. Στην περίπτωση του γονιδιώματος F του *M. trossulus*, το CR παρουσιάζει μια σύνθετη δομή και περιέχει ένα όμοιο προς M CR (M-like CR), παρόμοιο με το CR του γονιδιώματος M του *M. trossulus* και ένα όμοιο προς F CR (F-like CR), παρόμοιο με το CR του γονιδιώματος F του *M. edulis*. Τα δύο CR διαχωρίζονται από μια αλληλουχία με ψευδογονίδια tRNA και ένα λειτουργικό κατά πάσα πιθανότητα tRNA^{glu}. Το γονιδίωμα C των *M.edulis*/*M. galloprovincialis* είναι ένα «αρρενοποιημένο» γονιδίωμα: μεταβιβάζεται μέσω του σπέρματος, παρόλο που το μεγαλύτερο μέρος της αλληλουχίας του είναι τύπου F. Το CR του είναι επίσης σύνθετο και αποτελείται από μια σειρά από διαδοχικές επαναλήψεις CR τύπου M, ενσωματωμένες στο CR ενός γονιδιώματος F. Τροποποιημένο από [Zouros \(2013\)](#).

(β) υπάρχουν διφορούμενες απόψεις όσον αφορά το γονίδιο *ATPase8*, στα είδη αυτά. Σύμφωνα με τις αρχικές μελέτες αλληλούχησης (Hoffman et al. 1992, Mizi et al. 2005), το γονίδιο θεωρήθηκε ότι απουσιάζει από τα μιτοχondριακά γονιδιώματα των *Mytilus*. Μεταγενέστερες έρευνες όμως, βασισμένες κυρίως σε *in silico* ανάλυση πολλών αλληλουχιών mtDNA, υποδεικνύουν τη θέση του γονιδίου αυτού τόσο στο F όσο και στο M (Smietanka and Burzynski 2010, Breton et al. 2010). (γ) υπάρχουν διάσπαρτες μικρές μη-κωδικές περιοχές ανάμεσα στα γονίδια και μία μεγάλη μη-κωδική περιοχή μεταξύ των γονιδίων *16S rRNA* και *tRNA^{tyr}*. Η περιοχή αυτή βρέθηκε ότι περιέχει μοτίβα πολύ όμοια με στοιχεία της κύριας ρυθμιστικής περιοχής θηλαστικών και αχινού, που παίζουν συγκεκριμένο ρόλο στην αντιγραφή και μεταγραφή του mtDNA (Cao et al. 2004a). Συνεπώς, αυτή η μη-κωδική περιοχή των γονιδιωμάτων F και M του *Mytilus* ονομάστηκε κύρια ρυθμιστική περιοχή (control region-CR). Το CR των γονιδιωμάτων F και M του *M. edulis* και *M. galloprovincialis* (τα οποία είναι αδελφά είδη και έχουν παρόμοιες αλληλουχίες mtDNA), έχει μήκος ~900 – 1.200 bp και έχει τριμερή δομή. Το μεσαίο τμήμα (CD) (~350 bp), είναι αρκετά συντηρητικό μεταξύ F και M, με διαφορά μικρότερη από 2%. Το τμήμα αριστερά του CD, ονομάζεται «πρώτη μεταβλητή περιοχή» (VD1) (~500 – 660 bp) και αποτελεί την πιο μεταβλητή περιοχή των δύο γονιδιωμάτων, τόσο σε μέγεθος όσο και σε αλληλουχία, με διαφορά πάνω από 49%. Δεξιά του CD υπάρχει άλλη μια μικρότερη μεταβλητή περιοχή (VD2) που διαφέρει κατά 24% μεταξύ F και M. Παρόμοια τριμερή δομή έχουν και τα γονιδιώματα M και F του *M. californianus*, καθώς και το γονιδίωμα M του *M. trossulus*, αν και διαειδικά διαφέρουν σε μεγάλο βαθμό οι αλληλουχίες τους, ειδικότερα των περιοχών VD1 και VD2. Το γονιδίωμα F του *M. trossulus* διαφέρει καθότι έχει σύνθετη δομή. Αποτελείται από ένα όμοιο προς M CR (M-like CR) που είναι παρόμοιο με το CR του γονιδιώματος M του *M. trossulus* και ένα όμοιο προς F CR (F-like CR), που είναι παρόμοιο με το CR του γονιδιώματος F του *M. edulis*. Μεταξύ των δύο αυτών CR παρεμβάλλεται μια σειρά από ψευδογονίδια tRNA αλλά και ένα λειτουργικό *tRNA^{gln}*. Το σύνθετο αυτό CR έχει προφανώς προκύψει με ανασυνδυασμό (Cao et al. 2004a). Ομοίως με ανασυνδυασμό έχει προκύψει και ένα άλλο

σύνθετο γονιδίωμα *M. edulis*/*M. galloprovincialis* που έχει ανακαλυφθεί, το επονομαζόμενο C, το οποίο κληρονομείται πατρικά. Στο CR του γονιδιώματος C υπάρχουν διαδοχικές επαναλήψεις CR γονιδιώματος M που έχουν ενσωματωθεί σε ένα CR τύπου F. Επίσης, όλη η υπόλοιπη αλληλουχία του C είναι τύπου F, πράγμα που το καθιστά «αρρενοποιημένο» (Venetis et al. 2007) (βλέπε Ενότητα 1.3.2.2).

Αρρενοποίηση

Σε φυσικούς πληθυσμούς *M. edulis*, *M. galloprovincialis* και *M. trossulus* παρατηρούνται αρσενικά άτομα, τα οποία δεν εμφανίζουν την τυπική εικόνα αναφορικά με το μιτοχondριακό τους DNA. Αυτά τα μη-τυπικά αρσενικά φαίνεται ότι στερούνται γονιδιώματος M και εμφανίζονται σαν ομοπ्लाσμικά για έναν απλότυπο F ή σαν ετεροπ्लाσμικά για δύο διαφορετικούς απλότυπους F (Hoeh et al. 1997, Saavedra et al. 1997, Quesada et al. 1999, Ladoukakis et al. 2002). Με βάση τις παρατηρήσεις αυτές προτάθηκε η υπόθεση της «αρρενοποίησης» ή της αναστροφής του τρόπου μεταβίβασης του mtDNA, σύμφωνα με την οποία τα γονιδιώματα τύπου F είναι δυνατό να αλλάξουν ρόλο και να εισβάλουν στην πατρική γραμμή κληρονόμησης (από το σπέρμα) αντικαθιστώντας τα M. Οι Hoeh et al. (1996) ονόμασαν το φαινόμενο αυτό «αρρενοποίηση» για να τονιστεί ότι σε τέτοιες περιπτώσεις, ένα μιτοχondριακό γονιδίωμα που λειτουργούσε ως μητρικά κληρονομούμενο (F), μετατράπηκε σε ένα λειτουργικό πατρικά κληρονομούμενο (M) γονιδίωμα. Η υπόθεση ότι τα αρρενοποιημένα γονιδιώματα ήταν απλά γονιδιώματα F με ανάστροφη πορεία κληρονόμησης απεδείχθη λανθασμένη όταν παρατηρήθηκε ότι τα αρρενοποιημένα γονιδιώματα διαφέρουν από τα τυπικά γονιδιώματα F στην κύρια ρυθμιστική περιοχή τους (CR). Το μέγεθος του CR ποικίλλει ελάχιστα μεταξύ των τυπικών γονιδιωμάτων F των *M. edulis*/*M. galloprovincialis* (Cao et al. 2004b). Επίσης, ένας μεγάλος αριθμός μορίων τύπου F με πολύ μεταβλητό μέγεθος CR απομονώθηκε από αρσενικά ενός πληθυσμού *Mytilus* της Βαλτικής (Burzyński et al. 2003, Burzyński et al. 2006). Πρόκειται για έναν πληθυσμό στον οποίο το πυρηνικό DNA περιέχει στοιχεία από *M. trossulus* και *M. edulis*, αλλά τα γονιδιώματα F και M τους είναι τύπου *M. edulis* (Riginos and Cunningham 2005, Zbawicka et al. 2007)

(βλέπε και [υποσημείωση Πίνακα 1.1](#)). Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι τα CR αυτών των μη-τυπικών γονιδιωμάτων ποικίλλει όχι μόνο σε μέγεθος αλλά και στη σύνθεση: κάποια είναι F/M μωσαϊκά που περιέχουν τμήματα CR του τυπικού γονιδιώματος F και του τυπικού M. Οι μελέτες αυτές έδειξαν ότι επρόκειτο για αρρενοποιημένα γονιδιώματα και ότι η αναδιοργάνωση του CR που περιελάμβανε την ενσωμάτωση αλληλουχιών από το CR του γονιδιώματος M ήταν απαραίτητη για την αρρενοποίησή τους. Δεδομένα υπέρ της υπόθεσης «αρρενοποίησης» υπάρχουν, μέχρι σήμερα, μόνο για τα είδη του γένους *Mytilus*.

Ένα άλλο είδος με ΔΜΚ στην οικογένεια Mytilidae για το οποίο έχει αποκτηθεί η πλήρης αλληλουχία F και M, είναι το *Musculista senhousia* ([Passamonti 2007](#), [Passamonti et al. 2011](#)). Τα γονιδιώματα αυτά διαφέρουν αρκετά και από πολλές απόψεις από τα γονιδιώματα των *Mytilus*. Πιο συγκεκριμένα, έχουν διαφορετική γονιδιακή οργάνωση και περισσότερες και μεγαλύτερες περιοχές άγνωστης λειτουργίας. Οι κύριες διαφορές μεταξύ των γονιδιωμάτων F και M του *M. senhousia* είναι το μέγεθος του γονιδίου *16S rRNA* και η παρουσία ενός δεύτερου γονιδίου *COII* στο γονιδίωμα M, το οποίο μάλιστα φέρει χαρακτηριστική επέκταση – ουρά 120 bp, που έχει παρατηρηθεί και σε γονιδιώματα των Unionidae ([βλέπε πιο πάνω](#)). Επίσης, η μεγάλη μη-κωδική περιοχή του γονιδιώματος F είναι αρκετά μεγαλύτερη από την αντίστοιχη περιοχή στο M, ενώ οι εσωτερικές δομές αυτών των περιοχών είναι πολύ διαφορετικές από τις αντίστοιχες στο *Mytilus*. Αυτές οι μεγάλες διαφορές μεταξύ των γονιδιωμάτων από διαφορετικά είδη, αλλά από την ίδια οικογένεια, αποτελούν σημαντική ένδειξη ότι τα μιτοχονδριακά γονιδιώματα των ειδών με ΔΜΚ υπόκεινται σε πολύ πιο δραστικές αλλαγές και με πολύ μεγαλύτερο ρυθμό από ότι τα γονιδιώματα των ειδών με αυστηρά μητρική κληρονομία ([Zouros 2013](#)). Ένα άλλο αξιοσημείωτο εύρημα ήταν η ανακάλυψη ενός ανοιχτού πλαισίου ανάγνωσης (ORF) στο γονιδίωμα F του *M. edulis*, το οποίο δεν αντιστοιχεί σε κανένα γνωστό μιτοχονδριακό γονίδιο. Το ORF αυτό αποτελείται από 111 κωδικόνια και σύμφωνα με τους [Hoffman et al. \(1992\)](#) που το ανακάλυψαν, θεωρήθηκε μη-κωδικό, αν και αφέθηκε ανοιχτό το

ενδεχόμενο να ισχύει το αντίθετο. Σχεδόν μια δεκαετία αργότερα, οι [Breton et al. \(2011a\)](#), αναφέρθηκαν στο ίδιο ORF, το οποίο ωστόσο περιέγραψαν ως μεγέθους 163 κωδικονίων. Εκτός αυτού, οι συγγραφείς εντόπισαν με *in silico* αναλύσεις, παρόμοιο ORF σε ομόλογα τμήματα των γονιδιωμάτων F των *M. trossulus*, *M. californianus* καθώς και στα *Mytilus coruscus* και *Musculista senhousia*, τους πιο μακρινούς συγγενείς των πρώτων. Τα ORF αυτά βρίσκονται στο VD1 του CR και συνεπώς έχουν μεγάλες αποκλίσεις μεταξύ των ειδών. Το μήκος τους ποικίλλει από 121 έως 163 κωδικόνια ([Zouros 2013](#)). Πρόσφατα, οι [Milani et al. \(2013\)](#) εντόπισαν ORF και στο VD1 του γονιδιώματος M των ειδών *M. edulis*, *M. galloprovincialis*, *M. trossulus* και *M. californianus*, το οποίο όμως παρουσιάζει σημαντικές διαφορές τόσο στη νουκλεοτιδική αλληλουχία όσο και στο μήκος, ακόμα και μεταξύ ατόμων του ίδιου είδους. Ο ρόλος που έχει προταθεί για αυτά τα ORF είναι η εμπλοκή τους στη φυλο-ειδική κληρονομηση των γονιδιωμάτων F και M.

1.3.2.2 ...σε επίπεδο RNA

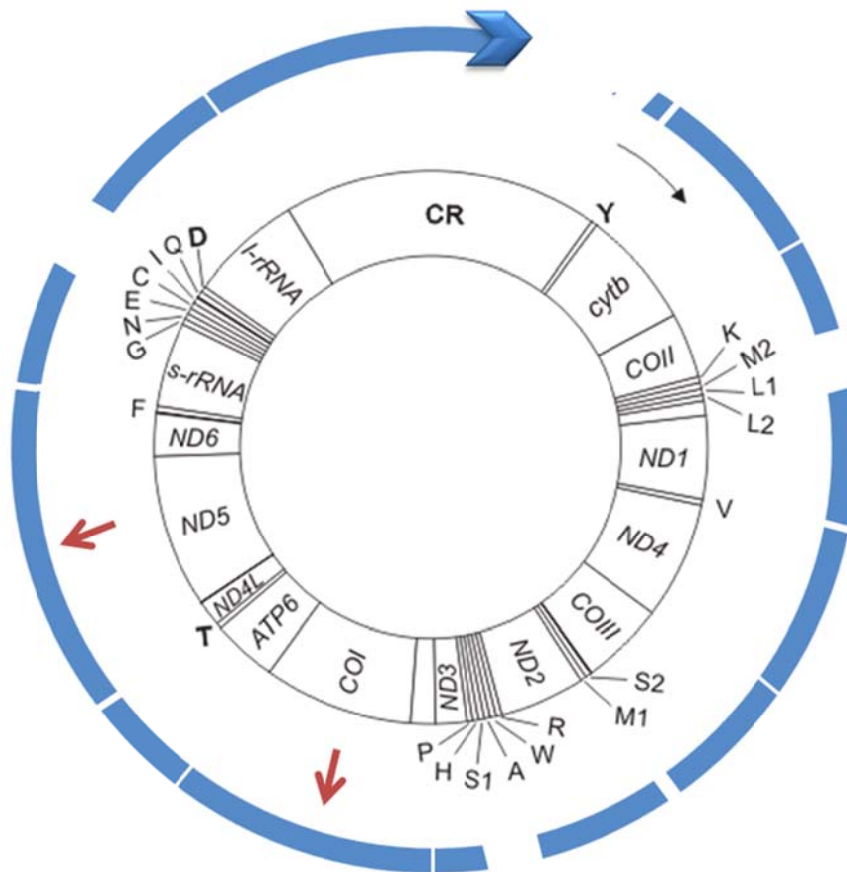
Πολλές προσπάθειες έγιναν για την κατανόηση της έκφρασης των γονιδιωμάτων F και M στους διάφορους ιστούς. Στο σημείο αυτό θα πρέπει να σημειωθεί ότι η εικόνα της κατανομής των γονιδιωμάτων F στους σωματικούς ιστούς αρσενικών και θηλυκών ατόμων καθώς και στα αυγά, ενώ των M μόνο στο σπέρμα, είναι αρκετά γενικευμένη και ποσοτική. Στην πραγματικότητα, mtDNA τύπου M έχει εντοπιστεί και σε σωματικούς ιστούς τόσο αρσενικών όσο και θηλυκών ατόμων, απλώς σε μικρές ποσότητες ([Garrido-Ramos et al. 1998](#), [Obata et al. 2006](#), [Kyriakou et al. 2010](#)). Όσον αφορά στο μιτοχονδριακό περιεχόμενο των σπερματοζωαρίων, απομόνωση καθαρού σπέρματος με χρήση διαλύματος περκόλης από τους [Venetis et al. \(2006\)](#) για το *M. galloprovincialis* καθώς και από τους [Ghiselli et al. \(2011\)](#) για το *Ruditapes philippinarum*, βοήθησε στην εξακρίβωση ότι στο σπέρμα περιέχεται μόνο γονιδίωμα M. Η απάντηση στο ερώτημα αν τα αυγά περιέχουν το γονιδίωμα M, είναι λιγότερο σαφής. Οι [Ghiselli et al. \(2011\)](#) δεν βρήκαν κανένα ίχνος του M σε αυγά του *Ruditapes philippinarum*, ενώ αντίθετα, οι

Garrido-Ramos et al. (1998), Obata et al. (2007) και Sano et al. (2007, 2010), παρατήρησαν ότι το M υπάρχει σε αυγά *Mytilus* μαζί φυσικά με το F.

Επιστρέφοντας στο θέμα της έκφρασης των δύο γονιδιωμάτων στους ιστούς και στα γαμετικά κύτταρα των ειδών με ΔΜΚ, το σημαντικό ερώτημα είναι εάν το γονιδίωμα M το οποίο εντοπίζεται σε μειοψηφία στους ιστούς αρσενικών και θηλυκών, και σε αποκλειστικότητα στο σπέρμα, εκφράζεται ή όχι. Μελέτες έκφρασης των γονιδίων *COIII* (Dalziel and Stewart 2002) και *Cytb* (Obata et al. 2011) στο *Mytilus*, έδειξαν ότι το γονιδίωμα F εκφράζεται σε όλους τους αρσενικούς και θηλυκούς ιστούς, ενώ το M εκφράζεται στις αρσενικές γονάδες, και πιο συγκεκριμένα στα σπερματογόνια και στα σπερματοκύτταρα ενώ η έκφρασή του στους σωματικούς ιστούς είναι ασθενής και σποραδική. Η δεύτερη ομάδα συγγραφέων βρήκε επίσης ότι δεν υπάρχει καμία έκφραση του M στα ώριμα σπερματοζώαρια. Μια μελέτη έκφρασης του γονιδίου *COII* στα Unionidae, έδειξε ότι το γονίδιο τύπου M εκφράζεται τόσο στις αρσενικές όσο και στις θηλυκές γονάδες (Chakrabarti et al. 2006, 2007), ενώ το γονίδιο τύπου F εκφράζεται και έξω από το μιτοχόνδριο (Chakrabarti et al. 2009). Το πρότυπο αυτό διέφερε αρκετά από αυτό που ισχύει στο *Mytilus*, και αυτή η διαφορά οφείλεται πιθανόν στην εξελικτική απόσταση μεταξύ Mytilidae και Unionidae. Τέλος, στο είδος *Ruditapes philippinarum* (Veneridae), βρέθηκε ότι το γονιδίωμα M μεταγράφεται και στους σωματικούς ιστούς (Milani et al. 2014a).

Το μιτοχονδριακό μεταγράψωμα του *M. galloprovincialis* μελετήθηκε πρόσφατα από το εργαστήριό μας (Chatzoglou et al. 2013). Η μεταγραφή των γονιδιωμάτων F και M στο είδος αυτό έχει βρεθεί ότι ξεκινάει από το τέλος περίπου του CR (Cao et al. 2004a) και έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία ενός πολυσιτρονικού μεταγράφου μήκους περίπου 16 kb (Εικόνα 1.15). Τα tRNA του μεταγράφου αυτού αναδιπλώνονται άμεσα στην χαρακτηριστική δομή τους και αποκόπτονται από το ενιαίο μετάγραφο, κόβοντας το σε συγκεκριμένα σημεία και απελευθερώνοντας τα mRNA, rRNA και τμήματα του μεταγράφου που αντιστοιχούν σε μη κωδικές ρυθμιστικές περιοχές. Υπάρχουν περιπτώσεις στις οποίες ανάμεσα σε δύο εφαπτόμενα γονίδια δεν υπάρχει tRNA. Σε ορισμένες από αυτές, υπάρχει μια όμοια προς tRNA (tRNA-like) δομή, η

οποία αναδιπλώνεται και δημιουργεί την τομή ώστε να απελευθερωθούν τα mRNA των γονιδίων. Στις υπόλοιπες περιπτώσεις, απλώς δημιουργούνται πολυσιστρονικά mRNA (Εικόνα 1.15). Αφού αποκοπούν τα mRNA από το πολυσιστρονικό μετάγραφο, πολυαδενυλιώνονται (25 έως 78 αδενίνες), ενώ δεν υφίστανται καμία τροποποίηση του 5' άκρου τους (Chatzoglou et al. 2013).

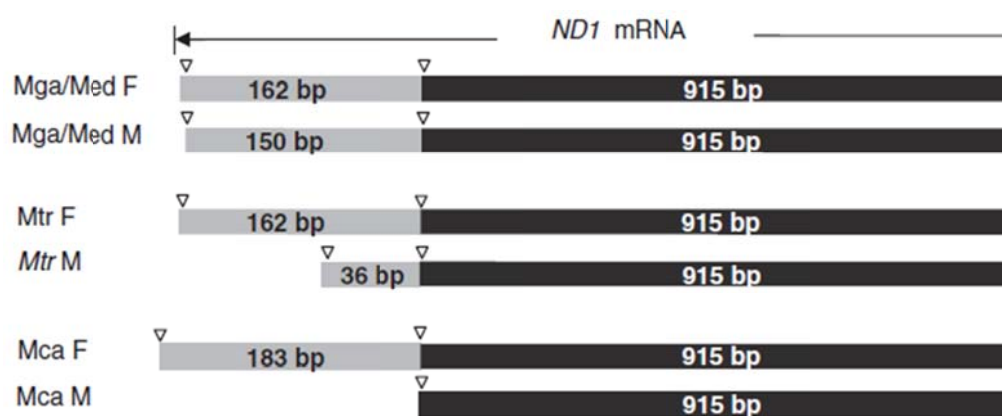


Εικόνα 1.15. Μεταγραφή των mtDNA τύπου F και M του *Mytilus galloprovincialis*. Το κυρτό βελάκι δείχνει την κατεύθυνση της μεταγραφής. Η μπλε κυκλική περιφέρεια συμβολίζει το πρωτογενές πολυσιστρονικό μετάγραφο. Οι τομές σε αυτό δημιουργούνται κατά την αναδίπλωση των tRNA ή όμοιων προς tRNA δομών (tRNA-like structures), και εξυπηρετούν την απελευθέρωση των μεταγράφων των γονιδίων. Τα κόκκινα, έντονα βελάκια υποδεικνύουν το δισιστρωνικό και τρισιστρωνικό μετάγραφο που προκύπτει. Ακολουθείται η τυπική ονοματολογία για γονίδια πρωτεϊνών, rRNA και tRNA.

Όπως ειπώθηκε και προηγουμένως, οι δύο τύποι mtDNA του *Mytilus* διαθέτουν 12 ή 13 γονίδια. Υπάρχει μια αβεβαιότητα για την ύπαρξη του γονιδίου *ATPase8*, διότι παρουσιάζει μεγάλη νουκλεοτιδική

ετερογένεια από είδος σε είδος και δεν έχει περιγραφεί σε πρωτεϊνικό επίπεδο. Οι [Chatzoglou et al. \(2013\)](#) εντόπισαν 10 πολυαδενυλιωμένα μετάγραφα. Τα 8 ήταν μονοιστρονικά (για τα *Cytb*, *COII*, *ND1*, *ND4*, *COII*, *ND2*, *ND3* και *ATPase6*), το ένα δισιστρονικό (*COI* + *ATPase8*) ή μονοιστρονικό (*COI*), αναλόγως αν το τμήμα που φέρει το μετάγραφο του *COI* είναι όντως το *ATPase8*. Και για πρώτη φορά στη βιβλιογραφία, ανιχνεύτηκε ένα τρισιστρονικό μιτοχονδριακό μετάγραφο. Πρόκειται για τα γονίδια *ND4L*, *ND5*, *ND6* τα οποία συμμετέχουν στον σχηματισμό του ίδιου συμπλόκου της αναπνευστικής αλυσίδας και ίσως αυτό να δικαιολογεί την ύπαρξη του συγκεκριμένου πολυιστρονικού μεταγράφου. Πιθανόν να υπήρχαν κάποτε τα σινιάλα αποκοπής κάθε γονιδίου, αλλά χάθηκαν λόγω του πολλαπλασιαστικού πλεονεκτήματος που κατά κανόνα παρουσιάζουν τα μικρότερα μόρια mtDNA και αυτό παγιώθηκε εξελικτικά.

Ένα από τα σημαντικά ευρήματα της μελέτης των [Chatzoglou et al. \(2013\)](#), είναι ότι η άγνωστης λειτουργίας περιοχή UR2 ([Εικόνα 1.14](#)) (162 bp στο F και 150 bp στο M), που βρίσκεται πριν από το γονίδιο *ND1* (στο 5' άκρο του), περιλαμβάνεται στο mRNA του *ND1*. Σε αυτή την περιοχή πράγματι αρχίζει ένα ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης το οποίο συνεχίζει σε πλαίσιο με το *ND1*, οπότε θα μπορούσε να αποτελεί μέρος του. Η έλλειψη ομοιότητας του UR2 με χαρακτηρισμένα γονίδια *ND1* άλλων οργανισμών, οδήγησαν αρκετούς ερευνητές στην υπόθεση ότι δεν ανήκει στο *ND1* ([Hoffman et al. 1992](#), [Boore et al. 2004](#), [Mizi et al. 2005](#), [Breton et al. 2006](#)). Την αντίθετη άποψη υποστήριξαν οι [Zbawicka et al. \(2007\)](#), η οποία υποστηρίζεται και από το εύρημα των [Chatzoglou et al. \(2013\)](#), καθώς μέχρι σήμερα δεν έχει βρεθεί μιτοχονδριακό μετάγραφο με μεγάλη μη-κωδική 5' αμετάφραστη περιοχή. Συγκρίσεις της περιοχής UR2 σε F και M τεσσάρων ειδών *Mytilus* έδειξαν σημαντικές διαφορές στο μήκος ([Εικόνα 1.16](#)). Στο F του *M. trossulus*, το UR2 έχει παρόμοιο μήκος (162 bp) με το F των *M. edulis*/*M. galloprovincialis*, ενώ στο M του *M. trossulus*, το UR2 είναι πολύ μικρό (μόλις 36 bp). Από την άλλη, στο *M. californianus*, ενώ το UR2 τύπου F είναι ελαφρώς μεγαλύτερο από ότι στα άλλα είδη (162 bp), το UR2 τύπου M λείπει εντελώς.



Εικόνα 1.16. Σχηματική αναπαράσταση των διαφορών μήκους του ND1 ανάμεσα σε γονιδιώματα F και M διαφορετικών ειδών *Mytilus*. Το κωδικόνιο λήξης έχει εξααιρεθεί. Οι δύο εναλλακτικές θέσεις κωδικονίου έναρξης παρουσιάζονται με κάθετα λευκά βέλη. Mga: *Mytilus galloprovincialis*, Med: *Mytilus edulis*, Mtr: *Mytilus trossulus*, Mca: *Mytilus californianus*. Από [Chatzoglou et al. \(2013\)](#).

Φυλογενετικές μελέτες έχουν δείξει ότι στο είδος *Mytilus* ο διαχωρισμός μεταξύ των γονιδιωμάτων F και M των *M. edulis* - *M. galloprovincialis* είναι ο πιο πρόσφατος, ο διαχωρισμός του *M. californianus* είναι ο πιο παλιός, ενώ ο διαχωρισμός του *M. trossulus* είναι χρονικά ενδιάμεσος ([Hoeh et al. 1996](#)). Αυτή η φυλογενετική απόσταση ταιριάζει με το μήκος του UR2 στα γονιδιώματα M, όπως εξηγείται πιο πάνω, αλλά δεν ταιριάζει με το μήκος του UR2 των γονιδιωμάτων F, το οποίο παρέμεινε σχεδόν ίδιο μεταξύ των ειδών. Μια εξήγηση θα μπορούσε να είναι ότι το UR2 αποτελεί τμήμα του ND1 απαραίτητο για τη λειτουργία του γονιδιώματος F, αλλά όχι του M. Αφού όμως το UR2 δεν είναι απαραίτητο για το M, γιατί δεν έχει εξαφανιστεί από όλα τα γονιδιώματα M αυτού του είδους; Η απάντηση έρχεται από τη μελέτη του φαινομένου της «αρρενοποίησης» ([Zouros et al. 2013](#)). Στο ζεύγος ειδών *M. edulis*/*M. galloprovincialis* έχει δειχθεί ότι ο ανασυνδυασμός μεταξύ των γονιδιωμάτων F και M – που είναι γνωστό ότι συμβαίνει στο γένος *Mytilus* ([Ladoukakis and Zouros 2001](#), [Ladoukakis et al. 2011](#)) – στη συντηρητική περιοχή CD του CR, μπορεί να επιτρέψει στα γονιδιώματα F να ενσωματώσουν αλληλουχίες από το γονιδίωμα M και να γίνουν πατρικά κληρονομούμενα. Τέτοια γονιδιώματα τύπου F με ανεστραμμένο τύπο κληρονομησης είναι γνωστό ότι υπάρχουν σε φυσικούς πληθυσμούς (π.χ. γονιδίωμα C, βλέπε [Ενότητα 1.3.2.1](#)) ([Burzyński et al. 2003](#), [Venetis et al. 2007](#)). Σε εξελικτικό χρόνο, τα γονιδιώματα αυτά πρέπει να

εξαπλώθηκαν και να αντικατέστησαν το «τυπικό γονιδίωμα M», αλλιώς η φυλογένεση των mtDNA του γένους *Mytilus* δεν θα μπορούσε να εξηγηθεί (Zouros 2013). Η αρρενοποίηση είναι κοινή σε πληθυσμούς *M. edulis*/*M. galloprovincialis* (Burzyński et al. 2003, Ladoukakis et al. 2002, Venetis et al. 2007) ενώ πρέπει να είναι πολύ σπάνια, αν όχι αδύνατη στο *M. californianus*. Συνεπώς, η παρουσία της αλληλουχίας UR2 στο γονιδίωμα M των *M. edulis*/*M. galloprovincialis* εξηγείται εύκολα ως αποτέλεσμα γεγονότος αρρενοποίησης που εμφανίστηκε αφού το ζεύγος των ειδών αυτών διαχωρίστηκε από τη γραμμή που οδήγησε σε *M. trossulus*. Αυτό το γεγονός δεν είναι αρκετά παλιό ώστε να επιτρέψει τη μείωση του μήκους του UR2 στο γονιδίωμα M των ειδών αυτών. Ακολουθώντας την ίδια λογική, η παρουσία ενός αρκετά κοντύτερου UR2 στο γονιδίωμα M του *M. trossulus* είναι απομεινάρια ενός πολύ παλιότερου γεγονότος αρρενοποίησης που εμφανίστηκε στη γραμμή που έδωσε τα είδη *M. edulis* – *M. galloprovincialis* – *M. trossulus* μετά το διαχωρισμό αυτής της γραμμής από τη γραμμή που οδήγησε στο *M. californianus*. Αυτή η αλληλουχία γεγονότων αρρενοποίησης έχει προταθεί σε μία παλαιότερη μελέτη (Hoeh et al. 1996) και αποτελεί καλή εξήγηση για παρατηρήσεις που προέκυψαν σε αρκετές μελέτες που ακολούθησαν. Στα Unionidae, η αρρενοποίηση είναι ένα αρκετά σπάνιο ή αδύνατο γεγονός (Zouros 2013). Μια υπόθεση για την εξήγηση αυτού, είναι η ύπαρξη της επέκτασης του γονιδίου COII στα γονιδιώματα M των Unionidae (βλέπε Ενότητα 1.3.2.1). Εάν για κάποιο λόγο, η επέκταση αυτή είναι απαραίτητη για τη λειτουργία του γονιδιώματος M (Curole and Kocher 2002, Chakrabarti et al. 2006, 2007, Chapman et al. 2008) και εάν ο μοριακός μηχανισμός για τη μεταφορά της με ανασυνδυασμό στο γονιδίωμα F, είναι αδύνατος ή εξαιρετικά σπάνιος, τότε δεν αναμένεται να επισυμβαίνει αρρενοποίηση στα Unionidae. Ένα παρόμοιο, και ίσως ισχυρότερο επιχείρημα μπορεί να διαμορφωθεί για τις πολλές και μικρές μη-κωδικές περιοχές που βρίσκονται διάσπαρτες στα γονιδιώματα F και M των Unionidae. Λαμβάνοντας υπόψη το γεγονός ότι στα είδη *Mytilus*, τέτοιες αλληλουχίες εμπλέκονται στην αρρενοποίηση, εάν υπάρχουν δομές απαραίτητες για τη λειτουργία του γονιδιώματος M σε αυτές, και η μεταφορά τους από το M στο F είναι δύσκολη, τότε πάλι η αρρενοποίηση θα ήταν αδύνατη. Όσον αφορά στα Veneridae, για να εξαχθεί κάποιο ασφαλές συμπέρασμα για την ύπαρξη ή μη αρρενοποίησης απαιτούνται πλήρεις αλληλουχίες και

άλλων γονιδιωμάτων F και M καθότι είναι γνωστές οι πλήρεις αλληλουχίες μόνο του F και M του *Ruditapes philippinarum* (Zouros 2013).

Ένα άλλο σημαντικό θέμα στη μελέτη της ΔΜΚ σε RNA επίπεδο, είναι η πιθανότητα μεταγραφής του ORF που βρέθηκε στα γονιδιώματα F του είδους *Mytilus* (βλέπε Ενότητα 1.3.2.1). Οι Breton et al. (2011a) βρήκαν αλληλουχίες του ORF αυτού σε βιβλιοθήκες EST του *M. edulis*. Ομοίως, οι Ghiselli et al. (2013) βρήκαν μετάγραφα ενός ORF που υπάρχει τόσο στο γονιδίωμα F όσο και στο M του *Ruditapes philippinarum* (Veneridae). Εντούτοις, αυτή η ένδειξη είναι έμμεση για αλληλουχίες mtDNA λόγω πιθανότητας πολυσιστρονικών μεταγράφων και ασάφειας όσον αφορά στο σημείο προσάρτησης της poly(A) ουράς (Zouros 2013).

1.3.2.3 ...σε πρωτεϊνικό επίπεδο

Δεν είναι πολλές οι μελέτες που έχουν διεξαχθεί σε επίπεδο πρωτεΐνης για τη ΔΜΚ. Οι Diz et al. (2013) μελέτησαν το πρωτέωμα αυγών από διάφορα θηλυκά άτομα του γένους *Mytilus*. Εδώ πρέπει να σημειωθεί ότι στο *Mytilus*, το φύλο των απογόνων καθορίζεται από τον πυρηνικό γονότυπο της μητέρας (Saavedra et al. 1997, Kenchington et al. 2002, Kenchington et al. 2009, βλέπε Ενότητα 1.3.4). Οι Diz et al. (2013) έδειξαν ότι αυγά θηλυκών που παράγουν μόνο αρσενικούς απογόνους παρουσιάζουν υψηλότερα επίπεδα έκφρασης διάφορων υπομονάδων του πρωτεασώματος από ότι αυγά θηλυκών που παράγουν μόνο θηλυκούς απογόνους. Από την άλλη, τα αυγά θηλυκών που παράγουν μόνο θηλυκούς απογόνους, εμφάνισαν υψηλότερα επίπεδα των ενζύμων κινάση αργινίνης και ενολάση, που εμπλέκονται στην παραγωγή ενέργειας, ενώ η φερριτίνη, που εμπλέκεται στην ομοιόσταση του σιδήρου είχε χαμηλότερα επίπεδα έκφρασης. Η εμπλοκή του συστήματος ουβικιτίνης-πρωτεασώματος στη ΔΜΚ έχει προταθεί επίσης και από άλλες μελέτες (Diz et al. 2009, Ghiselli et al. 2012).

Σημαντικά είναι και τα ευρήματα σε πρωτεϊνικό επίπεδο σε σχέση με τα ORF με λειτουργία διαφορετική της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης (βλέπε Ενότητες 1.3.2.1 και 1.3.2.2). Οι Breton et al. (2009) ανέφεραν την παρουσία ενός τέτοιου ORF σε επτά γονιδιώματα F και τέσσερα M των Unionidae. Το ισχυρό δεδομένο που παρουσίασαν είναι η εύρεση πρωτεϊνικών προϊόντων που κωδικοποιούν τα ORF αυτά με πειράματα

στυπώματος κατά Western. Το προϊόν του ORF του γονιδιώματος F (F-ORF) βρέθηκε στις θηλυκές γονάδες, ενώ λείπει από τις αρσενικές και το αντίθετο ισχύει για το ORF του γονιδιώματος M (M-ORF). Σε επόμενη μελέτη, οι [Breton et al. \(2011b\)](#) έδειξαν ότι σε ιστούς ωοθηκών το προϊόν του F-ORF ανιχνεύεται στον πυρήνα και στο κυτταρόπλασμα (πιθανότατα στα μιτοχόνδρια) των αυγών. Οι συγγραφείς εκφράζουν την πεποίθηση ότι η διαφορετική αυτή έκφραση των F-ORF και M-ORF σχετίζεται με τη διαφορετική κληρονομή των δύο γονιδιωμάτων και ότι τα προϊόντα των γονιδίων αυτών παίζουν κάποιο ρόλο στον συγκεκριμένο τρόπο μεταβίβασης κάθε ενός από αυτά. Επίσης, και στο είδος *R. philippinarum* της οικογένειας Veneridae έχει βρεθεί πρωτεΐνη που κωδικοποιείται από το M-ORF ([Milani et al. 2014b](#)). Οι συγγραφείς θεωρούν ότι πρόκειται για πρωτεΐνη ικής προέλευσης και ότι ο ρόλος της είναι να αποτρέπει την αναγνώριση των πατρικών μιτοχονδρίων (με mtDNA M) από τον μηχανισμό αποικοδόμησης, επιτρέποντας την επιβίωσή τους στο ζυγωτό.

1.3.3 Η τύχη των πατρικών μιτοχονδρίων στο ζυγωτό - έμβρυο

Στο είδος *Mytilus*, το σπερματοζώαριο περιέχει πέντε μεγάλα μιτοχόνδρια ([Longo and Dornfield 1967](#)) σε αντίθεση με τα δεκάδες χιλιάδες μικρότερα μιτοχόνδρια του αυγού ([White et al. 2008](#)). Η τύχη των μιτοχονδρίων του σπέρματος στο γονιμοποιημένο αυγό εξαρτάται από το φύλο του εμβρύου ([Cao et al. 2004b](#), [Obata and Komaru 2005](#), [Cogswell et al. 2006](#), [Kenchington et al. 2009](#)). Σε θηλυκά έμβρυα, τα πέντε μιτοχόνδρια του σπέρματος ακολουθούν ένα «πρότυπο διασκορπισμού», δηλαδή κατανέμονται τυχαία ανάμεσα στα βλαστομερίδια που προκύπτουν από τη διαίρεση του ζυγωτού. Σε αρσενικά έμβρυα ακολουθούν το «πρότυπο σωσσωματώματος», δηλαδή συγκρατώνται ενωμένα και παραμένουν στο ίδιο βλαστομερίδιο κατά τις πρώτες διαιρέσεις. Το συσσωμάτωμα των μιτοχονδρίων του σπέρματος παρατηρήθηκε επίσης στο είδος *Ruditapes philippinarum* ([Milani et al. 2011](#)) της οικογένειας Veneridae. Στα μύδια, η παρουσία των μιτοχονδρίων του σπέρματος μόνο σε ένα βλαστομερίδιο παρατηρείται μέχρι και το στάδιο των οχτώ κυττάρων και της τροχοφόρου προνύμφης (μέχρι εκεί φτάνει η διακριτική ικανότητα του πειράματος που χρησιμοποιείται). Με βάση τις γνώσεις περί εμβρυονικής ανάπτυξης των

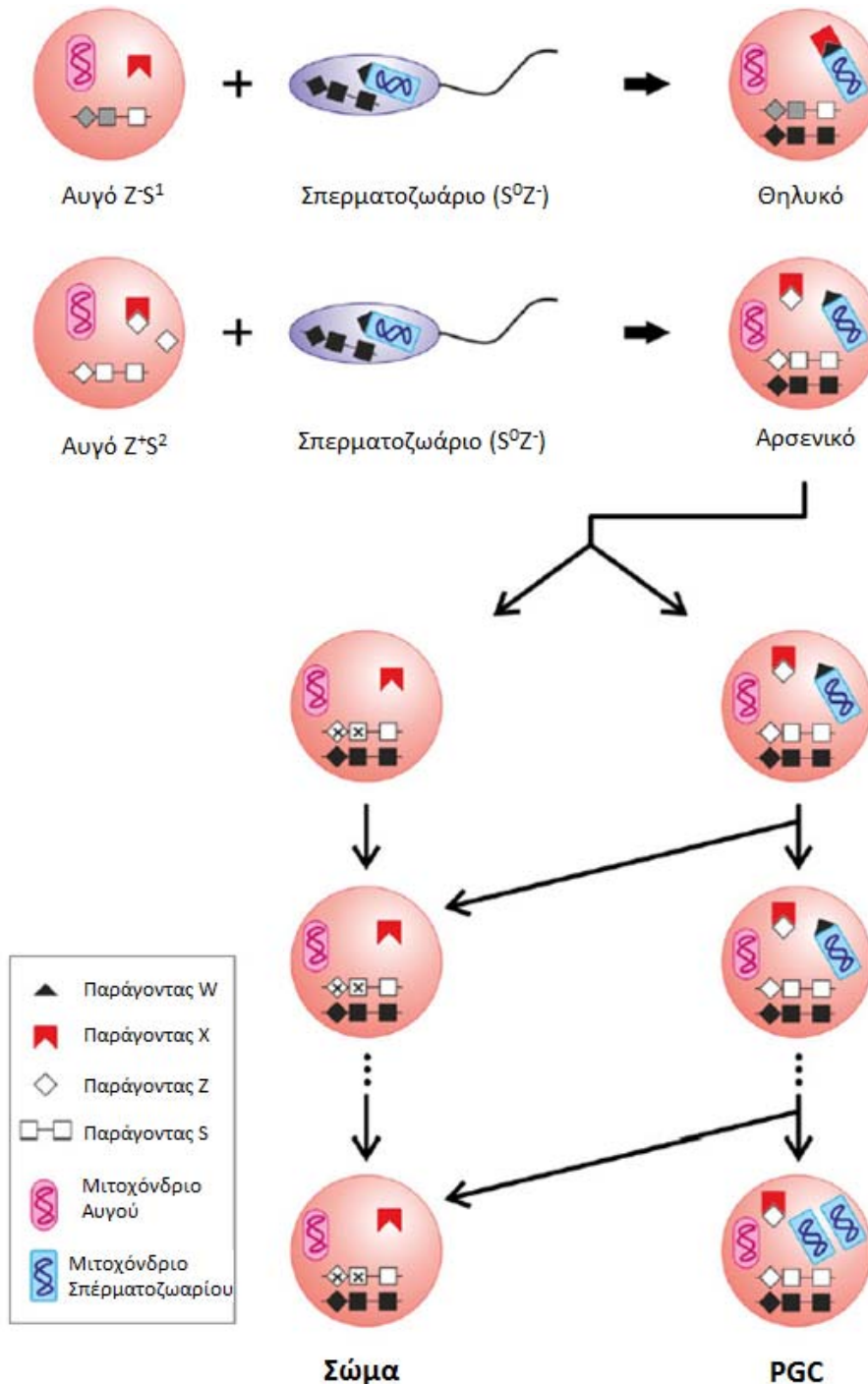
μυδιών, το βλαστομερίδιο αυτό (κύτταρο D, σύμφωνα με την ονοματολογία από Conklin 1987) είναι το αρχέγονο γαμετικό κύτταρο (Verdonk and Van Den Biggelaar 1983). Έχει προταθεί ότι ο σχηματισμός του συσσωματώματος των μιτοχονδρίων του σπέρματος στο αρσενικό έμβρυο, είναι το πρώτο βήμα στον αναπτυξιακό μηχανισμό που καθοδηγεί το πατρικό mtDNA στη γαμετική σειρά του αρσενικού και που τελικά καθιστά το mtDNA τύπου M, το μοναδικό τύπο μιτοχονδριακού DNA του ώριμου σπέρματος (Cao et al. 2004b).

1.3.4 Το προτεινόμενο μοντέλο της ΔΜΚ

Το πρώτο μοντέλο για το μηχανισμό της ΔΜΚ προτάθηκε από τον Zouros (2000). Δεκατρία χρόνια αργότερα το μοντέλο αυτό συμπληρώθηκε από τον ίδιο συγγραφέα, με βάση νέες πληροφορίες που συσσωρεύτηκαν στα έτη που μεσολάβησαν (Zouros 2013).

Σύμφωνα με το μοντέλο αυτό, το φύλο στα είδη με ΔΜΚ καθορίζεται από δύο πυρηνικούς παράγοντες, τον E και τον S. Ο παράγοντας S αποτελείται από δύο επαναλήψεις, την επονομαζόμενη «εγγύς» και την «απομακρυσμένη» (Εικόνα 1.17). Ένα έμβρυο αναπτύσσεται σε αρσενικό άτομο όταν έχει δύο ή περισσότερες δόσεις του S (φαινότυπος S^2 και παραπάνω). Σε αντίθετη περίπτωση το έμβρυο αναπτύσσεται σε θηλυκό άτομο (φαινότυπος S^1 · η περίπτωση S^0 μπορεί να είναι και θνησιγόνος). Στα αυγά, η απομακρυσμένη επανάληψη είναι πάντα ενεργή (Εικόνα 1.17, λευκό τετραγωνάκι), ενώ η εγγύς επανάληψη μπορεί να είναι ενεργή ή ανενεργή (γκρι τετραγωνάκι) ανάλογα με το γονότυπο του θηλυκού ως προς τον παράγοντα E. Επομένως, μπορούν να προκύψουν αυγά S^1 ή S^2 αντίστοιχα. Αντίθετα, στα σπερματοζωάρια και οι δύο επαναλήψεις είναι σιωπηλές (σε καταστολή) (Εικόνα 1.17, μαύρα τετραγωνάκια), συνεπώς τα σπερματοζωάρια έχουν πάντα φαινότυπο S^0 . Το E είναι ένα γονίδιο με δύο αλληλόμορφα, το E και το e. Τα θηλυκά με γονότυπο ee παράγουν αυγά στα οποία η εγγύς επανάληψη του S δεν μπορεί να ενεργοποιηθεί (συνεπώς αυγά S^1). Θηλυκά με γονότυπο EE παράγουν αυγά στα οποία η εγγύς επανάληψη του S είναι ενεργή (συνεπώς αυγά S^2). Τέλος, θηλυκά Ee παράγουν αυγά S^1 με συχνότητα k και αυγά S^2 με συχνότητα 1-k. Το γονίδιο E υπάρχει και στα αρσενικά άτομα, όμως αυτά θα παράγουν τον ίδιο τύπο σπερματοζωαρίων

ανεξαρτήτως του γονοτύπου τους ως προς το γονίδιο E. Εφόσον στο σπερματοζωάριο και οι δύο επαναλήψεις του S είναι κατεσταλμένες, το φύλο του εμβρύου εξαρτάται από το φαινότυπο του αυγού. Αυγό S^1 θα δώσει θηλυκό άτομο, ενώ αυγό S^2 θα δώσει αρσενικό (Εικόνα 1.17).



Εικόνα 1.17. Μοντέλο του μηχανισμού της ΔΜΚ. Βλέπε το κείμενο για επεξήγηση. Τροποποιημένο από [Zouros \(2013\)](#).

Είναι λογικό να θεωρηθεί ότι η ΔΜΚ εξελίχθηκε ως μια τροποποίηση της Αυστηρά Μητρικής Κληρονόμησης (SMI) του mtDNA. Το κοινό σημείο όλων των παραλλαγών της μητρικής κληρονόμησης είναι ότι το mtDNA του σπέρματος αποκλείεται από τη δεξαμενή mtDNA του νεοσχηματισθέντος ζυγωτού. Στα θηλαστικά, η διαδικασία αυτή περιλαμβάνει την ουβικιτινυλίωση της μεμβράνης των μιτοχονδρίων των σπερματοζωαρίων και τη μετέπειτα αναγνώριση και καταστροφή αυτών από ειδο-ειδικούς παράγοντες του αυγού (Sutovsky et al. 1999, 2000). Η διαδικασία αυτή μπορεί να αναπαρασταθεί ως μια αλληλεπίδραση δύο παραγόντων, του W και του X (Εικόνα 1.17). Ο παράγοντας W παράγεται κατά τη σπερματογένεση και σημαίνει την εξωτερική επιφάνεια των μιτοχονδρίων του σπέρματος. Ο παράγοντας X εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα του αυγού. Μετά τη γονιμοποίηση, ο παράγοντας X αλληλεπιδράει με τον παράγοντα W με αποτέλεσμα τα πατρικά μιτοχόνδρια να διασπείρονται στο κυτταρόπλασμα του ζυγωτού και να εξουδετερώνονται από το σύστημα ουβικιτινυλίωσης που περιγράφηκε πιο πάνω. Το σύστημα W/X θεωρείται ότι υπάρχει και στα είδη με ΔΜΚ, με μια μικρή τροποποίηση: την παρουσία ενός ακόμη πυρηνικού παράγοντα, του Z (Εικόνα 1.17, ρόμβος). Το γονίδιο του Z είναι στενά συνδεδεμένο και ακολουθεί το ίδιο πρότυπο έκφρασης με την εγγύς επανάληψη του S. Επομένως, εφόσον στα σπερματοζωάρια και οι δύο επαναλήψεις του S βρίσκονται υπό καταστολή, το ίδιο θα ισχύει και με το Z (Εικόνα 1.17, μαύρος ρόμβος), οπότε ο φαινότυπος των σπερματοζωαρίων είναι πάντα S^0Z^- . Στα αυγά S^1 η εγγύς επανάληψη του S είναι ανενεργή, επομένως και το Z θα είναι ανενεργό (Εικόνα 1.17, γκρι ρόμβος) και ο φαινότυπος των αυγών αυτών θα είναι S^1Z^- . Τέλος, στα αυγά S^2 η εγγύς επανάληψη του S είναι ενεργή, άρα ενεργό θα είναι και το Z (Εικόνα 1.17, λευκός ρόμβος) και ο φαινότυπος των αυγών αυτών θα είναι S^2Z^+ . Ο παράγοντας Z όταν είναι ενεργός, δεσμεύει τον παράγοντα X και δεν του επιτρέπει να προσδεθεί στο W, επομένως τα πατρικά μιτοχόνδρια δεν διασπείρονται αλλά δημιουργούν (ή διατηρούν) διάταξη συσσωματώματος, προστατεύοντάς τα από την αποικοδόμηση στο ζυγωτό.

Συνοψίζοντας, ανάλογα με τον γονότυπο που φέρουν ως προς το γονίδιο E, τα θηλυκά με ΔΜΚ παράγουν δύο τύπους αυγών: τα S^1Z^- και τα S^2Z^+ . Τα αρσενικά παράγουν πάντα τον ίδιο τύπο σπερματοζωαρίων: S^0Z^- .

Επομένως, το φύλο των απογόνων (που εξαρτάται από τον παράγοντα S), καθορίζεται από τη μητέρα, δηλαδή τον τύπο του αυγού που θα γονιμοποιηθεί. Αντίστοιχα, και η παρουσία ή όχι συσσωματώματος πατρικών μιτοχονδρίων (που εξαρτάται από τον παράγοντα Z) και άρα ΔΜΚ, επίσης καθορίζεται από τον τύπο του αυγού. Τα αυγά S^1Z^- θα δώσουν θηλυκά έμβρυα, στα οποία τα πατρικά μιτοχόνδρια εμφανίζουν «πρότυπο διασκορπισμού», επομένως θα ουβικιτινυλιωθούν και θα αποικοδομηθούν. Συνεπώς το πατρικό mtDNA (τύπος M) θα χαθεί, και ο θηλυκός απόγονος θα έχει μόνο mtDNA τύπου F. Τα αυγά S^2Z^+ θα δώσουν αρσενικά έμβρυα, στα οποία τα πατρικά μιτοχόνδρια θα εμφανίζουν «πρότυπο συσσωματώματος», επομένως θα διαφύγουν τον κίνδυνο αποικοδόμησης. Το συσσωμάτωμα αυτό διατηρείται κατά τις πρώτες κυτταρικές διαιρέσεις και μεταφέρεται στο ένα πάντα από τα δύο θυγατρικά κύτταρα σε κάθε διαίρεση. Τελικά, καταλήγει στο κύτταρο που θα αποτελέσει το αρχέγονο γαμετικό κύτταρο (PGC – primordial germ cell). Για το λόγο αυτό, τα κύτταρα της αρσενικής γαμετικής σειράς περιέχουν πατρικά μιτοχόνδρια με mtDNA τύπου M. Σε όλα τα υπόλοιπα κύτταρα του θηλυκού απογόνου (σωματικά κύτταρα), θα υπάρχουν μητρικά μιτοχόνδρια με mtDNA τύπου F.

1.4 Σκοπός της διατριβής

Σύμφωνα με το μοντέλο για το μηχανισμό της ΔΜΚ που περιγράφηκε πιο πάνω, μπορεί να εξηγηθεί:

- ✓ γιατί τα θηλυκά άτομα έχουν μιτοχονδριακό DNA τύπου F τόσο στους σωματικούς ιστούς τους όσο και στη γονάδα τους.
- ✓ γιατί παρατηρούνται περιπτώσεις διαρροής γονιδιώματος M σε μικρή ποσότητα στα θηλυκά άτομα (Ενότητα 1.3.2.2):
 - προφανώς κάποιο από τα πατρικά μιτοχόνδρια που ακολούθησαν το «πρότυπο διασκορπισμού» στα θηλυκά άτομα, διέφυγε της καταστροφής μέσω ουβικιτινυλίωσης και πολλαπλασιάστηκε, συνεισφέροντας, σε μικρό ποσοστό στη δεξαμενή μιτοχονδριακού DNA του θηλυκού ατόμου.

- ✓ γιατί τα αρσενικά άτομα έχουν γονιδίωμα F στους σωματικούς ιστούς αλλά γονιδίωμα M στο σπέρμα.
- ✓ γιατί παρατηρούνται μερικές φορές μικρά ποσοστά γονιδιώματος M σε σωματικούς ιστούς αρσενικών (Ενότητα 1.3.2.2)
 - κάποιο από τα πατρικά μιτοχόνδρια του συσσωματώματος, αποκόπηκε από αυτό (Cogswell et al. 2006) και κατέληξε σε κάποιο άλλο κύτταρο πλην του PGC.

Το ερώτημα όμως που παραμένει αναπάντητο, είναι:

- ✓ γιατί το ώριμο σπέρμα περιέχει αποκλειστικά πατρικά μιτοχόνδρια με γονιδίωμα M (Venetis et al. 2006); Τρία είναι τα πιθανά ενδεχόμενα:
 - θα μπορούσε να υποτεθεί ότι τα πατρικά μιτοχόνδρια και μόνο αυτά εισέρχονται στο PGC, πράγμα που σημαίνει ότι θα πρέπει να υπάρχει ένας μηχανισμός που αποτρέπει την είσοδο μητρικών μιτοχονδρίων στο κύτταρο αυτό.
 - θα μπορούσαν να εισέρχονται τόσο πατρικά όσο και μητρικά μιτοχόνδρια στο PGC, αλλά στη συνέχεια, τα μητρικά μιτοχόνδρια να καταστρέφονται, ή να υπερτερούν τα πατρικά μέσω πολύ μεγαλύτερου ρυθμού αντιγραφής του mtDNA τύπου M.
 - θα μπορούσε το PGC να περιέχει ένα μίγμα πατρικού και μητρικού mtDNA και ο μηχανισμός για την εξουδετέρωση του μητρικού mtDNA να εκκινείται όταν το PGC ενεργοποιείται για την παραγωγή σπερματοζωαρίων (Zouros 2013).

Δεν υπάρχουν αρκετά δεδομένα υπέρ κάποιου από τα τρία αυτά ενδεχόμενα. Όσον αφορά τα δύο πρώτα, δεν υπάρχουν αδιάσειστα στοιχεία που να οδηγούν στο συμπέρασμα ότι αυτές οι διαδικασίες όντως λαμβάνουν χώρα. Από την άλλη, η σπάνια εμφάνιση ερμαφρόδιτων ατόμων στα είδη με ΔΜΚ, καθώς και ανωμαλίες που σχετίζονται με υβρίδια ειδών *Mytilus* (Kenchington et al. 2009), συνηγορούν υπέρ του τρίτου ενδεχομένου (Zouros 2013).

Επομένως, είναι πιθανό να υπάρχουν αλληλουχίες ειδικές για το mtDNA τύπου M ή F, οι οποίες να εξυπηρετούν τον αποκλεισμό ή την καταστροφή του γονιδιώματος F και κατ'επέκταση των μητρικών μιτοχονδρίων από το σπέρμα, ή/και άλλες που να προστατεύουν το

γονιδίωμα Μ και κατ'έκταση τα πατρικά μιτοχόνδρια από την καταστροφή στα σπερματοζωάρια. Οι εν λόγω αλληλουχίες μπορεί να περιέχουν γονίδια ή να αποτελούν θέσεις πρόσδεσης πυρηνικών παραγόντων. Ενδείξεις για ύπαρξη γονιδίων που σχετίζονται με την κληρονόμηση μιτοχονδριακών γονιδιωμάτων, υπάρχουν για τα mtDNA τύπων F και M του *Mytilus*, και για τα F και M διαφόρων Unionidae και Veneridae (Breton et al. 2009, 2011a, Milani et al. 2013). Υπόνοιες για μη-γονιδιακές αλληλουχίες που ίσως σχετίζονται αναλόγως, έχουν διατυπωθεί για την Κύρια Ρυθμιστική Περιοχή (CR) στα είδη *Mytilus* (Burzynski et al. 2003, Cao et al. 2004a, Venetis et al. 2007, Cao et al. 2009).


Στόχος της παρούσας διδακτορικής διατριβής ήταν η εύρεση και η μελέτη αλληλουχιών που σχετίζονται με τις διαφορετικές πορείες κληρονόμησης των γονιδιωμάτων F και M στο είδος *Mytilus galloprovincialis*. Γνωρίζοντας ότι οι γονάδες των αρσενικών ατόμων περιέχουν τόσο γονιδίωμα F όσο και M, απώτερος σκοπός μας ήταν η ανακάλυψη κάποιου μηχανισμού με τον οποίο γίνεται ο αποκλεισμός του γονιδιώματος F και συνεπώς των μητρικών μιτοχονδρίων από το σπέρμα. Με άλλα λόγια, στόχος μας είναι η απάντηση του ερωτήματος: πώς γίνεται το σπέρμα να έχει αποκλειστικά mtDNA τύπου M;

2. Υλικά και Μέθοδοι

Επεξηγήσεις

10X TBE	1 M Tris, 0,83 M βορικό οξύ, 10 mM EDTA
70-80% αιθανόλη	Αιθανόλη αραιωμένη με αποστειρωμένο, απεσταγμένο νερό.
APS	Ammonium persulfate / Υπερθειικό αμμώνιο, πολυμεριστικό μέσο της ακρυλαμίδης.
Bottom agar	LB που περιέχει 1,5% άγαρ (3,75 g άγαρ ανά 250 ml θρεπτικό υλικό).
bp	Base pair / Ζεύγος βάσεων.
BSA	Bovine Serum Albumin / Αλβουμίνη ορού βοός.
Buffer	Ρυθμιστικό διάλυμα.
cDNA	Complementary DNA / Συμπληρωματικό DNA, δηλ. DNA που προκύπτει μετά από αντίστροφη μεταγραφή ενός RNA.
cps	Counts per second / Κρούσεις ανά δευτερόλεπτο, μονάδα μέτρησης ρυθμού μεταστοιχείωσης ραδιενεργών υλικών.
DNase	Deoxyribonuclease / Δεσοξυριβονουκλεάση.
dNTPs	Deoxyribonucleotides / Δεσοξυριβονουκλεοτίδια (και τα τέσσερα, A, T, G, C).
DTT	Dithiothreitol / Διθειοθρεϊτόλη, σε χαμηλές συγκεντρώσεις, προστατεύει τις πρωτεΐνες από οξείδωση, αποτρέποντας το σχηματισμό ενδομοριακών ή διαμοριακών δισουλφιδικών δεσμών.
EDTA	Ethylene diamino tetraacetic acid / Αιθυλενο-διαμινο-τετραοξικό οξύ, χηλικός παράγοντας που δεσμεύει διθενή ιόντα.
Forward primer	Πρόσθιος εκκινητής της PCR.
GSP	Gene-specific primer / ειδικός εκκινητής γονιδίου.
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid / 4-(2-υδροξυαιθυλο)-1-πιπεραζινοαιθανοσουλφονικό οξύ, ρυθμιστικός παράγοντας.
KAc	Potassium acetate, οξικό κάλιο.
Kb	Kilobase / Χιλιάδα βάσεων.
LB	Θρεπτικό υλικό Luria broth ή Lysogeny broth: 2,5 g Tryptone, 1,25 g Yeast extract, 2,5 g NaCl ανά 250 ml H ₂ O, ρύθμιση pH

	στο 7,0 με NaOH 1N (0,875 ml).
MBA	N,N'-Methylenebisacrylamide / N,N'-Μεθυλενοδιαακρυλαμίδη, παράγοντας που δημιουργεί διακλαδώσεις στην ακρυλαμίδη, οδηγώντας στο σχηματισμό πλέγματος και άρα πηκτώματος.
NaAc	Sodium acetate / Οξικό νάτριο.
nt	Nucleotides / Νουκλεοτίδια.
o/n	Overnight / Κατά τη νύχτα.
PBS	8 g NaCl, 0,2 g KCl, 1,44 g Na ₂ HPO ₄ , 0,24 g KH ₂ PO ₄ – pH 7,4 ανά 1 l διαλύματος.
PCR	Polymerase Chain Reaction / Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης.
PEG	Polyethylene glycol / Πολυαιθυλενογλυκόλη, ένωση πολυαιθέρα, πολυμερές το οποίο σε υψηλά μοριακά βάρη (8.000) χρησιμοποιείται για την κατακρήμνιση DNA.
PMSF	Phenylmethanesulfonylfluoride / Φαινυλομεθανοσουλφονυλοφθορίδιο, αναστολέας πρωτεασών σερίνης.
Poly(dIdC)	Poly(deoxyinosinic-deoxycytidylic) acid / Πολύ(δεοξυινωσινικό-δεοξυκυτιδυλικό) οξύ, ένα δίκλωνο τμήμα DNA που αποτελείται από εναλλασσόμενα νουκλεοτίδια δεοξυϊνωσης και δεοξυκυτιδίνης, το οποίο χρησιμοποιείται ως μη-ειδικός ανταγωνιστής σε πειράματα αλληλεπίδρασης DNA-πρωτεϊνών.
Reverse primer	Ανάστροφος εκκινητής της PCR ή της αντίστροφης μεταγραφής.
RNase	Ribonuclease / Ριβονουκλεάση.
rpm	Revolutions per minute / Στροφές ανά λεπτό, μονάδα μέτρησης ταχύτητας περιστροφής σε φυγόκεντρο.
RT	Reverse Transcription / Αντίστροφη Μεταγραφή.
SDS	Sodium-Dodecyl-Sulfate / Θειοδωδεκυλικό νάτριο, απορρυπαντικό.
SEVAG	24 μέρη χλωροφόρμιο : 1 μέρος ισοαμυλική αλκοόλη.
Speedvac	Centrifugal evaporator / Φυγόκεντρος συνδεδεμένη με αντλία κενού, όπου τα δείγματα φυγοκεντρώνται σε χαμηλές στροφές, με ανοιχτά τα καπάκια των σωλήνων, υπό συνθήκες κενού, ώστε να επιτυγχάνεται εξάτμιση του υγρού περιεχομένου τους.

TE	10 mM Tris·HCl pH 8,0 & 1 mM EDTA.
TE_{0,1}	10 mM Tris·HCl pH 8,0 & 0,1 mM EDTA.
TEMED	Tetramethylethylenediamine / Τετραμεθυλαιθυλενοδιαμίνη, πολυμεριστικό μέσο της ακρυλαμίδης.
Tm	Melting temperature / Θερμοκρασία τήξης, θερμοκρασία στην οποία το 50% ενός ολιγονουκλεοτιδίου είναι υβριδοποιημένο με την απόλυτα συμπληρωματική αλυσίδα.
T-vector	Πλασμιδιακός φορέας που είναι γραμμικός και φέρει από μία αζευγάρωτη θυμίνη σε κάθε 3' ελεύθερο άκρο του.
Vortex	Συσκευή περιδίνησης (γρήγορης ανάδευσης).
X-gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranoside / 5-βρωμο-4-χλωρο-3-ινδουλο-γαλακτοσίδιο, υπόστρωμα που διασπάται από το ένζυμο α-γαλακτοσιδάση και χρωματίζεται μπλε κατά τη διάσπαση.
ZnAcetate	Zinc acetate / Οξικός ψευδάργυρος
Μετρητής Geiger	Συσκευή που μετράει το ρυθμό της ιονίζουσας ακτινοβολίας σε cps
Ομοιογενοποιητής Teflon	Γυάλινος ομοιογενοποιητής με έμβολο από Teflon 
πιπέτα Pasteur	
Σωλήνας eppendorf	
Σωλήνας τύπου Falcon	
Tris·HCl	Διάλυμα Tris, στο οποίο έχει ρυθμιστεί το pH με HCl
Φαινόλη/SEVAG	1 μέρος φαινόλη – pH 8,0 : 1 μέρος SEVAG.

Σημ.: Όλες οι φυγοκεντρήσεις διεξήχθησαν στις εξής φυγοκέντρους:

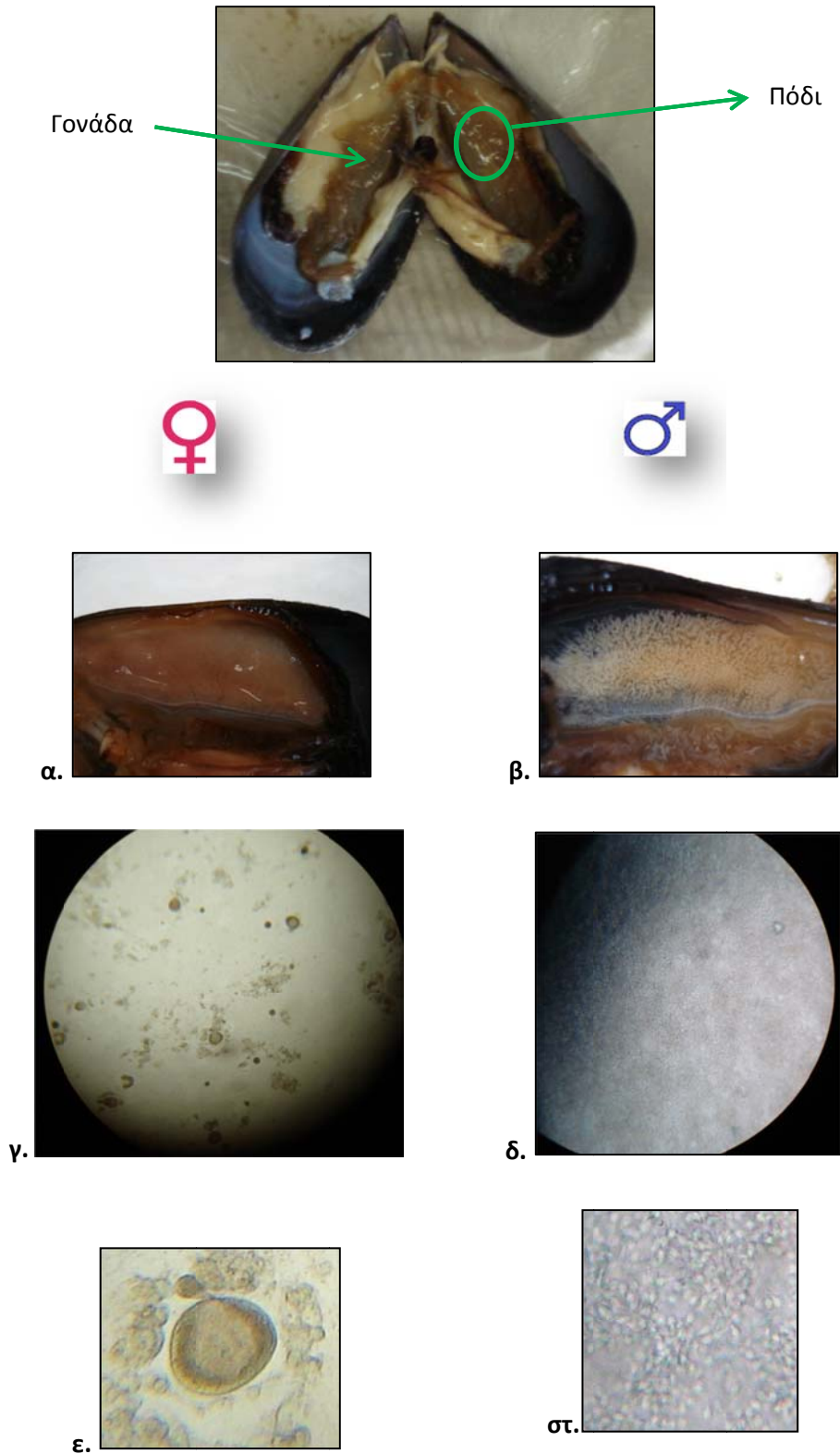
- ✓ Επιτραπέζια ψυχόμενη φυγόκεντρος *Universal 16R* από την εταιρεία *Hettich*. Κεφαλές: *Angle Rotor 24-place with lid, No. 1614* και *Rotor, 8-place free-swinging No. 1617*
- ✓ Επιτραπέζια φυγόκεντρος *Hettich-Mikroliter Cat.-No. 2022* από την εταιρεία *Hettich*
- ✓ Επιτραπέζια φυγόκεντρος *Espresso Personal Microcentrifuge, Model: 11210801* από την εταιρεία *Thermo Scientific*

2.1 Βιολογικό Υλικό

Στην παρούσα διατριβή χρησιμοποιήθηκαν μύδια του είδους *Mytilus galloprovincialis* (το κοινό μύδι της Μεσογείου) που αλιεύτηκαν από καλλιέργεια μυδιών στο Σαρωνικό κόλπο στην περιοχή της Νέας Περάμου (Πετρόπουλος Ανδρέας και ΣΙΑ ΟΕ – Μύδια Νέας Περάμου ΠΟΣΕΙΔΩΝ) κατά την αναπαραγωγική περίοδο των μυδιών, τους μήνες Νοέμβριο έως Μάρτιο. Τους μήνες αυτούς οι γονάδες των μυδιών είναι ώριμες, οπότε είναι δυνατός ο προσδιορισμός του φύλου κάθε ατόμου με μικροσκοπική παρατήρηση των γονάδων τους. Οι γονάδες είναι διάχυτες στο μανδύα και στη σπλαχνική μάζα σχηματίζοντας δύο ωοειδείς σάκους μέχρι τα χείλη του μανδύα (Εικόνα 2.1 α και β). Το μύδι είναι γονοχωριστικός οργανισμός. Η εμφάνιση ερμαφροδιτισμού αποτελεί εξαίρεση.

Η ανατομία πραγματοποιήθηκε σε μεγάλα τρυβλία σε πάγο για να αποφευχθεί η δράση νουκλεασών των κυττάρων.

Ο προσδιορισμός του φύλου έγινε με παρατήρηση δείγματος γονάδας στο μικροσκόπιο σε μεγέθυνση 100X και 400X για να διαπιστωθεί το φύλο του ατόμου. Η ανίχνευση αυγών στη μεγέθυνση 100X σήμαινε ότι πρόκειται για θηλυκό άτομο, ενώ η ανίχνευση σπερματοζωαρίων στη μεγέθυνση 400X υποδείκνυε αρσενικό άτομο (Εικόνα 2.1). Το ώριμο αυγό έχει μέγεθος 68 – 70 μm και περιβάλλεται από λεκιθικό περίβλημα πάχους 0,5 – 1 μm (Dan 1962).



Εικόνα 2.1. Μύδι μετά τη διάνοιξη των οστράκων. **(α)** Μέρος θηλυκής γονάδας. **(β)** Μέρος αρσενικής γονάδας. **(γ)** Δείγμα γονάδας θηλυκού ατόμου σε αντικειμενοφόρο πλάκα, παρατηρηθέν στο μικροσκόπιο σε μεγέθυνση 100X. **(δ)** Δείγμα γονάδας αρσενικού ατόμου σε αντικειμενοφόρο πλάκα, παρατηρηθέν στο μικροσκόπιο σε μεγέθυνση 400X. **(ε)** ώριμο αυγό. **(στ)** Ωριμα σπερματοζώαρια.

Μετά τον προσδιορισμό του φύλου του ατόμου, τμήμα του εκάστοτε ιστού (γονάδας ή ποδιού) κοβόταν και ξεπλενόταν με φυσιολογικό ορό πριν την λύση του για απομόνωση DNA, RNA ή πρωτεϊνών σύμφωνα με τα πρωτόκολλα που ακολουθούν.

2.2 Απομόνωση ολικών νουκλεϊκών οξέων από ιστούς μυδιού

Ακολουθείται τροποποιημένο το πρωτόκολλο από [Douris et al. \(1988\)](#). Η μέθοδος βασίζεται στην κατεργασία του ιστού με διάλυμα SDS και πρωτεϊνάσης K, ώστε να διαλυθούν οι κυτταρικές μεμβράνες και τα πρωτεϊνικά συστατικά.

1. Πρόσθετος τεμαχισμός κάθε κομματιού ιστού σε τμήματα $1 - 2 \text{ mm}^3$. Τρία ή τέσσερα το πολύ τέτοια τμήματα προχωρούν για απομόνωση ολικού DNA. Τα υπόλοιπα φυλάσσονται στην κατάψυξη στους -80°C . (ο όγκος του ιστού να είναι ίσος με περίπου $20 - 50 \text{ ml}$ -ο υπολογισμός γίνεται με το μάτι).
2. Τοποθέτηση του τεμαχισμένου ιστού σε 490 ml Lysis buffer (20 mM EDTA , 200 mM NaCl , $20 \text{ mM Tris-HCl pH } 7,5$, $2\% \text{ SDS}$).
3. Προσθήκη $12,5 \text{ ml}$ πρωτεϊνάσης K (20 mg/ml – για τελική συγκέντρωση 5 mg/ml) για τη διάλυση των πρωτεϊνικών κυτταρικών συστατικών. Επώαση στους 50°C με περιοδική χειροκίνητη ανάδευση, μέχρι να διαλυθεί πλήρως ο ιστός (συνήθως $30 - 60 \text{ min}$).
4. Εκχύλιση με ίσο όγκο ($0,5 \text{ ml}$) φαινόλης/SEVAG (vortex 1 min). Φυγοκέντρηση για 10 min στα 12.000 rpm . Αναρρόφηση του υπερκειμένου και μεταφορά του σε νέο καθαρό σωλήνα erpendorf.
5. Επανάληψη του βήματος 4 μέχρι να εξαφανισθεί η μεσόφαση, συν μία ακόμη φορά. ($3 - 4$ φορές συνολικά)
6. Προσθήκη δυο όγκων απόλυτης αιθανόλης στο τελικό υπερκείμενο, που θα έχει ήδη μεταφερθεί σε νέο καθαρό σωλήνα erpendorf. Ήπια ανάδευση (με αναστροφή πάνω-κάτω του σωλήνα $2 - 3$ φορές) και παραμονή του στους -20°C για τουλάχιστον μία ώρα.
7. Φυγοκέντρηση για 15 min στους 4°C στα 12.000 rpm και απόρριψη του υπερκειμένου.

8. Ξέπλυμα του ιζήματος με 500 μl 80% αιθανόλης (vortex 10 – 20 sec). Φυγοκέντρηση για 10 min στους 4°C στα 12.000 rpm. Απόρριψη του υπερκλειμένου.
9. Τοποθέτηση του σωλήνα σε ξηραντήρα κενού (desiccator) για 10 περίπου λεπτά. Προσοχή: Η παρατεταμένη παραμονή στον ξηραντήρα μπορεί να δυσκολέψει ή και να κάνει αδύνατη την μετέπειτα αναδιάλυση του DNA.
10. Προσθήκη 50 μl TE_{0,1} (10 mM Tris·HCl pH 8,0, 0,1 mM EDTA pH 8,0) για την αναδιάλυση του ιζήματος.

Εάν είναι επιθυμητή η απομάκρυνση του RNA, η διαδικασία συνεχίζεται ως εξής:

11. Προσθήκη 5 μl RNase A (10 mg/ml – για τελική συγκέντρωση 1 mg/ml) και επώαση στους 37°C για 30 min.
12. Προσθήκη 400 μl TE_{0,1} και 40 μl NaCl 5 M.
13. Εκχύλιση με φαινόλη/SEVAG μέχρι να εξαφανισθεί η μεσόφαση και μία ακόμη φορά.
14. Κατακρήμνιση με αιθανόλη όπως προηγουμένως.
15. Αναδιάλυση του ιζήματος με 40 μl TE_{0,1}.

2.3 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA

Για την απομόνωση πλασμιδιακού DNA επιλέχθηκε η μέθοδος της αλκαλικής λύσης (Birnboim and Doly 1979). Χρησιμοποιήθηκαν δύο πειραματικά πρωτόκολλα απομόνωσης πλασμιδιακού DNA, τα οποία διαφέρουν στην κλίμακα εφαρμογής τους και στην ποιότητα του πλασμιδιακού DNA που απομονώνεται. Η πρώτη διαδικασία (Ενότητα 2.3.1) χρησιμοποιήθηκε κατά την απομόνωση από μικρούς αρχικούς όγκους βακτηριακής καλλιέργειας (1,5 ml). Το πλασμιδιακό DNA που απομονώνεται είναι μειωμένης καθαρότητας. Η διαδικασία αυτή χρησιμοποιήθηκε κατά το στάδιο ελέγχου της επιτυχίας της κλωνοποίησης ώστε να είναι δυνατή η επιλογή των κατάλληλων κλώνων, μέσω αντιδράσεων πέψης με ενδονουκλεάσες περιορισμού. Η δεύτερη πειραματική διαδικασία (Ενότητα 2.3.2) χρησιμοποιήθηκε κατά την απομόνωση

πλασμιδιακού DNA από μεσαίους αρχικούς όγκους βακτηριακής καλλιέργειας (25 ml) και περιλαμβάνει επιπλέον βήματα καθαρισμού. Το DNA που απομονώνεται με το πρωτόκολλο αυτό χρησιμοποιείται σε οποιαδήποτε περαιτέρω επεξεργασία απαιτείται – στην παρούσα διατριβή χρησιμοποιήθηκε κατά τη διαδικασία παρασκευής ανιχνευτών αλλά και για προσδιορισμό πρωτοδιάταξης. Τέλος, χρησιμοποιήθηκαν και τυποποιημένες συσκευασίες (kits) απομόνωσης πλασμιδιακού DNA: GeneJet Plasmid Miniprep Kit (#K0502 Thermo) και NucleoSpin-Plasmid (#740588.50 Macherey-Nagel), όπου ακολουθήθηκε το πρωτόκολλο του κατασκευαστή, στις περιπτώσεις που ήταν απαραίτητη η άμεση απομόνωση πλασμιδιακού DNA (αρχική καλλιέργεια: 4,5 ml).

2.3.1 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μικρή κλίμακα (mini prep)

1. Ανάπτυξη 3 ml υγρής βακτηριακής καλλιέργειας με το επιθυμητό πλασμίδιο σε θρεπτικό υλικό LB με το κατάλληλο αντιβιοτικό (συνήθως αμπικιλίνη σε τελική συγκέντρωση 0,1 mg/ml) στους 37°C για 12 – 16 h.
2. Μεταφορά 1,5 ml της καλλιέργειας σε σωλήνα τύπου errendorf και φυγοκέντρωση σε 7.000 rpm για 2 min. Απόρριψη του υπερκείμενου με αναστροφή σε χλωρίνη.
3. Αναδιάλυση του βακτηριακού ιζήματος σε 100 μl διαλύματος GET (50 mM γλυκόζη 10 mM EDTA, 25 mM Tris·HCl pH 8) με μηχανική ανακίνηση (vortex). Παραμονή σε θερμοκρασία δωματίου για 5 min. *Πραγματοποιείται η λύση των κυτταρικών τοιχωμάτων.*
4. Προσθήκη 200 μl φρέσκου αλκαλικού διαλύματος (0,2 N NaOH, 1% SDS), ήπια ανάδευση και διατήρηση στον πάγο για 5 min. Στο στάδιο αυτό, το SDS προκαλεί τη λύση της κυτταρικής μεμβράνης και η αύξηση του pH – λόγω προσθήκης NaOH – την αποδιάταξη του DNA).
5. Προσθήκη 150 μl διαλύματος KAc (3 M CH₃COOK pH 4,8), μηχανική ανακίνηση (vortex) με το σωλήνα ανάποδα για 1 sec και παραμονή στον πάγο για 5 min. Στο βήμα αυτό πραγματοποιείται εξουδετέρωση των ιόντων υδροξυλίων που είχαν προστεθεί στο προηγούμενο στάδιο της διαδικασίας. Το pH επανέρχεται στο ουδέτερο και ξεκινά η αναδιάταξη των αλυσίδων του πλασμιδιακού DNA ενώ το χρωμοσωμικό DNA σχηματίζει αδιάλυτο ίζημα.

6. Φυγοκέντρηση στα 12.000 rpm, στους 4°C για 10 min. Μεταφορά του υπερκείμενου σε νέο σωλήνα (~400 μl).
7. Εκχύλιση με φαινόλη/SEVAG (~400 μl) για την αποδιάταξη πρωτεϊνών που ενδεχομένως έχουν παραμείνει στο διάλυμα. Μηχανική ανακίνηση για λίγα sec (vortex). Φυγοκέντρηση στα 12.000 rpm για 5 min. Μεταφορά της υδατικής φάσης (πάνω) σε νέο σωλήνα.
8. Προσθήκη 2 όγκων παγωμένης απόλυτης αιθανόλης (~800 μl) και διατήρηση στον πάγο για 10 min για την κατακρήμνιση του πλασμιδιακού DNA. Φυγοκέντρηση στα 12.000 rpm για 15 min στους 4°C. Άδειασμα του υπερκείμενου με αναστροφή και ξέπλυμα του ιζήματος με 500 μl διαλύματος αιθανόλης 80% για την απομάκρυνση των αλάτων και της αιθανόλης. Φυγοκέντρηση στα 12.000 rpm για 5 min στους 4°C.
9. Απόρριψη του υπερκείμενου με αναστροφή και ξήρανση του ιζήματος υπό κενό (~15 min).
10. Αναδιάλυση του ιζήματος σε 20 μl TE_{0,1}.

2.3.2 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μεσαία κλίμακα (midi prep)

1. Ανάπτυξη 25 ml βακτηριακής καλλιέργειας με το επιθυμητό πλασμίδιο σε θρεπτικό υλικό LB με το κατάλληλο αντιβιοτικό (συνήθως αμπικιλίνη σε τελική συγκέντρωση 0,1 mg/ml), σε σωλήνα τύπου Falcon των 50 ml στους 37°C, για 12 – 16 h.
2. Φυγοκέντρηση υγρής καλλιέργειας στα 5.000 rpm για 5 min (τα κύτταρα πέφτουν ως ίζημα). Απόρριψη υπερκείμενου με αναστροφή.
3. Αναδιάλυση του βακτηριακού διαλύματος σε 400 μl διαλύματος GET (50 mM γλυκόζη, 10 mM EDTA, 25 mM Tris-HCl pH 8) με μηχανική ανακίνηση (vortex). Παραμονή σε θερμοκρασία δωματίου για 5 min. Μοίρασμα σε 4 σωλήνες erpendorf (περίπου 120 μl σε κάθε σωλήνα erpendorf).
4. Προσθήκη 200 μl φρέσκου αλκαλικού διαλύματος (0,2 N NaOH, 1% SDS) σε κάθε σωλήνα, ήπια ανάδευση και διατήρηση στον πάγο για 10 min.

5. Προσθήκη 150 μl διαλύματος ΚΑc (3 Μ CH₃COOK pH 4,8), μηχανική ανακίνηση (vortex) με το σωλήνα ανάποδα για 1 sec και παραμονή στον πάγο για 10 min.
6. Φυγοκέντρηση στα 12.000 rpm, στους 4°C για 10 min. Μεταφορά του υπερκείμενου σε νέο σωλήνα.
7. Εκχύλιση με ίσο όγκο φαινόλης/SEVAG. Μηχανική ανακίνηση για 1 min (vortex). Φυγοκέντρηση στα 12.000 rpm για 5 min. Μεταφορά της υδατικής φάσης (πάνω φάση) σε νέο σωλήνα.
8. Προσθήκη σε κάθε σωλήνα 3 μl RNase A (10 mg/ml). Σύντομο vortex και επώαση στους 37°C για 45 min.
9. Εκχύλιση με φαινόλη/SEVAG (ίσος όγκος). Μηχανική ανακίνηση για 1 min (vortex). Φυγοκέντρηση στα 12.000 rpm για 5 min. Μεταφορά της υδατικής φάσης (πάνω φάση) σε νέο σωλήνα.
10. Προσθήκη 2 όγκων παγωμένης απόλυτης αιθανόλης και διατήρηση στον πάγο για 10 min. Φυγοκέντρηση στα 12.000 rpm για 15 min στους 4°C. Άδειασμα του υπερκείμενου με αναστροφή και ξέπλυμα του ιζήματος με 500 μl διαλύματος αιθανόλης 80%. Φυγοκέντρηση στα 12.000 rpm για 5 min στους 4°C.
11. Άδειασμα του υπερκείμενου με αναστροφή και ξήρανση του ιζήματος υπό κενό (~15 – 20 min).
12. Αναδιάλυση του ιζήματος σε 20 μl αποστειρωμένου, απεσταγμένου H₂O και ενοποίηση των τεσσάρων σωλήνων. Προσθήκη 20 μl NaCl 4 Μ και 100 μl 13% PEG (πολυαιθυλενογλυκόλη) 8.000. Παραμονή στον πάγο για τουλάχιστον 2 ώρες και 15 min.
13. Φυγοκέντρηση στα 13.000 rpm στους 4°C για 15 min.
14. Ξέπλυμα του ιζήματος 2 – 3 φορές με προσθήκη 500 μl 80% αιθανόλης και φυγοκέντρηση στα 12800 rpm για 10 min στους 4°C.
15. Ξήρανση υπό κενό (~15 min) και αναδιάλυση του ιζήματος σε 40 μl TE_{0,1}.

2.4 Απομόνωση RNA από ιστούς μυδιού

Για την απομόνωση RNA από γονάδα και πόδι μυδιού χρησιμοποιήθηκε το αντιδραστήριο TRIzol® Reagent (#15596-026 Invitrogen) και η τυποποιημένη συσκευασία Purelink™ RNA Mini kit

(#12183-018A Invitrogen). Τα: Spin cartridge, collection tube, Wash Buffer I, Wash Buffer II, Recovery Tube, RNase-free water αποτελούν συστατικά του kit.

Ακολουθήθηκε το πρωτόκολλο που παρατίθεται με το kit:

1. Ομοιογενοποίηση τμημάτων του ιστού σε 1 ml TRIzol ανά 50 – 100 mg ιστού χρησιμοποιώντας ομοιογενοποιητή Teflon. Ο όγκος των δειγμάτων δεν πρέπει να ξεπερνάει το 10% του όγκου του TRIzol που χρησιμοποιείται για την ομοιογενοποίηση (στην απαγωγό εστία λόγω επικινδυνότητας του TRIzol).
2. Επώαση λύματος με το TRIzol σε θερμοκρασία δωματίου για 5 min για να επιτραπεί ο πλήρης διαχωρισμός των νουκλεοπρωτεϊνικών συμπλόκων.
3. Προσθήκη 200 μl χλωροφορμίου ανά 1 ml TRIzol που χρησιμοποιήθηκε. Έντονη ανακίνηση του σωλήνα με το χέρι για 15 sec.
4. Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 2 – 3 min.
5. Φυγοκέντρηση του δείγματος στα 12.000 g για 15 min στους 4°C.
6. Μεταφορά περίπου 400 μl (από τα περίπου 600 μl) άχρωμης πάνω φάσης που περιέχει RNA σε νέο σωλήνα eppendorf.
7. Προσθήκη ίσου όγκου 70% αιθανόλης ώστε η τελική συγκέντρωση αιθανόλης να είναι 35%. Έντονη ανάδευση με vortex.
8. Αναστροφή σωλήνα για να διασκορπιστούν τυχόν ορατά ιζήματα που μπορεί να σχηματιστούν μετά την προσθήκη αιθανόλης.
9. Μεταφορά 700 μl δείγματος σε στήλη Spin cartridge (με Collection tube).
10. Φυγοκέντρηση στα 12.000 g για 15 sec σε θερμοκρασία δωματίου. Απόρριψη του περιεχομένου του Collection tube και επανατοποθέτηση του Spin cartridge.
11. Επανάληψη βημάτων 9 – 10 μέχρι να περάσει από το Spin cartridge όλο το δείγμα.
12. Προσθήκη 700 μl Wash Buffer I στο Spin cartridge. Φυγοκέντρηση στα 12.000 g για 15 sec σε θερμοκρασία δωματίου. Απόρριψη του Collection tube μαζί με το περιεχόμενό του. Εισαγωγή του Spin cartridge σε νέο Collection tube.
13. Προσθήκη 500 μl Wash Buffer II με αιθανόλη στο Spin cartridge,

14. Φυγοκέντρηση στα 12.000 g για 15 sec σε θερμοκρασία δωματίου. Απόρριψη του περιεχομένου του Collection tube και επανατοποθέτηση του Spin cartridge.
15. Επανάληψη βημάτων 13 – 14 μία φορά.
16. Φυγοκεντρηση του Spin cartridge με το Collection tube στα 12.000 g για 1 min σε θερμοκρασία δωματίου για να στεγνώσει η μεμβράνη με το προσκολλημένο RNA. Απόρριψη του Collection tube και εισαγωγή του Spin cartridge σε Recovery tube (κοινό σωλήνα erpendorf).
17. Προσθήκη 30 – 100 µl (3 διαδοχικές εκλούσεις με 30 – 100 µl έκαστη) RNase-free water στο κέντρο του Spin cartridge.
18. Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 1 min.
19. Φυγοκέντρηση του Spin cartridge με το Recovery tube για 2 min σε >12.000 g σε θερμοκρασία δωματίου.
20. Αποθήκευση στον πάγο εάν πρόκειται να χρησιμοποιηθεί μέσα σε λίγες ώρες. Για μακρόχρονη αποθήκευση: -80°C.

Σημ.: Υπάρχει κίνδυνος αποικοδόμησης του RNA από ριβονουκλεάσες, για αυτό όλα τα γυαλικά, πλαστικά, πιπέτες, επιφάνειες που χρησιμοποιούνται θα πρέπει να αποστειρώνονται πάρα πολύ καλά.

