



Ευρωπαϊκή Ένωση
Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο



ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ
ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ ΚΑΙ ΔΙΑ ΒΙΟΥ ΜΑΘΗΣΗ
επένδυση στην κοινωνία της γνώσης

ΥΠΟΥΡΓΕΙΟ ΠΑΙΔΕΙΑΣ ΚΑΙ ΘΡΗΣΚΕΥΜΑΤΩΝ
ΕΙΔΙΚΗ ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ

Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης



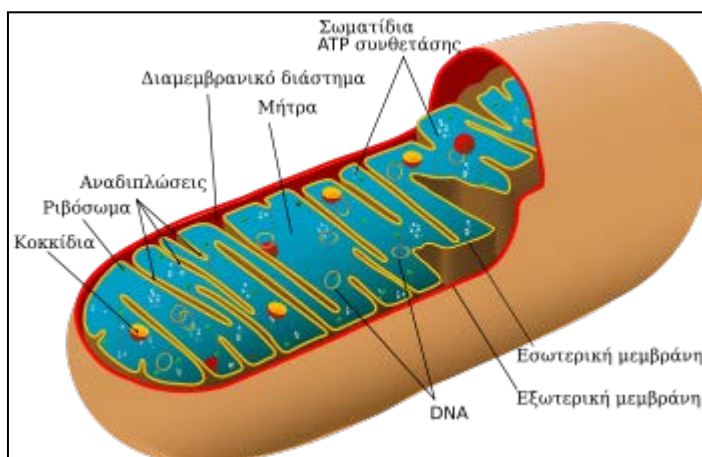
ΕΥΡΩΠΑΪΚΟ ΚΟΙΝΩΝΙΚΟ ΤΑΜΕΙΟ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΔΙΑ ΒΙΟΥ ΜΑΘΗΣΗΣ ΑΕΙ ΓΙΑ ΤΗΝ ΕΠΙΚΑΙΡΟΠΟΙΗΣΗ ΓΝΩΣΕΩΝ ΑΠΟΦΟΙΤΩΝ ΑΕΙ (ΠΕΓΑ)

«Οι σύγχρονες τεχνικές βιο-ανάλυσης στην υγεία, τη γεωργία, το περιβάλλον και τη διατροφή»

Το Μιτοχονδριακό DNA

Τα μιτοχόνδρια, η δομή των οποίων απεικονίζεται στην Εικόνα 1, είναι θεμελιώδη οργανίδια που συναντούνται σε όλα τα ευκαρυωτικά κύτταρα και χρησιμοποιούνται για το μεταβολισμό των βιολογικών μακρομορίων που προσλαμβάνουν οι οργανισμοί με τις τροφές. Έτσι, με τη βοήθεια των μιτοχονδρίων τα κύτταρα διασπούν τους υδατάνθρακες και τα λίπη συνθέτοντας χημική ενέργεια - μόρια τριφωσφορικής αδενοσίνης (ATP) - μέσω της διαδικασίας της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης. Η



Εικόνα 1: Η δομή του μιτοχονδρίου

διαδικασία αυτή αποτελεί την κυτταρική αναπνοή, είναι αερόβια και συντελείται διαμέσου ενός πολύπλοκου διαμεμβρανικού ενζύμου που βρίσκεται στην εσωτερική μεμβράνη του μιτοχονδρίου και ονομάζεται ATP-συνθετάση. Τα μιτοχόνδρια διαθέτουν DNA έτσι ώστε να μπορούν να αναπαράγονται χωρίς να χρειάζεται να διαιρεθεί το κύτταρο. Αυτή η σχετική αυτοδυναμία κάνει τους επιστήμονες να υποθέτουν πως προέρχονται από προκαρυωτικούς οργανισμούς που ενσωματώθηκαν σε ευκαρυωτικά κύτταρα, συμβιώνοντας με αυτά.

