

Universitat de Barcelona

Facultat de Biologia
Departament de Genètica

Evolución molecular
de los genes del sistema olfatorio *OS-E* y *OS-F*
en diferentes especies de *Drosophila*

Alejandro Sánchez-Gracia

Barcelona, Noviembre de 2005

1. Introducción

1.1 El sistema olfativo

Todos los seres vivos detectan y reaccionan a señales químicas de su ambiente exterior; de hecho, la quimiorrepción es posiblemente uno de los sentidos más antiguos e imprescindibles de los seres vivos. En los organismos con sistema nervioso central, se pueden distinguir dos tipos de sistemas, el gustativo y el olfativo, que difieren en la disposición de las células quimiorreceptoras y en la organización de sus diferentes axones. Una de las principales características del sistema olfativo de los animales terrestres es su capacidad de detectar y discriminar, de forma extremadamente sensible y con una enorme especificidad, un gran número de señales olfativas, los denominados odorantes. La percepción se lleva a cabo en un entorno acuoso; en los vertebrados este entorno está directamente expuesto al exterior (mucus olfativo), mientras que en los insectos aparece cubierto por una cutícula porosa (fluido sensiliar) (STERN and MARX 1999).

1.1.1 El sistema olfativo de los insectos

En los insectos las señales olorosas se detectan a través de los sensilios, estructuras similares a pelos, con una o dos paredes cuticulares y con una forma variable según la especie, provistos de un sistema de poros que permiten el acceso de las moléculas olfativas al espacio sensiliar o lumen (figura 1.1). En la parte basal interna del sensilio se encuentran los somas de las células neuronales, que extienden sus dendritas en el fluido sensiliar, así como las células de soporte encargadas de sintetizar y excretar otros componentes al lumen. Cada uno de los sensilios contiene -por lo menos- tres clases de proteínas con capacidad de unir e interactuar con las moléculas olfativas: las proteínas de unión a odorantes (OBPs), los receptores olfativos (ORs), y las enzimas de degradación de odorantes (ODEs).

Las moléculas transmitidas a través del aire entran por los poros y, unidas a las OBPs, atraviesan el espacio acuoso que separa las células neuronales del exterior, y contactan con los receptores olfativos (STEINBRECHT 1969, 1996). Los receptores, que se localizan en la membrana de las dendritas de las neuronas sensitivas (BUCK and AXEL 1991; VOSSHALL *et al.* 1999), tienen

una estructura de siete dominios transmembrana y transmiten el impulso olfativo por una vía de transducción de señal acoplada a proteína G (ANHOLT 1993) (figura 1.2).

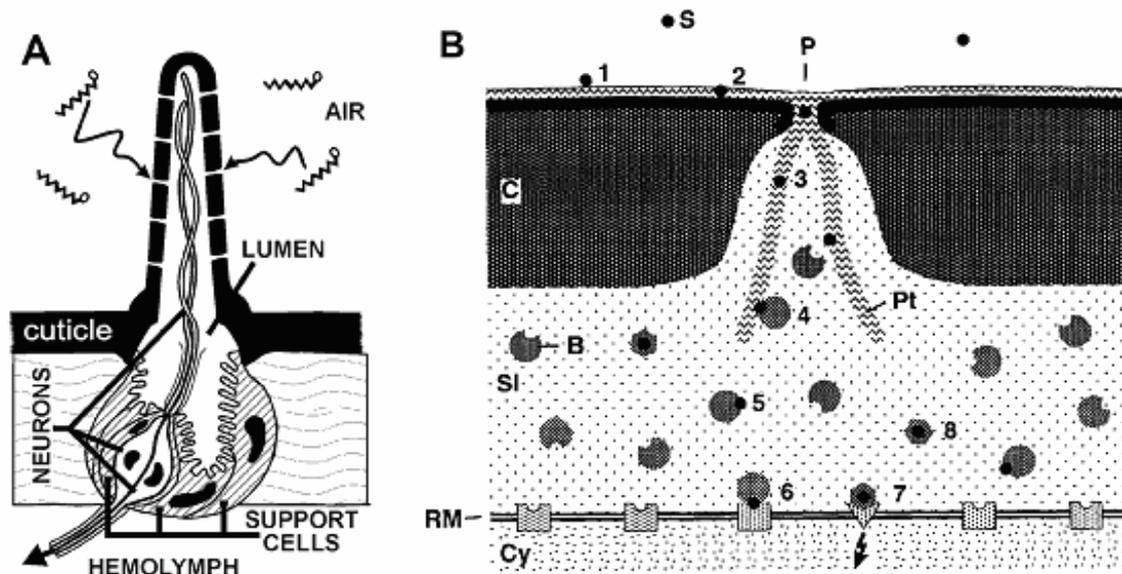


Figura 1.1. (A) Esquema general de la estructura del sensorio olfativo en los insectos (VOGT 2005). (B) Detalle del espacio sensorial. Los números indican la secuencia temporal. S, estímulo. P, poro. C, pared cuticular. B, OBP. Pt, túmulos del poro. Sl, linfa sensorial. RM, membrana de la célula neuronal con receptores olfativos. Cy, citoplasma de la célula neuronal. (STENBREICHT 1997).

Las subunidades alfa y beta-gamma de estas proteínas G son capaces de amplificar la actividad de la fosfolipasa C (PLC), enzima que genera productos como el inositol 1, 4, 5 (IP3) y diacilglicéridos trifosfato a partir del sustrato fosfatidilinositol bifosfato (PIP2). Estos productos actúan como segundos mensajeros, incrementando la concentración de calcio en el interior del citoplasma celular y permitiendo la transmisión de la señal a otros componentes celulares.

Las ODEs son proteínas que participan en la terminación de la señal olfativa (desactivación del estímulo), degradando las moléculas estimulantes mediante un proceso enzimático (e.g. PRESTWISH 1987; ISHIDA and LEAL 2005). Aunque el mecanismo de degradación aún no está bien establecido, se ha constatado que estas proteínas son necesarias para la correcta transmisión de la señal. Se han descrito diferentes tipos de ODEs, localizadas en diferentes lugares del organismo: unidas a la membrana celular, en el interior de la célula o en la superficie cuticular. Las OBPs son proteínas globulares de bajo peso

molecular, muy abundantes en el lumen, capaces de unir y solubilizar odorantes hidrofóbicos, incluyendo las feromonas.