2.5 Αντίστροφη μεταγραφή (Reverse Transcription - RT)

Πρόκειται για μια μέθοδο, η οποία μιμείται *in vitro* την ικανότητα που έχουν ορισμένοι RNA-ιοί να μεταγράφουν αντίστροφα το γενετικό τους υλικό, το οποίο είναι RNA, σε DNA (το οποίο μετέπειτα ενσωματώνεται στο γενετικό υλικό του ξενιστή). Η διαδικασία στους ιούς αυτούς καταλύεται από ένα ένζυμο που ονομάζεται αντίστροφη μεταγραφάση (reverse transcriptase). Αντίστροφες μεταγραφάσες έχουν απομονωθεί από διάφορους ιούς και χρησιμοποιούνται πλέον στο εργαστήριο για *in vitro* αντίστροφη μεταγραφή του RNA. Τέσσερις αντίστροφες μεταγραφάσες είναι οι πιο μελετημένες:

- HIV-1 (από τον ιό HIV)
- M-MuLV (από τον ιό Moloney murine leukemia virus)

- AMV (από τον ιό Avian myeloblastosis virus)
- Telomerase Reverse Transcriptase (διατηρεί τα τελομερή των ευκαρυωτικών χρωμοσωμάτων)

Σε εργαστηριακή ρουτίνα για τη μέθοδο RT χρησιμοποιούνται κυρίως οι AMV και M-MuLV αντίστροφες μεταγραφάσες. Για τη διαδικασία της αντίστροφης μεταγραφής απαιτείται ένα ολιγονουκλεοτίδιο που λειτουργεί ως ανάστροφος (reverse) DNA εκκινήτης, συμπληρωματικός με κάποιο τμήμα του RNA μεταγράφου. Μετά την υβριδοποίηση του εκκινήτη, στο 3' άκρο του, η αντίστροφη μεταγραφάση μπορεί να ξεκινήσει να τοποθετεί συμπληρωματικά δεοξυριβονουκλεοτίδια απέναντι από τα ριβονουκλεοτίδια του RNA, συνθέτοντας έτσι μια συμπληρωματική cDNA αλυσίδα (complementary DNA). Τριών ειδών εκκινήτες (primers) χρησιμοποιούνται στην αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής, αναλόγως με το σκοπό του πειράματος:

- oligodT primers: εκκινήτες που φέρουν μια αλληλουχία δεοξυθυμινών, συμπληρωματική με την ουρά πολυαδενινών που έχουν να περισσότερα μετάγραφα.
- random (hexamer) primers: ολιγονουκλεοτίδια με τυχαία αλληλουχία η οποία λόγω μικρού μήκους (έξι νουκλεοτίδια), σίγουρα θα συναντάται στα περισσότερα μεταγραφα.
- gene-specific primers: εκκινήτες με συγκεκριμένη αλληλουχία που αποσκοπούν στην αντίστροφη μεταγραφή συγκεκριμένων μεταγράφων.

Κάποιες αντίστροφες μεταγραφάσες διαθέτουν ενεργότητα RNase H, η οποία μετά τη σύνθεση του cDNA αποικοδομεί το RNA στα υβρίδια RNA-cDNA. Οι αντίστροφες μεταγραφάσες που δεν διαθέτουν τέτοια ενεργότητα, φέρουν τη διάκριση RNase H⁻ ή H Minus στην ονομασία τους.

Όσον αφορά στα συστατικά που χρησιμοποιούνται, τις ποσότητες, καθώς και τις συνθήκες της αντίδρασης, συνήθως εφαρμόζεται το πρωτόκολλο της εκάστοτε εταιρείας που συνοδεύει την αντίστροφη μεταγραφάση.

Στην παρούσα διατριβή χρησιμοποιήθηκαν οι ακόλουθες αντίστροφες μεταγραφάσες:

- AMV Reverse Transcriptase (#F-520 Finnzymes)
- AMV Reverse Transcriptase (#M5101 Promega)
- M-MuLV Reverse Transcriptase RNase H- (#F-572 Finnzymes)
- M-MuLV Reverse Transcriptase (#EP0447 Fermentas)
- M-MuLV RevertAid Reverse Transcriptase H Minus (#EP0459 Fermentas)
- M-MuLV RevertAid Reverse Transcriptase (#EP0441 Thermo Scientific)

Στην αντίδραση προστίθετο επιπλέον:

- Το ρυθμιστικό διάλυμα (Buffer) της εκάστοτε αντίστροφης μεταγραφάσης στην αραιώση που προβλέπεται από το πρωτόκολλο.
- Δεοξυριβονουκλεοτίδια A, T, G, C (dNTPs) σε τελική συγκέντρωση 2 mM
- Ένας αναστολέας ριβονουκλεασών – RNasin® Ribonuclease Inhibitor (#N251A ή #N2111 Promega): 20 u
- Ο επιθυμητός εκκινητής (primer)
- Ολικό RNA ιστού (κυκλοποιημένο η μη – βλ. Ενότητα 2.19.3) σε συγκέντρωση που προβλέπεται από το πρωτόκολλο.

Ο όγκος συμπληρωνόταν με νερό ελεύθερο νουκλεασών - RNase/DNase-free Distilled Water (#10977 GIBCO).

Αρχικά, το RNA, το νερό και ο εκκινητής προεπιάζονται στους 70°C για 10 min για την αποδιάταξη τυχόν δίκλωνων δομών του RNA και του εκκινητή. Το μίγμα μεταφέρεται αμέσως στον πάγο για 5 min. Επακόλουθα προστίθενται και τα υπόλοιπα συστατικά και το δείγμα επωάζεται στους 42°C για 1 h κατά την οποία λαμβάνει χώρα η αντίστροφη μεταγραφή. Τέλος μπορεί να γίνει απενεργοποίηση της αντίστροφης μεταγραφάσης τοποθετώντας το δείγμα για 10 min στους 70°C.

2.6 Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction – PCR)

Η αντίδραση PCR αποτελεί έναν μοναδικό τρόπο *in vitro* πολλαπλασιασμού ενός τμήματος DNA σε εκατομμύρια αντίγραφα.

Ουσιαστικά η μέθοδος αυτή «μιμείται» τη φυσική ικανότητα του κυττάρου να αντιγράφει το γενετικό του υλικό με τη βοήθεια του ενζύμου DNA πολυμεράση και μικρών RNA αλληλουχιών που συντίθενται στα σημεία έναρξης της αντιγραφής (συμπληρωματικά) και δρουν ως εκκινητές της αντίδρασης (πρωταρχικά τμήματα). Η πολυμεράση δεν είναι σε θέση να ξεκινήσει την αντιγραφή χωρίς την παρουσία των πρωταρχικών τμημάτων, διότι ο ρόλος της έγκειται στην τοποθέτηση νουκλεοτιδίων σε προϋπάρχον 3' άκρο (πολυμερισμός και επιμήκυνση της νεοσυντιθέμενης αλυσίδας). Τα πρωταρχικά τμήματα έπειτα απομακρύνονται (εφόσον είναι RNA) και στη θέση τους τοποθετούνται DNA νουκλεοτίδια.

In vitro, με τη μέθοδο PCR, προσομοιάζεται η φυσιολογική αυτή πορεία, αφού για την αντίδραση χρησιμοποιείται το ένζυμο DNA πολυμεράση απομονωμένο από κάποιον μικροοργανισμό. Ως εκ τούτου θα πρέπει να χρησιμοποιηθούν και εκκινητές. Το ρόλο αυτό διαδραματίζουν στην προκειμένη περίπτωση μικρές συνθετικές DNA αλληλουχίες - ολιγονουκλεοτίδια (15 – 30 νουκλεοτιδίων) που σχεδιάζονται με τέτοιον τρόπο ώστε υβριδοποιούμενες να οριοθετούν το τμήμα που επιθυμούμε να πολλαπλασιάσουμε και να περιλαμβάνονται στη νεοσυντιθέμενη αλυσίδα. Το DNA είναι δίκλωνο, επομένως χρειαζόμαστε 2 αντιπαράλληλης κατεύθυνσης εκκινητές (primers) για κάθε αντίδραση PCR, έναν για την κάθε αλυσίδα.

Πρώτοι οι [Kleppe et al. \(1971\)](#) περιέγραψαν μια μέθοδο που περιελάμβανε ενζυμική δοκιμασία για την *in vitro* αντιγραφή ενός μικρού τμήματος DNA με εκκινητές. Εντούτοις, αυτή η πρώιμη περιγραφή της βασικής αρχής της PCR δεν έτυχε ιδιαίτερης προσοχής και η εφεύρεση της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης το 1983 αποδίδεται γενικά στον [Kary Mullis \(Saiki et al. 1988\)](#). Ο Mullis εφήυρε μια μέθοδο πολλαπλασιασμού ενός τμήματος DNA μέσω επαναλαμβανόμενων

κύκλων διπλασιασμού στους οποίους κυρίαρχο ρόλο παίζει η DNA πολυμεράση. Για την PCR όμως, απαιτείται μια DNA πολυμεράση που να αντέχει τις υψηλές θερμοκρασίες $>90^{\circ}\text{C}$ που απαιτούνται για τον διαχωρισμό των δύο αλυσίδων DNA στη διπλή έλικα μετά από κάθε κύκλο αντιγραφής. Οι DNA πολυμεράσες που χρησιμοποιήθηκαν αρχικά, ήταν ανίκανες να αντέξουν τέτοιες θερμοκρασίες. Οπότε οι πρώιμες διαδικασίες *in vitro* αντιγραφής του DNA ήταν αρκετά αναποτελεσματικές και χρονοβόρες, και απαιτούσαν μεγάλες ποσότητες DNA πολυμεράσης και συνεχή χειρισμό κατά τη διάρκεια της διαδικασίας. Η ανακάλυψη το 1976 της Taq πολυμεράσης – μιας DNA πολυμεράσης που απομονώθηκε από το θερμόφιλο βακτήριο *Thermus aquaticus*, που ζει φυσιολογικά σε θερμά (50°C έως 80°C) περιβάλλοντα, όπως οι θερμοπηγές – άνοιξε το δρόμο για δραματικές βελτιώσεις στη μέθοδο PCR. Η DNA πολυμεράση που απομονώθηκε από το *T. aquaticus* είναι σταθερή σε υψηλές θερμοκρασίες και παραμένει ενεργή ακόμη και μετά την αποδιάταξη του DNA, καταργώντας συνεπώς την ανάγκη για προσθήκη νέας DNA πολυμεράσης μετά από κάθε κύκλο. Αυτό επέτρεψε μια αυτοματοποιημένη διαδικασία για τον πολλαπλασιασμό του DNA που αποτελείται από συνεχείς επαναλαμβανόμενους κύκλους πολυμερισμού του DNA.

Πιο κάτω περιγράφονται τα συστατικά που απαιτούνται για μια αντίδραση PCR.

2.6.1 Συστατικά και συνθήκες της αντίδρασης PCR

Εκκινητές (primers)

Η επιλογή της αλληλουχίας ενός εκκινητή δεν είναι εύκολη υπόθεση. Για να έχει μεγαλύτερες πιθανότητες να λειτουργήσει σωστά στην αντίδραση PCR θα πρέπει να πληροί κάποιες προϋποθέσεις:

- ✓ Το μέγεθός του πρέπει να κυμαίνεται από 15 – 30 νουκλεοτίδια που να υβριδοποιούνται στην αρχή (για τον εκκινητή της μιας αλυσίδας – Forward/Sense primer) και στο τέλος (για τον εκκινητή της άλλης αλυσίδας – Reverse/Anti-Sense Primer) του τμήματος DNA που επιθυμούμε να πολλαπλασιάσουμε. Το μικρότερο μέγεθος εκκινητή που μπορεί να χρησιμοποιηθεί είναι 9 νουκλεοτίδια. Όσο πιο μικρό

όμως το μέγεθος εκκινητή, τόσο αυξάνει ο κίνδυνος να υπάρχει μια DNA αλληλουχία όμοια με αυτή η οποία περιέχεται στο τμήμα DNA που επιθυμούμε να πολλαπλασιάσουμε και επομένως, αυξάνεται η πιθανότητα να προκύψουν προϊόντα μη-ειδικά, δηλαδή άσχετα με το επιθυμητό μας προϊόν.

- ✓ Αυτό που μας ενδιαφέρει περισσότερο, είναι να υπάρχει η βέλτιστη δυνατή συμπληρωματικότητα μεταξύ του 3' άκρου του εκκινητή και της DNA μήτρας, διότι από εκεί θα αρχίσει να επιμηκύνει η DNA πολυμεράση. Μάλιστα, πολλές φορές φροντίζουμε στο 3' άκρο να υπάρχουν C-G δεσμοί (3 δεσμοί υδρογόνου) για να είναι πιο σταθερή η πρόσδεση.
- ✓ Μέσα σε έναν εκκινητή, μπορούμε να εισάγουμε εκφυλισμένες βάσεις. Αν για παράδειγμα σε κάποια θέση προκύπτει από στοίχιση ότι μπορεί να υπάρχει είτε T είτε A, τότε εισάγουμε την εκφυλισμένη βάση W, η οποία συμπεριφέρεται και ως A και ως T, στην αντίστοιχη θέση του εκκινητή. Οι εκφυλισμένες βάσεις που μπορούν να χρησιμοποιηθούν είναι οι εξής:

A = Αδενοσίνη (Adenosine)	R = A ή G (Πουρίνη - puRine)
C = Κυτιδίνη (Cytidine)	Y = C ή T (Πυριμιδίνη - pYrimidine)
G = Γουανοσίνη (Guanosine)	K = G ή T (Κετο - Keto)
T = Θυμιδίνη (Thymidine)	M = A ή C (Αμινο - aMino)
B = C, G ή T	S = G ή C (Ισχυρό - Strong -3 δεσμοί H)
D = A, G ή T	W = A ή T (Ασθενές - Weak -2 δεσμοί H)
H = A, C ή T	N = Οποιαδήποτε βάση (aNy base)
V = A, C ή G	

- ✓ Επίσης, μέσα σε έναν εκκινητή ή στα άκρα του, μπορούμε να εισάγουμε μία θέση περιορισμού για κάποια περιοριστική ενδονουκλεάση. Αν είναι εσωτερικά στον εκκινητή, τότε θα πρέπει να σχηματίζεται έτσι κι αλλιώς από τις βάσεις που υπάρχουν στο DNA αλλά ίσως να χρειάζεται π.χ. η προσθήκη/αλλαγή μίας βάσης για να ολοκληρωθεί. Οπότε όταν θα γίνει η υβριδοποίηση εκκινητή-μήτρας, θα εισαχθεί μία περιοριστική θέση. Αν θέλουμε να εισάγουμε στην άκρη μία θέση περιορισμού, τότε μπορούμε να προσθέσουμε όσες βάσεις θέλουμε για να σχηματιστεί εκ νέου μία θέση, αρκεί η προσθήκη να γίνει στο 5' άκρο, διότι τα νουκλεοτίδια της θέσης

περιορισμού δε θα ζευγαρώνουν με τη μήτρα. Αυτό είναι ανεκτό για το 5' άκρο, εφόσον θα υπάρχουν επαρκή νουκλεοτίδια στον εκκινητή που θα ζευγαρώνουν κανονικά, είναι όμως απαγορευτικό για το 3' άκρο το οποίο, όπως αναφέρθηκε, πρέπει να ζευγαρώνει πολύ καλά. Επίσης, τα νουκλεοτίδια της θέσης περιορισμού που δεν ζευγαρώνουν με τη DNA μήτρα, δεν πρέπει να συμμετέχουν στον υπολογισμό του T_m του εκκινητή (βλέπε πιο κάτω).

- ✓ Κατά το σχεδιασμό ενός εκκινητή μας ενδιαφέρει επίσης η θερμοκρασία υβριδοποίησής του, που αντιστοιχεί στη θερμοκρασία τήξης - melting temperature (T_m) του. T_m είναι η θερμοκρασία στην οποία το 50% του ολιγονουκλεοτιδίου είναι υβριδοποιημένο με την απόλυτα συμπληρωματική μήτρα του. Το T_m εξαρτάται κυρίως από το μήκος του εκκινητή και το νουκλεοτιδικό περιεχόμενό του. Όσο περισσότερα G και C περιέχει ένας εκκινητής τόσο υψηλότερο είναι το T_m γιατί μεταξύ G και C σχηματίζονται 3 δεσμοί υδρογόνου ενώ μεταξύ A και T, 2 δεσμοί. Συνήθως λαμβάνεται μέριμνα ώστε να υπάρχει παρεμφερής σύσταση (περίπου 50%) G+C μεταξύ των δύο εκκινητών. Άλλοι παράγοντες που επηρεάζουν το T_m είναι η συγκέντρωση αλάτων, η συγκέντρωση των DNA αλυσίδων και η παρουσία αποδιατακτικών παραγόντων (όπως φορμαμίδιο ή DMSO). Ο απλούστερος και επικρατέστερος τύπος για υπολογισμό του T_m ενός εκκινητή είναι ο κανόνας του Wallace:

$$T_d = 2^{\circ}\text{C}(\text{A}+\text{T}) + 4^{\circ}\text{C}(\text{G}+\text{C})$$

Αυτή η εξίσωση δημιουργήθηκε για μικρά DNA ολιγονουκλεοτίδια 14 – 20 βάσεις που υβριδοποιούνται σε DNA μήτρα προσδεμένη σε μεμβράνη σε 0,9 M NaCl. Στην πράξη όμως, η DNA μήτρα δεν είναι προσδεμένη σε μεμβράνη ούτε η συγκέντρωση άλατος είναι πάντα αυτή κατά την PCR.

Για το λόγο αυτό, υπάρχουν αλγόριθμοι που υπολογίζουν το T_m εισάγοντας την αλληλουχία του εκκινητή και συγκέντρωση αλάτων. Παράδειγμα τέτοιου αλγόριθμου, που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα διατριβή είναι ο:

<https://www.promega.com/techserv/tools/biomath/calc11.htm>

Είναι προτιμότερο, το Tm των δύο εκκινητών που θα χρησιμοποιηθούν στην αντίδραση PCR να μην απέχει πάρα πολλούς βαθμούς.

- ✓ Τέλος, μας ενδιαφέρει ο εκκινητής να μη δημιουργεί διμερή με τον εαυτό του, τον έτερο εκκινητή με τον οποίο θα χρησιμοποιηθεί στην αντίδραση PCR και να μην αναδιπλώνεται σε δομές μίσχου-θηλιάς: stem-loop (δομές φουρκέτας - hairpin structures). Όλα αυτά μπορούν να προβλεφτούν με ειδικά προγράμματα σχεδιασμού εκκινητών, όπου δίνονται και οι τιμές ΔG των δίκλωνων δομών που σχηματίζονται. Αν η δομή έχει $\Delta G < -5$ τότε είναι πολύ σταθερή, επομένως θα πρέπει να σχεδιάσουμε διαφορετικό εκκινητή. Παράδειγμα τέτοιου προγράμματος που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα διατριβή, είναι το: <http://www.genelink.com/tools/gl-downloads.asp>

Ο καθαρισμός του κάθε εκκινητή, ο προσδιορισμός της μοριακής συγκέντρωσης αλλά και ο τελικός προσδιορισμός του Tm γίνεται από τον κατασκευαστή. Όλοι οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα διδακτορική διατριβή απαριθμούνται στους Πίνακες 2.4 και 2.5. Σε κάθε αντίδραση PCR της παρούσας διατριβής οι δύο εκκινητές χρησιμοποιήθηκαν σε τελική συγκέντρωση 0,5 μΜ.

dNTPs

Σε κάθε αντίδραση PCR χρησιμοποιείται μίγμα τεσσάρων δεοξυριβονουκλεοτιδίων (dNTPs) σε τελική συγκέντρωση 200 μΜ το καθένα. Συνήθως παρασκευάζεται ένα ισομοριακό μίγμα δεκαπλάσιας συγκέντρωσης (2 mM) το οποίο διατηρείται σε θερμοκρασία -20°C για συνεχή χρήση.

Taq DNA polymerase

Η συγκέντρωση *Taq* DNA πολυμεράσης στην αντίδραση PCR εξαρτάται από την εκάστοτε εταιρεία παραγωγής της. Η DreamTaq Polymerase (#EP0702 Fermentas – Thermo Scientific) που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα διατριβή, λειτουργεί βέλτιστα σε συγκεντρώσεις 0,025 u/μl – 0,125 u/μl. Κάθε πολυμεράση συνοδεύεται από ένα ρυθμιστικό διάλυμα (buffer) το οποίο πρέπει να αραιωθεί, σύμφωνα με το πρωτόκολλο, στο μίγμα της αντίδρασης. Το buffer αυτό

μπορεί να περιέχει κάποια χρωστική (συνήθως πράσινη) για να μπορούν απευθείας να ηλεκτροφορηθούν οι αντιδράσεις μετά το τέλος της PCR. Επίσης μπορεί να περιέχει $MgCl_2$ ή κάποιο άλλο άλας.

Υπάρχουν διαφόρων ειδών Taq πολυμεράσες. Χρειάζεται πολλή προσοχή και μελέτη των ιδιοτήτων της καθεμιάς για την επιλογή αυτής που ταιριάζει στο εκάστοτε πείραμα, αναλόγως π.χ. με το μέγεθος τμημάτων που επιμηκύνουν, το αν έχουν ή όχι ικανότητα επιδιόρθωσης, το αν προσθέτουν στο 3' άκρο dA (βλ. Ενότητα 2.11.2.2) ή αφήνουν απότομα άκρα (blunt ends) στα προϊόντα PCR, το αν μπορούν να ενσωματώσουν ή όχι τροποποιημένα νουκλεοτίδια, κλπ.

MgCl₂

Τα ιόντα Mg^{++} είναι συμπράγοντας της πολυμεράσης και είναι απαραίτητα για τη διεξαγωγή της αντίδρασης. Κατά κανόνα προστίθενται στην αντίδραση με τη μορφή $MgCl_2$ και η συγκέντρωσή του τελευταίου μπορεί να κυμαίνεται από 1,5 – 4 mM, με βέλτιστα αποτελέσματα συνήθως στις συγκεντρώσεις 2 – 2,5 mM. Ενδέχεται το Buffer της πολυμεράσης να περιέχει ήδη $MgCl_2$ σε κάποια συγκέντρωση. Όσο αυξάνεται τη συγκέντρωση $MgCl_2$ στην αντίδραση PCR, τόσο μειώνεται η ειδικότητα της αντίδρασης. Επίσης, η παρουσία χηλικών παραγόντων οι οποίοι δεσμεύουν δισθενή κατιόντα, π.χ. το EDTA, μπορεί να μειώσει την πραγματική συγκέντρωση Mg^{++} .

Υπόστρωμα - μήτρα DNA

Θεωρητικά, οποιοδήποτε τμήμα του γονιδιώματος μπορεί να πολλαπλασιαστεί με PCR από ολικά εκχυλίσματα DNA, από οποιοδήποτε ιστό και αν προέρχονται. Φυσικά το DNA πρέπει να είναι όσο το δυνατόν πιο ακέραιο, όπως επίσης και απαλλαγμένο από προσμίξεις (π.χ. απορρυπαντικά, EDTA, ίχνη φαινόλης) ώστε να ελαχιστοποιηθεί η πιθανότητα αναστολής της δράσης του ενζύμου. Η συγκέντρωση και η καθαρότητα του DNA μπορεί να προσδιοριστεί φασματοφωτομετρικά. Επιπλέον γίνεται ηλεκτροφορητικός έλεγχος ώστε να διαπιστωθεί η ποιότητα του απομονωμένου DNA. Η ποσότητα του DNA που χρησιμοποιείται στην αντίδραση είναι συνάρτηση της πολυπλοκότητας του DNA (δηλαδή του βαθμού αντιπροσώπευσης του επιθυμητού

τμήματος DNA). Συνήθως, απαιτείται ποσότητα από 0,01 – 1 μg για τον πολλαπλασιασμό οποιουδήποτε τμήματος DNA.

Συνθήκες της αντίδρασης

Τα πιο πάνω συστατικά αναμιγνύονται σε σωλήνα erpendorf των 0,5 ml ή των 0,25 ml (ανάλογα με τη συσκευή PCR που θα χρησιμοποιηθεί) (Πίνακας 2.1). Ανάλογα με τις ειδικές απαιτήσεις της κάθε αντίδρασης, οι συνθήκες (θερμοκρασία και χρόνος του κάθε βήματος) μπορεί να ποικίλουν (Πίνακας 2.2). Κατά κανόνα, μία αντίδραση περιλαμβάνει τα εξής βήματα:

1. Ένα αρχικό στάδιο αποδιάταξης στους 95°C για 1 έως 3 min (Συνήθως 2 min).
2. Έναν αριθμό κύκλων πολυμερισμού. Οι κύκλοι αυτοί περιλαμβάνουν αποδιάταξη στην ίδια θερμοκρασία για 10 έως 30 sec (συνήθως 30 sec), πρόσδεση των εκκινητών σε θερμοκρασία που καθορίζεται από το σημείο τήξης τους (T_m - συνήθως 2 – 3°C χαμηλότερα από το T_m του εκκινητή με το χαμηλότερο T_m) από 20 έως 30 sec (συνήθως 30 sec) και επιμήκυνση στους 72°C ή 74°C (ανάλογα με την *Taq* πολυμεράση) για 10 sec έως 3 min (με βάση το θεωρητικό κανόνα ότι η *Taq* πολυμεράση μπορεί να αντιγράψει 1 kb/min - η ταχύτητα αυτή μπορεί να ποικίλλει ανάλογα με την *Taq* πολυμεράση που χρησιμοποιείται). Ο αριθμός των κύκλων ποικίλλει και εξαρτάται από το βαθμό αντιπροσώπευσης του επιθυμητού DNA (τυπική τιμή 30 – 35 κύκλοι). Όσο αυξάνουμε τη θερμοκρασία πρόσδεσης των εκκινητών (annealing) τόσο αυξάνουμε την ειδικότητα της αντίδρασης.
3. Ένα τελευταίο στάδιο επιμήκυνσης στη θερμοκρασία βέλτιστης δράσης του κάθε ενζύμου (72°C ή 74°C) για 5 – 25 min, προκειμένου να πολυμεριστούν όλα τα ατελή τμήματα DNA. Ειδικά αν πρόκειται, τα τμήματα DNA που θα προκύψουν, να κλωνοποιηθούν σε φορείς T-vectors (βλ. Ενότητα 2.11.2), τότε η τελική επιμήκυνση πρέπει να διαρκεί 20 – 25 λεπτά για να είναι βέβαιο ότι η πλειοψηφία των ατελών τμημάτων πολυμερίστηκαν και προστέθηκε και η αδερίνη στο 3' άκρο από την πολυμεράση.

Πίνακας 2.1: Συστατικά και συγκεντρώσεις τους, που χρησιμοποιήθηκαν στις αντιδράσεις PCR της παρούσας διδακτορικής διατριβής

Συστατικό	Προέλευση	Τελική Συγκέντρωση
Taq polymerase	Fermentas/Thermo Scientific #EP0702 (DreamTaq™ DNA Polymerase)	0,025 u/μl
Taq Buffer	Fermentas/Thermo Scientific (10X DreamTaq™ Buffer)	1 X
Primers	Κάποιοι συντέθηκαν από την εταιρεία Invitrogen και άλλοι από τη VBC Αυστρίας.	0,5 μM
dNTPs	Invitrogen/ Fermentas/Applied Biosystems	200 μM
MgCl₂	Fermentas	2 – 3 mM
DNA template	Απομονωμένο από ιστό, πλασμίδιο από midi-prep ή cDNA	50 – 100 ng
H₂O	Water for injection	Συμπλ. έως τα 25 ή τα 50 μl

Πίνακας 2.2: Συνθήκες αντιδράσεων PCR της παρούσας διδακτορικής διατριβής

Στάδια αντίδρασης PCR	Θερμοκρασία	Χρόνος	
Αρχικό στάδιο αποδιάταξης	95°C	2 min	
Αποδιάταξη	95°C	30 sec	} 35 κύκλοι
Υβριδοποίηση σε θερμοκρασία ανάλογη με το T _m των εκκινητών	48°C – 57°C	30 sec	
Επιμήκυνση σε χρόνο ανάλογο με το μέγεθος σε bp του επιθυμητού τμήματος DNA	72°C	10 sec – 3 min	
Τελικό στάδιο επιμήκυνσης	72°C	25 min	

Μαζί με τις αντιδράσεις που περιέχουν υπόστρωμα DNA προς ενίσχυση, συγκροτείται και μία αντίδραση «τυφλού» δείγματος (blank). Το «τυφλό» δείγμα περιέχει όλα τα συστατικά της PCR που περιέχει μία αντίδραση με τις αντίστοιχες συγκεντρώσεις, με τη διαφορά ότι απουσιάζει το υπόστρωμα DNA. Έτσι το «τυφλό» δείγμα αναμένουμε να μη δίνει κανένα προϊόν μετά το πέρας της αντίδρασης PCR. Έτσι μπορούμε να βεβαιωθούμε ότι τα διαλύματά μας δεν είναι επιμολυσμένα με κάποιο μη – επιθυμητό DNA. Από κάθε αντίδραση PCR συνήθως ηλεκτροφορούνται 5 μl για έλεγχο των προϊόντων.

2.6.2 PCR Επέκτασης Αλληλοεπικαλυπτόμενων Τμημάτων (Overlap Extension PCR)

Η μέθοδος που ακολουθήθηκε είναι αυτή που πρότειναν οι [Lee et al. \(2010\)](#) σύμφωνα με την οποία μπορούμε να δημιουργήσουμε ελλείψεις, προσθήκες και αντικαταστάσεις βάσεων σε επιθυμητό τμήμα DNA με δύο ξεχωριστά βήματα αντιδράσεων PCR χρησιμοποιώντας ειδικούς «χιμαιρικούς» εκκινητές. Γενικά η διαδικασία συνίσταται σε δύο διαδοχικά βήματα PCR. Στο πρώτο βήμα δημιουργούμε, με χρήση δυο ζευγών εκκινητών, τμήματα DNA με τις επιθυμητές αλλαγές τα οποία έχουν αλληλοεπικαλυπτόμενα άκρα. Στη συνέχεια τα τμήματα DNA που προκύπτουν αναμιγνύονται και υβριδοποιούνται (λόγω των αλληλοεπικαλυπτόμενων άκρων) και τα προκύπτοντα υβρίδια ενισχύονται στο δεύτερο βήμα της PCR για παραγωγή τελικά του ανασυνδυασμένου προϊόντος.

Κατασκευή χιμαιρικών εκκινητών

Η βασική στρατηγική για τη δημιουργία τόσο αντικαταστάσεων, όσο και ελλείψεων συγκεκριμένου μεγέθους αφορά την κατασκευή «χιμαιρικών» εκκινητών οι οποίοι θα δημιουργήσουν τα αλληλοεπικαλυπτόμενα άκρα μετά την PCR στο πρώτο βήμα. Οι χιμαιρικοί αυτοί εκκινητές έχουν ελάχιστο μέγεθος 27 nt, το οποίο προκύπτει από (1) μία αλληλουχία 18 nt προερχόμενη από το επιθυμητό υπόστρωμα DNA, και (2) μία αλληλουχία 9 nt προερχόμενη από την αλληλουχία DNA που θα προστεθεί ως «ουρά» στην περίπτωση αντικαταστάσεων, ενώ στην περίπτωση δημιουργίας ελλείψεων η αλληλουχία 9 nt θα είναι

συμπληρωματική με το DNA εκατέρωθεν της αλληλουχίας που θέλουμε να αφαιρέσουμε.

Η πιο πάνω σύμβαση για το μέγεθος των εκκινητών βασίζεται (1) στο ότι 18 nt είναι το ελάχιστο μέγεθος του εκκινητή για αποτελεσματική ενίσχυση μέσω PCR και (2) η ουρά των 9 nt στο 5' άκρο του «χιμαιρικού» εκκινητή δημιουργεί την αλληλοεπικαλυπτόμενη περιοχή που αποτελεί τη βάση της δεδομένης μεθόδου. Έτσι η αλληλοεπικαλυπτόμενη περιοχή που δημιουργείται μεταξύ δύο παρακείμενων PCR τμημάτων αποκτά μέγεθος 18 nt, καθώς προκύπτει από 2 ουρές των 9 nt.

Οι χιμαιρικοί εκκινητές που παρασκευάστηκαν για τις ανάγκες της παρούσας διατριβής, παρατίθενται στον [Πίνακα 2.4](#).

Στην πράξη

Στο πρώτο βήμα, πραγματοποιούνται δύο ξεχωριστές αντιδράσεις PCR, χρησιμοποιώντας για κάθε μία έναν ειδικό «χιμαιρικό» εκκινητή και έναν μη-χιμαιρικό. Επειδή οι χιμαιρικοί εκκινητές φέρουν αλληλοεπικαλυπτόμενα τμήματα, σε αυτό το πρώτο βήμα οι δύο αντιδράσεις PCR παρήγαγαν κομμάτια DNA με αλληλοεπικαλυπτόμενες ουρές. Τα προϊόντα αυτά καθαρίστηκαν ([βλέπε Ενότητα 2.9.2](#)). Στο δεύτερο βήμα, 1 μl από κάθε καθαρισμένο PCR προϊόν χρησιμοποιήθηκε ως ανάμικτο υπόστρωμα για νέα αντίδραση PCR. Σε αυτό το βήμα, οι αλληλοεπικαλυπτόμενες ουρές υβριδοποιήθηκαν και τα προϊόντα της υβριδοποίησης πολλαπλασιάστηκαν για την απόκτηση του προϊόντος με την επιθυμητή αλληλουχία.

Οι αντιδράσεις PCR και των δύο βημάτων έγιναν σε συνολικό όγκο 50 μl και περιείχαν τα ίδια συστατικά/συγκεντρώσεις που περιγράφηκαν στη συμβατική PCR. Το πρώτο βήμα πραγματοποιήθηκε με βάση το πρόγραμμα θερμικών κύκλων που περιγράφηκε στη συμβατική PCR ([Πίνακας 2.2](#)), ενώ το δεύτερο βήμα πραγματοποιήθηκε με βάση το πρόγραμμα που παρουσιάζεται στον [Πίνακα 2.3](#) που ακολουθεί. Στο [Παράρτημα](#) απεικονίζεται αναλυτικά η διαδικασία δημιουργίας κάθε χιμαιρικού ανιχνευτή ξεχωριστά.

Πίνακας 2.3: Συνθήκες αντιδράσεων 2^{ου} θήματος PCR επέκτασης αλληλοεπικαλυπτόμενων τμημάτων, της παρούσας διδακτορικής διατριβής

Στάδια αντίδρασης PCR	Θερμοκρασία	Χρόνος	
Αρχικό στάδιο αποδιάταξης	98°C	2 min	
Αποδιάταξη	98°C	10 sec	} 25 κύκλοι
Υβριδοποίηση σε θερμοκρασία ανάλογη με το T _m των εκκινητών	51°C – 54°C	15 sec	
Επιμήκυνση σε χρόνο ανάλογο με το μέγεθος σε bp του επιθυμητού τμήματος DNA	72°C	15 – 60 sec	
Τελικό στάδιο επιμήκυνσης	72°C	25 min	

Πίνακας 2.4: Ολιγονουκλεοτίδια που χρησιμοποιήθηκαν ως εκκινητές σε αντιδράσεις PCR για τη δημιουργία DNA ανιχνευτών ή ανταγωνιστών που χρησιμοποιήθηκαν στις αναλύσεις EMSA και αποτυπώματος DNase I.

Γονίδιο/ Περιοχή	Όνομασία εκκινητή	Κατεύθυνση ^α	Αλληλουχία	Νουκλεοτιδική θέση		Σχεδιασμός
				AY363687 (τύπος M)	AY497292 (τύπος F)	
Εκκινητές που χρησιμοποιούνται στη συνηθισμένη αντίδραση PCR						
CR	VD1MF	F	5'-GCTACCYAAAAAATMTGGTG-3'	161 – 180		Παρούσα μελέτη
	VD1MR	R	5'-ACHGAGGCGAYTRCTTCTGT-3'	293 – 312		Παρούσα μελέτη
	VD1MF2	F	5'-AACCGTAAAATGTTTAGGAATAAGG-3'	231 – 255		Παρούσα μελέτη
	VD1M-FXba	F	5'-CTAGTCTAGAGCTACCTAAAAAATCTGGTG-3'	161 – 180		Παρούσα μελέτη
	VD1M-RIF	F	5'-CCGAATTCAAATAGGAATAAAGCTACCTAAA-3'	148 – 170		Παρούσα μελέτη
	VD1M-RIR	R	5'-CGAATTCTTTTTTTTTTTTTGCGTATACTTGT-3'	197 – 219		Παρούσα μελέτη
	VD1M-Fint	F	5'-GTGTAACGTGTGTATACAAGTAT-3'	180 – 202		Παρούσα μελέτη
	VD1M-Rint	R	5'-TACAGGCAATGGCAAGGAAT-3'	275 – 291		Παρούσα μελέτη
	oIVD1M-a	F	5'-GATCCGTAAAATGTTTAGGAATAAG-3'	233 – 254		Παρούσα μελέτη
	oIVD1M-b	R	5'-GATCCTTATTCCTAAACATTTTACG-3'	234 – 255		Παρούσα μελέτη
	a-f	F	5'-GCCTCAAATCCTAGAGTTATCG-3'	592 – 613	779 – 800	Mizi et al. (2005)
	CD_END-R	R	5'-CCGATAATTTACGCTTTGGG-3'	777 – 796	964 – 983	Παρούσα μελέτη
	ssFdl1	F	5'-GGTGATAGGTTGTTAAGYGTGG-3'		28 – 49	Mizi et al. (2005)

	ssFdI2	R	5'-CACCGTCRCCTTCTCCWCCC-3'		195 – 214	Mizi et al. (2005)
	VD1Fa-F	F	5'-GCAGGAGATGGGGGCTTATG-3'		172 – 191	Παρούσα μελέτη
	VD1Fa-R	R	5'-TCTTCTAACGGAAGGGCATA-3'		331 – 350	Παρούσα μελέτη
	VD1F-F	F	5'-GGCTATGCCCTTCCGTTAGA-3'		328 – 347	Παρούσα μελέτη
	VD1F-R	R	5'-GCACCAGCAACCTTTAGACC-3'		511 – 530	Παρούσα μελέτη
	VD1Fb-F	F	5'-GGTCTAAAGGTTGCTGGTGC-3'		511 – 530	Παρούσα μελέτη
	muDLR	R	5'-CTCTGACAAATGCTTATYAGCTG-3'	520 – 542	708 – 730	Mizi et al. (2005)
	VD1F1-F	F	5'-GGTAGATTTTAGAGAAGTCC-3'		48 – 67	Παρούσα μελέτη
	VD1F1-R	R	5'-CATAAGCCCCATCTCCTGC-3'		172 – 191	Παρούσα μελέτη
	VD1F2-F	F	5'-GTAGCTGGTTTAAAGTAGGC-3'		71 – 90	Παρούσα μελέτη
	VD1F2-R	R	5'-CATCTATTCCGAACATGGAA-3'		153 – 172	Παρούσα μελέτη
<i>Cytb</i>	Cytb-F	F	5'-GCACTATATGTGTTCTTTTCACCC-3'	1658 – 1682	1911 – 1935	Mizi et al. (2005)
	Cytb-R	R	5'-CACTCAGGCTGCACATGAATAGGC-3'	1809 – 1832	2062 – 2085	Mizi et al. (2005)
	Cytb-RXba	R	5'-AGCTAGTCTAGACTCAGGCTGCACATGAATAGGC-3'	1809 – 1832	2062 – 2085	Παρούσα μελέτη

Χιμαιρικοί εκκινητές που χρησιμοποιούνται στην PCR επέκτασης αλληλοεπικαλυπτόμενων τμημάτων

CR	Chimer-F	F	5'-AGTATACGCCCGTAAAATGTTTAGGAATAAG-3'	198 – 206 & 233 – 254	Παρούσα μελέτη
	Chimer-R	R	5'-ATTTTACGGGCGTATACTTGTATACACAC-3'	187 – 206 & 233 – 241	Παρούσα μελέτη
	ChimTA-F	F	5'-ATATATATATATATATATATATATATATACCGTAAAATGTTTAGGAATAAG-3'	233 – 254	Παρούσα μελέτη
	ChimTA-R	R	5'-TATATATATATATATATATATATATATATGCGTATACTTGTATACACAC-3'	187 – 206	Παρούσα μελέτη
	ChimACTG-F	F	5'-TGACTGACTGACTGACTGACTGACTGACCCGTAAAATGTTTAGGAATAAG-3'	233 – 254	Παρούσα μελέτη
	ChimACTG-R	R	5'-GTCAGTCAGTCAGTCAGTCAGTCAGTCAGCGTATACTTGTATACACAC-3'	187 – 206	Παρούσα μελέτη
	ChimAs-F	F	5'-AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAACC GTAAAATGTTTAGGAATAAG-3'	207 – 254	Παρούσα μελέτη
	ChimAs-R	R	5'-TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTCGCGTATACTTGTATACACAC-3'	187 – 232	Παρούσα μελέτη
<i>Cytb</i>	ChimAs-cytbF	F	5'-AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAGACCCTGAGCTTCTAGGGAA-3'	2006 – 2025	Παρούσα μελέτη
	ChimAs-cytbR	R	5'-TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTCAAAGAGGTCCTTAATAGTATAG-3'	1961 – 1939	Παρούσα μελέτη
Random sequence	Ran ^β		5'-AGTTTTCACGCCCAAAGCATAAACGAGGAGCAGTCATGAAAGTCTTAAA AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAACC G-3'		Παρούσα μελέτη
	Ran-F	F	5'-AGTTTTCACGCCCAAAGCAT-3'		Παρούσα μελέτη

^α F, πρόσθιος εκκινητής (forward primer)· R, ανάστροφος εκκινητής (reverse primer)

^β Δεν πρόκειται για εκκινητή, αλλά για συνθετική αλληλουχία που σχεδιάστηκε και χρησιμοποιήθηκε για τη δημιουργία χιμαιρικού ανιχνευτή (βλέπε [Ενότητα 3.4.1.4](#))

Πίνακας 2.5: Ολιγονουκλεοτίδια που χρησιμοποιήθηκαν ως εκκινητές σε αντιδράσεις αντίστροφης μεταγραφής του μιτοχονδριακού RNA και PCR, καθώς και σε αντιδράσεις PCR για την ενίσχυση πυρηνικού DNA.

Γονίδιο/ Περιοχή	Όνομασία εκκινητή	Κατεύθυνση ^α	Αλληλουχία	Νουκλεοτιδική θέση		Σχεδιασμός
				AY497292 (τύπος F)	AY363687 (τύπος M)	
<i>l-rRNA</i>	cyc16SF	F	5'-GGGTTAAGCTGAAAAATGGTG-3'	15790 – 15810	16717 – 16737	Παρούσα μελέτη
	cyc16SR	R	5'-GCGAATAGTATCTAGCCGCC-3'	15697 – 15716	16626 – 16645	Παρούσα μελέτη
	UNFOR1	F	5'-TTGCGACCTCGATGTTGGC-3'	16497 – 16515	17424 – 17442	Cao et al. (2004a)
	s-r	R	5'-CTGACCCTCCGATCATAGGC-3'	15935 – 15954		Mizi et al. (2005)
<i>s-rRNA</i>	r-f	F	5'-GCTTATGATAAGGTTAATCTGGG-3'	14762 – 14784		Mizi et al. (2005)
	12R	R	5'-CCGTTTTCTATCTCAGACACC-3'	14499 – 14519	14382 – 14402	Mizi et al. (2005)
<i>tRNA^{Asp}</i>	tRNAD-F	F	5'-CTAGATTCTTTTACTAAGGC-3'	15473 – 15493	16403 – 46423	Παρούσα μελέτη
	tRNAD-R	R	5'-GACAATTCTAAGTTATATATTAAC-3'	15445 – 15468	16375 – 16398	Παρούσα μελέτη

<i>tRNA^{Thr}</i>	9F	F	5'-GCTGAAGCAACGGCCTTGTAAGTCG-3'	11477 – 11501	11358 – 11382	Mizi et al. (2005)
<i>tRNA^{Tyr}</i>	Y-f	F	5'-TGAGCTGTAAACTCATAAACAAGGTTGGCC-3'	1183 – 1212	928 – 957	Mizi et al. (2005)
CR	16SF-END-F	F	5'-GTGTATAACAGGTTGATTAGCC-3'	16709 – 16730		Παρούσα μελέτη
	ssFdl1	F	5'-GGTGATAGGTTGTTAAGYGTGG-3'	28 – 49		Mizi et al. (2005)
	ssMdl1	F	5'-TAARTGAGGTTGGCTATAMGTGT-3'		10 – 32	Μίζη 2007
	VD1F-F	F	5'-GGCTATGCCCTTCCGTTAGA-3'	328 – 347		Παρούσα μελέτη
	VD1M-F2	F	5'-AACCGTAAAATGTTTAGGAATAAGG-3'		231 – 255	Παρούσα μελέτη
	VD1Fb-F	F	5'-GGTCTAAAGGTTGCTGGTGC-3'	511 – 530		Παρούσα μελέτη
Καθολικοί (universal)	Oligo(dT)-adapter		5'-GACTCGAGTCGACATCGATTTTTTTTTTTTTTTT-3'			Frohman et al. (1988)
	Adapter		5'-GACTCGAGTCGACATCG-3'			Frohman et al. (1988)
Πυρηνικό γονίδιο <i>Foxl2</i>	Foxl2_F		5'-AA YARRAARGGHTGGC ARAA-3'			Liu et al. (2012)
	Foxl2_R		5'-WARTTNCCHTTYTCRAACAT-3'			Liu et al. (2012)

^a F, πρόσθιος εκκινητής· R, ανάστροφος εκκινητής

2.7 Ηλεκτροφόρηση

Η ηλεκτροφόρηση, είναι η ηλεκτροχημική μέθοδος διαχωρισμού ηλεκτρικά φορτισμένων σωματιδίων (συνήθως πρωτεϊνικής ή νουκλεϊκής φύσεως) από ένα μίγμα τους. Η μέθοδος αυτή επιτρέπει την ταξινόμηση των μορίων βάσει μεγέθους, σχήματος και φορτίου.

Κατά την ηλεκτροφόρηση διοχετεύεται ηλεκτρικό ρεύμα μέσω ηλεκτροδίων σε ένα μέσο (πήκτωμα ή και χαρτί) που πάνω του έχει τοποθετηθεί (ή/και ενσωματωθεί) σε ένα σημείο το προς ανάλυση δείγμα. Το αποτέλεσμα είναι ότι τα φορτισμένα σωματίδια κινούνται προς τα ηλεκτρόδια με ταχύτητες διαφορετικές ανάλογα με το φορτίο τους και αντιστρόφως ανάλογα με το μέγεθος τους. Έτσι τα περισσότερο φορτισμένα και μικρότερα μόρια απομακρύνονται περισσότερο από το αρχικό σημείο, ενώ τα μεγαλύτερα και λιγότερο φορτισμένα λιγότερο, οπότε επέρχεται διαχωρισμός παρόμοιος με την χρωματογραφία.

Ο ηλεκτροφορητικός διαχωρισμός γίνεται σχεδόν πάντα σε πήκτωμα και όχι σε διάλυμα, επειδή το πήκτωμα λειτουργεί ως μοριακός ηθμός καθιστώντας έτσι ευκολότερους τους διαχωρισμούς μορίων κι επιπλέον καταστέλλει τα ρεύματα που δημιουργούνται από μικρές βαθμιδώσεις της θερμοκρασίας, προϋπόθεση απαραίτητη για σωστό διαχωρισμό μορίων. Η ηλεκτροφόρηση πηκτώματος χρησιμοποιείται συνήθως για το διαχωρισμό βιολογικών μακρομορίων όπως δεσοξυριβονουκλεϊκό οξύ (DNA), ριβονουκλεϊκό οξύ (RNA), ή πρωτεΐνες· παρόλα αυτά, η ηλεκτροφόρηση πηκτώματος μπορεί να χρησιμοποιηθεί και για το διαχωρισμό νανοσωματιδίων. Ο όρος ηλεκτροφόρηση αναφέρεται στη μετακίνηση ενός φορτισμένου σωματιδίου σε ένα ηλεκτρικό πεδίο. Τα πηκτώματα καταστέλλουν τη θερμική μεταγωγή που προκαλείται με την εφαρμογή του ηλεκτρικού πεδίου, και δρουν επίσης ως ένα διηθητικό μέσο, καθυστερώντας τη δίοδο των μορίων· τα πηκτώματα μπορούν επίσης να διατηρήσουν έναν ολοκληρωμένο διαχωρισμό, έτσι ώστε να εφαρμοστεί ή να παρατηρηθεί μία μετα-ηλεκτροφορητική χρωστική. Συνηθέστερα υλικά που χρησιμοποιούνται για την κατασκευή πηκτώματος είναι η ακρυλαμίδα και η αγαρόζη.

Το «καλούπι» στο οποίο σχηματίζεται το πήκτωμα μπορεί να είναι είτε μικροί κυλινδρικοί σωλήνες είτε ένα «sandwich» επίπεδων τζαμιών (ηλεκτροφόρηση σε σωληνάκια ή επίπεδη - slab). Η ηλεκτροφόρηση σε σωληνάκια χρησιμοποιείται κυρίως για ισοηλεκτρική εστίαση που προηγείται του αποδιατακτικού διαχωρισμού στις ηλεκτροφορήσεις δύο διαστάσεων. Μετεξέλιξη αυτής της μεθόδου είναι η σύγχρονη ηλεκτροφόρηση σε τριχοειδή (capillary electrophoresis) που εφαρμόζεται ευρύτατα στην αλληλούχιση DNA σε σύγχρονους αυτόματους αναλυτές (sequencers). Το «φόρτωμα» των δειγμάτων γίνεται είτε στην επιφάνεια των σωληνών είτε σε κατάλληλες θέσεις υποδοχής (slots) που δημιουργούνται σε πήκτωμα επίπεδης ηλεκτροφόρησης με την τοποθέτηση ειδικής «χτένας», όσο το πήκτωμα είναι ακόμα υγρό. Η επίπεδη ηλεκτροφόρηση έχει το πλεονέκτημα ότι όλα τα δείγματα διαχωρίζονται στο ίδιο πήκτωμα, συνεπώς στις ίδιες συνθήκες συγκέντρωσης ακρυλαμίδης ή αγαρόζης, θερμοκρασίας κλπ κι έτσι είναι περισσότερο αξιόπιστη η ποιοτική και ποσοτική σύγκριση των ζωνών μεταξύ τους.

Όσον αφορά στο πήκτωμα της αγαρόζης, το “καλούπι” μπορεί να είναι και οριζόντιο, ανοιχτό από την πάνω μεριά, με θέσεις υποδοχής (“πηγαδάκια” – slots) κάθετες προς το πήκτωμα.

2.7.1 Ηλεκτροφόρηση νουκλεϊκών οξέων

Στην περίπτωση των νουκλεϊκών οξέων, η κατεύθυνση της μετανάστευσης, από το αρνητικό προς το θετικό ηλεκτρόδιο, οφείλεται στο φυσικό αρνητικό φορτίο του σακχαροφωσφορικού σκελετού τους.

Τα δίκλινα τμήματα DNA συμπεριφέρονται ως μακριά ραβδιά και άρα η μετανάστευσή τους μέσω του πηκτώματος σχετίζεται με το μέγεθός τους ή, για κυκλικά τμήματα, την ακτίνα περιστροφής τους. Τα κυκλικά DNA όπως τα πλασμίδια, εντούτοις, μπορεί να παρουσιάζουν πολλαπλές ζώνες, καθώς η ταχύτητα μετανάστευσής τους μπορεί να σχετίζεται με το αν είναι υπερελικωμένα ή χαλαρά.

Το μονόκλωνο DNA ή RNA τείνει να αναδιπλώνεται σε μόρια με ακαθόριστα σχήματα και να μεταναστεύει μέσω του πηκτώματος με έναν περίπλοκο τρόπο που σχετίζεται με την τριτοταγή δομή τους. Συνεπώς,

παράγοντες που διασπούν τους δεσμούς υδρογόνου, όπως η θέρμανση, το υδροξείδιο του νατρίου (NaOH) ή το φορμαμίδιο, χρησιμοποιούνται για να αποδιατάξουν τα νουκλεϊκά οξέα και να τα κάνουν να συμπεριφέρονται και πάλι σαν μακριά ραβδιά.

Η ηλεκτροφόρηση πηκτώματος μεγάλων DNA ή RNA μορίων γίνεται συνήθως με ηλεκτροφόρηση πηκτώματος αγαρόζης. Για διάφορες εφαρμογές μπορεί να χρησιμοποιηθεί και πήκτωμα πολυακρυλαμίδης (π.χ. αλληλούχιση DNA κατά Sanger, Maxam & Gilbert, αποτύπωμα με DNase I κλπ.). Ο χαρακτηρισμός μέσω αλληλεπίδρασης με κάποιον συνδέτη των νουκλεϊκών οξέων ή τμημάτων αυτών μπορεί να πραγματοποιηθεί μέσω μείωσης κινητικότητας σε ηλεκτροφόρηση συγγένειας.

Η ηλεκτροφόρηση RNA δειγμάτων μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να ελεγχθεί η πρόσμιξη γενωμικού DNA καθώς και η αποικοδόμηση του RNA. Το RNA των ευκαρυωτικών οργανισμών παρουσιάζει διακριτές ζώνες του 28S και 18S rRNA, με τη ζώνη του 28S να είναι σχεδόν δυο φορές πιο έντονη από ότι αυτή του 18S. Το αποικοδομημένο RNA έχει λιγότερο διακριτές ζώνες, διάχυτη μορφή και η αναλογία έντασης είναι μικρότερη από 2:1.

2.7.1.1 Ηλεκτροφόρηση DNA σε πηκτώματα αγαρόζης

Η αγαρόζη συντίθεται από μακριές μη διακλαδισμένες αλυσίδες αφόρτιστου υδατάνθρακα χωρίς διασυνδέσεις με αποτέλεσμα να σχηματίζεται ένα πήκτωμα με μεγάλους πόρους που επιτρέπουν το διαχωρισμό μακρομορίων και μακρομοριακών συμπλόκων.

Με την ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης επιτυγχάνεται: (α) ένας πρώτος έλεγχος της ποιότητας και καθαρότητας του DNA, (β) προσδιορισμός, χονδρικά, της ποσότητάς του και (γ) εκτίμηση, με σχετικά ικανοποιητική ακρίβεια, του μεγέθους γραμμικών μορίων. Επιπρόσθετα, ανάλογα με την πυκνότητα του πηκτώματος, είναι δυνατός ο διαχωρισμός διαφορετικών γραμμικών μορίων DNA, μήκους 0,05 – 30 kb (**Πίνακας 2.6**).

Πίνακας 2.6 Εύρη μεγεθών τμημάτων DNA που διαχωρίζονται σε πηκτώματα διαφόρων πυκνοτήτων αγαρόζης

Προτεινόμενο % Αγαρόζης (βάρος κατ'όγκο)	Βέλτιστη ανάλυση για γραμμικό DNA (bp)
0,5	1.000 – 30.000
0,7	800 – 12.000
1,0	500 – 10.000
1,2	400 – 7.000
1,5	200 – 3.000
2,0	50 – 2.000

Για τις πιο κοινές εφαρμογές, χρησιμοποιούνται πηκτώματα της τάξης του 1 – 2%. Με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης μπορούν να διαχωριστούν και τμήματα DNA μεγέθους εκατομμυρίων βάσεων (ολόκληρα χρωμοσώματα) μέσω της τεχνικής της ηλεκτροφόρησης εναλασσόμενου πεδίου.

Στην πράξη

Τα πηκτώματα παρασκευάζονται με διάλυση της αγαρόζης με βρασμό σε ρυθμιστικό διάλυμα 0,5X TBE το οποίο περιέχει βρωμιούχο αιθίδιο σε τελική συγκέντρωση 0,5 μg/ml. Το TBE παρέχει στο πήκτωμα τα κατάλληλα ιόντα για την ηλεκτροφόρηση, ενώ το βρωμιούχο αιθίδιο είναι μια φθορίζουσα χρωστική που προσδένεται στη διπλή έλικα (συνεπώς είναι ένα ισχυρό μεταλλαξογόνο) και καθιστά τα νουκλεϊκά οξέα ορατά παρουσία υπεριώδους ακτινοβολίας (πορτοκαλί χρώμα). Το βρασμένο διάλυμα αγαρόζης τοποθετείται πριν κρυώσει σε ένα καλούπι με ειδική «χτένα» που θα δημιουργήσει τις θέσεις υποδοχής των δειγμάτων (πηγαδάκια) και αφήνεται να κρυώσει. Η αγαρόζη θα στερεοποιηθεί και θα δημιουργήσει πήκτωμα σε θερμοκρασία ~35 – 45°C, που εξαρτάται από τον τύπο της αγαρόζης αλλά και από την πυκνότητα του πηκτώματος. Η επιλογή μεγέθους του καλουπιού εξαρτάται από τις ανάγκες των πειραμάτων, π.χ. πόσα είναι τα δείγματα προς ηλεκτροφόρηση, πόσο καλός θέλουμε να είναι ο διαχωρισμός, δηλ. πόσο πολύ θέλουμε να διαχωριστούν τα δείγματα κλπ.

Τα προς ηλεκτροφόρηση δείγματα αναμιγνύονται με 1/6 του όγκου διάλυμα χρωστικής (0,025% μπλε της βρωμοφαινόλης και 0,025% κυανού της ξυλόλης σε διάλυμα 30% γλυκερόλης σε TE_{0,1}) και τοποθετούνται στις ειδικές θέσεις υποδοχής του πήκτωματος. Στο εμπόριο διατίθενται και έτοιμες χρωστικές – Loading Dyes. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται σε ρυθμιστικό διάλυμα 0,5X TBE σε ειδικές συσκευές υπό την επίδραση κατάλληλου ηλεκτρικού πεδίου (50 – 150 V). Η γλυκερόλη της χρωστικής δίνει «βάρος» στα δείγματα και τους επιτρέπει να «κάτσουν» στις θέσεις υποδοχής και έτσι να αποφευχθεί η διάχυσή τους. Οι χρωστικές είναι απαραίτητες για την παρακολούθηση της πορείας ηλεκτροφόρησης. Στον **Πίνακα 2.7** φαίνεται η μετανάστευση των πιο ευρέως χρησιμοποιούμενων χρωστικών σε πήκτωμα αγαρόζης 0,5 – 1,4%:

Πίνακας 2.7 Μετανάστευση χρωστικών σε πήκτωμα αγαρόζης 0,5 – 1,4%

Χρωστική	Μέγεθος
GoTaq blue dye	4 kb
Xylene cyanol FF	4 kb
Bromophenol Blue	300 bp
Orange G	50 bp
Go Taq Yellow Dye	10 bp

Μετά την ηλεκτροφόρηση, ακολουθεί φωτογράφιση με τη χρήση ψηφιακής μηχανής (Sony DSC-W55) και φίλτρου για τη διερχόμενη υπεριώδη ακτινοβολία (364 nm) από ειδική UV φωτοτράπεζα. Η ελάχιστη ποσότητα DNA που είναι ορατή με το βρωμιούχο αιθίδιο, είναι 20 ng.

Ο προσδιορισμός του μεγέθους των εξεταζόμενων τμημάτων DNA επιτυγχάνεται με την παράλληλη ηλεκτροφόρηση στο πήκτωμα κατάλληλου προτύπου μεγεθών DNA (marker). Το είδος του marker επιλέγεται ανάλογα με το μέγεθος των ζωνών που επιθυμούμε να διαχωρίσουμε στο πήκτωμα. Οι markers που έχουν χρησιμοποιηθεί στην παρούσα διατριβή είναι οι: GeneRuler 1 kb DNA Ladder (#SM0311 Fermentas), GeneRuler Low Range DNA Ladder (#SM1198 Fermentas), GeneRuler 100 bp DNA Ladder (#SM0249 Fermentas), O'GeneRuler 1 kb

DNA Ladder (#SM1348 Fermentas), GeneRuler 50 bp DNA Ladder (#SM0379 Fermentas), GeneRuler Ultra Low Range DNA Ladder (#SM1218 Fermentas), Lambda DNA – *Hind*III Digest Ladder (#301-2S Biolabs), Quick-Load 100 bp DNA Ladder (#N0467S NEB), Quick-Load 1 kb DNA Ladder (N0468S NEB), 100bp DNA Ladder (#MWD100 Nippon Genetics), 1 kb DNA Ladder (#MWD1 Nippon Genetics), 100 bp Ladder (#15628-019 Invitrogen). Από κάθε marker ηλεκτροφορούνται 4 – 5 μl παράλληλα με τα δείγματα.

2.7.1.2 Ηλεκτροφόρηση RNA σε πήκτωμα αγαρόζης

Για την ηλεκτροφόρηση του RNA, τα δείγματα RNA (3 – 5 μl ολικού RNA) αναμίχθηκαν με 1/6 του όγκου διάλυμα αποδιατακτικής χρωστικής 6X SDS Loading Dye (0,25 w/v μπλε της βρωμοφαινόλης, 0,25 w/v κυανού της ξυλόλης, 60 mM Na₃PO₄ pH 6,8, 1,2% SDS και 30% γλυκρόλη) ή με 1/2 του όγκου διάλυμα αποδιατακτικής χρωστικής του εμπορίου 2X RNA Loading Dye (#R0641 Fermentas). Τα δείγματα αποδιατάχτηκαν με θέρμανση στους 70°C για 10 min και αφέθηκαν για 5 min στον πάγο πριν την ηλεκτροφόρηση. Τόσο για το πήκτωμα όσο και ως διάλυμα ηλεκτροφόρησης χρησιμοποιήθηκε TBE 1X. Τα πηκτώματα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν 1,3 – 1,5% αγαρόζη. Ως marker χρησιμοποιήθηκε ο High-Range RNA Ladder (#SM0421 Fermentas)

2.7.1.3 Ηλεκτροφόρηση DNA σε αποδιατακτικά πηκτώματα πολυακρυλαμίδης

Το πήκτωμα της πολυακρυλαμίδης είναι ένα τρισδιάστατο πλέγμα από μακριές αλειφατικές αλυσίδες πολυακρυλαμίδης που ενώνονται μεταξύ τους με μόρια N-N μεθυλενο-δισ-ακρυλαμίδης (MBA). Τα πηκτώματα πολυακρυλαμίδης είναι τα καταλληλότερα για ηλεκτροφόρηση γιατί αποτελούνται από χημικά ουδέτερες ενώσεις και σχηματίζονται εύκολα. Επίσης το μέγεθος των πόρων μπορεί να ρυθμιστεί με την επιλογή διαφορετικών συγκεντρώσεων ακρυλαμίδης και MBA. Τα μικρότερα μόρια μετακινούνται πιο εύκολα διαμέσου των πόρων του πηκτώματος, ενώ τα μεγαλύτερα καθυστερούν. Μόρια ενδιάμεσου μεγέθους μετακινούνται με διαφορετικές ταχύτητες.

Ο σχηματισμός του πηκτώματος, με πολυμερισμό των μονομερών ακρυλαμίδης και MBA, γίνεται σε θερμοκρασία δωματίου με τη βοήθεια

δύο πολυμεριστικών παραγόντων: του υπερθειϊκού αμμωνίου (ammonium persulfate, APS) και του TEMED (N,N,N,N-τετραμεθυλο-1,2-διαμινο-αιθάνιο), το οποίο καταλύει το σχηματισμό ελεύθερων ριζών από το APS. Έτσι προκύπτει ένα πλέγμα, με μέγεθος πόρων που κυμαίνεται αφενός ανάλογα με την ολική συγκέντρωση ακρυλαμίδης και MBA και, αφετέρου, ανάλογα με τη σχετική συγκέντρωση της MBA ως προς την ακρυλαμίδα. Ανάλογα με την εφαρμογή του πηκτώματος επιλέγουμε διαφορετική αναλογία ακρυλαμίδης : MBA. Γενικά πηκτώματα με μικρή συγκέντρωση πολυακρυλαμίδης έχουν μεγαλύτερους πόρους και το αντίστροφο. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι για να πολυμεριστεί η ακρυλαμίδα θα πρέπει να μην έρχεται σε επαφή με τον αέρα.

Η ακρυλαμίδα, σε αντίθεση με την πολυακρυλαμίδα, είναι νευροτοξίνη και πρέπει να τηρούνται κατάλληλες προφυλάξεις ασφαλείας για να αποφευχθεί η δηλητηρίαση. Επίσης και το TEMED είναι ένα μεταλλαξογόνο και στερωτικό χημικό και θα πρέπει να διαχειρίζεται με προσοχή.

Τα αποδιατακτικά πηκτώματα πολυακρυλαμίδης χρησιμοποιούνται για τον διαχωρισμό μορίων DNA όταν απαιτείται μεγάλη διακριτική ικανότητα, της τάξης της μίας βάσης. Ανάλογα με το μέγεθος των μορίων που πρέπει να διαχωριστούν η συγκέντρωση του πηκτώματος κυμαίνεται από 3,5 – 20%, ενώ ως αποδιατακτικός παράγοντας χρησιμοποιείται ουρία. Συνήθως η αναλογία ακρυλαμίδα : δισ-ακρυλαμίδα στα πηκτώματα αυτά είναι 19:1.

Στην πράξη

Για την κατασκευή των πηκτωμάτων οι κατάλληλες ποσότητες ακρυλαμίδης, δισ-ακρυλαμίδης, ουρίας και ρυθμιστικού διαλύματος (Πίνακας 2.8) αναμιγνύονται και διαλυτοποιούνται στον επιθυμητό όγκο αποστειρωμένου, δισαπεσταγμένου νερού. Ακολουθεί προσθήκη της απαραίτητης ποσότητας διαλύματος 10% APS και TEMED και το διάλυμα τοποθετείται αμέσως ανάμεσα σε δύο επίπεδα τζάμια του επιθυμητού μεγέθους που έχουν κατάλληλα συναρμολογηθεί και απέχουν μεταξύ τους 0,2 – 0,5 mm με ειδικά διαχωριστικά (spacers) στις τρεις από τις τέσσερις πλευρές των τζαμιών. Το ένα από τα δύο τζάμια υφίσταται κατεργασία με

έναν τύπο σιλικόνης: με μια υδρόφοβη σιλικόνη (repel-silane: 2% dimethyldichlorosilane) με συνέπεια μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης να είναι εύκολη η απομάκρυνση του πηκτώματος από τα τζάμια, καθώς αυτό θα κολλήσει στο τζάμι που δεν έχει υποστεί κατεργασία. Μόλις το διάλυμα τοποθετηθεί στη σχισμή ανάμεσα στα τζάμια, στην τέταρτη πλευρά των τζαμιών που δεν υπάρχει διαχωριστικό, τοποθετείται χτενάκι, το οποίο μόλις πολυμεριστεί το πήκτωμα θα σχηματίσει σε αυτό τις θέσεις (πηγαδάκια - slots) για την τοποθέτηση (φόρτωση) των δειγμάτων. Ο πολυμερισμός του πηκτώματος ολοκληρώνεται σε 1,5 – 2 h περίπου απουσία αέρα.

Σημ.: τζάμια, διαχωριστικά και χτενάκια πλένονται πολύ καλά, ξεπλένονται με απεσταγμένο νερό και αιθανόλη, ενώ τα δύο τελευταία ξηραίνονται υπό κενό για 30 min.

Πίνακας 2.8: Συνταγή αποδιατακτικού πηκτώματος πολυακρυλαμίδης - ουρίας 6%

Συστατικό	Ποσότητα/Όγκος	Τελική συγκέντρωση
Σε ένα ποτήρι ζέσης με μαγνητάκι προστίθεται:		
Ουρία	50 g	8 M
Διάλυμα ακρυλαμίδης 40% [19:1 ακρυλαμίδη:MBA]	15 ml	6%
TBE 10X	10 ml	1X
Αποστειρωμένο, δισαπεσταγμένο H ₂ O	38 ml (είναι ο όγκος που απαιτείται για να φτάσει το διάλυμα μετά την αναδιάλυση της ουρίας, τα 100 ml)	
<p><i>Ανάδευση σε μαγνητικό αναδευτήρα</i> <i>Διήθηση με χαρτί Whatman 3MM</i> <i>Προσθήκη 10 ml Triton10%, ανάδευση, αποαέρωση του μίγματος σε ξηραντήρα κενού</i> <i>Λίγο πριν την τοποθέτηση ανάμεσα στα τζάμια προσθήκη:</i></p>		
APS 10%	650 μl	0,065%
TEMED	25 μl	0,025%

Στην παρούσα διατριβή αποδιατακτικά πήκτωμα πολυακρυλαμίδης-ουρίας χρησιμοποιήθηκαν κατά την ανάλυση αποτυπώματος DNase I (Ενότητα 2.16.2). Οι διαστάσεις των πηκτωμάτων ήταν 20 x 40 cm ή 30 x 40 cm και πάχος 0,35 mm.

Οι ηλεκτροφορήσεις πραγματοποιήθηκαν σε ειδική συσκευή κάθετης ηλεκτροφόρησης LIFE TECHNOLOGIES BRL (model S2), σε ρυθμιστικό διάλυμα 1X TBE, υπό τάση 2.000 V, ένταση ρεύματος 100 mA και ισχύ 150 W. Η θερμοκρασία των τζαμιών πρέπει να είναι περίπου 48 – 50°C. Οι ειδικές θέσεις τοποθέτησης των δειγμάτων ξεπλένονται με το διάλυμα ηλεκτροφόρησης. Πριν την τοποθέτηση των δειγμάτων, πραγματοποιείται ηλεκτροφόρηση του πηκτώματος για μισή ώρα σε ρυθμιστικό διάλυμα 1X TBE, με σκοπό την απομάκρυνση της περίσσειας των πολυμεριστικών μέσων και την εξισορρόπηση των ιόντων.

Τα δείγματα αποδιατάσσονται στους 90°C για 2 min πριν φορτωθούν στο πήκτωμα. Η πορεία της ηλεκτροφόρησης παρακολουθείται με τη βοήθεια χρωστικών, όπως και στην ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης. Στο αποδιατακτικό πήκτωμα ακρυλαμίδης οι χρωστικές αυτές μεταναστεύουν σύμφωνα με τον Πίνακα 2.9.

Πίνακας 2.9 Μετανάστευση χρωστικών ηλεκτροφόρησης σε αποδιατακτικό πήκτωμα πολυακρυλαμίδης

Συγκέντρωση πολυακρυλαμίδης	Μπλε της βρωμοφαινόλης	Κυανού της Ξυλόλης
5%	35 bp	140 bp
6%	26 bp	106 bp
8%	19 bp	75 bp
10%	12 bp	55 bp
20%	8 bp	28 bp

Για να φτάσει η χρωστική μπλε της βρωμοφαινόλης περίπου στα 4/5 του πηκτώματος, υπό τις συνθήκες ηλεκτροφόρησης που αναφέρθηκαν πιο πάνω, σε πήκτωμα συγκέντρωσης πολυακρυλαμίδης 6%, απαιτούνται 1 – 1,5 ώρες. Μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης, το πήκτωμα μεταφέρεται σε χαρτί Whatman και ακολουθεί αυτοραδιογραφία.

2.7.2 Ηλεκτροφόρηση συμπλόκων DNA-πρωτεϊνών σε μη αποδιατακτικό (native) πήκτωμα πολυακρυλαμίδης

Τα μη αποδιατακτικά πηκτώματα δεν περιέχουν κάποιον αποδιατακτικό παράγοντα, επομένως τόσο οι πρωτεΐνες όσο και το DNA ηλεκτροφορούνται διατηρώντας παράλληλα τη στερεοδομή τους.

Στην πράξη

Για την κατασκευή των πηκτωμάτων οι κατάλληλες ποσότητες ακρυλαμίδης, δισ-ακρυλαμίδης, ρυθμιστικού διαλύματος και γλυκερόλης (Πίνακας 2.10) αναμιγνύονται και διαλυτοποιούνται στον επιθυμητό όγκο απεσταγμένου νερού. Ακολουθεί προσθήκη της απαραίτητης ποσότητας διαλύματος 10% APS και TEMED και το διάλυμα τοποθετείται αμέσως ανάμεσα σε δύο επίπεδα τζάμια 16 x 16 cm που έχουν συναρμολογηθεί κατάλληλα και απέχουν μεταξύ τους 1,5 mm με ειδικά διαχωριστικά (spacers). Με διάλυμα αγαρόζης 1% σε H₂O σφραγίζονται καλά τα σημεία επαφής τζαμιών και διαχωριστικών για να επιτευχθεί η μέγιστη στεγανοποίηση του συστήματος και να αποφευχθεί η διάχυση του διαλύματος. Μετά την προσθήκη του διαλύματος, τοποθετείται το κατάλληλο χτενάκι που θα δημιουργήσει τις εσοχές (πηγαδάκια) για την τοποθέτηση (φόρτωση) του δείγματος στο πήκτωμα. Ο πολυμερισμός του πηκτώματος ολοκληρώνεται σε 1,5 – 2 h περίπου απουσία αέρα.

Σημ.: τζάμια, διαχωριστικά και χτενάκια πλένονται πολύ καλά, ξεπλένονται με απεσταγμένο νερό και αιθανόλη, ενώ τα δύο τελευταία ξηραίνονται υπό κενό για 30 min.

Στην παρούσα διατριβή μη αποδιατακτικά πηκτώματα πολυακρυλαμίδης χρησιμοποιήθηκαν κατά τον Έλεγχο Μείωσης της Κινητικότητας Συμπλόκου (Ενότητα 2.16.1).

Πίνακας 2.10 Συνταγή μη αποδιατακτικού πηκτώματος πολυακρυλαμίδης 5%

Συστατικό	Όγκος	Τελική συγκέντρωση
Σε σωλήνα τύπου Falcon των 50 ml προσθήκη:		
Διάλυμα ακρυλαμίδης 40% [39:1 Ακρυλαμίδα: MBA]	4,375 ml	5%
TBE 10X	875 ml	0,25X
Γλυκερόλη	1050 ml	3%
Απεσταγμένο H ₂ O	έως τα 35 ml	
Καλή ανάδευση με αναστροφή του σωλήνα Λίγο πριν την τοποθέτηση ανάμεσα στα τζάμια προσθήκη:		
APS 10%	158 ml	0,045%
TEMED	79 ml	0,225%

Οι ηλεκτροφορήσεις πραγματοποιήθηκαν σε ρυθμιστικό διάλυμα 0,25X TBE, υπό τάση 200 V και ένταση ρεύματος 15 mA σε ειδικό θάλαμο-ψυγείο στους 4°C. Τα πηγαδάκια ξεπλένονται με το διάλυμα ηλεκτροφόρησης πριν από αυτή. Επίσης, πριν τη φόρτωση των δειγμάτων, πραγματοποιείται προ-ηλεκτροφόρηση του πηκτώματος για μισή ώρα σε ρυθμιστικό διάλυμα 0,25X TBE υπό τάση 100 V, με σκοπό την απομάκρυνση της περίσσειας των πολυμεριστικών μέσων και την εξισορρόπηση των ιόντων.

Η ηλεκτροφόρηση διαρκεί περίπου 3,5 – 5 h αναλόγως με τα τμήματα DNA που θέλουμε να διαχωριστούν. Μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης, το πήκτωμα μεταφέρεται σε χαρτί Whatman 3MM και ακολουθεί αυτοραδιογραφία.

Σημ.: λόγω του ότι χρησιμοποιούνται μικρά σε μήκος και πλάτος, και μεγαλύτερα σε πάχος πηκτώματα από ότι στην περίπτωση των αποδιατακτικών πηκτωμάτων

για την ηλεκτροφόρηση του DNA, ο χειρισμός τους είναι πιο εύκολος και δεν απαιτείται η εφαρμογή σιλικόνης σε ένα από τα τζάμια.

2.8 Πέψη με περιοριστικές ενδονουκλεάσες

Οι πέψεις του DNA με περιοριστικές ενδονουκλεάσες πραγματοποιήθηκαν σύμφωνα με τις οδηγίες της εταιρείας παραγωγής του εκάστοτε ενζύμου. Τυπικά, χρησιμοποιούνται 5 – 50 u ενζύμου σε αντιδράσεις συνολικού όγκου 20 μl – 200 μl. Οι αντιδράσεις επωάζονται στους 37°C για 1,5 – 16 h. Τα περιοριστικά ένζυμα που χρησιμοποιήθηκαν ανήκουν στις εταιρείες Fermentas – Thermo Scientific, New England Biolabs, Takara.

Ο σχεδιασμός των αντιδράσεων πέψης με περιοριστικές ενδονουκλεάσες γίνεται με βάση τις συνθήκες στις οποίες το ένζυμο παρουσιάζει τη βέλτιστη απόδοσή του. Οι συνθήκες αυτές καθορίζονται κυρίως από την ιοντική ισχύ, το pH, και την αναλογία DNA-ενζύμου. Κάθε ένζυμο παρέχεται από την εκάστοτε εταιρεία με το αντίστοιχο ρυθμιστικό διάλυμα, το οποίο προστίθεται στην πέψη και παρέχει τα κατάλληλα ιόντα και pH για τη βέλτιστη δράση του ενζύμου. Αρκετά ένζυμα απαιτούν για τη δράση τους την ύπαρξη σταθεροποιητικών παραγόντων με χαρακτηριστικότερο την ωαλβουμίνη του βοδιού (BSA). Η ποσότητα του ενζύμου που χρησιμοποιείται εξαρτάται από το συνολικό όγκο της αντίδρασης, την ποσότητα του DNA και τη συγκέντρωση του ενζύμου σε units/μl. Η κάθε αντίδραση πέψης επωάζεται στην απαραίτητη για τη δράση του ενζύμου θερμοκρασία (συνήθως 37°C). Σε περιπτώσεις όπου το προς πέψη δείγμα περιέχει RNA, η απομάκρυνση του RNA μπορεί να γίνει ταυτόχρονα με την πέψη, εφόσον το ένζυμο RNase δρα και αυτό στους 37°C. Επομένως, σε περιπτώσεις π.χ. πέψεων πλασμιδιακού DNA απομονωμένου σε μικρή κλίμακα, το RNA των δειγμάτων αποικοδομείται με RNase A που προστίθεται στην πέψη, σε τελική συγκέντρωση 0,5 mg/ml.

2.9 Απομόνωση ζώνης DNA από πήκτωμα αγαρόζης - καθαρισμός DNA

2.9.1 Απομόνωση ζώνης DNA με χρήση kit - Gel extraction

Για την απομόνωση ζωνών DNA από πήκτωμα αγαρόζης χρησιμοποιήθηκαν ειδικά kit από το εμπόριο, τα οποία σε πολύ μικρό χρονικό διάστημα καθιστούν δυνατή την απομάκρυνση της αγαρόζης, την ποσοτική κατακρήμνιση του DNA και την αναδιάλυσή του σε διάλυμα έκλουσης (π.χ. TE). Τα kit αυτά χρησιμοποιούν στήλες που περιέχουν πορώδεις πυριτικές μεμβράνες δέσμευσης (silica membranes), στις οποίες δεσμεύεται το DNA. Η βασική αρχή είναι η εξής: το τμήμα DNA του ενδιαφέροντος κόβεται από ένα πήκτωμα αγαρόζης, τοποθετείται σε έναν σωλήνα erpendorf, διαλυτοποιείται σε ένα ρυθμιστικό διάλυμα πρόσδεσης στους 50°C και φορτώνεται στη στήλη. Ο χαιοτροπικός παράγοντας στο ρυθμιστικό διάλυμα πρόσδεσης διαλύει την αγαρόζη, αποδιατάσσει τις πρωτεΐνες και προωθεί την πρόσδεση του DNA στην πυριτική μεμβράνη της στήλης. Οι ακαθαρσίες απομακρύνονται με ένα απλό βήμα ξεπλύματος με ένα διάλυμα ξεπλύματος με αιθανόλη. Το καθαρισμένο DNA έπειτα εκλύεται από τη στήλη σε συνθήκες χαμηλής αλατότητας, με ρυθμιστικό διάλυμα έκλουσης.

Τα kit που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα διατριβή είναι τα εξής:

- GeneJET Gel Extraction Kit, της εταιρείας Fermentas - Thermo Scientific (#K0691)
- NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up, της εταιρείας Macherey-Nagel (#740609.50)

σύμφωνα με το εγχειρίδιο που συνόδευε το κάθε προϊόν.

2.9.2 Καθαρισμός DNA

Με τα ίδια ακριβώς kit έγινε και ο καθαρισμός τμημάτων DNA από συστατικά αντιδράσεων π.χ. PCR. Απλώς παραλήφθηκε το βήμα της

διαλυτοποίησης της αγαρόζης και αντί αυτού, το προϊόν PCR αναμίχθηκε με το ρυθμιστικό διάλυμα πρόσδεσης και φορτώθηκε απευθείας στη στήλη.

Για το διαχωρισμό μορίων DNA υψηλού μοριακού βάρους από μικρότερα μόρια, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος χρωματογραφίας σε στήλη, η οποία βασίζεται στο γεγονός ότι τα μικρομοριακά συστατικά καθυστερούν στο υλικό της στήλης, ενώ τα μεγαλύτερα μόρια του DNA εκλύονται πιο γρήγορα. Η μέθοδος εφαρμόστηκε για το διαχωρισμό ραδιοσημασμένων μορίων DNA – ανιχνευτή από τα μη ενσωματωμένα νουκλεοτίδια μετά από αντίδραση σήμανσης, καθώς και για τον καθαρισμό ολιγονουκλεοτιδίων. Ανάλογα με την περίπτωση χρησιμοποιήθηκαν δυο τύποι στήλης: BioGel P-60 fine (Bio-Rad) (για τον καθαρισμό ανιχνευτών της μεθόδου αποτυπώματος DNase I) και Sephadex G25 (για τον καθαρισμό ανιχνευτών της μεθόδου Μείωσης Κινητικότητας Συμπλόκου αλλά και για τον καθαρισμό συνθετικών ολιγονουκλεοτιδίων).

2.9.2.1 Στήλη χρωματογραφίας BioGel P-60

Η παρασκευή του υλικού της στήλης γίνεται ως εξής: 2 g πολυακρυλαμίδης P-60 fine προστίθενται σε 100 ml διαλύματος TEN (10 mM Tris-HCl pH 7,5, 1 mM EDTA pH 8 και 100 mM NaCl). Γίνεται ανανέωση του διαλύματος και ακολουθεί αποστείρωση για 15 min. Η διαδικασία έχει ως εξής:

1. Σε μια γυάλινη πιπέτα pasteur γίνεται μια τομή (με τη βοήθεια διαμαντιού) στο σημείο που αρχίζει να λεπταίνει και το λεπτό τμήμα απομακρύνεται.
2. Με τη βοήθεια μιας άλλης πιπέτας pasteur τοποθετείται ελάχιστη ποσότητα αποστειρωμένου υαλοβάμβακα στην άκρη της κομμένης πιπέτας.
3. Γίνεται διάβρεξη της στήλης με διάλυμα TEN με τέτοιο τρόπο ώστε να αποφευχθεί ο σχηματισμός φυσαλίδας αέρα στη βάση της στήλης. Αρχίζει η σταδιακή προσθήκη υλικού, ενώ υπάρχει ακόμα διάλυμα μέσα στη στήλη (για να μη σχηματιστεί φυσαλίδα πρέπει το υλικό P-60, το διάλυμα και η στήλη να βρίσκονται στην ίδια θερμοκρασία). Η

προσθήκη υλικού συνεχίζεται μέχρι η επιφάνειά του να έρθει κοντά στη χαραγή της πιπέτας pasteur.

4. Μόλις η περίσσεια του διαλύματος από το πάνω μέρος της στήλης απορροφηθεί, φορτώνεται το δείγμα με προσοχή ώστε να μη δημιουργηθούν φυσαλίδες.
5. Αμέσως μόλις απορροφηθεί το δείγμα ξεπλένονται τα τοιχώματα της στήλης με ελάχιστο διάλυμα TEN. Μόλις απορροφηθεί προστίθεται και νέο διάλυμα TEN μέχρι να συμπληρωθεί η στήλη.
6. Η πορεία της χρωματογραφίας παρακολουθείται με τη βοήθεια της χρωστικής που υπάρχει στο δείγμα (το μπλε της βρωμοφαινόλης κινείται περίπου μαζί με τα ελεύθερα δεοξυνουκλεοτίδια) και επίσης με το μετρητή ραδιενέργειας Geiger.
7. Το κλάσμα που περιέχει τον ανιχνευτή συλλέγεται, σε τελικό όγκο 300 – 500 μl, και φυλάσσεται στους -20°C μέχρι να χρησιμοποιηθεί.

2.9.2.2 Στήλη φυγοκέντρησης Sephadex (spin-column chromatography)

Η παρασκευή του υλικού Sephadex (πολυσακχαρίτης) γίνεται με τον ίδιο τρόπο που παρασκευάζεται το P-60, με τη διαφορά ότι ως διάλυμα εξισορρόπησης χρησιμοποιείται TE_{0,1}.

1. Στο άκρο μιας σύριγγας (ινσουλίνης) του 1 ml τοποθετείται μικρή ποσότητα υαλοβάμβακα (σιλικοναρισμένος για να μην προσδένονται πάνω του νουκλεϊκά οξέα και πρωτεΐνες και αποστειρωμένος).
2. Η σύριγγα συμπληρώνεται με υλικό Sephadex G-25.
3. Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 1 min σε κεφαλή swinging bucket σε 2.000 rpm σε θερμοκρασία δωματίου (το υλικό της στήλης συμπιέζεται). Προσθήκη υλικού και επανάληψη της διαδικασίας της φυγοκέντρησης μέχρι ο όγκος του υλικού στη στήλη να είναι περίπου 0,9 ml. Για τη φυγοκέντρηση η σύριγγα τοποθετείται μέσα σε σωλήνα των 15 ml και αυτός μέσα σε σωλήνα των 50 ml τύπου Falcon.
4. Προσθήκη 100 μl διαλύματος TE_{0,1} και φυγοκέντρηση όπως στο βήμα 3. Επανάληψη μέχρι το έκλουσμα να είναι διαυγές και ο όγκος του να είναι ακριβώς 100 μl.

5. Το δείγμα φορτώνεται στη στήλη σε τελικό όγκο 100 μl (ο όγκος συμπληρώνεται με TE). Η στήλη μεταφέρεται σε σωλήνα 15 ml που περιέχει ένα καθαρό σωλήνα errendorf χωρίς καπάκι.
6. Φυγοκέντρηση όπως στο βήμα 3 και συλλογή του DNA που εκλούεται στο errendorf σε όγκο 100 μl.

Σημ.: Η στήλη χρωματογραφίας δεν πρέπει σε καμία περίπτωση να στεγνώσει. Απαιτείται συνεχής διάβρεξή της μέχρι να τοποθετηθεί το δείγμα.

2.10 Ποσοτικός φωτομετρικός προσδιορισμός νουκλεϊκών οξέων

Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης του DNA ή του RNA σε ένα δείγμα έγινε με μέτρηση οπτικής πυκνότητας μιας αραιώσης αυτού. Χρησιμοποιήθηκαν αραιώσεις: 1:50 και 1:60 για πλασμιδιακό DNA, 2:60 και 3:60 για καθαρισμένο προϊόν PCR ή για τμήμα DNA απομονωμένο από πήκτωμα, και 1:100 για RNA ή DNA ενός ιστού.

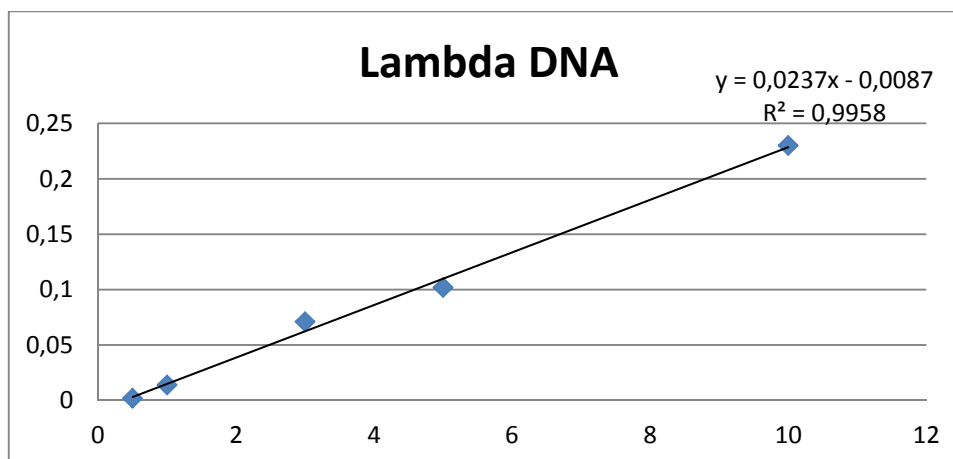
Η φωτομέτρηση έγινε σε φωτόμετρο BioPhotometer της εταιρείας Errendorf και ο υπολογισμός της συγκέντρωσης έγινε με βάση τους ακόλουθους τύπους:

$$C \left(\frac{\mu g}{\mu l} \right) = OD_{260} \times \text{παράγοντας αραιώσης} \times 0,04 \text{ για RNA}$$

$$C \left(\frac{\mu g}{\mu l} \right) = OD_{260} \times \text{παράγοντας αραιώσης} \times 0,05 \text{ για DNA}$$

Όπου παράγοντας αραιώσης: Τελικός όγκος/Αρχικός όγκος διαλύματος. Π.χ. για την αραιώση 2:60, ο παράγοντας αραιώσης θα είναι: $60/2 = 30$.

Για μεγαλύτερη ακρίβεια, κατασκευάστηκε πρότυπη καμπύλη (Εικόνα 2.2) με φωτομέτρηση διαδοχικών αραιώσεων διαλύματος DNA γνωστής συγκέντρωσης του βακτηριοφάγου λ.



Εικόνα 2.2. Πρότυπη καμπύλη απορροφήσεων (OD_{260}) διαδοχικών αραιώσεων διαλύματος DNA γνωστής συγκέντρωσης του βακτηριοφάγου λ. Στον οριζόντιο άξονα: συγκέντρωση DNA σε ng/μl. Στον κάθετο άξονα: απορρόφηση στα 260 nm.

Με βάση αυτή έγιναν οι αντιστοιχίσεις της οπτικής πυκνότητας αραιωμένων δειγμάτων DNA με τη συγκέντρωσή τους. Έπειτα φυσικά η συγκέντρωση του αραιωμένου δείγματος έπρεπε να πολλαπλασιαστεί με τον παράγοντα αραιώσης για να υπολογιστεί η συγκέντρωση του αρχικού δείγματος.

2.11 Κλωνοποίηση DNA τμημάτων

Η διαδικασία της κλωνοποίησης περιλαμβάνει την παρασκευή του κατάλληλου φορέα κλωνοποίησης (πλασμίδιο, φάγος, κοσμίδιο ή τεχνητά χρωμοσώματα), τη δημιουργία του ανασυνδυασμένου DNA μέσω της τεχνητής σύνδεσης άκρων (ligation) μεταξύ του εξωγενούς DNA (ενθέματος) και του φορέα, το μετασχηματισμό των βακτηρίων ξενιστών και την ταυτοποίηση των ανασυνδυασμένων κλώνων.

Στην παρούσα διατριβή χρησιμοποιήθηκε κατά κόρον η διαδικασία της TA κλωνοποίησης (TA cloning). Η διαδικασία αυτή είναι μια τεχνική κλωνοποίησης κατά την οποία αποφεύγεται η χρήση περιοριστικών ενζύμων και είναι ευκολότερη και συντομότερη από την παραδοσιακή διαδικασία κλωνοποίησης.

Σε λίγες περιπτώσεις χρησιμοποιήθηκε η παραδοσιακή πορεία κλωνοποίησης όπου ο φορέας έπρεπε να κοπεί με περιοριστικές ενδονουκλεάσες, να υποστεί κατεργασία ώστε να μην ξανακυκλοποιηθεί πριν την εισαγωγή του DNA ενθέματος και να καθαριστεί, όπως περιγράφεται πιο κάτω (Ενότητα 2.11.1).