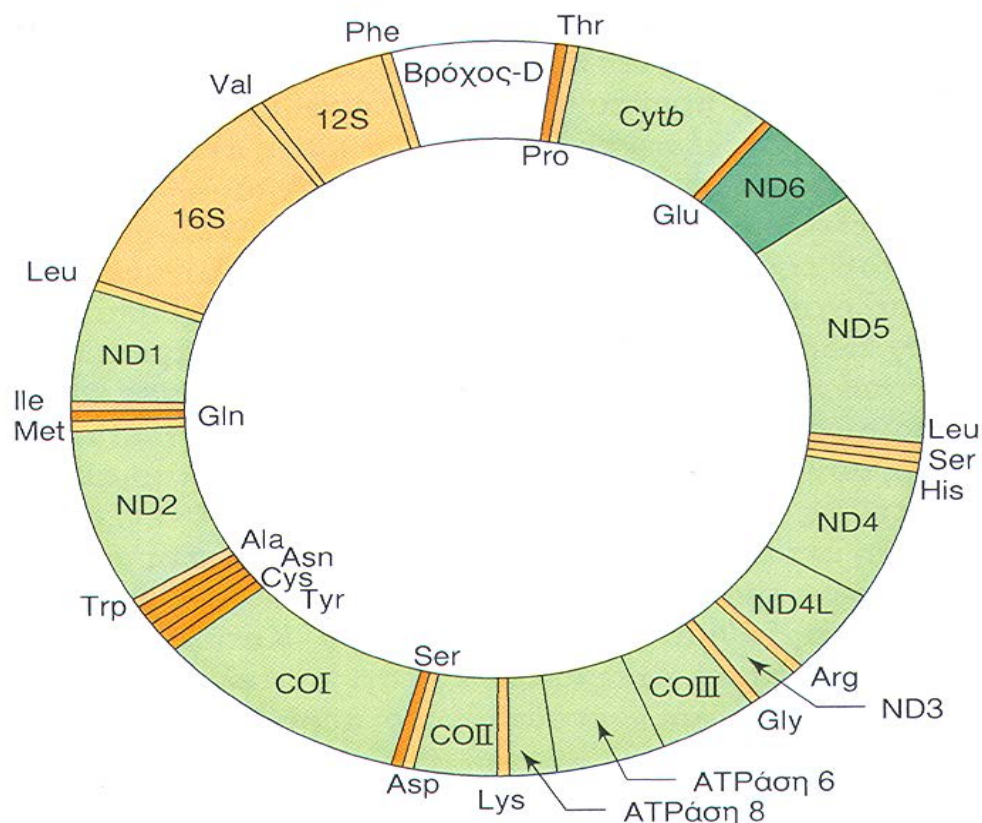
Το mtDNA είναι απλοειδές, δίκλωνο, κυκλικό μόριο. Έχει σχετικά μικρό μέγεθος και μπορεί εύκολα να απομονωθεί. Συγκεκριμένα, το μέγεθος του μιτοχονδριακού γονιδιώματος των ζώων κυμαίνεται από 14000 ζεύγη βάσεων (14kb) (στον νηματώδη, *Caenorhabditis elegans*), έως 42000 ζεύγη βάσεων (42kb) (στο χτένι, *Placoepecten megallanicus*), ενώ στα περισσότερα ζώα είναι γύρω στις 16-20 kb.

Τα γονιδιώματα των μιτοχονδρίων κωδικοποιούν πρωτεΐνες που συνδέονται με την οξειδωτική φωσφορυλίωση, μόρια rRNA και tRNA που χρησιμοποιούνται στα μιτοχόνδρια και λίγες πρωτεΐνες που συμμετέχουν στη μετάφραση.

Έχει προσδιοριστεί η αλληλουχία τουλάχιστον 200 μιτοχονδριακών γονιδιωμάτων τα περισσότερα εκ των οποίων κωδικοποιούν από 3 έως 37 πρωτεΐνες. Τα μιτοχονδριακά γονιδιώματα των ζώων (μέσα στα οποία

περιλαμβάνονται και τα πτηνά), έχουν κατά κανόνα μόνο 13 γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες (συν 22 tRNA και 2 rRNA).