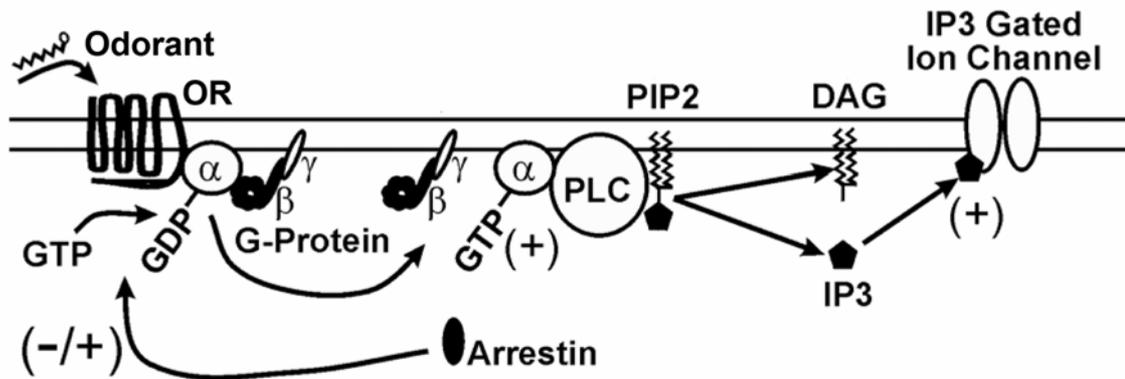


Figura 1.2. Transmisión de la señal después de la activación de los receptores olfativos.

Estas proteínas se sintetizan en las células accesorias que rodean a las neuronas sensitivas y son posteriormente secretadas al espacio acuoso (figura 1.3). Las OBPs constituyen una familia multigénica formada por dos grandes grupos: las proteínas de unión a odorantes generales (GOBPs) y las proteínas de unión a feromonas (PBPs). Es interesante destacar que los miembros de esta familia no son homólogos de los correspondientes en vertebrados, los cuales presentan un tamaño y estructura muy diferentes (VOGT and RIDDIFORD 1981; PELOSI and MAIDA 1995).

A pesar de la baja similitud de secuencia entre las diferentes OBPs de insectos, la mayor parte presenta un conjunto de residuos hidrofóbicos altamente conservados con una distribución equivalente. Tanto las predicciones de estructura secundaria a partir de la secuencia primaria de amino ácidos, como la conformación tridimensional (resuelta por métodos cristalográficos en algunos miembros de la familia), muestran una importante similitud estructural de todas las OBPs (SANDLER *et al.* 2000; KRUSE *et al.* 2003; LARTIGUE *et al.* 2003, 2004; SÁNCHEZ-GRACIA *et al.* 2003). Una característica común de estas proteínas es la presencia de seis cisteínas altamente conservadas y localizadas en una posición equivalente de la proteína (PIKIELNY *et al.* 1994). Estas cisteínas están implicadas en la formación de puentes

disulfuro tanto en PBPs como en GOBPs (SCALONI *et al.* 1999), que son críticos para la conformación globular final (figura 1.4).

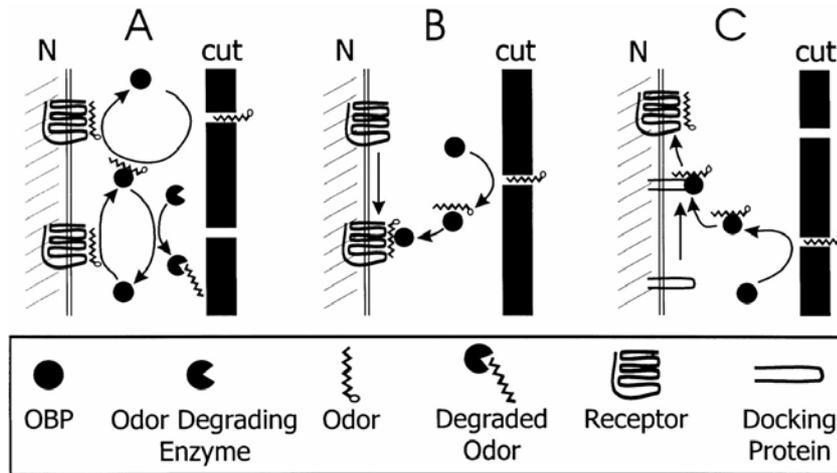


Figura 1.3. Modelos propuestos sobre la función de las OBPs. (A) transportador pasivo. (B) transportador y formación de un complejo OR-OBP. (C) Interacción con otras proteínas de membrana. N, neurona. cut, cutícula. Modificado de VOGT *et al.* (1999).

A pesar de que la función global de las OBPs en el sistema olfativo no está del todo establecida, se cree que podrían tener un papel importante en la codificación de la señal olfativa. Se ha demostrado que las distintas OBPs poseen diferentes especificidades de unión a odorante y que están presentes en diferentes subregiones de los sensilos antenales (PELOSI and MAIDA 1995).

Además, los genes que codifican para los receptores olfativos -los cuales también presentan diferentes especificidades de unión a odorantes- se expresan en áreas muy específicas del órgano olfativo (VOSSHALL *et al.* 2000). Estas y otras observaciones sugieren que las OBPs podrían participar en la detección de olores restringiendo el espectro de odorantes accesible a los receptores olfativos, y por lo tanto representarían el primer mecanismo de discriminación olfativa; incluso podrían actuar también en la desactivación del estímulo oloroso (figura 1.3), participando conjuntamente con las ODEs en alguno de los mecanismos de degradación (PELOSI and MAIDA 1995).

1.1.2 La familia de las OBPs en *Drosophila*

En *Drosophila melanogaster* se han identificado 51 posibles miembros de la familia de las OBPs, un número muy parecido al de los miembros de los

receptores olfativos (~61) (CLYNE *et al.* 1999; GAO and CHESS 1999; VOSSHALL *et al.* 1999, VOSSHALL 2000, 2001).