2.11.1 Παρασκευή φορέα κλωνοποίησης

1. Πέψη του πλασμιδίου με τα επιθυμητά περιοριστικά ένζυμα. Στην παρούσα διατριβή ως φορέας κλωνοποίησης για την παραδοσιακή διαδικασία κλωνοποίησης χρησιμοποιήθηκε το πλασμίδιο *pBluescript II KS+/-* (STRATAGENE), το οποίο κόπηκε με *Bam*HI ή με *Xba*I.
2. Απομάκρυνση της ακραίας φωσφορικής ομάδας με επίδραση αλκαλικής φωσφατάσης ώστε να αποφευχθεί η επανακυκλοποίηση του γραμμικού πλασμιδίου, με βάση το πρωτόκολλο της κάθε φωσφατάσης. Στην παρούσα διατριβή χρησιμοποιήθηκε η *Calf Intestinal Alkaline Phosphatase* (#18009-019 GIBCO-BRL). Φωσφατάσες ορισμένων εταιρειών επιτρέπουν την απευθείας αποφωσφορυλίωση του κομμένου πλασμιδίου, χωρίς τη μεσολάβηση βήματος καθαρισμού από τα ένζυμα της πέψης. Άλλες φωσφατάσες όμως απαιτούν τον προηγούμενο καθαρισμό, ο οποίος επιτυγχάνεται με τη χρήση του kit για καθαρισμό προϊόντων PCR (Ενότητα 2.9.2).
3. Ηλεκτροφόρηση όλης της αντίδρασης πέψης-αποφωσφορυλίωσης και απομόνωση της ζώνης του κομμένου πλασμιδίου από πήκτωμα αγαρόζης με ειδικό kit (Ενότητα 2.9.1). (το άκοπο, κυκλικό πλασμίδιο έχει διαφορετική κινητικότητα στο πήκτωμα από το κομμένο. Για σιγουριά μπορεί να ηλεκτροφορηθεί παράλληλα ποσότητα άκοπου πλασμιδίου, προκειμένου να είναι εύκολα διακριτό ποιο είναι το άκοπο και ποιο το κομμένο).
4. Ποσοτικός προσδιορισμός του DNA φωτομετρικά (Ενότητα 2.10).

2.11.2 Αντίδραση συγκόλλησης μονόκλωνων συμπληρωματικών άκρων DNA – DNA Ligation

Η σύνδεση άκρων μορίων DNA πραγματοποιείται με τη βοήθεια του ενζύμου T4 DNA λιγάση το οποίο, παρουσία ATP, καταλύει το

σχηματισμό φωσφοδιεστερικού δεσμού μεταξύ 5'-P και 3'-OH. Η σύνδεση μπορεί να πραγματοποιηθεί τόσο μεταξύ τμημάτων DNA με μονόκλωνα συμπληρωματικά (cohesive) άκρα όσο και μεταξύ δίκλωνων, απότομων άκρων (blunt-end).

Η DNA λιγάση που χρησιμοποιήθηκε είναι η: T4 DNA Ligase (# EL0014 και #EL0016 Fermentas – Thermo), η οποία συνοδεύεται και από το αντίστοιχο ρυθμιστικό διάλυμα (Buffer) και ακολουθήθηκε το πρωτόκολλο του κατασκευαστή. Οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν σε όγκο 20 μl και επωάζονταν στους 22°C για 2 – 3 h και προαιρετικά στους 4°C καθόλη τη νύχτα. Η αντίδραση ligation μπορεί να αποθηκευτεί για μετέπειτα χρήση στην κατάψυξη (-20°C).

2.11.2.1 Σύνδεση άκρων φορέα και ενθέματος κομμένων με περιοριστικές ενδονουκλεάσες

Στην περίπτωση αυτή απαιτείται: (α) Κομμένος, καθαρισμένος φορέας. (β) Κομμένο, καθαρισμένο ένθεμα. (γ) DNA λιγάση. (δ) Το ρυθμιστικό διάλυμα (Buffer) της DNA λιγάσης. (ε) H₂O για τη συμπλήρωση του όγκου.

Οι ποσότητες του DNA του φορέα και του ενθέματος (ξένου DNA) είναι κατά κανόνα ισομοριακές, εκτός αν για τη συγκεκριμένη κλωνοποίηση απαιτούνται διαφορετικές αναλογίες (συνήθως 1:3). Για τον υπολογισμό της ποσότητας ενθέματος που πρέπει να προστεθεί στην αντίδραση, χρησιμοποιείται ο ακόλουθος τύπος:

$$ng \text{ ενθέματος} = \frac{ng \text{ φορέα} \times \text{μέγεθος ενθέματος σε kb}}{\text{μέγεθος φορέα σε kb}} \times \text{μοριακή αναλογία ενθέματος : φορέα}$$

2.11.2.2 Σύνδεση άκρων φορέα T-vector και ενθέματος – προϊόντος PCR

Η τεχνική αυτή βασίζεται στο γεγονός ότι: (α) Η συνήθης Taq DNA πολυμεράση προσθέτει μια αδενίνη σε κάθε 3' άκρο του προϊόντος PCR. (β) Χρησιμοποιείται ένας φορέας (T-vector) ο οποίος είναι γραμμικός και φέρει από μία θυμίνη σε κάθε 3' άκρο του. Ως αποτέλεσμα, όταν το προϊόν PCR βρεθεί στο ίδιο διάλυμα με τον T-vector, θα σχηματιστούν δεσμοί υδρογόνου μεταξύ των συμπληρωματικών ζευγών αδενίνης-θυμίνης και αν στο διάλυμα υπάρχει το ένζυμο DNA λιγάση, τότε θα

σχηματίζει και τους φωσφοδιεστερικούς δεσμούς, ενώνοντας «οριστικά» το φορέα με το προϊόν PCR-ένθεμα.

Στην περίπτωση αυτή απαιτείται: (α) φορέας T-vector. (β) Κομμένο, καθαρισμένο ένθεμα. (γ) DNA λιγάση. (δ) Το ρυθμιστικό διάλυμα (Buffer) της DNA λιγάσης. (ε) H₂O για τη συμπλήρωση του όγκου.

Στην παρούσα διατριβή χρησιμοποιήθηκε ο T-vector pTZ57R/T (#SD0601 Fermentas), συστατικό του kit InsTAclone PCR Cloning Kit (#K1214 Fermentas-Thermo Scientific), σε ποσότητα 2 – 3 μl με βάση το πρωτόκολλο του κατασκευαστή. Ομοίως με βάση το πρωτόκολλο, το προϊόν PCR προστίθεται απευθείας μετά την αντίδραση PCR, σε ποσότητα 2 – 3 μl. Σε ορισμένες περιπτώσεις, κατά την κλωνοποίηση ορισμένων προϊόντων PCR που δεν κλωνοποιήθηκαν εύκολα με τον τρόπο αυτό, η κλωνοποίηση επετεύχθη αφού προηγήθηκε καθαρισμός του προϊόντος PCR (με kit βλ. Ενότητα 2.9.2) ή απομόνωση ζώνης DNA από το προϊόν PCR μέσω πηκτώματος αγαρόζης (βλ. Ενότητα 2.9.1), της αντίδρασης σύνδεσης άκρων.

2.11.3 Παρασκευή δεκτικών κυττάρων για μακρόχρονη διατήρηση (frozen competent cells)

Για το στέλεχος DH5α της *Escherichia coli* που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα διατριβή, ακολουθήθηκαν τα εξής βήματα:

1. Ανάπτυξη καλλιέργειας έναρξης σε 6 ml υγρού θρεπτικού υλικού LB χωρίς αντιβιοτικό. Επώαση στους 37°C κατά τη διάρκεια της νύχτας.
2. Εμβολιασμός 40 ml θρεπτικού υλικού με 350 μl καλλιέργειας έναρξης, σε μια αποστειρωμένη κωνική φιάλη. Επώαση με ανάδευση στους 37°C για 3 – 3,5 h, έως ότου η οπτική πυκνότητα στα 600 nm να είναι περίπου 0,35 – 0,4 μονάδες (OD₆₀₀ = 0,35 – 0,4).
3. Τοποθέτηση της καλλιέργειας στον πάγο για 15 min. Ακολουθεί μεταφορά της καλλιέργειας σε σωλήνα τύπου Falcon των 50 ml και φυγοκέντρηση σε 2500 rpm, στους 4°C, για 12 min. Απόρριψη του υπερκείμενου με αναστροφή του σωλήνα.
4. Αναδιάλυση του κυτταρικού ιζήματος σε 15 ml διαλύματος TF1 (100 mM RbCl₂, 50 mM MnCl₂·4H₂O, 30 mM KAc pH 7,5, 10 mM CaCl₂·2H₂O, 15% w/v γλυκερόλη, τελικό pH διαλύματος: 5,8, ρύθμιση με διάλυμα

0,2 M CH₃COOH) και επώαση των κυττάρων στον πάγο για 15 – 20 min.

5. Φυγοκέντρηση σε 2500 rpm, στους 4°C για 12 min.
6. Αναδιάλυση του κυτταρικού ιζήματος σε 3 ml διαλύματος TF2 (10 mM MOPS pH 6,8, 10 mM RbCl₂, 75 mM CaCl₂·2H₂O, 15% w/v γλυκερόλη, τελικό pH διαλύματος 6,8, ρύθμιση με προσθήκη διαλύματος NaOH) και επώαση των κυττάρων στον πάγο για 15 min.
7. Κατανομή 100 και 200 μl δεκτικών κυττάρων σε σωλήνες erpendorf (στον πάγο). Διατήρηση στους -80°C.

Σημ.: Τα διαλύματα TF1 και TF2 αποστειρώνονται με διήθηση από φίλτρο οξικής κυτταρίνης Minisart® (#16534 Sartorius) με πόρους διαμέτρου 0,2 μm.

2.11.4 Μετασχηματισμός δεκτικών κυττάρων (Transformation)

1. Προσθήκη 1 – 200 ng ανασυνδυασμένου DNA (στην πράξη, 5 μl αντίδρασης ligation) σε 50 – 100 μl δεκτικών κυττάρων και επώαση για 30 min στον πάγο.
2. Θερμικό σοκ των κυττάρων με επώαση για 2 min στους 42°C. Μεταφορά στον πάγο για 2 – 3 min.
3. Προσθήκη 1 ml υγρού θρεπτικού υλικού LB και επώαση υπό ανάδευση για 1 ώρα στους 37°C.
4. Φυγοκέντρηση σε 6.000 rpm για 3 min. Απόρριψη του υπερκειμένου με αναστροφή, αλλά έτσι ώστε να παραμείνουν περίπου 200 μl LB και το ίζημα των κυττάρων. Αναδιάλυση των κυττάρων με ελαφριά ανακίνηση στο εναπομείναν LB.
5. Επίστρωση των βακτηρίων σε τρυβλία (διαμέτρου 90 mm) που περιέχουν θρεπτικό υλικό LB στερεοποιημένο με άγαρ (bottom agar), το κατάλληλο αντιβιοτικό και έχουν επιστρωθεί με 40 μl X-gal (20 mg/ml).
6. Επώαση των τρυβλίων ανάποδα (με το καπάκι προς τα κάτω) στους 37°C για 16 h.

2.11.5 Επιλογή και φύλαξη των ανασυνδυασμένων κλώνων

Η ταυτοποίηση των ανασυνδυασμένων κλώνων πραγματοποιείται με τα ακόλουθα φίλτρα επιλογής.

Τα βακτηριακά κύτταρα μετά το μετασχηματισμό επιστρώνονται σε θρεπτικό μέσο παρουσία του κατάλληλου αντιβιοτικού (αμπικιλίνη στην παρούσα διατριβή) για το οποίο το πλασμίδιο παρέχει ανθεκτικότητα, με συνέπεια να αναπτύσσονται μόνο τα μετασχηματισμένα κύτταρα.

Το δεύτερο φίλτρο επιλογής αφορά την παρουσία X-gal στο θρεπτικό μέσο και την επιλογή των άσπρων αποικιών. Η επιλογή αυτή βασίζεται στο γεγονός ότι η παρεμβολή του εξωγενούς DNA γίνεται εντός του πολυσυνδέσμου του πλασμιδίου, ο οποίος έχει ενσωματωθεί στο γονίδιο της β-γαλακτοζιδάσης, με επακόλουθο την αδρανοποίησή του γονιδίου και την αδυναμία υδρόλυσης του X-gal. Στην περίπτωση που τα κύτταρα έχουν προσλάβει το μη ανασυνδυασμένο πλασμίδιο το γονίδιο της β-γαλακτοζιδάσης εκφράζεται φυσιολογικά και το προϊόν της διασπά το X-gal παράγοντας μια μπλε χρωστική.

Ο έλεγχος των ανασυνδυασμένων κλώνων πραγματοποιείται επίσης μέσω απομόνωσης πλασμιδιακού DNA και πέψης με τις κατάλληλες περιοριστικές ενδονουκλεάσες και μέσω προσδιορισμού της πρωτοδιάταξης του εξωγενούς DNA.

Η διατήρηση του ανασυνδυασμένου κλώνου γίνεται με έντονη ανακίνηση (vortex) της καλλιέργειας και διαλύματος 100% γλυκερόλης σε αναλογία 1 : 1 (500 μl καλλιέργειας με 500 μl γλυκερόλης) σε κατάλληλους σωλήνες (liquid stabs). Οι σωλήνες φυλάσσονται στους -80°C όπου μπορούν να διατηρηθούν για αρκετά χρόνια.

Σημ.: Επειδή οι πιο πάνω διαδικασίες εμπλέκουν ζωντανά βακτήρια, και υπάρχει διαρκώς ο κίνδυνος μόλυνσεων των δειγμάτων αλλά και του εργασιακού χώρου, θα πρέπει να τηρούνται κάποιοι κανόνες:

- ❖ Οι διαδικασίες που εμπλέκουν βακτήρια θα πρέπει να γίνονται παρουσία λύχνου.
- ❖ Όλα τα υλικά που πρόκειται να χρησιμοποιηθούν (αναλώσιμα ή μη) θα πρέπει να είναι αποστειρωμένα!

- ❖ Η αποστείρωση γυάλινων ράβδων που χρησιμοποιούνται για επίστρωση βακτηρίων σε τρυβλίο (κεκαμμένες) ή για ανακαλλιέργεια σε υγρό θρεπτικό υλικό, γίνεται τη στιγμή της χρήσης με εμβάπτισή τους σε αιθανόλη και «κάψιμο» σε αναγωγική φλόγα λύχνου.
- ❖ Η απόρριψη πλαστικών αναλώσιμων που έχουν έρθει σε επαφή με βακτήρια ή θρεπτικό υλικό, αλλά και θρεπτικού υλικού θα πρέπει να γίνεται σε διάλυμα χλωρίνης 10%.
- ❖ Οι κωνικές φιάλες και οποιοδήποτε άλλο γυάλινο σκεύος που περιείχε βακτήρια ή θρεπτικό υλικό, θα πρέπει να ξεπλένονται με διάλυμα χλωρίνης 10%.

2.12 Κατασκευή δίκλωνων συνθετικών ολιγονουκλεοτιδίων

Κατασκευάστηκαν συνθετικά δίκλινα ολιγονουκλεοτίδια τα οποία αντιστοιχούν στην Κύρια Ρυθμιστική περιοχή του mtDNA και χρησιμοποιήθηκαν κυρίως σε πειράματα αλληλεπιδράσεων DNA-πρωτεΐνης. Για κάθε δίκλινο ολιγονουκλεοτίδιο συντέθηκαν οι δύο συμπληρωματικές αλυσίδες χωριστά (από την εταιρεία VBC Αυστρίας) και στη συνέχεια αναδιατάχθηκαν στις κατάλληλες συνθήκες. Ο σχεδιασμός των μονόκλωνων αλυσίδων έγινε έτσι ώστε μετά την αναδιάταξη, στο δίκλινο μόριο, να προεξέχουν τα 5' άκρα για να είναι δυνατή η σήμανση του δίκλωνου ολιγονουκλεοτιδίου με Klenow. Επίσης, στα 5' άκρα των αλυσίδων προστέθηκε η αλληλουχία αναγνώρισης κάποιας περιοριστικής ενδονουκλεάσης για να διευκολυνθεί η κλωνοποίησή τους εάν αυτό ήταν επιθυμητό.

Η διαδικασία κατασκευής των δίκλωνων ολιγονουκλεοτιδίων έχει ως εξής:

1. Ανάμιξη ισομοριακών ποσοτήτων (2 – μg) των δυο συμπληρωματικών αλυσίδων σε τελικό όγκο 100 μl διαλύματος TE που περιέχει 150 mM NaCl.
2. Τοποθέτηση του μίγματος στους 90°C – 94°C (σε θερμομπλόκ υδατόλουτρου) για 1 –5 min.

3. Κλείνουμε το υδατόλουτρο και αφήνουμε τη θερμοκρασία να πέσει μέχρι τη θερμοκρασία δωματίου (3 – 4 h). Αφήνουμε 10 min σε θερμοκρασία δωματίου και τοποθετούμε στον πάγο. Εναλλακτικά βγάζουμε το θερμομπλοκ με τα δείγματά μας και το θερμόμετρο από τη συσκευή και το αφήνουμε στον πάγο να κρυώσει (2 h περίπου). Δεν θέλουμε η ψύξη να είναι απότομη για να μην γίνει στραβά η υβριδοποίηση των αλυσίδων. Όλη η διαδικασία πρέπει να γίνεται σταδιακά.
4. Ακολουθεί καθαρισμός του δίκλωνου ολιγονουκλεοτιδίου με στήλη φυγοκέντρησης Sephadex G-25 (βλ. [Ενότητα 2.9.2.2](#))
5. Προσθήκη 1/10 του όγκου 3 M NaAc pH 5,2 και κατακρήμνιση του DNA με προσθήκη αιθανόλης 100% και επώαση 1 h στους -80°C και 1/2 h στους -20°C. Φυγοκέντρηση στα 12.000 rpm, 4°C, 15 min. Απόρριψη υπερκείμενου με πιπέτα Pasteur για να μην ξεκολλήσει το ίζημα.
6. Ξέπλυμα του ιζήματος με 500 μl 70% αιθανόλη, φυγοκέντρηση στα 12.000 rpm, 4°C, 10 min, ξήρανση ιζήματος υπό κενό και αναδιάλυση στον επιθυμητό όγκο H₂O (20 μl).

2.13 Προσδιορισμός πρωτοδιάταξης DNA (DNA Sequencing)

Για τον προσδιορισμό της πρωτοδιάταξης, τα δείγματα DNA εστάλησαν για αλληλούχηση στην εταιρεία MacroGen Κορέας ή VBC Αυστρίας ή Biogenomica Ελλάδας. Οι αλληλουχίες των δειγμάτων «διαβάστηκαν» μέσω αυτόματου αναλυτή και παραδόθηκαν από την εκάστοτε εταιρεία, ως αρχεία χρωματογραφημάτων (.ab1) ή αδρής αλληλουχίας (.txt).

2.14 Ραδιοσήμανση άκρων τμημάτων DNA με τη μέθοδο “Klenow”

Για τις ανάγκες της διατριβής χρησιμοποιήθηκαν τριφωσφορικά δεοξυριβονουκλεοτίδια ([α -³²P]dATP) για τη σήμανση DNA ανιχνευτών. Τα

ραδιενεργά νουκλεοτίδια είχαν ειδική ενεργότητα 3.000 Ci/mmol. Όλα τα ραδιενεργά αντιδραστήρια προήλθαν από την εταιρεία IZOTOP Ουγγαρίας. Για τη σήμανση μορίων DNA χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος πολυμερισμού των άκρων των τμημάτων DNA μέσω της μεγάλης υπομονάδας της DNA πολυμεράσης I (Klenow fragment).

Η μέθοδος Klenow στηρίζεται στις ιδιότητες της μεγάλης υπομονάδας της DNA πολυμεράσης I. Αυτή διαθέτει την ενεργότητα 5'→3' πολυμεράσης και 3'→5' εξωνουκλεάσης, ενώ στερείται της 5'→3' εξωνουκλεάσης. Η ραδιοσήμανση πραγματοποιείται με συμπλήρωση των μονόκλωνων άκρων και απαιτεί ελεύθερα 3'-OH στα υπολειπόμενα άκρα του τμήματος DNA. Τα ραδιενεργά νουκλεοτίδια επιλέγονται με τέτοιο τρόπο ώστε να υπάρχουν τα συμπληρωματικά τους στα προεξέχοντα 5' άκρα. Η αντίδραση έχει συνολικό όγκο 20 μl και για τα συστατικά της αλλά και για τις συνθήκες επώασης ακολουθείται το πρωτόκολλο του κατασκευαστή του ενζύμου. Στην παρούσα διατριβή χρησιμοποιήθηκε το ένζυμο Klenow Fragment (#EP0051 Fermentas/Thermo Scientific).

Αναλυτικά η αντίδραση σήμανσης περιλαμβάνει τα εξής:

- 0,1 – 5 μg γραμμικό κομμάτι DNA με προεξέχοντα άκρα
- 1X ρυθμιστικό διάλυμα (Buffer) που παρέχεται μαζί με το ένζυμο από την εταιρεία
- 0,25 mM dTTP + dCTP + dGTP (μίγμα νουκλεοτιδίων εκτός του ραδιενεργού dATP)
- 5 units ένζυμο Klenow
- 15 – 20 μCi [α -³²P]dATP

Το ένζυμο προστίθεται προτελευταίο, ενώ τελευταίο προστίθεται το ραδιενεργό νουκλεοτίδιο. Η αντίδραση επώαζεται στους 37°C για 30 min και τερματίζεται με θέρμανση τους 75°C για 10 min. Ακολουθεί απομάκρυνση των μη ενσωματωμένων νουκλεοτιδίων με διήθηση σε χρωματογραφική στήλη Sephadex G25 (βλ. [Ενότητα 2.9.2.2](#))

2.15 Εκχύλιση πρωτεϊνών από ιστούς μυδιού

Για την απομόνωση πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων από ιστούς μυδιού χρησιμοποιήθηκαν δυο τρόποι. Ο πρώτος (Ενότητα 2.15.1) οδήγησε στο διαχωρισμό μεταξύ πυρηνικού και κυτταροπλασματικού κλάσματος ενώ ο δεύτερος (Ενότητα 2.15.2), στην απομόνωση ολικού πρωτεϊνικού εκχυλίσματος (total extract). Όλες οι διαδικασίες πραγματοποιούνται στον πάγο ή στους 4°C για περιορισμό της ενεργότητας των πρωτεασών. Οι αναστολείς πρωτεασών (π.χ. PMSF) πρέπει να προστίθενται σε κάθε διάλυμα λίγο πριν τη χρήση, διότι το νερό που περιέχουν τα διαλύματα τους απενεργοποιεί σε περίπου 1 ώρα. Οι ίδιοι είναι διαλυμένοι σε μη υδατικές ουσίες και φυλάσσονται στους -20°C.

2.15.1 Απομόνωση πυρηνικού και κυτταροπλασματικού πρωτεϊνικού εκχυλίσματος από ιστούς μυδιού

1. Κόβουμε 100 mg του επιθυμητού ιστού. Ξέπλυμα με παγωμένο PBS (ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών σε αλατούχο διάλυμα) και στέγνωμα με διηθητικό χαρτί.
2. Ομοιογενοποίηση (σε γυάλινο δοκιμαστικό σωλήνα με έμβολο από Teflon που εφαρμόζει καλά) του ιστού σε PBS με 1 mM PMSF και 1 mM DTT σε τελικό όγκο 1 ml. Μεταφορά του ομοιογενοποιημένου σε σωλήνα eppendorf 1,5 ml.
3. Φυγοκέντρηση στα 250 g (~1500 rpm) για 5 min στους 4°C. Προσεκτική αναρρόφηση υπερκειμένου, διότι το ίζημα κυττάρων ανασηκώνεται εύκολα.
4. Αναδιάλυση του ιζήματος σε 250 μl Buffer 1 (25 mM HEPES, 5 mM KCl, 0,5 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 1 mM PMSF)
5. Προσθήκη 250 μl Buffer 2 (25 mM HEPES, 5 mM KCl, 0,5 mM MgCl₂, 1% (v/v) NP-40, 1 mM DTT, 1 mM PMSF), ήπια ανάδευση και περιστροφή στους 4°C για 15 min.
6. Φυγοκέντρηση στα 500 g (~2.500 rpm) για 7 min στους 4°C για να διαχωριστεί το κυτταροπλασματικό κλάσμα από τους πυρήνες. Προσεκτική μεταφορά του υπερκειμένου (**κυτταροπλασματικό πρωτεϊνικό εκχύλισμα**) σε νέο σωλήνα. Παραμονή του ιζήματος των πυρήνων στον πάγο.

7. Φυγοκέντρηση στα 20.000 g για 15 min στους 4°C για να καθαριστεί το κυτταροπλασματικό εκχύλισμα. Μεταφορά του υπερκείμενου σε νέο σωλήνα. Χωρισμός σε σωλήνες erpendorf (0,5 ml) σε κλάσματα (aliquots) των 50 μl. Άμεση χρήση ή αποθήκευση στους -80°C.
8. Προσθήκη 500 μl Buffer 3 (1:1 μίγμα των Buffer 1 και 2) στο ίζημα πυρήνων, ήπια ανάδευση με αναποδογύρισμα του σωλήνα και παραμονή στον πάγο για 2 min. Φυγοκέντρηση στα 500 g (~2.500 rpm) για 7 min στους 4°C και προσεκτική αναρρόφηση του υπερκειμένου. Επανάληψη 2 φορές.
9. Προσθήκη 300 μl παγωμένου Buffer 4 (25 mM HEPES, 10% (w/v) Sucrose, 350 mM NaCl, 0,01% NP-40, 1 mM DTT, 1 mM PMSF). Αναρρόφηση και απελευθέρωση 5 – 10 φορές για να διαλυθούν τυχόν συσσωματώματα. Περιστροφή για 1 h στους 4°C (900 – 1.200 rpm).
10. Καθαρισμός του πυρηνικού λύματος με φυγοκέντρηση στα 20.000 g για 10 min στους 4°C. Μεταφορά του υπερκειμένου (**πυρηνικό πρωτεϊνικό εκχύλισμα**) σε νέο σωλήνα. Χωρισμός σε σωλήνες erpendorf (0,5 ml) σε κλάσματα (aliquots) των 50 μl. Άμεση χρήση ή αποθήκευση στους -80°C.

2.15.2 Απομόνωση ολικού πρωτεϊνικού εκχυλίσματος από ιστούς μυδιού

Τροποποιημένο από [Chora et al. \(2009\)](#):

1. Κόβουμε μικρό κομμάτι του επιθυμητού ιστού (να καταλαμβάνει περίπου 250 μl σε σωλήνα erpendorf). Προσθήκη 3 όγκων (750 μl) Homogenization Buffer (10 mM HEPES, 250 mM Sucrose, 1 mM DTT, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF) και καλή ομοιογενοποίηση (σε γυάλινο δοκιμαστικό σωλήνα με έμβολο από Teflon που εφαρμόζει καλά) του ιστού.
2. Μεταφορά όλου του ομοιογενοποιημένου σε ένα παγωμένο σωλήνα erpendorf και φυγοκέντρηση στα 15.000 g (~12.000 rpm) για 2 h στους 4°C.
3. Διατήρηση του υπερκείμενου (**ολικό πρωτεϊνικό εκχύλισμα**). Χωρισμός σε σωλήνες erpendorf (0,5 ml) σε κλάσματα (aliquots) των 50 μl. Άμεση χρήση ή αποθήκευση στους -80°C.

Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης όλων των πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων έγινε με τη μέθοδο Bradford (Bradford 1976). Για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης μετρήθηκε η απορρόφηση στα 560 nm διαλυμάτων αλβουμίνης γνωστής συγκέντρωσης. Στην παρούσα διατριβή χρησιμοποιήθηκε έτοιμο διάλυμα Bradford του εμπορίου: Coomassie Protein Assay Reagent Kit της εταιρείας BioRad (Coomassie Brilliant Blue G-250, μεθανόλη, φωσφορικό οξύ και διαλυτικοί παράγοντες), ενώ για την κατασκευή της καμπύλης αλβουμίνης, χρησιμοποιήθηκε η αλβουμίνη βοός Pentex Bovine Albumin Crystallized της εταιρείας MILES LABORATORIES ING.

2.16 Μελέτες αλληλεπίδρασης DNA-πρωτεϊνών

2.16.1 Μείωση της κινητικότητας συμπλόκου DNA-πρωτεϊνών σε μη-αποδιατακτικό πήκτωμα πολυακρυλαμίδης (ΜΚΣ)

Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA) ή Mobility Shift Electrophoresis ή Gel Retardation Assay ή Bandshift Assay ή Gel Shift Assay ή Gel Mobility Shift Assay.

Η ικανότητα ενός τμήματος DNA να προσδέσει μία ή περισσότερες πρωτεΐνες μπορεί να ελεγχθεί με τη μέθοδο της μείωσης της κινητικότητας του DNA σε ηλεκτροφόρηση (Garner and Revzin 1981). Η μέθοδος βασίζεται στην παρατήρηση ότι τα σύμπλοκα DNA-πρωτεΐνης, μέσα σε ένα πήκτωμα πολυακρυλαμίδης χαμηλής ιονικής ισχύος, κινούνται πιο αργά από ότι το ελεύθερο DNA. Η μεγάλη ευαισθησία της μεθόδου επιτρέπει την ανίχνευση πρωτεϊνικών παραγόντων που βρίσκονται σε πολύ μικρές ποσότητες και επιπλέον μπορεί να δώσει πληροφορίες για τον αριθμό και το είδος των πρωτεϊνών που προσδένονται στο εκάστοτε DNA. Διαφορετικού τύπου πρωτεΐνες, όταν προσδένονται στο ίδιο DNA, δίνουν σύμπλοκα με διαφορετική κινητικότητα και ειδικότητα. Έτσι, ακόμα κι αν οι θέσεις πρόσδεσης πάνω στο DNA είναι επικαλυπτόμενες, τα διαφορετικά σύμπλοκα μπορούν να διαχωριστούν και να χαρακτηριστούν.

Ανάλογα με τον αριθμό, το μοριακό βάρος και τη θέση των πρωτεϊνών πάνω στο DNA δημιουργούνται ένα ή περισσότερα σύμπλοκα με διαφορετική κινητικότητα. Όσο μεγαλύτερο είναι το τμήμα του DNA που χρησιμοποιείται τόσο πιο πολύπλοκο είναι το πρότυπο. Ένας τρόπος να ελεγχθεί η ειδικότητα των αλληλεπιδράσεων που γίνονται είναι με τα πειράματα ανταγωνισμού. Σε αυτά, πριν την προσθήκη του πρωτεϊνικού εκχυλίσματος στην αντίδραση, το ραδιοσημασμένο DNA αναμιγνύεται με διάφορες ποσότητες του ίδιου ή διαφορετικού μη σημασμένου DNA που δρα ως ανταγωνιστής (Singh et al. 1986). Εάν το ανταγωνιστικό DNA περιέχει αλληλουχίες αναγνώρισης για κάποια από τις πρωτεΐνες που συμμετέχουν στα σύμπλοκα, τότε ο σχηματισμός του αντίστοιχου συμπλόκου με το ραδιοσημασμένο DNA θα ελαττωθεί. Ο βαθμός ελάττωσης εξαρτάται από την ποσότητα του ανταγωνιστικού DNA, σε σχέση με το ραδιοσημασμένο στην αντίδραση και είναι ανάλογος με το βαθμό συγγένειας της αντίστοιχης πρωτεΐνης με αυτό.

Πληθώρα παραγόντων επηρεάζουν το σχηματισμό συμπλόκων DNA-πρωτεΐνης *in vitro*. Πιο σημαντικοί από αυτούς είναι η συγκέντρωση αλάτων όπως NaCl, KCl και MgCl₂, το pH, η συγκέντρωση πρωτεΐνης και DNA, η φύση και η συγκέντρωση μη ειδικού DNA και οι συνθήκες ηλεκτροφόρησης. Πιο συγκεκριμένα: (α) αύξηση των μονοθενών αλάτων (NaCl, KCl) οδηγεί σε πιο γρήγορη διάσπαση των συμπλόκων DNA-πρωτεΐνης, επομένως ευνοούνται πιο ειδικές αλληλεπιδράσεις. Αντίθετα, η επίδραση των δισθενών κατιόντων (π.χ. Mg⁺⁺) ποικίλλει ανάλογα με την πρωτεΐνη, γι αυτό και, συνήθως, τα ιόντα αυτά δεν περιλαμβάνονται στο βασικό πρωτόκολλο. (β) Το pH, εφόσον δεν κινείται σε ακραίες τιμές που μπορεί να αλλοιώνουν τις πρωτεΐνες, επίσης επηρεάζει την ειδικότητα των συμπλόκων (χαμηλό pH - ισχυρότερη άρα λιγότερο ειδική πρόσδεση και αντίστροφα). (γ) Η παρουσία, σε κατάλληλη ποσότητα, μη ειδικού DNA είναι απολύτως απαραίτητη προκειμένου να παρεμποδιστεί η πρόσδεση πολλών μη ειδικών παραγόντων στο ραδιοσημασμένο DNA. Συνήθως χρησιμοποιείται το συνθετικό πολυμερές poly(dIdC) ή τεμαχισμένο με υπερήχηση DNA σπέρματος σολωμού (sonicated salmon sperm DNA). (δ) Η κινητικότητα ενός συμπλόκου DNA-πρωτεΐνης σε ένα μη αποδιατακτικό πήκτωμα πολυακρυλαμίδης καθορίζεται κυρίως από το μέγεθος και το φορτίο της πρωτεΐνης. Έτσι, διαφοροποιήσεις στην πυκνότητα του

πηκτώματος, την αναλογία ακρυλαμίδης : MBA και την ιοντική ισχύ, μπορούν να επηρεάσουν το πρότυπο των συμπλόκων κάθε αντίδρασης.

Στην πράξη:

Η μέθοδος περιλαμβάνει τα εξής βήματα: σήμανση του DNA στα άκρα με ραδιενεργό ^{32}P με το ένζυμο Klenow (βλ. [Ενότητα 2.14](#)), επώαση με πρωτεϊνικά εκχυλίσματα, ηλεκτροφόρηση των αντιδράσεων σε μη αποδιατακτικό πήκτωμα πολυακρυλαμίδης 5% (βλ. [Ενότητα 2.7.2](#)) και ανίχνευση των συμπλόκων στο πήκτωμα με αυτοραδιογραφία (βλ. [Ενότητα 2.17](#)).

Οι αντιδράσεις έγιναν σε τελικό όγκο 30 μl , μέσα σε διάλυμα 1X BB (12 mM HEPES pH 7, 4 mM Tris pH 7, 60 mM KCl, 1 mM EDTA pH 8, 1 mM DTT, 14% γλυκερόλη) που περιείχε τα εξής: 2 μg poly(dIdC) ή 1,8 μg sonicated salmon sperm DNA, 10 ng/ μl BSA, $10^2 - 10^3$ cpm ραδιοσημασμένου στα άκρα τμήματος DNA (1 – 10 ng), 5 μg πρωτεϊνικό εκχύλισμα και 27 mM NaCl (τελική συγκέντρωση). Όσον αφορά το NaCl, διάφορες συγκεντρώσεις δοκιμάστηκαν σε αναλύσεις σταθερότητας συμπλόκου.

Τα πιο πάνω πλην του ραδιοσημασμένου DNA, αναμιγνύονται καλά στον πάγο και στη συνέχεια επωάζονται στους 30°C για 10 min. Έπειτα προστίθεται το DNA και η αντίδραση επωάζεται για άλλα 30 min στην ίδια θερμοκρασία. Ακολουθεί αμέσως ηλεκτροφόρηση σε μη αποδιατακτικό πήκτωμα πολυακρυλαμίδης.

Στις αντιδράσεις ανταγωνισμού, πριν την προσθήκη του ραδιοσημασμένου DNA, προστίθεται μη σημασμένο ανταγωνιστικό DNA, σε μοριακή περίσσεια 50X –100X επί του ραδιοσημασμένου τμήματος DNA και η επώαση πριν την προσθήκη του ραδιοσημασμένου DNA διαρκεί 1 h.

Η ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων έγινε σε μη αποδιατακτικά πηκτώματα πολυακρυλαμίδης 5% με βάση τη διαδικασία που περιγράφεται στην [Ενότητα 2.7.2](#). Μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης, το πήκτωμα μεταφέρεται σε χαρτί Whatman 3MM. Ακολουθεί αυτοραδιογραφία.

2.16.2 Μέθοδος αποτυπώματος (DNase I footprinting DNA)

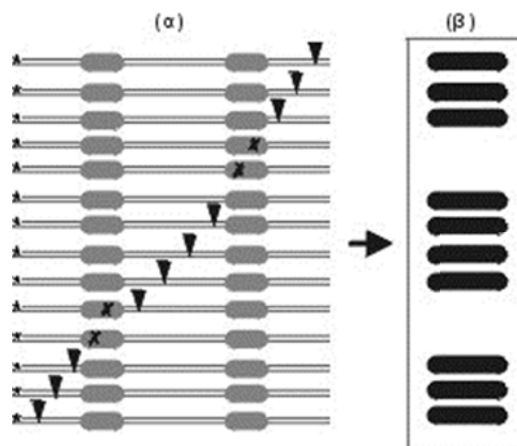
Η μέθοδος του αποτυπώματος χρησιμοποιείται για την ανάλυση των συμπλόκων που σχηματίζονται κατά τις αλληλεπιδράσεις DNA-πρωτεϊνών και επιτρέπει τον προσδιορισμό των θέσεων πρόσδεσης ειδικών πρωτεϊνών πάνω στο DNA (Schmitz and Galas 1978). Η μέθοδος βασίζεται στο γεγονός ότι η πρόσδεση μιας πρωτεΐνης πάνω στο DNA παρεμποδίζει τη δράση της DNase I στη συγκεκριμένη θέση αλληλεπίδρασης αλλά όχι και γύρω από αυτή. Έτσι, μερική πέψη ενός συμπλόκου DNA-πρωτεΐνης με DNase I θα οδηγήσει στο κόψιμο του DNA σε διάφορα σημεία εκτός από τη θέση που καλύπτεται από την πρωτεΐνη. Η θέση αυτή θα φανεί ως κενό (αποτύπωμα) κατά την ανάλυση των προϊόντων της πέψης σε αποδιατακτικό πήκτωμα πολυακρυλαμίδης (Εικόνα 2.3).

Η διαδικασία δημιουργίας «αποτυπώματος» περιλαμβάνει τα εξής γενικά βήματα:

- Γίνεται μερική επίδραση DNase I σε ένα τμήμα DNA πριν και μετά την αλληλεπίδρασή του με πρωτεΐνες. Παράλληλα γίνεται προσδιορισμός της πρωτοδιάταξης του ίδιου DNA κατά Maxam-Gilbert (μόνο αντίδραση G/A), που θα χρησιμοποιηθεί ως μάρτυρας.
- Ακολουθεί ανάλυση των προϊόντων κάθε αντίδρασης και του μάρτυρα σε αποδιατακτικό πήκτωμα πολυακρυλαμίδης
- Γίνεται σύγκριση των ηλεκτροφορητικών προτύπων του ελεύθερου DNA και του DNA με τις προσδεμένες πρωτεΐνες και προσδιορίζονται οι θέσεις όπου υπάρχει απουσία ζωνών (κενό) με τη βοήθεια του μάρτυρα.

Η δημιουργία καλού αποτυπώματος, προϋποθέτει το κόψιμο του ανιχνευτή σε πολλά και διαφορετικά σημεία, τόσο πριν όσο και μετά την αλληλεπίδρασή του με το πρωτεϊνικό εκχύλισμα. Η δράση του ενζύμου DNase I, επομένως, πρέπει να ρυθμιστεί με τέτοιο τρόπο ώστε κάθε μόριο του ανιχνευτή να κοπεί μια μόνο φορά και, αν είναι δυνατόν, σε διαφορετικό σημείο, έτσι ώστε να προκύψει ένας πληθυσμός μορίων διαφορετικών μεγεθών. Για το σκοπό αυτό, δοκιμάζεται η επίδραση του ενζύμου σε διαφορετικές συγκεντρώσεις και σε διαφορετικούς χρόνους

επώασης πάνω στο ελεύθερο DNA και στο σύμπλοκο DNA -πρωτεϊνών και επιλέγονται οι συνθήκες με το καλύτερο αποτέλεσμα.



Εικόνα 2.3: Σχηματική αναπαράσταση της δημιουργίας αποτυπώματος ενός συμπλόκου DNA-πρωτεΐνης από τη δράση του ενζύμου DNase I. **(α)** Δίκλωνα μόρια ενός τμήματος DNA ραδιοσημασμένα στο ένα άκρο (**αστεράκι**) στα οποία έχουν προσδεθεί πρωτεΐνες (**γκρι πλαίσια**). Με **μαύρα τρίγωνα** σημειώνονται οι τυχαίες θέσεις όπου κόβει η DNase I. **(β)** Ηλεκτροφορητικό πρότυπο των μορίων του A μετά την επίδραση του ενζύμου DNase I σε αποδιατακτικό πήκτωμα πολυακρυλαμίδης (από [Κραββαρίτη 2002](#))

Στην πράξη:

A. Ραδιοσήμανση τμημάτων DNA

1. 2 – 3 μg ανασυνδυασμένου πλασμιδιακού DNA γίνονται γραμμικά με επίδραση κατάλληλης περιοριστικής ενδονουκλεάσης. Επιλέγεται ένζυμο που να κοβει στη μία πλευρά του κλώνοποιημένου DNA (ενθέματος) και να δημιουργεί προεξέχον 5' άκρο (εδώ χρησιμοποιήθηκε η XbaI).

Συστατικά	Όγκος
πλασμιδικό DNA	3 – 4 μl
XbaI	2 μl
Buffer ενζύμου	10 μl
H ₂ O	85 – 84 μl
Επώαση στους 37°C 5 – 6 h ή ο/η (κατά τη νύχτα).	

Παρασκευάστηκαν 2 ίδιες πέψεις για κάθε ανιχνευτή για μεγαλύτερη ποσότητα καλά κομμένου ανιχνευτή.

2. Ακολουθεί κατακρήμνιση του DNA.

- Προσθήκη TE ώστε ο τελικός όγκος να φτάσει τα 200 μl.
- Προσθήκη ίσου όγκου φαινόλης/SEVAG, έντονο vortex, φυγοκέντρηση στις 12.000 στροφές για 5 min. Αναρρόφηση υπερκείμενου, μεταφορά σε νέο σωλήνα erpendorf.
- Προσθήκη 1/10 όγκου 3 M NaAc pH 5,2 και 2 – 2,5 όγκων αιθανόλης 100%. Ήπια ανάδευση με αναστροφή του σωλήνα 3 – 4 φορές.
- Παραμονή στους -80°C για 40 min και -20°C για 20 – 30 min. Εναλλακτικά μετά τους -80°C μπορεί να μείνει ο/η στους -20°C.
- Φυγοκέντρηση στους 4°C για 20 min στα 12.000 rpm. Άδειασμα του υπερκείμενου με πιπέτα pasteur
- Προσθήκη 500 μl αιθανόλης 80%, ανάδευση, φυγοκέντρηση για 15 min στους 4°C, 12.000 rpm. Άδειασμα του υπερκείμενου με πιπέτα pasteur.
- Ξήρανση υπό κενό για 10 – 15 min.
- Αναδιάλυση σε 14,2 μl TE.

3. Γίνεται σήμανση του γραμμικού DNA με Klenow (βλ. [Ενότητα 2.14](#))

Συστατικό	Όγκος
10X Buffer	3 μl
*dATP[α- ³² P]	2 μl
2 mM dTTP, dCTP, dGTP mix	3 μl
Klenow 10 u/μl	0,8 μl
Water	7 μl

Προσθήκη των συστατικών αυτών στο erpendorf με το κατακρημνισμένο DNA, προσθήκη τελευταίου του ραδιενεργού νουκλεοτιδίου.

Επώαση στους 37°C για 30 min – 1 h

Επώαση στους 75°C για 10 min

Ένωση των 2 αντιδράσεων ανά probe (+ 5 μl bromophenol blue σε TE_{0,1}) και καθαρισμός έκαστου probe από στήλη χρωματογραφίας P-60 (βλ. Ενότητα 2.9.2.1), οπότε σημαίνεται το ένα άκρο εξωγενούς DNA και του εξωγενούς DNA και του πλασμιδιακού φορέα. Τελικό προϊόν: ~300 – 400 μl.

4. Ακολουθεί κατακρήμιση του ραδιοσημασμένου DNA με αιθανόλη.
 - Προσθήκη 1/10 όγκου 3 M NaAc (CH₃COONa) pH 5,2 και 2 – 2,5 όγκων αιθανόλης 100%. Ήπια ανάδευση με αναστροφή του σωλήνα 3 – 4 φορές.
 - Παραμονή στους -80°C για 40 min και -20°C για 20 – 30 min. Εναλλακτικά μετά τους -80°C μπορεί να μείνει ο/η στους -20°C.
 - Φυγοκέντρηση στους 4°C για 20 min στα 12.000 rpm. Άναρρόφηση του υπερκείμενου με πιπέτα pasteur.
 - Προσθήκη 500 μl αιθανόλης 80%, ήπια ανάδευση, φυγοκέντρηση για 15 min στους 4°C, 12.000 rpm. Άναρρόφηση του υπερκείμενου με πιπέτα pasteur.
 - Ξήρανση υπό κενό για 10 – 15 min.
 - Αναδιάλυση σε 20 μl TE_{0,1}.
5. Στη συνέχεια, πραγματοποιείται πέψη του DNA με δεύτερο ένζυμο που απομακρύνει το κλωνοποιημένο DNA από τον πλασμιδιακό φορέα (σε τελικό όγκο 100 μl). Για τη δεύτερη πέψη χρησιμοποιήθηκε το ένζυμο *Bam*HI.

Συστατικά	Για 1
σημασμένο DNA	20 μl
<i>Bam</i> HI	3 μl
Buffer	9 μl
Water	58 μl

Προσθήκη των συστατικών αυτών στο erpendorf με το κατακρημισμένο DNA, προσθήκη τελευταίου του ραδιενεργού νουκλεοτιδίου.

Επώαση για 5 – 6 h στους 37°C.

6. Ακολουθεί απομόνωση της ζώνης που αντιστοιχεί στο κλωνοποιημένο τμήμα DNA από πήκτωμα αγαρόζης (βλ. Ενότητα 2.9.1) και αναδιάλυση στον επιθυμητό όγκο TE_{0,1} (ώστε να υπάρχουν περίπου 100 – 200 cps (κρούσεις)/μl). Το τμήμα αυτό είναι έτσι ραδιοσημασμένο μόνο στο ένα άκρο και στη μία αλυσίδα. (Μετά την απομόνωση και τον καθαρισμό, η ποσότητα του κάθε ανιχνευτή είναι περίπου 200 ng).
7. Για τη σήμανση της συμπληρωματικής αλυσίδας του DNA ακολουθείται η ίδια διαδικασία επιλέγοντας για την αρχική πέψη ένζυμο που κόβει από την αντίθετη πλευρά του κλωνοποιημένου DNA και επίσης δημιουργεί 5' προεξέχον άκρο (δηλ. *Bam*HI ως πρώτο ένζυμο και *Xba*I ως δεύτερο ένζυμο).

B. Κατασκευή G/A μάρτυρα

1. Σε 3 μl ραδιοσημασμένου DNA προστίθενται 7 μl H₂O και 25 μl 88% μυρμηκικό οξύ.
2. Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου (22°C) για 4 min και αμέσως τοποθέτηση στον πάγο. Κατακρήμνιση με προσθήκη 200 μl διαλύματος Hydrazine Stop (0,3 M NaAc pH 7, 0,1 M EDTA, 25 μg/ml tRNA) και 750 μl απόλυτης αιθανόλης. Επώαση στους -80°C για 40 min, 20 – 30 min στους -20°C. Φυγοκέντρηση στους 4°C για 20 min στα 12.000 rpm. Άναρρόφηση του υπερκείμενου με πιπέτα pasteur.
3. Ακολουθεί στέγνωμα του ιζήματος υπό κενό για 10 – 15 min και αναδιάλυσή του σε 250 μl 0,3 M NaAc pH 7. Κατακρήμνιση με προσθήκη 750 μl απόλυτης αιθανόλης, παραμονή στους -80°C για 40 min, 20 – 30 min στους -20°C. Φυγοκέντρηση στους 4°C για 20 min στα 12.000 rpm. Άναρρόφηση του υπερκείμενου με πιπέτα pasteur.
4. Ξέπλυμα του ιζήματος με 80% αιθανόλη (Φυγοκέντρηση στους 4°C για 15 min στα 12.000 rpm, άναρρόφηση του υπερκείμενου με πιπέτα pasteur).
5. Ακολουθεί στέγνωμα του ιζήματος υπό κενό (10 – 15 min), αναδιάλυση σε 100 μl 1 M πιπεριδίνης (η πιπεριδίνη πρέπει να αναδιαλυθεί σε νερό σε γυάλινο σωλήνα). Το δείγμα μπορεί να μείνει στους 4°C ο/η ή να προχωρήσει σε θραύση του DNA.
6. Θραύση του DNA στις τροποποιημένες βάσεις με επώαση στους 90°C για 30 min.

7. Απομάκρυνση της πιπεριδίνης με επίδραση κενού (σε συσκευή speedvac).
8. Αναδιάλυση του ιζήματος σε 20 μl H₂O και στέγνωμα όπως στο βήμα 7.
9. Επανάληψη του βήματος 8 άλλες 2 φορές με 15 και 10 μl H₂O αντίστοιχα.
10. Αναδιάλυση του ιζήματος σε 20 μl χρωστικής (80% φορμαμίδιο, 0,5X TBE, 0,05% μπλε της βρωμοφαινόλης και κυανού της ξυλόλης). Το δείγμα φυλάσσεται στους -20°C μέχρι να ηλεκτροφορηθεί σε αποδιατακτικό πήκτωμα πολυακρυλαμίδης.

Γ. Επίδραση DNase I στο ελεύθερο DNA

1. Γίνεται προετοιμασία μιας σειράς από σωληνάκια erpendorf, ένα για κάθε αραιώση DNase I που πρόκειται να χρησιμοποιηθεί.
2. Για κάθε σημασμένη αλυσίδα του DNA (ανιχνευτή), παρασκευάζεται μίγμα ανιχνευτή με διάλυμα 10X FB (50 mM MgCl₂, 340 mM KCl, 250 mM HEPES pH 7,9, 1 μM ZnAcetate, 5 mM DTT) σε αναλογία 1:2. Χρησιμοποιείται 1 μl ανιχνευτή, με περίπου 200 cpm/μl, για κάθε αντίδραση.
3. Σε κάθε σωληνάκι τοποθετούνται 4 μl διαλύματος 0,375 μg/μl poly(dIdC) και 13 μl διαλύματος D* (25 mM HEPES pH 7,9, 40 mM KCl, 10% glycerol, 1 mM DTT). Επώαση στον πάγο για 15 min.
4. Προσθήκη 3 μl μίγματος ανιχνευτή (από βήμα 2) σε κάθε σωληνάκι και επώαση στον πάγο για 60 min.
5. Παράλληλα πραγματοποιείται μια σειρά διαδοχικών αραιώσεων του ενζύμου DNase I από 0 – 100 ng/μl I (0, 2,5, 5, 10, 20, 50, 100, (200) ng/μl) σε διάλυμα Ca⁺⁺ (25 mM CaCl₂, 10 mM HEPES pH 7,9).
6. Σε κάθε σωληνάκι προστίθενται 2 μl από την αντίστοιχη συγκέντρωση DNase I και ακολουθεί επώαση στον πάγο για 10 min (μπορεί να γίνει δοκιμή και για 5 min).
7. Τερματισμός κάθε αντίδρασης με προσθήκη 5 μl διαλύματος τερματισμού (stop solution: 125 mM Tris pH 8, 125 mM EDTA pH 8, 3% SDS) και 2,5 μl διαλύματος πρωτεΐνάσης K (16 mg/ml πρωτεΐνάση K, 0,5 mg/ml tRNA) και επώαση στους 65°C, για 20 min.
8. Αύξηση του όγκου στα 100 μl με προσθήκη 70 μl TE_{0,1} και εκχύλιση με φαινόλη/SEVAG μία φορά.

9. Μεταφορά της υδατικής φάσης σε νέο σωλήνα και προσθήκη 50 μl διαλύματος 6 M οξικό αμμώνιο και 375 μl 100% αιθανόλη και κατακρήμνιση του DNA με τοποθέτηση των δειγμάτων στους -80°C για 1 h. Φυγοκέντρηση στους 4°C για 20 min στις 12.000 στροφές. Αναρρόφηση του υπερκείμενου με πιπέτα pasteur.
10. Ακολουθεί ξέπλυμα του ιζήματος με 500 μl 70% αιθανόλη, (φυγοκέντρηση στους 4°C για 20 min στις 12.000 στροφές και άδειασμα του υπερκείμενου με πιπέτα pasteur) και στέγνωμα σε ξηραντήρα (υπό κενό) για 15 – 20 min.
11. Αναδιάλυση σε 5 μl διάλυμα χρωστικής (80% φορμαμίδιο, 0,5X TBE, 0,05% μπλε της βρωμοφαινόλης και κυανούν της ξυλόλης). Τα δείγματα μπορούν είτε να ηλεκτροφορηθούν αμέσως ή να φυλαχτούν 24 ώρες το πολύ στους -80°C μέχρι την ηλεκτροφόρηση.

Δ. Επίδραση DNase I στο σύμπλοκο DNA-πρωτεϊνών

1. Γίνεται προετοιμασία μιας σειράς από σωληνάκια errendorf, ένα για κάθε αραιώση DNase I και για κάθε συγκέντρωση πρωτεϊνικού εκχυλίσματος που πρόκειται να χρησιμοποιηθεί.
2. Ακολουθούνται τα βήματα 2, 3 και 4 της προηγούμενης παραγράφου, με τη διαφορά ότι στο βημα 3 γίνεται προσθήκη 13 μl μίγματος διαλύματος D* με την επιθυμητή ποσότητα πρωτεϊνικού εκχυλίσματος (10 μg).
3. Πραγματοποιείται μια σειρά διαδοχικών αραιώσεων του ενζύμου DNase I από 0,2 – 1 μg/μl (200 ng/μl, 400 ng/μl, 800 ng/μl, 1 μg/μl) σε διάλυμα Ca⁺⁺ (25 mM CaCl₂, 10 mM HEPES pH 7,9).
4. Ακολουθούν τα βήματα 6 – 11 της πιο πάνω παραγράφου.

Ε. Ηλεκτροφόρηση

Για την ηλεκτροφόρηση ακολουθείται το πρωτόκολλο που περιγράφεται στην **Ενότητα 2.7.1.3**. Τα δείγματα θερμαίνονται προς αποδιάταξη στους 90°C και φορτώνονται σε αποδιατακτικό πήκτωμα πολυακρυλαμίδης (38% ακρυλαμίδη+2% MBA)/ουρίας που περιέχει 6% πολυακρυλαμίδη, 8 M ουρία και 1X TBE. Οι ποσότητες από κάθε δείγμα που ηλεκτροφορούνται πρέπει να έχουν τις ίδιες κρούσεις (cps). Η ηλεκτροφόρηση γίνεται σε ρυθμιστικό διάλυμα 1X TBE και διαρκεί περίπου 1 – 2 ώρες, μέχρις ότου δηλαδή η χρωστική μπλε της

βρωμοφαινόλης διατρέξει τα 4/5 του πηκτώματος. Ακολουθεί μεταφορά του πηκτώματος σε χαρτί Whatman, και αυτοραδιογραφία (βλ. [Ενότητα 2.17](#)).

2.17 Αυτοραδιογραφία

Μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης, το πήκτωμα μεταφέρεται σε χαρτί Whatman 3MM, τυλίγεται με πλαστική μεμβράνη (wrap) και τοποθετείται μέσα στους ειδικούς φακέλους (folders), παρουσία φιλμ αυτοραδιογραφίας (Fuji SUPER RX X-Ray film for autoradiography 35 x43cm, ras/ 100 τεμ.) και οθόνης (screen) που ενισχύει την ένταση του σήματος στους -80°C για χρονικό διάστημα που εξαρτάται από την ένταση του σήματος της ραδιενέργειας (τον αριθμό κρούσεων cps στο πήκτωμα με βάση τον μετρητή Geiger). Μετά το πέρας του διαστήματος αυτού, πραγματοποιείται εμφάνιση του φιλμ με ειδικά διαλύματα εμφάνισης (Developer, Fixer). Πιο συγκεκριμένα, το φιλμ εμβαπτίζεται στο διάλυμα εμφάνισης (Developer – AGFA Neutol) μέχρι να εμφανιστούν οι μαύρες κηλίδες που αντιστοιχούν στα σημεία που υπάρχει ραδιενέργεια, δηλαδή ο ραδιενεργός ανιχνευτής, στο πήκτωμα. Όταν η εικόνα των κηλίδων φτάσει σε επιθυμητό σημείο έντασης, το φιλμ απομακρύνεται από το διάλυμα εμφάνισης, ξεπλένεται με νερό και εμβαπτίζεται για 1 min περίπου στο διάλυμα στερέωσης (Fixer – Kodak X-Ray fixer AL4 #507 1071) για να μονιμοποιηθεί η εικόνα που σχηματίστηκε. Τέλος, το φιλμ ξεπλένεται για να απομακρυνθεί η περίσσεια διαλύματος. Όλες οι διαδικασίες που εμπλέκουν το φιλμ πραγματοποιούνται σε σκοτεινό θάλαμο.

2.18 Φθορίζουσα χρώση παρασκευασμάτων πυρήνων

1. Απομονώθηκαν πυρήνες (ως ίζημα) αλλά δε λύθηκαν, σύμφωνα με το πρωτόκολλο της [Ενότητας 2.15.1](#) (βήματα 1 έως 6).
2. Το ίζημα πυρήνων εναιωρήθηκε σε 200 μl 100 nM Mito Tracker® Green FM σε PBS, για να βαφτούν πράσινα πιθανόν εναπομείναντα μιτοχόνδρια. Επώση 15 min.
3. Ξέπλυμα του ιζήματος πυρήνων με φυγοκέντρηση στα 500 g.

4. Επαναιώρηση ιζήματος σε 100 μl 1 mM Hoechst 33258 σε DMSO. Επώαση 10 min, κατά τη διάρκεια της οποίας οι πυρήνες βάφονται μπλε.
5. Ξέπλυμα του ιζήματος πυρήνων με φυγοκέντρηση στα 500 g και επαναιώρηση σε 30 μl PBS.
6. Μεταφορά δείγματος σε αντικειμενοφόρο πλάκα και εξέταση με το μικροσκόπιο φθορισμού.
7. Το υπερκείμενο του τελευταίου ξεπλύματος (από τη φυγοκέντρηση του βήματος 5) διατηρήθηκε και φυγοκεντρήθηκε σε υψηλές στροφές. Το ίζημα που προέκυψε, το οποίο θα μπορούσε επίσης να περιέχει εναπομείναντες πυρήνες και μιτοχόνδρια, εναιωρήθηκε σε PBS και εξετάστηκε μικροσκοπικά.

2.19 Προσδιορισμός των άκρων των μεταγράφων - Rapid Amplification of cDNA Ends (RACE)

Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό των 3' και 5' άκρων ενός RNA (συνήθως mRNA). Επιτρέπει δηλαδή την εύρεση της αλληλουχίας ενός RNA σε όλο του το μήκος. Περιλαμβάνει 2 βασικές διαδικασίες, και από εκεί και έπειτα, πολλές τροποποιήσεις. Οι βασικές διαδικασίες που περιλαμβάνει είναι:

- Αντίστροφη μεταγραφή (RT)
- Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR)

Συνοπτικά:

Η RACE έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή cDNA αντιγράφου της RNA αλληλουχίας που μας ενδιαφέρει, το οποίο παράγεται μέσω αντίστροφης μεταγραφής που ακολουθείται από PCR ενίσχυση των cDNA αντιγράφων. Τα ενισχυμένα cDNA αντίγραφα έπειτα κλωνοποιούνται και αλληλουχούνται.

Τα μιτοχονδριακά μετάγραφα δεν διαθέτουν τροποποιήσεις στο 5' άκρο τους. Ωστόσο το 3' άκρο τους είναι πολυαδενυλιωμένο (poly(A) ουρά).

Ο προσδιορισμός των 5' και 3' άκρων μπορεί να γίνει είτε σε δυο ξεχωριστές διαδικασίες που ονομάζονται αντίστοιχα 5'RACE και 3'RACE (η τεχνική αυτή μερικές φορές ονομάζεται “one-sided PCR” ή “anchored PCR”) είτε σε μια ενιαία διαδικασία.

2.19.1 3'RACE

Εφαρμόζεται πολύ εύκολα σε RNA μετάγραφα ευκαρυωτικών οργανισμών (ή και μιτοχονδρίων) τα οποία φέρουν ουρά poly(A) στο 3' άκρο, δηλαδή κυρίως σε mRNA, αλλά και σε κάποια rRNA, τα οποία επίσης όπως είναι γνωστό αδενυλιώνονται στο 3' άκρο, άλλοτε με περισσότερες και άλλοτε με λιγότερες αδενίνες. Στην περίπτωση αυτή, ακολουθείται η εξής διαδικασία (βλ. [Εικόνα 2.4](#)):

- Κατασκευάζεται ένας εκκινητής (oligo-dT-adaptor primer) ο οποίος διαθέτει μια αλληλουχία από T (συνήθως 17), και μια αλληλουχία από νουκλεοτίδια (adaptor) τα οποία είναι επιλεγμένα έτσι ώστε να μην υβριδοποιούνται στο DNA κανενός οργανισμού, ή τουλάχιστον στο DNA του οργανισμού υπό διερεύνηση. Παραδείγματα τέτοιων εκκινητών:

5'-**GACTCGAGTCGACATCGA**TTTTTTTTTTTTTTTTT-3'

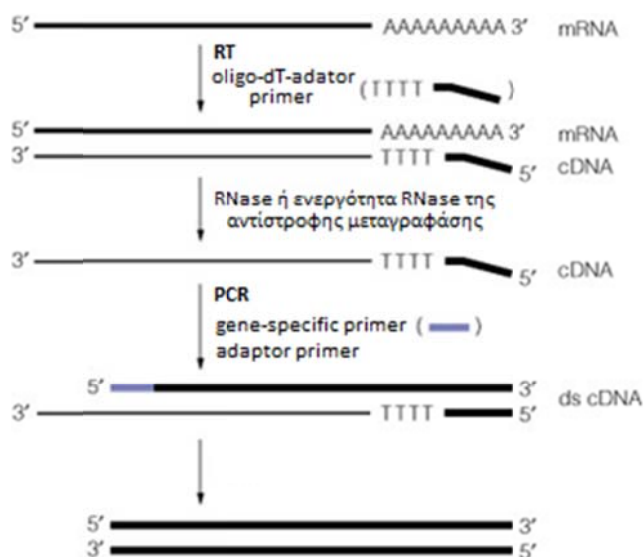
5'-**CTCGGATCCGTCGACATGC**TTTTTTTTTTTTTTTTT-3'

Οι εκκινητές αυτοί δρουν ως ανάστροφοι (reverse primers).

- Διενεργείται έπειτα RT (βλ. [Ενότητα 2.5](#)) κατά την οποία δημιουργούνται cDNA με τη χρήση του oligo-dT-adaptor primer, οι θυμίνες του οποίου είναι συμπληρωματικές με τις αδενίνες της poly(A) ουράς και προστίθεται και μια ειδική αλληλουχία (adaptor) στο 5' άκρο κάθε cDNA.
- Έπειτα, χρησιμοποιείται ένας ειδικός εκκινητής γονιδίου (gene specific primer - forward) σε συνδυασμό με τον adaptor primer (ο oligo-dT-

adaptor primer χωρίς τις 17 θυμίνες δηλαδή) – reverse, και διενεργούμε PCR (ως μήτρα από την RT χρησιμοποιούμε 2 – 5 μl).

- Ακολουθεί κλωνοποίηση του προϊόντος PCR και αλληλούχηση επιθυμητών κλώνων.



Εικόνα 2.4: Αναπαράσταση διαδικασίας αντίστροφης μεταγραφής με τη χρήση ενός oligo-dT-adaptor primer

2.19.2 5'RACE

Η μέθοδος αυτή αποσκοπεί στον προσδιορισμό του 5' άκρου των mRNA. Εδώ τα πράγματα είναι λίγο πιο περίπλοκα όσον αφορά ειδικά στα πυρηνικά mRNA των ευκαρυωτικών οργανισμών, όπου το 5' άκρο είναι καλυμμένο με έναν ειδικό σχηματισμό (cap). Στην περίπτωση αυτή, αρχικά πρέπει να αφαιρεθεί το κάλυμμα αυτό. Η αφαίρεση του καλύμματος γίνεται με τη βοήθεια ενός ενζύμου που ονομάζεται πυροφωσφατάση (η πιο ευρέως χρησιμοποιούμενη είναι η Tobacco Acid Pyrophosphatase-TAP). Σε περίπτωση RNA που δεν διαθέτει τη δομή αυτή (όπως στα μιτοχονδριακά μετάγραφα), η διαδικασία αυτή παραλείπεται.

Για τον προσδιορισμό του 5' άκρου των μεταγράφων, πραγματοποιείται προσάρτηση ενός ολιγονουκλεοτιδίου σε αυτό, το οποίο στη συνέχεια μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως θέση πρόσδεσης

πρόσθιου (forward) εκκινητή της PCR, αφού προηγηθεί ένα βήμα αντίστροφης μεταγραφής.

Εναλλακτικά, μετά την αντίστροφη μεταγραφή, μπορεί να χρησιμοποιηθεί το ένζυμο TdT (Τελική Δεοξυνουκλεοτιδική Τρανσφεράση) για να προστεθεί μια ουρά από ίδια νουκλεοτίδια, γνωστή και ως ομοπολυμερική ουρά, στο 3' άκρο του cDNA.

Στην παρούσα διδακτορική διατριβή δεν έγινε ξεχωριστός προσδιορισμός του 5' άκρου αλλά διενεργήθηκε μια διαδικασία κατά την οποία μπορούν να προσδιοριστούν ταυτόχρονα και τα δύο άκρα (βλ. [Ενότητα 2.19.3](#)).

2.19.3 3'RACE και 5'RACE (ενιαία διαδικασία)

Κυκλοποίηση του RNA

- Το πρωτόκολλο αυτό περιγράφηκε για πρώτη φορά από τους [Mandl et al. \(1991\)](#) και βασίζεται στην ικανότητα της T4 RNA λιγάσης να συνενώνει μονόκλωνα άκρα RNA με ελεύθερο 5' μονοφωσφορικό και 3' υδροξυλικό άκρο. Στην παρούσα διατριβή χρησιμοποιήθηκε ένα απλουστευμένο πρωτόκολλο ([Εικόνα 2.5](#)) που εφαρμόζεται στα μιτοχονδριακά μετάγραφα που δεν έχουν τροποποιήσεις στο 5' άκρο τους και μπορούν συνεπώς να κυκλοποιηθούν αμέσως παρουσία T4 RNA λιγάσης.

Το RNA κυκλοποιήθηκε με τη βοήθεια του ενζύμου T4 RNA Ligase (#E10021 Fermentas). Εάν διαθέτουμε ολικό RNA απομονωμένο από έναν ιστό, τότε με την προσθήκη της T4 RNA λιγάσης συνενώνονται όλα τα μονόκλωνα RNA άκρα που γειτνιάζουν στο διάλυμα. Αυτό σημαίνει ότι δημιουργείται μια “δεξαμενή” διαφόρων RNA, κάποια από τα οποία είναι κυκλοποιημένα, ενώ άλλα έχουν απλά ενωθεί μεταξύ τους. Ανάλογα με τις συνθήκες της αντίδρασης κυκλοποίησης, άλλοτε ευνοείται η συνένωση άκρων του ίδιου RNA ενώ άλλοτε η συνένωση άκρων διαφορετικών RNA. Για τις ανάγκες του παρόντος πειράματος επιθυμούμε την κυκλοποίηση των μεταγράφων.

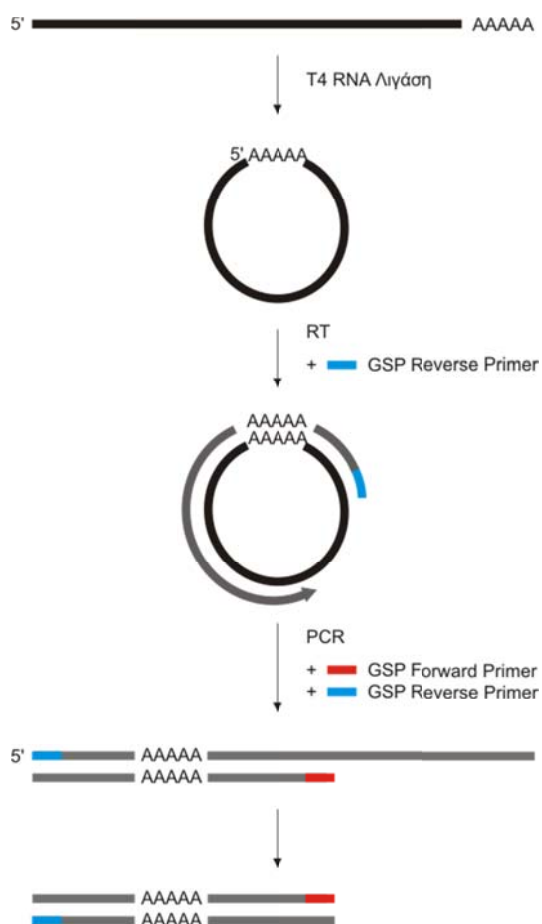
Στον **Πίνακα 2.11** παρουσιάζονται τα συστατικά και οι συνθήκες που απαιτούνται για την κυκλοποίηση του RNA.

Πίνακας 2.11 Συνταγή για κυκλοποίηση RNA

Συστατικά	Όγκοι-ποσότητες
Ολικό RNA ενός ατόμου	15 – 20 µg
10X ρυθμιστικό διάλυμα του ενζύμου	20 µl
BSA	20 µl
T4 RNA Ligase 10 u/µl	10 µl
Συνολικός όγκος	200 µl

37°C για 4h, 4°C ο/n

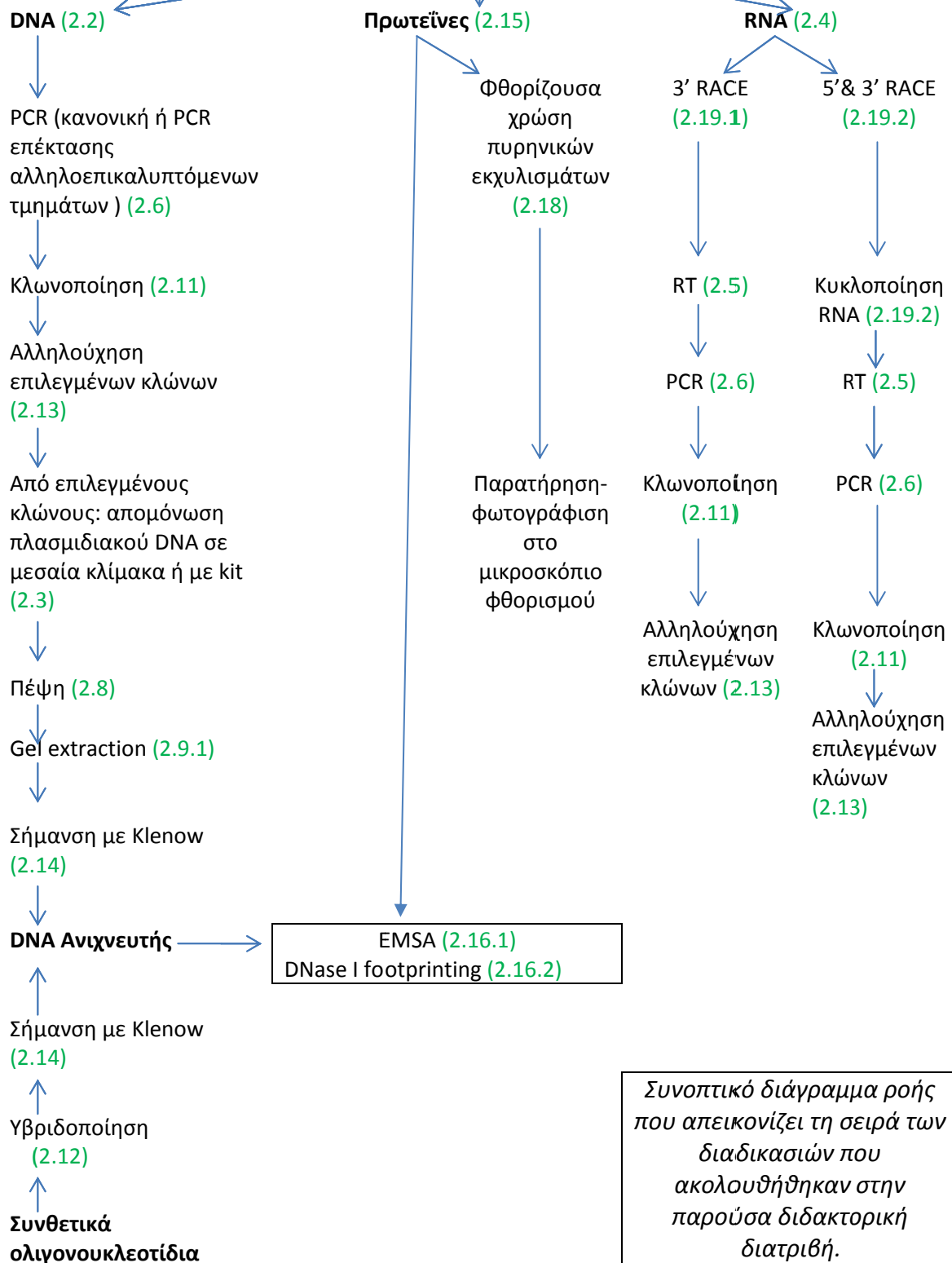
- Ακολουθεί καθαρισμός του προϊόντος της αντίδρασης με στήλες PureLink RNA mini kit (Invitrogen) σύμφωνα με το πρωτοκόλλο “Purifying RNA from Liquid Samples/RNA Clean-up” του κατασκευαστή. Αναδιάλυση σε 60 µl H₂O.
- Ακολουθεί RT (βλ. **Ενότητα 2.5**) με μήτρα 2,5 – 3 µg κυκλοποιημένου RNA και με τη χρήση ενός ανάστροφου ειδικού εκκινητή γονιδίου (Reverse GSP) σχετικά κοντά στο 5' άκρο του RNA ώστε να σχηματιστεί cDNA στο οποίο να υπάρχει η ένωση (junction) των 2 άκρων.
- Έπειτα διενεργούμε PCR με πρόσθιο και ανάστροφο ειδικό εκκινητή γονιδίου (GSP). Ο Reverse GSP είναι ο ίδιος που χρησιμοποιήθηκε στην RT, ενώ ο Forward GSP επιλέγεται έτσι ώστε να υβριδοποιείται προς το τέλος του RNA (3' άκρο). Για κάθε αντίδραση χρησιμοποιούνται 0,5 – 1 µg cDNA μήτρας από την αντίδραση RT.
- Τέλος, το προϊόν της PCR κλωνοποιείται και επιθυμητοί κλώνοι αλληλουχούνται.



Εικόνα 2.5: Αναπαράσταση διαδικασίας κυκλοποίησης RNA μεταγράφου και προσδιορισμού των 3' και 5' άκρων αυτού μέσω RT και PCR. GSP: *gene-specific primer*, δηλ. ειδικός εκκινητής γονιδίου.

2.20 Ανάλυση αλληλουχιών σε Η/Υ

Η ταυτοποίηση όλων των αλληλουχιών έγινε με BLASTN 2.2.27+ (Zhang et al. 2000) και η περαιτέρω στοίχιση και ανάλυση πραγματοποιήθηκε με τα προγράμματα CLUSTAL X (Thomson et al. 1997) και MEGA v. 3.1 (Kumar et al. 2004). Για τον υπολογισμό νουκλεοτιδικών αποκλίσεων χρησιμοποιήθηκε η επιλογή p-distance. Το p-distance αντιστοιχεί στο ποσοστό των νουκλεοτιδικών θέσεων στις οποίες δύο αλληλουχίες που συγκρίνονται διαφέρουν μεταξύ τους. Η αρίθμηση των νουκλεοτιδικών θέσεων ακολουθεί τους Mizi et al. (2005) (GenBank Acc. Nos. AY497292 για το γονιδίωμα F και AY363687 για το γονιδίωμα M. Αναθεώρηση 12 Μαρ. 2012).



3. Αποτελέσματα και Συζήτηση

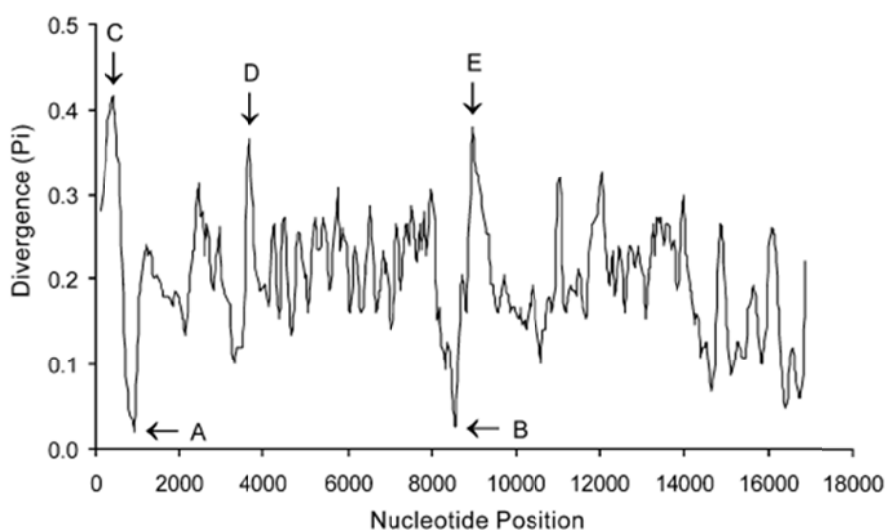
Επεξηγήσεις

- Υπενθυμίζεται ότι CR είναι η κύρια ρυθμιστική περιοχή τόσο του γονιδιώματος F όσο και του M. Αποτελείται (και στα δύο γονιδιώματα) από: Δύο μεταβλητές περιοχές (VD1 και VD2) και μεταξύ τους μία συντηρητική περιοχή (CD).
- Όταν γίνεται αναφορά σε «τμήμα DNA», εννοείται μια δίκλωνη γραμμική αλληλουχία DNA με ελεύθερα 5' και 3' άκρα. Όταν αναφέρεται ο όρος «ανιχνευτής», εννοείται ένα τμήμα DNA, που έχει σημανθεί με ραδιενεργό νουκλεοτίδιο, ώστε όταν προσδένονται σε αυτό πρωτεΐνες αυξάνει το μοριακό βάρος του και έτσι εμφανίζεται ως βαρύτερη ζώνη σε αυτοραδιογραφία πηκτώματος ηλεκτροφόρησης. Με τον όρο «ανταγωνιστής», δηλώνεται ένα τμήμα DNA μη ραδιενεργά σημασμένο (ή αλλιώς «κρύο») το οποίο ανταγωνίζεται τον ανιχνευτή ως προς την πρόσδεση των πρωτεϊνών και έτσι μπορεί να εξακριβωθεί ο βαθμός ειδικότητας της πρόσδεσης των πρωτεϊνών στον ανιχνευτή.
- Οι αριθμητικοί δείκτες στις ονομασίες τμημάτων DNA, που χρησιμοποιήθηκαν είτε ως ανιχνευτές είτε ως ανταγωνιστές (π.χ. VD1-M₁₆₁₋₃₁₂) υποδηλώνουν τη θέση του πρώτου (π.χ. 161) και του τελευταίου (π.χ. 312) νουκλεοτιδίου του τμήματος DNA με βάση την αρίθμηση των αλληλουχιών των γονιδιωμάτων F και M του *Mytilus galloprovincialis*, όπως έχουν κατατεθεί στη βάση δεδομένων GenBank (Acc. Nos: AY497292 και AY363687, αντίστοιχα, [Mizi et al. 2005](#)). Το γράμμα που βρίσκεται αμέσως πριν τους δείκτες (F ή M) υποδηλώνει το γονιδίωμα στο οποίο αντιστοιχεί το τμήμα DNA (F ή M, αντίστοιχα).
- Η αλληλουχία λίγων νουκλεοτιδίων, στην οποία προσδένεται ένας ή περισσότεροι παράγοντες, ονομάζεται «στοιχείο πρόσδεσης» (Απόδοση στα Ελληνικά του αγγλικού όρου «binding element»).
- Η αλληλουχία των περίπου 26 αδενινών, που συναντάται στην περιοχή VD1 του γονιδιώματος M, αναφέρεται στο κείμενο ως «αλληλουχία πολλών αδενινών» ή απλά «αλληλουχία αδενινών».

3.1 Προσδιορισμός της περιοχής των γονιδιωμάτων F και M του *M. galloprovincialis* που πιθανόν εμπλέκεται στην πορεία κληρονομιάς τους.

Όπως αναφέρθηκε στην [Εισαγωγή](#), έχουν διατυπωθεί προτάσεις ότι στην Κύρια Ρυθμιστική Περιοχή (CR) των δύο γονιδιωμάτων του γένους *Mytilus*, και συγκεκριμένα στην πρώτη μεταβλητή περιοχή του (VD1, βλέπε [Εικόνα 1.14](#)) βρίσκονται αλληλουχίες που σχετίζονται με την κληρονομιά τους. Οι ενδείξεις που υποδεικνύουν την εμπλοκή του VD1 στον τρόπο μεταβίβασης των δύο γονιδιωμάτων είναι οι εξής:

1. Το VD1 παρουσιάζει το μεγαλύτερο βαθμό διαφοροποίησης μεταξύ F και M του *M. galloprovincialis* (περίπου 50%) ([Cao et al. 2004a](#)) ([Εικόνα 3.1](#)). Επομένως, υπάρχει μεγαλύτερη πιθανότητα να περιέχονται στο VD1 ειδικά στοιχεία που διαφοροποιούν τις λειτουργίες των F και M μορίων.



Εικόνα 3.1. Βαθμός απόκλισης μεταξύ F και M γονιδιωμάτων. Το γονιδίωμα νοείται γραμμικό ξεκινώντας από το πρώτο νουκλεοτίδιο του CR και η σύγκριση πραγματοποιήθηκε με «ολισθαίνον παράθυρο» των 150 bp που μετακινείται με βήμα 50 bp. Οι δύο πολύ συντηρητικές περιοχές (οριζόντια βέλη) αντιστοιχούν σε: (A) στην συντηρητική περιοχή (CD) του CR και (B) στο γονίδιο ND3 συν τις παρακείμενες 100 bp της μη-κωδικής περιοχής UR4. Οι τρεις πολύ διαφοροποιημένες περιοχές (κάθετα βέλη) αντιστοιχούν σε: (C) στην πρώτη μεταβλητή περιοχή (VD1) του CR, (D) στο UR2 και (E) στο εναπομείναν τμήμα του UR4. Από [Mizi et al. \(2005\)](#).

2. Η εύρεση ανασυνδυασμένων mtDNA γονιδιωμάτων σε αρσενικές γονάδες του είδους *M. trossulus*, τα οποία ήταν τύπου F αλλά περιείχαν και ένα τμήμα τύπου M στην περιοχή VD1 του CR (Burzynski et al. 2003). Πρέπει να σημειωθεί ότι στη συγκεκριμένη έρευνα, το είδος *M. trossulus* προέρχεται από τη Βαλτική θάλασσα, όπου παρατηρείται το εξής παράδοξο: ενώ, με βάση ορισμένους μοριακούς δείκτες, το πυρηνικό γονιδίωμα των ατόμων είναι το τυπικό του είδους *M. trossulus*, το μιτοχονδριακό γονιδίωμα είναι του είδους *M. edulis* (Zbawicka et al. 2007).
3. Τέτοιο ανασυνδυασμένο γονιδίωμα βρέθηκε επίσης σε σπέρμα ενός ατόμου *M. galloprovincialis* και αλληλουχήθηκε πλήρως (έχει ονομαστεί "γονιδίωμα C", δηλαδή "σύνθετο" –compound-, Πίνακας 1.1, DQ399833, Venetis et al. 2007). Οι συγγραφείς πρότειναν ότι η ικανότητα τέτοιων γονιδιωμάτων να αλλάζουν οδό μεταβίβασης και να κληρονομούνται πατρικά, μπορεί να προέρχεται από την ενσωμάτωση αλληλουχιών από το CR τύπου M, στο κατά τα άλλα, F γονιδίωμα.
4. Η πιο ισχυρή ένδειξη παρέχεται από το μητρικό γονιδίωμα του *M. trossulus*. Όπως αναφέρθηκε στην Εισαγωγή, το CR του γονιδιώματος αυτού είναι αρκετά μεγαλύτερο από το CR του πατρικού γονιδιώματος στο ίδιο είδος (η αλληλουχία έχει δοθεί από τους Rawson (2005), Breton et al. (2006) και Cao et al. (2009)). Πιο συγκεκριμένα, το CR του γονιδιώματος F του *M. trossulus* είναι σύνθετο και αποτελείται από ένα CR όμοιο προς M (M-like CR) και ένα CR όμοιο προς F (F-like CR). Η ανάγκη για ύπαρξη και διατήρηση και των δύο αυτών στοιχείων CR έγκειται πιθανότατα στο γεγονός ότι το CD του όμοιου προς F CR περιέχει μια έλλειψη ~30 bp, η οποία αλλοιώνει τα ρυθμιστικά στοιχεία αντιγραφής και μεταγραφής που βρίσκονται σε αυτό. Συνεπώς, επειδή το CD είναι σχεδόν πανομοιότυπο στα F και M, το CD του όμοιου προς M CR μπορεί να υποκαταστήσει τη λειτουργία του ελαττωματικού CD του όμοιου προς F CR. Από την άλλη, το VD1 του όμοιου προς M στοιχείου εμφανίζεται κατεστραμμένο λόγω μεταλλαγών, οι οποίες διαπιστώνονται μέσω σύγκρισης με το VD1 του τυπικού πατρικού γονιδιώματος (M) του *M. trossulus*. Συνεπώς, η λειτουργία της πρώτης μεταβλητής περιοχής διεκπεραιώνεται από το

VD1 του του όμοιου προς F CR και γι αυτό το μόριο μεταβιβάζεται από τη μητρική γραμμή (Cao et al. 2009).

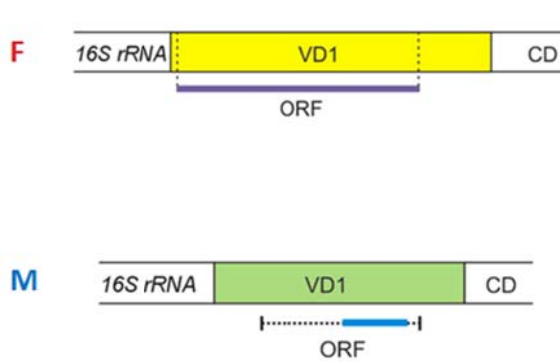
3.2 Υπάρχει ανοικτό πλαίσιο ανάγνωσης (ORF) στην περιοχή VD1 του CR;

Όπως αναφέρθηκε στην **Εισαγωγή**, στο γονιδίωμα F του *Mytilus* έχει εντοπιστεί ένα ανοικτό πλαίσιο ανάγνωσης (ORF) το οποίο όμως δεν φαίνεται να αντιστοιχεί σε λειτουργικό γονίδιο (Hoffman et al. 1992). Αντίθετα, οι Breton et al. (2011a) στηριζόμενοι, μεταξύ άλλων, στο ότι το συγκεκριμένο ORF έχει μεγαλύτερο μήκος κατά 159 bp (Εικόνα 3.2) υποστηρίζουν την άποψη ότι πιθανόν αντιπροσωπεύει ένα νέο γονίδιο, το προϊόν του οποίου ίσως σχετίζεται με τη μητρική κληρονόμηση του γονιδιώματος F. Παρόμοιο ORF έχει βρεθεί και στα γονιδιώματα F και M του είδους *Musculista senhousia*, που επίσης ανήκει στην οικογένεια Mytilidae, καθώς και του είδους *Ruditapes philippinarum* (Veneridae) (Ghiselli et al. 2013) όπως και σε γονιδιώματα F και M ειδών της οικογένειας Unionidae (Breton et al. 2009). Ωστόσο, οι μόνες ενδείξεις για παραγωγή πρωτεΐνης, κωδικοποιούμενης από αυτά τα ORF, προέρχονται από μελέτες των Breton et al. (2011b) στην οικογένεια των Unionidae, καθώς και των Milani et al. (2014b) στο είδος *R. philippinarum*.

Ειδικά για το γένος *Mytilus* δεν έχει εντοπιστεί πρωτεΐνη που να παράγεται από το συγκεκριμένο ORF. Η μόνη ένδειξη λειτουργικότητάς του είναι ο εντοπισμός αντιστοιχων αλληλουχιών, τύπου F, σε βιβλιοθήκες EST του *M. edulis* (Breton et al. 2011a) γεγονός που υποδεικνύει ότι μεταγράφονται.

Εκτός από το ORF τύπου F έχει επίσης υποτεθεί η παρουσία ORF στο VD1 του γονιδιώματος M τεσσάρων ειδών *Mytilus* (*M. galloprovincialis*, *M. edulis*, *M. trossulus* και *M. californianus*) (Milani et al. 2013) (Εικόνα 3.2). Στα είδη *M. galloprovincialis*, *M. edulis* και *M. trossulus*, τα ORF αυτά φέρουν μια χαρακτηριστική αλληλουχία πολλών λυσινών (poly-K) ποικίλου μήκους, η οποία απουσιάζει από τα ORF του γονιδιώματος M του *M. californianus*, αλλά και από τα ORF του γονιδιώματος F του ίδιου γένους. Επίσης, οι Milani et al. (2013)

αναφέρουν ότι ειδικά στο πρώτο μέρος του ORF M εμφανίζεται έντονη ποικιλομορφία, καθώς σε πολλά άτομα υπάρχουν μεταλλαγές που διακόπτουν το ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης. Σύμφωνα με τους συγγραφείς, όλα αυτά τα ανοικτά πλαίσια ανάγνωσης, πιθανόν σχετίζονται με την εμφάνιση και εδραίωση της ΔΜΚ.



Εικόνα 3.2. Θέση των προτεινόμενων ORF στο VD1 των γονιδιωμάτων F και M του *M. galloprovincialis* σύμφωνα με τους Breton et al. (2011) και Milani et al. (2013) αντίστοιχα. Το μήκος του ORF του γονιδιώματος M ποικίλλει από άτομο σε άτομο. Με μπλε γραμμή συμβολίζεται το μικρότερο ORF που έχει βρεθεί σε αλληλουχία της GenBank (βλέπε κείμενο, πιο κάτω), ενώ με διακεκομμένη γραμμή συμβολίζεται το εύρος εντός του οποίου κυμαίνονται τα μήκη των ORF σε διάφορα άτομα.