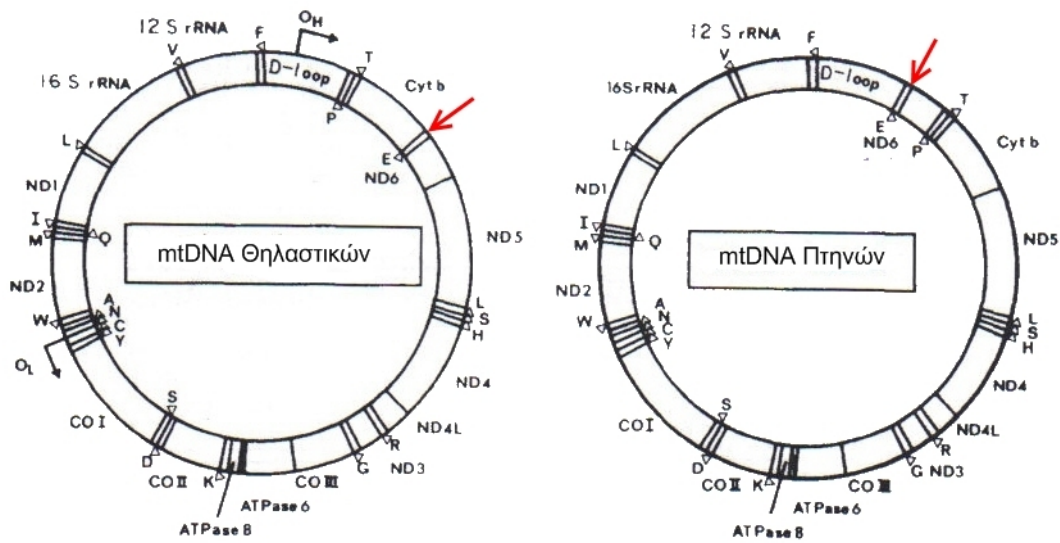
Η Εικόνα 2 δείχνει έναν χάρτη του μιτοχονδριακού γονιδιώματος των θηλαστικών, αποτελούμενου από 16.569 ζεύγη βάσεων.



Εικόνα 2: Το μιτοχονδριακό γονιδίωμα.

Το γονιδίωμα κωδικοποιεί τα 16S και 12S rRNA και τα 22 tRNA. Οι προσδιορισμοί των αμινοξέων για το tRNA σημειώνονται εξωτερικά του κύκλου για τα γονίδια που μεταγράφονται αριστερόστροφα και εσωτερικά του κύκλου για τα γονίδια που μεταγράφονται δεξιόστροφα. Ομοίως τα 13 γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες υποδεικνύονται με σκούρο πράσινο (μεταγράφονται αριστερόστροφα) και ανοικτό πράσινο (μεταγράφονται δεξιόστροφα). Τα γονίδια κωδικοποιούν: Cytb, κυτόχρωμα b. ND1-6, συστατικά του συμπλόκου της αφυδρογονάσης του NADH. COI-III, υπομονάδες του συμπλόκου της οξειδάσης του κυτοχρώματος. ATPάση 6 και 8, πολυπεπτίδια του συμπλόκου της μιτοχονδριακής ATPάσης. Οι δύο υποκινητές εντοπίζονται στον βρόχο-D περιοχή η οποία εμπλέκεται και στην αντιγραφή του DNA.

Παρά την μεγάλη ομοιότητα μεταξύ των ζώων, έχει βρεθεί (Desjardins & Morais, 1999) ότι η δομή του μιτοχονδριακού γονιδιώματος των πτηνών διαφέρει από τη αντίστοιχη των θηλαστικών ως προς την θέση του γονιδίου ND6 όπως φαίνεται στην ακόλουθη εικόνα.



Εικόνα 3: Σύγκριση mtDNA θηλαστικών με το αντίστοιχο των πτηνών. Η διαφορά τους υποδεικνύεται με βέλος.

Το mtDNA θεωρείται κατάλληλο για χρήση σε μελέτες διαχωρισμού ειδών για τους εξής λόγους (Scheffler, 2001):

- Η απομόνωση του mtDNA των 16-20 kb από τα δισεκατομμύρια άλλα νουκλεοτίδια του γονιδιώματος είναι σχετικά εύκολη λόγω φυσικού διαχωρισμού του.
- Η ποσότητα του ανά κύτταρο θεωρείται υπερεπαρκής αφού απαντάται περίπου σε 1000 αντίτυπα (1000 φορές περισσότερο από το πυρηνικό DNA). Κάτι τέτοιο αυξάνει την πιθανότητα επιτυχούς ενίσχυσης με την τεχνική PCR, του επιθυμητού τμήματος του γονιδιώματος που μας ενδιαφέρει.
- Λόγω της μητρικής του προελεύσεως και την απουσία ανασυνδυασμού κληρονομείται απaráλλακτο από γενιά σε γενιά.