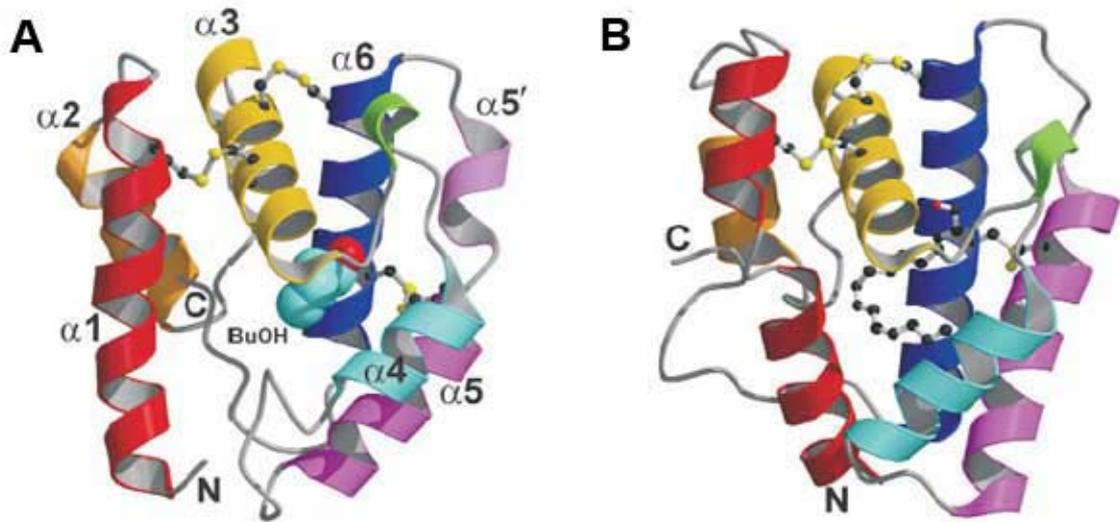


Figura 1.4. Estructura tridimensional de las OBPs. (A) Proteína LUSH de *D. melanogaster*. (B) Proteína de unión a feromona de *Bombyx mori* (BmPBP). Modificado de KRUSE *et al.* (2003).

La gran mayoría (un 73%) de los genes que codifican las OBPs se encuentran localizados en *clusters* de entre cuatro y nueve genes (figura 1.5), alguno de los cuales incluye también genes de ORs. Al igual que en el resto de los insectos, las OBPs de *Drosophila* no presentan una elevada similitud de secuencia, destacando únicamente una relativa conservación en su extremo C-terminal (HEKMAT-SCAFE *et al.* 2002). A pesar de ello, los análisis filogenéticos apuntan a un origen monofilético, con un ancestro común muy antiguo. De hecho, en el mosquito *Anopheles gambiae* se ha identificado un número muy parecido de miembros de esta familia (57 genes potenciales). Estos genes incluyen tanto posibles ortólogos, como miembros de la familia no identificados en *Drosophila* (XU *et al.* 2003). Esta observación sugiere que el ancestro común a todas las OBPs se remonta a más de 250 millones de años.

1.1.3 Los genes OS-E y OS-F

Dos de las proteínas de la familia de las OBPs de *D. melanogaster*, OS-E (Olfactory-Specific E) y OS-F (Olfactory-Specific F) (MCKENNA *et al.* 1994) se

coexpresan, de forma restringida, en la mitad ventro-lateral de la antena de los adultos (MCKENNA *et al.* 1994; HEKMAT-SCAFFE *et al.* 1997) (figura 1.6).

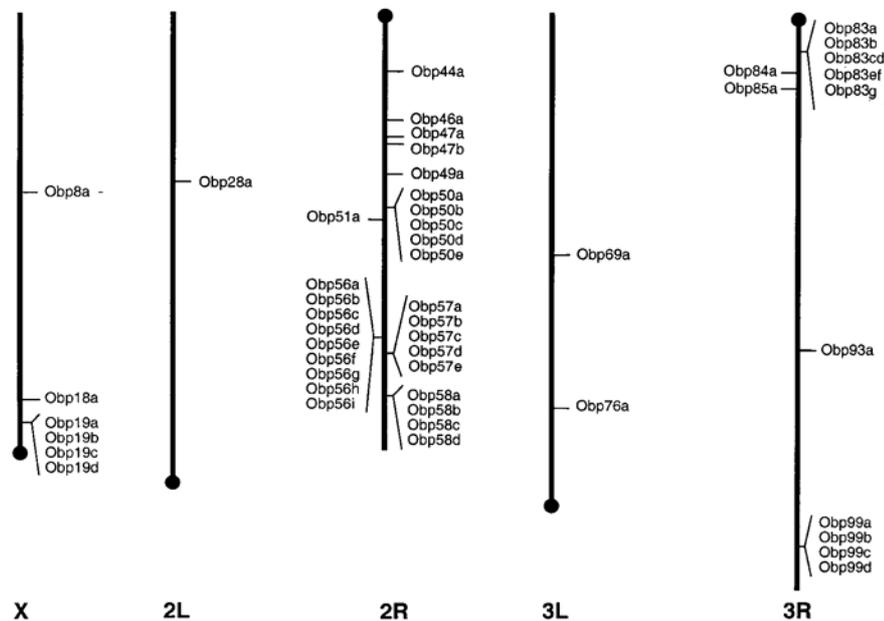


Figura 1.5. Distribución de los genes de las OBPs en los diferentes cromosomas de *D. melanogaster*. Modificado de HEKMAT-SCAFFE *et al.* (2002).

Esta región de la antena es rica en sensilios tricoideos, y presenta menos sensibilidad a determinados odorantes que otras regiones de la antena (AYER y CARLSON 1992). Se ha determinado, además, que los sensilios tricoideos son un 30% más abundantes en los machos de *Drosophila*, lo que sugiere que podrían ser estimulados por feromonas (STOCKER and GENDRE 1989).

Las proteínas OS-E y OS-F presentan una similitud elevada (72% de identidad de aminoácidos en la proteína madura, PELOSI and MAIDA 1995), con excepción de una región situada justo antes del dominio C-terminal (denominada como región heterogénea, *hr*, en HEKMAT-SCAFFE *et al.* 2000, *het1* en este trabajo). Se han planteado diferentes hipótesis para explicar el bajo nivel de conservación de la región *hr*, i) podría formar parte de un sitio de unión para la molécula odorante; ii) podría estar implicada en la formación de un complejo con el receptor olfativo, o bien iii) simplemente podría ser una región con una menor restricción funcional. Los genes que codifican estas proteínas están localizados en la banda citológica 83CD (brazo cromosómico 3R),

dispuestos en *tandem* y separados por una región intergénica de unos 900 nucleótidos (figura 1.7).

