

ESTUDI COMPARATIU DE L'ESTRUCTURA DEL GEN
Adh* A VÀRIES ESPÈCIES DE *Drosophila

Gemma Marfany i Nadal

Departament de Genètica. Facultat de Biologia.
Universitat de Barcelona.

DISCUSSIÓ

DISCUSSIÓ

El desenvolupament de les noves tecnologies de genètica molecular ha revolucionat i renovat disciplines d'estudi tant reconegudes com la bioquímica i la genètica de poblacions. La caracterització estructural de gens està proporcionant informacions molt valuoses: d'una banda, permet ampliar els coneixements sobre l'organització del genoma eucariota i les diferents estratègies funcionals emprades pels organismes, i de l'altra, comparar seqüències per aprofundir en l'evolució molecular dels genomes i inferir les tendències de les forces evolutives que hi actuen. Les conclusions més importants que fins ara s'han extret d'aquest tipus d'anàlisi fan referència a la gran flexibilitat i plasticitat del genoma, i a la gran varietat de seqüències que el conformen, tant a nivell purament estructural i organitzatiu, com funcional. A més, permet complementar d'altres tipus de dades més convencionals a l'hora d'establir relacions filogenètiques, ja sia de seqüències o d'organismes, donant llum sobre aspectes tan polèmics com analogies i homologies, convergències o divergències evolutives.

L'anàlisi de la regió genòmica del gen *Adh* en diferents espècies, ha permès assolir els nostres objectius, ja que la informació estructural obtinguda il·lustra un dels exemples més clars de la variabilitat i plasticitat del genoma, permet la comparació de les tendències evolutives en diferents espècies i en diferents gens dins d'una mateixa espècie, i a més, proporciona més dades per suggerir possibles relacions filogenètiques entre espècies de posició controvertida.

Finalment, s'ha localitzat citogenèticament la posició del gen *Adh* i seqüències homòlogues, s'ha caracteritzat per restricció i seqüenciació la regió genòmica del gen *Adh*, on s'han ubicat dos gens - l'*Adh* i l'*Adh-dup*- molt probablement, relacionats en el seu origen. S'ha fet una anàlisi preliminar de la seva expressió i s'han comparat les seqüències per inferir-ne l'evolució gènica intra- e inter-específicament. S'han aïllat i caracteritzat les primeres retroseqüències de gens estructurals a *Drosophila subobscura* i també s'ha demostrat la seva existència a *D.guanche* i *D.madeirensis*. S'ha descrit una repetició invertida relacionada amb les retroseqüències, que forma part d'una família de DNA moderadament repetit en el genoma d'aquestes tres espècies, i amb totes aquestes dades conjuntament, es suggereixen possibles relacions filogenètiques entre les espècies analitzades.

1.- EL GEN *Adh* EN EL GENOMA DEL SUBGRUP *obscura*.

La primera aproximació a l'anàlisi de la regió genòmica que comprèn el gen *Adh* en les espècies analitzades va ser l'anàlisi de restricció dels clons positius aïllats de les genoteques corresponents. El gen *Adh* presenta molt poques dianes internes per als enzims emprats en aquesta anàlisi (com a màxim dues, una *PvuII* i una *BamHI* a *D.melanogaster*) i per tant es fa difícil observar la seva conservació; de fet només hem detectat aquesta mateixa diana *PvuII* a *D.ambigua*. En canvi, dues dianes *HindIII*, separades per tant sols 20 pb, en regió no codificant, es troben conservades a les quatre espècies analitzades probablement degut a la seva posició molt propera al promotor proximal. Per altra part, l'*Adh-dup* presenta fins 5 dianes internes, i dues d'elles, les més conservades es cavalquen amb els senyals de maduració dels dos introns. Els mapes de restricció s'agrupen clarament en dos patrons diferenciats, per un cantó, *D.ambigua*, i per l'altre la tríade *D.subobscura*, *D.madeirensis* i *D.guanche*. Així mateix, tot i que aquestes tres espècies presenten moltes dianes en comú, cal resaltar que *D.subobscura* i *D.madeirensis* comparteixen fins 14 dianes de restricció de 16, en una regió genòmica de més de 15 kb. Per tant, la conservació de dianes de restricció, tot i que constitueix una aproximació relativament grollera a la conservació de seqüències, dóna idea de les relacions de proximitat entre espècies, i a més, presenta l'avantatge d'ampliar la regió del genoma analitzada, que és més extensa que l'accessible per seqüenciació. A més, en les espècies *D.subobscura*, *D.madeirensis* i *D.guanche* s'han aïllat d'altres clons, apart dels que contenen el gen funcional, que contenen seqüències homòlogues a l'*Adh* (veure apartat 4 de la discussió).