Στην παρούσα διατριβή, για περαιτέρω διερεύνηση της παρουσίας ORF M στο γένος *Mytilus*, αναζητήθηκαν όλες οι πλήρεις αλληλουχίες VD1 τύπου M των αδελφών ειδών *M. edulis* - *M. galloprovincialis* από τη GenBank (συνολικά 66 έως το Δεκέμβριο του 2014) και ακολουθήθηκε η διαδικασία εντοπισμού ORF όπως περιγράφεται από τους Milani et al. (2013). Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα ORF Finder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf>) και απομονώθηκαν 66 αλληλουχίες, οι οποίες στοιχήθηκαν με τη βοήθεια των προγραμμάτων CLUSTALX και MEGA 3.1 (Εικόνα 3.3).

```

#MEGA
!Title proteins ORF.aln;
!Format
  DataType=Protein
  NSeqs=66 NSites=106
  Identical=. Missing=? Indel=-;

!Domain=Data;
#HM027627 -----M QVYA KKKKK-----K KKTVC LGMSCFYTLS FLAIACNSSS RLCSPVFLHV KVPCWHTWEP PY----- [106]
#HM027628 -----M QVYA KKKKK-----K KKTVC LGMSCFYTLS FLAIACNSSS RLCSPVFLHV KVPCWHTWEP PY----- [106]
#HM027608 -----M QVYA KKKKK-----K KKTVC LGMSCFYTLS FLAIACNSSS RLCSPVFLHV KVPCWHTWEP PY----- [106]
#HM027607 -----M QVYA KKKKK-----K KKTVC LGMSCFYTLS FLAIACNSSS RLCSPVFLHV KVPCWHTWEP PY----- [106]
#HM027603 -----M QVYA KKKKK-----K KKTVC LGMSCFYTLS FLAIACNSSS RLCSPVFLHV KVPCWHTWEP PY----- [106]
#HM027629 -----M QVYA KKKKK-----K KKTVC LGMSCFYTLS FLAIACNSSS RLCSPVFLHV KVPCWHTWEP PY----- [106]
#HM027630 -----M QVYA KKKKK-----K KKTVC LGMSCFYTLS FLAIACNSSS RLCSPVFLHV KVPCWHTWEP PY----- [106]
#FJ890850 -----M QVYA KKKKK-----K KKTVC LGMSCFYTLS FLAIACNSSS RLCSPVFLHV KVPCWHTWEP PY----- [106]
#HM027601 -----M WCVMCVYK.T Q.....L.....D.N.S.....R..... [106]
#HM027602 -----M WCVMCVYK.T Q.....L.....D.N.S.....R..... [106]
#HM027605 -----M WCVMCVYK.T Q.....L.....D.N.S.....R..... [106]
#AY363687 -----M WCVMCVYK.T Q.....L.....D.N.S.....R..... [106]
#HM027606 -----M WCVMCVYK.T Q.....L.....D.N.S.....R..... [106]
#HM027604 -----M WCVMCVYK.T Q.....L.....D.N.S.S.....R..... [106]
#HM027619 -----M WCVTCVYK.T Q.....D.N.G.S..... [106]
#HM027620 -----M WCVTCVYK.T Q.....D.N.G.S..... [106]
#HM027611 -----M WCVTCVYK.T Q.....D.N.G.S..... [106]
#HM027614 -----M WCVTCVYK.T Q.....D.N.G.S..... [106]
#AY629164 -----M WCVTC.YK.T Q.....D.N.G.S.....L..... [106]
#HM027612 -----M WCVTC.YK.T Q.....D.N.G.S..... [106]
#HM027615 -----M WCVTC.YK.T Q.....D.N.G.S..... [106]
#HM027621 -----M VCNVC.....KKK-----L..... [106]
#HM027622 -----M VCNVC.....KKK-----L..... [106]
#HM027625 -----M VCNVC.....KKK-----L..... [106]
#HM027626 -----M VCNVC.....KKK-----L..... [106]
#HM027623 -----M VCNVC.....KKK-----L..... [106]
#HM027624 -----M VCNVC.....KKK-----L..... [106]
#AY629163 -----M VCNVY.....A.....Y..... [106]
#HM027609 -----M VCNVC.....D.N.G.S..... [106]
#AF188280 -----M VCNVC.....D.N.G.S..... [106]
#HM027613 -----M VCNVC.....H.....N.S..... [106]
#HM027616 -----M VCNVC.....H.....N.S..... [106]
#EU344847 -----M VCNVC.....RK-----XX.....H.I.....N.S..... [106]
#AY823623 -MWGVCSNNK LIPGESCKSF KNSNKATQKM WCVACVY---.YTQ..KK-- --K...YH...K.....N.P.T.....P...Y...Y...MR.L.L.XNNL [106]
#AY350791 -----M VCNVC.....N.P.T.....P...Y...Y...MR.L.L..... [106]
#AY823624 -MSGLFKQQT NFSGESCKSF KNSXKATQKM WCVACVY---.YTQ..KK-- --K...YH...K.....N.P.T.....P...Y...Y...MR.L.L..... [106]

```

#AY350792	-----	-----	-----M	WCVACVY---	.YTQ..KK--	--K...YH..	.K.....N	.P.T.....	.P...Y.	..Y...MR.LL	----	[106]
#HM027610	-MSGLFKHQT	NFSGQSCESF	KNSNKATQKM	WCVACVY---	.YTQ..KK--	--K...YH..	.K.....N	.P.T.....	.P...Y.	..Y...M.LL	----	[106]
#AY115482	-----	-----	-----M	WCVACVYK.T	Q-...KKK-	--K--SH..	.K...Y...N	.P.T.....	...Y.	..Y...M.LL	WNNL	[106]
#DQ198225	MGGGCSNNKL	ILGGKSVSLL	KNKNKATQKM	WCVACVYK.T	Q-...KKK-	--K...NH..	.K...Y...N	.P.T.....	...Y.	..Y...M.LL	WNNL	[106]
#HM027618	-----	-----	-----	-----	--MR..KKK-	--K...YH..	.K...Y.N..N	.P.T.....	.P...Y.	..Y...M.LL	WNNL	[106]
#HM027617	-----	-----	-----	-----	--MR..KKK-	--K...YH..	.K...Y.N..N	.P.T.....	.P...Y.	..Y...M.LL	WNNL	[106]
#EF434635	-----	-----	-----	-----	MSMR..KKK-	--K...YH..	.K...Y...N	.P.T.....	.P...Y.	..Y...M.LL	WNNL	[106]
#DQ198237	-----	-----	-----	-----	-----	-----	..Y...N	.P.T.....	.P...Y.	..Y...M.LL	WNNL	[106]
#AY115480	-----	-----	-----	-----	-----	-----	..Y...N	.P.T.....	.P...Y.	..Y...M.LL	WNNL	[106]
#AY350794	-----	-----	-----M	R....KKK-	--K...YH..	.K...Y..K.N	.P.T.....	.P...Y.	..Y...M.LL	WNNL	[106]	
#DQ198236	-----	-----	-----M	R....KKK-	--K...SH..	.K...Y...N	.P.T.....	...Y.	..Y...M.LL	WNNL	[106]	
#DQ198223	-----	-----	-----	-----	-----	-----	..Y...N	.P.T.....	...Y.	..Y...M.LL	WNNL	[106]
#DQ198222	-----	-----	-----M	WCVACVYK.MKKK-	--K...IH..	.K...Y...N	.P.T.....	...Y.	..Y...M.LL	WNNL	[106]
#DQ198224	-----	-----	-----M	WCVACVYK.TKKK-	---IH..	.K.GY...N	.P.T.....	...Y.	..Y...M.LL	WNNL	[106]
#DQ198238	-----	-----	-----M	WCVACVYK.TKKK-	--K...IH..	.K...Y...N	.P.T.....	.P...Y.	..Y...M.LL	WNNL	[106]
#DQ198245	-----	-----	-----	-----	-----	-----	..Y...N	.P.TT....	..YP...YA	..Y...M.LL	WNNL	[106]
#DQ198249	-----	-----	-----	-----	..R....NK-	--K.N.YH..	.K...Y...N	.P.TT....	..YP...YA	..Y...M.LL	WNNL	[106]
#DQ198246	-----	-----	-----	-----	..R....	---N.YH..	.K...Y...N	.P.TT....	..YP...YA	..Y...M.LL	WNNL	[106]
#DQ198247	-----	-----	-----M	VCSVC...VYA..	..KK--	--K.N.YH..	.K...Y..A.N	.P.TT....	..YP...YA	..Y...M.LL	WNNL	[106]
#EF434638	-----	-----	-----M	WCVACVY---	.YTQ.----	--KMM.YH..	.K...Y...N	.P.TT....	..YP...YA	..Y...M.LL	WNNL	[106]
#AY115481	-----	-----	-----M	WCVACVY---	.YTQ..MKK-	--KMM.YH..	.K...Y...N	.P.TT....	..YP...YA	..Y...M.LL	WNNL	[106]
#KM192125	-----	-----	-----M	WCVACVY---	.YTQ..KKK-	--K...YH..	.K...Y...N	.P.TT....	..YP...YA	..Y...M.LL	WNNL	[106]
#DQ198244	-----	-----	-----M	WCVACVY---	.YTQ..KKK-	--K...YH..	.K...Y...N	.P.TT....	..YP...YA	..Y...M.LL	WNNL	[106]
#DQ198248	-----	-----	-----M	WCVACVY---	.YTQ..KKK-	--K...YH..	.K...Y...N	.P.TT....	..YP...YA	..Y...M.LL	WNNL	[106]
#EF434634	MWGVCSNNKL	ILGGKSVSLL	KNKNKATQKM	WCVACVY---	.YTQ..KKK-	--K...YH..	.K...Y...N	.P.T.....	.P...Y.	..Y...M.LL	WNNL	[106]
#AY350793	-----	-----	-----M	VCSVC....	..M..KK-	-----YH..	.K.....N	.P.T.....	.P...Y.	..Y...MR.LL	----	[106]
#AF188279	-----	-----	-----M	VCSVC....KK-	-----YH..	.K.....N	.P.T.....	.P...Y.	..Y...MR.LL	----	[106]
#EF434636	-----	-----	-----M	VCSVC....K K K K	..K K K..NYH..	.K...Y...N	.P.T.....	.P...Y.	..Y...M.LL	WNNL	[106]
#EF434633	-----	-----	-----M	VCSVC....KK-	--K..X-H..	.K...Y...N	.P.T.....	...Y.	..Y...M.LL	WNNL	[106]
#EF434632	-----	-----	-----M	VCSVC....KK-	--K...SH..	.K...Y...N	.P.T.....	...Y.	..Y...M.LL	WNNL	[106]

Εικόνα 3.3. Στοίχιση των αμινοξικών αλληλουχιών του ORF των 66 αλληλουχιών VD1 τύπου M που είναι κατατεθειμένες στη GenBank. Δίνονται οι κωδικοί πρόσβασης (accession Numbers) της GenBank όλων των αλληλουχιών. Για τη δημιουργία της στοίχισης χρησιμοποιήθηκαν τα προγράμματα CLUSTALX και MEGA 3.1. Με κίτρινο υποδεικνύεται το κοινό τμήμα των 66 ORF. Για την ονοματολογία των αμινοξέων ακολουθείται ο κανόνας του ενός γράμματος. Με παύλες συμβολίζονται οι θέσεις στις οποίες λείπουν αμινοξέα, ενώ με τελείες, οι θέσεις όπου τα αμινοξέα είναι ίδια με την πρώτη αλληλουχία.

Από την πιο πάνω συγκριτική ανάλυση γίνεται εύκολα αντιληπτό ότι το μήκος των συγκεκριμένων ORF είναι πολύ μεταβλητό ακόμα και μεταξύ ατόμων του ίδιου είδους. Συγκεκριμένα, το μικρότερο μέγεθος ORF αντιστοιχεί σε 40 αμινοξέα (στα AY350791, HM027604, AY363687 και HM027608), ενώ το μεγαλύτερο μέγεθος ORF αντιστοιχεί σε 100 και 102 αμινοξέα (στο EF434634 και DQ198225 αντίστοιχα). Με άλλα λόγια, η διαφοροποίηση μήκους για το συγκεκριμένο ORF είναι της τάξης του 150% εντός του είδους. Επιπρόσθετα, ο υπολογισμός της μέσης απόστασης (Overall Mean Distance) με το πρόγραμμα MEGA v.3.1 στο τμήμα των 40 αμινοξέων, που είναι κοινό σε όλες τις αλληλουχίες (επισημαίνεται με κίτρινο χρώμα στην [Εικόνα 3.3](#)) έδωσε τιμές p-distance της τάξεως του 0,2 (p-distance, pairwise deletion: $d = 0.228$, $SE = 0.030$ | p-distance, complete deletion: $d = 0.209$, $SE = 0.036$ | Poisson correction, complete deletion: $d = 0.251$, $SE = 0.056$), που δηλώνει σημαντική αμινοξική διαφορά μεταξύ ατόμων του ίδιου είδους. Τα αποτελέσματα αυτά συνηγορούν υπέρ της μη-λειτουργικότητας του συγκεκριμένου ORF του γονιδιώματος M του *Mytilus*.

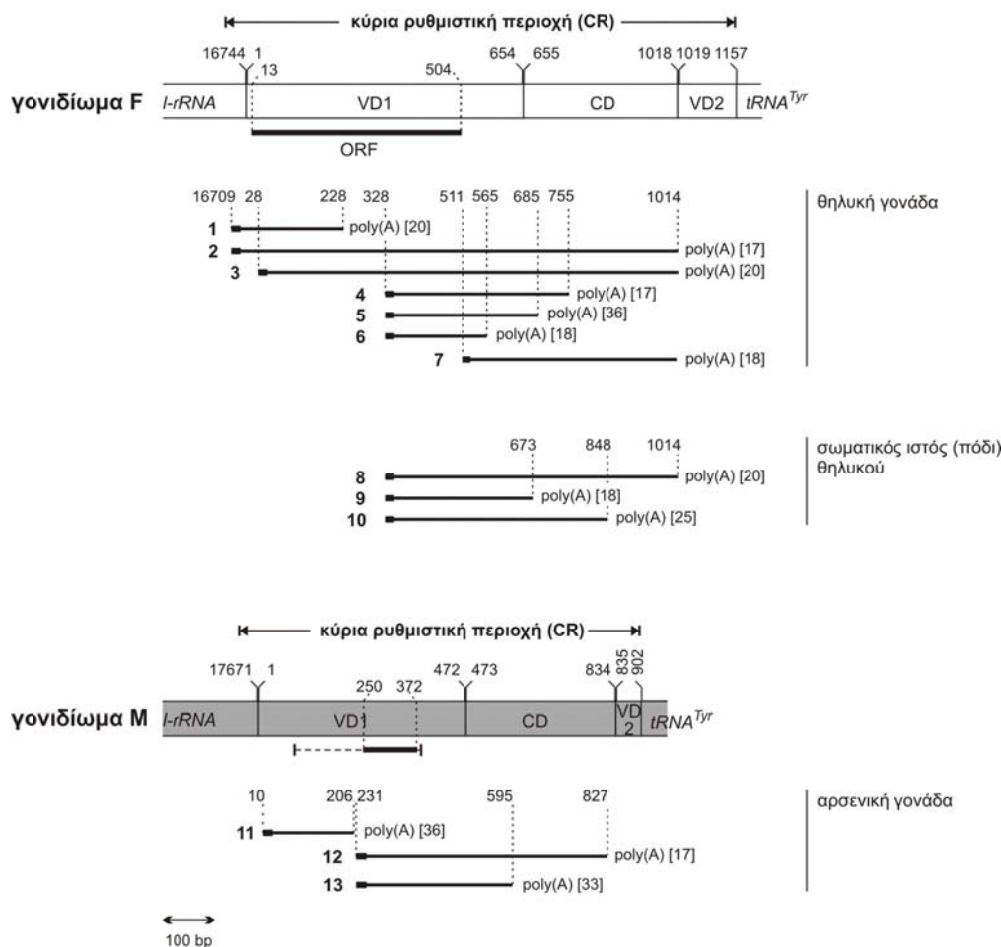
Εκτός από την *in silico* ανάλυση που παρουσιάστηκε πιο πάνω, επεκτείναμε τη διερεύνηση της πιθανής λειτουργικότητας του ORF τόσο του M όσο και του F γονιδιώματος στο είδος *M. galloprovincialis*, με την αναζήτηση πλήρους μήκους πολυαδενυλιωμένων μεταγράφων. Όπως αναφέρθηκε πριν, το ORF βρίσκεται στην κύρια ρυθμιστική περιοχή (CR) του γονιδιώματος F και πιο συγκεκριμένα, στην πρώτη μεταβλητή περιοχή (VD1). Για την εύρεση μεταγράφων, απομονώθηκε ολικό RNA από θηλυκές και αρσενικές γονάδες που περιείχαν γαμετικά κύτταρα σε διάφορα στάδια της γαμετογένεσης, καθώς και ώριμα αυγά και σπερματοζωάρια, αντίστοιχα. Η επιλογή του συγκεκριμένου ιστού και του συγκεκριμένου σταδίου βασίστηκε στα εξής:

- (α) Η παρουσία μόνο τύπου M mtDNA στα σπερματοζωάρια (Venetis et.al. 2006) μας επιτρέπει την παραδοχή ότι η απομάκρυνση ή η απαγόρευση εισόδου του F mtDNA στα σπερματοζωάρια, πιθανότατα συμβαίνει κατά την ωρίμανση των σπερματοκυττάρων, τα οποία αποτελούν συστατικό της γονάδας του ατόμου. Επομένως, λογικά αναμένεται το προϊόν του ORF, αν όντως υπάρχει και εφόσον

σχετίζεται με την εμφάνιση και την εδραίωση της ΔΜΚ, να παράγεται στον ιστό της γονάδας.

(β) Σε εκχύλισμα γονάδων εντόπισαν οι [Breton et al. \(2011b\)](#) μια πρωτεΐνη που πιθανόν κωδικοποιείται από το ORF στα Unionidae.

Το RNA που εκχυλίστηκε, χρησιμοποιήθηκε για αντιδράσεις 3' RACE (βλέπε [Ενότητα 2.19.1](#)) με τη χρήση εκκινητών ειδικών προς το γονίδιο (στο βήμα της PCR) που υβριδοποιούνται εντός του ORF ([βλέπε Πίνακα 2.5](#)). Τα προϊόντα της PCR κλωνοποιήθηκαν και επιλεγμένοι κλώνοι αλληλουχήθηκαν. Αρχικά, με τη χρήση των εκκινητών ssFd11 και VD1F-F, ανιχνεύτηκαν τα πολυαδενυλιωμένα μετάγραφα 3 και 4, 5, 6 αντίστοιχα ([Εικόνα 3.4](#)), που αντιστοιχούν στο γονιδίωμα F. Και τα τέσσερα αυτά μετάγραφα έχουν διαφορετικές θέσεις πολυαδενυλίωσης, ενώ κανένα από αυτά δεν πολυαδενυλιώνεται κοντά στο 3' άκρο του υποτιθέμενου ORF. Μάλιστα, τα μετάγραφα 3, 4 και 5 εκτείνονται πέραν της πρώτης μεταβλητής περιοχής (VD1). Το μετάγραφο 3 περιλαμβάνει και ολόκληρη τη συντηρητική περιοχή (CD) και πολυαδενυλιώνεται στο τέλος αυτής. Με τη χρήση εκκινητών έξω από το ORF του F, από τα αριστερά (εκκινητής 16SF-END-F, [Πίνακας 2.5](#)) και από τα δεξιά (εκκινητής VD1Fb-F, [Πίνακας 2.5](#)), εντοπίστηκαν τα πολυαδενυλιωμένα μετάγραφα 1, 2 και 7 αντίστοιχα ([Εικόνα 3.4](#)). Το 3' άκρο του μεταγράφου 1 βρίσκεται εντός του ORF, περίπου στη μέση αυτού. Το μετάγραφο 2 περιλαμβάνει ολόκληρο το VD1, συνεπώς και ολόκληρο το ORF, καθώς και ολόκληρο το CD και πολυαδενυλιώνεται στο τέλος αυτού. Στο ίδιο σημείο βρίσκεται και το 3' άκρο του μεταγράφου 7. Κανένα από τα μετάγραφα που εντοπίστηκαν δεν έχει 3' άκρο που να αντιστοιχεί στο 3' άκρο του ORF.



Εικόνα 3.4. Μετάγραφα της κύριας ρυθμιστικής περιοχής των γονιδιωμάτων *F* (λευκό) και *M* (γκρι), που αποκτήθηκαν με ανάλυση 3'RACE των εκχυλισμάτων RNA από γονάδα και πόδι ενός θηλυκού και από γονάδα ενός αρσενικού ατόμου. Το προτεινόμενο ORF του γονιδιώματος *F* υποδηλώνεται από παχιά μαύρη γραμμή. Το προτεινόμενο ORF του γονιδιώματος *M*, που αντιστοιχεί στην αλληλουχία του AY363687 από τους Mizi et al. (2005) υποδηλώνεται από την παχιά μαύρη γραμμή, ενώ το εύρος μηκών, εντός του οποίου κυμαίνονται τα αντίστοιχα ORF σε άλλες αλληλουχίες γονιδιωμάτων *M* κατατεθειμένων στη GenBank, συμβολίζεται με διακεκομμένη γραμμή που πλαισιώνει την παχιά μαύρη γραμμή. Συνολικά μελετήθηκαν δέκα μετάγραφα (1 έως 10) για το γονιδίωμα *F* (1 έως 7 από θηλυκή γονάδα και 8 έως 10 από θηλυκό πόδι) και 3 (11 έως 13) για το γονιδίωμα *M* (παρουσιάζονται ως συμπαγείς γραμμές κάτω από κάθε γονιδίωμα). Οι αριθμοί (εκτός αγκυλών) υποδεικνύουν νουκλεοτιδικές θέσεις σύμφωνα με τους Mizi et al. (2005). Οι αριθμοί στις αγκύλες αντιπροσωπεύουν το μήκος της poly(A) ουράς. Μικρά τετράγωνα στα άκρα των συμπαγών γραμμών υποδηλώνουν τις θέσεις πρόσδεσης των εκκινήτων.

Όλα τα μετάγραφα που περιείχαν ολόκληρη την αλληλουχία του ORF, εκτείνονταν στη μη-κωδική περιοχή του VD1 και το CD ακόμη και κατά 500 bp. Στην πραγματικότητα δεν μπορεί να αποκλειστεί η πιθανότητα ενός mRNA με πολύ μακριά 3' αμετάφραστη περιοχή, παρόλο που τέτοιες αμετάφραστες περιοχές δεν παρατηρήθηκαν κατά τη μελέτη των mRNA των 12 ή 13 πρωτεϊνικών γονιδίων του μιτοχονδριακού DNA του *M. galloprovincialis* (Chatzoglou et al. 2013). Σε όλα τα mRNA, η poly(A) ουρά, είτε των μονοιστρονικών είτε των πολυιστρονικών μεταγράφων, βρισκόταν αμέσως ή το πολύ 18 νουκλεοτίδια μετά το 3' άκρο του γονιδίου. Παρόμοια εικόνα αποκαλύφθηκε και στην περίπτωση του ORF του γονιδιώματος M. Συγκεκριμένα, με τη χρήση των εκκινητών ssMdl1 και VD1M-F2 (Πίνακας 2.5), ανιχνεύτηκαν πολυαδενυλιωμένα μετάγραφα (11, 12 και 13, Εικόνα 3.4) που αντιστοιχούν στο CR του γονιδιώματος M, κάποια από τα οποία περιλαμβάνουν ολόκληρο το ORF τύπου M. Τα μετάγραφα αυτά είχαν, όπως και στην περίπτωση του ORF τύπου F, διαφορετικά σημεία πολυαδενυλίωσης: εντός του VD1 (μετάγραφο 11) εντός του CD (μετάγραφο 13) καθώς και στο τέλος αυτού (μετάγραφο 12). Ως πείραμα ελέγχου, απομονώθηκε RNA από σωματικό ιστό (πόδι) θηλυκού ατόμου και πραγματοποιήθηκε 3'RACE. Όπως εξηγήθηκε πιο πάνω, στον ιστό αυτό δεν αναμένεται να εκφράζεται το συγκεκριμένο ORF. Παρόλα αυτά, ανιχνεύτηκαν παρόμοια πολυαδενυλιωμένα μετάγραφα του ORF του γονιδιώματος F (8, 9 και 10, Εικόνα 3.4) με διαφορετικά σημεία πολυαδενυλίωσης.

Συνοψίζοντας, (α) εντοπίστηκαν πολυαδενυλιωμένα μετάγραφα των ανοιχτών πλαισίων ανάγνωσης στο VD1 τύπου F και M με πολλά διαφορετικά σημεία πολυαδενυλίωσης· (β) κανένα εξ'αυτών δεν αντιστοιχεί στο 3' άκρο του εκάστοτε ORF· (γ) η ύπαρξη τόσο μεγάλων 3' αμετάφραστων περιοχών δε συνάδει με τις σχεδόν ανύπαρκτες αμετάφραστες περιοχές των υπόλοιπων γονιδίων των μιτοχονδριακών γονιδιωμάτων του *Mytilus*· (δ) και στο RNA ποδιού, όπου δεν αναμένεται έκφραση του ORF, η εικόνα ήταν παρόμοια. Τα ευρήματα αυτά, σε συνδυασμό με τα δεδομένα περί μεγάλης διαφοροποίησης μήκους και αλληλουχίας του ORF του γονιδιώματος M μεταξύ ατόμων του ίδιου είδους (που αναφέρθηκαν πιο πάνω), συνηγορούν υπέρ της άποψης ότι

πρόκειται για μη-λειτουργικά ORF. Στην περίπτωση αυτή γεννιούνται δύο ερωτήματα:

1. Ποιος ο λόγος ύπαρξης μεταγράφων από μη-κωδική περιοχή;
2. Γιατί τα μετάγραφα αυτά είναι πολυαδενυλιωμένα;

Τα ερωτήματα αυτά μπορούν να απαντηθούν μέσω της μελέτης της μεταγραφής στο μιτοχονδριακό DNA του *Mytilus* (Chatzoglou et al. 2013). Όπως αναφέρθηκε στην [Εισαγωγή](#), η μεταγραφή ξεκινάει από το τέλος περίπου του CD στην κύρια ρυθμιστική περιοχή, προχωρεί προς τα δεξιά και οδηγεί στη δημιουργία ενός πολυσιστρονικού μεταγράφου που καλύπτει όλο το mtDNA (βλέπε [Εικόνα 1.15](#)) Το τελευταίο γονίδιο που μεταγράφεται είναι το *l-rRNA*, αλλά οι θέσεις πρόσδεσης παραγόντων για τον τερματισμό της μεταγραφής βρίσκονται στο 3' άκρο του CD (Cao et al. 2004a). Συνεπώς, η σύνθεση του RNA συνεχίζεται μέχρι περίπου το τέλος του CD, από όπου και απελευθερώνεται το πρωτογενές μετάγραφο. Μετά την αποκοπή των tRNA από το πρωτογενές μετάγραφο και την απελευθέρωση των μεταγράφων των γονιδίων (βλέπε [Ενότητα 1.2.2.2](#)), τα τμήματα που αντιστοιχούν στο VD1 και στο CD αποικοδομούνται. Η αποικοδόμηση των μη-λειτουργικών και/ή λάθος αναδιπλωμένων μεταγράφων περιλαμβάνει την προσθήκη μιας poly(A) ουράς που στοχοποιεί τα μετάγραφα αυτά για 3'-προς-5' εξωνουκλεολυτική αποικοδόμηση (Coburn and Mackie 1999, Dreyfus and Régnier 2002, Bollenbach et al. 2004, Slomovic et al. 2005). Η δημιουργία μεταγράφου πλήρους μήκους, καθώς και η αποικοδόμηση πολυαδενυλιωμένων τμημάτων που αντιστοιχούν σε μη κωδικές περιοχές, εξηγεί την εύρεση αλληλουχιών, που αντιστοιχούν στο ORF, σε βιβλιοθήκες EST του *M. edulis* (Breton et al. 2011a).

3.3 Μελέτη του ρόλου της πολυαδενυλίωσης για την αποικοδόμηση των προϊόντων RNA μη-πρωτεϊνικών γονιδίων

Για την εύρεση περαιτέρω στοιχείων για το ρόλο της πολυαδενυλίωσης στην αποικοδόμηση των RNA μεταγράφων μη-πρωτεϊνικών γονιδίων, μελετήθηκαν τα 5' και 3' άκρα RNA μεταγράφων

από γονίδια που δεν κωδικοποιούν πρωτεΐνες, όπως ριβοσωμικού RNA (rRNA) και μεταφορικού RNA (tRNA).

3.3.1 Γονίδιο *I-rRNA* (*16S rRNA*, συστατικό της μεγάλης ριβοσωμικής υπομονάδας)

Το γονίδιο *I-rRNA* βρίσκεται μεταξύ του *tRNA^{Asp}* και του CR, στις θέσεις #15.501 έως #16.744 στο γονιδίωμα F και #16.431 έως #17.671 στο γονιδίωμα M του *Mytilus galloprovincialis* (Mizi et al. 2005). Το 5' άκρο του μεταγράφου *I-rRNA* μπορεί να προσδιοριστεί με ακρίβεια, ακολουθώντας την εκτομή του *tRNA^{Asp}* που προηγείται σύμφωνα με το μοντέλο «tRNA punctuation model» (Ojala et al. 1981, βλέπε Ενότητα 1.2.2). Πράγματι, σε όλα τα μεταγράφα *I-rRNA* που εντοπίστηκαν στην παρούσα διατριβή, το 5' άκρο βρέθηκε να είναι στη θέση #15.501 του γονιδιώματος F. Αντίθετα, το 3' άκρο δεν μπορεί να προσδιοριστεί θεωρητικά με την ίδια ευκολία επειδή το μήκος του γονιδίου καθώς και η αλληλουχία του 3' άκρου ποικίλλει στα διάφορα είδη μεταζώων (βλέπε για παράδειγμα, Hatzoglou et al. 1995). Οι Hoffman et al. (1992) ήταν οι πρώτοι που όρισαν το 3' άκρο του *I-rRNA* του *Mytilus*, μετά από σύγκριση έξι γονιδίων *I-rRNA* διαφορετικών ειδών. Αυτός ο ορισμός του 3' άκρου του γονιδίου του *I-rRNA* του *Mytilus* παγιώθηκε έκτοτε σε όλες τις δημοσιεύσεις που ακολούθησαν και από όλες τις σχετικές ερευνητικές ομάδες.

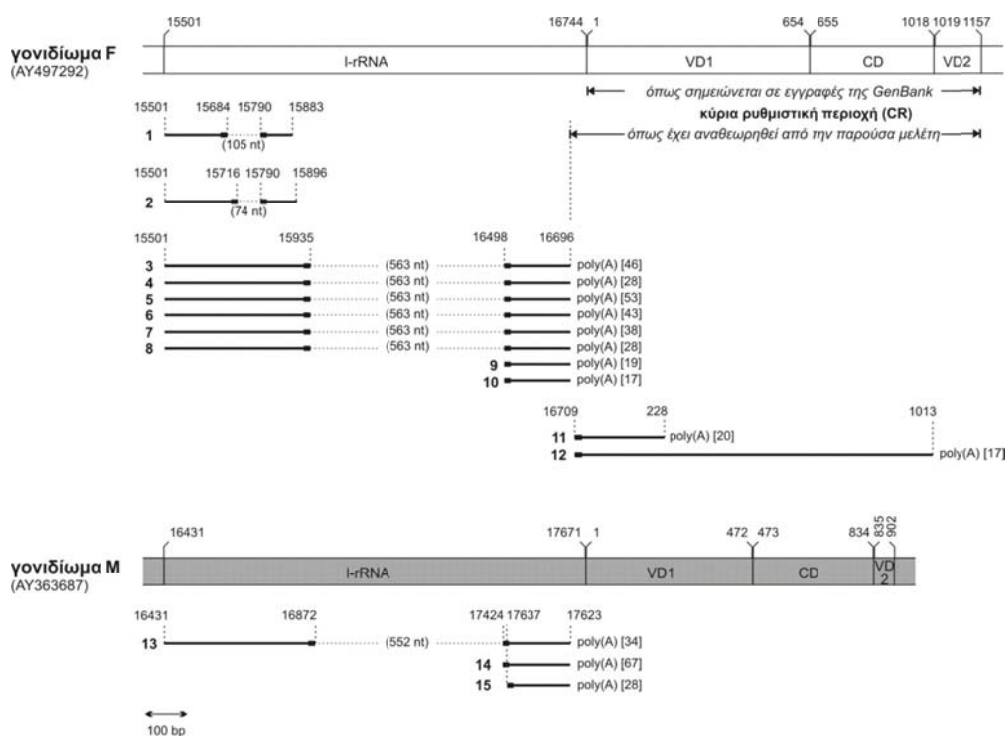
Στην παρούσα διατριβή, βρέθηκαν δύο μεταγράφα με ιδιαίτερο ενδιαφέρον κατά την προσπάθεια εντοπισμού μεταγράφων του ORF που βρίσκεται στην πρώτη μεταβλητή περιοχή (VD1) του γονιδιώματος F (Ενότητα 3.2). Το πρώτο εκτείνεται από το 3' άκρο του *I-rRNA*, μέχρι τη μέση περίπου του VD1 (Εικόνα 3.4, μετάγραφο 1, Εικόνα 3.4, μετάγραφο 11) και το δεύτερο εκτείνεται μέχρι το τέλος του CD, περιλαμβάνοντας φυσικά, ολόκληρο το VD1 και το CD (Εικόνα 3.4, μετάγραφο 2, Εικόνα 3.5, μετάγραφο 12). Η εύρεση αυτών των μεταγράφων οδήγησε σε αμφισβήτηση του έως σήμερα αποδεκτού σημείου ως το πραγματικό 3' άκρο του *I-rRNA*. Συγκεκριμένα, το μετάγραφο 12 (Εικόνα 3.5) αν και εφόσον ανήκει στο *I-rRNA*, υποδεικνύει μια επέκταση του γονιδίου πάνω από 1.000 bp, κάτι που δεν μπορεί να γίνει αποδεκτό εφόσον πιθανότατα θα το παρεμπόδιζε στο να λάβει τη σωστή στερεοδιάταξη και από εκεί και πέρα, το σχηματισμό ενός λειτουργικού ριβοσώματος. Ως εκ τούτου,

ακολούθησε σειρά πειραμάτων 3' και 5' RACE (Ενότητα 2.19.3) για τον ακριβή προσδιορισμό του 3' και κατά συνέπεια και του 5' άκρου του *l-rRNA*.

Με τα περάματα αυτά, εντοπίστηκαν δύο κομμένα μη-αδενυλιωμένα μετάγραφα *l-rRNA* από το γονιδίωμα F, με διαφορετικά 3' άκρα (Εικόνα 3.5, μετάγραφα 1 και 2). Το άκρο του μεταγράφου 1 βρίσκεται στη θέση #15.883, ενώ του μεταγράφου 2, στη θέση #15.896 με βάση το σχολιασμό του γονιδιώματος F από Mizi et al. (2005), δηλαδή 861 και 848 νουκλεοτίδια πριν το αρχικά ορισμένο 3' άκρο του γονιδίου *l-rRNA*, αντίστοιχα. Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι κομμένα μετάγραφα *l-rRNA* έχουν βρεθεί επίσης από τους Slomovic et al. (2005) σε ανθρώπινα μιτοχόνδρια και ερμηνεύθηκαν ως προϊόντα αποικοδόμησης (βλέπε και Ενότητα 1.2.2.2, πλαίσιο με τίτλο Αποικοδόμηση RNA). Η εναλλακτική περίπτωση, ότι πρόκειται δηλαδή για νέο-συντιθέμενα προϊόντα μεταγραφής, είναι αρκετά απίθανη, δεδομένου του ότι το συντηρητικό μοτίβο λήξης της μεταγραφής που προσδιορίστηκε στα μύδια (Valverde et al. 1994) βρίσκεται 47 νουκλεοτίδια μετά το αρχικά ορισμένο 3' άκρο του *l-rRNA* και 908 και 895 νουκλεοτίδια μετά το 3' άκρο των μεταγράφων 1 και 2, αντίστοιχα. Επίσης, προσδιορίστηκαν οκτώ πολυαδενυλιωμένα μετάγραφα *l-rRNA* τύπου F. Τα έξι από αυτά (3 έως 8, Εικόνα 3.5) εντοπίστηκαν με κυκλοποίηση μεταγράφου (Ενότητα 2.19.3) και χρήση νέων εκκινήτων που υβριδοποιούνται πιο κοντά στα άκρα του γονιδίου (UNFOR1 και s-r, Πίνακας 2.5), και τα δύο (9 και 10, Εικόνα 3.5) εντοπίστηκαν με 3'RACE (Ενότητα 2.19.1). Ο αριθμός των καταλοίπων αδενίνης της poly(A) ουράς ήταν από 17 έως 19 για τα μετάγραφα που εντοπίστηκαν με κυκλοποίηση και από 28 έως 53 για εκείνα που εντοπίστηκαν με 3'RACE (Εικόνα 3.5). Το 3' άκρο όλων αυτών των μεταγράφων βρισκόταν στη θέση #16.696 ή #16.697, ανάλογα με το αν η πρώτη αδενίνη της poly(A) ουράς είναι το τελευταίο νουκλεοτίδιο του γονιδίου *l-rRNA* ή είναι μέρος της poly(A) ουράς. Αυτό το 3' άκρο βρίσκεται 48 ή 47 νουκλεοτίδια πριν το αρχικά ορισμένο 3' άκρο του γονιδίου.

Παρόμοια αποτελέσματα ελήφθησαν κατά τη μελέτη των μεταγράφων του *l-rRNA* του γονιδιώματος M. Το 3' άκρο αυτών των μεταγράφων βρίσκεται στη θέση #17.623 (Εικόνα 3.5, μετάγραφα 13, 14

και 15) αντί της θέσης #17.671 που είχε προταθεί από τους Hoffmann et al. (1992). Δεν βρέθηκε κανένα μετάγραφο, ούτε του γονιδιώματος F ούτε του M, το οποίο να ήταν πολυαδενυλιωμένο στη νουκλεοτιδική θέση που είχε αρχικά οριστεί ως 3' άκρο του αντίστοιχου γονιδίου.



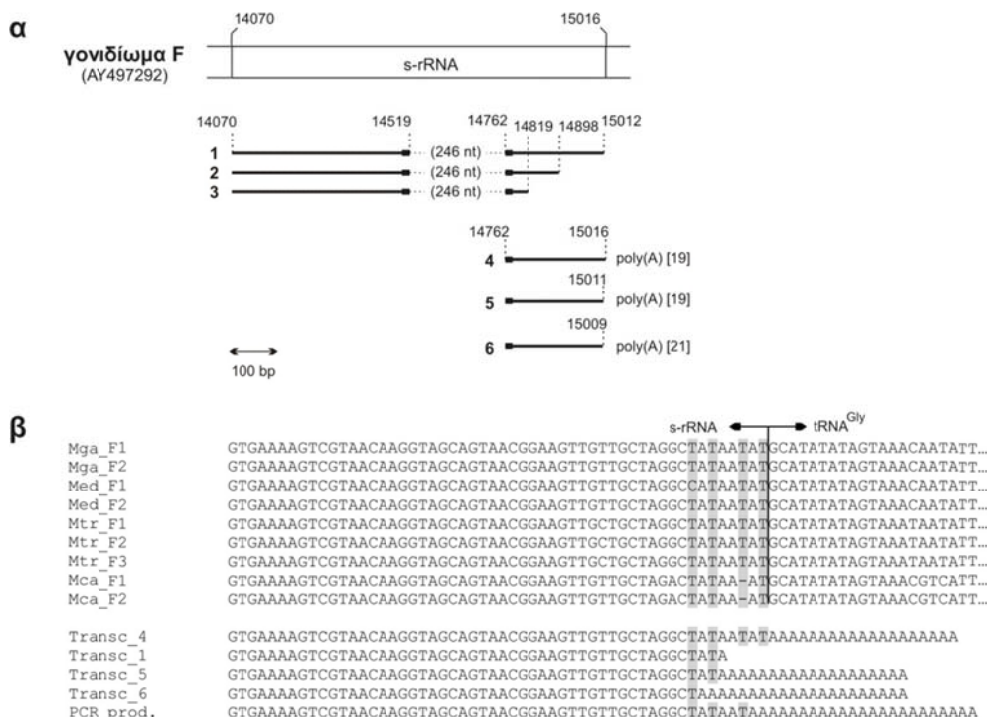
Εικόνα 3.5. Μετάγραφα του *I-rRNA* και της κύριας ρυθμιστικής περιοχής (CR) των γονιδιωμάτων F (λευκό) και M (γκρι). Δώδεκα μετάγραφα (1 έως 12) μελετήθηκαν για το γονιδίωμα F και 3 (13 έως 15) για το M (συμβολίζονται ως γραμμές κάτω από κάθε γονιδίωμα). Οι αριθμοί (εκτός παρένθεσης) δηλώνουν τις νουκλεοτιδικές θέσεις σύμφωνα με το σχολιασμό από τους Mizi et al. (2005). Το μήκος του μεταγράφου μπορεί να συναχθεί αφαιρώντας τους αριθμούς νουκλεοτιδικής θέσης στα δύο άκρα των μεταγράφων (χωρίς να περιλαμβάνεται η poly(A) ουρά). Οι στικτές γραμμές συμβολίζουν το τμήμα του μεταγράφου που μεσολαβεί μεταξύ των δύο τμημάτων που απεικονίζονται με συμπαγή γραμμή, ενώ ο αριθμός στην παρένθεση δίνει το μήκος του στικτού μέρους. Τα μικρά μαύρα κουτάκια στα άκρα των συμπαγών γραμμών υποδηλώνουν τις θέσεις πρόσδεσης των εκκινήτων. Οι αριθμοί στις αγκύλες δίνουν το μήκος της poly(A) ουράς.

Το πλήθος των μεταγράφων (μετάγραφα 3 έως 10 για το γονιδίωμα F και 13 έως 15 για το γονιδίωμα M) που έχουν το ίδιο 3' άκρο που βρίσκεται πριν από το αρχικά ορισμένο άκρο του γονιδίου *l-rRNA*, αλλά και η αποτυχία εντοπισμού μεταγράφου που καταλήγει στο αρχικά ορισμένο άκρο, οδηγούν στο συμπέρασμα ότι το γονίδιο *l-rRNA* είναι 47 ή 48 νουκλεοτίδια κοντότερο από αυτό που είχε αρχικά θεωρηθεί από τους [Hoffman et al. \(1992\)](#). Συγκεκριμένα, το 3' άκρο του βρίσκεται στη θέση #16.696 ή #16.697 για το γονιδίωμα F, και #17.623 για το γονιδίωμα M. Τα 48 νουκλεοτίδια από τη θέση αυτή μέχρι και τη θέση #1, συνεπώς, ανήκουν στην πρώτη μεταβλητή περιοχή (VD1) της κύριας ρυθμιστικής περιοχής (CR).

3.3.2 Γονίδιο *s-rRNA* (*12S rRNA*, συστατικό της μικρής ριβοσωμικής υπομονάδας)

Το γονίδιο *s-rRNA* βρίσκεται μεταξύ των γονιδίων $tRNA^{Phe}$ και $tRNA^{Gly}$ (νουκλεοτιδικές θέσεις #14.070 έως #15.016 στο γονιδίωμα F και #13.953 έως 14.901 στο γονιδίωμα M). Εφόσον το *s-rRNA* πλαισιώνεται από $tRNA$, τα 5' και 3' άκρα του μπορούν εύκολα να προβλεφθούν, οπότε η παρούσα έρευνα είχε σκοπό την επιβεβαίωση και πιστοποίησή τους σε επίπεδο RNA.

Στην παρούσα διατριβή, εντοπίστηκαν έξι μετάγραφα *s-rRNA* τύπου F μέσω κυκλοποίησης μεταγράφου (Ενότητα 2.19.3) (Εικόνα 3.6α, μετάγραφα 1, 2 και 3) και 3'RACE (Ενότητα 2.19.1) (Εικόνα 3.6α, μετάγραφα 4, 5 και 6). Σε όλες τις περιπτώσεις, το 5' άκρο συνέπιπτε με το νουκλεοτίδιο που βρίσκεται αμέσως μετά το γονίδιο $tRNA^{Phe}$ που προηγείται του γονιδίου *s-rRNA*. Όσον αφορά στο μήκος τους, τα μετάγραφα 1, 2 και 3 ήταν μη-αδενυλιωμένα και ποικίλλου μήκους. Από την άλλη, τα μετάγραφα 2 και 3 ήταν κομμένα (με 3' άκρα στις θέσεις #14.898 και #14.819 αντίστοιχα) και αποτελούν, κατά πάσα πιθανότητα, κατάλοιπα της αποικοδόμησης του *s-rRNA*. Και τα τρία μετάγραφα που παρήχθησαν με 3'RACE ήταν πολυαδενυλιωμένα και πλήρους μήκους. Ωστόσο, τα τέσσερα πλήρους μήκους μετάγραφα (Εικόνα 3.6α, μετάγραφα 1, 4, 5 και 6) δεν είχαν το ίδιο 3' άκρο.



Εικόνα 3.6. Μετάγραφα του *s-rRNA* του γονιδιώματος *F.* **(α)** Εντοπίστηκαν συνολικά έξι μετάγραφα (1 έως 6) τα οποία απεικονίζονται ως γραμμές κάτω από κάθε γονιδίωμα. Οι αριθμοί (εκτός παρένθεσης) δηλώνουν τις νουκλεοτιδικές θέσεις σύμφωνα με το σχολιασμό από τους *Mizi et al. (2005)*. Το μήκος του μεταγράφου μπορεί να συναχθεί αφαιρώντας τους αριθμούς νουκλεοτιδικής θέσης στα δύο άκρα των μεταγράφων (χωρίς να περιλαμβάνεται η *poly(A)* ουρά). Οι στικτές γραμμές συμβολίζουν το τμήμα του μεταγράφου που μεσολαβεί μεταξύ των δύο τμημάτων που απεικονίζονται με συμπαγή γραμμή, ενώ ο αριθμός στην παρένθεση δίνει το μήκος του στικτού μέρους. Τα μικρά μαύρα κουτάκια στα άκρα των συμπαγών γραμμών υποδηλώνουν τις θέσεις πρόσδεσης των εκκινήτων. Οι αριθμοί στις αγκύλες δίνουν το μήκος της *poly(A)* ουράς. **(β)** Στοιχισμός των περιοχών 3' άκρου του γονιδίου *s-rRNA* πλήρως αλληλουχημένων αλληλουχιών *F* του *Mytilus* [*Mga_F1*: AY497292, *Mga_F2*: FJ890849, *Med_F1*: AY484747, *Med_F2*: DQ198231, *Mtr_F1*: AY823625, *Mtr_F2*: GU936625, *Mtr_F3*: HM462080, *Mca_F1*: GQ527172, , *Mca_F2*: JX486124, βλέπε *Πίνακα 1.1*] και της περιοχής 3' άκρου των κλωνοποιημένων μερών τεσσάρων μεταγράφων *s-rRNA* (*Transc_1*, 4, 5, και 6) και ενός απευθείας αλληλουχημένου προϊόντος PCR ενός μεταγράφου που αποκτήθηκε στην παρούσα μελέτη. Τα σκιασμένα νουκλεοτίδια είναι οι θυμίνες που αποτελούν πιθανά τελικά σημεία αυτού του γονιδίου (βλέπε κείμενο για επεξήγηση).

Στην πραγματικότητα, το γονίδιο *s*-rRNA έχει στο 3' άκρο του μια αλληλουχία 5'-ΤΑΤΑΑΤΑΤ-3' σε όλα τα γνωστά είδη *Mytilus*, εκτός από το *Mytilus californianus*, όπου λείπει η τρίτη θυμίνη (Εικόνα 3.6β). Η τελευταία θυμίνη σε αυτή την αλληλουχία είναι και το τελευταίο νουκλεοτίδιο του γονιδίου (θέση #15.016 στο γονιδίωμα F). Ωστόσο, από τα τέσσερα πλήρους μήκους μεταγράφα (Εικόνα 3.6β) μόνο ένα (μετάγραφο 4) περιέχει την πλήρη τερματική αλληλουχία ΤΑΤΑΑΤΑΤ. Αυτό σημαίνει ότι το 3' άκρο του *s*-rRNA μπορεί να ποικίλλει σε μήκος ακόμη και στο ίδιο άτομο.

Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, το 3' άκρο των μεταγράφων του rRNA είναι συχνά ετερογενές στο ίδιο άτομο. Μπορεί να βρίσκεται λίγα νουκλεοτίδια πριν (Dubin et al. 1982, Van Etten et al. 1983) ή μετά το θεωρητικά προσδιορισμένο τελικό νουκλεοτίδιο του γονιδίου rRNA, που στην τελευταία περίπτωση οδηγεί σε αλληλεπικάλυψη μεταξύ του 3' άκρου του rRNA και των πρώτων νουκλεοτιδίων του γονιδίου μετά το rRNA. Έχει προταθεί ότι αυτή η ετερογένεια είναι αποτέλεσμα διαφορετικών μηχανισμών αδενυλίωσης του 3' άκρου των rRNA (Van Etten et al. 1983).

3.3.3 Γονίδια tRNA

Για τη μελέτη των μεταγράφων του tRNA, επιλέχθηκαν προς εξέταση τρία tRNA: το *tRNA^{Tyr}* το οποίο βρίσκεται αμέσως μετά το 3' άκρο του CR, το *tRNA^{Asp}*, το οποίο προηγείται του γονιδίου *l*-rRNA, και το *tRNA^{Thr}*, ένα τυπικό γονίδιο tRNA που βρίσκεται μεταξύ των γονιδίων *ATPase6* και *ND4L*. Σύμφωνα με όσα αναφέρθηκαν πιο πάνω, ο σχηματισμός στερεοδομής των tRNA ακολουθείται από την εκτομή τους από το πολυσιστρονικό μετάγραφο και συνεπώς τα άκρα ενός tRNA συμπίπτουν με τα άκρα της αλληλουχίας που έχει ταυτοποιηθεί ως γονίδιο tRNA σε επίπεδο DNA.

Όπως αναμενόταν, τα αποτελέσματα της παρούσας διατριβής υποδεικνύουν ότι τα 5' και 3' άκρα των μεταγράφων συμπίπτουν με το πρώτο και το τελευταίο νουκλεοτίδιο των αντίστοιχων γονιδίων tRNA (Εικόνα 3.7).

tRNA^{Thr}

F mtDNA GCTTTAAAAGCTTTGCTGAAGCAACGGCCTTGTAAGTCGTAGAAAACATACGTTTTAAAGCT
 M mtDNA GTTTTAAAAGCTTTGCTGAAGCAACGGCCTTGTAAGTCGTAGAAAATTAATGTTTAAAGCT
 cDNA GCTGAAGCAACGGCCTTGTAAGTCGTA-AAAATTAATGTTTAAAGCTCCA+poly(A) [32]

tRNA^{Tyr}

F mtDNA CATAGGATGGCCGAGGAATAGGTGGTGAGCTGTAAACTCATAAACAAGGCGTAAGCCTTCTTATGA
 M mtDNA CATAAGATGGCTGAGGAAAAGGCGGTGAGCTGTAAACTCATAAACAAGGT-TGGCCCTTCTTATGA
 cDNA TGAGCTGTAAACTCATAAACAAGGT-TGGCCCTTCTTATGACCA+poly(A) [27]
 ***** * *****

tRNA^{Asp}

F mtDNA TTAAAAGTAGTTAATATATAACTTAGAATTGTCAGTTCTAGATTCCTTTACTAAGGCTTTTAT
 M mtDNA TTAAAAGTAGTTAATATATAACTTAGAATTGTCAGTTCTAGATTCCTTTACTAAGGCTTTTATC
 Circ. cDNA TTAAAAGTAGTTAATATATAACTTAGAAT-GTC CTAGATTCCTTTACTAAGGCTTTTATCCA
 Circ. cDNA TTAAAAGTAGTTAATATATAACTTAGAATTGTC CTAGATTCCTTTACTAAGGCTTTTATCCA
 ***** ***** ** * *****

Εικόνα 3.7. Συγκριτική ανάλυση τριών μεταγράφων tRNA. Οι αλληλουχίες F και M προέρχονται από τα γονιδιώματα AY497292 και AY363687 (Mizi et al. 2005) αντίστοιχα. cDNA: μέρη μεταγράφων που αποκτήθηκαν με 3'RACE. Circ. DNA: μέρη μεταγράφων που αποκτήθηκαν με τεχνικές κυκλοποίησης RNA και επακόλουθης RT-PCR. Το «poly(A) [nn]» υποδεικνύει τα μετάγραφα στα οποία ανιχνεύτηκε poly(A) ουρά (στις αγκύλες δίνεται ο αριθμός των αδενινών).

Συγκεκριμένα, με τη μέθοδο της κυκλοποίησης των tRNA (Ενότητα 2.19.3) προέκυψαν δύο μη-αδενυλιωμένα μετάγραφα του tRNA^{Asp} που έφεραν το τρινοκλεοτίδιο CCA (Εικόνα 3.7). Ωστόσο, η ανάλυση 3'RACE που στοχεύει πολυαδενυλιωμένα μετάγραφα, ανέδειξε ένα πολυαδενυλιωμένο μετάγραφο του tRNA^{Thr} και ένα του tRNA^{Tyr} (Εικόνα 3.7). Περίεργως, και τα δύο αυτά μετάγραφα έφεραν το τρινοκλεοτίδιο CCA μεταξύ του 3' άκρου και της poly(A) ουράς. Σημειώνεται ότι το CCA είναι μια συντηρητική αλληλουχία που φέρουν όλα τα ώριμα tRNA στο 3' άκρο τους (Spinzi and Cramer 1979). Όμως, παρόλο που το CCA είναι απαραίτητο για τη λειτουργία ενός tRNA, μόνο μία ομάδα βακτηρίων (*E. coli* και τα συγγενικά του βακτήρια) περιέχουν την αλληλουχία CCA σε όλα τα tRNA γονιδιά τους. Στο θετικό κατά Gram βακτήριο *Bacillus subtilis* και σε κάποια συγγενικά του βακτήρια, μόνο ένα μέρος των γονιδίων tRNA τους, περιλαμβάνουν την αλληλουχία CCA. Από την άλλη, σε άλλα θετικά κατά Gram βακτήρια, αρχαία και ευκάρια (τόσο στο κυτταρόπλασμα όσο και στα μιτοχόνδρια), η αλληλουχία CCA δεν περιλαμβάνεται στα γονίδια tRNA και πρέπει να προστεθεί μετα-μεταγραφικά (Hou 2010). Η αλληλουχία CCA αποτελεί τη θέση πρόσδεσης του αμινοξέος και συνεπώς υπάρχει μόνο στα ώριμα και σωστά αναδιπλωμένα tRNA. Προφανώς, το

αμινοξύ δε θα μπορούσε να προσδεθεί στην αλληλουχία CCA αν τη θέση του καταλάμβανε μια poly(A) ουρά.

Τα αποτελέσματα από τα πειράματα 5' & 3' RACE σε tRNA που αναφέρθηκαν πιο πάνω, υποδεικνύουν ότι η πλειοψηφία των μεταγράφων των tRNA είναι ώριμα μετάγραφα με την αλληλουχία CCA και χωρίς poly(A) ουρά. Η διαπιστωμένη όμως παρουσία πολυαδενυλιωμένων μεταγράφων, που φέρουν τόσο το CCA όσο και μια poly(A) ουρά, ερμηνεύεται ως το πρώτο στάδιο αποικοδόμησης ώριμων tRNA, όπου η poly(A) ουρά χρησιμεύει ως μοριακή επισήμανση για την αποικοδόμησή τους.

3.4 Διερεύνηση πρόσδεσης πρωτεϊνικών παραγόντων στην περιοχή VD1 του CR

Σύμφωνα με τα πιο πάνω αποτελέσματα, κατά πάσα πιθανότητα τα ORF που υπάρχουν στο VD1 τύπων M και F δεν είναι λειτουργικά (δηλαδή δεν αποτελούν γονίδια). Εντούτοις, σύμφωνα με τις ενδείξεις που παρατέθηκαν στην [Ενότητα 3.1](#), το VD1 είναι πολύ πιθανό να σχετίζεται με τη διαφορετική οδό κληρονόμησης των F και M. Εναλλακτικά, λοιπόν, το VD1 θα μπορούσε να περιλαμβάνει αλληλουχίες για την πρόσδεση κωδικοποιούμενων από τον πυρήνα πρωτεϊνικών παραγόντων που εμπλέκονται στην κληρονόμηση των δύο γονιδιωμάτων.

3.4.1 Αναζήτηση ύπαρξης περιοχής πρόσδεσης παραγόντων στο VD1 του γονιδιώματος M

Για να προσδιοριστεί μια υποψήφια υπο-περιοχή στο VD1 του γονιδιώματος M ως πιθανώς απαραίτητη για την πατρική κληρονόμησή του, στοιχήθηκαν περιοχές VD1 από πλήρεις αλληλουχίες γονιδιωμάτων M των *M. edulis* και *M. galloprovincialis* με την περιοχή VD1 τύπου M του γονιδιώματος C ([Εικόνα 3.8α](#)). Εδώ θα πρέπει να σημειωθεί ότι το γονιδίωμα C έχει τρεις επαναλήψεις περιοχών VD1 τύπου M και ένα VD1 τύπου F ([Εικόνα 1.14](#)). Και οι τρεις επαναλήψεις VD1 τύπου M του C έχουν την ίδια αλληλουχία και υπολείπονται ενός τμήματος 150 bp στην αρχή, σε σύγκριση με τα VD1 των γονιδιωμάτων M. Παρά την έλλειψη αυτή,

παραμένουν λειτουργικές βοηθώντας το γονιδίωμα C να μεταβιβάζεται πατρικά, εφόσον είναι γνωστό ότι το C βρέθηκε σε σπέρμα. Συνεπώς, αυτά τα πρώτα ~150 bp πιθανότατα να μην εμπλέκονται στην πατρική κληρονόμηση του γονιδιώματος M. Για να περιοριστεί περαιτέρω η υποψήφια περιοχή, συγκρίθηκε το όμοιο προς M VD1 του μητρικού γονιδιώματος του *M. trossulus* με το VD1 του πατρικού (M) γονιδιώματος του ίδιου είδους (Εικόνα 3.8β). Φαίνεται ότι το μη-λειτουργικό (λόγω μητρικής κληρονόμησης) όμοιο προς M VD1 του γονιδιώματος F, φέρει πολλές μεταλλαγές σε σύγκριση με το λειτουργικό (πατρικά κληρονομούμενο) VD1 του M. Μεταξύ των μεταλλαγών είναι και τρεις ελλείψεις 4 – 19 bp. Εξαιρώντας τα πρώτα 150 bp, που σύμφωνα με την εξέταση του C γονιδιώματος, δεν είναι απαραίτητα για την πατρική κληρονόμηση του mtDNA τύπου M, οι περισσότερες μεταλλαγές, και ειδικά δύο ελλείψεις 4 και 7 bp, εντοπίζονται στα επόμενα ~150 – 160 bp. Από αυτό, συμπεραίνουμε ότι ίσως το τμήμα του VD1 του γονιδιώματος M που εμπλέκεται στην πατρική κληρονόμησή του, να είναι το δεύτερο, εάν διαιρέσουμε χονδρικά το VD1 του M (μήκους ~490 bp) σε τρία τμήματα. Υποθέτουμε ότι η περιοχή αυτή χρησιμοποιείται για την πρόσδεση πρωτεϊνικών παραγόντων και ότι αυτό είναι ένα πρώτο σκαλοπάτι για τον καθορισμό του μιτοχονδριακού περιεχομένου του σπέρματος.

3.4.1.1 Αλληλεπίδραση τμήματος VD1 του γονιδιώματος M με πρωτεϊνικούς παράγοντες της αρσενικής γονάδας

Εφόσον περιορίστηκε με *in silico* ανάλυση η πιθανή περιοχή που σχετίζεται με την κληρονόμηση του γονιδιώματος M, σχεδιάστηκαν εκκινήτες για την απομόνωσή της με PCR (VD1MF/VD1MR, Πίνακας 2.4). Έτσι ενισχύθηκε ένα τμήμα 152 bp (Εικόνα 3.8, σκιασμένο τμήμα) το οποίο υπάρχει στο γονιδίωμα C, που κληρονομείται πατρικά, αλλά φέρει αρκετές μεταλλαγές στο γονιδίωμα F του *M. trossulus*, το οποίο κληρονομείται μητρικά. Αυτό το τμήμα του VD1 του γονιδιώματος M, το οποίο ονομάστηκε VD1-M₁₆₁₋₃₁₂ (Πίνακας 3.1), χρησιμοποιήθηκε ως ανιχνευτής σε πείραμα Μείωσης Κινητικότητας Συμπλόκου (EMSA, βλέπε Ενότητα 2.16.1) για να διαπιστωθεί εάν υπάρχουν πρωτεϊνικοί παράγοντες στους ιστούς του *Mytilus* που προσδέονται σε αυτή την περιοχή.

α

Mytilus galloprovincialis/Mytilus edulis

```
AY363687_Mga CCTTTTATGAAGTGGAGTTGGCTA-----CTAGACT-TTACAGGAATATACGCAGATAGTT-----T-CACCTTGAAAAAGAGTGTGTATCGCGTATATGAAAG--CCTACCTGAACAACAGAGTAATCCAGGGGAAAGAGGTGCGAGTCTGTAAAAAATAGGAAT
FJ890850_Mga CCTTTTATGAAGTGGAGTTGGCTAATAAGTACTAGACT-TTACAGGAATATACGCAGATAGTTGGAGATAGTTT-CACCTTGAAAAAGAGTGTGTATCGCGTATATGAAAG--CCACCTGAACAACAGAGTAATCCAGGGGAAAGAGGTGCGAGTCTCATAAAGA-TAGGAAT
AY823623_Med CCTTTTATGTAAT-AGTTGGCTATAAGTGTCTAGATTACTCGCAGGAGGGGCCAGTAAATGAGAAGTAATCTCACCTTGAAAAAGGCTGTTTT-TGGGTATATGAGGGG--TCTGTTCAAACAACAACTAATTC--GGGGAGAGATGTAAGTCTTTAAAAA-TAGAAAT
AY823624_Med CCTTTTATGTAAT-AGTTGGCTATAAGTGTCTAGATTACTACAGGAGGGGCCAGTAAATGAGAAGTAATCTCACCTTGAAAAAGGCTGTTTT-TGGGTATATGAGGGG--TTTGTCAAAGCAACAATAATTTCCAGGGGGAGAGATGTAAGTCTTTAAAAA-TAGANAT
DQ198225_Med CCTTTTGTGTAAG-AGTTGTTTATAAGTGTCTAGACTTCTATAGGGAGG-CTCAGTAAATGGAATTAACCC-CACCTTGAAAAAGGCTGTCGT-TAAGTATATGAGGGGGGTTGTTCAAACAATAAATAATTTTAGGGGAAAAAGTGAAGTCTTTAAAAAATAAATAA
DQ399833_Cga -----TAAAAAT-----
** **
```

```
AY363687_Mga AAAGCTACCTAAAAAATATGGTGTGTAATGTGTGTATATAAGTATACGCAAAAAA-----CCGTAAAATGTTTGGGAATAAGGTGTTTCTACACGCTTAGACTCCCTGCCATTGCCCTGTGACAGAAGCAATCGCCTCAGTTCCCTGTTTTTT
FJ890850_Mga AAAGCTACCTAAAAAATATGGTGTGTAAGTGTGTATATACAACTATACGCAAAAAA-----CCGTAAAATGTTTGGGAATAAGGTGTTTCTATACGCTTAGACTCCCTGCCATTGCCCTGTACAGAAGCAATCGCCTCTGTTCCCTGTTTTTT
AY823623_Med AAGGCTACCCAAAAAATATGGTGTGTAAGTGTGTATATACAAGTATACGCAAAAAA-----CCATAAA-TGCTTAAAAATAAGGTGTTTCTACACGCTTAACCTCCCTGCCACTGCTTGAACAGAAGTAGTCCGCTCTGTCCTCCCTGTTTTTT
AY823624_Med AAGGCTACCCAAAAAATATGGTGTGTAAGTGTGTATATACAAGTATACGCAAAAAA-----CCATAAA-TGTTTAAAAATAAGGTGTTTCTACACGCTTAACCTCCCTGCCACTGCTTGAACAGAAGTAGTCCGCTCTGTTCCCTGTTTTTT
DQ198225_Med AAGGCTACCCAAAAAATATGGTGTGTAAGTGTGTATATACAAGTATACGCAAAAAA-----CCATAAA-TGTTTAAAAATAAGGTATTTCTACACGCTTAACCTCCCTGCCACTGCTTGAACAGAAGTAGTCCGCTCTGTTCCCTGTTTTTT
DQ399833_Cga AAGGCTACCCAAAAAATATGGTGTGTAAGTGTGTATATACAAGTATACGCAAAAAA-----CCATAAA-TGTTTAAAAATAAGGTATTTCTACACGCTTAACCTCCCTGCCACTGCTTGAACAGAAGTAGTCCGCTCTACCCCTGTTTTTT
** **
```

```
AY363687_Mga TACACGTAAGTCCCTGTTGACGCACATGGGAGCGCCTTATAAATAAATATAAATAAGTGAAGCAGCACACCTAATAGTGTATATTAGGCATTATAGTATTTATCAAATTTAGGCCATATATGTACAGATACCTAGCCAT
FJ890850_Mga TACACGTAAGTCCCTGTTGACGCACATGGGAGCGCCTTATAAATAAATATAAATAAGTGAAGCAGCACACCTAATAGTGTATATTAGGCATTATAGTATTTATCAAATTTAGGCCATATATGTACAGATACCTAGCCAT
AY823623_Med TATACGTAAGTCCCTGTTGACGCACATGGGAGCGCCTTATAAATAAATATAAATAAGTGAAGCAGCACACCTAGTTAGTCCCTTATTAGGCATTATATATTTTATCAAATTTAGGCCATATATGTACAGATACCTAGCCAT
AY823624_Med TATACGTAAGTCCCTGTTGACGCACATGGGAGCGCCTTATAAATAAATATAAATAAGTGAAGCAGCACACCTAGTTAGTCCCTTATTAGGCATTATATATTTTATCAAATTTAGGCCATATATGTACAGATACCTAGCCAT
DQ198225_Med TATACGTAAGTCCCTGTTGACGCACATGGGAGCGCCTTATAAATAAATATAAATAAGTGAAGCAGCACACCTAATAGTGTCTTATTAGGCATTATATCTTTTATCAAATTTAGGCCATATATGTACAGATACCTAGCCAT
DQ399833_Cga TATACGTAAGTCCCTGTTGACGCACATGGGAGCGCCTTATAAATAAATATAAATAAGTGAAGCAGCACACCTAATAGTGTCTTATTAGGCATTATATAGTATTTATCAAATTTAGGCCATATATGTACAGATACCTAGCCAT
** **
```

β

Mytilus trossulus

```
GU936627_Mtr CCTTTTATGAATCTAAAAGTTAGATAG-GGTGATGGAGCATGTGTGGCCT-----ATTTTCATTAAAGACTAGAGGTAAA-CGTATCACAATAAAGTAAT-AATAAAATAGCCTTAAATGATAGCAGCAAAAAGCAGCAATAACCTGCCTAGATAAGAAAAACA
GU936626_Mtr CCTTTTATGAATCTAAAAGTTAGATAG-GGTGATGGAGCATGTGTGGCCT-----ATTCATTAAAGACTAGAGGTAAA-CGTATCACAATAAAGTAAT-AATAAAATAGCCTTAAATGATAGCAGCAAAAAGCAGCAATAACCTGCCTAGATAAGAAAAACA
HM462081_Mtr CCTTTTATGAATCTAAAAGTTAGATAG-GGTGATGGAGCATGTGTGGCCT-----ATTTTCATTAAAGACTAGAGGTAAA-CGTATCACAATAAAGTAAT-AATAAAATAGCCTTAAATGATAGCAGCAAAAAGCAGCAATAACCTGCCTAGATAAGAAAAACA
AY823625_Ftr CCTTTTATGAAGCTGAAGCCAAATTAGTGGCGTAGG-GCGTGTCTGGTCTCTGTGTAATAGTATCGCTATTTTATTAATAAATAAGGGTTAAAAAGGGTTGCAAAATAGGTAAGAAATAAAACAGTCTTAAATGACAGCAAAAAGCAGCAATAACCTGCCTAGATAAGAAAAACA
GU936625_Ftr CCTTTTATGAAGCTGAAGCCAAATTAGTGGCGTAGG-GCGTGTCTGGTCTCTGTGTAATAGTATCGCTATTTTATTAATAAATAAGGGTTAAAAAGGGTTGCAAAATAGGTAAGAAATAAAACAGTCTTAAATGACAGCAAAAAGCAGCAATAACCTGCCTAGATAAGAAAAACA
HM462080_Ftr CCTTTTATGAAGCTGAAGCCAAATTAGTGGCGTAGG-CGCTGTCTGGTCTCTGTGTAATAGTATCGCTATTTTATTAATAAATAAGGGTTAAAAAGGGTTGCAAAATAGGTAAGAAATAAAACAGTCTTAAATGACAGCAAAAAGCAGCAATAACCTGCCTAGATAAGAAAAACA
***** ** **
```

```
GU936627_Mtr AGTGTGTCTAAACCCTGGGTTGTGTTAGGTTGTGCTGTAA---CAAAAAA-----GTGAAAACACTTAAAGATGAGGCTTATGGCGTACTTCATTTCTTGCACAGGTAGGGACA
GU936626_Mtr AGTGTGTCTAAACCCTGGGTTGTGTTAGGTTGTGCTGTAA---CAAAACAAAAA-----GTGAAAACACTTAAAGATGAGGCTTATGGCGTACTTCATTTCTTGCACAGGTAGGGACA
HM462081_Mtr AGTGTATCTAAACCCTGGGTTGTGTTAGGTTGTGCTGTAA---GAAAAA-----GTGAAAACCTTAAAGATGAGGCTTATGGCGTACTTCATTTCTTGCACAGGTAGGGACA
AY823625_Ftr AGGGT-TCTAAAA-ACGCGGTGCGTAAAGGATTGTGTAGTAAACAGGCAAAAACNA-----CCAAAACACTGTGAAAACCTTAAAGATGAGGCTTATAGTGTACCGCATTTCTT-GTCCCGCGGTTACA
GU936625_Ftr AGGGT-TCTAAAA-ACGCGGTGCGTAAAGGATTGTGTAGTAAACAGGCAAAAACNA-----CCAAAACACTGTGAAAACCTTAAAGATGAGGCTTATAGTGTACCGCATTTCTT-GTACCGCGGTTACA
HM462080_Ftr AGTGT-TCTAAAA-ACGCGCGTGTAAAGGATTGTGTAGTAAACAGGCAAAAACNA-----CCAAAACACTGTGAAAACCTTAAAGATGAGGCTTATAGTGTACCGCATTTCTT-GTACCGCGGTTACA
** **
```

```
GU936627_Mtr GTGACCATGACCCCTTCCACCTGCTCTTTTAGACGCAAAAACCTGTGCTGATGATGATGATAAAGCCCTAATTAATAAATAAATCAAGTCAAAGTAAACTAAATTTACTTGACATTTGTGATTTTATTGAAA-TCTGTTGCAAATGCCACATACCTAATCAA
GU936626_Mtr ATGACCATGACCCCTTCCACCTGCTCTTTTAGACGCAAAAACCTGTGCTGATGATGATGATAAAGCCCTAATTAATAAATAAATCAAGTCAAAGTAAACTAAATTTACTTGACATTTGTGATTTTATTGAAA-TCTGGTTGCAAATGCCACATACCTAATCAA
HM462081_Mtr GTGACCATGACCCCTTCCACCTGCTCTTTTAGACGCAAAAACCTGTGCTGATGATGATGATAAAGCCCTAATTAATAAATAAATCAAGTCAAAGTAAACTAAATTTACTTGACATTTGTGATTTTATTGAAA-TCTGGTTGCAAATGCCACATACCTAATCAA
AY823625_Ftr GTGACCATAAGGCTGTCTCTGCTCTTTTAGACGCAAAAACCTGTGCTGATGATGATGATAAAGCCCTTAGTAAAGTAAACTAAATTTACTTGACATTTGTGATTTTATTGAAAATCTAGTTGGCAATGCCATACCTGTCCAA
GU936625_Ftr GTGACCATAAGGCTGTCTCTGCTCTTTTAGACGCAAAAACCTGTGCTGATGATGATGATAAAGCCCTTAGTAAAGTAAACTAAATTTACTTGACATTTGTGATTTTATTGAAAATCTAGTTGGCAATGCCATACCTGTCCAA
HM462080_Ftr GTGACCATAAGGCTGTCTCTGCTCTTTTAGACGCAAAAACCTGTGCTGATGATGATGATAAAGCCCTTAGTAAAGTAAACTAAATTTACTTGACATTTGTGATTTTATTGAAAATCTAGTTGGCAATGCCATACCTGTCCAA
***** ** **
```

Εικόνα 3.8. Στοιχισμός της περιοχής VD1 τύπου M από πλήρως αλληλουχημένα γονιδιώματα mtDNA του *Mytilus*. (α) Από *Mytilus galloprovincialis/Mytilus edulis*. (β) Από *Mytilus trossulus*. Δίνονται οι κωδικοί πρόσβασης (accession numbers) της GenBank όλων των αλληλουχιών. Τα Mga, Med και Mtr αντιπροσωπεύουν το γονιδίωμα M των *Mytilus galloprovincialis*, *M. edulis* και *M. trossulus* αντίστοιχα. Το Ftr αντιπροσωπεύει το όμοιο προς M (M-like) τμήμα του CR του F γονιδιώματος του *Mytilus trossulus* (Cao et al. 2009). Το Cga αντιπροσωπεύει το γονιδίωμα C του *Mytilus galloprovincialis* (Venetis et al. 2007). Η περιοχή που πιθανόν να παίζει ρόλο στη μεταίβωση του γονιδιώματος M είναι σκιασμένη.

Πίνακας 3.1: Τμήματα DNA που χρησιμοποιήθηκαν ως ανιχνευτές ή ανταγωνιστές σε ελέγχους EMSA ή αποτυπώματος DNase I.

Ονομασία ανιχνευτή	Εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν ^α	Μήκος (bp)
Παρασκευασμένοι με κανονική PCR (Ενότητα 2.6.1)		
VD1-M ₁₆₁₋₃₁₂	VD1MF/VD1MR	152
VD1-M ₁₈₀₋₂₉₁	VD1M-Fint/VD1M-Rint	112
VD1-M ₁₈₀₋₃₁₂	VD1M-Fint/VD1MR	133
VD1-M ₁₄₈₋₂₁₉	VD1M-RIF/VD1M-RIR	81 (72) ^β
VD1-M ₁₆₁₋₂₉₁	VD1MF/VD1M-Rint	131
VD1-M ₁₆₁₋₂₅₅	VD1M-F/oIVD1M-b	99 (95) ^β
VD1-M ₂₃₁₋₃₁₂	VD1MF2/VD1MR	82
VD1-M ₁₈₀₋₂₅₅	VD1M-Fint/oIVD1M-b	80 (76) ^β
VD1-M ₂₀₇₋₃₁₂	ChimAs-F/VD1MR	106
CD-M ₅₉₂₋₇₉₆	a-f/CD_END-R	205
VD1-F ₂₈₋₂₁₄	ssFdl1/ssFdl2	187
VD1-F ₁₇₂₋₃₅₀	VD1Fa-F/VD1Fa-R	179
VD1-F ₃₂₈₋₅₃₀	VD1F-F/VD1F-R	203
VD1-F ₅₁₁₋₇₃₀	VD1Fb-F/muDLR	220
VD1-F ₄₈₋₁₉₁	VD1F1-F/VD1F1-R	144
VD1-F ₇₁₋₁₇₂	VD1F2-F/VD1F2-R	102
Παρασκευασμένοι με PCR επέκτασης αλληλοεπικαλυπτόμενων τμημάτων (Ενότητα 2.6.2)		
Del-As	VD1MF/Chimer-R + Chimer-F/VD1MR	126
Ins-TAs	VD1MF/ChimTA-R + ChimTA-F/VD1MR	147
Ins-ACTGs	VD1MF/ChimACTG-R + ChimACTG-F/VD1MR	159
R-As-R	Cytb-F/ChimAs-cytbR + ChimAs-cytbF/Cytb-R	165
R-As-VD1M	Cytb-F/ChimAs-cytbR + ChimAs-F/VD1MR	179
VD1M-As-R	VD1M-FXba/ChimAs-R + ChimAs-cytbF/Cytb-RXba	155
R2-As-VD1M	Ran-F/Ran + ChimAs-F/VD1MR	153
Παρασκευή συνθετικών δίκλωνων ολιγονουκλεοτιδίων (Ενότητα 2.12)		
VD1M ₂₃₃₋₂₅₅	oIVD1M-a/oIVD1M-b	25(23) ^β

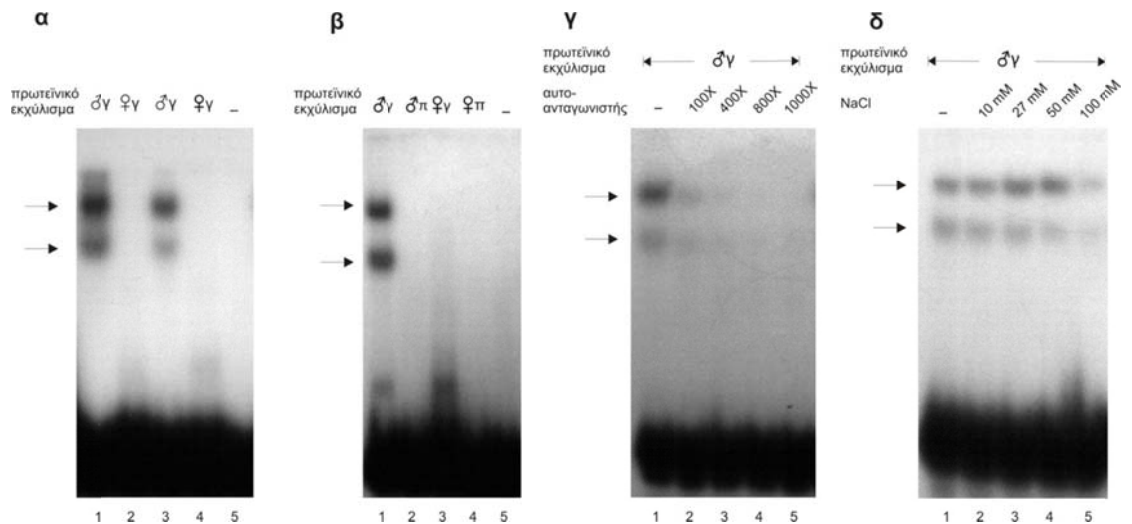
^α Η αλληλουχία των εκκινητών δίνεται στον Πίνακα 2.4.

^β Αυτοί οι ανιχνευτές είναι κατά λίγα bp μεγαλύτεροι από ότι ορίζουν οι αριθμοί θέσης των ακραίων νουκλεοτιδίων των εκκινητών με τη βοήθεια των οποίων συντέθηκαν. Αυτό συμβαίνει διότι, είτε ο ένας είτε και οι δύο εκκινητές φέρουν περιοριστικές θέσεις στο 5' άκρο, που δεν υβριδοποιούνται στο υπόστρωμα – μήτρα DNA. Το πραγματικό μήκος είναι ο αριθμός εκτός παρένθεσης, ενώ το μήκος της αλληλουχίας του τμήματος DNA που αντιστοιχεί στην αλληλουχία του VD1 του γονιδιώματος M, είναι σε παρένθεση.

Από αυτό το πείραμα προέκυψε ότι η κινητικότητα του ανιχνευτή VD1-M₁₆₁₋₃₁₂ μειώνεται όταν χρησιμοποιείται εκχύλισμα αρσενικής γονάδας (Εικόνα 3.9α), που σημαίνει ότι η αρσενική γονάδα περιέχει κάποιον (ή κάποιους) παράγοντα(ες) που αναγνωρίζει το συγκεκριμένο τμήμα DNA και προσδέεται σε αυτό. Όταν όμως χρησιμοποιήθηκε εκχύλισμα θηλυκής γονάδας, δεν παρατηρήθηκε καμία αλλαγή στην κινητικότητα του συγκεκριμένου ανιχνευτή (Εικόνα 3.9 α, β). Ομοίως, καμία αλλαγή δεν υπήρξε όταν χρησιμοποιήθηκε εκχύλισμα από σωματικό ιστό (πόδι), είτε αρσενικού είτε θηλυκού ατόμου (Εικόνα 3.9β). Αυτό σημαίνει ότι μόνο η αρσενική γονάδα περιέχει παράγοντες που αλληλεπιδρούν με το VD1-M₁₆₁₋₃₁₂, και ότι αυτοί οι παράγοντες δεν υπάρχουν ούτε στους σωματικούς ιστούς των αρσενικών, ούτε στη γονάδα ή στους σωματικούς ιστούς θηλυκών ατόμων. Με άλλα λόγια, φαίνεται ότι η αλληλεπίδραση αυτή είναι φυλο- και ιστο-ειδική.

Για να ελεγχθεί η ειδικότητα της πρόσδεσης, πραγματοποιήθηκε EMSA ανταγωνισμού (Ενότητα 2.16.1). Συγκεκριμένα, στην αντίδραση προστέθηκαν αυξανόμενες ποσότητες μη-σημασμένου («κρύου») VD1-M₁₆₁₋₃₁₂ σε περίσσεια έναντι του σημασμένου ανιχνευτή. Η πρόσδεση διαταράχθηκε ακόμη και παρουσία μικρών ποσοτήτων ανταγωνιστή (Εικόνα 3.9γ), που σημαίνει ότι οι παράγοντες που αλληλεπιδρούν είναι ειδικοί για το συγκεκριμένο τμήμα DNA.

Για να ελεγχθεί η σταθερότητα του συμπλόκου, εξετάστηκε η συμπεριφορά του παρουσία διάφορων συγκεντρώσεων NaCl που επηρεάζουν τις αλληλεπιδράσεις DNA-πρωτεΐνης. Το σύμπλοκο φαίνεται ότι διατηρείται σε ένα μεγάλο εύρος συγκεντρώσεων NaCl (Εικόνα 3.9δ). Η παρουσία δύο ζωνών στο πείραμα EMSA, χρησιμοποιώντας τον ανιχνευτή VD1-M₁₆₁₋₃₁₂ και εκχύλισμα αρσενικής γονάδας, θα συζητηθεί στην Ενότητα 4.



Εικόνα 3.9. Πειράματα μείωσης κινητικότητας συμπλόκου (EMSA) χρησιμοποιώντας ως ανιχνευτή το τμήμα VD1- $M_{161-312}$ με πρωτεϊνικά εκχυλίσματα από αρσενικά και θηλυκά μύδια. **(α)** Ο ανιχνευτής επώαστηκε με εκχυλίσματα γονάδας από δύο αρσενικά (διαδρομές 1, 3) και από δύο θηλυκά (διαδρομές 2, 4), ξεχωριστά. Η διαδρομή 5 είναι ο ελεύθερος ανιχνευτής. **(β)** Ο ανιχνευτής επώαστηκε με πρωτεϊνικό εκχύλισμα από τη γονάδα (διαδρομή 1) ή το πόδι (διαδρομή 2) ενός αρσενικού και από τη γονάδα (διαδρομή 3) ή το πόδι (διαδρομή 4) ενός θηλυκού ατόμου. Η διαδρομή 5 είναι ο ελεύθερος ανιχνευτής. **(γ)** Αποτελέσματα από EMSA ανταγωνισμού χρησιμοποιώντας σημασμένο και μη σημασμένο (ανταγωνιστικό) VD1- $M_{161-312}$ με εκχύλισμα από αρσενική γονάδα. Διαδρομή 1, χωρίς ανταγωνιστή· διαδρομές 2 έως 5, ανταγωνιστής σε αυξανόμενα πολλαπλάσια της ποσότητας του σημασμένου ανιχνευτή. **(δ)** Αποτελέσματα EMSA με VD1- $M_{161-312}$ και εκχύλισμα γονάδας αρσενικού, χωρίς NaCl (διαδρομή 1) και αυξανόμενες συγκεντρώσεις NaCl (διαδρομές 2 έως 5). Σε όλες τις περιπτώσεις, η κατώτερη ζώνη είναι ο ανιχνευτής, ενώ τα βέλη υποδεικνύουν τη μείωση κινητικότητας του ανιχνευτή λόγω σχηματισμού του συμπλόκου ανιχνευτή/πρωτεΐνης.

Επιδιώχθηκε επίσης η δοκιμή του ίδιου πειράματος με ανιχνευτή VD1- $M_{161-312}$ που να έχει, ωστόσο, αλληλουχία ελαφρώς διαφοροποιημένη από την αλληλουχία αναφοράς (AY363687, Mizi et al. 2005), αλλά παρόλα αυτά να προέρχεται από σπέρμα ατόμου του ίδιου είδους (*M. galloprovincialis*), ώστε να γνωρίζουμε ότι προέρχεται από λειτουργικό mtDNA τύπου M. Από προηγούμενη μελέτη του εργαστηρίου (Kyriakou et al. 2010), βρέθηκε ένα τέτοιο τμήμα DNA στην αλληλουχία m10sp (Additional material, online), η οποία έχει κατατεθεί στη GenBank με Acc. No. HM027618. Το τμήμα αυτό, ενώ προέρχεται από αλληλουχία απομονωμένη από καθαρό σπέρμα ζώου *M. galloprovincialis*, παρουσιάζει

μεγαλύτερη ομοιότητα με το αντίστοιχο τμήμα από *M. edulis*, παρά με το αντίστοιχο τμήμα από *M. galloprovincialis*, όπως φαίνεται και από τη στοίχιση στην **Εικόνα 3.10α**. Επομένως, εμφανίζει αρκετές διαφορές συγκριτικά με την αλληλουχία VD1-M₁₆₁₋₃₁₂ που χρησιμοποιήσαμε στα αρχικά πειράματα· είναι ουσιαστικά τύπου *M. edulis*.

α

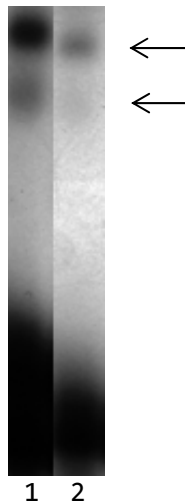
```

HM027618      GCTACCCAAAAAATCTGGTGTGTAGCGTGTGTATACAAGTATACGCAAAAAAAAAAAAAA 60
Med_AY823623  GCTACCCAAAAAATATGGTGTGTAGCGTGTGTATACAAGTATACGCAAAAAAAAAAAAAA 60
Mga_AY363687  GCTACCTAAAAAATATGGTGTGTAAATGTGTATATAAGTATACGCAAAAAAAAAAAAAA 60
*****
*****

HM027618      AAAAAAAAA---TACCATAAA-TGTTTGAAGATAAGGTATTTCAACACGCTTAACTTCCC 115
Med_AY823623  AAAAAAAAAAAATACCATAAA-TGCTTAAAAATAAGGTGTTTCTACACGCTTAACTTCCC 119
Mga_AY363687  AAAAAAAAAAA--ACCGTAAATGTTTGGGAATAAGGTGTTTCTACACGCTTAGACTCCT 118
*****
*** ** * * *

HM027618      TGCCACTGCTTGTAACAGAAGCAGTCGCCTCAGT 149
Med_AY823623  TGCCACTGCTTGTAACAGAAGTAGTCGCCTCTGT 153
Mga_AY363687  TGCCATGCTTGTAACAGAAGCAATCGCCTCAGT 152
*****
*** ** * * *
    
```

β



Εικόνα 3.10. Ανιχνευτής VD1-M₁₆₁₋₃₁₂ με αλληλουχία HM027618 (Kyriakou et al. 2010). **(α)** Στοίχιση αλληλουχίας τμήματος VD1-M₁₆₁₋₃₁₂ από το HM027618 με την αντίστοιχη περιοχή από ένα πλήρως αλληλουχημένο γονιδίωμα *M* του *Mytilus edulis* (*Med*) και ένα πλήρως αλληλουχημένο γονιδίωμα *M* του *Mytilus galloprovincialis* (*Mga*). Αναγράφονται και οι αντίστοιχοι κωδικοί στη GenBank. **(β)** Πείραμα EMSA χρησιμοποιώντας ως ανιχνευτή το VD1-M₁₆₁₋₃₁₂ με αλληλουχία AY363687 (διαδρομή 1), και το VD1-M₁₆₁₋₃₁₂ με αλληλουχία HM027618 (διαδρομή 2), και εκχύλισμα αρσενικής γονάδας. Και στις δύο περιπτώσεις, η κατώτερη ζώνη είναι ο ανιχνευτής, ενώ τα βέλη υποδεικνύουν τη μείωση κινητικότητας του ανιχνευτή λόγω σχηματισμού του συμπλόκου ανιχνευτή/πρωτεΐνης.

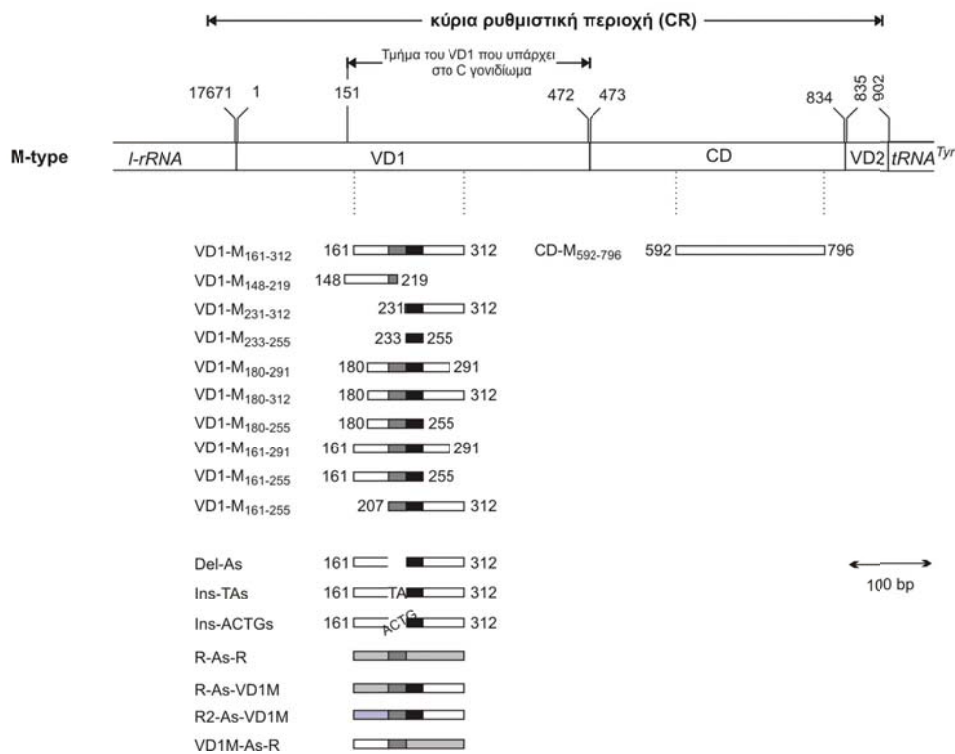
Η αλληλουχία αυτή χρησιμοποιήθηκε ως ανιχνευτής σε πείραμα EMSA με εκχύλισμα αρσενικής γονάδας (*M. galloprovincialis*) και παρατηρήθηκε ότι και σε αυτή την περίπτωση το σύμπλοκο σχηματίζεται κανονικά (**Εικόνα 3.10β**). Προφανώς λοιπόν, κάποια(ες) πρωτεΐνη(ες) από τη γονάδα του *M. galloprovincialis* αναγνωρίζει το τμήμα VD1-M₁₆₁₋₃₁₂ του *M. edulis* και μπορεί να προσδεθεί σε αυτό. Αυτό είναι λογικό εφόσον τα *M. edulis* και

M. galloprovincialis θεωρούνται αδελφά είδη και υβριδοποιούνται ελεύθερα στη φύση (Zouros 2013), που σημαίνει ότι το γονιδίωμα του πυρήνα τους είναι παρόμοιο και άρα λειτουργεί με παρόμοιο τρόπο, κωδικοποιώντας παρόμοιες πρωτεΐνες. Το αποτέλεσμα αυτό ενίσχυσε ακόμη περισσότερο την άποψη ότι πρόκειται για έναν ειδικό ως προς το γονιδίωμα M παράγοντα.