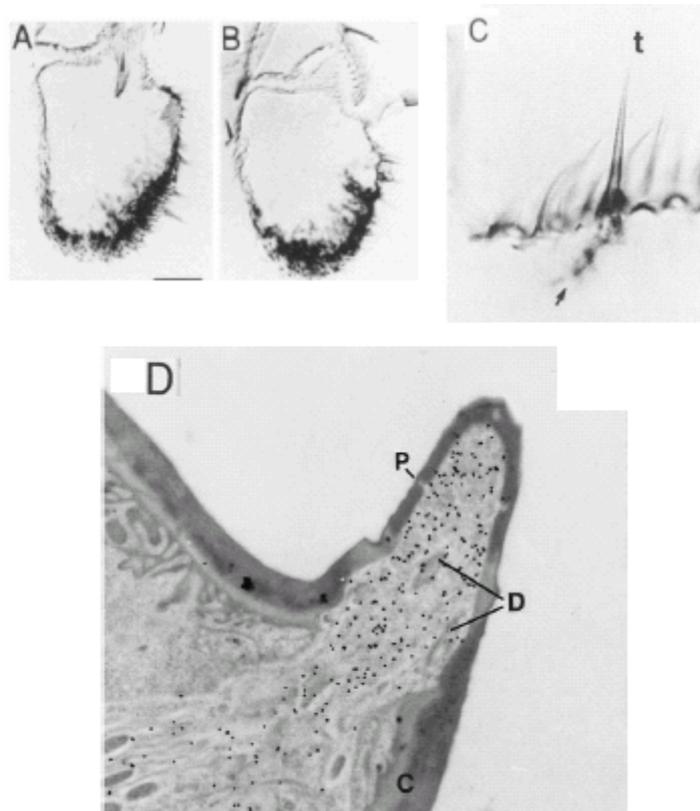


Figura 1.6. Hibridación *in situ* de los ARN mensajeros de los genes *OS-E* y *OS-F* en la antena de *Drosophila*. (A) ARN mensajero de *OS-F* hibridado con su ARN antisentido. (B) ARN mensajero de *OS-E* hibridado con su ARN antisentido (C) ARN mensajero de *OS-E* en un sensilio tricoideo. t, sensilio tricoideo. (D) Localización inmunocitoquímica de las proteínas *OS-E* y *OS-F* en sensilios olfatorios de *Drosophila*. P, poro. D, dendritas. C, cutícula. (MCKENNA *et al.* 1994; HEKMAT-SCAFE *et al.* 1997).

Los genes *OS-E* y *OS-F*, denominados *Obp83a* y *Obp83b* en HEKMAT-SCAFE *et al.* (2002), presentan una organización intrónica-exónica muy similar y el mismo sentido de transcripción. La marcada proximidad física y el alto grado de similitud de secuencia de las dos regiones codificadoras, sugiere que los genes se originaron por un evento de duplicación de DNA (MCKENNA *et al.* 1994; ver también HEKMAT-SCAFE *et al.* 2000). Candidatos de ortólogos de los genes *OS-E* y *OS-F* han sido identificados en los mosquitos *Anopheles gambiae* (VOGT 2002) y *Culex quinquefasciatus* (ISHIDA *et al.* 2002), por lo que el evento de duplicación génica que originó estos genes podría ser anterior a la separación de moscas y mosquitos en los dípteros. La elevada conservación

de los genes *OS-E* y *OS-F* en especies muy alejadas sugiere que su función debe tener una importancia singular en el sistema olfativo de los dípteros.

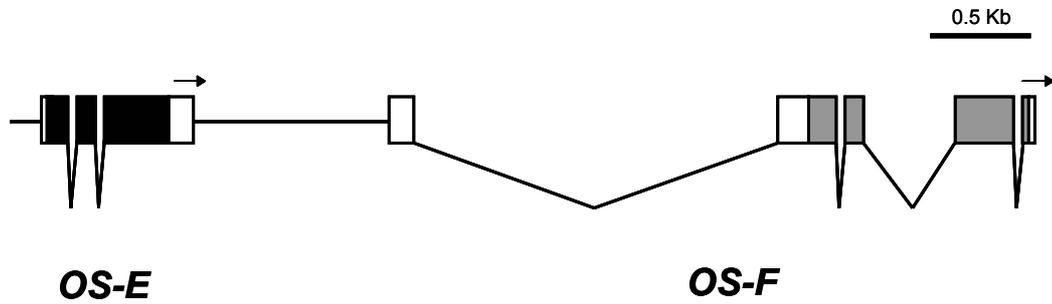


Figura 1.7. Estructura de los genes *OS-E* y *OS-F* en *D. melanogaster*. Los intrones se indican con líneas en forma de V. Las cajas sombreadas y las blancas indican las porciones traducidas y no traducidas de los exones, respectivamente (en negro *OS-E* y en gris *OS-F*).

1.2 Evolución por duplicación génica

Los genomas de la mayor parte de los organismos contienen numerosos genes en múltiples copias, y que están relacionados tanto en su estructura como en su función. Estas copias se han originado mediante mecanismos de duplicación de DNA. La primera observación de una duplicación génica data de los años 30, detectada como un mutante en *D. melanogaster* (BRIDGES 1936). No obstante, los mecanismos y procesos implicados en el origen de las duplicaciones de DNA no fueron descritos hasta finales de los años 70, cuando se desarrollaron las herramientas moleculares y bioquímicas apropiadas. A partir de los años 80, es cuando se empezó a estudiar extensivamente tanto el papel de la duplicación génica en la evolución, como los mecanismos responsables de su generación (ver ZHANG 2003).

La obtención (a finales de los 90) de las primeras secuencias nucleotídicas de genomas completos puso de manifiesto la ubicuota presencia de múltiples copias génicas en los genomas. Así, se ha constatado que una extensa proporción de genes, en los tres grandes dominios de la vida, han sido generados por procesos de duplicación génica. Además, probablemente, este número está considerablemente subestimado debido a la incapacidad de detectar aquellas copias que, originándose por duplicación génica, han divergido lo suficiente como para no poder ser reconocidas como tales.

El proceso de generación de un nuevo gen por duplicación génica comprende dos pasos: el proceso mutacional inicial que genera una nueva copia, en principio idéntica, seguido del subsiguiente proceso evolutivo por el cual esta nueva estructura se fija en todos los individuos de la especie. Se ha estimado que en eucariotas la tasa de generación de copias por duplicación génica es de aproximadamente una duplicación por cada 100 millones de años (LYNCH and CONERY 2003a, 2003b), tasa que es comparable a la de sustitución nucleotídica (~0.1-0.5 sustituciones por sitio y por 100 millones de años en genomas nucleares de vertebrados, LI 1997). Se han propuesto tres mecanismos principales para explicar el proceso de generación de una duplicación génica:

(1) Entrecruzamiento desigual. Este mecanismo genera normalmente duplicaciones en *tandem*, es decir, situándose muy cerca unas de las otras (figura 1.8). Uno de los ejemplos mejor conocido es el de la familia de las globinas de mamíferos (SHEN *et al.* 1981; DAVIS *et al.* 1987). Dependiendo del fragmento afectado por el entrecruzamiento, los genes pueden duplicarse de forma completa o parcial, e incluir o no zonas adyacentes. Este mecanismo, además, ha jugado un papel importante en la generación de nuevos genes por combinación de exones provenientes de otros genes (*exon shuffling*).