Ο μεγάλος ρυθμός μεταλλαγής του (10 φορές υψηλότερος του πυρηνικού) έχει ως αποτέλεσμα την συσσώρευση πολυμορφισμών και την δημιουργία μεγάλης ποικιλομορφίας μεταξύ των μιτοχονδρίων, όχι μόνο μεταξύ των ειδών αλλά και ανάμεσα στο ίδιο είδος. Έτσι, μπορούν να εντοπιστούν διαφορές μεταξύ των πληθυσμών ακόμη και στις περιπτώσεις όπου οι πληθυσμοί είναι ίδιοι στο επίπεδο του πυρηνικού DNA (Avise *et al.*, 1994).

Το ζωικό mtDNA παρουσιάζει μια σαφή συντηρητικότητα ως προς τα γονίδια που περιέχει. Πράγματι, το mtDNA των σπονδυλωτών, εχινόδερμων και εντόμων περιλαμβάνει 13 γονίδια που μεταφράζονται σε πολυπεπτιδικές αλυσίδες, 2 γονίδια για ριβοσωμικά RNA (12s και 16s rRNA) και 22 γονίδια για μεταφορικά RNA (tRNA). Επίσης υπάρχει μια περιοχή που δεν κωδικοποιεί, αλλά περιέχει τις αρχικές θέσεις για αντιγραφή του mtDNA και την μεταγραφή του σε RNA, γνωστή ως περιοχή ελέγχου ή βρόγχος D (D-loop). Τα μιτοχονδριακά γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες καθορίζουν υπομονάδες ενζύμων που εμπλέκονται στην αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων στην αναπνευστική αλυσίδα (Εικόνα 2). Αυτά είναι: οι 7 υπομονάδες αφυδρογονάσης του NADH (ND 1, 2, 3, 4, 4L, 5, 6), μια υπομονάδα του κυτοχρώματος b, τρεις υπομονάδες της οξειδάσης του κυτοχρώματος c (COI, COII, COIII) και δυο υπομονάδες της μιτοχονδριακής συνθετάσης του ATP (ATάση 6, 8). Για τη λειτουργία των βιοχημικών αντιδράσεων των μιτοχονδρίων χρειάζονται περισσότερα ένζυμα, από το μεγαλύτερο μέρος των οποίων ελέγχεται από το πυρηνικό DNA, συντίθεται στο κυτταρόπλασμα και εισάγεται στα μιτοχόνδρια. Προφανώς το εξαρτώμενο από τον πυρήνα μιτοχονδριακό γονιδίωμα είναι αποτέλεσμα της προοδευτικής μεταφοράς του γενετικού ελέγχου στον πυρήνα από ένα προηγούμενο πιο σύνθετο και μεγαλύτερο μιτοχονδριακό γονιδίωμα (Wolstenholme, 1992).

Η απουσία ενδονίων, ψευδογονιδίων, επαναλαμβανόμενου DNA και μεγάλων ακολουθιών, οι οποίες παρεμβάλλονται μεταξύ των γονιδίων του, καθιστούν το mtDNA παράδειγμα γενετικής οικονομίας στη φύση. Εξάλλου, οι περισσότερες από τις γενετικές αλλαγές που παρατηρούνται είναι απλές αντικαταστάσεις βάσεων, μικρές προσθήκες ή ελλείμματα ενός ή λίγων νουκλεοτιδίων, ενώ λιγότερες αφορούν σε μεγάλες αλλαγές (μέχρι αρκετές εκατοντάδες νουκλεοτίδια) στο μήκος του μορίου. Οι περισσότερες διαφορές μήκους περιορίζονται στην περιοχή ελέγχου του μορίου (Roehrdanz & Degruillier, 1998).