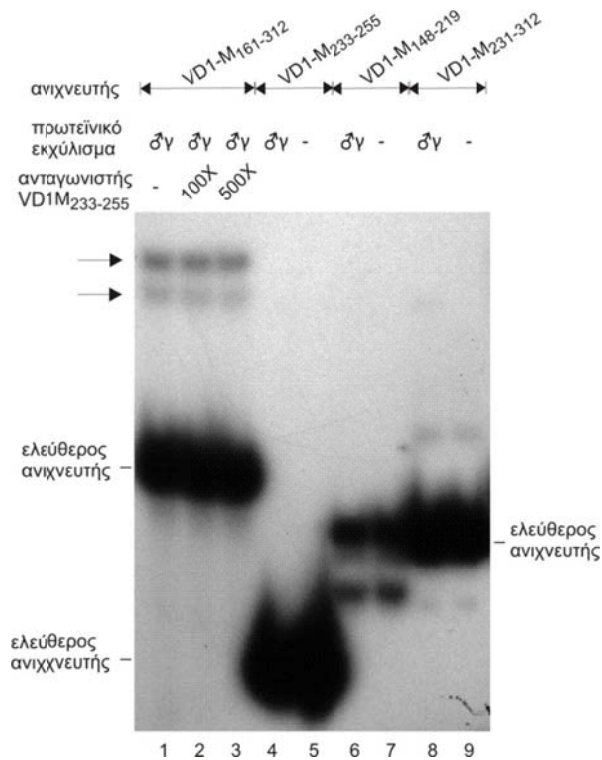
3.4.1.2 Τα σημαντικά για την αλληλεπίδραση τμήματα του VD1-M₁₆₁₋₃₁₂

Για να προσδιοριστούν οι περιοχές του VD1-M₁₆₁₋₃₁₂ που είναι σημαντικές για το σχηματισμό συμπλόκου, επιδιώχθηκε περιορισμός της πλήρους μήκους αλληλουχίας με διάφορους τρόπους και τα τμήματα που προέκυψαν, χρησιμοποιήθηκαν σε EMSA ως ανιχνευτές.

Αρχικά, το VD1-M₁₆₁₋₃₁₂ χωρίστηκε στη μέση και πραγματοποιήθηκαν δύο έλεγχοι EMSA. Στον πρώτο χρησιμοποιήθηκε ως ανιχνευτής το VD1-M₁₄₈₋₂₁₉ (Πίνακας 3.1, Εικόνα 3.11), το οποίο εκτείνεται από λίγο πριν την αρχή του VD1-M₁₆₁₋₃₁₂ μέχρι και την αλληλουχία των πολλών αδενινών που υπάρχει στο μέσο περίπου του VD1-M₁₆₁₋₃₁₂ (Εικόνα 3.8) περιλαμβάνοντας ένα τμήμα αυτής της αλληλουχίας. Στον δεύτερο έλεγχο χρησιμοποιήθηκε ως ανιχνευτής το VD1-M₂₃₁₋₃₁₂, το οποίο αρχίζει αμέσως μετά την αλληλουχία των πολλών αδενινών και εκτείνεται μέχρι το τέλος του VD1-M₁₆₁₋₃₁₂ (Πίνακας 3.1, Εικόνα 3.11). Παρατηρήθηκε αδυναμία σχηματισμού συμπλόκου και στις δύο περιπτώσεις (Εικόνα 3.12, διαδρομές 6 έως 9), που υποδηλώνει ότι ούτε το πρώτο αλλά ούτε και το δεύτερο μισό του VD1-M₁₆₁₋₃₁₂ είναι από μόνο του ικανό να δημιουργήσει σύμπλοκο με πρωτεΐνη.



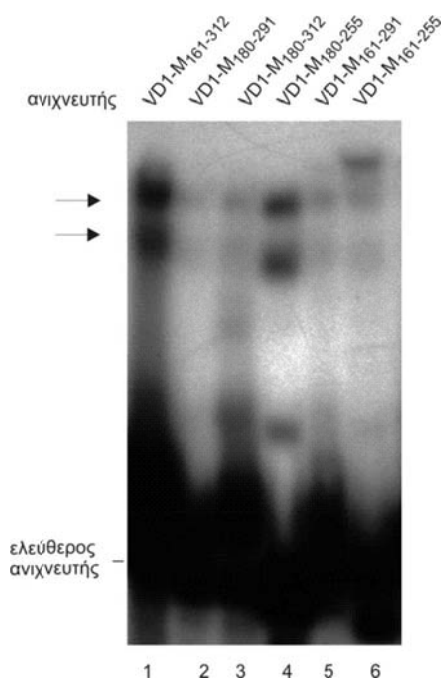
Εικόνα 3.11. Η κύρια ρυθμιστική περιοχή (CR) του πατρικά κληρονομούμενου μιτοχονδριακού γονιδιώματος (M) του *M. galloprovincialis* και ανιχνευτές που χρησιμοποιήθηκαν σε πειράματα μείωσης κινητικότητας συμπλόκου (EMSA). Οι αριθμοί υποδεικνύουν θέσεις νουκλεοτιδίων σύμφωνα με τους [Mizi et al. \(2005\)](#). Τα VD1 (πρώτη μεταβλητή περιοχή), CD (συντηρητική περιοχή), VD2 (δεύτερη μεταβλητή περιοχή) είναι οι τρεις περιοχές του CR· τα *l-rRNA* και *tRNA^{Tyr}* είναι τα γονίδια του *rRNA* της μεγάλης ριβοσωμικής υπομονάδας και του *tRNA* της τυροσίνης, αντίστοιχα. Το μήκος των ανιχνευτών συνάγεται από τους αριθμούς – νουκλεοτιδικές θέσεις στα δύο άκρα. Τα ορθογώνια κάτω από τα VD1 και CD αντιπροσωπεύουν τους ανιχνευτές που χρησιμοποιήθηκαν σε EMSA. Το μαύρο κουτάκι αντιπροσωπεύει το στοιχείο πρόσδεσης (βλέπε κείμενο, πιο κάτω), το σκούρο γκρι – την αλληλουχία πολλών αδενινών, το ανοιχτό γκρι – τυχαία αλληλουχία από DNA του ίδιου οργανισμού, ενώ το ιώδες – τυχαία αλληλουχία που προέκυψε από σχετικό αλγόριθμο (βλέπε κείμενο). Στον ανιχνευτή *Del-As* η αλληλουχία πολλών αδενινών έχει αφαιρεθεί, ενώ στους ανιχνευτές *Ins-TAs* και *Ins-ACTGs*, έχει αντικατασταθεί με ίσου μήκους αλληλουχία επαναλήψεων του δινουκλεοτιδίου TA ή του τετρανουκλεοτιδίου ACTG. Το τμήμα 1 έως 151 του VD1 λείπει στο γονιδίωμα C.



Εικόνα 3.12. Πειράματα μείωσης κινητικότητας συμπλόκου (EMSA) χρησιμοποιώντας εκχυλίσματα αρσενικής γονάδας και τμήματα του VD1-M₁₆₁₋₃₁₂ ως ανιχνευτές. Διαδρομές 1 έως 3: EMSA ανταγωνισμού χρησιμοποιώντας το VD1-M₁₆₁₋₃₁₂ ως ανιχνευτή και το VD1-M₂₃₃₋₂₅₅ ως ανταγωνιστή (διαδρομή 1: χωρίς ανταγωνιστή, διαδρομή 2: 100X περίσσεια ανταγωνιστή και διαδρομή 3: 500X περίσσεια ανταγωνιστή). Διαδρομές 4 έως 9: EMSA με ανιχνευτές τα VD1-M₂₃₃₋₂₅₅ (διαδρομές 4 και 5), VD1-M₁₄₈₋₂₁₉ (διαδρομές 6 και 7) και VD1-M₂₃₁₋₃₁₂ (διαδρομές 8 και 9). Στο πάνω μέρος κάθε διαδρομής φαίνεται η παρουσία (♂γ) ή απουσία (-) πρωτεϊνικού εκχυλίσματος αρσενικής γονάδας. Τα βέλη υποδεικνύουν τα σύμπλοκα που σχηματίζονται.

Για την καλύτερη κατανόηση των μερών του VD1-M₁₆₁₋₃₁₂ που είναι απαραίτητα και επαρκούν για το σχηματισμό του συμπλόκου, δημιουργήθηκαν ανιχνευτές «αφαιρώντας» διαδοχικά περίπου 20 bp από κάθε άκρο του VD1-M₁₆₁₋₃₁₂ και υποβλήθηκαν σε EMSA με πρωτεϊνικό εκχύλισμα αρσενικής γονάδας (ανιχνευτές VD1-M₁₈₀₋₂₉₁, VD1-M₁₈₀₋₃₁₂, VD1-M₁₄₈₋₂₁₉, VD1-M₁₆₁₋₂₉₁ και VD1-M₁₈₀₋₂₅₅, Πίνακας 3.1, Εικόνα 3.11). Η σειρά των ελέγχων αυτών (Εικόνα 3.13) υπέδειξε το VD1-M₁₈₀₋₂₅₅ ως το μικρότερο τμήμα του VD1-M₁₆₁₋₃₁₂ που ομοίως με αυτό, σχηματίζει σύμπλοκο με πρωτεΐνες εκχυλίσματος αρσενικής γονάδας (Εικόνα 3.13,

διαδρομή 4 και Εικόνα 3.14, διαδρομή 2). Το τμήμα αυτό έχει μήκος 76 bp και περιέχει την αλληλουχία πολλών αδενινών (26), μια περιοχή 27 bp αριστερά της αλληλουχίας των πολλών αδενινών και μια περιοχή 23 bp δεξιά της αλληλουχίας των αδενινών (Εικόνα 3.11). Αποφασίστηκε η διερεύνηση του ρόλου κάθε ενός από τα συστατικά αυτά στον σχηματισμό του συγκεκριμένου συμπλόκου, όπως περιγράφεται πιο κάτω.

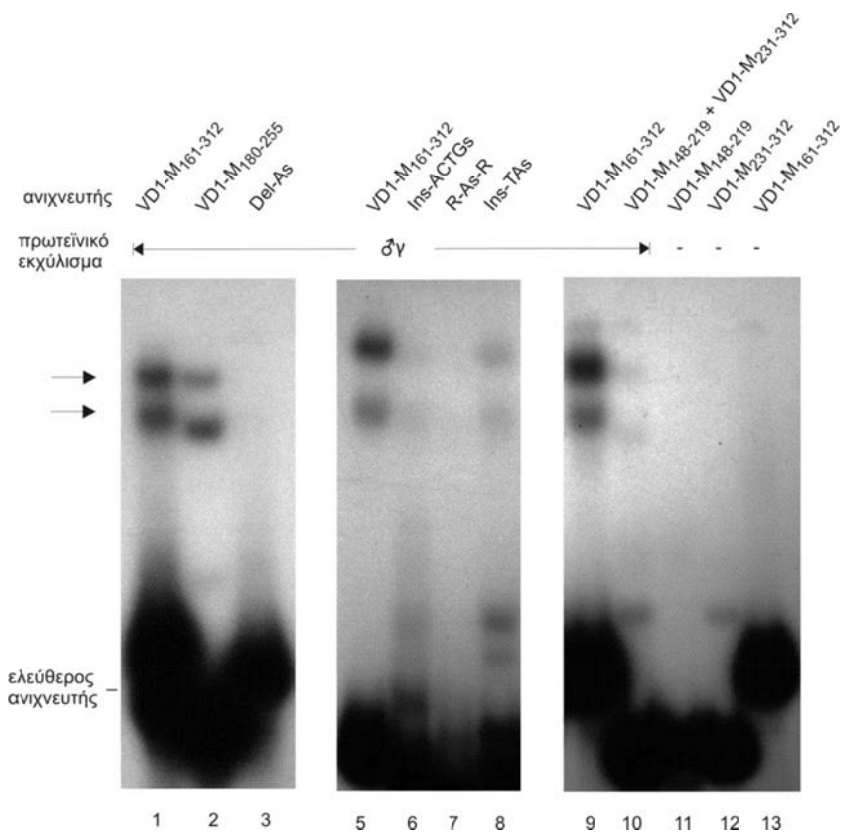


Εικόνα 3.13. Πειράματα μείωσης κινητικότητας συμπλόκου (EMSA) χρησιμοποιώντας εκχυλίσματα αρσενικής γονάδας και τμήματα του VD1-M₁₆₁₋₃₁₂ ως ανιχνευτές. Στο πάνω μέρος κάθε διαδρομής δίνεται η ταυτότητα του ανιχνευτή. Τα βέλη υποδεικνύουν τα σύμπλοκα που σχηματίζονται.

3.4.1.3 Ο ρόλος της αλληλουχίας των αδενινών

Από τα πιο πάνω αποτελέσματα διαφαίνεται ο σημαντικός ρόλος της αλληλουχίας των αδενινών στο σχηματισμό του συμπλόκου VD1-M₁₆₁₋₃₁₂/πρωτεΐνης. Για την βαθύτερη κατανόηση του ρόλου των αδενινών, κατασκευάστηκε ένας ανιχνευτής που περιείχε την αλληλουχία του VD1-M₁₆₁₋₃₁₂ πλην της αλληλουχίας των πολλών αδενινών (ανιχνευτής Del-As, Πίνακας 3.1, Εικόνα 3.11). Όταν ο ανιχνευτής αυτός χρησιμοποιήθηκε σε πείραμα EMSA με πρωτεϊνικό εκχύλισμα αρσενικής γονάδας, το σύμπλοκο δε σχηματίστηκε (Εικόνα 3.14, διαδρομή 3).

Η σκέψη που προέκυψε ήταν μήπως η αλληλουχία αδενινών αποτελεί η ίδια θέση πρόσδεσης. Για να ελεγχθεί αυτό, δημιουργήθηκε ένας ανιχνευτής στον οποίο αντικαταστήθηκε η αλληλουχία δεξιά και αριστερά των αδενινών με μια τυχαία αλληλουχία, τμήμα γονιδίου (τυχαία επιλέχθηκε το Cytb του γονιδιώματος F) από το ίδιο είδος (ανιχνευτής R-As-R, Πίνακας 3.1, Εικόνα 3.11). Και αυτός ο ανιχνευτής απέτυχε να σχηματίσει σύμπλοκο με πρωτεΐνες αρσενικής γονάδας (Εικόνα 3.14, διαδρομή 7). Συμπερασματικά, η αλληλουχία αδενινών έχει κάποιον άλλο, σημαντικό ρόλο.



Εικόνα 3.14. Πειράματα μείωσης κινητικότητας συμπλόκου (EMSA) χρησιμοποιώντας εκχυλίσματα αρσενικής γονάδας και τμήματα του VD1-M₁₆₁₋₃₁₂ ή παραλλαγές του ως ανιχνευτές. Στο πάνω μέρος κάθε διαδρομής δίνεται η ταυτότητα του ανιχνευτή και η παρουσία (♂γ) ή απουσία (-) πρωτεϊνικού εκχυλίσματος αρσενικής γονάδας. Τα βέλη υποδεικνύουν τα σύμπλοκα που σχηματίζονται.

Είναι γνωστό ότι αλληλουχίες πολλών αδενινών προκαλούν κάμψη στο DNA η οποία βοηθάει τη μεταγραφή και άλλες σχετικές λειτουργίες (π.χ. Koo et al. 1986, Crothers et al. 1990, Pérez-Martin et al. 1994,

Katayama et al. 1999). Υποτέθηκε λοιπόν ότι και στην παρούσα περίπτωση, η αλληλουχία των αδενινών κάμπτεται, διευκολύνοντας έτσι τη δημιουργία του συμπλόκου. Για να ελεγχθεί η υπόθεση αυτή, η αλληλουχία αδενινών αντικαταστάθηκε με μια ίσου μήκους αλληλουχία επαναλήψεων του δινουκλεοτιδίου TA (ανιχνευτής Ins-TAs) και με μία ίσου μήκους αλληλουχία επαναλήψεων του τετρανουκλεοτιδίου ACTG (ανιχνευτής Ins-ACTGs), με διατήρηση της υπόλοιπης αλληλουχίας του ανιχνευτή, πανομοιότυπης με το VD1-M₁₆₁₋₃₁₂. Η αλληλουχία επαναλήψεων TA έχει την ικανότητα να κάμπτεται, αλλά όχι τόσο καλά όσο η αλληλουχία αδενινών, ενώ η αλληλουχία επαναλήψεων του ACTG είναι σχετικά άκαμπτη. Κατόπιν πραγματοποιήθηκε EMSA χρησιμοποιώντας τους ανιχνευτές αυτούς και εκχύλισμα αρσενικής γονάδας. Παρατηρήθηκε ότι σύμπλοκο σχηματίστηκε και με τους δύο αυτούς ανιχνευτές, αλλά οι ζώνες που αντιστοιχούν στο σύμπλοκο με τον ανιχνευτή Ins-TAs ήταν πιο έντονες από ότι οι αντίστοιχες ζώνες με τον ανιχνευτή Ins-ACTGs (Εικόνα 3.14, διαδρομή 8 και 6). Με άλλα λόγια, όταν αντικαθίσταται η αλληλουχία των αδενινών με μια λιγότερο εύκαμπτη και με μια σχετικά άκαμπτη αλληλουχία, το σύμπλοκο σχηματίζεται όλο και πιο δύσκολα. Επομένως, πράγματι η αλληλουχία αδενινών πρέπει να είναι απαραίτητη για το σύμπλοκο, όχι λόγω της αλληλουχίας αυτής καθαυτής, αλλά λόγω της ικανότητας κάμψης της. Για τη συγκέντρωση περισσότερων ενδείξεων υπέρ του συμπεράσματος αυτού, χρησιμοποιήθηκαν τα τμήματα VD1-M₁₄₈₋₂₁₉ και VD1-M₂₃₁₋₃₁₂ μαζί ως ανιχνευτές στην ίδια αντίδραση EMSA. Παρόλο που κανένας από αυτούς τους ανιχνευτές δεν προκάλεσε τη δημιουργία συμπλόκου όταν χρησιμοποιήθηκε από μόνος του (Εικόνα 3.12, διαδρομές 6-9), παρατηρήθηκε η δημιουργία ενός αχνού συμπλόκου με πρωτεΐνες από εκχύλισμα αρσενικής γονάδας, όταν χρησιμοποιήθηκαν μαζί (Εικόνα 3.14, διαδρομή 10). Δεν είναι γνωστό εάν το γεγονός ότι το σύμπλοκο ήταν ασθενές οφείλεται στη σχεδόν πλήρη απουσία της αλληλουχίας αδενινών ή στο φυσικό «σπάσιμο» του ανιχνευτή VD1-M₁₆₁₋₃₁₂ σε δύο τμήματα. Το ότι τα δύο «μισά» του ανιχνευτή VD1-M₁₆₁₋₃₁₂ δεν δίνουν σύμπλοκο από μόνα τους, αλλά όταν βρίσκονται και τα δύο μαζί στην ίδια αντίδραση EMSA, δίνουν έστω και αχνό σύμπλοκο, σημαίνει ότι είναι και τα δύο απαραίτητα. Και στον ανιχνευτή Del_As ήταν παρόντα και τα δύο «μισά», απλά ήταν συγκολλημένα μεταξύ τους χωρίς τη μεσολάβηση της αλληλουχίας των

αδενινών. Γιατί στην περίπτωση αυτή δε σχηματίστηκε σύμπλοκο; Προφανώς τα δύο «μισά» πρέπει να είναι σε θέση να λάβουν κάποια διαμόρφωση στο χώρο, π.χ. κάποια γωνία και γι'αυτό απαιτείται η παρουσία των αδενινών, η οποία θα καμφθεί, βοηθώντας τα δύο «μισά» να λάβουν τη διαμόρφωση που απαιτείται για το σχηματισμό του συμπλόκου.

Όλα αυτά τα αποτελέσματα συμφωνούν με την υπόθεση ότι η αλληλουχία αδενινών συμβάλλει στο σχηματισμό του συμπλόκου mtDNA/πρωτεΐνης μέσω πρόκλησης μιας κάμψης στο DNA. Η κάμψη αυτή φαίνεται ότι είναι απαραίτητη για το σχηματισμό του συμπλόκου. Η αλληλουχία αδενινών υπάρχει σε όλα τα πατρικά κληρονομούμενα γονιδιώματα του γένους *Mytilus* (βλέπε **Εικόνα 3.8**). Μεταξύ των πλήρως αλληλουχημένων μιτοχονδριακών γονιδιωμάτων *M. galloprovincialis*/*M. edulis* που έχουν κατατεθεί στη GenBank, ο αριθμός καταλοίπων αδενίνης ποικίλλει από 26 έως 37.

3.4.1.4 Ο ρόλος των τμημάτων του VD1-M₁₆₁₋₃₁₂ που πλαισιώνουν την αλληλουχία των αδενινών

Ο ανιχνευτής VD1-M₁₈₀₋₂₅₅, που είναι ο μικρότερος ανιχνευτής που βρέθηκε ότι έχει ικανότητα σχηματισμού συμπλόκου (**βλέπε Ενότητα 3.4.1.2**), εκτός από την αλληλουχία των αδενινών, περιλαμβάνει μια αλληλουχία 27 bp στα αριστερά αυτής και μια αλληλουχία 23 bp στα δεξιά αυτής. Για να διαπιστωθεί ο ρόλος της αριστερής αλληλουχίας των 27 bp, κατασκευάστηκαν τα τμήματα R-As-VD1M και R2-As-VD1M (**Πίνακας 3.1, Εικόνα 3.11**). Στο R-As-VD1M, αριστερά από την αλληλουχία των πολλών αδενινών εισήχθη μια αλληλουχία που επιλέχτηκε στην τύχη από το γονιδίωμα F του ίδιου είδους (συγκεκριμένα, ένα τμήμα του γονιδίου *Cytb*). Στο R2-As-VD1M, αριστερά από την αλληλουχία των πολλών αδενινών εισήχθη μια τυχαία αλληλουχία που ελήφθη από online αλγόριθμο που σχεδιάζει τυχαίες αλληλουχίες συγκεκριμένου μήκους (το Random DNA Sequence Generator <http://www.faculty.ucr.edu/~mmaduro/random.htm>). Στην τελευταία περίπτωση, δηλαδή, το τμήμα αριστερά των αδενινών δεν προέρχεται από υπάρχον DNA κάποιου είδους, αλλά είναι πλήρως «τεχνητό», και όπως φαίνεται στην **Εικόνα 3.15**, η αλληλουχία του δεν παρουσιάζει ομοιότητες

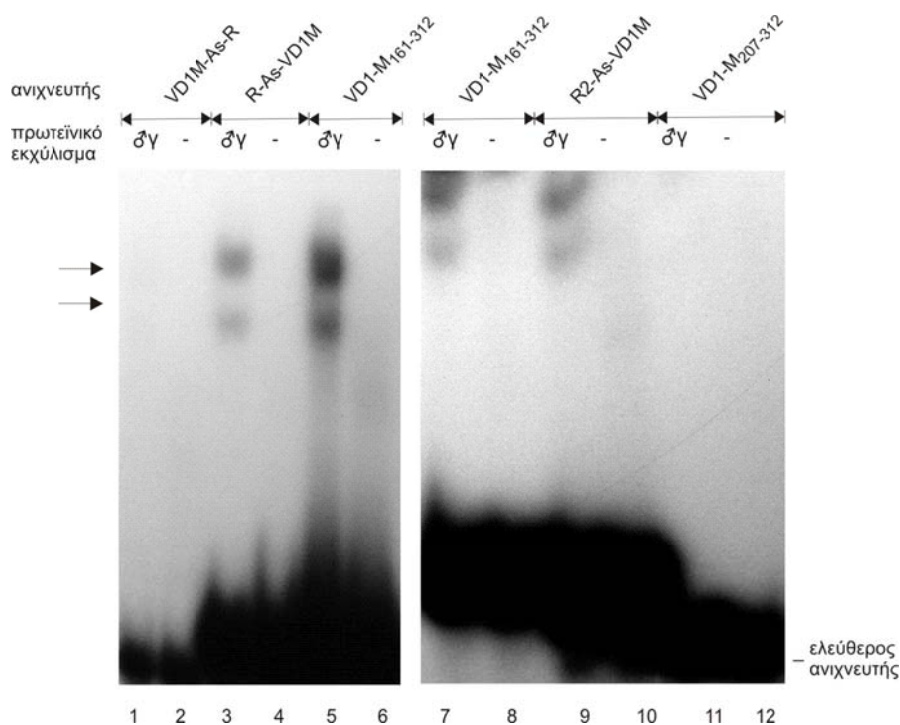
με την αλληλουχία του αντίστοιχου τμήματος από τον ανιχνευτή VD1-M₁₆₁₋₃₁₂. Η υπόλοιπη αλληλουχία τόσο του R-As-VD1M όσο και του R2-As-VD1M είναι ίδια με το VD1-M₁₆₁₋₃₁₂.

```

VD1-M      ---GCTACCTAATAAATAATGGTGTGTAACGTGTGTATACAAGTATACGC
R2         AGTTTTTCACGCCCAAAGCATAA-ACGAGGAGCAGTCATGAAAGTCTTA--
           *  *      ***  **      *   *      **  ****  *
    
```

Εικόνα 3.15. Στοιχίση τμήματος αλληλουχίας των ανιχνευτών VD1-M₁₆₁₋₃₁₂ και R2-As-VD1M αριστερά των αδενινών (VD1-M και R2, αντίστοιχα). Η αλληλουχία R2 ελήφθη από ειδικό αλγόριθμο που παρέχει τυχαίες αλληλουχίες συγκεκριμένου μήκους (βλέπε κείμενο).

Τα R-As-VD1M, R2-As-VD1M χρησιμοποιήθηκαν ως ανιχνευτές σε πείραμα EMSA. Διαπιστώθηκε ότι και στις δύο περιπτώσεις δημιουργείται σύμπλοκο σχεδόν τόσο ισχυρό όσο με τον ανιχνευτή VD1-M₁₆₁₋₃₁₂ (Εικόνα 3.16, διαδρομές 3, 4 και 9, 10 αντίστοιχα). Αυτό σημαίνει ότι η περιοχή πριν την αλληλουχία των αδενινών είναι απαραίτητη, αλλά μπορεί να έχει οποιαδήποτε αλληλουχία. Για να διαπιστωθεί ο ρόλος της δεξιάς αλληλουχίας των 23 bp, κατασκευάστηκε το τμήμα VD1M-As-R, όπου η περιοχή δεξιά της αλληλουχίας των αδενινών έχει αλληλουχία που επιλέχτηκε στην τύχη από το F γονιδίωμα του ίδιου είδους (συγκεκριμένα, ένα τμήμα του γονιδίου *Cytb*). Το υπόλοιπο του VD1M-As-R είναι πανομοιότυπο με το VD1-M₁₆₁₋₃₁₂. Όταν χρησιμοποιήθηκε ως ανιχνευτής σε πείραμα EMSA, το VD1M-As-R απέτυχε να δημιουργήσει σύμπλοκο (Εικόνα 3.16, διαδρομές 1 και 2), πράγμα το οποίο σημαίνει ότι η αλληλουχία του τμήματος 23 bp δεξιά της αλληλουχίας των αδενινών είναι πολύ σημαντική για το σχηματισμό του συμπλόκου και κατά πάσα πιθανότητα περιέχει το στοιχείο πρόσδεσης της συγκεκριμένης αλληλεπίδρασης.

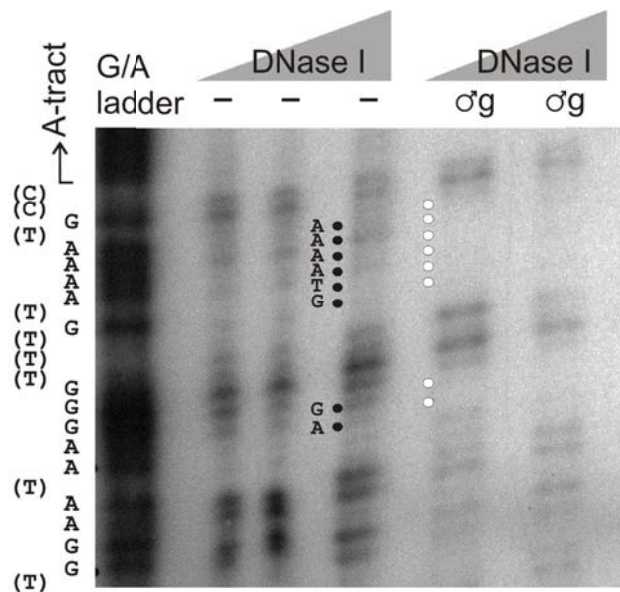


Εικόνα 3.16. Πειράματα μείωσης κινητικότητας συμπλόκου (EMSA) χρησιμοποιώντας εκχυλίσματα αρσενικής γονάδας και παραλλαγές του VD1-M₁₆₁₋₃₁₂ ως ανιχνευτές. Στο πάνω μέρος κάθε διαδρομής δίνεται η ταυτότητα του ανιχνευτή και η παρουσία (♂γ) ή απουσία (-) πρωτεϊνικού εκχυλίσματος αρσενικής γονάδας. Τα βέλη υποδεικνύουν τα σύμπλοκα που σχηματίζονται.

Από την άλλη, όταν χρησιμοποιήθηκε ανιχνευτής που περιείχε μόνο την αλληλουχία των αδενινών και την αλληλουχία δεξιά αυτών (ανιχνευτής VD1M₂₀₇₋₃₁₂, Πίνακας 3.1, Εικόνα 3.11) σε πείραμα EMSA, σύμπλοκο δε σχηματίστηκε (Εικόνα 3.16, διαδρομές 11 και 12). Αυτό σημαίνει ότι ναι μεν (α) η αλληλουχία δεξιά των αδενινών πιθανότατα περιέχει το στοιχείο πρόσδεσης και (β) η αλληλουχία των αδενινών είναι σημαντική για την αλληλεπίδραση, χωρίς όμως την ύπαρξη μιας οποιαδήποτε αλληλουχίας αριστερά των αδενινών, σύμπλοκο δεν μπορεί να σχηματιστεί.

Για τον περαιτέρω έλεγχο αυτής της υπόθεσης, αξιοποιήθηκε η μέθοδος του αποτυπώματος (DNase I footprinting DNA – Ενότητα 2.16.2), χρησιμοποιώντας τον ανιχνευτή VD1-M₁₆₁₋₃₁₂ και πρωτεϊνικό εκχύλισμα αρσενικής γονάδας. Παρατηρήθηκε σχηματισμός αποτυπώματος (Εικόνα 3.17) αμέσως μετά από την αλληλουχία πολλών αδενινών, εντός της

αλληλουχίας 23 bp. Επομένως, η αλληλουχία των 23 bp αποτελεί το στοιχείο πρόσδεσης της συγκεκριμένης αλληλεπίδρασης.



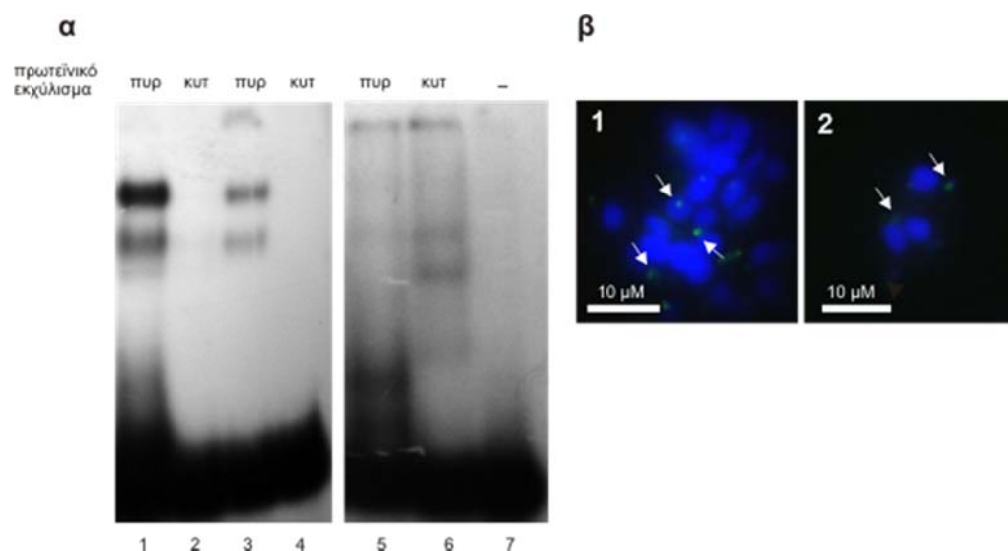
Εικόνα 3.17. Ανάλυση αποτυπώματος DNase I του ανιχνευτή VD1-M₁₆₁₋₃₁₂. Πέντε επίπεδα DNase I χρησιμοποιήθηκαν (10 ng στη διαδρομή 2, 20 ng στη διαδρομή 3, 40 ng διαδρομή 4, 400 ng στη διαδρομή 5 και 800 ng στη διαδρομή 6) απουσία (διαδρομές 2, 3, 4) ή παρουσία (διαδρομές 5 και 6) πρωτεϊνικού εκχυλίσματος από αρσενική γονάδα. Διαδρομή 1: μάρτυρας G/A. Στα αριστερά δίνονται τα νουκλεοτίδια της αλληλουχίας: εκτός παρένθεσης είναι νουκλεοτίδια αδενίνης και γουανίνης που αντιπροσωπεύονται από τις ζώνες του μάρτυρα G/A· εντός παρένθεσης είναι τα νουκλεοτίδια θυμίνης και κυτοσίνης που αντιστοιχούν στα κενά μεταξύ των ζωνών του μάρτυρα. Οι μαύρες κουκκίδες υποδεικνύουν τις ζώνες νουκλεοτιδίων στις διαδρομές 2, 3 και 4 που λείπουν από τις διαδρομές 5 και 6 (λευκές κουκκίδες) λόγω σχηματισμού του συμπλόκου.

Για να διερευνηθεί εάν αυτή η αλληλουχία είναι ικανή να σχηματίσει από μόνης της σύμπλοκο με πρωτεΐνες, κατασκευάστηκε ένα συνθετικό δίκλωνο ολιγονουκλεοτίδιο 25 bp (ανιχνευτής VD1-M₂₃₃₋₂₅₅, Πίνακας 3.1, Εικόνα 3.11) που περιείχε την αλληλουχία 23 bp και χρησιμοποιήθηκε αφενός ως ανιχνευτής και αφετέρου ως ανταγωνιστής σε πειράματα EMSA με εκχύλισμα αρσενικής γονάδας. Διαπιστώθηκε ότι σύμπλοκο δε σχηματίστηκε όταν χρησιμοποιήθηκε το VD1-M₂₃₃₋₂₅₅ ως ανιχνευτής (Εικόνα 3.12, διαδρομές 4 και 5). Επιπλέον, ο σχηματισμός συμπλόκου του ανιχνευτή VD1-M₁₆₁₋₃₁₂ με παράγοντες του εκχυλίσματος

δεν επηρεάστηκε από την προσθήκη του VD1-M₂₃₃₋₂₅₅ ως ανταγωνιστή (Εικόνα 3.12, διαδρομές 1, 2 και 3). Το αποτέλεσμα αυτό υποδηλώνει ότι το στοιχείο πρόσδεσης δεν είναι από μόνο του αρκετό για το σχηματισμό του συμπλόκου. Να σημειωθεί ότι δεν παρατηρήθηκε σχηματισμός αποτυπώματος στο τμήμα αριστερά της αλληλουχίας των αδενινών. Έτσι δικαιολογείται και το γεγονός ότι η αλληλουχία του τμήματος αυτού δεν παίζει ρόλο στο σχηματισμό του συμπλόκου, αρκεί η ύπαρξη ενός τμήματος στη συγκεκριμένη θέση, με οποιαδήποτε αλληλουχία.

3.4.1.5 Ο ιδιαίτερος ρόλος του πυρηνικού εκχύλισματος

Για να προσδιοριστεί η πηγή των πρωτεϊνικών παραγόντων που συμμετέχουν στην αλληλεπίδραση με τον ανιχνευτή VD1-M₁₆₁₋₃₁₂, χρησιμοποιήθηκε ξεχωριστά πυρηνικό και κυτταροπλασματικό εκχύλισμα από γονάδα αρσενικού ατόμου σε πειράματα EMSA. Είναι γνωστό ότι το σύνολο των μιτοχονδρίων βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα, συνεπώς αναμένεται οι πρωτεΐνες που συμμετέχουν στο σχηματισμό του συμπλόκου mtDNA/πρωτεΐνης, να προέρχονται από το κυτταρόπλασμα. Περιέργως, δεν παρατηρήθηκε μείωση κινητικότητας του ανιχνευτή VD1-M₁₆₁₋₃₁₂ όταν χρησιμοποιήθηκε το κυτταροπλασματικό εκχύλισμα, αλλά παρατηρήθηκε ισχυρή αλληλεπίδραση με το πυρηνικό εκχύλισμα (Εικόνα 3.18α). Για να αποκλειστεί η πιθανότητα τεχνικού προβλήματος με το κυτταροπλασματικό εκχύλισμα, αυτό χρησιμοποιήθηκε για EMSA σε συνδυασμό με τον ανιχνευτή CD-M₅₉₂₋₇₉₆ (Πίνακας 3.1 και Εικόνα 3.11), ο οποίος περιέχει στοιχεία που εμπλέκονται στην αντιγραφή και τη μεταγραφή του mtDNA (Cao et al. 2004a). Παρατηρήθηκε μείωση της κινητικότητας αυτού του ανιχνευτή (Εικόνα 3.18α, διαδρομή 6), προφανώς λόγω αντίδρασης κάποιας(ων) πρωτεΐνης(ών) με στοιχεία αντιγραφής και μεταγραφής. Η αντίδραση φαίνεται ότι ήταν ασθενής όταν αντί του κυτταροπλασματικού, χρησιμοποιήθηκε το πυρηνικό εκχύλισμα (Εικόνα 3.18α, διαδρομή 5). Φθορίζουσα χρώση του παρασκευάσματος πυρήνων πριν το βήμα της λύσης τους (βλέπε Ενότητα 2.18) αποκάλυψε την ύπαρξη υπολειπόμενων μιτοχονδρίων σε στενή γειτνίαση ή επαφή με τους πυρήνες (Εικόνα 3.18β1).



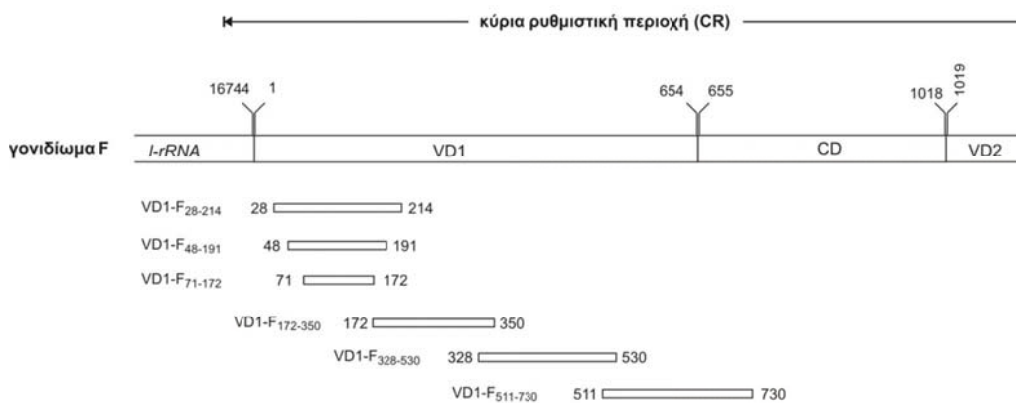
Εικόνα 3.18. Διερεύνηση του σχηματισμού συμπλόκου χρησιμοποιώντας πυρηνικά εκχυλίσματα αρσενικού ατόμου. **(α)** Αποτελέσματα EMSA χρησιμοποιώντας ως ανιχνευτή το $VD1-M_{161-312}$ (διαδρομές 1, 2, 3, 4) και ως ανιχνευτή ελέγχου το $CD-M_{592-796}$ (διαδρομές 5, 6, 7). Το $VD1-M_{161-312}$ επώαστηκε με πυρηνικό (πυρ) και κυτταροπλασματικό (κυτ) κλάσμα εκχυλίσματος γονάδας από δύο αρσενικά άτομα. Το $CD-M_{592-796}$ επώαστηκε με πυρηνικό (πυρ) και κυτταροπλασματικό (κυτ) κλάσμα εκχυλίσματος γονάδας από ένα αρσενικό άτομο. Η διαδρομή 7 είναι ο ελεύθερος ανιχνευτής. **(β)** Χρώση μιτοχονδρίων και πυρήνων. 1: χρώση του πυρηνικού εκχυλίσματος. 2: το υπερκείμενο του βήματος ξελύματος μετά τη χρώση (βλέπε [Ενότητα 2.18](#)).

Συμπεραίνεται λοιπόν ότι κατά την κυτταρική κλασμάτωση, οι πυρήνες απομονώνονται μαζί με υπολείμματα ενδοκυττάρων μεμβρανών (κυρίως του ενδοπλασματικού δικτύου), οι οποίες φέρουν προσκολλημένα μιτοχόνδρια (Soltys and Gupta 1992, Tang et al. 2007). Αξιοσημείωτο είναι επίσης το γεγονός ότι περιπυρηνικά (perinuclear) μιτοχόνδρια παρατηρούνται και στο υπερκείμενο του βήματος ξελύματος μετά τη χρώση (Εικόνα 3.18β2). Αυτό σημαίνει ότι η προσκόλληση αυτών των μιτοχονδρίων στις μεμβράνες που περιβάλλουν τον πυρήνα είναι αρκετά ισχυρή. Περιπτώσεις λειτουργιών πέραν της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης που αποδίδονται σε περιπυρηνικά μιτοχόνδρια έχουν περιγραφεί στη βιβλιογραφία (Park et al. 2001, Hashiatni et al. 2010). Στις περισσότερες από αυτές, τα περιπυρηνικά μιτοχόνδρια φαίνεται ότι εμπλέκονται στη μεταφορά κυτταρικού ασβεστίου σε διάφορα συστήματα θηλαστικών,

ενεργότητα που δεν παρατηρείται στα κυτταροπλασματικά μιτοχόνδρια (βλέπε Ενότητα 1.1.2.1.).

3.4.2 Αναζήτηση ύπαρξης περιοχής πρόσδεσης παραγόντων στο VD1 του γονιδιώματος F

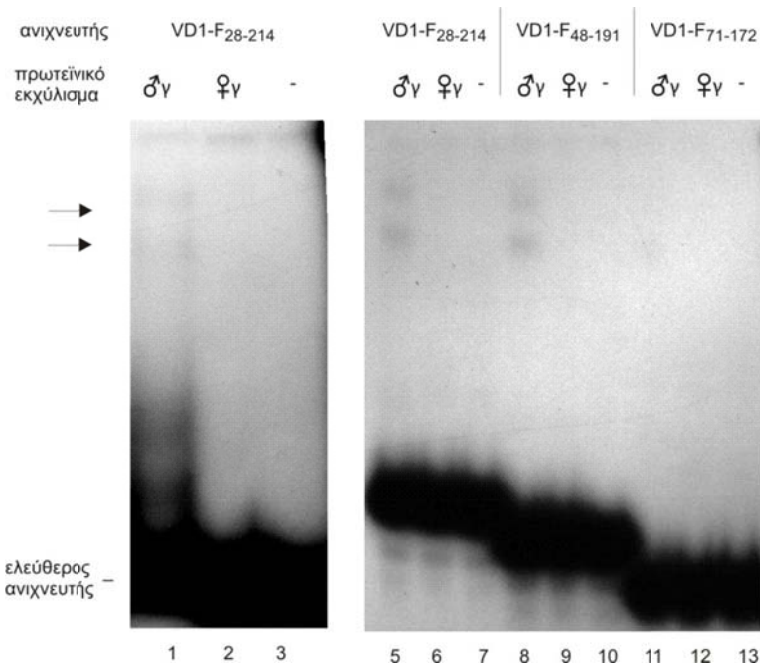
Εφόσον η υπόθεση, ότι το ORF που βρίσκεται στο VD1 του γονιδιώματος F παράγει κάποια πρωτεΐνη που εμπλέκεται στην κληρονόμηση αυτού, εξασθένησε με βάση τα πιο πάνω αποτελέσματα, αναζητήθηκε κάποια περιοχή που, όπως στο γονιδίωμα M, να αποτελεί θέση πρόσδεσης κάποιου παράγοντα. Σε αντίθεση με το VD1 του γονιδιώματος M, δεν υπάρχει κάποια ένδειξη από τη βιβλιογραφία ούτε προκύπτει από στοίχιση και μελέτη αλληλουχιών, η συγκεκριμένη θέση μιας τέτοιας περιοχής στο VD1 του F. Για αυτό το λόγο, κατασκευάστηκαν τέσσερις ανιχνευτές που καλύπτουν το σύνολο της αλληλουχίας του VD1 του F: VD1-F₂₈₋₂₁₄, VD1-F₁₇₂₋₃₅₀, VD1-F₃₂₈₋₅₃₀ και VD1-F₅₁₁₋₇₃₀ (Πίνακας 3.1, Εικόνα 3.19).



Εικόνα 3.19. Η κύρια ρυθμιστική περιοχή (CR) του μητρικά κληρονομούμενου μιτοχondριακού γονιδιώματος (F) του *M. galloprovincialis* και ανιχνευτές που χρησιμοποιήθηκαν σε πειράματα μείωσης κινητικότητας συμπλόκου (EMSA). Οι αριθμοί υποδεικνύουν θέσεις νουκλεοτιδίων σύμφωνα με το σχολιασμό από τους *Mizi et al. (2005)*. Το μήκος των ανιχνευτών συνάγεται από τους αριθμούς – νουκλεοτιδικές θέσεις στα δύο άκρα. Τα ορθογώνια παραλληλόγραμμα κάτω από τα VD1 και CD αντιπροσωπεύουν τους ανιχνευτές που χρησιμοποιήθηκαν σε πειράματα EMSA.

Οι ανιχνευτές αυτοί χρησιμοποιήθηκαν σε πειράματα EMSA με εκχυλίσματα αρσενικής και θηλυκής γονάδας. Από τους τέσσερις ανιχνευτές, μόνο ο πρώτος παρουσίασε φυλο-εδική αλληλεπίδραση, εφόσον σχημάτισε σύμπλοκο, παρότι αρκετά ασθενές, με κάποιον (ή κάποιους) παράγοντα(ες) μόνο του εκχυλίσματος αρσενικής γονάδας και όχι της θηλυκής (Εικόνα 3.20, διαδρομές 1 και 2).

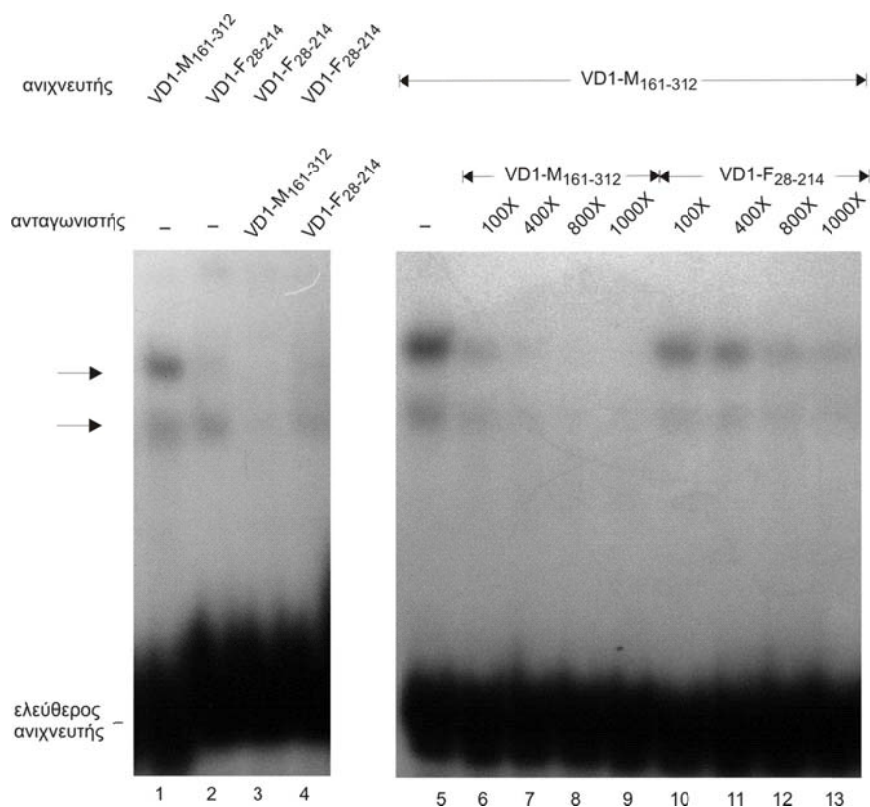
Για τον εντοπισμό μικρότερου τμήματος του VD1-F₂₈₋₂₁₄ που μπορεί να αλληλεπιδράσει με παράγοντα/παράγοντες του εκχυλίσματος αρσενικής γονάδας, κατασκευάστηκαν ανιχνευτές «αφαιρώντας» διαδοχικά περίπου 20 bp από κάθε άκρο του VD1-F₂₈₋₂₁₄. Οι ανιχνευτές αυτοί (VD1-F₄₈₋₁₉₁, VD1-F₇₁₋₁₇₂, Πίνακας 3.1, Εικόνα 3.19) υποβλήθηκαν σε πείραμα EMSA με πρωτεϊνικό εκχύλισμα αρσενικής και θηλυκής γονάδας. Το πείραμα (Εικόνα 3.20) υπέδειξε το VD1-F₄₈₋₁₉₁ ως το μικρότερο τμήμα του VD1-F₂₈₋₂₁₄ που ομοίως με αυτό, σχηματίζει σύμπλοκο με πρωτεΐνες εκχυλίσματος αρσενικής γονάδας (Εικόνα 3.20, διαδρομή 8).



Εικόνα 3.20. Πειράματα μείωσης κινητικότητας συμπλόκου (EMSA) χρησιμοποιώντας ως ανιχνευτές το τμήμα VD1-F₂₈₋₂₁₄ και υπο-περιοχές του, με πρωτεϊνικά εκχυλίσματα από αρσενική (♂) και θηλυκή (♀) γονάδα. Στο πάνω μέρος δίνεται η ταυτότητα του ανιχνευτή που χρησιμοποιήθηκε σε κάθε διαδρομή, καθώς και η παρουσία (♂ ή ♀) ή απουσία (-) πρωτεϊνικού εκχυλίσματος. Σε όλες τις περιπτώσεις, η κατώτερη ζώνη είναι ο ελεύθερος ανιχνευτής, ενώ τα βέλη υποδεικνύουν τη μείωση κινητικότητας του ανιχνευτή λόγω σχηματισμού του συμπλόκου ανιχνευτή/πρωτεΐνης.

Η μικρή ένταση του συμπλόκου που σχηματίζεται με τον ανιχνευτή VD1-F₂₈₋₂₁₄ σε σχέση και με την ένταση του συμπλόκου που σχηματίζεται με τον ανιχνευτή VD1-M₁₆₁₋₃₁₂ (Εικόνα 3.21, διαδρομές 1 και 2), καθώς και η σχετικά κακή επαναληψιμότητα αυτού του αποτελέσματος, εφόσον το σύμπλοκο άλλοτε σχηματιζόταν και άλλοτε όχι, δημιούργησαν προβληματισμό σχετικά με τη σταθερότητά του αλλά και τον *in vivo* σχηματισμό του.

Για το λόγο αυτό, διεξήχθησαν πειράματα EMSA ανταγωνισμού, χρησιμοποιώντας ως ανιχνευτές αλλά και ως μη-σημασμένους ανταγωνιστές, τα τμήματα VD1-F₂₈₋₂₁₄ και VD1-M₁₆₁₋₃₁₂, με εκχύλισμα γονάδας αρσενικού ατόμου (Εικόνα 3.21). Παρατηρήθηκε ότι ο μη-σημασμένος ανταγωνιστής VD1-M₁₆₁₋₃₁₂ «έκλεβε» με μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα τις πρωτεΐνες του συμπλόκου με τον ανιχνευτή VD1-F₂₈₋₂₁₄, παρά ο μη-σημασμένος εαυτός του (δηλ. το ίδιο το VD1-F₂₈₋₂₁₄ ως ανταγωνιστής). Με άλλα λόγια, παρουσία του ανταγωνιστή VD1-M₁₆₁₋₃₁₂, το σύμπλοκο με τον ανιχνευτή VD1-F₂₈₋₂₁₄, δεν σχηματιζόταν σχεδόν καθόλου (Εικόνα 3.21, διαδρομή 3), ενώ παρουσία μη-σημασμένου ανταγωνιστή VD1-F₂₈₋₂₁₄, το σύμπλοκο με τον ανιχνευτή VD1-F₂₈₋₂₁₄ σχηματιζόταν, απλά σε μικρότερο βαθμό (Εικόνα 3.21, διαδρομή 4). Στην πράξη, αυτό σημαίνει ότι η ειδικότητα του VD1-M₁₆₁₋₃₁₂ προς τις πρωτεΐνες του συμπλόκου του VD1-F₂₈₋₂₁₄, είναι μεγαλύτερη από ότι η ειδικότητα του ίδιου του VD1-F₂₈₋₂₁₄ προς τις πρωτεΐνες του συμπλόκου που σχηματίζει. Το αντίθετο συνέβη όταν χρησιμοποιήθηκε ως ανιχνευτής το τμήμα VD1-M₁₆₁₋₃₁₂. Στην περίπτωση αυτή, η ύπαρξη του μη-σημασμένου ανταγωνιστή VD1-M₁₆₁₋₃₁₂ (του εαυτού του δηλαδή) οδήγησε σε μείωση της έντασης του συμπλόκου, ήδη από χαμηλές συγκεντρώσεις ανταγωνιστή (Εικόνα 3.21, διαδρομές 5 έως 9). Από την άλλη, η χρήση του μη-σημασμένου ανταγωνιστή VD1-F₂₈₋₂₁₄ δεν είχε το ίδιο αποτέλεσμα, καθότι η μείωση της έντασης του συμπλόκου παρατηρήθηκε πιο αισθητά σε μεγάλες συγκεντρώσεις ανταγωνιστή (Εικόνα 3.21, διαδρομές 10 έως 13). Αυτό σημαίνει ότι η ειδικότητα του VD1-M₁₆₁₋₃₁₂ ως προς τις πρωτεΐνες του συμπλόκου που το ίδιο σχηματίζει είναι μεγαλύτερη από την ειδικότητα του VD1-F₂₈₋₂₁₄ ως προς τις πρωτεΐνες του συμπλόκου αυτού, που είναι άλλωστε, λογικό.



Εικόνα 3.21. Πειράματα μείωσης κινητικότητας συμπλόκου (EMSA) ανταγωνισμού, χρησιμοποιώντας ως ανιχνευτή το τμήμα $VD1-M_{161-312}$ καθώς και το $VD1-F_{28-214}$ με πρωτεϊνικό εκχύλισμα από αρσενική γονάδα. Στις διαδρομές 1, 2 και 5, δεν χρησιμοποιήθηκε ανταγωνιστής. Στις διαδρομές 3 και 4 χρησιμοποιήθηκε ως ανταγωνιστής, μη σημασμένο $VD1-M_{161-312}$ και $VD1-F_{28-214}$, αντίστοιχα, έναντι του σημασμένου ανιχνευτή $VD1-F_{28-214}$. Στις διαδρομές 6 έως 9, χρησιμοποιήθηκε ο μη σημασμένος ανταγωνιστής $VD1-M_{161-312}$ σε αυξανόμενα πολλαπλάσια της ποσότητας του σημασμένου ανιχνευτή $VD1-M_{161-312}$. Στις διαδρομές 10 έως 13, χρησιμοποιήθηκε ο μη σημασμένος ανταγωνιστής $VD1-F_{28-214}$ σε αυξανόμενα πολλαπλάσια της ποσότητας του σημασμένου ανιχνευτή $VD1-M_{161-312}$. Σε όλες τις περιπτώσεις, η κατώτερη ζώνη είναι ο ανιχνευτής, ενώ τα βέλη υποδεικνύουν τη μείωση κινητικότητας του ανιχνευτή λόγω σχηματισμού του συμπλόκου ανιχνευτή/πρωτεΐνης.

3.5 Αρχικές προσπάθειες χαρακτηρισμού παράγοντα που εμπλέκεται στο σύμπλοκο με το $VD1-M_{161-312}$.

Ως μια πρώτη προσπάθεια χαρακτηρισμού πρωτεϊνικού παράγοντα που εμπλέκεται στο σχηματισμό συμπλόκου με το $VD1-M_{161-312}$, αναζητήθηκε κάποιο γνωστό μοτίβο πρόσδεσης πρωτεϊνικών παραγόντων στο στοιχείο πρόσδεσης που εντοπίστηκε. Για το σκοπό αυτό,

χρησιμοποιήθηκε το διαδικτυακό λογισμικό ConSite (Sandelin et al. 2004). Πρόκειται για ένα εύχρηστο και ελεύθερα διαθέσιμο εργαλείο για την εύρεση ρυθμιστικών στοιχείων σε γονιδιωματικές αλληλουχίες, το οποίο βρίσκεται στην ηλεκτρονική διεύθυνση: <http://consite.genereg.net/cgi-bin/consite> (χρησιμοποιήθηκε η επιλογή «Analyze single sequence»). Ως αλληλουχία εισόδου χρησιμοποιήθηκε η αλληλουχία του τμήματος VD1-M₂₃₃₋₂₅₅ (Εικόνα 3.22α), που περιλαμβάνει το στοιχείο πρόσδεσης που εντοπίστηκε με τη μέθοδο του αποτυπώματος, αλλά είναι και λίγο ευρύτερη (συνολικά 25 bp). Επιλέγοντας το «Analyze the sequence with all TFs», το ConSite πράγματι αναγνώρισε αλληλουχίες στο τμήμα DNA που εισάγαμε, οι οποίες αποτελούν θέσεις πρόσδεσης πρωτεϊνικών παραγόντων (Εικόνα 3.22β). Συγκεκριμένα, εντόπισε έξι πρωτεϊνικούς παράγοντες που θα μπορούσαν να προσδένονται στο VD1-M₂₃₃₋₂₅₅.

Παρατηρώντας λεπτομερέστερα τα χαρακτηριστικά των παραγόντων αυτών (Εικόνα 3.22γ), διαπιστώθηκε ότι 3 από τους 6 αυτούς παράγοντες (HFH-1, FREAC-2, FREAC-4) ανήκουν στην τάξη των Forkhead πρωτεϊνών. Μάλιστα, οι υπόλοιποι παράγοντες έδωσαν, συγκριτικά, τις μικρότερες τιμές στο ConSite (Sox-5: 6,624, E74A: 5,756, Snail: 6,063). Ενδεικτικά οι τιμές των παραγόντων της τάξης Forkhead: HFH-1: 11,076, FREAC-2: 8,961, FREAC-4: 9,412. Συγκρίνοντας, λοιπόν, τις αλληλουχίες που αναγνωρίζουν οι τρεις Forkhead παράγοντες με την αλληλουχία VD1-M₂₃₃₋₂₅₅ (Εικόνα 3.22δ), διαπιστώθηκαν σημαντικές ομοιότητες. Μεγάλη ομοιότητα παρουσιάζει και η συναινετική αλληλουχία των παραγόντων Forkhead. Βέβαια, όπως φαίνεται και στην Εικόνα 3.22γ, οι τρεις παράγοντες Forkhead που έδωσε ως αποτέλεσμα το ConSite, δεν είναι από το είδος *Mytilus*, ούτε από κάποιο άλλο δίθυρο μαλάκιο, αλλά είναι από τον αρουραίο και τον άνθρωπο. Αναζητήθηκε επομένως στη βιβλιογραφία κάποια αναφορά σε πρωτεΐνες Forkhead σε *Mytilus* ή σε οποιοδήποτε μαλάκιο. Για το γένος *Mytilus*, δεν υπάρχει κάποια τέτοια αναφορά. Βρέθηκε όμως αναφορά σε πρωτεΐνη Forkhead στο χτένι *Chlamys farreri* (Liu et al. 2012) και στο στρείδι *Crassostrea gigas* (Naimi et al. 2009), τα οποία είναι δίθυρα μαλάκια, χωρίς όμως ΔΜΚ. Και οι δύο αυτές δημοσιεύσεις περιγράφουν τον εντοπισμό ενός ορθολόγου της πρωτεΐνης Foxl2 σε κάθε ένα από αυτά τα είδη αντίστοιχα.

Η πρωτεΐνη Foxl2 είναι μέλος της οικογένειας των πρωτεϊνών Forkhead (forkhead box/winged helix family). Οι πρωτεΐνες Forkhead (πρωτεΐνες Forkhead box ή πρωτεΐνες Fox) είναι μια οικογένεια μεταγραφικών παραγόντων που πήραν το όνομά τους από το σχήμα της περιοχής πρόσδεσης DNA που διαθέτουν. Συγκεκριμένα, πρόκειται για μια ακολουθία 80 έως 100 αμινοξέων που σχηματίζουν ένα μοτίβο τύπου έλικας-στροφής-έλικας, που χρησιμεύει για την πρόσδεση στο DNA. Το *Foxl2* (Forkhead box l2) είναι ένα από τα πιο συντηρητικά γονίδια που εμπλέκεται στα πρώιμα γεγονότα των διαδοχικών αντιδράσεων που οδηγούν στον καθορισμό του φύλου ή στη διαφοροποίηση ωοθηκών σε διάφορα σπονδυλόζωα. Σε πολλά σπονδυλόζωα με συστήματα φυλοκαθορισμού, όπως ο ποντικός (Crisponi et al. 2001, Loffler et al. 2003), το ψάρι *Oreochromis niloticus* (Wang et al. 2004), η χελώνα *Trachemys scripta* (Loffler et al. 2003) και η κότα (Govoroun et al. 2004), το *Foxl2* εκφράζεται σε εμβρυονικά σωματικά κύτταρα των ωοθηκών και η έκφρασή του διατηρείται και στις ώριμες ωοθήκες στα περισσότερα είδη.

Στα ασπόνδυλα ο ρόλος του *Foxl2* δεν είναι πολύ σαφής. Στο χτένι *Chlamys farreri*, το οποίο είναι δίθυρο μαλάκιο, αλλά χωρίς ΔΜΚ, εντοπίστηκε και μελετήθηκε το γονίδιο *Cf-foxl2* και ανιχνεύτηκε η έκφρασή του κατά τη γαμετογένεση (Liu et al. 2012). Με πειράματα *in situ* υβριδοποίησης, οι συγγραφείς εντόπισαν μετάγραφα του *Cf-foxl2* σε ωογόνια και ωοκύτταρα κατά την ωογένεση και σε σπερματογόνια και σπερματίδες κατά τη σπερματογένεση. Δεν παρατηρήθηκε έκφραση σε ώριμα σπερματοζώαρια. Επίσης, στο κυτταρόπλασμα των θυλακοκυττάρων της θηλυκής αλλά και αρσενικής γονάδας παρατηρήθηκε εντονότερη έκφραση από ότι στα γαμετικά κύτταρα. Στο στρείδι *Crassostrea gigas*, το οποίο είναι και αυτό δίθυρο μαλάκιο χωρίς ΔΜΚ, εντοπίστηκε και χαρακτηρίστηκε το γονίδιο *Gg-Foxl2* (Naimi et al. 2009). Χρησιμοποιώντας ίδιες τεχνικές με τους προηγούμενους συγγραφείς, οι Naimi et al. (2009), παρατήρησαν έκφραση του *Gg-Foxl2* κατά τη μείωση στις γονάδες των αρσενικών και κατά τη πρώιμη λεκιθογένεση στις γονάδες των θηλυκών ατόμων. Επίσης παρατήρησαν έκφραση σε σπερματογόνια και σε σωματικά κύτταρα που τα περιβάλλουν. Η υψηλή έκφραση γονιδίου *Foxl2* σε αρσενικές γονάδες έρχεται σε αντίθεση με αποτελέσματα σε άλλα είδη όπου η έκφραση του *Foxl2* είναι περίπου δύο

έως εκατό φορές υψηλότερη σε ώριμες ωθήκες από ότι σε ώριμες γονάδες (Govoroun et al. 2004, Alam et al. 2008, Oshima et al. 2008). Συνεπώς, το *Foxl2* στο είδος *Crassostrea gigas* διαθέτει μια νέα λειτουργία, καθώς συμμετέχει στην ωρίμανση των αρσενικών γονάδων. Ίσως αυτό να ισχύει γενικότερα στα δίθυρα μαλάκια.

Κατόπιν αυτής της σκέψης, αποφασίστηκε να διερευνηθεί αν και το μύδι διαθέτει γονίδιο *Foxl2* στο πυρηνικό του γονιδίωμα. Για το σκοπό αυτό, χρησιμοποιήθηκαν οι εκφυλισμένοι εκκινητές Foxl2_F, Foxl2_R (Πίνακας 2.5), οι οποίοι σχεδιάστηκαν από τους Liu et al. (2012) ώστε να στοχεύουν ένα μέρος της συντηρητικής περιοχής forkhead box που διαθέτουν από κοινού όλες οι κατατεθειμένες αλληλουχίες γονιδίων Foxl2 διαφόρων ειδών. Με τους εκκινητές αυτούς πραγματοποιήθηκε PCR με υπόστρωμα ολικό DNA από πόδι μυδιού. Το προϊόν της αντίδρασης, που όπως αναμενόταν (λόγω του μεγέθους της περιοχής αυτής σε άλλα είδη), ήταν μεταξύ 100-150 bp, κλωνοποιήθηκε και εστάλη για αλληλούχηση. Η αλληλουχία 149 bp που προέκυψε (Εικόνα 3.23α), όντως αποτελεί μέρος μιας περιοχής forkhead box, όπως φαίνεται από στοιχίσεις με την αντίστοιχη αλληλουχία του γονιδίου *Foxl2* του *Chlamys farreri* και του *Crassostrea gigas* (Εικόνα 3.23β).

Σημαντικές ομοιότητες παρατηρούνται και κατά τη σύγκριση της αλληλουχίας 49 αμινοξέων που προκύπτει από τη μετάφραση της αλληλουχίας του *Mytilus* βάσει του τυπικού (Standard) γενετικού κώδικα (Εικόνα 3.23γ), με τις αντίστοιχες αμινοξικές αλληλουχίες των *Chlamys farreri* και του *Crassostrea gigas* (Εικόνα 3.23δ). Γενικότερα, διεξάγοντας μια αναζήτηση με τον αλγόριθμο BLAST, χρησιμοποιώντας ως αλληλουχία εισόδου, είτε την νουκλεοτιδική είτε την αμινοξική αλληλουχία του τμήματος forkhead box του *Mytilus*, προκύπτουν ως οι πλέον ομοιάζουσες αλληλουχίες, μια πολύ μεγάλη λίστα αλληλουχιών της περιοχής forkhead box από γονίδιο Foxl2 σε διάφορα είδη. Όλα αυτά τα δεδομένα μας οδηγούν στο συμπέρασμα ότι κατά πάσα πιθανότητα η αλληλουχία DNA που βρέθηκε αποτελεί πράγματι ένα τμήμα του γονιδίου Foxl2 του *Mytilus galloprovincialis*.

Αρχικές προσπάθειες που πραγματοποιήθηκαν για την εύρεση του μεταγράφου του γονιδίου Foxl2 στο *Mytilus galloprovincialis*, δεν έχουν ακόμη δώσει κάποιο αποτέλεσμα.

4. Γενικά Συμπεράσματα

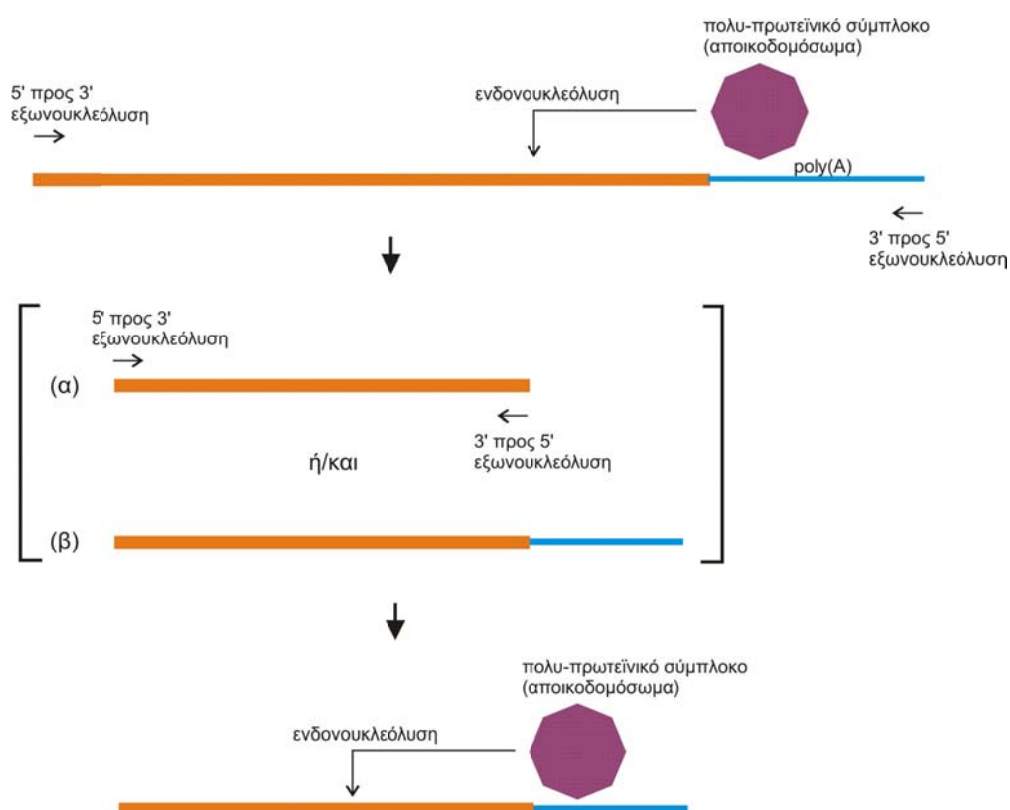
Το φαινόμενο της Διπλής Μονογονεϊκής Κληρονομικότητας (ΔΜΚ), που αποτελεί εξαίρεση του γενικού κανόνα της μητρικής κληρονομιάς του μιτοχονδριακού DNA των μεταζώων, δημιουργεί αρκετά ερωτήματα τα οποία δεν έχουν ακόμη διαλευκανθεί. Ένα από τα σημαντικότερα ερωτήματα, αφορά στον ιδιαίτερο τρόπο μεταβίβασης του μιτοχονδριακού DNA στα αρσενικά άτομα. Σε αυτά, το mtDNA του αυγού (μητρικός τύπος – F) μεταβιβάζεται σε όλους τους ιστούς, αλλά δεν απαντάται στο ώριμο σπέρμα, όπου ανιχνεύεται μόνο το mtDNA του σπερματοζωαρίου (πατρικός τύπος – M) από το οποίο προέκυψε το ζυγωτό. Κατά συνέπεια, η γονάδα του αρσενικού ατόμου μπορεί να περιλαμβάνει τόσο γονιδίωμα F όσο και M, αλλά το σπέρμα του περιέχει κατ'αποκλειστικότητα mtDNA τύπου M. Στην παρούσα διδακτορική διατριβή αναζητήθηκε ο τρόπος με τον οποίο γίνεται ο αποκλεισμός του γονιδιώματος F από το σπέρμα και η μεταβίβαση μόνο του M, μέσω εύρεσης και μελέτης αλληλουχιών στα γονιδιώματα F και M του είδους *Mytilus galloprovincialis*, που σχετίζονται με την κληρονομιά τους. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία (βλέπε [Ενότητα 3.1](#)), η επικρατέστερη περιοχή των δύο γονιδιωμάτων στην οποία θα μπορούσαν να εδράζονται τέτοιες αλληλουχίες, είναι η πρώτη μεταβλητή περιοχή (VD1) της κύριας ρυθμιστικής περιοχής (CR).

4.1. “Αποικοδομώσωμα” (degradosome) στα μιτοχόνδρια του *Mytilus*

Από τη μελέτη των μεταγράφων της κύριας ρυθμιστικής περιοχής, των γονιδίων *l-rRNA* και *s-rRNA*, καθώς και μερικών tRNA, και χρησιμοποιώντας δεδομένα από τη βιβλιογραφία ([Ενότητα 1.2.2.2](#)), μπορεί να προταθεί η ακόλουθη αλληλουχία γεγονότων.

Η μεταγραφή της βαριάς αλυσίδας των γονιδιωμάτων F και M ξεκινάει περίπου στο τέλος της συντηρητικής περιοχής (CD) του CR και προχωράει προς τα δεξιά. Αφού ολοκληρωθεί η μεταγραφή όλου του

μιτοχονδριακού DNA (συμπεριλαμβανομένης και της κύριας ρυθμιστικής περιοχής), τα tRNA του πολυσιστρονικού μεταγράφου αναδιπλώνονται στη χαρακτηριστική τους τριτοταγή δομή και αποκόπτονται από το μετάγραφο, απελευθερώνοντας έτσι τα mRNA και rRNA των γονιδίων. Σε περιπτώσεις που ανάμεσα σε δύο γονίδια δεν υπάρχει tRNA, είτε θα υπάρχει κάποια αλληλουχία που σχηματίζει μια δομή που μοιάζει με tRNA, οπότε αυτή αναδιπλώνεται και οδηγεί σε τομή που απελευθερώνει τα mRNA των γονιδίων είτε θα σχηματιστεί ένα δισιστρικό mRNA (Ojala et al. 1981, Chatzoglou et al. 2013). Παράλληλα, απελευθερώνονται και τμήματα του μεταγράφου που αντιστοιχούν σε ρυθμιστικές περιοχές του μορίου, όπως το CR. Αυτά τα RNA τμήματα, δεν έχουν κάποιο προφανή λειτουργικό ρόλο, επομένως πρέπει να αποικοδομηθούν. Για να γίνει αυτό, αρχικά πραγματοποιείται πολυαδενυλίωσή τους, η οποία λειτουργεί ως μια «επισήμανση» που θα προσελκύσει το «αποικοδομώσωμα» (degradosome). Όπως αναφέρθηκε και στην Ενότητα 1.2.2.2, το αποικοδομώσωμα είναι ένα σύμπλοκο ενζύμων, το οποίο χρησιμεύει για την αποικοδόμηση του RNA και έχει εντοπιστεί σε διάφορα είδη ευκαρυωτικών και προκαρυωτικών οργανισμών καθώς και σε μιτοχόνδρια. Η σύσταση υπομονάδων του αποικοδομοσώματος δεν είναι συντηρητική, αλλά τα βασικά συστατικά φαίνεται ότι είναι: μια RNA ελικάση, μια πολυνουκλεοτιδική φωσφορυλάση, μια 3' → 5' εξωνουκλεάση και μια ριβονουκλεάση (O'Hara et al. 1995, Coburn et al. 1999, Bobrowicz et al. 2008). Η διαδικασία αποικοδόμησης έχει ως εξής: στο πολυαδενυλιωμένο μετάγραφο προσδένεται το αποικοδομώσωμα. Αυτό κόβει ενδονουκλεολυτικά το μετάγραφο. Το προκύψαν τμήμα αποικοδομείται εξωνουκλεολυτικά ή πολυαδενυλιώνεται εκ νέου και έπειτα ξεκινάει νέος κύκλος ενδονουκλεολυτικής πέψης και εξωνουκλεολυτικής αποικοδόμησης (Εικόνα 4.1). Με αυτόν τον τρόπο εξηγείται και η εύρεση κομμένων σε διάφορα σημεία, πολυαδενυλιωμένων μεταγράφων του CR, τόσο του γονιδιώματος F όσο και του M, που βρέθηκαν στην παρούσα μελέτη. Επίσης, έτσι εξηγείται ο εντοπισμός κομμένων, πολυαδενυλιωμένων ή μη rRNA μεταγράφων, καθώς και πολυαδενυλιωμένων μετά το CCA tRNA. Είναι λογικό ότι η poly(A) ουρά εμποδίζει την πρόσδεση του αμινοξέος στο CCA του tRNA, επομένως η ύπαρξή της μαρτυρεί ότι το συγκεκριμένο tRNA είναι μη λειτουργικό και συνεπώς πρέπει να αποικοδομηθεί.



Εικόνα 4.1. Αποικοδόμηση RNA μεταγράφου. Το αποικοδομώσωμα (*degradosome*) προσδένεται στο μετάγραφο και το κόβει ενδονουκλεολιτικά. Τα τμήματα που προκύπτουν ή θα αποικοδομηθούν εξωνουκλεολιτικά, ή θα πολυαδενυλιωθούν εκ νέου, ώστε να ξεκινήσει νέος κύκλος ενδονουκλεολιτικής πέψης από το αποικοδομώσωμα και εξωνουκλεολιτικής αποικοδόμησης.

4.2 Εξεταση της πιθανότητας ύπαρξης ανοιχτού πλαισίου ανάγνωσης (ORF) στο VD1

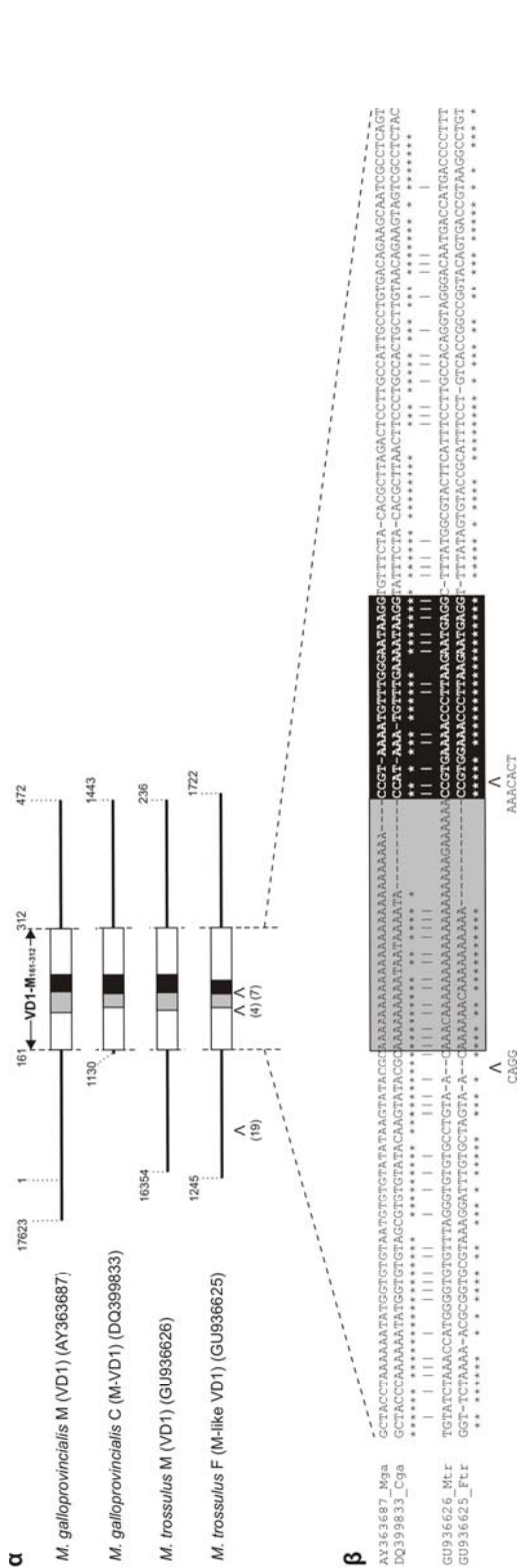
Στο VD1 τόσο του γονιδιώματος F όσο και του M έχει εντοπιστεί ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης (ORF) το οποίο πιθανολογείται ότι εκφράζεται και ότι σχετίζεται με την κληρονομία του γονιδιώματος F και του M (Hoffman et al. 1992, Breton et al. 2011a και Milani et al. 2013, αντίστοιχα). Ωστόσο, σε καμία από τις δύο περιπτώσεις δεν έχει εντοπιστεί ούτε το mRNA, ούτε και η πρωτεΐνη που κωδικοποιούν τα ORF αυτά. Οι ενδείξεις για τη λειτουργικότητά τους προέρχονται κυρίως από *in silico* αναλύσεις (βλέπε Ενότητα 3.2). Η εύρεση, στην παρούσα μελέτη: (α) πολυαδενυλιωμένων μεταγράφων σε γονάδα θηλυκού και αρσενικού ατόμου που περιλαμβάνουν ολόκληρο το ORF ή και τμήματά του, αλλά

έχουν πολύ διαφορετικά σημεία πολυαδενυλίωσης, κανένα από τα οποία δεν αντιστοιχεί στο 3' άκρο του ORF, και (β) παρόμοιων μεταγράφων σε σωματικό ιστό, στον οποίο τα ORF αυτά δεν έχουν κανένα λόγο να εκφράζονται, εξασθενούν την υπόθεση ότι τα ORF αυτά είναι πράγματι λειτουργικά γονίδια.

4.3 Εξέταση της πιθανότητας ύπαρξης αλληλουχιών πρόσδεσης πρωτεϊνικών παραγόντων στο VD1

Στα πλαίσια της παρούσας διατριβής, όπως περιγράφεται στην **Ενότητα 3.4.1.**, βρέθηκε ένα τμήμα (VD1₁₆₁₋₃₁₂) στην πρώτη μεταβλητή περιοχή (VD1) της κύριας ρυθμιστικής περιοχής (CR) του πατρικά κληρονομούμενου γονιδιώματος (M), το οποίο σχηματίζει σύμπλοκο με παράγοντες του πρωτεϊνικού εκχυλίσματος αρσενικής γονάδας, αλλά όχι θηλυκής γονάδας ή αρσενικού ή θηλυκού σωματικού ιστού. Συγκεκριμένα, απεδείχθη ότι ένα στοιχείο πρόσδεσης 23 bp εντός του τμήματος αυτού είναι απαραίτητο για το σχηματισμό του συμπλόκου· ότι μια αλληλουχία πολλών αδενινών στα αριστερά του στοιχείου πρόσδεσης προκαλεί κάμψη στο DNA, η οποία απαιτείται για το σχηματισμό του συμπλόκου· και ότι μια περιοχή 27 bp - που μπορεί να έχει οποιαδήποτε αλληλουχία – στα αριστερά της αλληλουχίας των αδενινών είναι επίσης σημαντική. Το τμήμα αυτό (27 bp + αλληλουχία αδενινών + στοιχείο πρόσδεσης 23 bp), είναι, με βάση τα ευρήματα της παρούσας μελέτης, κατά πάσα πιθανότητα απαραίτητο για την πατρική κληρονόμηση του γονιδιώματος M και γι' αυτό το λόγο θα αναφέρεται από εδώ και στο εξής ως STE (Sperm Transmission Element – στοιχείο μεταβίβασης μέσω σπέρματος). Εάν πράγματι ισχύει κάτι τέτοιο, τότε το STE αναμένεται να υπάρχει σε όλα τα πατρικά κληρονομούμενα γονιδιώματα του *Mytilus galloprovincialis*, αλλά και του αδελφού του είδους *Mytilus edulis*, καθώς και σε άλλα πολύ συγγενικά είδη. Πράγματι, το STE υπάρχει και στα πέντε πλήρως αλληλουχημένα γονιδιώματα M των ειδών *M. edulis*/*M. galloprovincialis* που είναι κατατεθειμένα στη GenBank, καθώς και στο γονιδίωμα C του *M. galloprovincialis*, το οποίο είναι επίσης πατρικά κληρονομούμενο (**Εικόνα 4.2α**). Η πρωτοταγής αλληλουχία του γονιδιώματος αυτού είναι σχεδόν πανομοιότυπη με το μητρικά κληρονομούμενο γονιδίωμα (γονιδίωμα F

του *M. galloprovincialis*), εκτός από την κύρια ρυθμιστική περιοχή του που περιέχει αλληλουχίες τύπου M (Venetis et al. 2007).



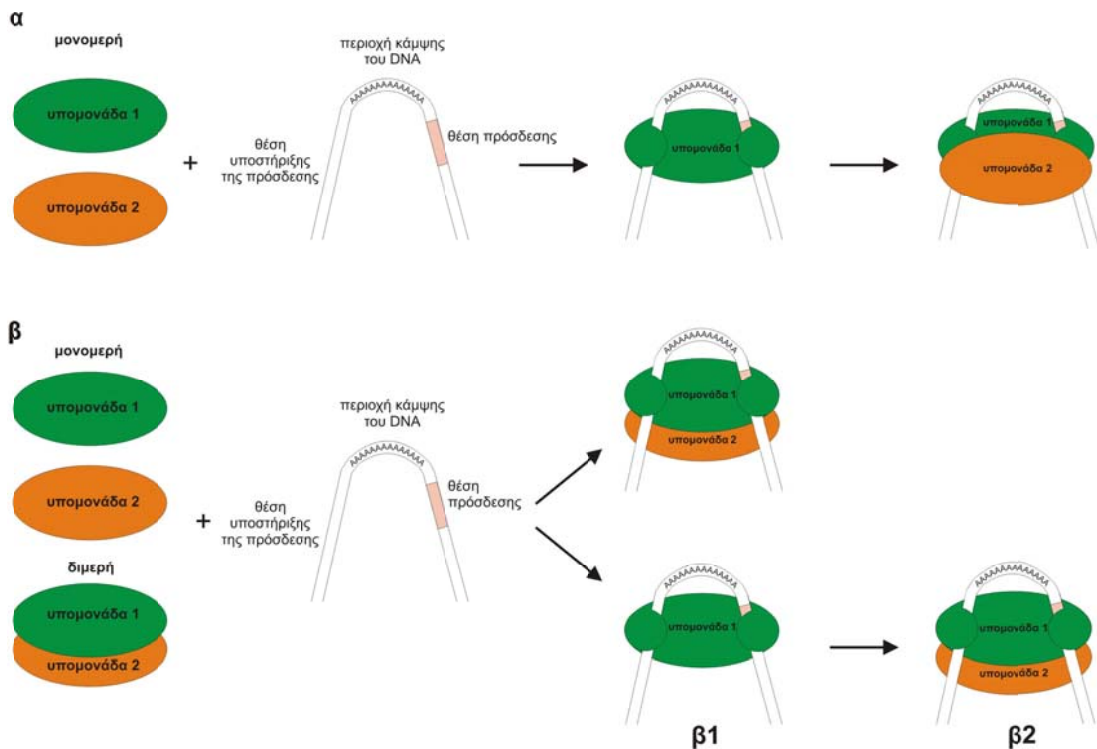
Εικόνα 4.2. Η πρωτοταγής δομή του VD1 τύπου *M.* (α) Σχηματική αναπαράσταση της περιοχής VD1 από τέσσερα τυπικά γονιδιώματα: το *M* του *M. galloprovincialis*, το *C* του *M. galloprovincialis*, το *M* του *M. trossulus* και το *M*-like τμήμα του *F* του *M. trossulus*. Η περιοχή VD1-M₁₆₁₋₃₁₂ που κατά πάσα πιθανότητα διαδραματίζει σπουδαίο ρόλο στην πατρική κληρονομία, συμβολίζεται με λευκό ορθογώνιο. Η αλληλουχία πολλών αδενικών αντιπροσωπεύεται με γκρι κουτάκι και το μαύρο κουτάκι υποδεικνύει το στοιχείο πρόσδεσης. Το "Λ" υποδηλώνει προσθήκες (το μήκος της προσθήκης δίνεται στην παρένθεση) στο *M*-like VD1 του *F* γονιδιώματος του *M. trossulus*, σε σύγκριση με το VD1 του γονιδιώματος *M* του ίδιου είδους. Δίνονται οι κωδικοί της GenBank όλων των αλληλουχιών. Οι αριθμοί υποδεικνύουν τις αντίστοιχες νουκλεοτιδικές θέσεις. Όσον αφορά στο γονιδίωμα του *M. galloprovincialis*, το 5' άκρο του VD1 αναθεωρήθηκε στην παρούσα διατριβή και βρίσκεται στη νουκλεοτιδική θέση 17623 και όχι στη θέση 1 όπως είχε σχολιαστεί προηγουμένως από τους Mizi et al. (2005). (β) Στοιχίση της περιοχής VD1-M₁₆₁₋₃₁₂ των τεσσάρων αλληλουχιών του (α). *Mga* είναι το γονιδίωμα *M* του *M. galloprovincialis*; *Cga* – το *C* γονιδίωμα του *M. galloprovincialis*; *Mtr* – το *M* του *M. trossulus*; *Ftr* – το *F* του *M. trossulus*. Οι δύο προσθήκες 4 και 7 bp στο *M*-like VD1 του *Ftr* υποδηλώνονται με "Λ". Νουκλεοτιδικές ομοιότητες μεταξύ των αλληλουχιών του ίδιου είδους υποδηλώνονται με "*" και μεταξύ αλληλουχιών διαφορετικών ειδών, με "/". Τα γκρι και μαύρα κουτάκια είναι οι αλληλουχίες των γκρι και μαύρων κουτιών του (α).

Ακόμα μία επιβεβαίωση για το ρόλο του STE προέρχεται από το αρκετά συγγενικό είδος *M. trossulus*. Όπως αναφέρθηκε και στην [Ενότητα 1.3.2.1](#), το VD1 του πατρικά κληρονομούμενου γονιδιώματος του είδους αυτού έχει την ίδια δομή με το VD1 του γονιδιώματος M του *M. galloprovincialis*, παρόλο που η πρωτοταγής αλληλουχία του είναι πολύ διαφορετική. Το σημαντικότερο είναι πως υπάρχει μεγάλη ομοιότητα όσον αφορά στα απαραίτητα τμήματα του STE: υπάρχει μια αλληλουχία πολλών αδενινών στο μέσο του VD1 του γονιδιώματος M του *M. trossulus* που ακολουθείται από ένα σύντομο μοτίβο, του οποίου η αλληλουχία είναι παρόμοια με το στοιχείο πρόσδεσης του *M. galloprovincialis* ([Εικόνα 4.2β](#)). Πρέπει να σημειωθεί ότι το στοιχείο πρόσδεσης είναι παρόμοιο αλλά όχι πανομοιότυπο μεταξύ των τριών τύπων των πατρικά κληρονομούμενων γονιδιωμάτων. Τα δύο γονιδιώματα *M. galloprovincialis* διαφέρουν στην 3^η θέση όπου το G του τυπικού γονιδιώματος M αντικαθίσταται με A και επίσης διαφέρουν στον αριθμό αδενινών στην αλληλουχία των αδενινών. Το τυπικό γονιδίωμα M του *M. trossulus* διαφέρει από αυτό του *M. galloprovincialis* λόγω της προσθήκης ενός G μετά την 4^η θέση, λόγω αντικατάστασης του τρινουκλεοτιδίου TGT στις θέσεις 9-11 από τρεις κυτοσίνες και λόγω μιας αντικατάστασης ενός G από A στη θέση 14 και ενός A από G στη θέση 20 ([Εικόνα 4.2β](#)).

Το μητρικά κληρονομούμενο γονιδίωμα του *M. trossulus* παρέχει ακόμη πιο ισχυρές ενδείξεις για το ρόλο του STE. Το γονιδίωμα αυτό έχει μια μεγάλη κύρια ρυθμιστική περιοχή (CR) που περιλαμβάνει δύο απλούστερες όμοιες προς CR υπο-περιοχές ([Cao et al. 2009](#)). Η πρώτη υπο-περιοχή (το M-like τμήμα) μοιάζει πολύ με το CR του πατρικά κληρονομούμενου γονιδιώματος του *M. trossulus* και η δεύτερη υπο-περιοχή (F-like τμήμα) μοιάζει με το CR του μητρικά κληρονομούμενου γονιδιώματος του *M. edulis*. Παρατηρείται λοιπόν, ότι η αλληλουχία του M-like τμήματος που αντιστοιχεί στο STE διαφέρει από αυτή του πατρικά κληρονομούμενου γονιδιώματος του *M. trossulus*: έχει πιο κοντή αλληλουχία αδενινών και, ίσως το πιο σημαντικό, είναι ότι φέρει προσθήκη μιας αλληλουχίας επτά νουκλεοτιδίων στο στοιχείο πρόσδεσης ([Εικόνα 4.2β](#)). Αυτές οι διαφορές ίσως να στέρησαν από το STE την ικανότητα να σχηματίζει το σύμπλοκο πρωτεΐνης/DNA που θα ήταν απαραίτητο για τη πατρική μεταβίβαση του F mtDNA του *M. trossulus*. Ως

αποτέλεσμα, το γονιδίωμα αυτό ακολουθεί τη μητρική γραμμή κληρονομής.