(2) Retroposición. Se produce cuando un ARN mensajero se retrotranscribe a DNA (cDNA) y se inserta posteriormente en el genoma (figura 1.8). Este mecanismo genera copias que carecen de intrones, y que pueden presentar secuencias de poliadenilación y/o flanqueantes.

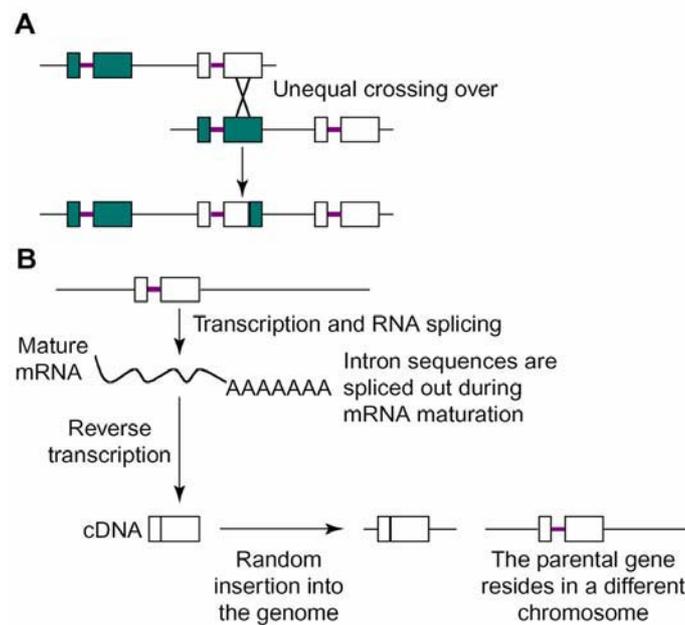


Figura 1.8. Dos de los mecanismos más importantes de formación de duplicaciones génicas. (A) Entrecruzamiento desigual. (B) Retroposición. (ZHANG 2003).

Ejemplos de este mecanismo son los pseudogenes procesados, como los SINEs y LINEs, o algunos genes quiméricos formados por la unión de regiones originadas por retroposición con fragmentos de otros genes (MCCARREY and THOMAS 1987; LONG and LANGLEY 1993).

(3) Duplicaciones de cromosomas, o genomas, completos. Estas duplicaciones se generan normalmente por anomalías en la separación de

cromosomas durante la meiosis. Si bien este mecanismo de duplicación ha sido muy frecuente en plantas, no ha ocurrido así en mamíferos (LI 1997).

A las copias de los genes que derivan del proceso de duplicación se les denomina genes parálogos, y forman frecuentemente familias multigénicas. En *Drosophila*, la familia de genes más numerosa es la de las tripsinas con 111 miembros (Gu *et al.* 2002), mientras que en mamíferos corresponde a la de los receptores olfativos, con aproximadamente unos 1000 miembros.

Es importante destacar que no todas las copias duplicadas mantendrán su función de forma estable en la población; muchas de ellas podrán dar lugar a pseudogenes, secuencias derivadas de los genes iniciales que han perdido su función por acumulación de mutaciones. La tasa de retención dependerá de varios aspectos, como la función de los genes o la dinámica poblacional. Los mecanismos evolutivos que preservan las copias de genes duplicados durante largos periodos de tiempo, así como su importancia relativa, son poco conocidos. La visión clásica (OHNO 1970) afirma que los genes duplicados mantendrían inicialmente funciones redundantes e idénticas. Como la tasa de mutación deletérea es mucho más elevada que la beneficiosa, el destino más común será la silenciación de una de las dos copias (la formación de un pseudogen). La preservación de las dos copias se produciría por el proceso de neofuncionalización, donde la fijación diferencial de mutaciones beneficiosas podría generar una nueva función en una de las copias, mientras que la otra mantendría la función original (HALDANE 1933; NEI and ROYCHOUDHURY 1973; BAILEY *et al.* 1978; TAKAHATA and MARUYAMA 1979; LI 1980; WATERSON 1983). A pesar de que el modelo clásico ha sido objeto de un desarrollo teórico exhaustivo, no ha podido acomodarse fácilmente a las observaciones empíricas, por lo que se han propuesto otros modelos que permitirían explicar el mantenimiento de las copias duplicadas durante largos periodos de tiempo (figura 1.9). Así, el modelo de subfuncionalización (FORCE *et al.* 1999) propone que algunas mutaciones podrían provocar pérdidas parciales de función, sin eliminar por completo la funcionalidad del gen. En este caso, las dos copias se complementarían recíprocamente, ya que entre ambas compensarían la funcionalidad. Un tipo de subfuncionalización se daría cuando cada una de las copias realizara una parte concreta de la función inicial, por lo que se generarían dos subfunciones diferentes, o bien cuando cada uno de los

miembros duplicados se expresara en distintas subregiones del área de expresión del gen ancestral (ALLENDORF *et al.* 1975; FERRIS and WHITT 1979). Estudios recientes han mostrado que este mecanismo habría tenido un papel importante en el mantenimiento de las copias duplicadas en genes implicados en el desarrollo (FORCE *et al.* 1999).

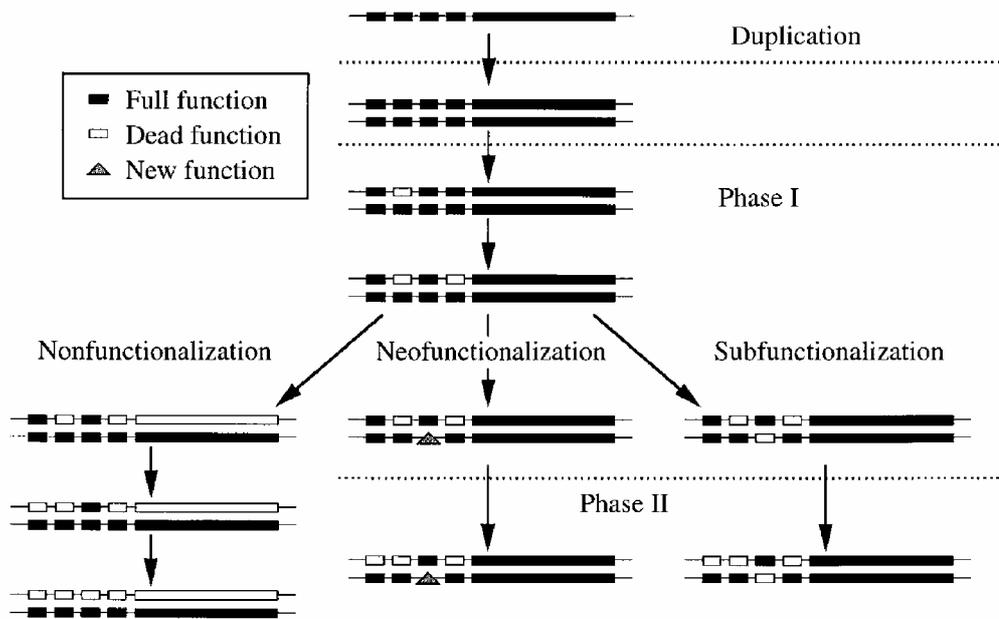


Figura 1.9. Posibles destinos para una duplicación génica. Las cajas pequeñas indican diferentes módulos de las zonas reguladoras, mientras que las grandes indican las zonas codificadoras del gen. (FORCE *et al.* 1999).