Després d'haver obtingut clons positius i d'haver realitzat la seva caracterització preliminar per restricció i seqüenciació parcial, es va plantejar l'interés d'utilitzar aquestes sondes homòlogues per a la localització citològica de l'*Adh* sobre cromosomes politènics, mitjançant la tècnica d'hibridació *in situ*, complementant estudis previs emprant una sonda heteròloga que contenia el gen *Adh* de *D.melanogaster* (González-Duarte et al., 1986). A *D.ambigua*, la hibridació es trobava clarament localitzada en el cromosoma E, que és el cromosoma homòleg al 2L de *D.melanogaster*, on ja s'havia localitzat l'*Adh* d'aquesta última espècie. Per altra part, els resultats de la hibridació sobre les altres tres espècies van ésser, en part, sorprenents, ja que s'obtenien múltiples bandes. Per experiments de lligament genètic es coneixia la localització aproximada del gen *Adh* a *D.subobscura*: prop del centròmer del cromosoma U, que també és l'homòleg al 2L de *D.melanogaster*. A més, d'aquesta hibridació,

se'n detectava una altra al cromosoma E. A *D.madeirensis* i *D.guanche* també s'han observat aquestes dues hibridacions, a més de dues hibridacions addicionals al cromosoma O a *D.guanche*. Donada la gran proximitat filogenètica d'aquestes tres espècies, és bastant probable que la hibridació prop del centròmer del cromosoma U a *D.madeirensis* i *D.guanche* correspongui a la del gen funcional. Queden per explicar la presència de la resta de bandes d'hibridació en d'altres cromosomes, ara bé, disposem de més dades (obtingudes a partir de *Southern*s genòmics, restricció de clons i seqüenciació) que evidencien l'existència d'altres seqüències homòlogues a l'*Adh* a més a més de les funcionals a *D.subobscura*, *D.madeirensis* i *D.guanche* (veure apartat 4 de la discussió).

Els resultats obtinguts a partir d'un *Southern* de DNA genòmic digerit amb *EcoRI* de *D.ambigua*, *D.subobscura*, *D.madeirensis* i *D.guanche* proporciona una informació complementària a l'esmentada. Mentre que a *D.ambigua* i a *D.subobscura* s'observa una única banda d'hibridació, a *D.madeirensis* i a *D.guanche* el nombre de bandes incrementa a dos i a tres, respectivament. Aquestes bandes són de mida molecular elevada, de 8 kb en endavant, i per explicar els casos de multiplicitat, s'ha de suposar l'existència de dianes internes, de polimorfismes de restricció, o bé de seqüències homòlogues addicionals al gen *Adh* funcional. Donat que el mapa de restricció d'aquest gen a les espècies esmentades demostra que no hi ha cap diana *EcoRI* que parteixi el gen, la primera explicació queda descartada. En canvi, totes les dades apunten cap a l'existència de seqüències addicionals, homòlogues a l'*Adh*, que seran discutides més endavant.

2.- ESTRUCTURA I EXPRESSIÓ DEL GEN *Adh* A ESPÈCIES DEL SUBGRUP *obscura*.

2.1.- El gen *Adh*

L'estructura i organització del gen *Adh* de les espècies analitzades: *D.ambigua*, *D.subobscura*, *D.madeirensis* i *D.guanche* és totalment comparable a la del grup *melanogaster*, és a dir, es troba un únic gen funcional, compost per tres exons. La mida d'aquests és de 93, 405 i 267 pb, igual que en el gen descrit al grup *melanogaster*. L'única excepció és una diferència de sis pb del primer exó, de manera que gen *Adh* de les espècies del grup *obscura* codifica per dos aminoàcids menys, probablement el segon i el tercer. La situació dels introns coincideix amb la descrita a totes les espècies de *Drosophila* en què el gen *Adh* ha estat analitzat, i les seves mides són també molt similars, ja que varien entre 66 i 70 pb. La presència de dues regions promotores d'estructura i posició relativa molt similars

als dos promotors descrits del grup *melanogaster*, és a dir, un de posició proximal i un altre distal, suggereix que també en aquestes espècies l'expressió del gen *Adh* està regulada de forma diferencial al llarg del desenvolupament. La distància entre els dos promotors varia segons les espècies, de forma que l'intró de l'adult oscil·laria entre 745 pb a 953 pb.

A *D.subobscura* s'han trobat polimorfismes de restricció en clons que contenen el gen funcional. Aquest polimorfisme s'ha detectat cap a 3' del conjunt format per l'*Adh* i l'*Adh-dup*, i no afecta només a dianes de restricció, sinó que suposa una inserció o deleció d'una regió (veure punt 4.1 de la discussió).

L'estudi de l'expressió per transferències *Northern* ha permès detectar un transcrit abundant, d'una mida entre 1100 i 1200 nt als estadis de larva i adult. En el cas de *D.ambigua*, es detecta expressió a l'estadi de pupa encara que no arriba als nivells dels estadis larvari i adult.

2.2.- El gen *Adh-dup*

Immediatament adjacent al gen *Adh* en les espècies analitzades es troba una pauta de lectura oberta molt conservada, l'*Adh-dup*. Aquest gen presenta una organització en tres exons de mida conservada, a excepció del tercer exó, que presenta variació de mida degut a una diferent posició del codó de terminació. Les mides dels exons són de 96 pb, 405 pb i des de 339 pb (*D.subobscura*, *D.madeirensis* i *D.guanche*) a 345 pb (*D.ambigua*), aquesta mida també és diferent respecte a la descrita per a *D.pseudoobscura* 336 pb, o a la que presenta *D.mauritiana*, 318 pb. Els dos introns tenen mides diferents, mentre que el primer varia de 124 pb a 292 pb, el segon, més petit, té de 62 pb a 67 pb. Les putatives seqüències reguladores es troben molt conservades, i es poden distingir una caixa CAAT i una caixa TATA.