Λαμβάνοντας υπόψη όλα τα αποτελέσματα των πειραμάτων EMSA, προτείνεται το ακόλουθο μοντέλο για το σχηματισμό του συμπλόκου πρωτεϊνών/STE (Εικόνα 4.3).



Εικόνα 4.3. Προτεινόμενο μοντέλο για την αλληλεπίδραση του VD1- $M_{161-312}$ με ένα διμερές πρωτεϊνικό σύμπλοκο από την αρσενική γονάδα. Η αλληλουχία αδενινών είναι η περιοχή στην οποία κάμπτεται το DNA. Το στοιχείο πρόσδεσης απεικονίζεται ως ένα ανοιχτό ροζ κουτάκι. Το τμήμα αριστερά της αλληλουχίας των αδενινών διαδραματίζει υποστηρικτικό ρόλο. Οι πρωτεϊνικές υπομονάδες (που απεικονίζονται ως ελλείψεις) μπορεί να είναι διαφορετικές (όπως παρουσιάζεται στην εικόνα) ή πανομοιότυπες (που σε αυτή την περίπτωση, οι διαφορετικοί χρωματισμοί των υπομονάδων είναι άσχετοι). Το σύμπλοκο πρωτεΐνης-mtDNA μπορεί να σχηματιστεί με δύο τρόπους: **(α)** Οι δύο υπομονάδες υπάρχουν ως μονομερή στο κυτταρόπλασμα και η πρόσδεση της υπομονάδας 1 στο DNA είναι απαραίτητη για την επακόλουθη πρόσδεση της υπομονάδας 2. Σε αυτή την περίπτωση, ο διμερισμός εξαρτάται από την πρόσδεση στο DNA. **(β)** Οι δύο υπομονάδες υπάρχουν ως μονομερή και διμερή στο κυτταρόπλασμα. Σε αυτή την περίπτωση, είτε το διμερές προσδένεται απευθείας στο DNA (β1) ή η υπομονάδα 1 προσδένεται πρώτη, και έπειτα η υπομονάδα 2 προσδένεται στην υπομονάδα 1, οδηγώντας έτσι στον σχηματισμό του συμπλόκου (β2).

Σύμφωνα με το μοντέλο αυτό, το VD1-M₁₆₁₋₃₁₂ κάμπτεται στην αλληλουχία των αδενινών. Το στοιχείο πρόσδεσης προσελκύει έναν πρωτεϊνικό παράγοντα που προσδένεται σε αυτό και περικλείει και τις δύο πλευρές του κεκαμμένου DNA, για τη σταθεροποίηση του συμπλόκου DNA-πρωτεϊνών. Μια επιπρόσθετη υπόθεση απαιτείται για να εξηγηθεί γιατί στο πείραμα EMSA παρατηρήθηκαν σε όλες τις περιπτώσεις δύο ζώνες. Μία περίπτωση είναι το πρωτεϊνικό σύμπλοκο να αποτελείται από δύο υπομονάδες από τις οποίες η μία (υπομονάδα 1) προσδένεται πρώτη στο DNA και ακολουθεί η δεύτερη υπομονάδα (Εικόνα 4.3α). Αυτή θα ήταν η πιο πιθανή υπόθεση αν οι δύο υπομονάδες είναι διαφορετικές (δηλαδή, κωδικοποιούνται από διαφορετικούς γενετικούς τόπους). Μια άλλη περίπτωση είναι ο πρωτεϊνικός παράγοντας να εμφανίζεται σε δύο μορφές, ως μονομερές και ως διμερές, με τις δύο μορφές να είναι εξίσου ικανές να σχηματίζουν σταθερά σύμπλοκα με το STE (Εικόνα 4.3β1). Μια ελαφρώς τροποποιημένη εκδοχή αυτής της υπόθεσης είναι ότι το διμερές σχηματίζεται μετά την πρόσδεση της πρώτης υπομονάδας στο DNA (Εικόνα 4.3β2). Σε αυτή τη δεύτερη υπόθεση οι δύο υπομονάδες του διμερούς μπορεί να είναι πανομοιότυπες (να κωδικοποιούνται από τον ίδιο γενετικό τόπο – ομοδιμερές) ή διαφορετικές (ετεροδιμερές). Μια πιο λεπτομερής παρατήρηση των ζωνών στα πειράματα EMSA (βλέπε Εικόνες Ενότητας 3) οδηγεί στη διαπίστωση ότι η ζώνη που αντιστοιχεί στο σύμπλοκο μικρότερου μεγέθους είναι πιο αχνή στις περισσότερες περιπτώσεις. Μια εξήγηση για αυτό θα μπορούσε να είναι ότι το σύμπλοκο DNA/μονομερούς είναι παροδικό στο κύτταρο, αλλά επανεμφανίζεται σε υψηλές συχνότητες σε *in vitro* συνθήκες.

Και στην περίπτωση του VD1 του F γονιδιώματος, αναζητήθηκε θέση πρόσδεσης παραγόντων που εμπλέκεται στην κληρονόμηση του μορίου. Πειράματα μείωσης κινητικότητας συμπλόκου πράγματι οδήγησαν στον εντοπισμό μιας τέτοιας πιθανής περιοχής στο VD1 του F, όμως λόγω του ότι το σύμπλοκο που σχηματιζόταν ήταν αρκετά αχνό, χωρίς ικανοποιητική επαναληψιμότητα και η αλληλεπίδραση μάλλον μη-ειδική, όπως δείχτηκε με πειράματα EMSA ανταγωνισμού, δεν μπορεί να εξαχθεί με ασφάλεια κάποιο συμπέρασμα. Εξάλλου, αν πράγματι το VD1 του γονιδιώματος F περιείχε κάποια περιοχή που καθορίζει τη μητρική του κληρονόμηση, τότε το γονιδίωμα C θα έπρεπε να κληρονομείται μητρικά, εφόσον φέρει ένα πλήρες VD1 τύπου F. Κάτι τέτοιο όμως δεν ισχύει

καθότι το γονιδίωμα C βρέθηκε σε καθαρό σπέρμα αρσενικού ατόμου (Venetis et al. 2007).

Είναι πιθανό, κατά την ωρίμανση των σπερματοκυττάρων των αρσενικών, να δρα ένας μηχανισμός ο οποίος καταστρέφει τα μιτοχόνδρια. Τα μιτοχόνδρια που φέρουν μιτοχονδριακό DNA με το STE προστατεύονται από αυτή την καταστροφή. Αυτό συμβαίνει μέσω του σχηματισμού συμπλόκου που αποτελείται από έναν πυρηνικό παράγοντα που αγκυροβολείται στην εξωτερική επιφάνεια του μιτοχονδρίου, που προσδένεται στην ειδική θέση του πατρικού mtDNA που φέρει το μιτοχόνδριο. Για να γίνει αυτό, το μιτοχόνδριο θα πρέπει να βρίσκεται κοντά στην επιφάνεια του πυρήνα. Τα μιτοχόνδρια χωρίς το STE, δηλαδή μιτοχόνδρια με το F γονιδίωμα, δεν είναι προστατευμένα εξαιτίας της απουσίας του συμπλόκου. Τα μιτοχόνδρια που φέρουν το STE αλλά δεν βρίσκονται κοντά στον πυρήνα, μπορεί επίσης να μην είναι προστατευμένα. Σύμφωνα με αυτή την υπόθεση, το γεγονός ότι δεν παρατηρήθηκε σχηματισμός συμπλόκου όταν χρησιμοποιήθηκε κυτταροπλασματικό εκχύλισμα, είναι λόγω απουσίας τμημάτων κυτταροπλασματικών μεμβρανών που περιβάλλουν τον πυρήνα, και πάνω στις οποίες βρίσκονται προσκολλημένα τα περιπυρηνικά μιτοχόνδρια.

Ο τρόπος αλληλεπίδρασης μοτίβων mtDNA με πρωτεΐνες του κυτταροπλάσματος έχει εξηγηθεί από τους Chen and Butow (2005). Η βασική ιδέα έγκειται στο ότι μιτοχονδριακά νουκλεοειδή, δηλαδή σύμπλοκα πρωτεΐνης-mtDNA που είναι προσδεμένα στην εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη, μπορούν να επικοινωνούν με κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες που προσδένονται σε ινίδια ακτίνης. Το σύστημα μπορεί να θεωρηθεί ως μια τροποποίηση ενός προϋπάρχοντος μηχανισμού εξάλειψης του πατρικού mtDNA σε έμβρυα ειδών με Αυστηρά Μητρική Κληρονόμηση (SMI), που αποτελεί το κοινό πρότυπο για το ζωικό βασίλειο (βλέπε Ενότητα 1.2.3 και Εικόνα 1.12). Για παράδειγμα, στα πρώιμα εμβρυονικά στάδια του *C. elegans*, επιστρατεύονται αυτοφαγосώματα στα σπερματοζώαρια, τα οποία εγκολπώνουν τα πατρικά μιτοχόνδρια και προκαλούν τη λυσοσωμική αποικοδόμησή τους. Επίσης, σε διάφορες μελέτες έχει παρατηρηθεί η ύπαρξη μονοπατιού ουβικιτίνης-πρωτεασώματος, το οποίο στοχεύει τα μιτοχόνδρια του σπέρματος προς αποικοδόμηση στο γονιμοποιημένο αυγό (Sutovsky et al.

1999, 2000, Al Rawi et al. 2011, Sato and Sato 2011, Zhou et al. 2011, Hajjar et al. 2014). Όπως αναφέρθηκε και στην Εισαγωγή (Ενότητα 1.3.2.3), η εμπλοκή του συστήματος ουβικιτίνης-πρωτεασώματος στη ΔΜΚ έχει προταθεί από διάφορες μελέτες (Diz et al. 2009, Ghiselli et al. 2012, Diz et al. 2013).

Τέλος, όσον αφορά στους πιθανούς πρωτεϊνικούς παράγοντες που συμμετέχουν στο σχηματισμό του συμπλόκου, μια πρώτη προσπάθεια έγινε με τον *in silico* εντοπισμό μιας οικογένειας παραγόντων (forkhead proteins), οι οποίες φαίνεται ότι αναγνωρίζουν το στοιχείο πρόσδεσης του STE. Σύμφωνα με δυο μελέτες (Naimi et al. 2009, Liu et al. 2012), δύο είδη διθύρων μαλακίων της θάλασσας, το χτένι *Chlamys farreri* και το στρείδι *Crassostrea gigas*, διαθέτουν forkhead πρωτεΐνη (Foxl2), η οποία σχετίζεται με λειτουργίες όπως η ωρίμανση των γονάδων, ο προσδιορισμός του φύλου κλπ. Θεωρήθηκε πιθανό να υπάρχει και στο *Mytilus* πρωτεΐνη Foxl2, εφόσον είναι κι αυτό δίθυρο μαλάκιο. Και αν όντως υπάρχει, είναι πολύ πιθανό να σχετίζεται με τη ΔΜΚ. Αρχικά αναζητήθηκε το γονίδιο *Foxl2* στο πυρηνικό γονιδίωμα του *Mytilus*, και βρέθηκε ένα τμήμα της συντηρητικής περιοχής forkhead box, που χαρακτηρίζει το συγκεκριμένο γονίδιο και που παρουσιάζει σημαντική ομοιότητα τόσο σε νουκλεοτιδικό όσο και σε αμινοξικό επίπεδο με την αντίστοιχη περιοχή των δύο ειδών που προαναφέρθηκαν. Μελλοντικό στόχο αποτελεί η μελέτη της έκφρασης του συγκεκριμένου γονιδίου, αλλά και η εύρεση πιθανής εμπλοκής της πρωτεΐνης Foxl2 στη ΔΜΚ.

5. Περίληψη

Το φαινόμενο της Διπλής Μονογονεϊκής Κληρονομικότητας (ΔΜΚ) αποτελεί μια ιδιαιτερότητα στο ζωικό βασίλειο. Είναι η μοναδική περίπτωση συστηματικής παραβίασης του γενικού κανόνα της μονογονεϊκής (μητρικής) κληρονόμησης του μιτοχονδριακού DNA. Η ΔΜΚ έχει ανιχνευτεί σε περισσότερα από 50 είδη διθύρων μαλακίων. Στα είδη αυτά υπάρχουν δύο τύποι μιτοχονδριακών γονιδιωμάτων, F και M, τα οποία παρουσιάζουν ίδια γονιδιακή οργάνωση αλλά διαφέρουν στη νουκλεοτιδική αλληλουχία σε σημαντικό βαθμό που ποικίλει από είδος σε είδος. Το μητρικό μιτοχονδριακό DNA (τύπος F) μεταβιβάζεται σε ολόκληρο τον θηλυκό απόγονο και κατ' επέκταση στα αυγά του. Από την άλλη, το πατρικό μιτοχονδριακό DNA (τύπος M), το οποίο σύμφωνα με την Αυστηρά Μητρική Κληρονόμηση που παρατηρείται στην πλειοψηφία των ζωικών ειδών, θα έπρεπε να καταστρέφεται στο ζυγωτό, στα είδη με ΔΜΚ όχι μόνο δεν καταστρέφεται, αλλά μεταβιβάζεται συστηματικά στη σπερματική γραμμή του αρσενικού απογόνου και κατ' επέκταση στα ώριμα σπερματοζωάρια του.

Στόχο της παρούσας διδακτορικής διατριβής αποτέλεσε η διερεύνηση του μηχανισμού με τον οποίο επιτυγχάνεται η εξάλειψη του γονιδιώματος F και η διατήρηση του M στη σπερματική γραμμή του αρσενικού ατόμου. Ως πειραματόζωο χρησιμοποιήθηκε το πιο άφθονο είδος με ΔΜΚ στην Ελλάδα, το μύδι *Mytilus galloprovincialis*.

Εκτενής *in silico* ανάλυση αλληλουχιών μιτοχονδριακού DNA τύπου F και M από υπάρχοντα βιβλιογραφικά δεδομένα υπέδειξε μέρος της πρώτης μεταβλητής περιοχής (VD1) της κύριας ρυθμιστικής περιοχής (CR) ως την πιθανότερη θέση αλληλουχιών που εμπλέκονται στην κληρονόμηση του κάθε τύπου γονιδιώματος. Η νουκλεοτιδική αλληλουχία του VD1 διαφέρει σε μεγάλο βαθμό μεταξύ των F και M. Το CR βρίσκεται μεταξύ των γονιδίων *l-rRNA* και *tRNA^{Tyr}* και έχει τριμερή δομή: μια συντηρητική περιοχή (CD) με δύο μεταβλητές περιοχές (VD1 και VD2) εκατέρωθεν αυτής.

Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, στο VD1 του γονιδιώματος F του *Mytilus* υπάρχει ένα ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης (ORF) το οποίο πιθανόν να κωδικοποιεί πρωτεΐνη. Ένα ORF έχει επίσης εντοπιστεί σύμφωνα με τη βιβλιογραφία και στο VD1 του M. Κατά την διάρκεια της παρούσας μελέτης προέκυψαν στοιχεία που συνηγορούν κατά της υπόθεσης της εμπλοκής αυτών των ORF στο μηχανισμό απάλειψης του F από το σπέρμα.

Κατά συνέπεια στραφήκαμε στην αναζήτηση πιθανών θέσεων πρόσδεσης πυρηνικών πρωτεϊνικών παραγόντων για τη ρύθμιση της κληρονομής των γονιδιωμάτων. Από την *in silico* ανάλυση αλληλουχιών VD1 από διάφορα είδη *Mytilus* και σε συνδυασμό με υπάρχοντα βιβλιογραφικά δεδομένα, εντοπίστηκε στο γονιδίωμα M μια αλληλουχία 152 bp (VD1-M₁₆₁₋₃₁₂) η οποία πιθανότατα εμπλέκεται στην κληρονομία του γονιδιώματος M. Υποτέθηκε ότι η αλληλουχία αυτή αποτελεί *cis*-στοιχείο, δηλαδή θέση πρόσδεσης *trans*-πρωτεϊνικών παραγόντων. Η υπόθεση αυτή εξετάστηκε με διεξοδική σειρά πειραμάτων Μείωσης Κινητικότητας Συμπλόκου (EMSA). Παρατηρήθηκε σχηματισμός σταθερού συμπλόκου του VD1-M₁₆₁₋₃₁₂ που χρησιμοποιήθηκε ως ανιχνευτής, με πρωτεϊνικό εκχύλισμα γονάδας αρσενικού ατόμου. Σχηματισμός συμπλόκου δεν υπήρξε στην περίπτωση που το πρωτεϊνικό εκχύλισμα προερχόταν από γονάδα θηλυκού ατόμου ή από σωματικό ιστό (πόδι) αρσενικού ή θηλυκού ατόμου. Συνεπώς, πρόκειται για παράγοντα/ες που δρα/ουν φυλο-ειδικά αλλά και ιστο-ειδικά. Η παρουσία δύο ζωνών συμπλόκου στο πείραμα EMSA, υποδηλώνει την πρόσδεση δύο παραγόντων (όπου ο κάθε παράγοντας θα μπορούσε να είναι ένα σύμπλοκο πρωτεϊνών) στον ανιχνευτή. Δεν είναι γνωστό, ωστόσο, εάν πρόκειται για δύο ίδιους παράγοντες (ομοδιμερές) ή για διαφορετικούς (ετεροδιμερές). Ιδιαίτερο εύρημα αποτελεί επίσης το γεγονός ότι οι παράγοντες του συμπλόκου προέρχονται από το πυρηνικό κλάσμα και όχι από το κυτταροπλασματικό, όπως θα αναμενόταν. Αυτό εξηγείται από το γεγονός ότι στο πυρηνικό κλάσμα βρέθηκαν περιπυρηνικά μιτοχόνδρια. Με βάση τη βιβλιογραφία, δεν είναι η πρώτη φορά που τα περιπυρηνικά μιτοχόνδρια διαδραματίζουν έναν ξεχωριστό ρόλο, πέραν της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης. Ακολούθησαν πειράματα EMSA ανταγωνισμού που επιβεβαίωσαν την ειδικότητα αλλά και τη σταθερότητα του συμπλόκου. Σε προσπάθεια εύρεσης μικρότερου τμήματος του VD1-M₁₆₁₋₃₁₂ που δίνει όμοια εικόνα σε πείραμα EMSA, προέκυψε το τμήμα VD1-M₁₈₀₋₂₅₅, το

οποίο περιλαμβάνει μια αλληλουχία 26 αδενινών περίπου στο μέσο του, αλληλουχία 27 bp στα αριστερά της και μια αλληλουχία 23 bp στα δεξιά της. Με πείραμα αποτυπώματος DNase I βρέθηκε ότι στην αλληλουχία των 23 bp μετά τις αδενίνες, εντοπίζεται το στοιχείο πρόσδεσης του VD1-M₁₆₁₋₃₁₂. Περαιτέρω πειράματα EMSA για την εξιχνίαση του ρόλου αυτών των επιμέρους αλληλουχιών, οδήγησαν στη διατύπωση του εξής μοντέλου για το σχηματισμό του συμπλόκου: η αλληλουχία των αδενινών κατά πάσα πιθανότητα κάμπτεται, επιτρέποντας έτσι την πρόσδεση της πρώτης υπομονάδας του διμερούς παράγοντα στο στοιχείο πρόσδεσης. Ιδιαίτερος και πρωτότυπος είναι ο ρόλος της αλληλουχίας στα αριστερά των αδενινών, η οποία είναι απαραίτητη για τη σταθεροποίηση και συγκράτηση του συμπλόκου. Ακολουθεί και η πρόσδεση της δεύτερης υπομονάδας για την ολοκλήρωση του διμερούς. Ο σχηματισμός του συμπλόκου, κατά πάσα πιθανότητα προστατεύει το γονιδίωμα M και κατ'επέκταση τα πατρικά μιτοχόνδρια από την αποικοδόμηση στο σπέρμα.

Θέση πρόσδεσης παραγόντων αναζητήθηκε και στο VD1 του γονιδιώματος F με πείραμα EMSA. Πράγματι σχηματίστηκε σύμπλοκο συγκεκριμένου ανιχνευτή από το VD1 με εκχύλισμα γονάδας αρσενικού ατόμου, το οποίο όμως ήταν αρκετά ασθενές, με μη ικανοποιητική επαναληψιμότητα και ειδικότητα. Επομένως, πιθανότατα το εν λόγω σύμπλοκο να μη σχηματίζεται *in vivo*. Επίσης, εφόσον το γονιδίωμα F δε διαθέτει αλληλουχία παρόμοια με το VD1-M₁₈₀₋₂₅₅ του M, δεν μπορεί να σχηματίσει αντίστοιχο σύμπλοκο προστασίας και συνεπώς εξαλείφεται από τη σπερματική γραμμή μέσω αποικοδόμησης των μητρικών μιτοχονδρίων.

Κατά τη διερεύνηση της λειτουργικότητας των ORF στο VD1 των F και M βρέθηκαν πολυαδενυλιωμένα μετάγραφα διαφόρων μεγεθών από την κύρια ρυθμιστική περιοχή. Σε ευρύτερη μελέτη μεταγράφων μη-πρωτεϊνικών γονιδίων, βρέθηκαν επίσης κομμένα, πολυαδενυλιωμένα ή μη μετάγραφα των rRNA γονιδίων, καθώς επίσης και tRNA μετάγραφα πολυαδενυλιωμένα μετά την προσθήκη του CCA. Όλα αυτά τα πολυαδενυλιωμένα μεν, μη λειτουργικά δε, μετάγραφα και απομεινάρια μεταγράφων που προκύπτουν από τον τρόπο που γίνεται η μεταγραφή στο μιτοχονδριακό γονιδίωμα, μαρτυρούν τη δράση αποικοδομοσώματος στα μιτοχόνδρια του *Mytilus*. Επίσης σε αυτή τη σειρά πειραμάτων

απεδείχθη ότι το 3' άκρο του γονιδίου του *l-rRNA* βρίσκεται 49 νουκλεοτίδια πριν από το αρχικά ορισμένο άκρο. Επομένως τα 49 νουκλεοτίδια που περισσεύουν, ανήκουν τελικά στο CR, που έπεται του εν λόγω γονιδίου.

Τέλος, σε μια πρώτη προσπάθεια εύρεσης των παραγόντων που προσδένονται στο VD1 του γονιδιώματος M, εντοπίστηκε με *in silico* ανάλυση, μια οικογένεια πρωτεϊνών (forkhead proteins), που αναγνωρίζουν το μοτίβο του στοιχείου πρόσδεσης στο VD1. Μάλιστα, ένα μέλος της οικογένειας αυτής, το *Foxl2*, ανιχνεύτηκε σε παλαιότερη μελέτη, σε ένα δίθυρο μαλάκιο χωρίς ΔΜΚ. Στο είδος αυτό, το *Foxl2* εμπλεκόταν στον φυλοκαθορισμό και την ωρίμανση των γονάδων. Στα πλαίσια της παρούσας διατριβής έγινε εφικτή η εύρεση ενός τμήματος της αλληλουχίας του *Foxl2* στο πυρηνικό γονιδίωμα του *Mytilus* και αποτελεί μελλοντικό στόχο η διαπίστωση της έκφρασής του και η μελέτη μεταγράφου και πρωτεΐνης.

6. Summary

The Doubly Uniparental Inheritance (DUI) phenomenon is a unique feature in the animal kingdom. It is the only case of systematic violation of the general rule of uniparental (maternal) inheritance of mitochondrial DNA. DUI has been detected in over 50 species of bivalve molluscs. In these species, two types of mitochondrial genomes exist, the F and the M. The two genomes exhibit the same gene organization but differ in nucleotide sequence at a significant level, which varies from species to species. The maternal mitochondrial DNA (F type) is transmitted to the female offspring, and hence its eggs. On the other hand, the paternal mitochondrial DNA (M type), which according to the Strictly Maternal Inheritance observed in the majority of animal species should be destroyed in the zygote, in species with DUI not only is it not destroyed, but it is also systematically transmitted to the germ line of the male offspring, and therefore to its mature sperm.

The primary aim of this thesis was the investigation of the mechanism by which the elimination of F and the retention of the M genome is accomplished in male germ line. The most abundant species with DUI in Greece, *Mytilus galloprovincialis*, was used as the animal model of this study.

An extensive *in silico* analysis of F and M mitochondrial DNA sequences, using the existing literature data, indicated a part of the first variable domain (VD1) of the main control region (CR) as the most promising site of sequences that are involved in the inheritance of each genome type. The nucleotide sequence of VD1 is highly different between F and M. The CR is located between *l-rRNA* and *tRNA^{Tyr}* genes and has a tripartite structure: a conserved domain (CD) in-between two variable domains (VD1 and VD2).

According to the literature, there is an open reading frame (ORF) in VD1 of the F genome of *Mytilus*, which might code for a protein product. An ORF has also been detected, according to the literature, in the VD1 of the M. During the present study, evidence occurred, that argues against

the involvement of these ORFs in the mechanism of elimination of the F in mature sperm.

Therefore, we searched for possible binding sites for nucleus-coded protein factors, which are responsible for the regulation of the inheritance of the genomes. *In silico* analysis of VD1 sequences from various *Mytilus* species, in combination with existing literature data, revealed a sequence of 152 bp (VD1-M₁₆₁₋₃₁₂) in the M genome, which is probably involved in the mode of inheritance of the M. Presumably, this sequence is a *cis*-element, namely a binding site for *trans*-acting protein factors. This hypothesis was examined by a comprehensive series of Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA) experiments. The formation of a stable complex was observed between VD1-M₁₆₁₋₃₁₂, which was used as a probe, and a protein extract from a male gonad. This complex was not formed when the protein extract originated from a female gonad or from a somatic tissue (foot) of either a male or a female individual. Therefore, the factor/s that participates in the complex is both sex-specific and tissue-specific. The presence of two retarded bands in the EMSA experiment suggests the binding of two factors to the probe (each of which could be itself a protein complex). It is not known, however, whether the two factors are identical (homodimer) or different (heterodimer). Another interesting observation is that the protein factors of the complex originate from the nuclear and not from the cytoplasmic extract, as expected. This can be explained, since perinuclear mitochondria were found in the nuclear extract. According to the literature, it is not the first time that perinuclear mitochondria play a distinctive role, besides oxidative phosphorylation. Subsequently, competitor EMSA experiments confirmed the specificity as well as the stability of the complex. In an attempt to find a shorter part of VD1-M₁₆₁₋₃₁₂ that provides a similar result in EMSA experiments, fragment VD1-M₁₈₀₋₂₅₅ was obtained, which consists of a sequence of 26 adenines approximately in the middle, a 27 bp sequence upstream from the adenine tract, and a 23 bp sequence downstream from the adenine tract. A DNase I footprinting experiment showed that the binding element of VD1-M₁₆₁₋₃₁₂ lies in the 23 bp sequence. Further EMSA experiments employed for the investigation of the role of these sequences, led to the formulation of the following model describing the formation of the complex: the adenine sequence probably bends, thus allowing the binding of the first subunit of the dimer to the

binding element. A special and original role is attributed to the 27 bp sequence upstream from the adenine tract, which is necessary for the stabilization and retention of the complex. Hereupon, the binding of the second subunit completes the dimer. Complex formation most probably protects the M genome and thus paternal mitochondria from degradation in the sperm.

The VD1 of the F genome was also investigated for the presence of a protein binding site. Indeed, a complex was formed between a certain VD1 probe and a male gonad protein extract, which nonetheless was fairly weak, with an unsatisfying repeatability and specificity. Therefore, this complex is probably not formed *in vivo*. Moreover, since the F genome does not possess a sequence similar to VD1-M₁₈₀₋₂₅₅ of the M, it cannot form the corresponding protection complex and is thus eliminated from the sperm line, through degradation of the maternal mitochondria.

During the investigation of the functionality of the ORFs in the F- and M-type VD1, polyadenylated transcripts of different lengths were found, corresponding to the main control region. In a further study of transcripts of non-protein-coding genes, truncated, polyadenylated or non-adenylated transcripts of rRNA genes were found, as well as polyadenylated after the addition of CCA, tRNA transcripts. All these polyadenylated but non-functional transcripts and transcript residues, which arise from the way mitochondrial transcription is performed, evince the existence of a degradosome in *Mytilus* mitochondria. Moreover, these series of experiments revealed that the 3' end of *l-rRNA* gene is located 49 nucleotides upstream from the initially annotated end. Thus the 49 excessive nucleotides eventually belong to the CR that follows the forementioned gene.

Finally, in an initial attempt to reveal the factors that bind to the VD1 of the M genome, a protein family (forkhead proteins) was detected through *in silico* analysis, which seems to recognize the motif of the binding element in VD1. Indeed, according to an earlier study, a member of this family, *Foxl2*, was detected in a bivalve mollusc without DUI. In this species, *Foxl2* is involved in sex determination and gonadal maturation. In the framework of the present thesis, a part of the *Foxl2* sequence was

obtained from the nuclear genome of *Mytilus* and as a future goal, the determination of its expression and the study of the respective transcript and protein product, is desired.

7. Βιβλιογραφία

- Al Rawi, S., Louvet-Vallée, S., Djeddi, A., Sachse, M., Culetto, E., Hajjar, C., Boyd, L., Legouis, R., Galy, V., 2011. Postfertilization autophagy of sperm organelles prevents paternal mitochondrial DNA transmission. *Science* 334, 1144–1147.
- Alam, M.A., Kobayashi, Y., Horiguchi, R., Hirai, T., Nakamura, M., 2008. Molecular cloning and quantitative expression of sexually dimorphic markers Dmrt1 and Foxl2 during female-to-male sex change in *Epinephelus merra*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 157, 75–85.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P., 2002. «Molecular Biology of the Cell», Garland Science.
- Allen, J.F., 1996. Separate sexes and the mitochondrial theory of ageing. *J. Theor. Biol.* 180, 135–140.
- Altmann, R., 1890. Die Elementarorganismen und ihre Beziehungen zu den Zellen. Veit, Leipzig.
- Anderson, S., Bankier, A.T., Barrell, B.G., de Bruijn, M.H., Coulson, A.R., Drouin, J., Eperon, I.C., Nierlich, D.P., Roe, B.A., Sanger, F., Schreier, P.H., Smith, A.H., Staden, R., Young, I.G., 1981. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature* 290, 457–465.
- Andersson, S.G.E., Karlberg, O., Canback, B., Kurland, C.G., 2003. On the origin of mitochondria: a genomics perspective. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* 358, 165–177.
- Aoyama, H., Hagiwara, Y., Misumi, O., Kuroiwa, T., Nakamura, S., 2006. Complete elimination of maternal mitochondrial DNA during meiosis resulting in the paternal inheritance of the mitochondrial genome in *Chlamydomonas* species, *Protoplasma* 228, 231–242.
- Asakawa, S., Himeno, H., Miura, K., Watanabe, K., 1995. Nucleotide sequence and gene organization of the starfish *Asterina pectinifera* mitochondrial genome. *Genetics* 140, 1047–1060.
- Avise, J.C., Giblyn-Davidson, C., Laerm, J., Patton, J.C., Lansman, R.A., 1979. Mitochondrial DNA clones and matriarchal phylogeny within and among geographic populations of the pocket gopher, *Geomys pinetis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 76, 6694–6698.
- Bakke, I., Johansen, S., 2002. Characterization of mitochondrial ribosomal RNA genes in gadiformes: sequence variations, secondary structural features, and phylogenetic implications. *Mol. Phylogenet. Evol.* 25, 87–100.
- Ballard, J.W., Whitlock, M.C., 2004. The incomplete natural history of mitochondria. *Mol. Ecol.* 13, 729–44.
- Benda, C., 1898. Über die Spermatogenese der Vertebraten und hoherer Evertebraten. II. Theil: Die Histiogenese der Spermien. *Arch. Anat. Physiol.* 393–398.
- Benkel, B.F., Duschesnay, P., Boer, P.H., Genest, Y., Hickey, D.A., 1988. Mitochondrial large ribosomal RNA: an abundant polyadenylated sequence in *Drosophila*. *Nucleic Acids Res.* 16, 9880.

- Bensley, R.R., Hoerr, N., 1934. Studies on cell structure by the freeze-drying method. VI. The preparation and properties of mitochondria. *Anal. Rec.* 60, 449–455.
- Bereiter-Hann, J., Voth, M., 1994. Dynamics of mitochondria in living cells: shape changes, dislocations, fusion, and fission of mitochondria. *Microsc. Res. Tech.* 27, 198–219.
- Berthier, F., Renaud, M., Alziari, S., Durand, R., 1986. RNA mapping on *Drosophila* mitochondrial DNA: precursors and template strands. *Nucleic Acids Res.* 14, 4519–4533.
- Bibb, M.J., Van Etten R.A., Wright C.T., Walberg M. W., Clayton, D.A., 1981. Sequence and gene organization of mouse mitochondrial DNA. *Cell* 26, 167–180.
- Birky, C.W.Jr., 2001. The inheritance of genes in mitochondria and chloroplasts: laws, mechanisms, and models. *Annu. Rev. Genet.* 35, 125–148.
- Birnboim, H.C., Doly, J., 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* 7, 1513–1523.
- Blobel, G., 1980. Intracellular protein topogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 77, 1496–1500.
- Blum, E., Carpousis, A.J., Higgins, C.F., 1999. Polyadenylation promotes degradation of 3'-structured RNA by the *Escherichia coli* mRNA degradosome in vitro. *J. Biol. Chem.* 274, 4009–4016.
- Bobrowicz, A.J., Lightowers, R.N., Chrzanowska-Lightowers, Z., 2008. Polyadenylation and degradation of mRNA in mammalian mitochondria: a missing link? *Biochem. Soc. Trans.* 36, 517–519.
- Bogenhagen, D.F., Clayton, D.A., 2003a. The mitochondrial DNA replication bubble has not burst. *Trends Biochem. Sci.* 28, 357–360.
- Bogenhagen, D.F., Clayton, D.A., 2003b. Concluding remarks: The mitochondrial DNA replication bubble has not burst. *Trends Biochem. Sci.* 28, 404–405.
- Bollenbach, T.J., Schuster, G., Stern, D.B., 2004. Cooperation of endo- and exoribonucleases in chloroplast mRNA turnover. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 78, 305–337.
- Bonitz, S.G., Berlani, R., Coruzzi, G., Li, M., Macino, G., Nobrega, F.G., Nobrega, M.P., Thalenfeld, B.E., Tzagoloff, A., 1980. Codon recognition rules in yeast mitochondria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 77, 3167–3170.
- Boore, J.L., Brown, W.M., 1994. Complete DNA sequence of the mitochondrial genome of the black chiton *Katharina tunicata*. *Genetics* 138, 423–443.
- Boore, J.L., Medina, M., Rosenberg, L.A., 2004. Complete sequences of the highly rearranged molluscan mitochondrial genomes of the Scaphopod *Graptacme eborea* and the Bivalve *Mytilus edulis*. *Mol. Biol. Evol.* 21, 1492–1503.
- Bowmaker, M., Yang, M.Y., Yasukawa, T., Reyes, A., Jacobs, H.T., Huberman, J.A., Holt, I.J., 2003. Mammalian mitochondrial DNA replicates bidirectionally from an initiation zone. *J. Biol. Chem.* 278, 50961–50969.
- Boyle, E.E., Etter, R.J., 2013. Heteroplasmy in a deep-sea protobranch bivalve suggests an ancient origin of doubly uniparental inheritance of mitochondria in Bivalvia. *Mar. Biol.* 160, 413–422.

- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Analytical Biochemistry* 72, 248–254.
- Breton, S., Burger, G., Stewart, D.T., Blier, P.U., 2006. Comparative analysis of gender-associated complete mitochondrial genomes in marine mussels (*Mytilus* spp.). *Genetics* 172, 1107–1119.
- Breton, S., Doucet-Beaupre, H., Stewart, D.T., Piontkivska, H., Karmakar, M., Bogan, A.E., Blier, P.U., Hoeh W.R., 2009. Comparative mitochondrial genomics of freshwater mussels (Bivalvia: Unionoids) with doubly uniparental inheritance of mtDNA: gender-specific open reading frames and putative origins of replication. *Genetics* 183, 1575–1589.
- Breton, S., Ghiselli, F., Passamonti, M., Milani, L., Stewart, D.T., Hoeh, W.R., 2011a. Evidence for a fourteenth mtDNA-encoded protein in the female-transmitted mtDNA of marine mussels (Bivalvia: Mytilidae). *PLoS One* 6, e19365.
- Breton, S., Stewart, D.T., Hoeh, W.R., 2010. Characterization of a mitochondrial ORF from the gender-associated mtDNAs of *Mytilus* spp. (Bivalvia: Mytilidae): Identification of the “missing” ATPase 8 gene. *Mar. Genomics* 3, 11–18.
- Breton, S., Stewart, D.T., Shepardson, S., Trdan, R.J., Bogan, A.E., Chapman, E.G., Ruminas, A.J., Piontkivska, H., Hoeh, W.R., 2011b. Novel protein genes in animal mtDNA: a new sex determination system in freshwater mussels (Bivalvia: Unionoida)? *Mol. Biol. Evol.* 28, 1645–1659.
- Bruce, J.L., Giovannucci, D.R., Blinder, G., Shuttleworth, T.J., Yule, D.I., 2004. Modulation of [Ca²⁺]_i signaling dynamics and metabolism by and metabolism by perinuclear mitochondria in mouse parotid acinar cells. *J. Biol. Chem.* 279; 12909–12917.
- Bromham, L., Eyre-Walker, A., Smith, N.H., Maynard Smith, J., 2003. Mitochondrial Steve: paternal inheritance of mitochondria in humans. *Trends Ecol. Evol.* 18, 2–4.
- Brown, R., 1833. On the organs and mode of fecundation in Orchideae and Asclepiadae. *Trans. Linn. Soc. London* 16, 685–745.
- Brown, T.A., Cecconi, C., Tkachuk, A.N., Bustamante, C., Clayton, D.A. 2005. Replication of mitochondrial DNA occurs by strand displacement with alternative light-strand origins, not via a strand-coupled mechanism. *Genes Dev.* 19, 2466–2476.
- Burger, G., Gray, M.W., Lang, B.F., 2003. Mitochondrial genomes: Anything goes. *Trends Genet.* 19, 709–716.
- Burzyński, A., Smietanka, B., 2009. Is interlineage recombination responsible for low divergence of mitochondrial nad3 genes in *Mytilus galloprovincialis*? *Mol. Biol. Evol.* 26, 1441–1445.
- Burzyński, A., Zbawicka, M., Skibinski, D.O.F., Wenne, R., 2003. Evidence for recombination in the marine mussel *Mytilus trossulus* from the Baltic. *Mol. Biol. Evol.* 20, 388–392.
- Burzyński, A., Zbawicka, M., Skibinski, D.O.F., Wenne, R., 2006. Doubly uniparental inheritance is associated with high polymorphism for rearranged and recombinant control region haplotypes in Baltic *Mytilus trossulus*. *Genetics* 174, 1081–1094.

- Calvo, S.E., Mootha, V.K., 2010. The mitochondrial proteome and human disease. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* 11, 25–44.
- Camara, Y., Asin-Cayuela, J., Park, C.B., Metodiev, M.D., Shi, Y., Ruzzenente, B., Kukat, C., Habermann, B., Wibom, R., Hultenby, K, Franz, T., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Hallberg, B.M., Gustafsson, C.M., Larsson, N.G., 2011. MTERF4 regulates translation by targeting the methyltransferase NSUN4 to the mammalian mitochondrial ribosome. *Cell Metab.* 13, 527–539.
- Cantatore, P., Roberti, M., Morisco, P., Rainaldi, G., Gadaleta, M.N., Saccone, C., 1987. A novel gene order in the *Paracentrotus lividus* mitochondrial genome. *Gene* 53, 41–54.
- Cantatore, P., Roberti, M., Rainaldi, G., Gadaleta, M.N., Saccone, C., 1989. The complete nucleotide sequence, gene organization, and genetic code of the mitochondrial genome of *Paracentrotus lividus*. *J. Biol. Chem.* 264, 10965–10975.
- Cao, L., Kenchington, E., Zouros, E., 2004b. Differential segregation patterns of sperm mitochondria in embryos of the blue mussel (*Mytilus edulis*). *Genetics* 166, 883–894.
- Cao, L., Kenchington, E., Zouros, E., Rodakis, G.C., 2004a. Evidence that the large noncoding sequence is the main control region of maternally and paternally transmitted mitochondrial genomes of the marine mussel (*Mytilus* spp.). *Genetics* 167, 835–850.
- Cao, L., Ort, S.B., Mizi, A., Pogson, G., Kenchington, E., Zouros, E., Rodakis, G.C., 2009. The control region of maternally and paternally inherited mitochondrial genomes of three species of the sea mussel genus *Mytilus*. *Genetics*. 181, 1045–1056.
- Carpousis, A.J., 2007. The RNA degradosome of *Escherichia coli*: an mRNA-degrading machine assembled on RNase E. *Annu. Rev. Microbiol.* 61, 71–87.
- Caspari, E., 1955. The role of genes and cytoplasmic particles in differentiation. *Ann. NY Acad. Sci.* 60, 1026–1037.
- Cavalier-Smith, T., 2002. The phagotrophic origin of eukaryotes and phylogenetic classification of Protozoa. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 52, 297–354.
- Cavalier-Smith, T., 1987. The origin of cells: A symbiosis between genes, catalysts, and membranes. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 52, 805–824.
- Cedergren, R., Gray, M.W., Abel, Y., Sankoff, D., 1988. The evolutionary relationships among known life forms. *J. Mol. Evol.* 28, 98–112.
- Chakrabarti, R., Walker, J.M., Chapman, E.G., Shepardson, S.P., Trdan, R.J., Curole, J.P., Watters, G.T., Stewart, D.T., Vijayaraghavan, S., Hoeh, W.R., 2007. Reproductive function for a C-terminus extended male-transmitted cytochrome c oxidase subunit II protein expressed in both spermatozoa and eggs. *FEBS Letters*. 581, 5213–5219.
- Chakrabarti, R., Walker, J.M., Stewart, D.T., Trdan, R.J., Vijayaraghavan, S., Curole, J.P., Hoeh, W.R., 2006. Presence of a unique male-specific extension of C-terminus to the cytochrome c oxidase subunit II protein coded by the male-transmitted mitochondrial genome of *Venustaconcha ellipsiformis* (Bivalvia: Unionoidea). *FEBS Letters* 580, 862–866.

- Chakrabarti, R., Shepardson, S., Karmakar, M., Trdan, R., Walker, J., Shandilya, R., Stewart, D., Vijayaraghavan, S., Hoeh, W., 2009. Extra-mitochondrial localization and likely reproductive function of a female-transmitted cytochrome c oxidase subunit II protein. *Develop. Growth Differ.* 51, 511–519.
- Chang, D.D., Clayton D.A., 1985. Priming of human mitochondrial DNA replication occurs at the light-strand promoter. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 82, 351–355.
- Chapman, E.G., Piontkivska, H., Walker, J.M., Stewart, D.T., Curole, J.P., Hoeh, W.R., 2008. Extreme primary and secondary protein structure variability in the chimeric male-transmitted cytochrome c oxidase subunit II protein in freshwater mussels: Evidence for an elevated amino acid substitution rate in the face of domain-specific purifying selection. *BMC Evol. Biol.* 8, 165.
- Chatzoglou, E., Kyriakou, E., Zouros, E., Rodakis, G.C., 2013. The mRNAs of maternally and paternally inherited mtDNAs of the mussel *Mytilus galloprovincialis*: start/end points and polycistronic transcripts. *Gene* 520, 156–165.
- Chen, X., Prosser, R., Simonetti, S., Sadlock, J., Jagiello, G., Schon, E A., 1995. Rearranged mitochondrial genomes are present in human oocytes. *Am. J. Hum. Genet.* 57, 239–247.
- Chen, X.J., Butow, R.A., 2005. The organization and inheritance of the mitochondrial genome. *Nat. Rev Genet.* 6, 815–825.
- Chi, J.C.H., Suyama, Y., 1970. Comparative studies on mitochondrial and cytoplasmic ribosomes of *Tetrahymena pyriformis*. *J. Mol. Biol.* 53, 531–556.
- Chora, S., Bebianno, M., Romeo, M., 2009. Analysis of proteins from marine molluscs. *Methods Mol. Biol.* 519, 197–204.
- Clary, D.O., Wolstenholme, D.R., 1985. The mitochondrial DNA molecule of *Drosophila yakuba*: nucleotide sequence, gene organization, and genetic code. *J. Mol. Evol.* 22, 252–271.
- Clayton, D.A., 1982. Replication of animal mitochondrial DNA. *Cell* 28, 693–705.
- Clayton, D.A., 1991. Replication and transcription of vertebrate mitochondrial DNA. *Annu. Rev. Cell Biol.* 7, 453–478.
- Clayton, D.A., 1992. Transcription and replication of animal mitochondrial DNAs. *Int. Rev. Cytol.* 141, 217–232.
- Clayton, D. A. 2003. Mitochondrial DNA replication: what we know. *IUBMB Life* 55, 213–217.
- Coburn, G.A., Miao, X., Briant, D.J., Mackie, G.A., 1999. Reconstitution of a minimal RNA degradosome demonstrates functional coordination between a 3' exonuclease and a DEAD-box RNA helicase. *Genes Dev.* 13, 2594–2603.
- Coburn, G.A., Mackie, G.A., 1999. Degradation of mRNA in *Escherichia coli*: an old problem with some new twists. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 62, 55–108.
- Cogswell, A.T., Kenchington, E.L.R., Zouros, E., 2006. Segregation of sperm mitochondria in two and four cell embryos of the blue mussel *Mytilus edulis*: implications for the mechanism of doubly uniparental inheritance of mitochondrial DNA. *Genome* 49, 799–807.
- Conklin, E.G., 1897. The embryology of *Crepidula*. *J. Morphol.* 13, 1–226.

- Coucheron, D.H., Nymark, M., Breines, R., Karlsen, B.O., Andreassen, M., Jørgensen, T.E., Moum, T., Johansen, S.D., 2011. Characterization of mitochondrial mRNAs in codfish reveals unique features compared to mammals. *Curr. Genet.* 57, 213–222.
- Crisponi, L., Deiana, M., Loi, A., Chiappe, F., Uda, M., Amati, P., Bisceglia, L., Zelante, L., Nagaraja, R., Porcu, S., Ristaldi, M.S., Marzella, R., Rocchi, M., Nicolino, M., Lienhardt-Roussie, A., Nivelon, A., Verloes, A., Schlessinger, D., Gasparini, P., Bonneau, D., Cao, A., Pilia, G., 2001. The putative forkhead transcription factor FOXL2 is mutated in blepharophimosis/ptosis/epicanthus inversus syndrome. *Nat. Genet.* 27, 132–134.
- Crothers, D.M., Haran, T.E., Nadeau, J.G., 1990. Intrinsically bent DNA. *J. Biol. Chem.* 265, 7093–7096.
- Crozier, R.H., Crozier, Y.C., The mitochondrial genome of the honeybee *Apis mellifera*: complete sequence and genome organization. *Genetics* 133, 97–117.
- Curole, J.P., Kocher, T.D., 2002. Ancient sex-specific extension of the cytochrome c oxidase gene in Bivalves and the fidelity of doubly-uniparental inheritance. *Mol. Biol. Evol.* 19, 1323–1328.
- Curole, J.P., Kocher, T.D., 2005. Evolution of a unique mitotype-specific protein-coding extension of the cytochrome c oxidase II gene in freshwater mussels (Bivalvia: Unionoida). *J. Mol. Evol.* 61, 381–389.
- Dalziel, A.C., Stewart, D.T., 2002. Tissue-specific expression of male-transmitted mitochondrial DNA and its implications for rates of molecular evolution in *Mytilus* mussels (Bivalvia: Mytilidae). *Genome* 45, 348–355.
- Dan, J. C., 1962. The vitelline coat of the *Mytilus* egg. I. Normal structure and effect of acrosomal lysine. *Biol. Bull.* 123, 531–541.
- Dawid, I.B., Blackler, A.W., 1972. Maternal and cytoplasmic inheritance of mitochondrial DNA in *Xenopus*. *Dev. Biol.* 29, 152–61.
- De Giorgi, C., Martiradonna, A., Lanave, C., Saccone, C., 1996. Complete sequence of the mitochondrial DNA in the sea urchin *Arbacia lixula*: conserved features of the echinoid mitochondrial genome. *Mol. Phylogenet. Evol.* 5, 323–332.
- De Giorgi, C., Saccone, C., 1989. Mitochondrial genome in animal cells: structure, organization and evolution. *Cell Biophys.* 14, 67–78.
- DeLuca, S.Z., O'Farrell, P.H., 2012. Barriers to male transmission of mitochondrial DNA in sperm development. *Dev. Cell* 22, 660–668.
- Dimmer, K.S., Jakobs, S., Vogel, F., Altmann, K., Westermann, B., 2005. Mdm31 and Mdm32 are inner membrane proteins required for maintenance of mitochondrial shape and stability of mitochondrial DNA nucleoids in yeast. *J Cell Biol.* 168, 103–115.
- Diz, A.P., Dudley, E., Cogswell, A., Macdonald, B.W., Kenchington, E.L., Zouros E., Skibinski, D.O., 2013. Proteomic analysis of eggs from *Mytilus edulis* females differing in mitochondrial DNA (mtDNA) transmission mode. *Mol. Cell Proteomics.* 12, 3068–3080.
- Diz, A.P., Dudley, E., Macdonald, B.W., Pina, B., Kenchington, E.L.R., Zouros, E., Skibinski, D.O.F., 2009. Genetic variation underlying protein expression in eggs of the marine mussel *Mytilus edulis*. *Mol. Cell. Proteomics.* 8, 132–144.

- Doda, J.N., Wright, C.T., Clayton, D.A., 1981. Elongation of displacement-loop strands in human and mouse mitochondrial DNA is arrested near specific template sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*. 78, 6116–6120.
- Doucet-Beaupre, H., Breton, S., Chapman, E.G., Blier, P.U., Bogan, A.E., Stewart, D.T., Hoeh, W.R., 2010. Mitochondrial phylogenomics of the Bivalvia (Mollusca): searching for the origin and mitogenomic correlates of doubly uniparental inheritance of mtDNA. *BMC Evol. Biol.* 10, 50.
- Douris, V., Giokas, S., Lecanidou, R., Mylonas, M., Rodakis, G.C., 1998. Phylogenetic analysis of mitochondrial DNA and of morphological characters suggest a need for taxonomic re-evaluation within the Alopiinae (Gastropoda: Clausiliidae). *J. Molluscan Stud.* 64, 81–92.
- Dreyfus, M., Régnier, P., 2002. The poly(A) tail of mRNAs: Bodyguard in eukaryotes, scavenger in bacteria. *Cell* 111, 611–613.
- Dubin, D.T., Montoya, J., Timko, K.D., Attardi, G., 1982. Sequence analysis and precise mapping of the 3' ends of HeLa cell mitochondrial ribosomal RNAs. *J. Mol. Biol.* 157, 1–19.
- Embley, T.M., Martin, W.F., 2006. Eukaryote evolution: changes and challenges. *Nature*. 440, 623–630.
- Emelyanov, V.V. 2003. Mitochondrial connection to the origin of the eukaryotic cell. *Eur. J. Biochem.* 270, 1599–618.
- Emelyanov, V.V., 2001a. Evolutionary relationship of Rickettsiae and mitochondria. *FEBS Lett.* 501, 11–18.
- Emelyanov, V.V., 2001b. Rickettsiaceae, rickettsia-like endosymbionts, and the origin of mitochondria. *Biosci. Rep.* 21, 1–17.
- Ephrussi, B., 1953. Nucleo-cytoplasmic relations in microorganisms. Clarendon, New York.
- Ernster, L., Schatz, G., 1981. Mitochondria: a historical review. *J Cell Biol.* 91, 227s–255s.
- Fan, L., Sanschagrin, P.C., Kaguni, L.S., Kuhn, L.A., 1999. The accessory subunit of mtDNA polymerase shares structural homology with aminoacyl-tRNA synthetases: Implications for a dual role as a primer recognition factor and processivity clamp. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 9527–9532.
- Fan, L., Kim, S., Farr, C.L., Schaefer, K.T., Randolph, K.M., Tainer, J.A., Kaguni, L.S., 2006. A novel processive mechanism for DNA synthesis revealed by structure, modeling and mutagenesis of the accessory subunit of human mitochondrial DNA polymerase. *J. Mol. Biol.* 358, 1229–1243.
- Fisher, C., Skibinski, D.O.F., 1990. Sex-biased mitochondrial DNA heteroplasmy in the marine mussel *Mytilus*. *Proc. R. Soc. B* 242, 149–156.
- Fitzpatrick, D.A., Creevey, C.J., McInerney, J.O., 2006. Genome phylogenies indicate a meaningful alpha-proteobacterial phylogeny and support a grouping of the mitochondria with the Rickettsiales. *Mol. Biol. Evol.* 23, 74–85.
- Francisco, J.F., Brown, G.G., Simpson, M.V., 1979. Further studies on types A and B rat mtDNAs: cleavage maps and evidence for cytoplasmic inheritance in mammals. *Plasmid* 2, 426–436.

- Frohman, M.A., Dush, M.K., Martin, G.R., 1988. Rapid production of full-length cDNAs from rare transcripts: amplification using a single gene-specific oligonucleotide primer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 85, 8998–9002.
- Fuste, J.M., Wanrooij, S., Jemt, E., Granycome, C.E., Cluett, T.J., Shi, Y., Atanassova, N., Holt, I.J., Gustafsson, C.M., Falkenberg, M. 2010. Mitochondrial RNA polymerase is needed for activation of the origin of light-strand DNA replication. *Mol. Cell.* 37, 67–78.
- Gadaleta, G., Pepe, G., De Candia, G., Quagliariello, C., Sbisà, E., Saccone, C., 1988. Nucleotide sequence of rat mitochondrial NADH dehydrogenase subunit 1. GTG, a new initiator codon in vertebrate mitochondrial genome. *Nucleic Acids Res.* 16, 6233.
- Garner, M.M., Revzin, A., 1981. A gel electrophoresis method for quantifying the binding of proteins to specific DNA regions: application to components of the *Escherichia coli* lactose operon regulatory system. *Nucleic Acids Res.* 9, 3047–3060.
- Garrido-Ramos, M.A., Stewart, D.T., Sutherland, B.W., Zouros, E., 1998. The distribution of male-transmitted and female-transmitted mitochondrial DNA types in somatic tissues of blue mussels: implications for the operation of doubly uniparental inheritance of mitochondrial DNA. *Genome* 41, 818–824.
- Ghiselli, F., Milani, L., Chang, P.L., Hedgecock, D., Davis, J.P., Nuzhdin, S.V., Passamonti, M., 2012. De novo assembly of the manila clam *Ruditapes philippinarum* transcriptome provides new insights into expression bias, mitochondrial doubly uniparental inheritance and sex determination. *Mol. Biol. Evol.* 29, 771–786.
- Ghiselli, F., Milani, L., Guerra, D., Chang, P.L., Breton, S., Nuzhdin, S.V., Passamonti, M., 2013. Structure, transcription and variability of metazoan mitochondrial genome. Perspectives from an unusual mitochondrial inheritance system. *Genome Biol. Evol.* 5, 1535–1554.
- Ghiselli, F., Milani, L., Passamonti, M., 2011. Strict sex-specific mtDNA segregation in the germ line of the DUI species *Venerupis philippinarum* (Bivalvia: Veneridae). *Mol. Biol. Evol.* 28, 949–961.
- Giles, R.E., Blanc, H., Cann, H.M., Wallace, D.C., 1980. Maternal inheritance of human mitochondrial DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77,6715–6719.
- Govoroun, M.S., Pannetier, M., Pailhoux, E., Cocquet, J., Brillard, J.-P., Couty, I., Batellier, F., Cotinot, C., 2004. Isolation of chicken homolog of the FOXL2 gene and comparison of its expression patterns with those of aromatase during ovarian development. *Dev. Dyn.* 231, 859–870.
- Gray, M. W. 1999. Evolution of organellar genomes. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 9, 678–687.
- Gray, M.W., Sankoff, D., Cedergren, R.J., 1984. On the evolutionary descent of organisms and organelles: A global phylogeny based on a highly conserved structural core in small subunit ribosomal RNA. *Nucleic Acids Res.* 12, 5837–5852.
- Gray, M.W., Cedergren, R., Abel, Y., Sankoff, D., 1989. On the evolutionary origin of the plant mitochondrion and its genome. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 86, 2267–2271.
- Gray, M.W., 1998. Rickettsia, typhus and the mitochondrial connection. *Nature* 396, 109–110.

- Gray, M.W., Burger, G., Lang, B.F., 1999. Mitochondrial evolution. *Science* 283, 1476–1481.
- Gyllenstein, U., Wharton, D., Wilson, A.C., 1985. Maternal inheritance of mitochondrial DNA during backcrossing of two species of mice. *J. Hered.* 76, 321–324.
- Gyllenstein, U., Wharton, D., Josefsson, A., Wilson, A.C., 1991. Paternal inheritance of mitochondrial DNA in mice. *Nature* 352, 255–257.
- Hajjar, C., Sampuda, K.M., Boyd, L., 2014. Dual roles for ubiquitination in the processing of sperm organelles after fertilization. *BMC Dev. Biol.* 14, 6.
- Halbreich, A., Rabinowitz, M., 1971. Isolation of *Saccharomyces cerevisiae* mitochondrial formyltetrahydrofolic acid-methionyl-tRNA transformylase and the hybridization of mitochondrial fMet-tRNA with mitochondrial DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 68, 294–298.
- Hashitani, H., Lang, R.J., Suzuki, H., 2010. Role of perinuclear mitochondria in the spatiotemporal dynamics of spontaneous Ca²⁺ waves in interstitial cells of Cajal-like cells of the rabbit urethra. *Br. J. Pharmacol.* 161, 680–694.
- Haslbrunner, E., Tuppy, H., Schatz, G., 1964. Deoxyribonucleic acid associated with yeast mitochondria. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 15, 127–132.
- Hastings, P.J., 1992. Mechanism and control of recombination in fungi. *Mutat. Res.* 284, 97–110.
- Hatzoglou, E., Rodakis G.C., Lecanidou, R., 1995. Complete sequence and gene organization of the mitochondrial genome of the land snail *Albinaria coerulea*. *Genetics* 140, 1353–1366.
- Hayashi, K., Yandell, D.W., 1993. How sensitive is PCR-SSCP? *Hum. Mutat.* 2, 338–346.
- He, F., Wang, G.L., Li, J., 2014. Complete F-type mitochondrial genome of Chinese freshwater mussels *Lamprotula gottschei*. *Mitochondrial DNA* doi: 10.3109/19401736.2014.883608.
- Hecht, N.B., Liem, H., Kleene, K.C., Distel, R.J., Ho, S.M., 1984. Maternal inheritance of the mouse mitochondrial genome is not mediated by a loss or gross alteration of the paternal mitochondrial DNA or by methylation of the oocyte mitochondrial DNA. *Dev Biol.* 102, 452–461.
- Henle, J., 1841. Lehre von den Mischungs- und Formbestandtheilen des menschlichen Körpers. Allgemeine Anatomie, published by Verlag von Leopold Voss in Leipzig.
- Hoeh, W.R., Blakley, K.H., Brown, W.M., 1991. Heteroplasmy suggests limited biparental inheritance of *Mytilus* mitochondrial DNA. *Science* 251, 1488–1490.
- Hoeh, W.R., Stewart, D.T., Sutherland, B.W., Zouros, E., 1996. Multiple origins of gender-associated mitochondrial DNA lineages in bivalves (Mollusca: Bivalvia). *Evolution* 50, 2276–2286.
- Hoeh, W.R., Stewart, D.T., Saavedra, C., Sutherland, B.W., Zouros, E., 1997. Phylogenetic evidence for role-reversals of gender-associated mitochondrial DNA in *Mytilus* (Bivalvia: Mytilidae). *Mol. Biol. Evol.* 14, 959–967.
- Hoffman, R.J., Boore, J., Brown, W.M., 1992. A novel mitochondrial genome organization for the blue mussel, *Mytilus edulis*. *Genetics* 131, 397–412.

- Holt, I.J., Lorimer H.E., Jacobs, H.T., 2000. Coupled leading and lagging–strand synthesis of mammalian mitochondrial DNA. *Cell* 100, 515–524.
- Hou, Y.M., 2010. CCA addition to tRNA: implications for tRNA quality control. *IUBMB Life* 62, 251–260.
- Howell, N., 1999. Human Mitochondrial Diseases: Answering Questions and Questioning Answers. *Int. Rev. Cytol.* 186, 49–116.
- Huang, X.C., Rong, J., Liu, Y., Zhang, M.H., Wan, Y., Ouyang, S., Zhou, C.H., Wu, X.P., 2013. The complete maternally and paternally inherited mitochondrial genomes of the endangered freshwater mussel *Solenia carinatus* (Bivalvia: Unionidae) and implications for Unionidae taxonomy. *PLoS One* 8, e84352.
- Hurst, L.D., Hoekstra, R.F., 1994. Evolutionary genetics. Shellfish genes kept in line. *Nature* 368, 811–812.
- Hutchison, C.A. (3rd), Newbold, J.E., Potter, S.S., Edgell, M.H., 1974. Maternal inheritance of mammalian mitochondrial DNA. *Nature*. 251, 536–538.
- Jansen, R.P., de Boer, K., 1998. The bottleneck: mitochondrial imperatives in oogenesis and ovarian follicular fate. *Mol. Cell. Endocrinol.* 145, 81–88.
- Jiang, W.-P., Li, J.-L., Zheng, R.-L., Wang, G.L., 2010. Analysis of complete mitochondrial genome of *Cristaria plicata*. *Hereditas* 32, 153–162.
- Kaneda, H., Hayashi, J., Takahama, S., Taya, C., Lindahl, K.F., Yonekawa, H., 1995. Elimination of paternal mitochondrial DNA in intraspecific crosses during early mouse embryogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 92, 4542–4546.
- Karbowski, M., Youle, R.J., 2003. Dynamics of mitochondrial morphology in healthy cells and during apoptosis. *Cell Death Differ.* 10, 870–880.
- Katayama, S., Matsushita, O., Jung, C.M., Minami, J., Okabe, A., 1999. Promoter upstream bent DNA activates the transcription of the *Clostridium perfringens* phospholipase C gene in a low temperature-dependent manner. *EMBO J.* 18, 3442–3450.
- Kenchington, E., MacDonald, B., Cao, L., Tsagkarakis, D., Zouros, E., 2002. Genetics of mother-dependent sex ratio in blue mussels (*Mytilus* spp.) and implications for doubly uniparental inheritance of mitochondrial DNA. *Genetics* 161, 1579–1588.
- Kenchington, E.L., Hamilton, L., Cogswell, A., Zouros, E., 2009. Paternal mtDNA and maleness are co-inherited but not causally linked in Mytilid mussels. *PLoS One* 4, e6976.
- Kitakawa, M., Isono, K., 1991. The mitochondrial ribosomes. *Biochimie* 73, 813–825.
- Kleppe, K., Ohtsuka, E., Kleppe, R., Molineux, I., Khorana, H.G., 1971. Studies on polynucleotides. XCVI. Repair replications of short synthetic DNA's as catalyzed by DNA polymerases. *J. Mol. Biol.* 56, 341–361.
- Kondo, M., Finkbeiner, W. E., Widdicombe, J.H., 1992. Changes in permeability of dog tracheal epithelium in response to hydrostatic pressure. *Am J Physiol.* 262:L176–182.
- Koo, H.S., Wu, H.M., Crothers, D.M., 1986. DNA bending at adenine . thymine tracts. *Nature* 320, 501–506.
- Koonin, E.V., 2010. The origin and early evolution of eukaryotes in the light of phylogenomics. *Genome Biol.* 11, 209.

- Korpelainen, H., 2004. The evolutionary processes of mitochondrial and chloroplast genomes differ from those of nuclear genomes. *Naturwissenschaften* 91, 505–518.
- Kozak, M., 1983. Comparison of initiation of protein synthesis in procaryotes, eucaryotes, and organelles. *Microbiol. Rev.* 47, 1–45.
- Kroon, A.M., de Vos, W.M., Bakker, H., 1978. The heterogeneity of rat-liver mitochondrial DNA. *Biochim. Biophys. Acta.* 519, 269–273.
- Kubo, T., Nishizawa, S., Sugawara, A., Itchoda, N., Estiati, A., Mikami, T., 2000. The complete nucleotide sequence of the mitochondrial genome of sugar beet (*Beta vulgaris* L.) reveals a novel gene for tRNA(Cys)(GCA). *Nucleic Acids Res.* 28, 2571–2576.
- Kumar, S., Tamurra, K., Nei, M., 2004. MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. *Brief. Bioinform.* 5, 150–163.
- Kurland, C.G., Andersson, S.G.E., 2000. Origin and evolution of the mitochondrial proteome. *Microbiol. Mol. Biol.* 64, 786–820.
- Kuroiwa, T., Kawano, S., Nishibayashi, S., Sato, C., 1982. Epifluorescent microscopic evidence for maternal inheritance of chloroplast DNA. *Nature* 298, 481–483.
- Kvist, L., Martens, J., Nazarenko, A.A., Orell, M., 2003. Paternal leakage of mitochondrial DNA in the great tit (*Parus major*). *Mol Biol Evol.* 20, 243–247.
- Kyriakou, E., Zouros, E., Rodakis, G.C., 2010. The atypical presence of the paternal mitochondrial DNA in somatic tissues of male and female individuals of the blue mussel species *Mytilus galloprovincialis*. *BMC Res. Notes* 3, 222.
- La Roche, J., Snyder, M., Cook, D.I., Fuller, K., Zouros, E., 1990. Molecular characterization of a repeat element causing large-scale size variation in the mitochondrial DNA of the sea scallop *Placopecten magellanicus*. *Mol. Biol. Evol.* 7, 45–64.
- LaCava, J., Housley, J., Saveanu, C., Petfalski, E., Thompson, E., Jacquier, A., Tollervey, D., 2005. RNA degradation by the exosome is promoted by a nuclear polyadenylation complex. *Cell* 121: 713–724.
- Ladoukakis, E., Zouros, E., 2001. Direct evidence for homologous recombination in mussel (*Mytilus galloprovincialis*) mitochondrial DNA. *Mol. Biol. Evol.* 18, 1168–1175.
- Ladoukakis, E., Zouros, E., 2001. Recombination in animal mitochondrial DNA: evidence from published sequences. *Mol. Biol. Evol.* 18, 2127–2131.
- Ladoukakis, E.D., Saavedra, C., Magoulas, A., Zouros, E., 2002. Mitochondrial DNA variation in a species with two mitochondrial genomes: the case of *Mytilus galloprovincialis* from the Atlantic, the Mediterranean and the Black Sea. *Mol. Ecol.* 11, 755–769.
- Ladoukakis, E.D., Theologidis, I., Rodakis, G.C., Zouros, E., 2011. Homologous recombination between highly diverged mitochondrial sequences: examples from maternally and paternally transmitted genomes. *Mol. Biol. Evol.* 28, 1847–1859.
- Lang, B.F., Gray, M.W., Burger, G., 1999. Mitochondrial genome evolution and the origin of eukaryotes. *Annu. Rev. Genet.* 33, 351–397.
- Lee, J., Shin, M.K., Ryu, D.K., Kim, S., Ryu, W.S., 2010. Insertion and deletion mutagenesis by overlap extension PCR. *Methods Mol. Biol.* 634, 137–146.

- Lee, J.H., Choi, E.H., Kim, S.K., Ryu, S.H., Hwang, U.W., 2012. Mitochondrial genome of the cockscomb pearl mussel *Cristaria plicata* (Bivalvia, Unionoida, Unionidae). *Mitochondrial DNA*. 23, 39–41.
- Levings, C.S., Brown, G.G., 1989. Molecular biology of plant mitochondria. *Cell* 56, 171–9.
- L'Hernault, S.W., 2006. Spermatogenesis, in: WormBook (Ed.), The *C. elegans* Research Community, WormBook, <http://dx.doi.org/10.1895/wormbook.1891.1885.1891>, (<http://www.wormbook.org>).
- Liu, X.L., Zhang, Z.F., Shao, M.Y., Liu, J.G., Muhammad, F., 2012. Sexually dimorphic expression of foxl2 during gametogenesis in scallop *Chlamys farreri*, conserved with vertebrates. *Dev. Genes Evol.* 222, 279–286.
- Loffler, K.A., Zarkower, D., Koopman, P., 2003. Etiology of ovarian failure in blepharophimosis-ptosis-epicanthus-inversus syndrome: FOXL2 is a conserved, early-acting gene in vertebrate ovarian development. *Endocrinology* 144, 3237–3243.
- Longo, F.J., Dornfeld, E.J., 1967. The fine structure of spermatid differentiation in the mussel *Mytilus edulis*. *J. Ultrastruct. Res.* 20, 462–480.
- Lopez-Garcia, P., Moreira, D., 2006. Selective forces for the origin of the eukaryotic nucleus. *Bioessays*. 28, 525–533.
- Lopez-Garcia, P., Moreira, D., 1999. Metabolic symbiosis at the origin of eukaryotes. *Trends Biochem. Sci.* 24, 88–93.
- Lynch, D.C., Attardi, G., 1976. Amino acid specificity of the transfer RNA species coded for by HeLa cell mitochondrial DNA. *J. Mol. Biol.* 102, 125–141.
- Madsen, C.S., Ghivizzani, S.C., Hauswirth, W.W., 1993. Protein binding to a single termination-associated sequence in the mitochondrial DNA D-loop region. *Mol. Cell Biol.* 13, 2162–2171.
- Magoulas, A.E., Zouros, E., 1993. Restriction-site heteroplasmy in anchovy (*Engraulis encrasicolus*) indicates incidental biparental inheritance of mitochondrial DNA. *Mol. Biol. Evol.* 10, 319–325.
- Margulis, L., 1970. Origin of eukaryotic cells. Yale University Press, New Haven, CT.
- Margulis L, Dolan, M.F., Guerrero, R., 2000. The chimeric eukaryote: Origin of the nucleus from the karyomastigont in a mitochondriate protists. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 97, 6954–6959.
- Martin, W., Müller, M., 1998. The hydrogen hypothesis for the first eukaryote. *Nature.* 392, 37–41.
- Malecki, M., Jedrzejczak, R., Stepien, P.P., Golik, P., 2007. *In vitro* reconstitution and characterization of the yeast mitochondrial degradosome complex unravels tight functional interdependence. *J. Mol. Biol.* 372, 23–36.
- Mandl, C.W., Heinz, F.X., Puchhammer-Stöckl, E., Kunz, C., 1991. Sequencing the termini of capped viral RNA by 5'-3' ligation and PCR. *Biotechniques* 10, 484–486.
- McKinney, E.A., Oliveira, M.T., 2013. Replicating animal mitochondrial DNA. *Genet. Mol. Biol.* 36, 308–315.
- Mercer, T.R., Neph, S., Dinger, M.E., Crawford, J., Smith, M.A., Shearwood, A.M., Haugen, E., Bracken, C.P., Rackham, O., Stamatoyannopoulos, J.A., Filipovska, A., Mattick, J.S., 2011. The human mitochondrial transcriptome. *Cell* 146, 645–658.

- Mereschkowsky, K., 1910. Theorie der zwei Plasmaarten als Grundlage der Symbiogenesis, einer neuen Lehre von der Entstehung der Organismen. *Biol Centralbl.* 30, 353–367.
- Meves, F., 1908. Die Chondriosomen als Träger erblicher Anlagen. Cyto- logische Studien am Huhnerembryo. *Arch. Mikr. Anal.* 72, 816–867.
- Michaelis, L., 1900. Die vitale Färbung, eine Darstellungsmethode der Zellgranula. *Arch. Mikrosk. Anal.* 55, 558–575.
- Michaels, G.S., Hauswirth W.W., Laipis, P.J., 1982. Mitochondrial DNA copy number in bovine oocytes and somatic cells. *Dev Biol.* 94, 246–251.
- Milani, L., Ghiselli, F., Guerra, D., Breton, S., Rassamonti, M., 2013. A comparative analysis of mitochondrial ORFans: new clues on their origin and role in species with Doubly Uniparental Inheritance of mitochondria. *Genome Biol. Evol.* 5, 1408–1434.
- Milani, L., Ghiselli, F., Iannello, M., Passamonti, M., 2014a. Evidence for somatic transcription of male-transmitted mitochondrial genome in the DUI species *Ruditapes philippinarum* (Bivalvia: Veneridae). *Curr. Genet.* 60, 163–173.
- Milani, L., Ghiselli, F., Maurizii, M.G., Nuzhdin, S.V., Passamonti, M., 2014b. Paternally transmitted mitochondria express a new gene of potential viral origin. *Genome Biol. Evol.* 6, 391–405.
- Milani, L., Ghiselli, F., Maurizii, M-G., Passamonti, M., 2011. Doubly uniparental inheritance of the mitochondria as a model system for studying germ line formation. *PLoS One* 6, e28194.
- Mitchell, P., Petfalski, E., Shevchenko, A., Mann, M., Tollervey, D., 1997. The Exosome: A conserved eukaryotic RNA processing complex containing multiple 3'→5' exoribonucleases. *Cell* 91, 457–466.
- Mizi, A., Zouros, E., Moschonas, N., Rodakis, G.C., 2005. The complete maternal and paternal mitochondrial genomes of the Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis*: implications for the doubly uniparental inheritance mode of mtDNA. *Mol. Biol. Evol.* 22, 952–967.
- Mizushima, N., Komatsu, M. 2011. Autophagy: renovation of cells and tissues, *Cell* 147, 728–741.
- Montoya, J., Gaines, GL., Attardi, G., 1983. The pattern of transcription of the human mitochondrial rRNA genes reveals two overlapping transcription units. *Cell* 34, 151–159.
- Moriyama, Y., Kawano, S., 2003. Rapid, selective digestion of mitochondrial DNA in accordance with the matA hierarchy of multiallelic mating types in the mitochondrial inheritance of *Physarum polycephalum*. *Genetics* 164, 963–975.
- Naimi, A., Martinez, A.S., Specq, M.L., Diss, B., Mathieu, M., Sourdain, P., 2009. Molecular cloning and gene expression of Cg-Foxl2 during the development and the adult gametogenetic cycle in the oyster *Crassostrea gigas*. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* 154, 134–142.
- Nakamura, S., Aoyama, H., van Woesik, R., 2003. Strict paternal transmission of mitochondrial DNA of *Chlamydomonas* species is explained by selection against maternal nucleoids. *Protoplasma* 221, 205–210.

- Nakatogawa, H., Suzuki, K., Kamada, Y., Ohsumi, Y. 2009. Dynamics and diversity in autophagy mechanisms: lessons from yeast, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 10, 458–467.
- Nass, M.M., Nass, S., 1963. Intramitochondrial fibers with DNA characteristics : I. fixation and electron staining reactions. *J. Cell Biol.* 19, 593–611.
- Nishimura, Y., Yoshinari, T., Naruse, K., Yamada, T., Sumi, K., Mitani, H., Higashiyama, T., Kuroiwa, T., 2006. Active digestion of sperm mitochondrial DNA in single living sperm revealed by optical tweezers, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 1382–1387.
- O'Brien, T.W., 2003. Properties of human mitochondrial ribosomes. *IUBMB Life.* 55, 505–513.
- Obata, M., Kamiya, C., Kawamura, K., Komaru, A., 2006. Sperm mitochondrial DNA transmission to both male and female offspring in the blue mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Dev. Growth Differ.* 48, 253–261.
- Obata, M., Komaru, A., 2005. Specific location of sperm mitochondria in mussel *Mytilus galloprovincialis* zygotes stained by MitoTracker. *Dev. Growth Differ.* 47, 255–263.
- Obata, M., Sano, N., Kawamura, K., Komaru, A., 2007. Inheritance of two M type mitochondrial DNA from sperm and unfertilized eggs to offspring in *Mytilus galloprovincialis*. *Dev. Growth Differ.* 49, 335–344.
- Obata, M., Sano, N., Komaru, A., 2011. Different transcriptional ratios of male and female transmitted mitochondrial DNA and tissue-specific expression patterns in the blue mussel, *Mytilus galloprovincialis*. *Dev. Growth Differ.* 53, 878–886.
- O'Hara, E.B., Chekanova, J.A., Ingle, C.A., Kushner, Z.R., Peters, E., Kushner, S.R., 1995. Polyadenylation helps regulate mRNA decay in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92, 1807–1811.
- Ojala, D., Merkel, C., Gelfand, R., Attardi, G., 1980. The tRNA genes punctuate the reading of genetic information in human mitochondrial DNA. *Cell* 22, 393–403.
- Ojala, D., Montoya, J., Attardi, G., 1981. tRNA punctuation model of RNA processing in human mitochondria. *Nature* 290, 470–474.
- Okimoto, R., Macfarlane J.L., Clary D.O., Wolstenholme, D.R. 1992. The mitochondrial genomes of two nematodes, *Caenorhabditis elegans* and *Ascaris suum*. *Genetics* 130, 471–498.
- Oshima, Y., Uno, Y., Matsuda, Y., Kobayashi, T., Nakamura, M., 2008. Molecular cloning and gene expression of Foxl2 in the frog *Rana rugosa*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 159, 170–177.
- Palade, G.E., 1952. The fine structure of mitochondria. *Anal. Rec.* 114, 427–451.
- Palade, G.E., 1953. An electron microscope study of the mitochondrial structure. *J. Histochem. Cytochem.* 1, 188–211.
- Park, M.K., Ashby, M.C., Erdemli, G., Petersen, O.H., Tepikin, A.V., 2001. Perinuclear, perigranular and sub-plasmalemmal mitochondria have distinct functions in the regulation of cellular calcium transport. *EMBO J.* 20, 1863–1874.
- Passamonti, M., 2007. An unusual case of gender-associated mitochondrial DNA heteroplasmy: the mytilid *Musculista senhousia* (Mollusca Bivalvia). *BMC Evol. Biol.* 7 Suppl 2, S7.

- Passamonti, M., Ricci, A., Milani, L., Ghiselli, F., 2011. Mitochondrial genomes and doubly uniparental inheritance: new insights from *Musculista senhousia* sex-linked mitochondrial DNAs (Bivalvia Mytilidae). *BMC Genomics* 12, 442.
- Pérez-Martín, J., Rojo, F., de Lorenzo, V., 1994. Promoters responsive to DNA bending: a common theme in prokaryotic gene expression. *Microbiol. Rev.* 58, 268–290.
- Pickworth, S., Change, M.C., 1969. Fertilization of Chinese hamster eggs in vitro. *J. Reprod. Fertil.* 19, 371–374.
- Piko, L., Matsumoto, L., 1976. Number of mitochondria and some properties of mitochondrial DNA in the mouse egg. *Dev Biol.* 49, 1–10.
- Piowowski, J., Grzechnik, P., Dziembowski, A., Dmochowska, A., Minczuk, M., Stepień, P.P., 2003. Human polynucleotide phosphorylase hPNPase, is localized in mitochondria. *J. Mol. Biol.* 329, 853–857.
- Pohjoismaki, J.L., Holmes, J.B., Wood, S.R., Yang, M.Y., Yasukawa, T., Reyes, A., Bailey, L.J., Cluett, T.J., Goffart, S., Willcox, S., Rigby, R.E., Jackson, A.P., Spelbrink, J.N., Griffith, J.D., Crouch, R.J., Jacobs, H.T., Holt, I.J., 2010. Mammalian mitochondrial DNA replication intermediates are essentially duplex but contain extensive tracts of RNA/DNA hybrid. *J. Mol. Biol.* 397, 1144–1155.
- Quesada, H., Wenne, R., Skibinski, D.O.F., 1999. Interspecies transfer of female mitochondrial DNA is coupled with role-reversals and departure from neutrality in the mussel *Mytilus trossulus*. *Mol. Biol. Evol.* 16, 655–665.
- Rawson, P.D., 2005. Nonhomologous recombination between the large unassigned region of the male and female mitochondrial genomes in the mussel, *Mytilus trossulus*. *J. Mol. Evol.* 61, 717–732.
- Reilly, J.G., Thomas, C.A. Jr., 1980. Length polymorphisms, restriction site variation, and maternal inheritance of mitochondrial DNA of *Drosophila melanogaster*. *Plasmid* 3, 109–115.
- Riginos, C., Cunningham, C.W., 2005. Local adaptation and species segregation in two mussel (*M. edulis* X *M. trossulus*) hybrid zones. *Mol. Ecol.* 14, 381–400.
- Robberson, D.L., Kasamatsu, H., Vinograd, J. 1972. Replication of mitochondrial DNA. Circular replicative intermediates in mouse L cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 69, 737–741.
- Ris, H., Plaut, W., 1962. Ultrastructure of DNA-containing areas in the chloroplast of *Chlamydomonas*. *J. Cell Biol.* 13, 383–391.
- Roberti, M., Musicco, C., Polosa, P.L., Milella, F., Gadaleta, M.N., Cantatore, P., 1998. Multiple protein-binding sites in the TAS-region of human and rat mitochondrial DNA. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 243, 36–40.
- Roe, B.A., Ma D.P., Wilson R.K., Wong, J.F., 1985. The complete nucleotide sequence of the *Xenopus laevis* mitochondrial genome. *J. Biol. Chem.* 260, 9759–9774.
- Rorbach, J., Minczuk, M., 2012. The post-transcriptional life of mammalian mitochondrial RNA. *Biochem. J.* 444, 357–373.
- Rose, K.M., Morris, H.P., Jacob, S.T., 1975. Mitochondrial poly(A) polymerase from a poorly differentiated hepatoma: purification and characteristics. *Biochemistry* 14, 1025–1032.

- Rossmannith, W., Tullo, A., Potuschak, T., Karwan, R., Sbisà, E., 1995. Human mitochondrial tRNA processing. *J. Biol. Chem.* 270, 12885–12891.
- Saavedra, C., Reyero, M.I., Zouros, E., 1997. Male-dependent doubly uniparental inheritance of mitochondrial DNA and female-dependent sex-ratio in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Genetics* 145, 1073–1082.
- Saccone, C., De Giorgi, C., Gissi, C., Pesole, G., Reyes, A., 1999. Evolutionary genomics in Metazoa: the mitochondrial DNA as a model system. *Gene* 238, 195–209.
- Sagan, L., 1967. On the origin of mitosing cells. *J Theor Biol.* 14, 255–274.
- Sager, R., Ishida, M.R., 1963. Chloroplast DNA in *Chlamydomonas*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 50, 725–730.
- Sager, R., Lane, D., 1972. Molecular basis of maternal inheritance. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 69, 2410–2413.
- Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B., Erlich, H.A., 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239, 487–491.
- Sandelin, A., Wasserman, W.W., Lenhard, B., 2004. ConSite: web-based prediction of regulatory elements using cross-species comparison. *Nucleic Acids Res.* 32 (Web Server issue), W249–W252.
- Sano, N., Obata, M., Komaru, A., 2007. Quantitation of the male and female types of mitochondrial DNA in a blue mussel, *Mytilus galloprovincialis*, using real-time polymerase chain reaction assay. *Dev. Growth Differ.* 49, 67–72.
- Sano, N., Obata, M., Komaru, A., 2010. Mitochondrial DNA transmitted from sperm in the blue mussel *Mytilus galloprovincialis* showing doubly uniparental inheritance of mitochondria, quantified by real-time PCR. *Zoolog. Sci.* 27, 611–614.
- Sasuga, J., Yokobori, S., Kaifu, M., Ueda, T., Nishikawa, K., Watanabe, K., 1999. Gene contents and organization of a mitochondrial DNA segment of the squid *Loligo bleekeri*. *J Mol Evol.* 48, 692–702.
- Sato, M., Sato, K., 2011. Degradation of paternal mitochondria by fertilization-triggered autophagy in *C. elegans* embryos. *Science* 334, 1141–1144.
- Sato, M., Sato, K., 2013. Maternal inheritance of mitochondrial DNA by diverse mechanisms to eliminate paternal mitochondrial DNA. *Biochim. Biophys. Acta* 1833, 1979–1984.
- Schimper, A.F.W., 1883. Über die Entwicklung der Chlorophyllkörner und Farbkörper. *Bot. Zeitung* 41, 105–14, 121–31, 137–46, 153–62.
- Schmitz, A., Galas, D., 1978. The interaction of RNA polymerase and lac repressor with the lac control region. *Nucleic Acids Res.* 6, 111–137.
- Schneider, A., Ebert, D., 2004. Covariation of mitochondrial genome size with gene lengths: evidence for gene length reduction during mitochondrial evolution. *J. Mol. Evol.* 59, 90–96.
- Schwartz, M., Vissing, J., 2002. Paternal inheritance of mitochondrial DNA. *N. Engl. J. Med.* 347, 576–580.
- Serb, J.M., Lydeard, C., 2003. Complete mtDNA sequence of the North American freshwater mussel, *Lampsilis ornata* (Unionidae): an examination of the evolution

- and phylogenetic utility of mitochondrial genome organization in *Bivalvia* (Mollusca). *Mol. Biol. Evol.* 20, 1854–1866.
- Shadel, G.S., Clayton, D.A., 1997. Mitochondrial DNA maintenance in vertebrates. *Annu. Rev. Biochem.* 66, 409–435.
- Shitara, H., Hayashi, J.I., Takahama, S., Kaneda, H., Yonekawa, H., 1998. Maternal inheritance of mouse mtDNA in interspecific hybrids: segregation of the leaked paternal mtDNA followed by the prevention of subsequent paternal leakage. *Genetics* 148, 851–857.
- Shitara, H., Kaneda, H., Sato, A., Inoue, K., Ogura, A., Yonekawa, H., Hayashi, J.I., 2000. Selective and continuous elimination of mitochondria microinjected into mouse eggs from spermatids, but not from liver cells, occurs throughout embryogenesis. *Genetics* 156, 1277–1284.
- Shu, Z., Vijayakumar, S., Chen, C.F., Chen, P.L., Lee, W.H., 2004. Purified human SUV3p exhibits multiple-substrate unwinding activity upon conformational change. *Biochemistry* 43, 4781–4790.
- Shutt, T.E., Gray, M.W., 2006. Bacteriophage origins of mitochondrial replication and transcription proteins. *Trends Genet.* 22, 90–95.
- Singh, H., Sen, R., Baltimor, D., Sharp, P.A., 1986. A nuclear factor that binds to a conserved sequence motif in transcriptional control elements of immunoglobulin genes. *Nature* 319, 154–158.
- Sjostrand, F.S., 1953a. Electron microscopy of mitochondria and cytoplasmic double membranes. *Nature* 171, 30–32.
- Sjostrand, F.S., 1953b. The ultrastructure of the outer segments of rods and cones of the eye as revealed by the electron microscope. *J. Cell Comp. Physiol.* 42, 15–44.
- Skibinski, D.O.F., Gallagher, C., Beynon, C.M., 1994b. Sex-limited mitochondrial DNA transmission in the marine mussel *Mytilus edulis*. *Genetics* 138, 801–809.
- Skibinski, D.O.F., Gallagher, C., Beynon, C.M., 1994a. Mitochondrial DNA inheritance. *Nature* 368, 817–818.
- Slomovic, S., Laufer, D., Geiger, D., Schuster, G., 2005. Polyadenylation and degradation of human mitochondrial RNA: the prokaryotic past leaves its mark. *Mol. Cell Biol.* 25, 6427–6435.
- Smietanka, B., Burzynski, A., 2010. Comparative genomics of marine mussels (*Mytilus* spp.). Gender associated mtDNA: rapidly evolving atp8. *J. Mol. Evol.* 71, 385–400.
- Smith, A.E., Marcker, K.A., 1968. N-Formylmethionyl transfer RNA in mitochondria from yeast and rat liver. *J. Mol. Biol.* 38, 241–243.
- Soltys, B.J., Gupta, R.S., 1992. Interrelationships of endoplasmic reticulum., mitochondria., intermediate filaments and microtubules - a quadruple fluorescence labeling study. *Biochem. Cell Biol.* 70, 1174–1186.
- Song, X.L., Ouyang, S., Zhou, C.H., Wu, X.P., 2014. Complete maternal mitochondrial genome of freshwater mussel *Anodonta lucida* (Bivalvia: Unionidae: Anodontinae). *Mitochondrial DNA* doi: 10.3109/19401736.2014.905852.
- Soroka, M., 2010. Characteristics of mitochondrial DNA of unionid bivalves (Mollusca: Bivalvia: Unionidae). II. Comparison of complete sequences of maternally

- inherited mitochondrial genomes of *Sinanodonta woodiana* and *Unio pictorum*. *Folia Malacologica* 18, 189–209.
- Soroka, M., Burzyński, A., 2010. Complete sequences of maternally inherited mitochondrial genomes in mussels *Unio pictorum* (Bivalvia, Unionidae). *J. Appl. Genet.* 51, 469–476.
- Soroka, M., Burzyński, A., 2014. Complete male mitochondrial genome of *Anodonta anatina* (Mollusca: Unionidae). *Mitochondrial DNA*. doi: 10.3109/19401736.2013.823176.
- Soroka, M., Burzyński, A., 2015. Complete female mitochondrial genome of *Anodonta anatina* (Mollusca: Unionidae): confirmation of a novel protein-coding gene (F ORF). *Mitochondrial DNA*. 26, 267–269.
- Sprinzi, M., Cramer, F., 1979. The -C-C-A end of tRNA and its role in protein biosynthesis. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 22, 1–69.
- Spradling, A., Pardue, M.L., Penman, S., 1977. Messenger RNA in heat-shocked *Drosophila* cells. *J. Mol. Biol.* 109, 559–587.
- Stanier, R.Y., 1970. Some aspects of the biology of cells and their possible evolutionary significance. *Symp. Soc. Gen. Microbiol.* 20, 1–38.
- Steege, D.A., 2000. Emerging features of mRNA decay in bacteria. *RNA* 6, 1079–1090.
- Steinborn, R., Zakhartchenko, V., Jelyazkov, J., Klein, D., Wolf, E., Müller, M., Brem, G., 1998. Composition of parental mitochondrial DNA in cloned bovine embryos. *FEBS Lett.* 426, 352–356.
- Stewart, J.B., Beckenbach, A.T., 2009. Characterization of mature mitochondrial transcripts in *Drosophila*, and the implications for the tRNA punctuation model in arthropods. *Gene* 445, 49–57.
- Stoneking, M., 2000. Hypervariable sites in the mtDNA control region are mutational hotspots. *Am. J. Hum. Genet.* 67, 1029–1032.
- Stoneking, M., Hedgecock, D., Higuchi, R.G., Vigilant, L., Erlich, H.A., 1991. Population variation of human mtDNA control region sequences detected by enzymatic amplification and sequence-specific oligonucleotide probes. *Am J Hum Genet.* 48, 370–382.
- Sutovsky, P., Schatten, G., 2000. Paternal contributions to the mammalian zygote: fertilization after sperm-egg fusion. *Int. Rev. Cytol.* 195, 1–65.
- Sutovsky, P., Moreno, R.D., Ramalho-Santos, J., Dominko, T., Simerly, C., Schatten, G., 2000. Ubiquitinated sperm mitochondria, selective proteolysis, and the regulation of mitochondrial inheritance in mammalian embryos, *Biol. Reprod.* 63, 582–590.
- Sutovsky, P., McCauley, T.C., Sutovsky, M., Day, B.N., 2003. Early degradation of paternal mitochondria in domestic pig (*Sus scrofa*) is prevented by selective proteasomal inhibitors lactacystin and MG132. *Biol Reprod.* 68, 1793–1800.
- Sutovsky, P., Moreno, R.D., Ramalho-Santos, J., Dominko, T., Simerly, C., Schatten, G., 1999. Ubiquitin tag for sperm mitochondria. *Nature* 402, 371–372.
- Taanman, J.-W., 1999. The mitochondrial genome: structure, transcription, translation and replication. *Biochim. Biophys. Acta* 1410, 103–123.