Στα σπονδυλωτά, οι αλυσίδες mtDNA, γνωστές ως L (light- ελαφριά), και H (heavy-βαριά), παρουσιάζουν σημαντικές διαφορές στο περιεχόμενο G+T. Με λίγες εξαιρέσεις, όλα τα γονίδια στο μιτοχονδριακό γονιδίωμα των σπονδυλωτών κωδικοποιούνται από την αλυσίδα H. Έτσι από τα 37 γονίδια στο mtDNA των

σπονδυλωτών μόνο ο τύπος tRNA και το γονίδιο ND6 κωδικοποιούνται από την αλυσίδα L (Avisé *et al.*, 1994).

Όμως, ενώ στα σπονδυλωτά λιγότερο από το 10% του ολικού αριθμού των βάσεων που κωδικοποιούν στο μιτοχονδριακό γονιδίωμα βρίσκονται στην αλυσίδα L, στη *Drosophila* (Meyer, 1993), το 50% περίπου βρίσκεται σε αυτή.

Η διάταξη των γονιδίων στο ζωικό mtDNA, είναι εξαιρετικά σταθερή, τουλάχιστον μέσα σε μια ταξινομική τάξη ή φύλλο. Ωστόσο, μπορεί να υπάρξει ποικιλότητα στη σειρά των γονιδίων του mtDNA, ακόμα και μέσα στο ίδιο φύλο (Wilson *et al.*, 1985).

Τα περισσότερα σωματικά κύτταρα και τα ώριμα ωοκύτταρα, περιέχουν εκατοντάδες ή χιλιάδες μόρια mtDNA. Έτσι, μια καινούρια μετάλλαξη θα δημιουργήσει μια κατάσταση ετεροπλασμίας, κατά την οποία δύο ή περισσότεροι γενότυποι θα συνυπάρχουν στο ίδιο άτομο. Στην πράξη κάθε μιτοχόνδριο περιέχει μόνο έναν τύπο mtDNA (ομοπλασμία). Περιπτώσεις ετεροπλασμίας έχουν διαπιστωθεί σε διάφορες ομάδες οργανισμών, αλλά είναι σχετικά σπάνιες και έτσι έχουν μικρή σημασία σε μελέτες του ζωικού mtDNA (Avisé *et al.*, 1994).

Ο μιτοχονδριακός γενετικός κώδικας είναι εκφυλισμένος και λιγότερος αυστηρός από τον παγκόσμιο γενετικό κώδικα. Ο μιτοχονδριακός κώδικας διαφέρει από τον παγκόσμιο γενετικό κώδικα στα εξής σημεία:

- Το UGA κωδικοποιεί για τρυπτοφάνη και δεν αποτελεί σημείο τερματισμού.
- Το CUA κωδικοποιεί για θρεονίνη αντί για λευκίνη.
- Το AUA κωδικοποιεί για μεθειονίνη αντί για ισολευκίνη.

Πολλοί ερευνητές πιστεύουν ότι τα μεταλλαγμένα κωδικόνια αντιπροσωπεύουν εξελικτικά ατυχήματα, τα οποία όμως διατηρήθηκαν διότι συνθέτουν ελάχιστες πρωτεΐνες και είναι συνεπώς αβλαβή για τον οργανισμό. Η αντιγραφή του mtDNA βρίσκεται κάτω από τον έλεγχο του πυρήνα, αφού τα χρησιμοποιούμενα ένζυμα, εισάγονται στο μιτοχόνδριο από το κυτταρόπλασμα. Στα ζωικά κύτταρα η κληρονομική μεταβίβαση του mtDNA γίνεται μητρικά καθώς το ωάριο προσφέρει πάντα όλο το κυτταρόπλασμα για το σχηματισμό του ζυγωτού (Griffiths *et al.*, 2002).