1.3 Drosophila como organismo modelo

Las especies del género *Drosophila* presentan una serie de características, como la facilidad de captura y mantenimiento, el corto tiempo de generación y el elevado número de descendientes por individuo, que las convierten en uno de los mejores y más utilizados organismos modelo para la investigación biológica y especialmente la genética. La presencia de *Drosophila* en la literatura científica es bastante antigua: existen referencias desde el siglo XVII, si bien los primeros estudios experimentales donde se utilizó este organismo datan de 1901 (para una revisión ver POWELL 1997). Desde entonces, se ha utilizado como organismo modelo para múltiples estudios, en genética del desarrollo, biología molecular, biología de poblaciones, sistemática, ecología, comportamiento, etc.

1.3.1 El género *Drosophila*

Existen más de 3000 especies de la familia Drosophilidae, de las que unas 2000 pertenecen al género *Drosophila*. Aunque la sistemática del género está bien establecida, se describen nuevas especies cada año. Se han utilizado diferentes tipos de datos, tanto morfológicos como moleculares, para establecer la posición del género *Drosophila* en la familia Drosophilidae. La hipótesis filogenética más aceptada sitúa al género *Zaprionus* como el más cercano al de *Drosophila*, seguido del de *Chymomyza* (DESALLE and GRIMALDI 1992).

El género *Drosophila* se divide en tres subgéneros: *Sophophora*, *Drosophila* y *Idiomya*. El presente estudio se centra en el estudio de especies pertenecientes al subgénero *Sophophora*. Las relaciones entre los grandes grupos de este subgénero están bien determinadas, e incluye cuatro grandes grupos: *melanogaster*, *obscura*, *willistoni* y *saltans* (figura 1.10).

1.3.2 El grupo *melanogaster*

El grupo *melanogaster* tiene probablemente un origen africano y comprende más de 200 especies, divididas en 10 subgrupos. El subgrupo

melanogaster ha sido el más intensamente estudiado, seguido del de ananassae (entre ellas la especie que da nombre al subgrupo, *D. ananassae*).

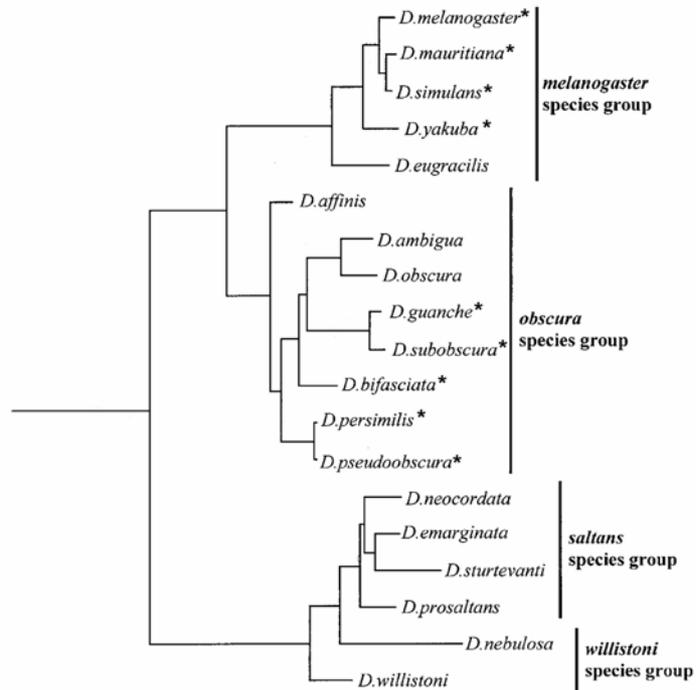


Figura 1.10. Relaciones filogenéticas de algunas especies del subgénero *Sophophora*. Los asteriscos indican especies estudiadas en este trabajo. Modificado de O'GRADY and KIDWELL (2002).

Las relaciones filogenéticas del subgrupo *melanogaster* han sido estudiadas ampliamente utilizando una gran variedad de tipos de datos: biogeográficos (LACHAISE *et al.* 1988), patrones de bandas de cromosomas politénicos (LEMEUNIER and ASHBURNER 1976, 1984), hibridaciones DNA-DNA (CACCONI *et al.* 1988), secuencias de DNA (JEFFS *et al.* 1994; CACCONI *et al.* 1996). Durante mucho tiempo, los resultados convergían en una misma topología, hasta la aparición de nuevos datos moleculares que han modificado ligeramente la posición de alguna de las especies del subgrupo (KO *et al.* 2003) (figura 1.11).

1.3.3 El grupo *obscura*

El origen del grupo *obscura* también se sitúa en África, donde se encuentran algunos representantes del grupo (POWELL 1997). El grupo contiene 35 especies conocidas, aunque probablemente existan más en el continente

otros dos, el subgrupo obscura del viejo mundo y el subgrupo pseudoobscura del nuevo mundo (figura 1.12).