- Tait, A., Knowles, J.K.C., 1977. Characterization of mitochondrial and cytoplasmic ribosomes from *Paramecium aurelia*. *J. Cell Biol.* 173, 139–148.
- Tang, H.L., Lung, H.L., Wu, K.C., Le, A.P., Tang, H.M., Fung, M.C., 2007. Vimentin supports mitochondrial morphology and organization. *Biochemical J.* 410, 141–146.
- Temperley, R.J., Wydro, M., Lightowlers, R.N., Chrzanowska-Lightowlers, Z.M., 2010. Human mitochondrial mRNAs—like members of all families, similar but different. *Biochim. Biophys. Acta.* 1797, 1081–1085.
- Theologidis I., Fodelianakis, S., Gaspar, M.B., Zouros, E., 2008. Doubly uniparental inheritance (DUI) of mitochondrial DNA in *Donax trunculus* (Bivalvia: Donacidae) and the problem of its sporadic detection in Bivalvia. *Evolution* 62, 959–970.
- Thompson, J. D., Gibson T. J., Plewniak F., Jeanmougin F., Higgins, D.G., 1997. The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.* 24, 4876–4882.
- Thompson, W.E., Ramalho-Santos, J., Sutovsky, P. 2003. Ubiquitination of prohibitin in mammalian sperm mitochondria: possible roles in the regulation of mitochondrial inheritance and sperm quality control. *Biol Reprod.* 69, 254–260.
- Tuppen, H.A., Blakely, E.L., Turnbull, D.M., Taylor, R.W., 2010. Mitochondrial DNA mutations and human disease. *Biochim. Biophys. Acta* 1797, 113–128.
- Valverde, J.R., Marco, R., Garesse, R., 1994. A conserved heptamer motif for ribosomal RNA transcription termination in animal mitochondria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91, 5368–5371.
- Van Etten, R.A., Bird, J.W., Clayton, D.A., 1983. Identification of the 3'-ends of the two mouse mitochondrial ribosomal RNAs. The 3'-end of 16 S ribosomal RNA contains nucleotides encoded by the gene for transfer RNA^{Leu}UUR. *J. Biol. Chem.* 258, 10104–10110.
- van Verseveld, H.W., Bosma, G., 1987. The respiratory chain and energy conservation in the mitochondrion-like bacterium *Paracoccus denitrificans*. *Microbiol Sci.* 4, 329–333.
- Vanacova, S., Liston, D.R., Tachezy, J., Johnson, P.J., 2003. Molecular biology of the amitochondriate parasites, *Giardia intestinalis*, *Entamoeba histolytica* and *Trichomonas vaginalis*. *Int. J. Parasitol.* 33, 235–55.
- Venetis, C., Theologidis, I., Zouros, E., Rodakis, G.C., 2006. No evidence for presence of maternal mitochondrial DNA in the sperm of *Mytilus galloprovincialis* males. *Proc. Biol. Sci.* 273, 2483–2489.
- Venetis, C., Theologidis, I., Zouros, E., Rodakis, G.C., 2007. A mitochondrial genome with a reversed transmission route in the Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Gene* 406, 79–90.
- Verdonk, N.H., Van Den Biggelaar, J.A.M., 1983. Early development and the formation of germ layers. In Verdonk, N.H., van den Biggelaar, J.A.M., Tompa, A.S. (Eds.), *The Mollusca*, Vol. 3: Development. New York: Academic Press.
- Walberg, M. W., Clayton, D.A., 1981. Sequence and properties of the human KB cell and mouse L cell D-loop regions of mitochondrial DNA. *Nucleic Acids Res.* 9, 5411–5421.

- Wallace, D.C., 1982. Structure and evolution of organelle genomes. *Microbiol. Rev.* 46, 208–240.
- Wallace, D.C., 1999. Mitochondrial diseases in man and mouse. *Science* 283, 1482–1488.
- Wallace, D.C., 2000. Mitochondrial defects in cardiomyopathy and neuromuscular disease. *Am. Heart J.* 139, S70–S85.
- Wallace, D.C., 2005. A mitochondrial paradigm of metabolic and degenerative diseases, aging, and cancer: a dawn for evolutionary medicine. *Annu. Rev. Genet.* 39, 359–407.
- Wallace, D.C., 2007. Why do we still have a maternally inherited mitochondrial DNA? Insights from evolutionary medicine. *Annu. Rev. Biochem.* 76, 781–821.
- Wallin, I.E., 1923. The Mitochondria Problem. *The American Naturalist* 57, 255–61.
- Wallin, I.E., 1927. Symbiogenesis and the origin of species. Baltimore: Williams & Wilkins Company. p. 171.
- Wang, D., Kobayashi, T., Zhou, L., Nagahama, Y., 2004. Molecular cloning and gene expression of Foxl2 in the Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 320, 83–89.
- Wang, D.D.H., Shu, Z., Lieser, S.A., Chen, P.L., Lee, W.H., 2009. Human mitochondrial SUV3 and polynucleotide phosphorylase form a 330-kDa heteropentamer to cooperatively degrade double-stranded RNA with a 3'-to-5' directionality. *J. Biol. Chem.* 284, 20812–20821.
- Wang, G., Cao, X., Li, J., 2013. Complete F-type mitochondrial genome of Chinese freshwater mussel *Lamprotula tortuosa*. *Mitochondrial DNA* 24, 515–513.
- Wang, G., Guo, L., Li, J., 2014a. The F-type mitochondrial genome of *Arconaia lanceolata*. *Mitochondrial DNA* doi: 10.3109/19401736.2014.892098.
- Wang, G., Chen, M., Li, J., 2014b. Complete F-type mitochondrial genome of freshwater mussel *Lanceolaria glayana*. *Mitochondrial DNA* doi: 10.3109/19401736.2014.919470.
- Wang, H., He, L., Yang, X., Yang, S., Li, C., Wang, X., 2014c. Determination of the complete mitochondrial genome sequence of mussel *Cristaria plicata* (Leach). *Mitochondrial DNA*. doi: 10.3109/19401736.2014.953100.
- Wei, M., Yang, S., Yu, P., Wan, Q., 2014. The complete mitochondrial genome of *Hyriopsis cumingii* (Unionoida: Unionidae): genome description and related phylogenetic analyses. *Mitochondrial DNA* doi: 10.3109/19401736.2014.963804.
- Whatley, J.M., 1976. Bacteria and nuclei in *Pelomyxa palustris*: comments on the theory of serial endosymbiosis. *New Phytologist* 111–120.
- White, D.J., Wolff, J.N., Pierson, M., Gemmell, N.J., 2008. Revealing the hidden complexities of mtDNA inheritance. *Mol. Ecol.* 17, 4925–4942.
- Wolstenholme, D.R., 1992. Animal mitochondrial DNA: structure and evolution. *Int. Rev. Cytol.* 141, 173–216.
- Xu, J., 2005. The inheritance of organelle genes and genomes: patterns and mechanisms. *Genome* 48, 951–958.
- Yanagimachi, R., Kamiguchi, Y., Sugawara, S., Mikamo, K., 1983. Gametes and fertilization in Chinese hamster. *Gamete Res.* 8, 97–117.

- Yang, D., Oyaizu, Y., Oyaizu, H., Olsen, G.J., Woese, C.R., 1985. Mitochondrial origins. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 82, 4443–4447.
- Yang, M.Y., Bowmaker, M., Reyes, A., Vergani, L., Angeli, P., Gringeri, E., Jacobs, H.T., Holt, I.J., 2002. Biased incorporation of ribonucleotides on the mitochondrial L-strand accounts for apparent strand-asymmetric DNA replication. *Cell* 111, 495–505.
- Yasukawa, T., Reyes, A., Cluett, T.J., Yang, M.Y., Bowmaker, M., Jacobs, H.T., Holt, I.J. 2006. Replication of vertebrate mitochondrial DNA entails transient ribonucleotide incorporation throughout the lagging strand. *EMBO J.* 25, 5358–5371.
- Yokobori, S., Pääbo, S., 1995. Transfer RNA editing in land snail mitochondria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92, 10432–10435.
- Youle, R.J., Narendra, D.P., 2011. Mechanisms of mitophagy. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 12, 9–14.
- Zbawicka, M., Burzynski, A., Skibinski, D., Wenne, R., 2010. Scottish *Mytilus trossulus* mussels retain ancestral mitochondrial DNA: Complete sequences of male and female mtDNA genomes. *Gene* 456, 45–53.
- Zbawicka, M., Burzyński, A., Wenne, R., 2007. Complete sequences of mitochondrial genomes from the Baltic mussel *Mytilus trossulus*. *Gene* 406, 191–198.
- Zbawicka, M., Wenne, R., Burzynski, A., 2014. Mitogenomics of recombinant mitochondrial genomes of Baltic Sea *Mytilus* mussels. *Mol. Genet. Genomics.* 289, 1275–1287.
- Zhang, Z., Schwartz, S., Wagner, L., Miller, W., 2000. A greedy algorithm for aligning DNA sequences. *J. Comput. Biol.* 7, 203–214.
- Zhao, X., Chu, M., Li, N., Wu, C., 2001. Paternal inheritance of mitochondrial DNA in the sheep (*Ovine aries*). *Sci. China C Life Sci.* 44, 321–326.
- Zhou, Q., Li, H., Xue, D., 2011. Elimination of paternal mitochondria through the lysosomal degradation pathway in *C. elegans*. *Cell Res.* 21, 1662–1669.
- Zillig, W., Klenk, H.-P., Palm, P., Leffers, H., Pühler, G., Gropp, F., Garrett, R.A., 1989. Did eukaryotes originate by a fusion event? *Endocytobiosis Cell Res.* 6, 1–25.
- Zouros, E., 2000. The exceptional mitochondrial DNA system of the mussel family Mytilidae. *Genes Genet. Syst.* 75, 313–318.
- Zouros, E., 2013. Biparental inheritance through uniparental transmission: the Doubly Uniparental Inheritance (DUI) of mitochondrial DNA. *Evol. Biol.* 40, 1–31.
- Zouros, E., Ball, A.O., Saavedra, C., Freeman, K.R., 1994a. Mitochondrial DNA inheritance. *Nature* 368, 818.
- Zouros, E., Ball, A.O., Saavedra, C., Freeman, K.R., 1994b. An unusual type of mitochondrial DNA inheritance in the blue mussel *Mytilus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 91, 7463–7467.
- Zouros, E., K. R. Freeman, Ball, A.O., Pogson, G.H., 1992. Direct evidence for extensive paternal mitochondrial DNA inheritance in the marine mussel *Mytilus*. *Nature.* 359, 412–414.

- Θεολογίδης, Ι., 2007. Η αναστροφή του τρόπου μεταβίβασης του μιτοχονδριακού DNA στα δίθυρα και οι φυλογενετικές της προεκτάσεις. Διδακτορική Διατριβή. Ηράκλειο.
- Κραββαρίτη, Ε., 2002. Οργάνωση και ρύθμιση της έκφρασης πρωιμων γονιδιων του χοριου του μεταξοσκωληκα *Bombyx mori*. Διδακτορική Διατριβή. Αθήνα.
- Μαργαρίτης, Χ.Λ., Γαλανόπουλος Β.Κ., Μαρίνος Ε.Σ., Παπασιδέρη Ι.Σ., Στραβοπόδης Δ.Ι., και Τρουγκάκος, Ι. Π., 2004. Βιολογία Κυττάρου. Ιατρικές Εκδόσεις Λίτσας, Αθήνα.
- Μίζη, Α., 2007. Το φαινόμενο της Διπλής Μονογονεϊκής Κληρονομικότητας του μιτοχονδριακού DNA: Μοριακή ανάλυση της πλήρους νουκλεοτιδικής αλληλουχίας δύο ομοειδικών μιτοχονδριακών γονιδιωμάτων με διαφορετικές οδούς κληρονόμησης στο είδος *Mytilus galloprovincialis*. Διδακτορική Διατριβή. Αθήνα.

8. Παράρτημα

Σχηματική απεικόνιση διαδικασίας δημιουργίας χιμαιρικών ανιχνευτών μέσω PCR επέκτασης αλληλοεπικαλυπτόμενων τμημάτων (βλέπε [Ενότητα 2.6.2.](#)). Όλοι οι εκκινητές παρουσιάζονται με μπλε χρώμα. Οι χιμαιρικοί εκκινητές εμφανίζονται στη μέση των αλληλουχιών, ενώ οι μη-χιμαιρικοί – στα άκρα.

Ανιχνευτής Del-As

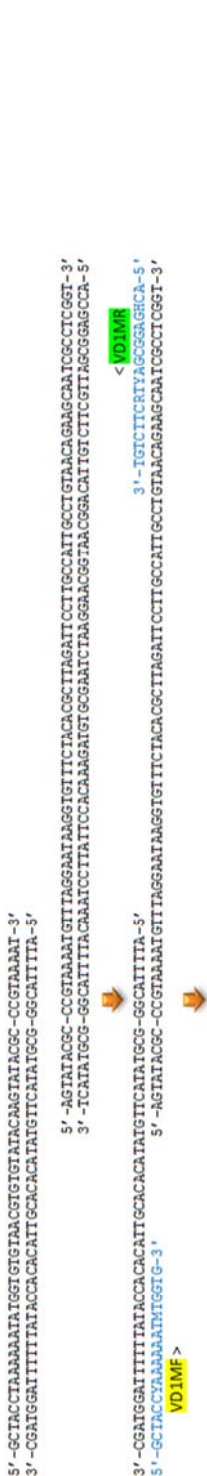
Βήμα 1 (PCR 1 και PCR 2)

Υπόστρωμα: *Mytilus* M-type mtDNA (VD1)



Βήμα 2 (PCR 3)

Υπόστρωμα: προϊόντα από PCR 1 και PCR 2



Del-As:



Ανιχνευτής R2-As-VD1M

Βήμα 1 (σύνθεση αλληλουχίας και PCR 1)

Σχεδιασμός και παραγγελία για σύνθεση, μονόκλωνης αλληλουχίας (Ran) που θα αποτελέσει το τμήμα αριστερά των αδενίων. Η αλληλουχία αυτή αποτελείται από ένα ολιγονουκλεοτίδιο τυχαίας αλληλουχίας 46 νουκλεοτιδίων: `AGTTTTACGCCCCAAAGCATAAACGAGGACGTCATGAAAGTCTT` (το οποίο ελήφθη από online αλγόριθμο που σχεδιάζει τυχαίες αλληλουχίες συγκεκριμένου μήκους, το Random DNA Sequence Generator <https://www.faculty.ucr.edu/~mmaduro/random.htm>), από την αλληλουχία των αδενίων (27 αδενίνες) και τρία νουκλεοτίδια που τηρήματος δεξιά των αδενίων, για να εξασφαλιστεί ότι ο αριθμός των αδενίων δεν θα αλλάξει μετά από την αντίδραση PCR.

Ran: 5'-AGTTTTACGCCCCAAAGCATAAACGAGGACGTCATGAAAGTCTTAAATAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAACCG-3'

PCR 1

Υπόστρωμα: *Mytilus* M-type mtDNA (VD1)

```

5'-GCTACTAATAAATAATGGTGTACGTGTGTAATACAGTATACGCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAACCGTAAATGTTTAGAATAAGGTGTTTACACGCTTAGAATCCTTGCCATTCCTGTACAGAGCAATCGCTCGGT-3'
3'-CGATGGATTTTTTAAACCAACATTCACACATATGTTCAATATCGGTTTTTTTTTTTTTTTTTTTGGCAATTTACAAATCCTTATCCAAAGATGTGGRAATCTAAGGACGGTAAAGGCAATGTCTTCGTAGCGGAGCCA-5'
5'-AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAACCGTAAATGTTTAGAATAAG-3'
Chimera-F >
    < VD1MR
    3'-TGTCTTCBTYAGCGGAGHCA-5'
    
```

Βήμα 2 (PCR 2)

Υπόστρωμα: Ran και προϊόν από PCR 1

```

5'-AGTTTTACGCCCAANGCATAAAGGAGGACGTCATGAAAGTCTTAAATAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAACCG-3'
3'-TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTGGCAATTTACAAATCCTTATCCAAAGATGTGGRAATCTAAGGACGGTAAAGGCAATGTCTTCGTAGCGGAGCCA-5'
5'-AGTTTTACGCCCAANGCATAAAGGAGGACGTCATGAAAGTCTTAAATAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAACCG-3' -----> επέκταση με Taq πολυμεράση κατά την PCR2
επέκταση με Taq πολυμεράση κατά την PCR2
5'-AGTTTTACGCCCAANGCATAAAGGAGGACGTCATGAAAGTCTTAAATAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAACCG-3' -----> επέκταση με Taq πολυμεράση κατά την PCR2
επέκταση με Taq πολυμεράση κατά την PCR2
5'-AGTTTTACGCCCAANGCATAAAGGAGGACGTCATGAAAGTCTTAAATAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAACCGTAAATGTTTAGAATAAGGTGTTTACACGCTTAGAATCCTTGCCATTCCTGTACAGAGCAATCGCTCGGT-3'
3'-TCAAAAGTGGGGTTTCGTAATTCGCTCCTCGTCACTTTCAGAAATTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTGGCAATTTACAAATCCTTATCCAAAGATGTGGRAATCTAAGGACGGTAAAGGCAATGTCTTCGTAGCGGAGCCA-5'
5'-AGTTTTACGCCCAANGCAT-3'
Ran-F >
    < VD1MR
    3'-TGTCTTCBTYAGCGGAGHCA-5'
    
```

R2-As-VD1M:

```

5'-AGTTTTACGCCCAANGCATAAAGGAGGACGTCATGAAAGTCTTAAATAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAACCGTAAATGTTTAGAATAAGGTGTTTACACGCTTAGAATCCTTGCCATTCCTGTACAGAGCAATCGCTCGGT-3'
3'-TCAAAAGTGGGGTTTCGTAATTCGCTCCTCGTCACTTTCAGAAATTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTGGCAATTTACAAATCCTTATCCAAAGATGTGGRAATCTAAGGACGGTAAAGGCAATGTCTTCGTAGCGGAGCCA-5'
    
```


ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

ΕΛΕΝΗ ΚΥΡΙΑΚΟΥ

ΠΡΟΣΩΠΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ

Ημερομηνία γέννησης:	11-05-1987
E-mail:	ekyriakou@biol.uoa.gr
Τηλέφωνο:	εργαστήριο:+30 210 7274745 / κινητό:+30 6979031604

ΣΠΟΥΔΕΣ

2010-σήμερα	Υποψήφια Διδάκτωρ Τομέας Βιοχημείας και Μοριακής Βιολογίας, Τμήμα Βιολογίας, ΕΚΠΑ Θέμα: «Μοριακή προσέγγιση δομικών και λειτουργικών στοιχείων του μιτοχονδριακού DNA του <i>Mytilus galloprovincialis</i> » υπό την επίβλεψη του Καθηγητή Γεώργιου Κ. Ροδάκη
2005-2009	Πτυχίο Βιολογίας Πανεπιστήμιο Αθηνών, Τμήμα Βιολογίας 2009 Βαθμός Πτυχίου: 7,31/10 (Λίαν Καλώς) Διπλωματική εργασία: «Μελέτη της μη αναμενόμενης παρουσίας του πατρικού (Μ μορίου) του μιτοχονδριακού DNA σε σωματικούς ιστούς αρσενικών ατόμων του είδους <i>Mytilus galloprovincialis</i> ». Επιβλέπων: Καθηγητής Γεώργιος Κ. Ροδάκης
2002-2005	Απόφοιτος 1 ^{ου} Λυκείου Νέας Σμύρνης 2005 Βαθμός Απολυτηρίου: 19/20 (Άριστα)

ΕΠΙΠΡΟΣΘΕΤΗ ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΜΠΕΙΡΙΑ

2009-2011	Συμμετοχή στο ερευνητικό έργο «Προσδιορισμός του 3' άκρου μιτοχονδριακών mRNA στο δίθυρο μαλάκιο <i>Mytilus galloprovincialis</i> » που αποτελούσε αντικείμενο μεταδιδακτορικής έρευνας της Δρ. Ευανθίας Χατζόγλου υπό την επίβλεψη του Καθηγητή Γεώργιου Κ. Ροδάκη.
2009-2010	Συνέχιση έρευνας στο θέμα της διπλωματικής εργασίας με σκοπό τη δημοσίευση της συνολικής ερευνητικής δουλειάς σε ξένο επιστημονικό περιοδικό.

ΜΕΛΟΣ ΕΤΑΙΡΕΙΩΝ

2011-σήμερα	Αργό Μέλος της Ελληνικής Εταιρείας Βιοχημείας και Μοριακής Βιολογίας.
-------------	-----------------------------------------------------------------------

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΟ ΠΕΔΙΟ/ΕΝΔΙΑΦΕΡΟΝΤΑ

- Μοριακή Βιολογία, Εξελικτική Βιολογία, Μοριακή Εξέλιξη.
- Προσδιορισμός και ανάλυση της πρωτοδιάταξης νουκλεϊκών οξέων του μιτοχονδριακού DNA των Μεταζώων.
- Ανάλυση και σύγκριση νουκλεϊκών οξέων σε επίπεδο οργανισμού και πληθυσμού,

διεξαγωγή εξελικτικών σχέσεων και προσδιορισμός πιθανών εξελικτικών μηχανισμών.

- Μελέτη αλληλεπιδράσεων μιτοχονδριακού DNA-πρωτεϊνών στα πλαίσια διερεύνησης εξελικτικών υποθέσεων.
-

ΓΝΩΣΗ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΩΝ ΤΕΧΝΙΚΩΝ

- Απομόνωση ολικού DNA extraction από διάφορους ιστούς
 - Απομόνωση ολικού RNA από διάφορους ιστούς
 - Απομόνωση πλασμιδιακού DNA
 - Κλωνοποίηση περιοριστικών θραυσμάτων DNA
 - Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης (DNA και RNA)
 - Βακτηριακός μετασχηματισμός
 - Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)
 - Αντίστροφη μεταγραφή του RNA (RT-PCR)
 - Στοιχισμός αλληλουχιών και εκτίμηση εξελικτικών σχέσεων
 - Κλασμάτωση σπέρματος με περκόλη – καθαρισμός σπερματοζωαρίων
 - Απομόνωση πρωτεϊνών από διάφορους ιστούς
 - Απομόνωση ζώνης από πήκτωμα αγαρόζης
 - Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης (SDS-PAGE και native PAGE)
 - Ραδιοσήμανση DNA τμημάτων
 - Αυτοραδιογραφία
 - Έλεγχος μείωσης κινητικότητας συμπλόκου (EMSA)
 - Μέθοδος αποτυπώματος (DNase I footprinting DNA)
 - Ανάλυση Southwestern
 - 5' RACE και 3'RACE
-

ΔΙΔΑΚΤΙΚΗ ΕΜΠΕΙΡΙΑ

- Συμμετοχή στη διεξαγωγή εργαστηριακών ασκήσεων προπτυχιακών φοιτητών του Τμήματος Βιολογίας στο υποχρεωτικό μάθημα: «Εισαγωγή στη Μοριακή Βιολογία» καθώς και του Τμήματος Φαρμακευτικής στο υποχρεωτικό μάθημα: «Βιοχημεία»
 - Διδασκαλία μαθημάτων βιολογίας σε μαθητές λυκείου.
-

ΕΠΙΠΡΟΣΘΕΤΕΣ ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ

Ξένες γλώσσες	Αγγλικά (Cambridge & Michigan Proficiency) Γερμανικά (Zertifikat) Ρώσικα (excellent (native) speaker)
Μεταφραστική εμπειρία	Διεκπεραίωση μεταφράσεων από τα Αγγλικά διπλωμάτων ευρεσιτεχνίας βιολογικού, φαρμακολογικού και ιατρικού περιεχομένου.
Γνώσεις Η/Υ	<ul style="list-style-type: none">▪ Άριστη γνώση χρήσης Η/Υ με λειτουργικά συστήματα Windows και Mac OS. Άριστη γνώση του πακέτου προγραμμάτων Ms-Office (2010, 2007, 2003, και παλαιότερων εκδόσεων), προγραμμάτων επεξεργασίας ήχου και εικόνας (π.χ., Adobe Photoshop, CorelDraw suit, κ.α.) προγραμμάτων κατασκευής και ενημέρωσης διαδικτυακών τόπων, καθώς και σειράς ειδικών προγραμμάτων για αναζήτηση δεδομένων σε επιστημονικές βάσεις πληροφοριών και ανάλυσης αλληλουχιών πρωτεϊνών και νουκλεϊκών οξέων.▪ Σεμινάριο Matlab. Υπολογιστικό Κέντρο. Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών. 10 Οκτωβρίου 2012.

**Εθελοντική
εργασία**

- Δημιουργία ιστοσελίδας βάσης δεδομένων βιβλιογραφίας:
http://users.uoa.gr/~grodakis/DUI_SITE/enter.htm
Συμμετοχή σε πρόγραμμα εθελοντικής εργασίας στο Θαλάσσιο Πάρκο Ζακύνθου.

ΥΠΟΤΡΟΦΙΕΣ/ΒΡΑΒΕΙΑ

2014	Υποτροφία από την Ελληνική Εταιρεία Βιοχημείας και Μοριακής Βιολογίας για τη συμμετοχή στο 65 ^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Ελληνικής Εταιρείας Βιοχημείας & Μοριακής Βιολογίας. 28-30 Νοεμβρίου, 2014. Θεσσαλονίκη.
2014	Υποτροφία από την εταιρεία Federation of European Biochemical Societies (FEBS) για τη συμμετοχή στο Συνέδριο FEBS EMBO Conference. 30 Αυγούστου – Σεπτεμβρίου 2014. Παρίσι, Γαλλία.
2013	Βραβείο καλύτερης προφορικής ανακοίνωσης στο 1 ^ο Φόρουμ Νέων Επιστημόνων της Ελληνικής Εταιρείας Βιοχημείας και Μοριακής Βιολογίας. 5 Δεκεμβρίου 2013. Αθήνα.
2013	Υποτροφία από την εταιρεία Federation of European Biochemical Societies (FEBS) για τη συμμετοχή στο 13 th Young Scientists Forum & 38 th FEBS Congress, 3-11 Ιουλίου, 2013. Αγία Πετρούπολη, Ρωσία.
2012	Υποτροφία από την Ελληνική Εταιρεία Βιοχημείας και Μοριακής Βιολογίας για τη συμμετοχή στο 63 ^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Ελληνικής Εταιρείας Βιοχημείας & Μοριακής Βιολογίας. 9-11 Νοεμβρίου, 2012. Ίδρυμα Τεχνολογίας και Έρευνας. Ηράκλειο, Κρήτη.
2010-2014	Υπότροφος για μεταπτυχιακές σπουδές στην Ελλάδα, σε βάρος των εσόδων της Κληρονομιάς Αντωνίου Παπαδάκη.

ΠΕΡΙΛΗΨΕΙΣ ΣΕ ΣΥΝΕΔΡΙΑ

2014	<u>Kyriakou, E., L. Kravariti, E. Zouros and G. C. Rodakis.</u> New insights into Doubly Uniparental Inheritance of mitochondrial DNA: a protein binding site in the M genome of <i>Mytilus</i> is responsible for its paternal transmission. 65 th Hellenic Society for Biochemistry and Molecular Biology Conference. November 28-30, 2014. Thessaloniki, Greece.
2014	<u>Kyriakou, E., E. Chatzoglou, E. Zouros and G. C. Rodakis.</u> The first complete transcriptome study of the two mitochondrial genomes of a species with Doubly Uniparental Inheritance (DUI) of mtDNA: unique features unveiled. FEBS EMBO Conference. 30 August -4 September, 2014. Paris, France.
2013	<u>Kyriakou, E., E. Chatzoglou, E. Zouros and G. C. Rodakis.</u> The first complete transcriptome study of a female and a male transmitted mitochondrial genome of a species with Doubly Uniparental Inheritance (DUI) of mtDNA. 1 st Young Scientists Forum & 64 th Hellenic Society for Biochemistry and Molecular Biology Conference. December 6-8, 2013. Athens, Greece.
2013	<u>Kyriakou, E., L. Kravariti, E. Zouros and G. C. Rodakis.</u> Sex-specific mtDNA-protein interactions in a system of obligatory biparental mtDNA inheritance and the exceptional role of perinuclear mitochondria. 13 th Young Scientists Forum & 38 th FEBS Congress. July 3-11, 2013. St. Petersburg, Russia.
2012	<u>Κυριακού, Ε., Λ. Κραββαρίτη, Ε. Ζούρος και Γ. Κ. Ροδάκης.</u> Περιπυρηνικά μιτοχόνδρια περιέχουν πρωτεΐνες που προσδέονται σε μιτοχονδριακό DNA, υπεύθυνες για την πατρική κληρονομία σε ένα σύστημα υποχρεωτικής διγονεϊκής κληρονομίας του μιτοχονδριακού DNA. 63 ^ο Πανελλήνιο

	Συνέδριο Ελληνικής Εταιρείας Βιοχημείας & Μοριακής Βιολογίας. 9-11 Νοεμβρίου, 2012. Ηράκλειο.
2011	Χατζόγλου Ε., <u>Ε. Κυριακού</u> , Ε. Ζούρος και Γ. Κ. Ροδάκης. 2011. Προσδιορισμός των 5' και 3' άκρων των μιτοχονδριακών mRNAs στο δίθυρο μαλάκιο <i>Mytilus galloprovincialis</i> , ένα είδος με δύο μιτοχονδριακά γονιδιώματα. 62 ^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Ελληνικής Εταιρείας Βιοχημείας & Μοριακής Βιολογίας. 9-11 Δεκεμβρίου, 2011. Αθήνα.
2011	<u>Κυριακού, Ε.</u> , Λ. Κραββαρίτη, Ε. Ζούρος και Γ. Κ. Ροδάκης. 2011. Φυλοειδικές αλληλεπιδράσεις μιτοχονδριακού DNA-πρωτεϊνών: ενδείξεις για έναν μοναδικό μηχανισμό κληρονομησης του μιτοχονδριακού DNA. 62 ^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Ελληνικής Εταιρείας Βιοχημείας & Μοριακής Βιολογίας. 9-11 Δεκεμβρίου, 2011. Αθήνα.
2011	<u>Κυριακού, Ε.</u> , Λ. Κραββαρίτη, Ε. Ζούρος και Γ. Κ. Ροδάκης. 2011. Εντοπισμός φυλοειδικών περιοχών πρόσδεσης πρωτεϊνικών παραγόντων στο μιτοχονδριακό DNA του <i>Mytilus galloprovincialis</i> . 33 ^ο Επιστημονικό Συνέδριο της Ελληνικής Εταιρείας Βιολογικών Επιστημών. 19-21 Μαΐου, 2011. Έδεσσα.
2010	Χατζόγλου Ε., <u>Κυριακού, Ε.</u> , Ε. Ζούρος και Γ. Κ. Ροδάκης. 2010. Προσδιορισμός του 3' άκρου του μιτοχονδριακού mRNA στο δίθυρο μαλάκιο <i>Mytilus galloprovincialis</i> . 32 ^ο Επιστημονικό Συνέδριο της Ελληνικής Εταιρείας Βιολογικών Επιστημών. 20-22 Μαΐου, 2010. Καρπενήσι.
2009	<u>Κυριακού, Ε.</u> , Ε. Ζούρος και Γ. Κ. Ροδάκης. 2009. Επιγενετικές μεταλλαγές του πατρικού mtDNA κατά την οντογένεση του <i>Mytilus galloprovincialis</i> . 31 ^ο Επιστημονικό Συνέδριο της Ελληνικής Εταιρείας Βιολογικών Επιστημών. 14-16 Μαΐου, 2009. Πάτρα.

ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ ΣΕ ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΑ ΠΕΡΙΟΔΙΚΑ

2015	<u>Kyriakou, E.</u> , L. Kravariti, T. Vassilopoulos, E. Zouros and G. C. Rodakis. 2015. A protein binding site in the M mitochondrial genome of <i>Mytilus</i> is essential for its paternal transmission. Gene . 562: 83–94.
2014	<u>Kyriakou, E.</u> , E. Chatzoglou, G. C. Rodakis and E. Zouros. 2014. Does the ORF in the control region of <i>Mytilus</i> mtDNA code for a protein product?. Gene . 546: 448–450.
2014	<u>Kyriakou, E.</u> , E. Chatzoglou, E. Zouros and G. C. Rodakis. 2014. The rRNA and tRNA transcripts of maternally and paternally inherited mtDNAs of <i>Mytilus galloprovincialis</i> suggest presence of a 'degradosome' in mussel mitochondria and necessitate the re-annotation of the l-rRNA/CR boundary. Gene . 540: 78–85.
2013	<u>Kyriakou, E.</u> , L. Kravariti, E. Zouros and G. C. Rodakis. 2013. Sex-specific mtDNA-protein interactions in a system of obligatory biparental mtDNA inheritance and the exceptional role of perinuclear mitochondria. FEBS Journal . 280: 260.
2013	Chatzoglou, E., E. <u>Kyriakou, E.</u> Zouros and G. C. Rodakis. 2013. The mRNAs of maternally and paternally inherited mtDNAs of the mussel <i>Mytilus galloprovincialis</i> : Start/end points and polycistronic transcripts. Gene . 520: 156–165.
2010	<u>Kyriakou, E.</u> , E. Zouros and G. C. Rodakis. 2010. The atypical presence of the paternal mitochondrial DNA in somatic tissues of male and female individuals of the blue mussel species <i>Mytilus galloprovincialis</i> . BMC Res. Notes . 3: 222.



The rRNA and tRNA transcripts of maternally and paternally inherited mitochondrial DNAs of *Mytilus galloprovincialis* suggest presence of a “degradosome” in mussel mitochondria and necessitate the re-annotation of the *l-rRNA*/CR boundary



Eleni Kyriakou^a, Evanthia Chatzoglou^a, Eleftherios Zouros^b, George C. Rodakis^{a,*}

^a Department of Biochemistry and Molecular Biology, National and Kapodistrian University of Athens, Panepistimioupolis, 15701 Athens, Greece

^b Department of Biology, University of Crete, 71409 Heraklion, Crete, Greece

ARTICLE INFO

Article history:

Received 4 October 2013

Received in revised form 15 January 2014

Accepted 21 January 2014

Available online 19 February 2014

Keywords:

Bivalvia

Mytilus

Doubly uniparental inheritance

mtDNA control region

Mitochondrial RNA transcripts

RNA transcript degradation

Degradosome

ABSTRACT

Species of the genus *Mytilus* carry two mitochondrial genomes in obligatory coexistence; one transmitted through the eggs (the F type) and one through the sperm (the M type). We have studied the 3' and 5' ends of rRNA and tRNA transcripts using RT-PCR and RNA circularization techniques in both the F and M genomes of *Mytilus galloprovincialis*. We have found polyadenylated and non-adenylated transcripts for both ribosomal and transfer RNAs. In all these genes the 5' ends of the transcripts coincided with the first nucleotide of the annotated genes, but the 3' ends were heterogeneous. The *l-rRNA* 3' end is 47 or 48 nucleotides upstream from the one assigned by a previous annotation, which makes the adjacent first domain (variable domain one, VD1) of the main control region (CR) correspondingly longer. We have observed *s-rRNA* and *l-rRNA* transcripts with truncated 3' end and polyadenylated tRNA transcripts carrying the CCA trinucleotide. We have also detected polyadenylated RNA remnants carrying the sequences of the control region, which strongly suggests RNA degradation activity and thus presence of degradosomes in *Mytilus* mitochondria.

© 2014 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Animal mitochondrial DNA (mtDNA) is typically a small (15–20 kb), circular molecule, containing 37 genes: 13 protein genes participating in the formation of respiratory chain complexes, two rRNA genes (*l-rRNA* and *s-rRNA*) encoding the RNA components of the ribosomal subunits

and 22 tRNA genes, necessary for the mitochondrial protein synthesis. A large non-coding region is also a common characteristic of animal mtDNA, known as “control region” for hosting replication and transcription control elements. However, some animal mtDNAs lack a single large non-coding region and instead have several small non-coding regions, probably exhibiting similar functions (Boore, 1999; Hatzoglou et al., 1995).

Transcription of mtDNA results in the formation of one or more polycistronic primary transcripts, depending on the distribution of genes in the two strands and the number of transcription promoters. In human mtDNA, genes are located on both strands (termed “heavy” and “light” on the basis of their G + T content), and transcribed by three promoters, resulting in the formation of three polycistronic transcripts (Montoya et al., 1982, 1983). In *Drosophila melanogaster*, where mtDNA genes are also distributed in both strands, five polycistronic transcripts are suggested to be produced (Berthier et al., 1986; Stewart and Beckenbach, 2009). The primary transcript is cleaved at specific points, as suggested by the “tRNA punctuation model” (Ojala et al., 1981) for the excision of mRNAs, rRNAs, tRNAs and RNA remnants corresponding to noncoding regions (Slomovic et al., 2005). Mitochondrial mRNAs are then polyadenylated at their 3' end, but there appears to be no post-transcriptional modification at their 5' end (Grohmann et al., 1978).

Abbreviations: AMV, avian myeloblastosis virus; ATP, adenosine triphosphate; ATP6, ATP synthase subunit 6; bp, base pairs; CD, conserved domain; cDNA, complementary DNA; CR, main control region of mitochondrial DNA; D-loop, displacement loop; DNA, deoxyribonucleic acid; DNase, deoxyribonuclease; dNTP, deoxyribonucleotide triphosphate; DTT, dithiothreitol; DUI, doubly uniparental inheritance; EST, expressed sequence tag; F-type genome, maternally transmitted mitochondrial genome; G + T, percentage of guanine and thymidine; kb, kilobases; LB, lysogeny broth (a bacteria growth medium); *l-rRNA*, large ribosomal RNA gene; mRNA, messenger RNA; mtDNA, mitochondrial DNA; M-type genome, paternally transmitted mitochondrial genome; ND4L, nicotinamide adenine dinucleotide dehydrogenase subunit 4 L; PAP, poly(A) polymerase; PCR, polymerase chain reaction; PNPase, polynucleotide phosphorylase; poly(A), polyadenosine; RACE, rapid amplification of cDNA ends; RNA, ribonucleic acid; RNase, ribonuclease; rRNA, ribosomal RNA; RTPCR, reverse transcription PCR; *s-rRNA*, small ribosomal RNA gene; tRNA, transfer RNA gene; *tRNA^{Asp}*, tRNA gene for aspartic acid; *tRNA^{Gly}*, tRNA gene for glycine; *tRNA^{Phe}*, tRNA gene for phenylalanine; *tRNA^{Thr}*, tRNA gene for threonine; *tRNA^{Tyr}*, tRNA gene for tyrosine; u, units; VD1, variable domain 1; VD2, variable domain 2.

* Corresponding author. Tel.: +30 210 7274617; fax: +30 210 7274158.

E-mail address: grodakis@biol.uoa.gr (G.C. Rodakis).

In addition to mitochondrial mRNAs, adenylation has been observed in rRNAs and tRNAs. In the two mitochondrial rRNAs the extent of adenylation varies. Oligoadenylation (namely the addition of no more than 10 adenines) was reported in humans (Dubin et al., 1982; Temperley et al., 2010), mouse (Van Etten et al., 1983) and codfish (Bakke and Johansen, 2002; Coucheron et al., 2011), while polyadenylation (addition of more than 10 adenines) was reported in humans (Mercer et al., 2011; Ojala et al., 1981; Slomovic et al., 2005) and *Drosophila* (Benkel et al., 1988; Berthier et al., 1986; Spradling et al., 1977), but complete absence of adenylation was also reported in *Drosophila* (Berthier et al., 1986). Oligoadenylation at the 3' end has been suggested to precede the appearance of long poly(A) tails, but how this extension occurs remains unclear (Piwowarski et al., 2003). In some cases mitochondrial tRNA genes that have incomplete 3' ends are completed post-transcriptionally by polyadenylation (Hatzoglou et al., 1995; Yokobori and Pääbo, 1995).

The role of polyadenylation of the 3' end of transcripts, though crucial, is yet to be deciphered (Bobrowicz et al., 2008). It is clearly necessary for the completion of the translation stop codon when the gene encodes only the first or only the first two nucleotides of the stop codon (Coucheron et al., 2011; Ojala et al., 1981; Stewart and Beckenbach, 2009), but these represent only a minority of cases. Currently, strong evidence suggests that polyadenylation has a dual and opposite role: it promotes the stability of the transcript and offers a target for the initiation of degradation. The role for stability is well established for mRNAs where it is necessary for efficient translation. The role for degradation is also well established for various types of RNAs including post-translational degradation of mRNAs (Blum et al., 1999; Bollenbach et al., 2004; Steege, 2000).

In eukarya and archaea degradation of RNAs is mediated by a multi-protein complex known as exosome and in bacteria by a similar but simpler complex known as degradosome (Carpousis, 2007; LaCava et al., 2005; Malecki et al., 2007; Mitchell et al., 1997; Rorbach and Minczuk, 2012). Degradosomes have been described in *Escherichia coli* (Carpousis, 2007), and also in yeast mitochondria (Malecki et al., 2007). However, the existence of mitochondrial degradosomes is still unclear for the majority of species. This is mainly because the subunit composition of degradosomes is not conserved. Among the core components, degradosomes are considered to be: an RNA helicase, for the unwinding of double-stranded RNA, a PNPase (polynucleotide phosphorylase) and a 3'→5' exonuclease (Bobrowicz et al., 2008). An endoribonuclease (RNase E) is also considered to be a part of *E. coli* degradosome (Coburn et al., 1999; O'Hara et al., 1995). As noted, the necessary condition for the functioning of the degradosome is the existence of a poly(A) tail, the addition of which is carried out by a poly(A) polymerase (PAP), or by PNPase itself (Slomovic et al., 2005). Homologues of some of these components were also found in human mitochondria (Shu et al., 2004; Wang et al., 2009), but their actual role remains uncertain (Bobrowicz et al., 2008). According to the prevailing model the exosome or the degradosome interacts with the poly(A) tail of the polyadenylated transcript and causes a cut upstream from the poly(A) tail. This results in two fragments which are subjected to a rapid exonucleolytic degradation, but the up-stream fragment may be polyadenylated again for a new round of the same process, the final result of which is the complete RNA decay (Coburn and Mackie, 1999; Dreyfus and Régnier, 2002; O'Hara et al., 1995; Slomovic et al., 2005). This process is responsible for the occurrence of a pool of various degradation-intermediate forms: polyadenylated transcripts of various lengths and truncated or full-length transcripts that have not yet been adenylated or are processed for degradation without polyadenylation. All these forms have been observed in human mitochondria (Slomovic et al., 2005). These authors found truncated non-adenylated and polyadenylated mRNA, rRNA and tRNA transcripts in human mitochondria and interpreted them as degradation intermediates. The same authors found polyadenylated RNA remnants of the human mtDNA control region (D-loop) that most likely resulted from the cleavage of

the primary transcript and were targeted for degradation, as they could have no obvious function. Their search was also extended to EST libraries, which are loaded by fragmented polyadenylated transcripts of coding or non-coding parts of the mtDNA genome.

The majority of mitochondrial transcriptome studies conducted to date come from maternally transmitted mtDNAs. However, certain mitochondrial genomes are exclusively transmitted through the sperm. Such genomes occur in a group of bivalvian mollusks, which are known to have Doubly Uniparental Inheritance (DUI) of mtDNA (Skibinski et al., 1994; Zouros et al., 1994). These organisms have two mitochondrial genomes in stable co-existence. One of these, the F, is transmitted through the egg and is found in the somatic and gonadal tissues of females. The other, the M, is transmitted through the sperm and is found in male gonads (for an extensive and recent review of DUI see Zouros, 2013). In *Mytilus galloprovincialis*, the main control region (CR) of both F and M genomes (Fig. 1) is located between the *l-rRNA* and the *tRNA^{Tyr}* and has a tripartite structure, as determined on the basis of indels and nucleotide variation. Namely, it consists of a conserved domain (CD) that hosts control elements for replication and transcription (Cao et al., 2004, 2009), and two flanking variable domains (VD1 and VD2) (Fig. 2). All genes are located on the heavy strand, which is transcribed clockwise (Chatzoglou et al., 2013; Hoffmann et al., 1992; Mizi et al., 2005). Since certain conserved motifs resembling binding sites of transcription factors in echinoids and human mtDNA were detected near the 3' end of CD (Cao et al., 2004), it appears likely that the transcription starts somewhere close to the junction of CD/VD2. Transcription probably ends at the same region, as elements for transcription termination factors are also found there (Cao et al., 2004), resulting in the release of a polycistronic primary transcript of ~16 kb. Transfer RNAs in the polycistron rapidly fold into their characteristic cloverleaf structures, excising themselves, and thus setting free the mRNAs, rRNAs and RNA remnants corresponding to the non-coding regions of the mtDNA. In the absence of an intervening tRNA, this role can be played by a tRNA-like structure (Ojala et al., 1981). Hence, the tRNA

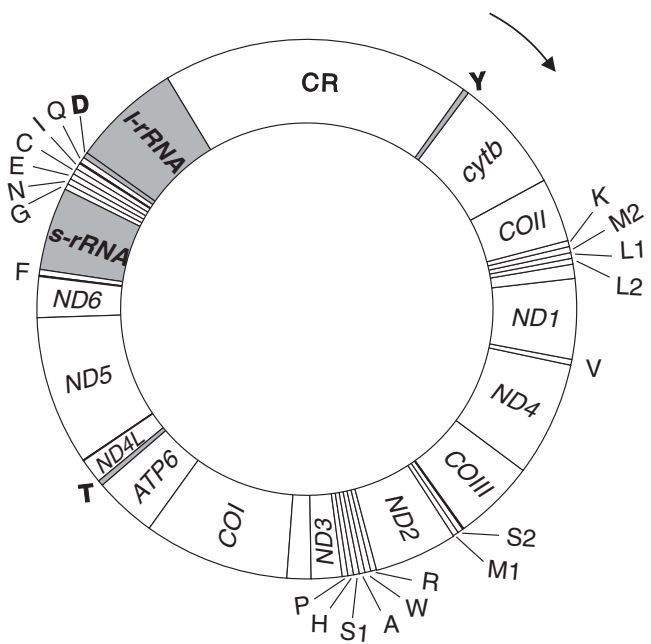


Fig. 1. Gene map of *Mytilus galloprovincialis* mtDNA. All genes are transcribed clockwise. The one-letter amino acid code is used for tRNA designation. Designation: L1, L2, M1, M2, S1, S2, tRNAs recognizing codons CUN, UUR, AUA, AUG, AGN and UCN, respectively; ATP6, ATP synthase subunit 6; COI–III, cytochrome c oxidase subunits I, II, and III; Cyt b, cytochrome b apoenzyme; ND1–6 and ND4L, nicotinamide adenine dinucleotide dehydrogenase subunits 1–6 and 4L; *s-rRNA* and *l-rRNA*, small and large ribosomal RNA genes; CR, main control region. The two rRNAs and three tRNAs, D, T and Y (shaded regions, shown with bold letters) are studied in the current paper.

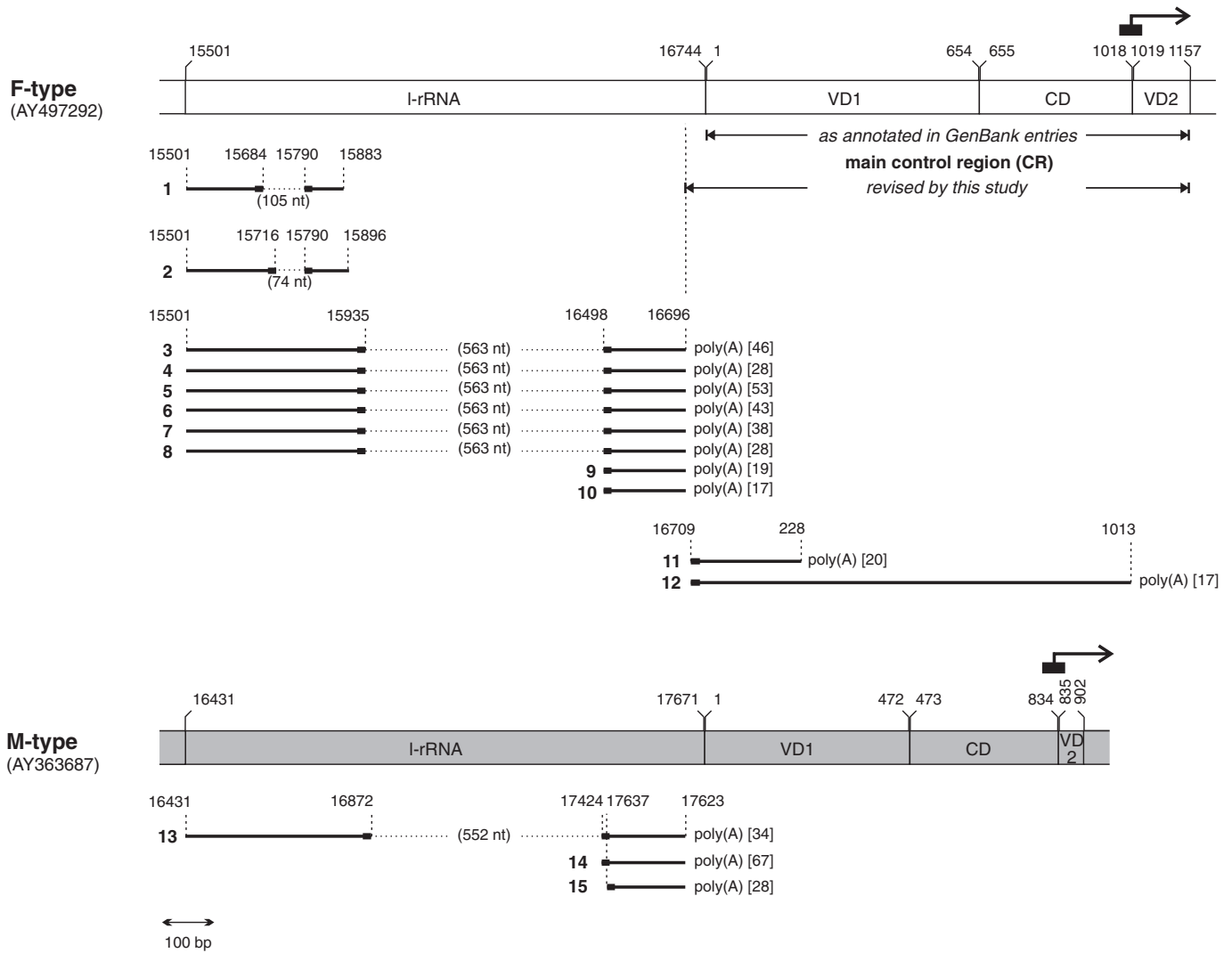


Fig. 2. Transcripts of the *I-rRNA* and the main control regions of the F (plain) and the M (gray) genomes. Twelve transcripts (numbers 1 to 12) were studied for the F genome and 3 (numbers 13 to 15) for the M (shown as lines below each genome). Numbers (except those in parenthesis) indicate nucleotide positions according to annotation by Mizi et al. (2005). VD1 (variable domain 1), CD (conserved domain) and VD2 (variable domain 2) are the three parts of the main control region (CR). The length of a transcript can be obtained from the annotation numbers of the two ends (not including the poly(A) tail). The dotted line marks the part of transcript between the two parts shown by the solid line and the number in parenthesis gives the length of the dotted part. Small squares at the ends of solid lines indicate the binding sites of the primers. Numbers in brackets give the length of the poly(A) tail.

genes' start/end points, as well as the 3' or 5' ends of genes that precede or follow a tRNA gene, respectively, can be easily predicted from the tRNA folding pattern.

The first transcriptome analysis of all mitochondrial protein genes of a species with DUI was performed by Chatzoglou et al. (2013) in *M. galloprovincialis*. The present study completes the mitochondrial transcriptome analysis of this species by focusing on the rRNA and tRNA genes.

2. Materials and methods

2.1. RNA isolation

Samples of the species *M. galloprovincialis* were offered by the "Petropoulos Mare" mussel cultures (Nea Peramos, Saronikos Gulf, Greece). Animals were sexed by microscopic examination of gonads. Since the F-type molecule is predominant in somatic tissues of the animal, the foot of female individuals has been used for the extraction of F-type transcripts. For the extraction of M-type transcripts, the genital tissue of male individuals has been used, since this molecule is almost exclusive in male germ line (Venetis et al., 2006). Total RNA was

extracted from each individual by homogenization of 50 mg of the respective tissue, using "TRIzol® Reagent" (Invitrogen), according to the manufacturer's protocol for "Lysate Preparation with TRIzol® Reagent". Samples were further purified using Spin Cartridges from a "PureLink™ RNA Mini Kit" (Invitrogen). To completely eliminate DNA that could interfere in PCR reactions, RNA samples were incubated with DNaseI, RNase-free (Fermentas) in a buffer containing 10 mM Tris-HCl (pH 7.5 at 25 °C), 2.5 mM MgCl₂, and 0.1 mM CaCl₂, at 37 °C for 30 min. DNaseI was removed using Spin Cartridges from the "PureLink™ RNA Mini Kit" (Invitrogen) according to the "Purifying RNA from Liquid Samples/RNA Clean-up" protocol.

2.2. 3' RACE

For the determination of 3' end, reverse transcription was performed using total RNA from one individual, directly after extraction, according to the protocol described by Frohman et al. (1988). Initially, 1 µg of total RNA and 25 pmol of an oligo(dT) primer (Table 1) were heated at 70 °C for 10 min and then chilled on ice for 5 min. The samples were used in a reverse transcription reaction with 10 u of AMV Reverse Transcriptase (Finnzymes-Thermo) in a buffer containing 25 mM Tris-HCl

Table 1
Oligonucleotides used as primers in mitochondrial RNA reverse transcription and PCR reactions.

Gene/ Region	Code	Orientation ^a	Sequence	Base position range		Reference
				AY497292 (F-type)	AY363687 (M-type)	
<i>l-rRNA</i>	cyc16SF	F	5'-GGGTTAAGCTGAAAATGGTG-3'	15,790–15,810	16,717–16,737	This study
	cyc16SR	R	5'-GCGAATAGTATCTAGCCGCC-3'	15,697–15,716	16,626–16,645	This study
	UNFOR1	F	5'-TTGCGACCTCGATGTTGGC-3'	16,497–16,515	17,424–17,442	Cao et al. (2004)
	s-r	R	5'-CTGACCTCCGATCATAGGC-3'	15,935–15,954		Mizi et al. (2005)
<i>s-rRNA</i>	r-f	F	5'-GCTTATGATAAGGTTAAITCTGGG-3'	14,762–14,784		Mizi et al. (2005)
	12R	R	5'-CCGTTTTCTATCTCAGACACC-3'	14,499–14,519	14,382–14,402	Mizi et al. (2005)
<i>tRNA^{Asp}</i>	tRNAD-F	F	5'-CTAGATTCCTTTTACTAAGGC-3'	15,473–15,493	16,403–16,423	This study
	tRNAD-R	R	5'-GACAATTCTAAGTTATATATTAAC-3'	15,445–15,468	16,375–16,398	This study
<i>tRNA^{Thr}</i>	9F	F	5'-GCTGAAGCAACGGCCTTGTAAGTCG-3'	11,477–11,501	11,358–11,382	Mizi et al. (2005)
<i>tRNA^{Tyr}</i>	Y-f	F	5'-TGAGCTGTAAACTATAAACAAGTTGGCC-3'	1183–1212	928–957	Mizi et al. (2005)
CR	16SF-END-F	F	5'-GTGTATAACAGGTTGATTAGCC-3'	16,709–16,730		This study
Universal	Oligo(dT)-adapter		5'-GACTCGAGTCGACATCGATTTTTTTTTTTTTTTT-3'			Frohman et al. (1988)
	Adapter		5'-GACTCGAGTCGACATCG-3'			Frohman et al. (1988)

^a F, forward primer; R, reverse primer.

(pH 8.3 at 25 °C), 50 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 2 mM DTT, 1 mM each dNTP and 20 u “RNasin® Plus RNase Inhibitor” (Promega). The reaction was incubated for 1 h at 42 °C and 20 min at 52 °C. This “cDNA pool” was used as a template for PCR reactions, where 0.1–0.2 µg of the “cDNA pool” was used for amplification with DreamTaq™ DNA Polymerase (Fermentas-Thermo). All samples were amplified in a total volume of 25 µl containing 1X DreamTaq™ Buffer, 2–3 mM MgCl₂, 0.5 µM adapter primer (Table 1), 0.5 µM gene specific primer and 0.625 u DreamTaq™ DNA Polymerase. All gene specific forward primers used in this study are described in Table 1. The PCR reaction consisted of 35–40 cycles of amplification at 95 °C for 30 s, 53–54 °C for 30 s and 72 °C for 15–60 s followed by a final elongation of 25 min at 72 °C.

2.3. RNA circularization and RT-PCR

This protocol was first described by Mandl et al. (1991) and it is based on the ability of T4 RNA ligase to ligate single stranded RNA ends with free 5' monophosphate and 3' hydroxyl ends. In this study we use a simplified protocol, which applies for mitochondrial transcripts that do not have 5' end modifications and can therefore self-ligate directly in the presence of T4 RNA ligase. 15–20 µg of total RNA from one individual (extracted as described before) was allowed to self-ligate in a total volume of 200 µl with 50 u “T4 RNA ligase” (Fermentas) in a buffer containing 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 10 mM MgCl₂, 10 mM DTT, and 1 mM ATP. The reaction was incubated at 37 °C for 4 h. The enzyme was removed using Spin Cartridges from the “PureLink™ RNA Mini Kit” (Invitrogen) according to the “Purifying RNA from Liquid Samples/RNA Clean-up” protocol.

The circularized RNAs were used as templates with gene specific primers to determine the 5' and 3' ends of each transcript with the following RT-PCR procedure: As a first step, reverse transcription was performed separately for each gene, using 2.5–3 µg of circularized RNA and 20 pmol of gene specific primer in each reaction. All gene specific reverse primers used in reverse transcription reactions are given in Table 1. The circularized RNA and the primer mix were denatured at 70 °C for 10 min and then chilled on ice for 5 min. The samples were transcribed using 10 u of AMV Reverse Transcriptase (Finnzymes) as described in Subsection 2.2. As a second step 0.5–1 µg of each gene-specific cDNA was used as a template with a set of gene specific primers, as given in Table 1. All samples were amplified in a total volume of 25 µl containing 1X DreamTaq™ Buffer, 2–3 mM MgCl₂ and 0.625 u DreamTaq™ DNA Polymerase, 0.5 µM gene specific Forward primer and 0.5 µM gene specific Reverse primer (Table 1). The PCR reaction consisted of 35–40 cycles of amplification at 95 °C for 30 s, 50 °C–56 °C for 30 s and 72 °C for 15–60 s, followed by a final elongation of 25 min at 72 °C.

2.4. Cloning and sequencing

After amplification, 5 µl of each PCR product was run on a 1.2–1.9% agarose gel. If only one band was observed, 1–3 µl of the PCR product was used for direct cloning. If more than one band was observed, all bands were excised and purified with “NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up” (Macherey-Nagel), protocol for DNA extraction from agarose gels. Products were cloned in plasmid pTZ57R/T (Fermentas-Thermo) using T4 DNA ligase (5 u/µl) (Fermentas-Thermo). In each reaction an insert/vector ratio of 3:1 was used in a buffer containing 1X Ligation buffer (40 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM DTT, and 0.5 mM ATP (pH 7.8 at 25 °C)) and 5 u T4 DNA ligase. The ligation mixture was incubated at 22 °C for 1 h. The ligated products were transformed in competent cells using the DH5α *E. coli* strain. Selection of clones was performed on LB agar plates with 100 µg/ml ampicillin. Further verification of the expected insert was performed by restriction enzyme fragment analysis. All selected clones were sequenced in Macrogen and VBC sequencing service companies.

2.5. Sequence data analysis

All sequences were identified with BLASTN 2.2.27 + (Zhang et al., 2000) and further alignment analysis was performed with CLUSTAL X (Thompson et al., 1997). Numbering of nucleotide positions follows Mizi et al. (2005) (GenBank Acc. Nos. AY497292 for F-type and AY363687 for M-type. Revision 12 Mar. 2012).

3. Results and discussion

3.1. The *l-rRNA*

The *l-rRNA* gene is located between *tRNA^{Asp}* and the main control region (Fig. 1), from positions #15,501 to #16,744 of the F genome and #16,431 to #17,671 of the M genome. The 5' end of the *l-rRNA* transcript can be determined following the excision of the preceding *tRNA^{Asp}* according to the “tRNA punctuation model” (Ojala et al., 1981). Indeed, in all *l-rRNA* transcripts the 5' end was found at position #15,501 of the annotated F genome. In contrast, the 3' end cannot be easily identified because the length of the gene as well as the sequence of its 3' end varies among metazoan species (e.g., Hatzoglou et al., 1995). Hoffmann et al. (1992) were the first to assign a 3' end to *l-rRNA* of *Mytilus* by comparing six *l-rRNA* genes from different species. This endpoint was used for all *Mytilus l-rRNA* sequences published since then.

Through transcript circularization we have identified two truncated non-adenylated F-type *l-rRNA* transcripts with different 3' ends (Fig. 2, transcripts 1 and 2). Transcript 1 ends at position #15,883 and transcript

2 ends at position #15,896 of the annotated F molecule, i.e., 861 and 848 nucleotides before the assumed 3' end of the *l-rRNA* gene, respectively. Truncated *l-rRNA* transcripts were also found by Slomovic et al. (2005) in human mitochondria and were interpreted as products of degradation. The alternative, that they are nascent products of transcription, is rather unlikely given that the conserved transcription termination motif identified in mussels (Valverde et al., 1994) is located 47 nucleotides downstream from the annotated 3' end of the *l-rRNA* and 908 and 895 nucleotides downstream from the 3' end of transcripts 1 and 2, correspondingly. We also identified eight F-type polyadenylated *l-rRNA* transcripts. Six of them (3 to 8) were identified through transcript circularization and the use of new primers located closer to the gene ends (Table 1), and two (9 and 10) through 3' RACE. The number of adenine residues in the poly(A) tail" ranged from 17 to 19 for the transcripts detected by circularization and from 28 to 53 for the ones detected by RACE (Fig. 2). The 3' end of all these transcripts was at position #16,696 or #16,697, depending on whether the first adenine of the poly(A) track represents the last nucleotide of the *l-rRNA* gene or belongs to the poly(A) tail. This is 48 or 47 nucleotides upstream from the annotated 3' end of the gene. We obtained similar results when we looked at the *l-rRNA* transcripts of the M genome. The 3' end of the *l-rRNA* transcripts of M genome was at position #17,623 (Fig. 2, transcripts 13, 14 and 15) rather than at position #17,671 given by Mizi et al. (2005). We found no transcript of either the F or the M genome that was polyadenylated at the currently assumed 3' end position of the gene.

In search for transcripts that may end at the previously annotated 3' end of *l-rRNA*, we used a primer (16SF-END-F, see Table 1), that binds to 20 bp inside the 48-nucleotide stretch which according to our findings does not belong to the *l-rRNA* gene but to the VD1, and performed the 3' RACE assay. We found no transcript with a poly-A tail starting at the assumed 3' end. Instead, we identified two polyadenylated transcripts of different lengths (Fig. 2, transcripts 11 and 12). The first ended at position #228 of VD1 and the second ended at position #1013 of the CD of the F molecule (these positions may be different by one bp depending on whether the first A belongs to the primary transcript or to the poly(A) tail). The 3' end of transcript 12 corresponds to a stretch of adenines in the junction of CD and VD2 domains of CR (positions 1011–1035). This raises the possibility that the oligo(dT) primer might have bound on this region and, thus, transcript 12 is a product of miss-annealing (Nam et al., 2002). This possibility cannot be excluded. We note, however, that previous work (Cao et al., 2004, 2009; Rodakis et al., 2007) has placed the elements for the initiation/termination of replication and transcription exactly in the same region. It is, therefore, equally possible that the end of transcript 12 represents the end of the primary transcript. If so, transcripts 11 and 12 are forms of the most downstream part of the primary transcript that, after cleavage, were polyadenylated for degradation. Transcript 11 had probably undergone several rounds of internal cut and polyadenylation that have reduced it to the observed length. This account is fully consistent with the transcription process of *Mytilus* mtDNAs (see Introduction). Transcripts that have no obvious function are generally degraded after their excision from the primary transcript (Slomovic et al., 2005), and this should apply to the transcripts that correspond to the non-coding sequence of the control region. The products from degradations of non-coding transcripts may explain the detection of CR transcripts in mussel EST libraries that vary in length (Breton et al., 2011).

The multiplicity of transcripts (transcripts 3 to 10 of the F genome and 13 to 15 of the M genome) ending in the same point upstream of the previously assumed end of the *l-rRNA* gene and the failure to observe any transcript ending at the assumed end leave little doubt that the *l-rRNA* gene is 47 or 48 nucleotides shorter than assumed by Hoffmann et al. (1992) and Mizi et al. (2005). Namely, it ends at positions #16,696 or #16,697 for the F genome, and #17,623 for the M genome. The 48 nucleotides from this position to position #1 belong to the VD1 of the main control region (CR).

3.2. *s-rRNA*

The *s-rRNA* gene is located between *tRNA^{Phe}* and *tRNA^{Gly}* genes (Fig. 1, positions #14,070 to #15,016 of the F genome and #13,953 to #14,901 of the M genome). Since *s-rRNA* is flanked by tRNAs, its 5' and 3' ends can be easily predicted. Six *s-rRNA* F-type transcripts were identified by means of transcript circularization (Fig. 3a, transcripts 1, 2, and 3) and 3' RACE (Fig. 3a, transcripts 4, 5, and 6). In all cases the 5' ends coincided with the nucleotide immediately after *tRNA^{Phe}*, the gene that precedes the *s-rRNA* gene. Transcripts 1, 2 and 3 were non-adenylated and had different lengths. Transcripts 2 and 3 were truncated (3' ends at positions #14,898 and #14,819 respectively) and are probably remnants of *s-rRNA* degradation. The three transcripts produced by 3' RACE were polyadenylated and of full-length.

The four full-length transcripts (Fig. 3a, transcripts 1, 4, 5, and 6) do not share the same 3' end. The *s-rRNA* gene ends with a 5'-TATAATAT-3' sequence in all known *Mytilus* species, except for *Mytilus californianus*, where the third T is missing (Fig. 3b). The last T in this sequence is the final nucleotide of the gene (position #15,016 in the F genome). From the four obtained transcripts (Fig. 3b) only one (transcript 4) contains the full terminal sequence TATAATAT, indicating that the 3' terminus of the *s-rRNA* could vary in length even in the same individual.

According to literature, the 3' end of rRNA transcripts is often heterogeneous in the same individual. It may be found that a few nucleotides upstream (Dubin et al., 1982; Van Etten et al., 1983) or downstream (Van Etten et al., 1983) from the annotated endpoint of the rRNA gene, result, in the latter case, in an overlap between the 3' end of the rRNA and the first nucleotides of the gene downstream the rRNA. It was suggested that this heterogeneity is the result of different mechanisms for the adenylation of the 3' end of rRNAs (Van Etten et al., 1983).

3.3. *tRNAs*

Three tRNAs were selected for transcript analysis: *tRNA^{Tyr}*, which is immediately adjacent to the 3' end of the CR, *tRNA^{Asp}* that precedes the *l-rRNA* gene, and *tRNA^{Thr}*, a typical tRNA gene located between the *ATP6* and *ND4L* genes (Fig. 1). The tRNA folding pattern dictates the tRNA's excision from the polycistronic transcript and therefore determines the ends of the gene. As expected the 5' and 3' ends of the transcripts matched the start/end point nucleotides of the corresponding tRNA genes.

The tRNA circularization assay identified two non-adenylated transcripts of *tRNA^{Asp}* that were carrying CCA (Fig. 4). The 3' RACE assay, which targets polyadenylated transcripts, identified a *tRNA^{Thr}* and *tRNA^{Tyr}* polyadenylated transcript (Fig. 4). Surprisingly, both these transcripts carried the CCA trinucleotide between the 3' end and the poly(A) tail. CCA is a universally conserved sequence that all mature tRNAs carry at their 3' end (Sprinzl and Cramer, 1979). It is remarkable that even though CCA is crucial for the function of a tRNA, only a group of bacteria (*E. coli* and related bacteria) encode the CCA sequence in all tRNA genes. In the Gram-positive *Bacillus subtilis* and some related bacteria, only a part of tRNA genes encode the CCA sequence. On the other hand, in other Gram-positive bacteria, archaea and eukarya (in both cytoplasm and mitochondria) the CCA sequence is not encoded in tRNA genes and must be added post-transcriptionally (Hou, 2010). The CCA sequence is the amino acid binding site, thus only mature, properly folded tRNAs carry it. The amino acid obviously would not be able to bind to the CCA sequence if its place was occupied by a poly(A) tail. Our results suggest that the majority of tRNA transcripts are mature, CCA carrying tRNAs with no poly(A) tail and that when the polyadenylation filter is introduced, tRNA transcripts may be found that carry both CCA and a poly(A) tail which serves as a tag for degradation.

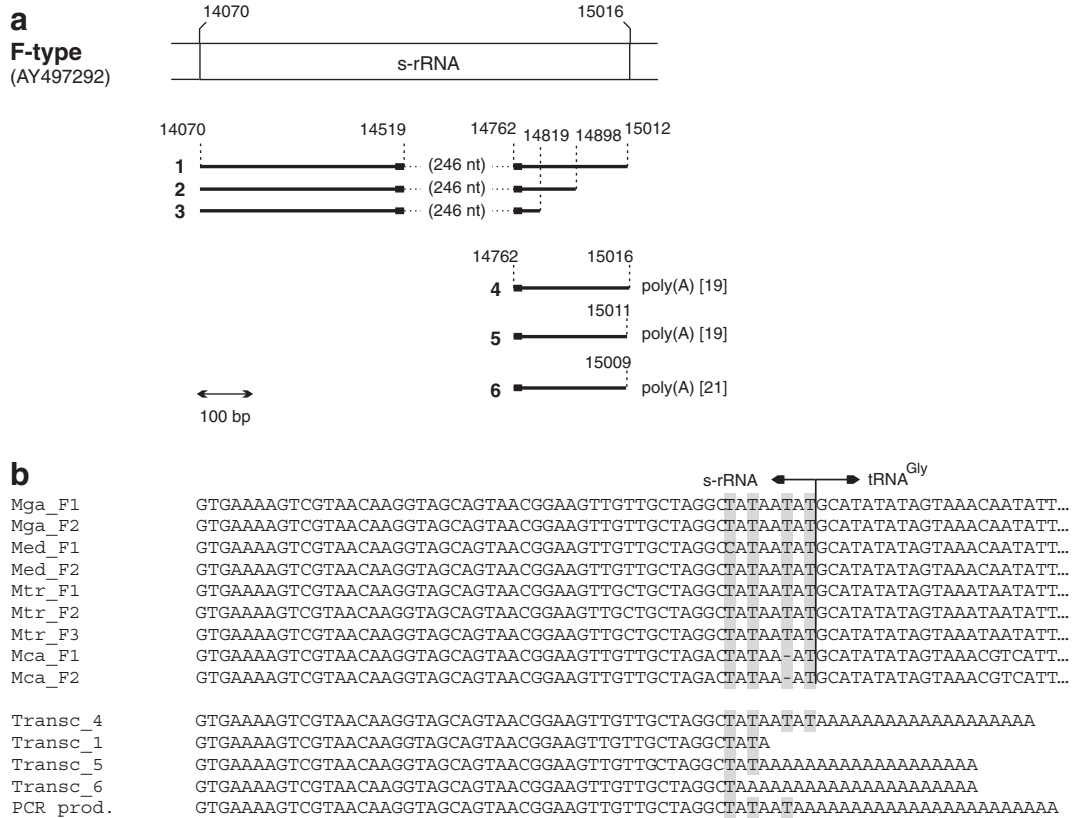


Fig. 3. Transcripts of the *s-rRNA* of the F genome. a: Notation as in Fig. 2. b: Alignment of 3' end regions of the *s-rRNA* gene of complete *Mytilus* F sequences [Mga_F1: AY497292 (Mizi et al., 2005), Mga_F2: FJ890849 (Burzyński and Śmietanka, 2009), Med_F1: AY484747 (Boore et al., 2004), Med_F2: DQ198231 (Zbawicka et al., 2007), Mtr_F1: AY823625 (Breton et al., 2006), Mtr_F2: GU936625 (Zbawicka et al., 2010), Mtr_F3: HM462080 (Śmietanka et al., 2010), Mca_F1: GQ527172, unpublished, Mca_F2: JX486124, unpublished] and of the 3' end region of cloned parts of four *s-rRNA* transcripts (Transc_1, 4, 5, and 6) and a directly sequenced PCR product of a transcript, obtained in this study. Shadowed nucleotides are the thymines that serve as the potential endpoints of the gene (see text).

4. Concluding remarks

The present study completes the analysis of the transcriptomes of the two mitochondrial genomes of *M. galloprovincialis*. We obtained evidence that these transcriptomes are as remarkable as the mode of transmission of their genomes. We have observed that transcription extends into non-coding regions and identified transcripts that can be best explained as products of degradation of the type that requires the

presence of a specific multi-protein complex. We refer to this complex as degradosome, rather than exosome, because of the prokaryotic origin of the mitochondrion. In addition, we have observed that tRNA transcripts are immediately processed by the addition of the CCA trinucleotide. We have also shown that the First Variable Domain (VD1) of the CR is longer than previously thought, both in the F and M genomes. This might be an interesting finding given that this region appears to play a role in the transmission of the *Mytilus* mitochondrial genomes



Fig. 4. Analysis of three tRNA transcripts. F and M sequences come from AY497292 and AY363687 (Mizi et al., 2005) respectively. cDNA: 3' RACE transcript parts; Circ. cDNA: transcript parts obtained through RNA circularization and subsequent RT-PCR techniques; poly(A) [nn] marks the transcripts in which a poly(A) tail was detected (with the number of As in parenthesis).

(Burzyński et al., 2003; Cao et al., 2004; Mizi et al., 2005; Venetis et al., 2007). These genomes have attracted considerable attention because of their separate route of transmission. It is equally remarkable that they operate under the same nuclear background in spite of the fact that their primary sequences differ by about 22%. Indeed, we have found no differences in the transcriptomes of the two genomes, which suggests that both may be functional, in agreement with the prevailing view that the M genome is not a “molecular parasite” that takes a ride with the sperm. Previous studies (Breton et al., 2011; Hoffmann et al., 1992) have identified an ORF in the VD1 of the F genome of *Mytilus*, but not in the M genome. We have observed no polyadenylated product that could correspond to it. Breton et al. (2011) suggested that this ORF might be coding for a product that is involved in the sex-specific transmission of mtDNA in *Mytilus*. Our results suggest that the F and M control region from the start of VD1 up to the end of CD, where the transcription starting point is located, is transcribed in the foot tissue that we have examined, but its transcript is degraded. Given that the somatic mtDNA is not transmitted to the next generation this observation provides no direct evidence for or against the hypothesis that the ORF plays a role in the sex-specific transmission of mtDNA.

Our observations about the M transcriptome agrees with previous results by Dalziel and Stewart (2002) and Obata et al. (2011) who have observed transcription of the M genome at various tissues of male mussels and at a lower level in females. But in general the levels of M transcription appear to be erratic and much lower than that of F and the only case at which the M transcription dominates the expression of F is at late stages of the male gonad development (Obata et al., 2011, see also Zouros, 2013 for review). Also, there is suggestive evidence that sperm carrying the typical M genome may not be as fast moving as sperm carrying “newly masculinized genomes” (Jha et al., 2008). The latter are paternally transmitted genomes whose coding part is of the F type, but their CR contains M type sequences. This suggests that the CR may carry motifs that determine whether the genome will be maternally or paternally transmitted. Several studies converge on the suggestion that these motifs may be located in VD1 (Burzyński et al., 2003; Cao et al., 2004; Mizi et al., 2005; Venetis et al., 2007). Taken together this information suggests that the M genome is indispensable for reasons that do not relate to the standard functions of mtDNA but may have to do with mtDNA transmission and/or sex determination and male gamete production. The transcriptomic assays we have used here and in our previous study (Chatzoglou et al., 2013) may be employed to throw light on these questions of cardinal importance for the phenomenon of DUI.

Conflict of interest

Authors declare that there are no conflicts of interest.

Acknowledgments

This work was supported by the National and Kapodistrian University of Athens, Special Account for Research Grants (Grant #11237 to G.C.R.).

References

- Bakke, I., Johansen, S., 2002. Characterization of mitochondrial ribosomal RNA genes in gadiformes: sequence variations, secondary structural features, and phylogenetic implications. *Mol. Phylogenet. Evol.* 25, 87–100.
- Benkel, B.F., Duschesnay, P., Boer, P.H., Genest, Y., Hickey, D.A., 1988. Mitochondrial large ribosomal RNA: an abundant polyadenylated sequence in *Drosophila*. *Nucleic Acids Res.* 16, 9880.
- Berthier, F., Renaud, M., Alziari, S., Durand, R., 1986. RNA mapping on *Drosophila* mitochondrial DNA: precursors and template strands. *Nucleic Acids Res.* 14, 4519–4533.
- Blum, E., Carpousis, A.J., Higgins, C.F., 1999. Polyadenylation promotes degradation of 3'-structured RNA by the *Escherichia coli* mRNA degradosome in vitro. *J. Biol. Chem.* 274, 4009–4016.
- Bobrowicz, A.J., Lightowlers, R.N., Chrzanoska-Lightowlers, Z., 2008. Polyadenylation and degradation of mRNA in mammalian mitochondria: a missing link? *Biochem. Soc. Trans.* 36, 517–519.
- Bollenbach, T.J., Schuster, G., Stern, D.B., 2004. Cooperation of endo- and exoribonucleases in chloroplast mRNA turnover. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 78, 305–337.
- Boore, J.L., 1999. Animal mitochondrial genomes. *Nucleic Acids Res.* 27, 1767–1780.
- Boore, J.L., Medina, M., Rosenberg, L.A., 2004. Complete sequences of the highly rearranged molluscan mitochondrial genomes of the scaphopod *Graptacme eborea* and the bivalve *Mytilus edulis*. *Mol. Biol. Evol.* 21, 1492–1503.
- Breton, S., Burger, G., Stewart, D.T., Blier, P.U., 2006. Comparative analysis of gender-associated complete mitochondrial genomes in marine mussels (*Mytilus* spp.). *Genetics* 172, 1107–1119.
- Breton, S., Ghiselli, F., Passamonti, M., Milani, L., Stewart, D.T., Hoeh, W.R., 2011. Evidence for a fourteenth mtDNA-encoded protein in the female-transmitted mtDNA of marine mussels (Bivalvia: Mytilidae). *PLoS One* 6, e19365.
- Burzyński, A., Śmietanka, B., 2009. Is interlineage recombination responsible for low divergence of mitochondrial nad3 genes in *Mytilus galloprovincialis*? *Mol. Biol. Evol.* 26, 1441–1445.
- Burzyński, A., Zbawicka, M., Skibinski, D.O.F., Wenne, R., 2003. Evidence for recombination in the marine mussel *Mytilus trossulus* from the Baltic. *Mol. Biol. Evol.* 20, 388–392.
- Cao, L., Kenchington, E., Zouros, E., Rodakis, G.C., 2004. Evidence that the large noncoding sequence is the main control region of maternally and paternally transmitted mitochondrial genomes of the marine mussel (*Mytilus* spp.). *Genetics* 167, 835–850.
- Cao, L., et al., 2009. The control region of maternally and paternally inherited mitochondrial genomes of three species of the sea mussel genus *Mytilus*. *Genetics* 181, 1045–1056.
- Carpousis, A.J., 2007. The RNA degradosome of *Escherichia coli*: an mRNA-degrading machine assembled on RNase E. *Annu. Rev. Microbiol.* 61, 71–87.
- Chatzoglou, E., Kyriakou, E., Zouros, E., Rodakis, G.C., 2013. The mRNAs of maternally and paternally inherited mtDNAs of the mussel *Mytilus galloprovincialis*: start/end points and polycistronic transcripts. *Genetics* 193, 156–165.
- Coburn, G.A., Mackie, G.A., 1999. Degradation of mRNA in *Escherichia coli*: an old problem with some new twists. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 62, 55–108.
- Coburn, G.A., Miao, X., Briant, D.J., Mackie, G.A., 1999. Reconstitution of a minimal RNA degradosome demonstrates functional coordination between a 3' exonuclease and a DEAD-box RNA helicase. *Genes Dev.* 13, 2594–2603.
- Coucheron, D.H., et al., 2011. Characterization of mitochondrial mRNAs in codfish reveals unique features compared to mammals. *Curr. Genet.* 57, 213–222.
- Dalziel, A.C., Stewart, D.T., 2002. Tissue-specific expression of male-transmitted mitochondrial DNA and its implications for rates of molecular evolution in *Mytilus* mussels (Bivalvia: Mytilidae). *Genome* 45, 348–355.
- Dreyfus, M., Régner, P., 2002. The poly(A) tail of mRNAs: bodyguard in eukaryotes, scavenger in bacteria. *Cell* 111, 611–613.
- Dubin, D.T., Montoya, J., Timko, K.D., Attardi, G., 1982. Sequence analysis and precise mapping of the 3' ends of HeLa cell mitochondrial ribosomal RNAs. *J. Mol. Biol.* 157, 1–19.
- Frohman, M.A., Dush, M.K., Martin, G.R., 1988. Rapid production of full-length cDNAs from rare transcripts: amplification using a single gene-specific oligonucleotide primer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 85, 8998–9002.
- Grohmann, K., Amairic, F., Crews, S., Attardi, G., 1978. Failure to detect “cap” structures in mitochondrial DNA-coded poly(A)-containing RNA from HeLa cells. *Nucleic Acids Res.* 5, 637–651.
- Hatzoglou, E., Rodakis, G.C., Lecanidou, R., 1995. Complete sequence and gene organization of the mitochondrial genome of the land snail *Albinaria coerulea*. *Genetics* 140, 1353–1366.
- Hoffmann, R.J., Boore, J.L., Brown, W.M., 1992. A novel mitochondrial genome organization for the blue mussel, *Mytilus edulis*. *Genetics* 131, 397–412.
- Hou, Y.M., 2010. CCA addition to tRNA: implications for tRNA quality control. *IUBMB Life* 62, 251–260.
- Jha, M., Côté, J., Hoeh, W.R., Blier, P.U., Stewart, D.T., 2008. Sperm motility in *Mytilus edulis* in relation to mitochondrial DNA polymorphisms: implications for the evolution of doubly uniparental inheritance in bivalves. *Evolution* 62, 99–106.
- LaCava, J., et al., 2005. RNA degradation by the exosome is promoted by a nuclear polyadenylation complex. *Cell* 121, 713–724.
- Malecki, M., Jedrzejczak, R., Stepień, P.P., Golik, P., 2007. *In vitro* reconstitution and characterization of the yeast mitochondrial degradosome complex unravels tight functional interdependence. *J. Mol. Biol.* 372, 23–36.
- Mandl, C.W., Heinz, F.X., Puchhammer-Stöckl, E., Kunz, C., 1991. Sequencing the termini of capped viral RNA by 5'–3' ligation and PCR. *Biotechniques* 10, 484–486.
- Mercer, T.R., et al., 2011. The human mitochondrial transcriptome. *Cell* 146, 645–658.
- Mitchell, P., Petfalski, E., Shevchenko, A., Mann, M., Tollervey, D., 1997. The exosome: a conserved eukaryotic RNA processing complex containing multiple 3' → 5' exoribonucleases. *Cell* 91, 457–466.
- Mizi, A., Zouros, E., Moschonas, N., Rodakis, G.C., 2005. The complete maternal and paternal mitochondrial genomes of the Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis*: implications for the doubly uniparental inheritance mode of mtDNA. *Mol. Biol. Evol.* 22, 952–967.
- Montoya, J., Christianson, T., Levens, D., Rabinowitz, M., Attardi, G., 1982. Identification of initiation sites for heavy-strand and light-strand transcription in human mitochondrial DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 79, 7195–7199.
- Montoya, J., Gaines, G.L., Attardi, G., 1983. The pattern of transcription of the human mitochondrial rRNA genes reveals two overlapping transcription units. *Cell* 34, 151–159.
- Nam, D.K., et al., 2002. Oligo(dT) primer generates a high frequency of truncated cDNAs through internal poly(A) priming during reverse transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 6152–6156.
- Obata, M., Sano, N., Komaru, A., 2011. Different transcriptional ratios of male and female transmitted mitochondrial DNA and tissue-specific expression patterns in the blue mussel, *Mytilus galloprovincialis*. *Dev. Growth Differ.* 53, 878–886.
- O'Hara, E.B., Chekanova, J.A., Ingle, C.A., Kushner, Z.R., Peters, E., Kushner, S.R., 1995. Polyadenylation helps regulate mRNA decay in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92, 1807–1811.

- Ojala, D., Montoya, J., Attardi, G., 1981. tRNA punctuation model of RNA processing in human mitochondria. *Nature* 290, 470–474.
- Piwowarski, J., Grzechnik, P., Dziembowski, A., Dmochowska, A., Minczuk, M., Stepien, P.P., 2003. Human polynucleotide phosphorylase hPNPase, is localized in mitochondria. *J. Mol. Biol.* 329, 853–857.
- Rodakis, G.C., Cao, L., Mizi, A., Kenchington, E.L.R., Zouros, E., 2007. Nucleotide content gradients in maternally and paternally inherited mitochondrial genomes of the mussel *Mytilus*. *J. Mol. Evol.* 65, 124–136.
- Rorbach, J., Minczuk, M., 2012. The post-transcriptional life of mammalian mitochondrial RNA. *Biochem. J.* 444, 357–373.
- Shu, Z., Vijayakumar, S., Chen, C.F., Chen, P.L., Lee, W.H., 2004. Purified human SUV3p exhibits multiple-substrate unwinding activity upon conformational change. *Biochemistry* 43, 4781–4790.
- Skibinski, D.O., Gallagher, C., Beynon, C.M., 1994. Mitochondrial DNA inheritance. *Nature* 368, 817–818.
- Slomovic, S., Lauffer, D., Geiger, D., Schuster, G., 2005. Polyadenylation and degradation of human mitochondrial RNA: the prokaryotic past leaves its mark. *Mol. Cell. Biol.* 25, 6427–6435.
- Smietanka, B., Burzyński, A., Wenne, R., 2010. Comparative genomics of marine mussels (*Mytilus* spp.) gender associated mtDNA: rapidly evolving atp8. *J. Mol. Evol.* 71, 385–400.
- Spradling, A., Pardue, M.L., Penman, S., 1977. Messenger RNA in heat-shocked *Drosophila* cells. *J. Mol. Biol.* 109, 559–587.
- Sprinzi, M., Cramer, F., 1979. The -C-C-A end of tRNA and its role in protein biosynthesis. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 22, 1–69.
- Steege, D.A., 2000. Emerging features of mRNA decay in bacteria. *RNA* 6, 1079–1090.
- Stewart, J.B., Beckenbach, A.T., 2009. Characterization of mature mitochondrial transcripts in *Drosophila*, and the implications for the tRNA punctuation model in arthropods. *Gene* 445, 49–57.
- Temperley, R.J., Wydro, M., Lightowlers, R.N., Chrzanowska-Lightowlers, Z.M., 2010. Human mitochondrial mRNAs — like members of all families, similar but different. *Biochim. Biophys. Acta* 1797, 1081–1085.
- Thompson, J.D., Gibson, T.J., Plewniak, F., Jeanmougin, F., Higgins, D.G., 1997. The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.* 24, 4876–4882.
- Valverde, J.R., Marco, R., Garesse, R., 1994. A conserved heptamer motif for ribosomal RNA transcription termination in animal mitochondria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91, 5368–5371.
- Van Etten, R.A., Bird, J.W., Clayton, D.A., 1983. Identification of the 3'-ends of the two mouse mitochondrial ribosomal RNAs. The 3'-end of 16 S ribosomal RNA contains nucleotides encoded by the gene for transfer RNA^{Leu}UUR. *J. Biol. Chem.* 258, 10104–10110.
- Venetis, C., Theologidis, I., Zouros, E., Rodakis, G.C., 2006. No evidence for presence of maternal mitochondrial DNA in the sperm of *Mytilus galloprovincialis* males. *Proc. R. Soc. B* 273, 2483–2489.
- Venetis, C., Theologidis, I., Zouros, E., Rodakis, G.C., 2007. A mitochondrial genome with a reversed transmission route in the Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Gene* 406, 79–90.
- Wang, D.D.H., Shu, Z., Lieser, S.A., Chen, P.L., Lee, W.H., 2009. Human mitochondrial SUV3 and polynucleotide phosphorylase form a 330-kDa heteropentamer to cooperatively degrade double-stranded RNA with a 3'-to-5' directionality. *J. Biol. Chem.* 284, 20812–20821.
- Yokobori, S., Pääbo, S., 1995. Transfer RNA editing in land snail mitochondria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92, 10432–10435.
- Zbawicka, M., Burzyński, A., Wenne, R., 2007. Complete sequences of mitochondrial genomes from the Baltic mussel *Mytilus trossulus*. *Genetics* 406, 191–198.
- Zbawicka, M., Burzyński, A., Skibinski, D., Wenne, R., 2010. Scottish *Mytilus trossulus* mussels retain ancestral mitochondrial DNA: complete sequences of male and female mtDNA genomes. *Genetics* 456, 45–53.
- Zhang, Z., Schwartz, S., Wagner, L., Miller, W., 2000. A greedy algorithm for aligning DNA sequences. *J. Comput. Biol.* 7, 203–214.
- Zouros, E., 2013. Biparental inheritance through uniparental transmission: the doubly uniparental inheritance (DUI) of mitochondrial DNA. *Evol. Biol.* 40, 1–31.
- Zouros, E., Ball, A.O., Saavedra, C., Freeman, K.R., 1994. Mitochondrial DNA inheritance. *Nature* 368, 818.



Letter to the Editor

Does the ORF in the control region of *Mytilus* mtDNA code for a protein product?



Eleni Kyriakou^a, Evanthia Chatzoglou^a, George C. Rodakis^a, Eleftherios Zouros^{b,*}

^a Department of Biochemistry and Molecular Biology, National and Kapodistrian University of Athens, Panepistimioupolis 15701 Athens, Greece

^b Department of Biology, University of Crete, 71409 Heraklion, Crete, Greece

ARTICLE INFO

Article history:

Received 27 April 2014

Received in revised form 14 June 2014

Accepted 17 June 2014

Available online 18 June 2014

Keywords:

Bivalvia

Mytilus

Doubly uniparental inheritance

mtDNA control region

mtRNA degradation

ABSTRACT

The control region of the mtDNA of *Mytilus* is known to contain sequences that determine whether the genome will be paternally or maternally transmitted. An open reading frame (ORF) in this region raised suspicion that it may code for a protein involved in this mechanism. An analysis of the mtDNA transcriptome failed to produce evidence for this hypothesis.

© 2014 Elsevier B.V. All rights reserved.

DUI (doubly uniparental inheritance) is an exceptional system of mtDNA transmission. Species with DUI (all of which are, as current knowledge goes, bivalvian mollusks) have two mitochondrial genomes, known as M and F, in obligatory co-existence. The sperm contains exclusively the M genome; the F genome is the main if not the exclusive mtDNA in the egg. Judging from the divergence of the primary sequence of conspecific genomes and the sharing of DUI among bivalve taxa, DUI must be as old as 400 million years (for a comprehensive review, see Zouros, 2013). At present, very little is known about the molecular mechanism underlying the tight association of sex determination and route of transmission of the two mitochondrial genomes.

An open reading frame (ORF) was reported by Hoffmann et al. (1992) in the F genome of *Mytilus edulis* and was subsequently found in three more species of the same genus (Breton et al., 2011). The ORF, which is absent from the M genome, is located in the first part (known as first variable domain, VD1) of the main control region (CR). The CR is known to house sequence motifs that are involved in the transcription and translation of the genome (Cao et al., 2004).