Ο ρυθμός εξέλιξης του mtDNA ποικίλει ανάμεσα στις διάφορες ομάδες οργανισμών. Στα θηλαστικά εξελίσσεται 5 με 10 φορές ταχύτερα από το πυρηνικό DNA (Jorde, Bamshad, & Rogers 1998), ίσως επειδή η DNA πολυμεράση, που

αντιγράφει το mtDNA, στερείται της ικανότητας εντοπισμού και διόρθωσής λαθών, ικανότητα που διαθέτουν οι πολυμεράσες που αντιγράφουν το πυρηνικό γονιδίωμα (Brown, 1993). Για παράδειγμα, ο ρυθμός εξέλιξης του mtDNA εκτιμάται ότι είναι 2% νουκλεοτιδική απόκλιση ανά ένα εκατομμύριο χρόνια. Ο ρυθμός αυτός αφορά σε ανώτερα ταξινομικά τάξα, ενώ στα έντομα εκτιμάται ότι είναι μικρότερος καθώς επηρεάζεται από διάφορα γνωρίσματα, όπως ο μεταβολικός αριθμός, ο χρόνος γενιάς και το μέγεθος (Avise *et al.*, 1992). Η πλειονότητα των μεταλλάξεων που συμβαίνει στο μόριο του μιτοχονδριακού DNA αφορούν απλές αντικαταστάσεις νουκλεοτιδίων. Οι μεταπτώσεις υπερσχύουν των μεταστροφών σε συγκρίσεις στενά συγγενικών ειδών, αλλά η αναλογία μεταπτώσεων/μεταστροφών ελαττώνεται καθώς αυξάνει η εξελικτική απόσταση μεταξύ των ειδών. Πιο σπάνια συμβαίνουν προσθήκες ή ελλείμματα και συνήθως περιορίζονται στην περιοχή του βρόγχου D σε ασπόνδυλα και κατώτερα σπονδυλωτά (Moritz *et al.*, 1987).

Τα γονίδια του mtDNA με την μεγαλύτερη προτίμηση σε μελέτες διαχωρισμού ειδών είναι τα: Cyt b, COI, 12S και 16S rRNA και η D-loop με το πρώτο να κατέχει την πρώτη θέση. Η επιλογή αυτών των γονιδίων στηρίζεται αφενός στην μεγάλη εξελικτική συντήρηση τους και αφετέρου στις επιμέρους διαφορές που παρουσιάζουν μεταξύ των ειδών.

Αναφορές

- Avise, J.C., Bowen, B.W., Lamb, T., Meylan, A.B & Bermingham, E. (1992). Mitochondrial DNA evolution at turtle's pace: evidence for low genetic variability and reduced microevolutionary rate in the testudines. *Molecular Biology and Evolution* 9:457-473
- Avise, J.C., (1994). *Molecular Markers, Natural History and Evolution*. Chapman and Hall, New York, pp. 511
- Desjardins P., Morais R., (1999). Sequence and gene organization of the chicken mitochondrial genome. *J.Mol.Biol* 212:599-634.
- Griffiths, A.J.F., Miller, J.H., Suzuki, D.T., R.C.& Gelbart, W.M. (2002). *An Introduction to Genetic Analysis*, 7th Edition, W.H. Freeman and Company, New York, pp. 626-627.
- Jorde, L. B., Bamshad, M., & Rogers, A.R.(1998). Using Mitochondrial and nuclear DNA markers to reconstruct human evolution. *BioEssays*,20,126-136.
- Meyer A. (1993). Evolution of mitochondrial DNA in fishes. In *Biochemistry and Molecular Biology of Fishes*, Vol. 2 (Eds P.W. Mochachka, & T.P. Mommsen), pp. 1-38. Elsevier, Amsterdam.
- Moritz, C., (1994). Defining 'evolutionary significant units' for conservation. *Trends in Ecology and Evolution* 9, 363–373.
- Roehrdanz R. L., Degrugillie M. E.R, (1998) Long sections of mitochondrial DNA amplified from fourteen orders of insects using *conserved polymerase chain reaction primers* *Ann. Entomol. Soc. Am* 91:771-778
- Scheffler I. (2001). Mitochondria make come back. *Advanced Drug Delivery Review* 49:3-26.
- Wilson, A.C., Can, R.L., Carr, S.M., George, M., Gyllensten, U.B., Helm-Bychowski, K.M., Higuchi, R.G., Palumbi, S.R., Prager, E.M., Sage, R.D., Stoneking, M., (1985). Mitochondrial DNA and two perspectives on evolutionary genetics. *Biological Journal Linnaeus Society*. 26, 375-400.
- Wolstenholme, D.R. (1992). Animal mitochondrial DNA: structure and evolution *International Review of Cytology* 141:173-216.