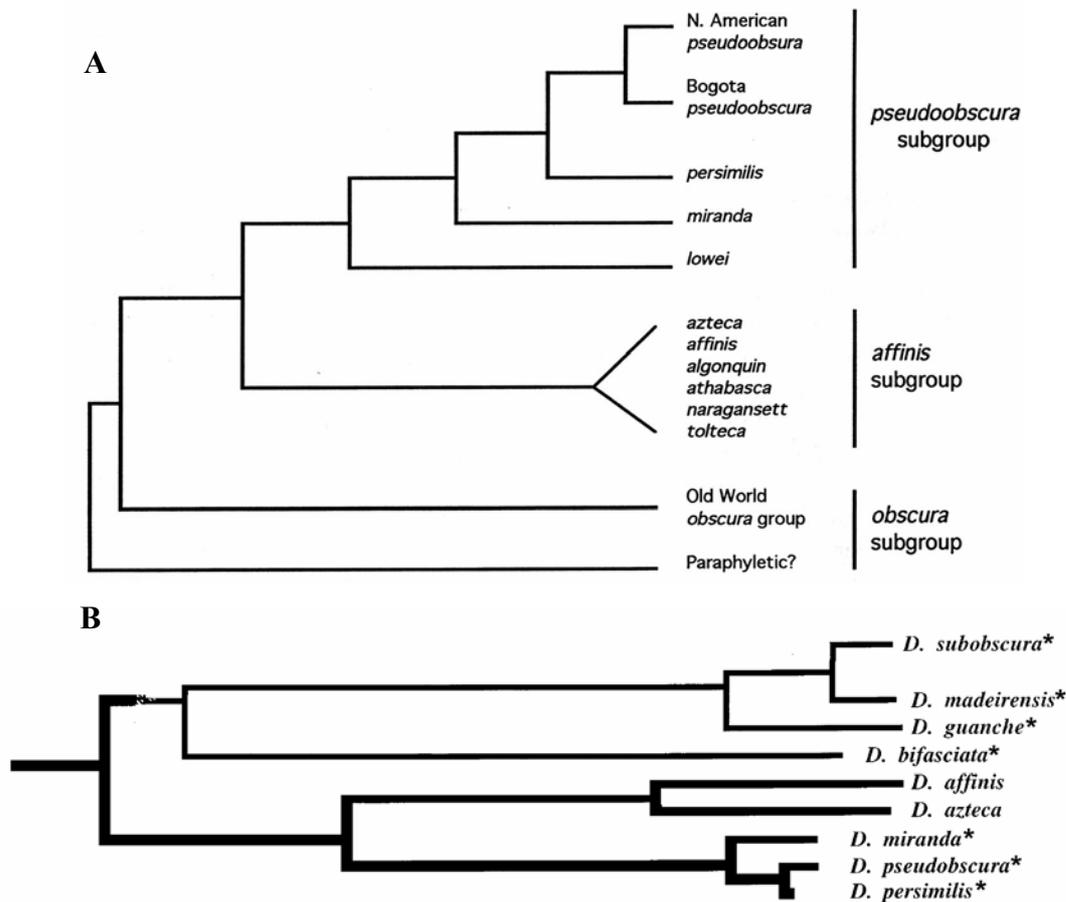


Figura 1.12. (A) Relaciones filogenéticas del grupo obscura. Modificado de POWELL (1997). (B) Árbol filogenético de la región *rp49* en diferentes especies del subgrupo obscura. Modificado de RAMOS-ONSINS *et al.* (1998). Los asteriscos indican las especies del grupo obscura estudiadas en este trabajo.

El subgrupo *affinis* es claramente monofilético, aunque las relaciones dentro del mismo no están del todo resueltas. El subgrupo *obscura* sería el más externo, con un origen probablemente africano. La relación entre las especies de este grupo es la más discutida, donde la posición filogenética algunas de ellas (por ejemplo *D. bifasciata*) varía en función del estudio. En la figura 1.12 se presentan las relaciones filogenéticas obtenidas a partir de datos de secuencias de DNA del gen *rp49* (RAMOS-ONSINS *et al.* 1998).

1.4 Inversiones cromosómicas

Una inversión es un tipo de mutación en el que la secuencia de nucleótidos del DNA queda invertida en relación a la orientación de referencia. En ocasiones estas inversiones son visibles a nivel cromosómico y son denominadas inversiones cromosómicas. Inicialmente, las inversiones cromosómicas fueron detectadas en *Drosophila* por la presencia de ciertas regiones con una recombinación reducida en los heterocigotos (heterocariotipos). Posteriormente, mediante mapaje genético, se pudo verificar que estas regiones eran realmente zonas donde, en algunos individuos, el orden de los genes estaba invertido (STURTEVANT 1917, 1926). El descubrimiento de los cromosomas politénicos (PAINTER 1933) constató la realidad física de las inversiones cromosómicas. Los posteriores estudios de Dobzhansky sobre el polimorfismo cromosómico por inversiones en las especies *D. pseudoobscura* y *D. persimilis* fueron el punto de partida de la genética de poblaciones experimental y del desarrollo de la síntesis neo-darwinista.

La sinapsis de los cromosomas homólogos en la meiosis fuerza que en los heterocigotos para inversiones cromosómicas se formen unos lazos (*loops*) observables citológicamente (en los cromosomas politénicos). Entrecruzamientos sencillos en la región invertida de un heterocigoto generan gametos (como productos de la recombinación) con cromosomas desequilibrados que no serán funcionales (figura 1.13). Los dobles entrecruzamientos dentro de la región invertida, en cambio, pueden no generar estos gametos desequilibrados, y por lo tanto, facilitar el intercambio genético. Así, cuanto mayor sea la longitud de la inversión más grande será la probabilidad de intercambio. No obstante, en heterocariotipos que difieran para dos o más inversiones solapadas, el intercambio genético podría estar totalmente suprimido.

Está ampliamente aceptado que la tasa de generación de inversiones cromosómicas en poblaciones naturales es muy baja, y aún será menor la de que dos inversiones abarquen exactamente el mismo fragmento de DNA y que eventualmente se establezcan en las poblaciones. En este sentido, los análisis

moleculares apuntan a que las inversiones cromosómicas tienen un origen único (son monofiléticas) (ROZAS and AGUADÉ 1990, 1994; WESLEY and EANES 1994; ANDOLFATTO *et al.* 1999), existiendo, además, claras evidencias sobre la implicación de los elementos transponibles en su generación (LIM and SIMMONS 1994; CÁCERES *et al.* 2001).

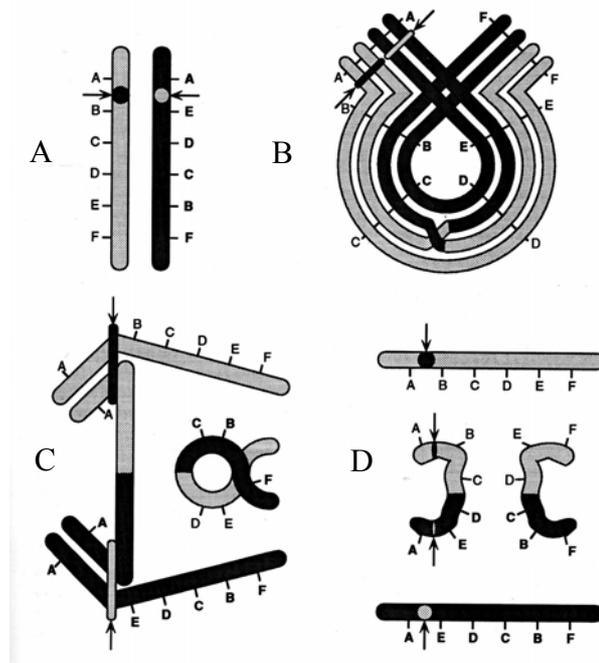


Figura 1.13. Productos del entrecruzamiento sencillo en heterocigotos para una inversión. El resultado final es la producción de gametos no funcionales. Los centrómeros están indicados por flechas. (POWELL 1997).