There is also good evidence that VD1 is involved in “masculinization”, the transformation of an F genome from maternally to paternally transmitted, through the incorporation of sequences from the M genome (Zouros, 2013). It becomes, therefore, of primary importance to demonstrate whether this ORF may or may not produce a peptide that could, by its mere presence, be a candidate member of the mechanism that determines the sex-specific route of the two mitochondrial genomes.

We have studied the complete transcriptome of the two mitochondrial genomes of *Mytilus galloprovincialis*. Among our noticeable findings is the presence of polycistronic mRNAs (Chatzoglou et al., 2013) and degradation intermediates of rRNA transcripts (Kyriakou et al., 2014). In the context of these studies we searched for polyadenylated transcripts that span the whole length of the ORF and have the same termination codon as the ORF in the VD1 domain of the F genome. Total RNA was extracted from female and male gonads that contained germ cells at various stages of oogenesis and spermatogenesis, including mature eggs and sperm. Given that a *Mytilus* individual cannot be characterized as a “male” or a “female” except when it has entered gametogenesis, these are the cells in which the ORF product would be most likely expressed. Indeed, Breton et al. (2011) have used these tissues in their detection of a female and male specific protein product coded by the F and M mitochondrial genomes of the unionid *Venustaconcha ellipsiformis*. We also extracted total RNA from the foot of a female individual. Technical details are given in Chatzoglou et al. (2013), Kyriakou et al. (2014) and Fig. 1.

The 3' RACE assay from the female gonad identified two polyadenylated transcripts of different lengths (Fig. 1, transcripts 1 and 2), the first ending inside VD1 and the second inside CD (the middle

Abbreviations: bp, base pairs; CD, conserved domain; CR, main control region of mitochondrial DNA; DNA, deoxyribonucleic acid; DUI, doubly uniparental inheritance; EST, expressed sequence tag; F-type genome, maternally transmitted mitochondrial genome; *l*-rRNA, large ribosomal RNA gene; mRNA, messenger RNA; mtDNA, mitochondrial DNA; M-type genome, paternally transmitted mitochondrial genome; ORF, open reading frame; poly(A), poly-adenosine; RACE, rapid amplification of cDNA ends; RNA, ribonucleic acid; rRNA, ribosomal RNA; *s*-rRNA, small ribosomal RNA gene; tRNA, transfer RNA gene; VD1, variable domain 1; VD2, variable domain 2.

* Corresponding author.

E-mail address: zouros@biology.uoc.gr (E. Zouros).

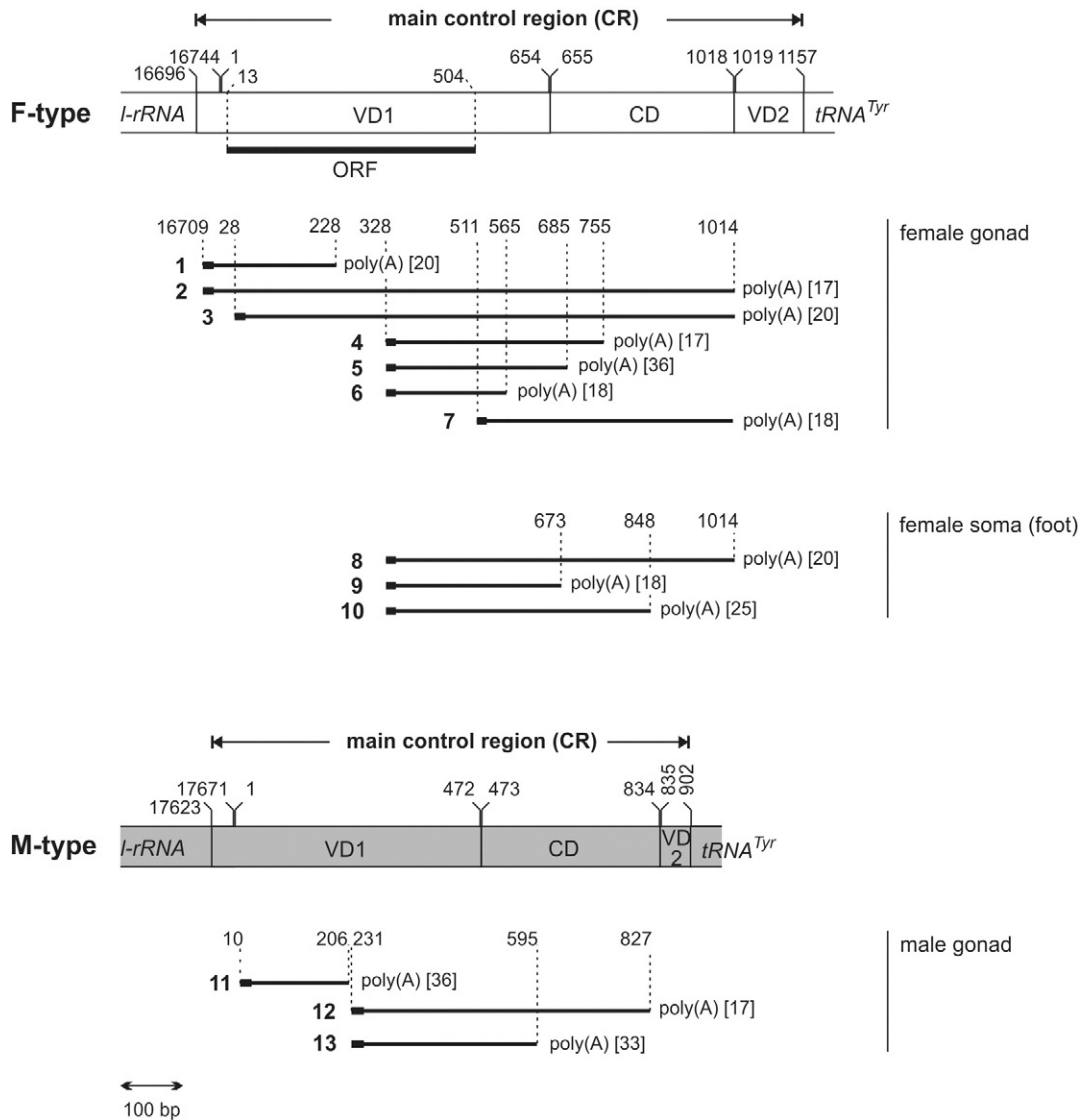


Fig. 1. Transcripts of the main control region of the F (plain) and the M (gray) genomes, obtained by 3' RACE analysis of RNA extracts from the gonad and the foot of a female and the gonad of a male individual. The putative F-ORF (Breton et al., 2011) is shown with a thick black line. Ten transcripts (1 to 10) were studied for the F genome (1 to 7 from female gonad, 8 to 10 from female foot) and 3 (11 to 13) for the M (shown as lines below each genome). Numbers (except those in brackets) indicate nucleotide positions according to annotation by Mizi et al. (2005). VD1 (variable domain 1, as annotated by Kyriakou et al., 2014), CD (conserved domain) and VD2 (variable domain 2) are the three parts of the main control region (CR). The length of a transcript (not including the poly(A) tail) can be obtained from the annotation numbers of the two ends. Numbers in brackets give the length of the poly(A) tail. Small squares at the ends of solid lines indicate the binding sites of the primers. For the needs of this study we used the gene-specific primers 16SF-END-F (Kyriakou et al., 2014) for transcripts 1 and 2, ssFd11 (Mizi et al., 2005) for transcript 3 and ssMdl1 (Mizi, Ph.D. Thesis) for transcript 11 and the universal primers (dT)₁₇-adaptor and adaptor (Frohman et al., 1988) for all transcripts. In addition we constructed the forward primers 5'-GGCTATGCCCTTCGGTTAGA-3' that was used for transcripts 4, 5, 6, 8, 9 and 10, 5'-AACCGTAAAATGTTTAGGAATAAGG-3' that was used for transcripts 12 and 13 and 5'-GGTCTAAAGGTTGCTGGTGC-3' that was used for transcript 7.

conserved domain of CR). The same assay identified five more polyadenylated transcripts (Fig. 1, transcripts 3 to 7) with different 3' ends, none of which extended beyond the 3' end of CD. The 3' end of one transcript (#1) was located within the ORF. The other transcripts covered the entire ORF and extended downstream, covering a part or the entire VD1 and parts or the entire CD (Fig. 1). We found no transcript with an end corresponding to the 3' end of the ORF. All transcripts with the entire ORF sequence that we detected extended into the non-coding sequence of the VD1 and into the CD for as long as 500 bp. We cannot exclude the possibility of an mRNA with a very long 3' untranslated region, although extensions of this type were not observed in our study of the mRNAs of the 13 protein coding genes. In all these mRNAs the poly(A) tail of either monocistronic or polycistronic transcripts started immediately or at the most 18 nucleotides downstream from the annotated 3' end of the gene (Chatzoglou et al., 2013). The search for polyadenylated transcripts corresponding to the CR of the M

genome, where no ORF was detected, produced similar results (Fig. 1, transcripts 11 to 13). Similar CR transcripts were also obtained in the RNA pool from the foot (Fig. 1, transcripts 8 to 10).

The transcripts with CR sequences that we have observed are expected from the way transcription occurs in *Mytilus* mtDNA (Chatzoglou et al., 2013; Kyriakou et al., 2014). The last gene transcribed is *l-rRNA*, but the binding sites for the termination of transcription are most probably located in the 3' end of CD (Cao et al., 2004). Thus, RNA synthesis continues until approximately the end of CD at which point the primary transcript is released. After cleavage of the polycistronic transcript the parts that correspond to VD1 and CD are most likely degraded. Degradation of non-functional and/or misfolded transcripts in bacteria and chloroplasts involves the addition of a poly(A) tail which targets these transcripts for 3'-to-5' exonucleolytic degradation (Bollenbach et al., 2004; Coburn and Mackie, 1999; Dreyfus and Régnier, 2002; Slomovic et al., 2005). We have, similarly, observed

polyadenylated fragments of the *s-rRNA* and *l-rRNA* genes and of the CR of varying length, which are most likely degradation intermediates (Kyriakou et al., 2014). This interpretation explains also the detection of mtDNA ORFs of various lengths in EST libraries of *Mytilus* (Breton et al., 2011) and human mtDNA (Slomovic et al., 2005).

ORFs were also found in the mtDNA of other species with DUI. In the marine mussel *Musculista senhousia* F and M ORFs are known from their primary sequence (Breton et al., 2011; Milani et al., 2013). In the clam *Ruditapes philippinarum* Ghiselli et al. (2013) found transcripts with the sequence of an ORF that is present in the F and the M genome. It remains unclear if these transcripts were functional mRNAs or degradation intermediates as the ones reported in Kyriakou et al. (2014). A stronger case was made by Breton et al. (2009) for an ORF that was found in both genomes of several, but not all, species of the freshwater mussel family Unionidae they examined. Support for the hypothesis that these ORFs have a protein product comes from the positive reaction of gonadal protein extracts to antibodies produced against peptides synthesized on the basis of the amino acid sequence inferred from the sequence of the ORF. The fact that an mtDNA sequence is responsible for a polypeptide that does not seem to be involved in standard mitochondrial functions is intriguing, but it does not in itself establish a role for it.

There is strong evidence that the mitochondrial genomes of *Mytilus*, and by implication of all species with DUI, carry sequences that determine whether they will be transmitted maternally or paternally (Zouros, 2013). Our results do not eliminate the hypothesis that they may code for a protein product, but increase the possibility that they are short motifs that bind to protein factors coded by the nucleus. The hypothesis of protein-binding motifs rather than protein-coding sequences is also more compatible with the long evolutionary pressure for a compact animal mtDNA (Khachane et al., 2007; Lynch et al., 2006). This raises the issue of how mtDNA motifs may interact with cytosolic proteins. A model for this type of interaction has been proposed by Chen and Butow (2005). Its basic idea is that the mt-nucleoids, the protein-mtDNA complexes that are bound to the inner mitochondrial membrane, are capable of communicating with actin-attached cytosolic proteins.

This work was supported by the National and Kapodistrian University of Athens, Special Account for Research Grants (Grant #11237 to G.C.R.).

References

Bollenbach, T.J., Schuster, G., Stern, D.B., 2004. Cooperation of endo- and exoribonucleases in chloroplast mRNA turnover. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 78, 305–337.

- Breton, S., Doucet-Beaupre, H., Stewart, D.T., Piontkivska, H., Karmakar, M., Bogan, A.E., Hoeh, W.R., 2009. Comparative mitochondrial genomics of freshwater mussels (Bivalvia: Unionoids) with doubly uniparental inheritance of mtDNA: gender-specific open reading frames and putative origins of replication. *Genetics* 183, 1575–1589.
- Breton, S., Ghiselli, F., Passamonti, M., Milani, L., Stewart, D.T., Hoeh, W.R., 2011. Evidence for a fourteenth mtDNA-encoded protein in the female-transmitted mtDNA of marine mussels (Bivalvia: Mytilidae). *PLoS One* 6, e19365.
- Cao, L., Kenchington, E., Zouros, E., Rodakis, G.C., 2004. Evidence that the large noncoding sequence is the main control region of maternally and paternally transmitted mitochondrial genomes of the marine mussel (*Mytilus* spp.). *Genetics* 167, 835–850.
- Chatzoglou, E., Kyriakou, E., Zouros, E., Rodakis, G.C., 2013. The mRNAs of maternally and paternally inherited mtDNAs of the mussel *Mytilus galloprovincialis*: start/end points and polycistronic transcripts. *Gene* 52, 156–165.
- Chen, X.J., Butow, R.A., 2005. The organization and inheritance of the mitochondrial genome. *Nat. Rev. Genet.* 6, 815–825.
- Coburn, G.A., Mackie, G.A., 1999. Degradation of mRNA in *Escherichia coli*: an old problem with some new twists. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 62, 55–108.
- Dreyfus, M., Régnier, P., 2002. The poly(A) tail of mRNAs: bodyguard in eukaryotes, scavenger in bacteria. *Cell* 111, 611–613.
- Frohman, M.A., Dush, M.K., Martin, G.R., 1988. Rapid production of full-length cDNAs from rare transcripts: amplification using a single gene-specific oligonucleotide primer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 85, 8998–9002.
- Ghiselli, F., Milani, L., Guerra, D., Chang, P.L., Breton, S., Nuzhdin, S.V., Passamonti, M., 2013. Structure, transcription and variability of metazoan mitochondrial genome. Perspectives from an unusual mitochondrial inheritance system. *Genome Biol. Evol.* 5, 1535–1554.
- Hoffmann, R.J., Boore, J.L., Brown, W.M., 1992. A novel mitochondrial genome organization for the blue mussel, *Mytilus edulis*. *Genetics* 131, 397–412.
- Khachane, A.N., Timmis, K.N., Martins dos Santos, V.A., 2007. Dynamics of reductive genome evolution in mitochondria and obligate intracellular microbes. *Mol. Biol. Evol.* 24, 449–456.
- Kyriakou, E., Chatzoglou, E., Zouros, E., Rodakis, G.C., 2014. The rRNA and tRNA transcripts of maternally and paternally inherited mitochondrial DNAs of *Mytilus galloprovincialis* suggest presence of a “degradosome” in mussel mitochondria and necessitate the re-annotation of the *l-rRNA*/CR boundary. *Gene* 540, 78–85.
- Lynch, M., Koskella, B., Schaack, S., 2006. Mutation pressure and the evolution of organelle genomic architecture. *Science* 311, 1727–1730.
- Milani, L., Ghiselli, F., Guerra, D., Breton, S., Passamonti, M., 2013. A comparative analysis of mitochondrial ORFans: new clues on their origin and role in species with Doubly Uniparental Inheritance of mitochondria. *Genome Biol. Evol.* 5, 1408–1434.
- Mizi, A., Zouros, E., Moschonas, N., Rodakis, G.C., 2005. The complete maternal and paternal mitochondrial genomes of the Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis*: implications for the doubly uniparental inheritance mode of mtDNA. *Mol. Biol. Evol.* 22, 952–967.
- Slomovic, S., Laufer, D., Geiger, D., Schuster, G., 2005. Polyadenylation and degradation of human mitochondrial RNA: the prokaryotic past leaves its mark. *Mol. Cell. Biol.* 25, 6427–6435.
- Zouros, E., 2013. Biparental inheritance through uniparental transmission: the Doubly Uniparental Inheritance (DUI) of Mitochondrial DNA. *Evol. Biol.* 40, 1–31.



A protein binding site in the M mitochondrial genome of *Mytilus galloprovincialis* may be responsible for its paternal transmission



Eleni Kyriakou^a, Lara Kravariti^a, Themistoklis Vasilopoulos^a, Eleftherios Zouros^b, George C. Rodakis^{a,*}

^a Department of Biochemistry and Molecular Biology, National and Kapodistrian University of Athens, Panepistimioupolis, 15701 Athens, Greece

^b Department of Biology, University of Crete, 71409 Heraklion, Crete, Greece

ARTICLE INFO

Article history:

Received 29 October 2014

Received in revised form 19 January 2015

Accepted 16 February 2015

Available online 19 February 2015

Keywords:

Mytilus

Doubly Uniparental Inheritance

Nuclear protein–mtDNA binding

Perinuclear mitochondria

ABSTRACT

Sea mussels (*genus Mytilus*) have two mitochondrial genomes in obligatory co-existence, one that is transmitted through the egg and the other through the sperm. The phenomenon, known as Doubly Uniparental Inheritance (DUI) of mitochondrial DNA (mtDNA), is presently known to occur in more than 40 molluscan bivalve species. Females and the somatic tissues of males contain mainly the maternal (F) genome. In contrast, the sperm contains only the paternal (M) genome. Through electrophoretic mobility shift assay (EMSA) experiments we have identified a sequence element in the control region (CR) of the M genome that acts as a binding site for the formation of a complex with a protein factor that occurs in the male gonad. An adenine tract upstream to the element is also essential for the formation of the complex. The reaction is highly specific. It does not occur with protein extracts from the female gonad or from a male or female somatic tissue. Further experiments showed that the interaction takes place in mitochondria surrounding the nucleus of the cells of male gonads, suggesting a distinct role of perinuclear mitochondria. We propose that at a certain point during spermatogenesis mitochondria are subject to degradation and that perinuclear mitochondria with the M mtDNA–protein complex are protected from this degradation with the result that mature spermatozoa contain only the paternal mitochondrial genome.

© 2015 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Doubly Uniparental Inheritance (DUI) is an exceptional system of mitochondrial DNA (mtDNA) inheritance. It is characterized by the

Abbreviations: A, adenine; ATP, adenosine triphosphate; A-tract, adenine tract; bp, base pairs; BSA, bovine serum albumin; C, cytosine; C genome or C type, “compound” mitochondrial genome; CD, conserved domain; cpm, counts per minute; CR, main control region of mitochondrial DNA; CR-F, CR of the F genome; CR-M, CR of the M genome; dATP, deoxyadenosine triphosphate; DNA, deoxyribonucleic acid; DNase, deoxyribonuclease; dNTP, deoxyribonucleotide triphosphate; DTT, dithiothreitol; DUI, Doubly Uniparental Inheritance; EDTA, ethylenediaminetetraacetic acid; EMSA, electrophoretic mobility shift assay; F-type genome, maternally transmitted mitochondrial genome; G, guanine; G/A ladder, guanine/adenine ladder; HEPES, (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid); LB, lysogeny broth (a bacteria growth medium); *l*-rRNA, large ribosomal RNA gene; mRNA, messenger RNA; mtDNA, mitochondrial DNA; M-type genome, paternally transmitted mitochondrial genome; NaAc, sodium acetate; NP-40, nonyl phenoxypolyethoxyethanol; ORF, open reading frame; OXPHOS, oxidative phosphorylation; PBS, phosphate buffered saline; PCR, polymerase chain reaction; PGC, primordial germ cell; PMSF, phenylmethylsulfonyl fluoride; Poly(dI–dC), poly(deoxyinosinic–deoxycytidylic) acid; R, purine; RNA, ribonucleic acid; rRNA, ribosomal RNA; SDS, sodium dodecyl sulfate; SMI, strict maternal inheritance; STE, sperm transmission element; T, thymine; TBE, Tris/Borate/EDTA buffer solution; TE_{0.1}, Tris/EDTA buffer solution; tRNA, transfer RNA; *tRNA^{Tr}*, tRNA gene for tyrosine; u, units; v/v, volume of substance per volume of solution; VD1, variable domain 1; VD1-F, VD1 of F genome; VD1-M, VD1 of M genome; VD1-trF, VD1 of the F genome of *Mytilus trossulus*; VD1-trM, VD1 of the M genome of *Mytilus trossulus*; VD2, variable domain 2.

* Corresponding author.

E-mail address: grodakis@biol.uoa.gr (G.C. Rodakis).

obligatory presence of two distinct mitochondrial genomes, the F that is transmitted maternally and is the main component of the mtDNA pool of females and of the somatic tissues of males, and the M that is transmitted paternally and is the exclusive component of the sperm's mtDNA pool (Kyriakou et al., 2010; Skibinski et al., 1994a,b; Venetis et al., 2006; Zouros et al., 1994a,b). To date, DUI has been found in more than 40 animal species that belong to three superfamilies of bivalve mollusks (for a detailed review, see Zouros (2013)).

The sea mussel *Mytilus*, the genus in which DUI was first observed (Skibinski et al., 1994a; Zouros et al., 1994a), remains one among which this unusual mtDNA transmission system has been studied in considerable detail. In these species the spermatozoon contains five large mitochondria (Longo and Dornfeld, 1967) in contrast to tens of thousands of much smaller mitochondria that occur in the egg (White et al., 2008). The fate of the sperm's mitochondria in the fertilized egg varies depending on the gender of the embryo (Cao et al., 2004a; Cogswell et al., 2006; Kenchington et al., 2009; Obata and Komaru, 2005). In female embryos the five mitochondria follow the “dispersed pattern”, i.e., they disperse randomly among the blastomeres that follow egg division. In male embryos they follow the “aggregate pattern”, i.e., they co-segregate into the same blastomere through the first zygote divisions. The sperm mitochondrial aggregate was also observed in the venerid species *Ruditapes philippinarum* (Milani et al., 2011), a species with DUI. In mussels the occurrence of sperm mitochondria in only

one blastomere has been observed up to the eight-cell stage and the trochophore larva. According to current knowledge of embryonic development of mussels, this blastomere is the one from which the germ line is formed (Verdonk and Van Den Biggelaar, 1983).

It has been suggested on the basis of these observations that the formation of the sperm mitochondria aggregate in the male embryo is the first step in the developmental mechanism that channels the paternal mtDNA into the male germ line and eventually makes this mtDNA the exclusive inhabitant of the mature sperm (Cao et al., 2004a). This is as far as current knowledge of this mechanism goes. Among the various questions that emerge, one of primary importance is: how is the maternal mtDNA, which is by far the predominant mtDNA in the egg, eliminated from the sperm? A hint toward obtaining an answer to this question comes from the phenomenon of “masculinization”. Earlier studies (Hoeh et al., 1997; Ladoukakis et al., 2002; Quesada et al., 1999; Saavedra et al., 1997; Wenne and Skibinski, 1995) have shown that wild populations of mussels contain, usually in low frequencies, mitochondrial genomes that are paternally inherited even though their primary sequence is of the maternal (F) type. It was subsequently suggested (Burzyński et al., 2003; Cao et al., 2004b; Burzyński et al., 2006) and finally confirmed (Theologidis et al., 2007; Venetis et al., 2007) that these genomes differ from the maternally transmitted ones in the major control region (CR). More specifically, the CR of these genomes contains sequences from the CR of the “standard” paternal (M) genome. Given that recombination occurs between F and M genomes (Ladoukakis and Zouros, 2001a,b), it is reasonable to assume that these sequences have been transferred from the M genome to the F through recombination. These observations strongly suggest that the paternally transmitted genomes carry sequences that enable their transmission through the sperm and that when these sequences are transferred to a maternally transmitted genome they make it paternally transmitted.

In principle there are two possibilities about the role of these sequences: they may code for a protein factor or serve as a binding site for factors encoded by the nuclear DNA. The first possibility was addressed in a number of studies. The first nearly complete sequence of a mussel mtDNA molecule was obtained by Hoffmann et al. (1992) before the phenomenon of DUI was discovered. The molecule turned out to be the F genome. Among other interesting features, the authors noted an open reading frame (ORF) in the CR of this genome. This ORF was subsequently studied by Breton et al. (2011). ORFs were also found in the mtDNA of other species with DUI, among which of particular interest are the ORFs on the M genome reported recently by Milani et al. (2013). The hypothesis that the F-specific or the M-specific ORFs (or both) play a role in determining the gender-specific transmission of the mitochondrial genomes of DUI species is attractive but the evidence in its favor remains circumstantial (see Discussion). For mytilids, in particular, the evidence does not go beyond the mere presence of the ORFs. The only evidence that bears on the issue is, in fact, negative. In a recent study of the transcriptome of the F and M genomes of *Mytilus galloprovincialis* (Chatzoglou et al., 2013; Kyriakou et al., 2014a) we recovered all predicted mRNAs for the protein coding genes (Chatzoglou et al., 2013), the two rRNAs, as well as several tRNAs (Kyriakou et al., 2014a), but failed to find an mRNA that would correspond to the ORF of the F or the M genome (Kyriakou et al., 2014b). For this reason we have turned our attention to the second possibility. Specifically, we asked whether there are mitochondrial sequences in the F or the M mitochondrial genome of *M. galloprovincialis* that bind to nucleus-coded protein factors and initiate, as a result, a sequence of events that leads to gender-specific mtDNA transmission. We report here the results from this approach.

2. Materials and methods

2.1. Nomenclature

The taxa *Mytilus edulis* and *M. galloprovincialis* are sibling species that hybridize freely. Differences in their maternally (F) and in their

paternally (M) inherited mitochondria genomes are practically indistinguishable. In the present work we have used *M. galloprovincialis*, so the use of F and M refers to the genomes of this species, but it applies also to those of *M. edulis*. We will refer to the various regions of the mtDNA by adding the suffix F or M according to the genome it applies (see Fig. 1). Thus, the control region (CR) of the F genome will be denoted as CR-F and the first variable domain (VD1) of the M genome as VD1-M. Similarly, the VD1 of the two genomes of *Mytilus trossulus* (see Section 4) will be referred to as VD1-trF and VD1-trM.

2.2. Sampling and DNA extraction

Adult mussels (*M. galloprovincialis*) were sexed by microscopic examination for the presence of eggs or sperm in gonad tissue. Total DNA was extracted from male and female gonads using SDS/proteinase K treatment and subsequent phenol extraction according to Douris et al. (1998).

2.3. Construction of DNA fragments used as probes or competitors in EMSA and DNase I footprinting experiments

DNA from male and female gonads was used as template in PCR reactions to produce the probes for EMSA and DNase I footprinting experiments. The primers used in these PCR reactions are listed in Supplementary Table 1 and the fragments produced in Table 1. The position of these fragments in the mitochondrial genome is shown in Fig. 1.

For the construction of fragments VD1-M_{161–312}, VD1-M_{148–219}, VD1-M_{231–312}, VD1-M_{180–255} and CD-M_{592–796} regular PCR was used. Samples from extracted DNA were amplified in total volume of 25 or 50 µl containing 1 × DreamTaq™ Buffer, 2–3 mM MgCl₂, 0.625 U DreamTaq™ DNA Polymerase, 200 µM dNTPs, 0.5 µM of a forward and 0.5 µM of a reverse primer and 50 to 100 ng of template DNA. The PCR reaction consisted of 35 cycles of amplification at 95 °C for 30 s, 50 °C–56 °C (depending on the T_m of the primer set) for 30 s and 72 °C for 15–30 s (depending on the length of the product), followed by a final elongation of 25 min at 72 °C.

The overlap extension PCR assay (Lee et al., 2010) was employed for the construction of fragments Del-As, Ins-TAs, Ins-ACTGs, R-As-R, R-As-VD1M and VD1M-As-R (see Table 1 and Fig. 1). This assay is used to induce site-directed substitutions, insertions or deletions in the amplicon. The assay consisted of two PCR steps. In the first step, two separate PCR reactions were conducted, using, for each one, a specific “chimeric” primer and a non-chimeric one (see Table 1 and Supplementary Table 1). The sequences of the desired “chimeric” primers were designed by using the template sequence that was targeted for amplification followed by a sequence from the fragment in which we intended to induce a deletion (fragment Del-As) or a substitution (fragments Ins-TAs, Ins-ACTGs, R-As-R, and R-As-VD1M and VD1M-As-R). Thus, in the first step the two PCR reactions produced DNA pieces with overlapping tails that were subsequently purified with Nucleospin® Gel & PCR clean-up by Macherey-Nagel. In the second step, 1 µl of each product was used as a mixed template for PCR reaction. During this step, the two fragments recombined, and the recombinants were amplified to obtain the product with the desired sequence. Fragments produced by overlap extension PCR that have an insertion of a large number of As, TAs or ACTGs, have unpredictable lengths. This is because, during the hybridization of the PCR products of the first step, repetitive nucleotides may produce different hybridization patterns resulting in a variable number of repeats. The sequence of these probes, and thus the exact number of repeats in each probe used, was determined by sequencing. The PCR reactions of both steps were carried out in total volume of 50 µl containing the same ingredients/concentrations mentioned above. The first step was performed following the thermal cycles of the regular PCR mentioned above, while the second step consisted of 25 cycles of amplification at 98 °C for 10 s, annealing at 51–54 °C for 15 s and 72 °C for 15–60 s, followed by a final elongation of 10 min at 72 °C.

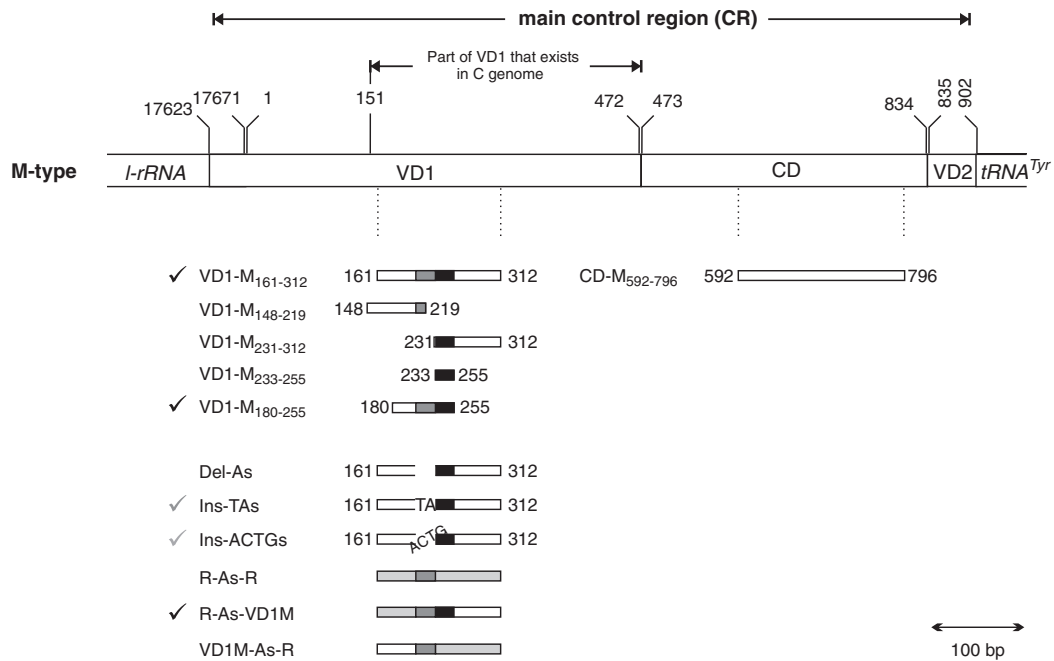


Fig. 1. The main control region (CR) of the paternally inherited mitochondrial genome of *M. galloprovincialis* and probes used in electrophoretic mobility shift assays (EMSAs). Numbers indicate nucleotide positions according to annotation by Mizi et al. (2005). VD1 (variable domain 1), CD (conserved domain) and VD2 (variable domain 2) are the three domains of CR; *l-rRNA* and *tRNA^{Tyr}* are the large rRNA and the tRNA of tyrosine genes, respectively. The length of the probes can be obtained from the annotation numbers of the two ends. Bars under VD1 and CD represent probes used in EMSA. The black box represents the binding site (see Section 3), the dark gray the adenine tract and the light gray random sequences. In probe Del-As the adenine tract has been deleted and in probes Ins-TAs and Ins-ACTGs, replaced by an equal length tract of TA dinucleotide or ACTG tetranucleotide repeats. Black and gray checkmarks indicate probes that produced a strong and a weak shift, correspondingly. Absence of a checkmark means that no shift was produced. The length 1 to 151 of VD1 is missing from the C genome (the first 199 bp of VD1-M contains the 150 bp that was originally assigned to VD1-M by Mizi et al. (2005) and the preceding 49 bp – from nucleotide position #17263 to position #1 – that was subsequently shown by Kyriakou et al. (2014b) to belong to CR).

For the fragment VD1-M_{233–255} (Fig. 1 and Table 1), which was constructed by oligonucleotide annealing, 4 µg of the two synthetic oligonucleotide strands (oVD1M-a and oVD1M-b, Supplementary Table 1) were mixed together in a total volume of 100 µl TE_{0.1} (10 mM Tris–HCl pH 8.0 and 0.1 mM EDTA pH 8.0) in the presence of 150 mM NaCl and the mix was heated at 90 °C–94 °C for 5 min and left to cool gradually to room temperature. After 10 min on ice, the annealed primers were purified through Sephadex spin columns, precipitated using 3 M NaAc pH 5.2 and ethanol and resuspended in 20 µl TE_{0.1}.

Table 1

Fragments used as probes or competitors in the EMSAs and DNase I footprinting assays.

Probe name	Primers used ^a	Length (bp)
A. Produced by regular PCR		
VD1-M _{161–312}	VD1MF/VD1MR	152
VD1-M _{148–219}	VD1M-RIF/VD1M-RIR	81 (72) ^b
VD1-M _{231–312}	VD1MF2/VD1MR	82
VD1-M _{180–255}	VD1M-Fint/oVD1M-b	80 (76) ^b
CD-M _{592–796}	a-f/CD_END-R	205
B. Produced by overlap extension PCR		
Del-As	VD1MF/Chimer-R + Chimer-F/VD1MR	126
Ins-TAs	VD1MF/ChimTA-R + ChimTA-F/VD1MR	147
Ins-ACTGs	VD1MF/ChimACTG-R + ChimACTG-F/VD1MR	159
R-As-R	Cytb-F/ChimAs-cytbR + ChimAs-cytbF/Cytb-R	165
R-As-VD1M	Cytb-F/ChimAs-cytbR + ChimAs-F/VD1MR	179
VD1M-As-R	VD1M-FXba/ChimAs-R + ChimAs-cytbF/Cytb-RXba	155
C. Produced by oligonucleotide annealing		
VD1M _{233–255}	oVD1M-a/oVD1M-b	25 (23) ^b

^a The sequence of the primers are given in Supplementary Table 1.

^b These probes are a few bp longer than indicated by their end point position numbers because one or both primers carry restriction sites on the 5' end, that do not hybridize to the template. The actual length is the number outside the parenthesis, while the length of the sequence of the probe that corresponds to VD1-M sequence is in parenthesis.

2.4. Cloning and sequencing

PCR products were cloned in plasmid pTZ57R/T (Fermentas-Thermo) using T4 DNA ligase (5 U/µl) (Fermentas-Thermo). In two cases (VD1M-As-R and VD1-M_{233–255}) the plasmid pBluescript II KS +/– was used for restriction site cloning (*Xba*I for the first and *Bam*HI for the second) following standard procedures (Sambrook et al., 1989). In each reaction an insert/vector ratio 3:1 was used in a buffer containing 1× ligation buffer (40 mM Tris–HCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 0.5 mM ATP, pH 7.8) and 5 u T4 DNA ligase. The ligation mixture was incubated at 22 °C for 2–3 h. The ligated products were transformed in competent cells using the DH5α *Escherichia coli* strain. Selection of clones was performed on LB agar plates with 100 µg/ml ampicillin. Further verification of the expected insert was performed by restriction enzyme fragment analysis. Selected clones were sequenced in Macrogen and VBC sequencing service companies.

2.5. Isolation and purification of fragments

For the production of probes for EMSA and DNase I footprinting experiments, fragments should possess 3' recessed ends that are needed for labeling by Klenow end filling (see Section 2.6). Such ends were obtained by digestion with restriction enzymes. For this reason, all cloned fragments – were isolated from their vectors by plasmid DNA purification and digestion with the appropriate enzyme. Fragments VD1-M_{148–219}, VD1M_{233–255} and VD1M-As-R carry restriction sites at both ends, which come from the primers used for their production. In these three probes the same site appears on both ends, therefore single digestion of the cloned fragments was performed using *Eco*RI, *Bam*HI and *Xba*I accordingly. Fragment VD1-M_{180–255} carries a restriction site on only one end (only one of the two primers used contained a restriction site – *Bam*HI) and therefore, a restriction site of the polylinker of the

vector (*Xba*I) was used along with *Bam*HI for its excision. Finally, fragments VD1-M_{161–312}, VD1-M_{231–312}, CD-M_{592–796}, Del-As, Ins-TAs, Ins-ACTGs, R-As-R and R-As-VD1M do not have any restriction site on their ends and thus were excised from the vector by double digestion with polylinker restriction enzymes *Xba*I/*Bam*HI. Whenever the polylinker site *Xba*I or *Bam*HI was used to excise a fragment from the vector, 8 bp was added to the corresponding side of the probe that is the distance between the cloning site and the restriction site (not added to the length of probes in Table 1). The inserts were separated from plasmids by gel extraction using “NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up” (Macherey-Nagel), protocol for DNA extraction from agarose gels and either used as cold competitors or labeled for the generation of probes.

2.6. Radiolabeling of fragments

The DNA fragments that were used as probes in EMSA experiments were end-labeled by filling in the 3' ends with [α -³²P]dATP using the Klenow fragment of DNA polymerase I (Fermentas-Thermo Scientific) according to the manufacturer's protocol. The probe VD1-M_{161–312} for the DNase I footprinting assay was prepared as follows: plasmid pTZ57R/T, containing the VD1-M_{161–312} fragment, was digested with polylinker enzyme *Xba*I and the 3' end was filled in with [α -³²P]dATP using the Klenow polymerase. The VD1-M_{161–312} probe was isolated from the plasmid after a second digestion with *Bam*HI followed by gel extraction.

2.7. Protein extraction

For total protein extraction, 200–300 mg of tissue (gonad or foot) from male or female mussels was homogenized on ice using a Teflon homogenizer in 3 volumes of homogenization buffer (10 mM HEPES pH 7.9 at 25 °C, 250 mM sucrose, 1 mM DTT, 1 mM EDTA pH 8 at 25 °C, 1 mM PMSF). The lysate was centrifuged at 15,000 g for 2 h to pellet cell and membrane debris. The supernatant, which contains total proteins, was divided to aliquots and stored at –70 °C for future use (protocol from Chora et al. (2009), modified).

For the separation of nuclear and cytoplasmic extracts, 100 mg of gonad tissue was homogenized on ice using a Teflon homogenizer in 1 ml PBS supplemented with 1 mM PMSF and 1 mM DTT. Cells were pelleted by centrifugation at 250 g for 5 min and resuspended in 250 μ l of Buffer 1 containing 25 mM HEPES, 5 mM KCl, 0.5 mM MgCl₂, 1 mM DTT and 1 mM PMSF. An equal volume of Buffer 1, supplemented with 1% (v/v) NP-40, was added. The samples were then rotated for 15 min to aid the cell membrane rupture. Centrifugation at 500 g was used to separate the cytoplasmic protein extract (supernatant) from the nuclei (pellet). The cytoplasmic extract was relieved from impurities by centrifugation at 20,000 g for 15 min. To obtain the nuclear extract, the nuclei pellet was washed 3 times in 500 μ l of Buffer 1 supplemented with 0.5% (v/v) NP-40. After the final centrifugation, the nuclei pellet was resuspended in 300 μ l of Buffer 2 containing 25 mM HEPES, 10% (w/v) sucrose, 350 mM NaCl, 0.01% (v/v) NP-40, 1 mM DTT and 1 mM PMSF. The samples were rotated for 1 h to lyse the nuclei. The nuclear protein extract was purified by centrifugation at 20,000 g for 10 min. All centrifugations were done at 4 °C and all steps were carried out either on ice or in a cold-room (4 °C). The protein concentration of all extracts was determined by the Bradford protein assay (Bradford, 1976).

2.8. Electrophoretic mobility shift assay (EMSA)

Approximately 2×10^3 to 6×10^3 cpm (corresponding to 1 to 5 ng) of the appropriate DNA probe was incubated with 5 μ g of protein extracts in 30 μ l reactions containing: $1 \times$ binding buffer (12 mM HEPES pH 7.9, 4 mM Tris pH 8, 60 mM KCl, 1 mM EDTA pH 8, 1 mM DTT and 14% glycerol), 27 mM NaCl, 1.8 μ g sonicated salmon sperm

DNA and 10 ng/ μ l BSA. Incubation was at 30 °C for 30 min prior to the addition of probe and for 30 min after the addition. In competition experiments, $100 \times$ – $1000 \times$ molar excess of the appropriate competitor DNA fragment was added to the reaction, followed by incubation at 30 °C for 1 h prior to the addition of the probe. The DNA–protein complexes were resolved in native 5% polyacrylamide gel (39:1 w/w acrylamide: bis-acrylamide), containing 3% glycerol and $0.25 \times$ TBE (25 mM Tris, 20.75 mM boric acid and 0.25 mM EDTA). Electrophoresis was performed at 4 °C, 200 V, in $0.25 \times$ TBE buffer. After electrophoresis the gel was autoradiographed at –80 °C.

2.9. DNase I footprinting assay

4×10^3 cpm of the DNA probe was mixed with 10 μ g of protein extract in $1 \times$ footprint buffer (5 mM MgCl₂, 34 mM KCl, 25 mM HEPES pH 7.9, 0.1 μ M Zn-acetate, 0.5 mM DTT) containing 1.5 μ g poly(dI-dC)–poly(dI-dC) in a final volume of 20 μ l. The binding reaction was incubated for 60 min on ice. After binding, 2 μ l of a freshly prepared solution containing 200–400 ng/ μ l DNase I in 25 mM CaCl₂–10 mM HEPES pH 7.9 was added and digestion was allowed to occur on ice for 10 min. The reaction was stopped with 5 μ l stop solution (125 mM Tris–HCl pH 8, 125 mM EDTA pH 8, 3% SDS) and was further incubated with 2.5 μ l PK solution (16 mg/ml proteinase K, 0.5 mg/ml tRNA) for 20 min at 65 °C. Following purification by phenol extraction and ethanol precipitation, the samples were analyzed on 6% sequencing gel containing 8 M urea and $1 \times$ TBE buffer. For the control reaction (binding without nuclear extract) the same amount of probe was cleaved with 10–40 ng DNase I. The G/A ladder of the probe was determined by the Maxam–Gilbert method (Maxam and Gilbert, 1980).

2.10. Fluorescent staining of nuclear extracts

Nuclei were isolated as a non-lysed pellet, following the protocol described in Section 2.7. The pellet was resuspended in 200 μ l of 100 nM Mito Tracker® Green FM in PBS, to stain in green possibly remaining mitochondria. After 15-min incubation, the nuclei pellet was washed by centrifugation at 500 g and resuspended in 100 μ l of 1 mM Hoechst 33258 in DMSO. After 10-minute incubation, during which the nuclei were stained blue, another washing step was performed and the nuclei pellet was finally resuspended in 30 μ l PBS, spread on a microscope slide and examined through a fluorescent microscope. The supernatant from the last washing step was centrifuged at high-speed. The resulting pellet, which could contain remaining nuclei and mitochondria, was also resuspended in PBS and examined under a fluorescence microscope.

3. Results

3.1. Searching for the part of the mitochondrial genome that is most likely to affect its transmission route

As stated in the Introduction, there is strong evidence that the control region (CR) of the mussel mtDNA contains sequences that determine whether the genome will be maternally or paternally inherited. Earlier studies (Burzyński et al., 2003; Cao et al., 2004b, 2009; Venetis et al., 2007) have suggested that the most likely part of the mussel mtDNA to house these sequences is the first variable domain (VD1) of CR. The CR consists of three domains (Fig. 1) of which the middle (conserved domain, CD) is the most conservative part of the entire molecule, varying by less than 2% between the F and M genomes (compared to 23% for the coding part) (Cao et al., 2004b; Mizi et al., 2005). There is good evidence that this region houses the signals for the molecule's replication and transcription (Cao et al., 2004b). Detailed examination of the sequences of standard M and masculinized genomes strongly suggests that CD acts as the site of recombination between the F and M genomes (Burzyński, 2007; Mizi et al., 2006; Venetis et al., 2007). In

contrast VD1 is the most variable in the two genomes, both in primary sequence (50%) and in length (Cao et al., 2004b). The third domain (variable domain 2, VD2) is much shorter and contains purine tracts of variable length, which makes it a less likely candidate for the target site.

The fact that a maternally inherited genome becomes paternally inherited by incorporating sequences from the M genome suggests that the sequence responsible for the reversal of transmission route lies in the M rather than in the F genome. A more direct evidence for this comes from the comparison of the ten fully sequenced genomes of *M. edulis/galloprovincialis*: four maternally transmitted (F), five paternally transmitted (M) and one of type C (GenBank acc. numbers, AY497292, FJ890849, AY484747, DQ198231, AY363687, FJ890850, AY823623, AY823624, DQ198225 and DQ399833, respectively). The CR of the C genome consists of three tandem repeats of the CR of the M genome that have been inserted within the VD1 of an otherwise F genome (Venetis et al., 2007). The most likely hypothesis about how the CR of the C genome was produced involves a recombination event between the F and M genomes at CD, the insertion of the CR of the M genome into CR of the F and subsequent duplication of the inserted CR in the F genome (Venetis et al., 2007). These events have transferred the postulated transmission-affecting site from the M genome into the F genome and, as a result, reversed its transmission from maternal to paternal. There is no part of the VD1 of the F genome that is missing from the C genome. This argues against the hypothesis that there is a sequence in the F genome that is responsible for its maternal transmission because in that case the C genome ought to be maternally transmitted. In view of this evidence we concentrated on the VD1 of the paternally transmitted genome.

3.2. Identification of an element in the VD1 of the M genome that forms a complex with a protein factor from the male gonad

The analysis of the primary sequences (Mizi et al., 2005) and the transcriptomes (Chatzoglou et al., 2013) of both mussel mtDNA genomes failed to provide hints for the presence of a mitochondrial

protein other than the standard proteins that are involved in oxidative phosphorylation (OXPHOS) functions. This suggests that if there is a protein binding site in the M genome the protein would most likely be encoded by the nuclear DNA.

In the search for such a site we noted that the CR-M repeats of the C genome lack the first 199 bp of VD1-M (Fig. 1), which suggests that it is unlikely that this part of VD1-M houses a binding sequence with the required properties. We have, therefore, focused on the sequence immediately downstream of the first 199 bp. For this we designed a series of primers (Supplementary Table 1) and obtained a series of DNA fragments which we used as probes or competitors in EMSA experiments. These probes are described in Table 1 and their position in the VD1-M is shown in Fig. 1. First, we amplified a 152 bp region that starts 10 nucleotides after the beginning of the part of VD1-M that is present in the C genome. This part of VD1-M, to which we refer as VD1-M_{161–312}, was used as a probe in electrophoretic mobility shift assay (EMSA) experiments with protein extracts from male gonad, female gonad, male foot and female foot. We obtained a band shift with the extract from male gonad, but not with any of the other three extracts (Fig. 2a and b). To test the specificity of binding, we performed a self-competitor EMSA, i.e., we ran the assay together with increasing amounts of non-labeled (“cold”) VD1-M_{161–312}. The binding was inhibited even with low amounts of competitor (Fig. 2c). The stability of the complex was tested by examining its formation in the presence of NaCl, which is known to affect protein/DNA binding. The complex persisted under a wide range of NaCl concentrations (Fig. 2d). Interestingly, the EMSA experiment produced two bands. We return to this point in Section 4.

3.3. The essential binding parts of VD1-M_{161–312}

To narrow down the parts of VD1-M_{161–312} that are indispensable for the binding, we divided it into two parts and used them as probes in EMSA experiments. The first part, VD1-M_{148–219}, includes the adenine tract that is located approximately in the middle of VD1-M_{161–312}, and

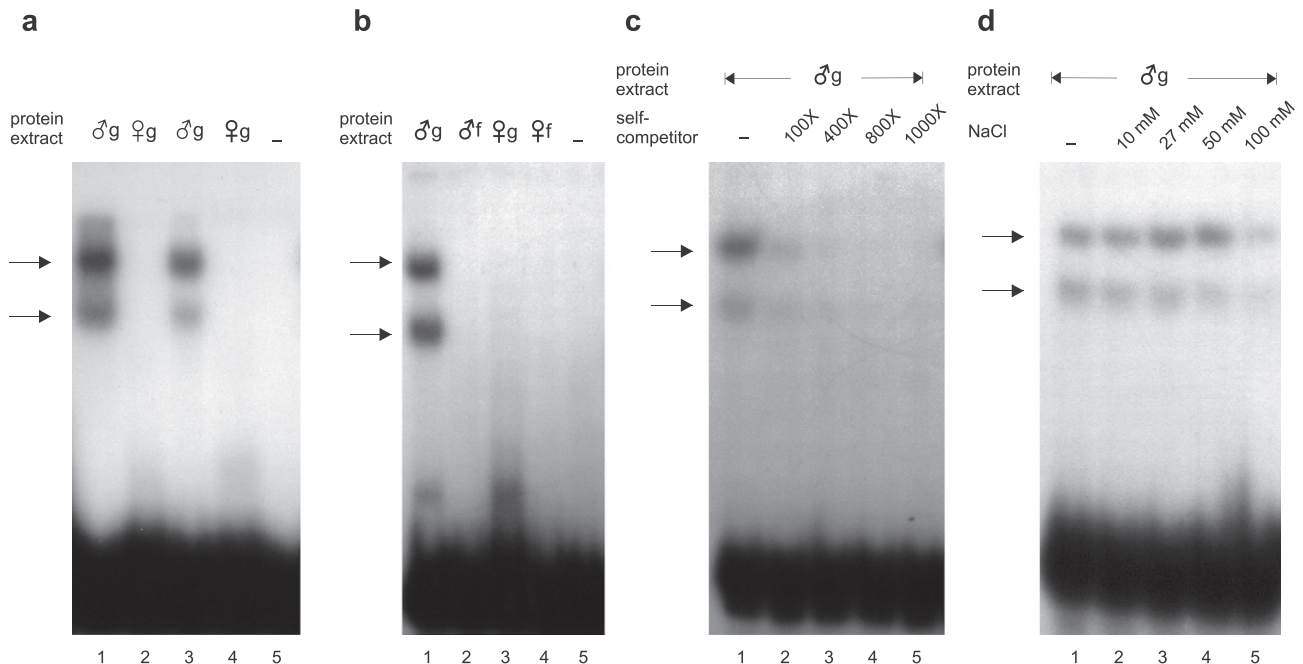


Fig. 2. Electrophoretic mobility shift assays (EMSAs) using VD1-M_{161–312} as probe and protein extracts from male and female mussels. a: the probe was incubated with gonadal extracts from two males (lanes 1 and 3) and from two females (lanes 2 and 4), separately. Lane 5 is the free probe. b: the probe was incubated with the protein extract from the gonad (lane 1) or the foot (lane 2) of a male and from the gonad (lane 3) or the foot (lane 4) of a female individual. Lane 5 is the free probe. c: competition EMSA results using “hot” and “cold” VD1-M_{161–312} with extract from male gonad. Lane 1, no competitor; lanes 2 to 5, competitor in increasing multiples of the amount of the “hot” probe. d: EMSA results with VD1-M_{161–312} male gonadal extract without NaCl (lane 1) and increasing concentrations of NaCl (lanes 2 to 5). In all panels the lower band is the probe and the arrows show the band shifting due to the formation of the probe/protein complex.

the second, VD1-M₂₃₁₋₃₁₂, starts immediately after the adenine tract and extends to the end of VD1-M₁₆₁₋₃₁₂. The absence of a shift when one or the other part was used as a probe (Fig. 3a, lanes 6 to 9), suggests that neither may alone produce a protein complex.

As a next step we performed EMSA tests with a series of probes in which ~20 bp was successively eliminated from both ends of VD1-M₁₆₁₋₃₁₂. These experiments identified fragment VD1-M₁₈₀₋₂₅₅ as the smallest part that could alone produce a protein complex (Fig. 3b, lane

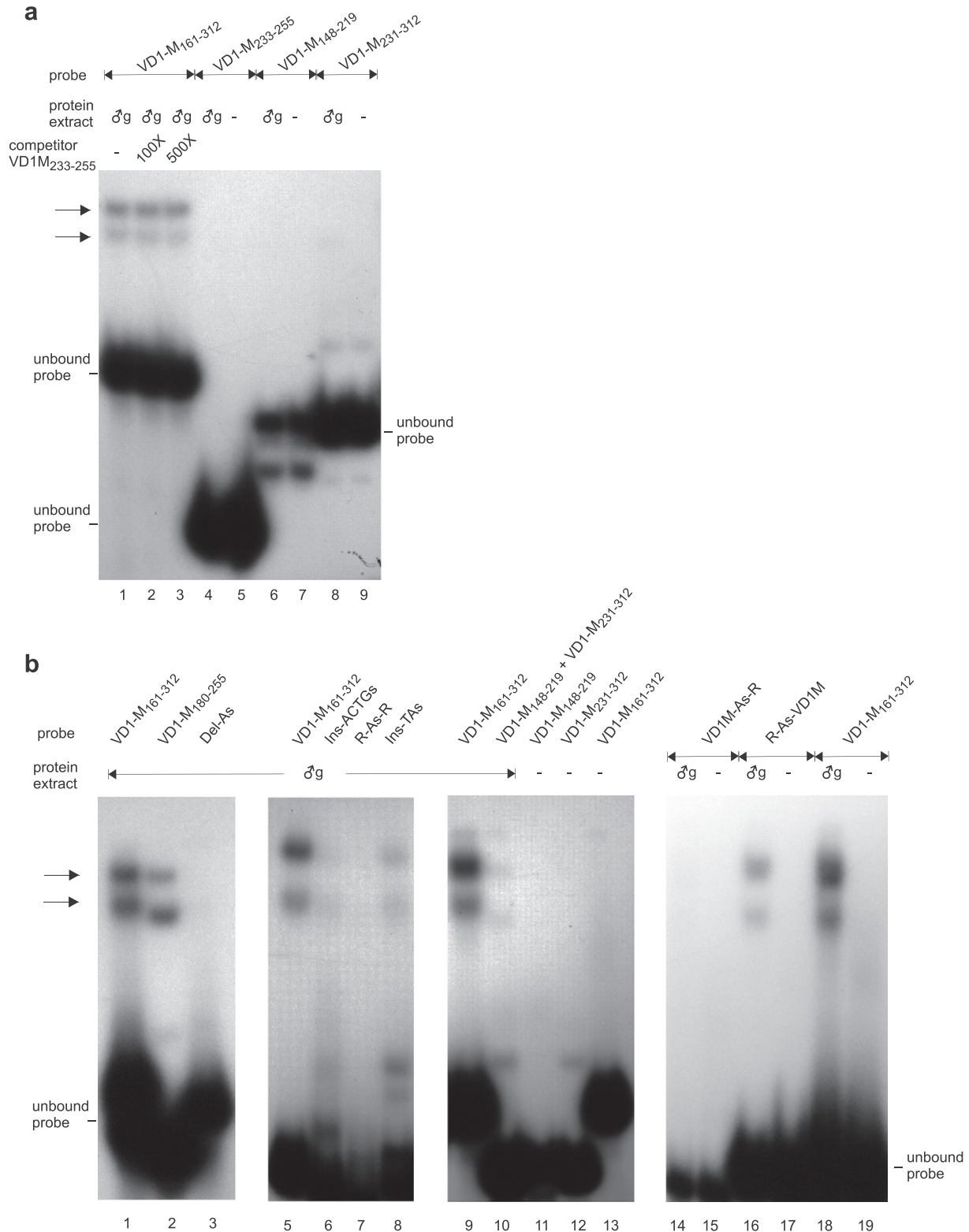


Fig. 3. Electrophoretic Mobility Shift Assays (EMSA) using extracts from male gonad and various parts of VD1-M₁₆₁₋₃₁₂ as probes. a: competition assay using VD1-M₁₆₁₋₃₁₂ as a probe and VD1-M₂₃₃₋₂₅₅ as a competitor (lane 1: no competitor, lane 2: 100× molar excess of competitor and lane 3: 500× molar excess of competitor) and regular EMSA using as probes VD1-M₂₃₃₋₂₅₅ (lanes 4 and 5), VD1-M₁₄₈₋₂₁₉ (lanes 6 and 7) and VD1-M₂₃₁₋₃₁₂ (lanes 8 and 9). b: investigation of the role of the A-tract. The probe used in each lane is shown in the upper margin together with the presence (♂g) or absence (-) of protein extract from male gonad. In both panels arrows show EMSA shifts and dashes unbound probe.

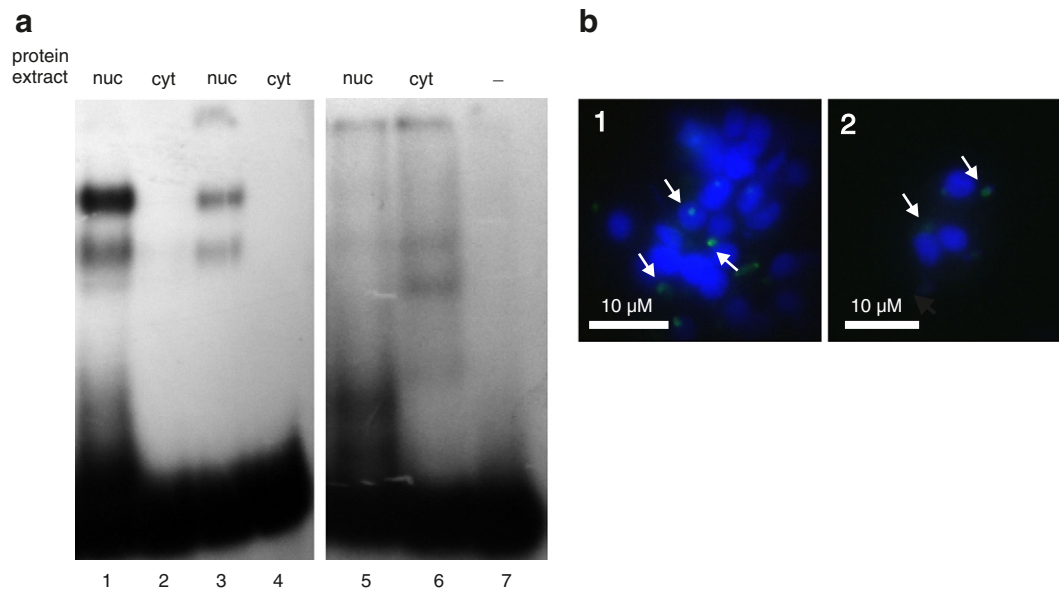


Fig. 5. Investigation of the presence of a shift when using male nuclear extracts. a: EMSA results using as probes: VD1-M₁₆₁₋₃₁₂ (lanes 1, 2, 3 and 4) and CD-M₅₉₂₋₇₉₆ (lanes 5, 6 and 7) as a control probe. VD1-M₁₆₁₋₃₁₂ was incubated with nuclear (nuc) and cytoplasmic (cyt) fractions of male gonadal extracts of two individuals. CD-M₅₉₂₋₇₉₆ was incubated with nuclear (nuc) and cytoplasmic (cyt) fractions of male gonadal extracts of one individual. Lane 7 is the free probe. b: mitochondria and nuclei staining. 1: staining of the nuclear precipitate. 2: the supernatant of the washing step after the staining (see Section 2.10).

membranes surrounding the nucleus is rather strong. Cases of non-OXPHOS functions attributed to perinuclear mitochondria have been described in the literature (Hashitani et al., 2010; Park et al., 2001). In most of such studies, perinuclear mitochondria are shown to be involved in cellular calcium transport in various mammalian systems, an activity that is not observed in the bulk of cytoplasmic mitochondria.

4. Discussion

The well documented phenomenon of masculinization (reversal of transmission route from maternal to paternal) leaves little doubt that mitochondrial sequences are directly involved in the gender-specific transmission of the two mitochondrial genomes of species with DUI. Direct evidence for masculinization exists, at present, only for the closely related species *M. edulis*, *M. galloprovincialis* and *M. trossulus*. It must, however, have occurred repeatedly in the evolution of molluscan bivalves, as it provides the best explanation for the phylogenetic pattern of maternally and paternally mitochondrial genomes of the entire collection of species with DUI under the assumption of a single origin of DUI (Zouros, 2013).

The research on the ORFs of the mitochondrial genomes has provided interesting hints about the possibility that these ORFs have a role for gender-specific transmission. The ORF that was firstly reported by Hoffmann et al. (1992) was subsequently found in the maternally transmitted genomes of other *Mytilus* species, but it was not found in paternally transmitted ones (Breton et al., 2011). An apparently homologous ORF was shown to code for a protein product in the fresh-water mussel (family Unionidae) *Venustaconcha ellipsiformis* (a species with DUI) (Breton et al., 2009), a finding that prompted Breton et al. (2011) to suggest that the *Mytilus* ORF may also produce a protein product that is somehow involved in the sex-specific transmission of the two DUI genomes. A similar suggestion was made for M-specific ORFs (Milani et al., 2014) which are of special interest, given the evidence from masculinization that the sequences responsible for gender-specific transmission are more likely to reside on the M genome. The protein product that may be coded by the ORF in the M genome reported by Milani et al. (2013) is predicted to be rich in poly-lysine or poly-serine motifs, which are features of membrane binding proteins, as those of the outer mitochondrial membrane. The RNA and the corresponding

protein of the M specific ORF have been, in fact, observed in the germline of the venerid *R. philippinarum* (Milani et al., 2014).

Analogous findings have not as yet been reported in mytilids. As noted, transcriptome studies failed to produce evidence for an mRNA product for either the F or M ORFs in *M. galloprovincialis* (Chatzoglou et al., 2013; Kyriakou et al., 2014a). Unlike the ORF of the F genome, the ORF of the M genome varies widely both in sequence and putative amino acid number among conspecific genomes. Among the 66 complete VD1 sequences of the *M. edulis*/*M. galloprovincialis* complex, currently submitted in GenBank, the length of the ORF varies from 123 to 309 nucleotides and, with the exception of a region of 40 codons, the sequence divergence is comparable to that of the entire VD1. This variation argues against a critical function for this ORF.

Our alternative strategy for mitochondrial binding sites has produced evidence for a fragment of the sperm-transmitted mitochondrial genome of *M. galloprovincialis* (genome M) that forms a complex with protein extracts from male gonads but not from female gonads or from male or female somatic tissues. In particular, we have shown that a 23-bp sequence in the first domain (VD1-M) of the control region (CR-M) is indispensable for the formation of the complex and that an adenine tract immediately upstream from it and a certain length of nucleotides upstream from the adenine tract – whose sequence may vary – are also necessary. We suggest that this part of the M genome, namely the part upstream of the adenine tract, the adenine tract and the 23 nucleotides downstream of the adenine tract, is essential for this genome's paternal inheritance and, conditionally, we refer to it as STE (for sperm transmission element). If this is the case, we would expect to find the STE in all paternally inherited genomes of the sibling-pair species *M. edulis*/*M. galloprovincialis* and possibly in other closely related species. The STE is present in all five fully sequenced M genomes of this pair that are deposited in GenBank and in the C genome of *M. galloprovincialis*, which is paternally inherited (Fig. 6a). The primary sequence of this genome is almost identical to the maternally transmitted genome (genome F of *M. galloprovincialis*), except of its control region that contains M-type sequences (Venetis et al., 2007).

Further support for the role of STE comes from the closely related species *M. trossulus*. The VD1 of the paternally inherited genome of this species has the same structure as the VD1-M of *M. galloprovincialis*, even though the primary sequence is very divergent. More importantly,

there is a strong similarity with regard to the essential parts of STE: there is an adenine tract in the middle of VD1-trM followed by a short motif whose sequence is similar to the binding site of *M. galloprovincialis* (Fig. 6b). The binding site (Fig. 6b, black box) is similar but not identical among the three types of paternally inherited genomes: the standard *M. galloprovincialis*, the C of *M. galloprovincialis* and the M of *M. trossulus*. The two *M. galloprovincialis* genomes differ in the 3rd position where the G of the standard M genome is replaced by A, and also by a deletion in the adenine tract. The standard M genome of *M. trossulus* differs from that of *M. galloprovincialis* by an insertion of G after the 4th position, by a replacement of the TGT trinucleotide in positions 9–11 by a string of three cytosines and by a substitution of G by A in position 14 and A by G in position 20 (Fig. 6b).

The maternally inherited genome of *M. trossulus* provides an even stronger support for the role of STE. This genome has a large control region that consists of two simpler control-like regions separated by a long stretch of nucleotides. The first of these regions (the M-like part) is very similar to the CR of the paternally inherited genome of *M. trossulus* and the second (the F-like part) resembles the CR of the maternally inherited genome of *M. edulis* (Cao et al., 2009). The relevant observation is that the sequence of the M-like part that corresponds to the STE differs from that of the paternally transmitted genome of *M. trossulus*: it has a shorter adenine tract and, perhaps more importantly, it carries a seven nucleotide insertion in the binding site (Fig. 6b). These differences may have obliterated the ability of the STE to form the

protein/DNA complex that is needed for the paternal transmission of the mtDNA molecule. As a result, the F genome of *M. trossulus* follows the default pattern of maternal transmission.

Taking all the results from the EMSA experiments into account we propose the following model about how the protein/STE complex is formed (Fig. 7). We suggest that the VD1-M_{161–312} domain bends at the adenine tract. The binding site attracts a protein factor which binds to it and engulfs both sides of the bended DNA producing a stable protein–DNA complex. An additional hypothesis is required to explain why the electrophoretic shifting produced always two bands. One possibility is that the protein complex consists of two subunits of which one (subunit 1) binds first to the DNA and the second subunit follows (Fig. 7a). This would be the most likely hypothesis if the two subunits are different (coded by different loci). Another possibility is that the protein factor occurs in two forms, as a monomer and as a dimer, and that both forms are capable of forming stable complexes with STE (Fig. 7b1). A modified version of this hypothesis is that the dimer is formed after the first subunit is bound to the DNA (Fig. 7b2). In this second hypothesis the two subunits of the dimer may be identical (coded by the same locus – homodimer) or different (heterodimer). A close inspection of the shifts shows that the band that corresponds to the smaller size complex is weaker in most cases (Figs. 2, 4). One explanation for this is that the complex with the monomer form is transient in the cell, but re-occurs in higher frequencies under in vitro conditions.

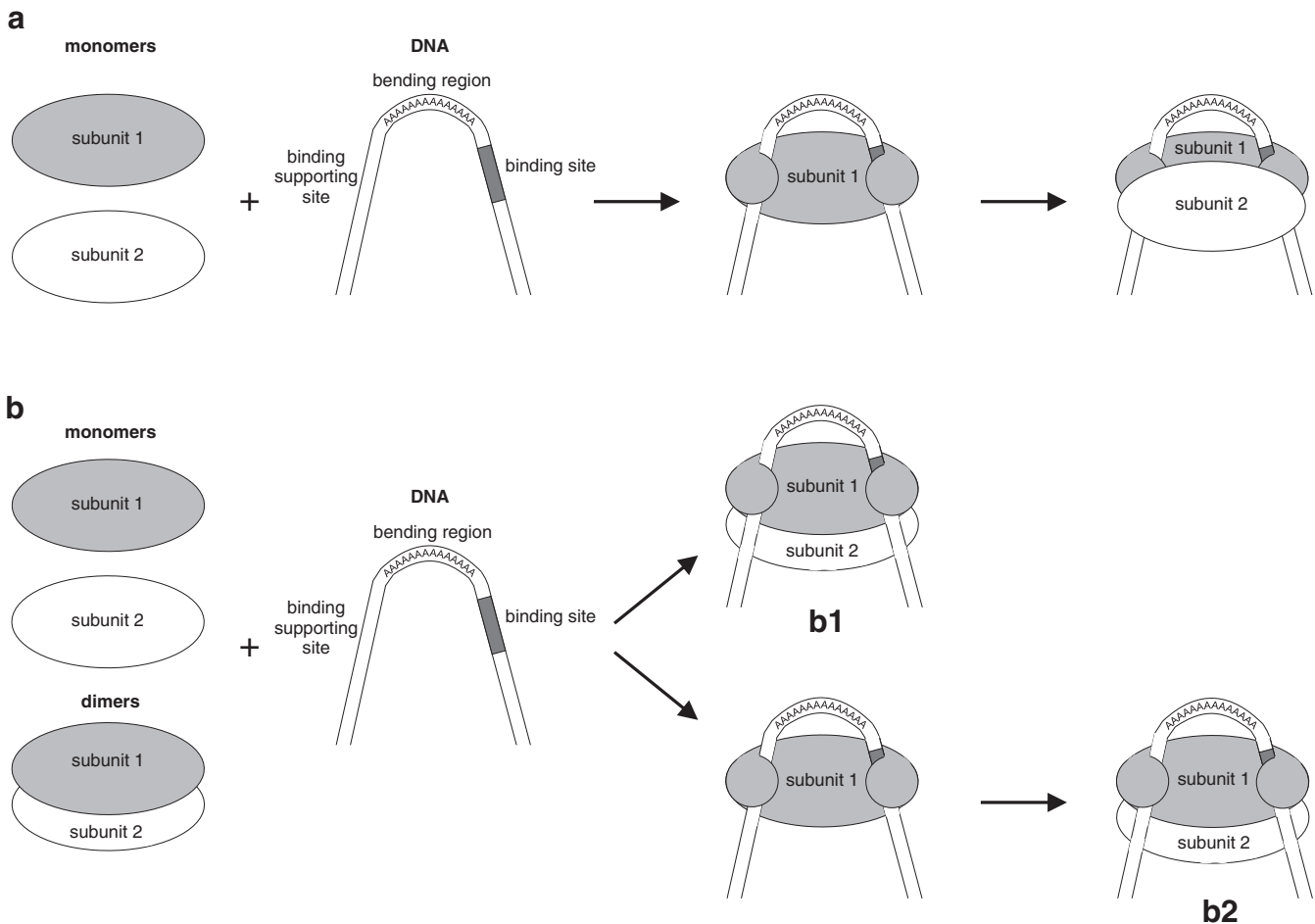


Fig. 7. A model for the interaction of VD1-M_{161–312} with a dimer protein complex from the male gonad. The adenine tract is the part at which the DNA bends. The binding site is represented by a gray box. The part upstream from the adenine tract plays a supporting role. The protein subunits (shown as ellipses) may be different (as shown) or identical (in which case the different shades are irrelevant). The DNA–mtDNA complex may be formed in two ways. a: the two subunits exist as monomers in the cytoplasm and the binding of subunit 1 to the DNA is necessary for the subsequent binding of subunit 2. In this case the dimerization is DNA-binding-dependent. b: the two subunits exist as monomers and dimers in the cytoplasm. In this case, either the dimer binds directly to the DNA (b1), or subunit 1 binds first and then subunit 2 binds to subunit 1 resulting in the formation of the complex (b2).

DUI is the best, if not the only, known case in which the male's mtDNA has successfully undermined the exclusive transmission of the female's mtDNA to the next generation and has made its own transmission an integral part of the species' biology. The sequence of events from the entry of sperm mitochondria in the egg to the point the paternal mtDNA becomes the only mtDNA type in the progeny's sperm is probably a unique developmental process in the animal kingdom. At present, we know a few important facts about the beginning and the end of the process. We know that the paternal mtDNA is packed in a small number of "mega-mitochondria" (five in the case of *Mytilus*). We also know that after entrance in the egg these mitochondria follow one of two routes: (a) they disperse randomly among the blastomeres that follow the division of the fertilized egg – and that this route occurs in embryos that develop into females, or (b) they remain together and move as a unit following successive egg divisions. We further know that the blastomere in which the sperm mitochondria aggregate occurs is the one that gives birth to the individual's germ line – and that this route occurs in embryos that develop into males. These events give a first-level answer to the question: how does the paternal mtDNA find its way into the male germ line given that it is carried only by five mitochondria among tens of thousands of egg mitochondria that carry the maternal mtDNA? This is the question about the "start" of the process. The second question is: how does the sperm get rid of the maternal mtDNA? This is the question about the "end" of the process. There can be three alternatives (Zouros, 2013). One is that somehow only paternal mitochondria enter the male's primordial germ cells (PGC). Another is that both maternal and paternal mitochondria enter these cells, but somehow the paternal mitochondria (or the paternal mtDNA) multiply faster once in the male germ line and drive the maternal mtDNA to extinction. The third alternative is that both types enter the male's germ line but the maternal mtDNA is actively eliminated before full sperm maturation. This study strongly supports the last alternative.

We suggest that in maturing male spermatocytes there exists a mechanism that destroys the mitochondria and that mitochondria carrying an mtDNA with the STE are protected from this destruction. This occurs through the formation of a complex that consists of a nuclear protein that anchors on the outer surface of the mitochondrion through its binding with a specific site of the paternal mtDNA that is carried by the mitochondrion. For this to occur, the mitochondrion must be held in close proximity to the nuclear surface. Mitochondria without the STE, i.e., mitochondria with the F genome, are not protected because of the absence of the complex. Mitochondria with the STE that are not in close proximity to the nucleus may also not be protected. According to this hypothesis, our lack to see the band shifting when we used a cytoplasm extract is due to the absence of cytoplasmic membrane fragments that surround the nucleus and are indispensable for the formation of the complex. As mentioned earlier, the proximity of perinuclear mitochondria to the nuclei appears to be strong (Fig. 5b).

The issue of how mtDNA motifs may interact with cytosolic proteins has been addressed by Chen and Butow (2005). The basic idea is that the mt-nucleoids, the protein–mtDNA complexes that are bound to the inner mitochondrial membrane, are capable of communicating with actin-attached cytosolic proteins. The system may be seen as a modification of an existing mechanism for sperm mtDNA elimination in embryos of species with strict maternal inheritance (SMI), which is the common pattern in the animal kingdom. For instance, in early embryonic stages of *C. elegans* there is a recruitment of autophagosomes in spermatozoa that engulf the paternal mitochondria and cause their lysosomal degradation. A ubiquitin–proteasome pathway that targets sperm mitochondria for degradation in the fertilized egg has also been found in several studies (Al Rawi et al., 2011; Hajjar et al., 2014; Sato and Sato, 2011; Sutovsky et al., 1999, 2000; Zhou et al., 2011). In *Mytilus*, the sex of the offspring (and, by association, the inheritance or not of the paternal mtDNA) is determined by the mother's nuclear genotype (Kenchington et al., 2002; Kenchington et al., 2009; Saavedra et al., 1997). A proteomic study by Diz et al. (2013) showed that eggs of

females that produce only sons have higher expression of different proteasome subunits than eggs of females that produce only daughters. The involvement of the ubiquitin–proteasome system in DUI has also been suggested in earlier studies (Diz et al., 2009; Ghiselli et al., 2012).

Our study provides strong evidence that the paternally transmitted mitochondrial genome of *Mytilus* carries sequences that interact with a nuclear-encoded factor (or factors) that is present only in spermatozoa. We suggest that this interaction is responsible for the presence of only the M genome in the mature sperm and, therefore, is instrumental for this genome's paternal inheritance. A sequel of this hypothesis is that the maternally inherited genome has a passive role with regard to transmission route. Maternal inheritance can be seen as the default state from which DUI resulted through the emergence of the M genome and its subsequent interactions with the nuclear genome that have made this genome an indispensable feature of species with this pattern of mtDNA inheritance. The first events that produced the M genome from the F would, according to this hypothesis, have occurred in the VD1 part of the control region. Divergence in the rest of the molecule followed in a relatively rapid pace because of relaxed selection pressure on the M genome (Stewart et al., 1996). This account is consistent with the F genome's indispensability in fueling the organism's cells and the restriction of the activity of the M genome in the late stages of spermatogenesis – when the F genome has been eliminated and the cell is dependent on the M genome for its energy needs (Obata et al., 2011). In turn, this explains why the M genome has not degenerated in a selfish element that would carry only the information that is necessary for its transmission.

Supplementary data to this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.gene.2015.02.047>.

Acknowledgments

We thank P. Livanos for the help with the fluorescent microscope and Dr. D. Stravopodis for the advice with the EMSA tests. Adult mussels (*M. galloprovincialis*) were kindly provided by "Poseidon Co." and "Petropoulos Mare" mussel cultures (Nea Peramos, Saronikos Gulf, Athens, Greece). This work was supported by a Research Grant from the National and Kapodistrian University of Athens (Grant # 11237/2013 to G.C.R.).

References

- Al Rawi, S., Louvet-Vallée, S., Djeddi, A., Sachse, M., Culetto, E., Hajjar, C., Boyd, L., Legouis, R., Galy, V., 2011. Postfertilization autophagy of sperm organelles prevents paternal mitochondrial DNA transmission. *Science* 334, 1144–1147.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing a principle of protein–dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254.
- Breton, S., Doucet-Beaupre, H., Stewart, D.T., Piontkivska, H., Karmakar, M., Bogan, A.E., Hoeh, W.R., 2009. Comparative mitochondrial genomics of freshwater mussels (*Bivalvia*: Unionoids) with doubly uniparental inheritance of mtDNA: gender-specific open reading frames and putative origins of replication. *Genetics* 183, 1575–1589.
- Breton, S., Ghiselli, F., Passamonti, M., Milani, L., Stewart, D.T., Hoeh, W.R., 2011. Evidence for a fourteenth mtDNA-encoded protein in the female-transmitted mtDNA of marine mussels (*Bivalvia*: Mytilidae). *PLoS One* 6, e19365.
- Burzyński, A., 2007. Two events are responsible for an insertion in a paternally inherited mitochondrial genome of the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Genetics* 175, 959–962.
- Burzyński, A., Zbawicka, M., Skibinski, D.O.F., Wenne, R., 2003. Evidence for recombination in the marine mussel *Mytilus trossulus* from the Baltic. *Mol. Biol. Evol.* 20, 388–392.
- Burzyński, A., Zbawicka, M., Skibinski, D.O.F., Wenne, R., 2006. Doubly uniparental inheritance is associated with high polymorphism for rearranged and recombinant control region haplotypes in Baltic *Mytilus trossulus*. *Genetics* 174, 1081–1094.
- Cao, L., Kenchington, E.L., Zouros, E., 2004a. Differential segregation patterns of sperm mitochondria in embryos of the blue mussel (*Mytilus edulis*). *Genetics* 166, 883–894.
- Cao, L., Kenchington, E., Zouros, E., Rodakis, G.C., 2004b. Evidence that the large noncoding sequence is the main control region of maternally and paternally transmitted mitochondrial genomes of the marine mussel (*Mytilus* spp.). *Genetics* 167, 835–850.
- Cao, L., Ort, S.B., Mizi, A., Pogson, G., Kenchington, E., Zouros, E., Rodakis, G.C., 2009. The control region of maternally and paternally inherited mitochondrial genomes of three species of the sea mussel genus *Mytilus*. *Genetics* 181, 1045–1056.
- Chatzoglou, E., Kyriakou, E., Zouros, E., Rodakis, G.C., 2013. The mRNAs of maternally and paternally inherited mtDNAs of the mussel *Mytilus galloprovincialis*: start/end points and polycistronic transcripts. *Gene* 520, 156–165.

- Chen, X.J., Butow, R.A., 2005. The organization and inheritance of the mitochondrial genome. *Nat. Rev. Genet.* 6, 815–825.
- Chora, S., Bebianno, M., Romeo, M., 2009. Analysis of proteins from marine molluscs. *Methods Mol. Biol.* 519, 197–204.
- Cogswell, A., Kenchington, E.L., Zouros, E., 2006. Segregation of sperm mitochondria in two and four cell embryos of the blue mussel *Mytilus edulis*: implications for the mechanism of doubly uniparental inheritance of mitochondrial DNA. *Genome* 49, 799–807.
- Crothers, D.M., Haran, T.E., Nadeau, J.G., 1990. Intrinsically bent DNA. *J. Biol. Chem.* 265, 7093–7096.
- Diz, A.P., Dudley, E., MacDonald, B.W., Piña, B., Kenchington, E.L., Zouros, E., Skibinski, D.O., 2009. Genetic variation underlying protein expression in eggs of the marine mussel *Mytilus edulis*. *Mol. Cell. Proteomics* 8, 132–144.
- Diz, A.P., Dudley, E., Cogswell, A., MacDonald, B.W., Kenchington, E.L., Zouros, E., Skibinski, D.O., 2013. Proteomic analysis of eggs from *Mytilus edulis* females differing in mitochondrial DNA transmission mode. *Mol. Cell. Proteomics* 12, 3068–3080.
- Douris, V., Giokas, S., Lecamidou, R., Mylonas, M., Rodakis, G.C., 1998. Phylogenetic analysis of mitochondrial DNA and of morphological characters suggests a need for taxonomic re-evaluation within the Alopinae (Gastropoda: Clausiliidae). *J. Molluscan Stud.* 64, 81–92.
- Ghiselli, F., Milani, L., Chang, P.L., Hedgecock, D., Davis, J.P., Nuzhdin, S.V., Passamonti, M., 2012. *De novo* assembly of the manila clam *Ruditapes philippinarum* transcriptome provides new insights into expression bias, mitochondrial doubly uniparental inheritance and sex determination. *Mol. Biol. Evol.* 29, 771–786.
- Hajjar, C., Sampuda, K.M., Boyd, L., 2014. Dual roles for ubiquitination in the processing of sperm organelles after fertilization. *BMC Dev. Biol.* 14, 6.
- Hashitani, H., Lang, R.J., Suzuki, H., 2010. Role of perinuclear mitochondria in the spatiotemporal dynamics of spontaneous Ca^{2+} waves in interstitial cells of Cajal-like cells of the rabbit urethra. *Br. J. Pharmacol.* 161, 680–694.
- Hoeh, W.R., Stewart, D.T., Saavedra, C., Sutherland, B.W., Zouros, E., 1997. Phylogenetic evidence for role-reversals of gender-associated mitochondrial DNA in *Mytilus* (Bivalvia: Mytilidae). *Mol. Biol. Evol.* 14, 959–967.
- Hoffmann, R.J., Boore, J.L., Brown, W.M., 1992. A novel mitochondrial genome organization for the blue mussel, *Mytilus edulis*. *Genetics* 131, 397–412.
- Katayama, S., Matsushita, O., Jung, C.M., Minami, J., Okabe, A., 1999. Promoter upstream bent DNA activates the transcription of the *Clostridium perfringens* phospholipase C gene in a low temperature-dependent manner. *EMBO J.* 18, 3442–3450.
- Kenchington, E., MacDonald, B., Cao, L., Tsagkarakis, D., Zouros, E., 2002. Genetics of mother-dependent sex ratio in blue mussels (*Mytilus* spp.) and implications for doubly uniparental inheritance of mitochondrial DNA. *Genetics* 161, 1579–1588.
- Kenchington, E.L., Hamilton, L., Cogswell, A., Zouros, E., 2009. Paternal mtDNA and maleness are co-inherited but not causally linked in Mytilid mussels. *PLoS One* 4, 9.
- Koo, H.S., Wu, H.M., Crothers, D.M., 1986. DNA bending at adenine · thymine tracts. *Nature* 320, 501–506.
- Kyriakou, E., Zouros, E., Rodakis, G.C., 2010. The atypical presence of the paternal mitochondrial DNA in somatic tissues of male and female individuals of the blue mussel species *Mytilus galloprovincialis*. *BMC Res. Notes* 3, 222.
- Kyriakou, E., Chatzoglou, E., Zouros, E., Rodakis, G.C., 2014a. The rRNA and tRNA transcripts of maternally and paternally inherited mitochondrial DNAs of *Mytilus galloprovincialis* suggest presence of a “degradosome” in mussel mitochondria and necessitate the re-annotation of the l-rRNA/CR boundary. *Gene* 540, 78–85.
- Kyriakou, E., Chatzoglou, E., Rodakis, G.C., Zouros, E., 2014b. Does the ORF in the control region of *Mytilus* mtDNA code for a protein product? *Gene* 546, 448–450.
- Ladoukakis, M.D., Zouros, E., 2001a. Direct evidence for homologous recombination in mussel (*Mytilus galloprovincialis*) mitochondrial DNA. *Mol. Biol. Evol.* 18, 1168–1175.
- Ladoukakis, M.D., Zouros, E., 2001b. Recombination in animal mitochondrial DNA: evidence from published sequences. *Mol. Biol. Evol.* 18, 2127–2131.
- Ladoukakis, L., Saavedra, C., Magoulas, A., Zouros, E., 2002. Mitochondrial DNA variation in a species with two mitochondrial genomes: the case of *Mytilus galloprovincialis* from the Atlantic, the Mediterranean and the Black Sea. *Mol. Ecol.* 11, 755–769.
- Lee, J., Shin, M.K., Ryu, D.K., Kim, S., Ryu, W.S., 2010. Insertion and deletion mutagenesis by overlap extension PCR. *Methods Mol. Biol.* 634, 137–146.
- Longo, F.J., Dornfeld, E.J., 1967. The fine structure of spermatid differentiation in the mussel, *Mytilus edulis*. *J. Ultrastruct. Res.* 20, 462–480.
- Maxam, A.M., Gilbert, W., 1980. Sequencing end-labeled DNA with base-specific chemical cleavages. *Methods Enzymol.* 65, 499–560.
- Milani, L., Ghiselli, F., Maurizii, M.G., Passamonti, M., 2011. Doubly uniparental inheritance of mitochondria as a model system for studying germ line formation. *PLoS One* 6, 11.
- Milani, L., Ghiselli, F., Guerra, D., Breton, S., Rassamonti, M., 2013. A comparative analysis of mitochondrial ORFans: new clues on their origin and role in species with doubly uniparental inheritance of mitochondria. *Genome Biol. Evol.* 5, 1408–1434.
- Milani, L., Ghiselli, F., Maurizii, M.G., Nuzhdin, S.V., Passamonti, M., 2014. Paternally transmitted mitochondria express a new gene of potential viral origin. *Genome Biol. Evol.* 6, 391–405.
- Mizi, A., Zouros, E., Moschonas, N., Rodakis, G.C., 2005. The complete maternal and paternal mitochondrial genomes of the Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis*: implications for the doubly uniparental inheritance mode of mtDNA. *Mol. Biol. Evol.* 22, 952–967.
- Mizi, A., Zouros, E., Rodakis, G.C., 2006. Multiple events are responsible for an insertion in a paternally inherited mitochondrial genome of the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Genetics* 172, 2695–2698.
- Obata, M., Komaru, A., 2005. Specific location of sperm mitochondria in mussel *Mytilus galloprovincialis* zygotes stained by MitoTracker. *Develop. Growth Differ.* 47, 255–263.
- Obata, M., Sano, N., Komaru, A., 2011. Different transcriptional ratios of male and female transmitted mitochondrial DNA and tissue-specific expression patterns in the blue mussel, *Mytilus galloprovincialis*. *Develop. Growth Differ.* 53, 878–886.
- Park, M.K., Ashby, M.C., Erdemli, G., Petersen, O.H., Tepikin, A.V., 2001. Perinuclear, perigranular and sub-plasmalemmal mitochondria have distinct functions in the regulation of cellular calcium transport. *EMBO J.* 20, 1863–1874.
- Pérez-Martín, J., Rojo, F., de Lorenzo, V., 1994. Promoters responsive to DNA bending: a common theme in prokaryotic gene expression. *Microbiol. Rev.* 58, 268–290.
- Quesada, H., Wenne, R., Skibinski, D.O.F., 1999. Interspecies transfer of female mitochondrial DNA is coupled with role-reversals and departure from neutrality in the mussel *Mytilus trossulus*. *Mol. Biol. Evol.* 16, 655–665.
- Saavedra, C., Reyero, M.L., Zouros, E., 1997. Male-dependent doubly uniparental inheritance of mitochondrial DNA and female-dependent sex-ratio in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Genetics* 145, 1073–1082.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T., 1989. *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Sato, M., Sato, K., 2011. Degradation of paternal mitochondria by fertilization-triggered autophagy in *C. elegans* embryos. *Science* 334, 1141–1144.
- Skibinski, D.O., Gallagher, C., Beynon, C.M., 1994a. Mitochondrial DNA inheritance. *Nature* 368, 817–818.
- Skibinski, D.O.F., Gallagher, C., Beynon, C.M., 1994b. Sex-limited mitochondrial DNA transmission in the marine mussel *Mytilus edulis*. *Genetics* 138, 801–809.
- Soltys, B.J., Gupta, R.S., 1992. Interrelationships of endoplasmic reticulum, mitochondria, intermediate filaments and microtubules — a quadruple fluorescence labeling study. *Biochem. Cell Biol.* 70, 1174–1186.
- Stewart, D.T., Kenchington, E.R., Singh, R.K., Zouros, E., 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, 1349–1357.
- Sutovsky, P., Moreno, R.D., Ramalho-Santos, J., Dominko, T., Simerly, C., Schatten, G., 1999. Ubiquitin tag for sperm mitochondria. *Nature* 402, 371–372.
- Sutovsky, P., Moreno, R.D., Ramalho-Santos, J., Dominko, T., Simerly, C., Schatten, G., 2000. Ubiquitinated sperm mitochondria, selective proteolysis, and the regulation of mitochondrial inheritance in mammalian embryos. *Biol. Reprod.* 63, 582–590.
- Tang, H.L., Lung, H.L., Wu, K.C., Le, A.P., Tang, H.M., Fung, M.C., 2007. Vimentin supports mitochondrial morphology and organization. *Biochem. J.* 410, 141–146.
- Theologidis, I., Saavedra, C., Zouros, E., 2007. No evidence for absence of paternal mtDNA in male progeny from pair matings of the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Genetics* 176, 1367–1369.
- Venetis, C., Theologidis, I., Zouros, E., Rodakis, G.C., 2006. No evidence for presence of maternal mitochondrial DNA in the sperm of *Mytilus galloprovincialis* males. *Proc. R. Soc. B* 273, 2483–2489.
- Venetis, C., Theologidis, I., Zouros, E., Rodakis, G.C., 2007. A mitochondrial genome with a reversed transmission route in the Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Gene* 406, 79–90.
- Verdonk, N.H., Van Den Biggelaar, J.A.M., 1983. Early development and the formation of germ layers. In: Verdonk, N.H., van den Biggelaar, J.A.M., Tompa, A.S. (Eds.), *The Mollusca. Development vol. 3*. Academic Press, New York, pp. 91–134.
- Wenne, R., Skibinski, D.O.F., 1995. Mitochondrial DNA heteroplasmy in European populations of the mussel *Mytilus edulis*. *Mar. Biol.* 122, 619–624.
- White, D.J., Wolff, J.N., Pierson, M., Gemmell, N.J., 2008. Revealing the hidden complexities of mtDNA inheritance. *Mol. Ecol.* 17, 4925–4942.
- Zhou, Q., Li, H., Xue, D., 2011. Elimination of paternal mitochondria through the lysosomal degradation pathway in *C. elegans*. *Cell Res.* 21, 1662–1669.
- Zouros, E., 2013. Biparental inheritance through uniparental transmission: the doubly uniparental inheritance (DUI) of mitochondrial DNA. *Evol. Biol.* 40, 1–31.
- Zouros, E., Ball, A.O., Saavedra, C., Freeman, K.R., 1994a. Mitochondrial DNA inheritance. *Nature* 368, 818.
- Zouros, E., Oberhouser Ball, A., Saavedra, C., Freeman, K.R., 1994b. An unusual type of mitochondrial DNA inheritance in the blue mussel *Mytilus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91, 7463–7467.