Las inversiones cromosómicas no tendrán un impacto importante en las poblaciones naturales a no ser que presenten, o hayan presentado, frecuencias considerables. En este caso, debido a su efecto en los niveles y patrones de variabilidad genética, podrían jugar un papel importante en la dinámica evolutiva de las poblaciones y de las especies. Actualmente existe un gran compendio de evidencias sobre el significado adaptativo del polimorfismo cromosómico por inversiones (PREVOSTI *et al.* 1988; KRIMBAS and POWELL 1992). Una de las más claras la proporciona el análisis de la distribución de las clinas latitudinales para inversiones cromosómicas, y para la longitud del ala, observadas tanto en poblaciones de europeas (ancestrales) como de reciente colonización (continente americano) de *D. subobscura* (PREVOSTI *et al.* 1988; HUEY *et al.* 2000). Los mecanismos moleculares implicados en el

mantenimiento de las inversiones en la naturaleza son, no obstante, bastante desconocidos. La hipótesis clásica (hipótesis de la coadaptación) propone que la inversión cromosómica se mantendría en la población ya que el segmento invertido incluiría una combinación favorable de alelos (mantenida por la reducida tasa de recombinación) (DOBZHANSKY 1970; CHARLESWORTH 1974). Otra hipótesis (efecto de posición), propone que el mantenimiento se debería a cambios en la función, o la expresión, de determinados genes situados cerca, o en los puntos de rotura (SPERLICH 1966). Aunque existen numerosas evidencias que apuntan a la primera hipótesis como la más plausible (PRAKASH and LEWONTIN 1968, 1971; PRAKASH 1976; SCHAEFFER *et al.* 2003), poco se conoce del efecto de los puntos de rotura sobre los genes vecinos. Recientemente, no obstante, se ha observado que los elementos transponibles situados en puntos de rotura pueden afectar la expresión de genes adyacentes mediante el silenciamiento por RNA antisentido (PUIG *et al.* 2004).

D. subobscura es una de las especies donde el polimorfismo cromosómico ha sido mejor estudiado. Esta especie tiene un rico polimorfismo cromosómico por inversiones (se han descrito más de 80 ordenaciones cromosómicas), siendo el cromosoma O el más grande y en el que se han descrito un mayor número de inversiones y ordenaciones cromosómicas. En esta especie, además, el polimorfismo cromosómico forma claras clinas latitudinales (KRIMBAS and POWELL 1992).

1.4.1 Diversidad nucleotídica en inversiones polimórficas

La tasa de recombinación es un parámetro crucial para entender los patrones de variación genética. Se ha observado que los niveles de variabilidad nucleotídica están correlacionados con los niveles de recombinación (AQUADRO *et al.* 1994; NACHMAN 1997; DVORAK *et al.* 1998; STEPHAN and LANGLEY 1998; PRZEWORSKI *et al.* 2000), debido al efecto de determinadas formas de selección sobre la variabilidad neutra ligada (MAYNARD-SMITH and HAIGH 1974, CHARLESWORTH *et al.* 1993; HILL and ROBERTSON 1966). Las inversiones cromosómicas son, de hecho, importantes agentes modificadores de la tasa de recombinación (ROBERTS 1976) debido a que el entrecruzamiento está fuertemente suprimido en las regiones incluidas en el fragmento afectado por la

inversión. La recombinación no tendría porque estar homogéneamente suprimida a lo largo de todo el fragmento invertido ya que, por ejemplo, esta supresión podría ser mayor en las zonas cercanas a los puntos de rotura (NAVARRO *et al.* 1997). Por lo tanto, la reducción de la variabilidad genética no debería ser homogénea a lo largo de la inversión, si no mayor a medida que nos acercamos a los puntos de rotura, y mínima en el centro de la inversión. De la misma manera, esta reducción debería variar en función de la longitud del fragmento invertido, siendo más importante en inversiones pequeñas. Otra de las consecuencias de la disminución del flujo genético entre ordenaciones cromosómicas es el aislamiento genético entre clases cromosómicas.

Los estudios empíricos que relacionan los niveles de polimorfismo por inversiones y variabilidad nucleotídica se han realizado esencialmente en tres especies de *Drosophila*: *D. melanogaster*, *D. pseudoobscura* y *D. subobscura* (AGUADÉ 1988; ROZAS and AGUADÉ 1990, 1993, 1994; WESLEY and EANES 1994; HASSON and EANES 1996; ANDOLFATTO *et al.* 1999; BENASSI *et al.* 1999; NAVARRO-SABATÉ *et al.* 1999; ROZAS *et al.* 1999; DEPAULIS *et al.* 1999, 2000; LAAYOUNI *et al.* 2003; MOUSSET *et al.* 2003; SCHAEFFER *et al.* 2003). Estos estudios indican claramente que las inversiones tienen un origen monofilético y muestran que, en general, los niveles de variabilidad nucleotídica en la clase cromosómica derivada son menores que en la ancestral. Se ha observado, asimismo, que el contenido genético de las diferentes ordenaciones está fuertemente diferenciado, a pesar de la existencia de intercambio genético por conversión génica o dobles entrecruzamientos. En algunos casos también se ha observado un mayor aislamiento genético cerca de los puntos de rotura. Recientemente MUNTÉ *et al.* (2005) han mostrado analizando dos ordenaciones cromosómicas que los niveles de diversidad nucleotídica, de diferenciación genética, y la distribución del espectro de frecuencias de las mutaciones presentan una distribución homogénea a lo largo de la inversión. Si esta fuerte y homogénea estructuración de la variabilidad genética se diera también en otras inversiones cromosómicas, el genoma de la especie debería estar fuertemente estructurado, presentando fragmentos cromosómicos que tendrían destinos evolutivos independientes. El estudio de MUNTÉ *et al.* (2005), no obstante, es un caso particular en el que intervienen dos inversiones solapadas. En el caso de que sea un fenómeno general, tendría importantes

consecuencias evolutivas en especies como *D. subobscura* o *D. pseudoobscura* que presentan un rico polimorfismo cromosómico por inversiones.