L'anàlisi de l'expressió d'aquest gen no sempre ha donat resultats positius. No s'ha detectat cap hibridació en transferència *Northern*, mentre que l'amplificació del transcrit per PCR, ha permès visualitzar dues bandes d'intensitat similar, una corresponent al transcrit processat i l'altre al no processat. D'aquests resultats sembla deduir-se que aquest gen s'expressa molt poc, probablement en cèl·lules o teixits específics, i que el transcrit processat co-existiria amb el no processat, o bé que una mínima presència de DNA contaminant és suficient com per donar un resultat similar a la que proporciona el transcrit present en la mostra. La funció del producte d'aquest gen és encara desconeguda.

D'altra banda, la comparació de les seqüències i organització dels dos gens, el gen *Adh* i l'*Adh-dup* confirma que ambdós gens han divergit a partir d'un gen ancestral, ja que comparteixen aproximadament el 50% de posicions nucleotídiques i un 35% de residus aminoacídics.

3.- EVOLUCIÓ DE LA REGIÓ GENÒMICA DEL GEN *Adh* A ESPÈCIES DEL SUBGRUP *obscura*.

Disposar de les seqüències d'una mateixa regió genòmica permet fer comparacions inter-específiques i conèixer les tendències evolutives d'aquesta regió. Generalment la comparació de seqüències es fa sobre regions codificants, o si les espècies estan allunyades filogenèticament, sobre la seqüència d'aminoàcids. D'altra banda, la comparació de seqüències no codificants és sovint molt difícil a menys que les espècies no siguin molt properes, ja que el constrenyiment funcional no és tant evident, ni s'ha de conservar cap pauta de lectura, de forma que l'evolució d'aquestes regions és més relaxada i els fenòmens d'inserció/deleció són freqüents.

Per altra part, el fet que en aquesta regió genòmica es trobin dos gens en un espai d'aproximadament 4 kb, derivats d'un precursor comú constitueix un model ideal per a determinar si les forces evolutives actuen similarment i il·lustrar la dinàmica evolutiva dins d'un mateix genoma.

3.1.- Evolució de les regions codificants dels gens *Adh* i *Adh-dup*

La comparació de seqüències codificants està condicionada per la funcionalitat de la molècula i això implica la conservació de la pauta de lectura oberta i el manteniment de l'estructura de la proteïna codificada, al menys en els llocs actius. D'una banda, aquest constrenyiment funcional es tradueix, a nivell de DNA, en un menor nombre de canvis en les regions codificants respecte les no codificants. Per l'altra, els canvis en les regions codificants es poden subdividir en dos grups: els canvis en posicions silencioses, que no afecten l'aminoàcid codificat, i els canvis en posicions de reemplaçament, és a dir, que es reflecteixen en un canvi de residu en la proteïna. El nombre de posicions silencioses és diferent per a cada gen i depèn de la proporció d'aminoàcids codificats, en general es troba al voltant del 25% al 30% de les posicions totals. Tot i això, degut al constrenyiment funcional, les substitucions silencioses són molt més freqüents que les de reemplaçament, i fins i tot poden ser proporcionalment més abundoses que les de regions no codificants

La comparació de les seqüències dels dos gens, *Adh* i *Adh-dup*, en les espècies analitzades entre elles i amb dues espècies de referència: *D.pseudoobscura* (subgrup *obscura*) i *D.mauritiana* (subgrup *melanogaster*) mostra que ha tingut lloc un major nombre de substitucions en la tercera posició dels codons, i un biaix significatiu cap a transicions respecte transversions. Això està d'acord amb l'elevat nombre de substitucions silencioses, ja que donada la degeneració del codi genètic, les substitucions en terceres posicions dels codons, especialment les transicions, solen ser silencioses.

La major part de substitucions de reemplaçament són de caràcter conservatiu, com ara Leu→Val o Ile, o de Gln→Asn. En d'altres casos, en què el canvi a nivell d'estructura primària no ha estat conservatiu, sí que es conserva l'estructura secundària. Els perfils d'hidrofobicitat/hidrofilicitat de les proteïnes varia mínimament, éssent l'única excepció l'extrem carboxi-terminal del putatiu producte genètic de l'*Adh-dup*, ja que per a la posició diferent del codó de terminació, aquesta regió pot variar molt en estructura i càrrega.

S'ha suggerit que el gen *Adh* és un gen d'evolució lenta en el gènere *Drosophila* (Sharp i Li, 1989; Caccone i Powell, 1990) i que les substitucions de reemplaçament inter-específiques són adaptatives (McDonald i Kreitman, 1991). Quan es comparen les taxes de divergència inter-específica dels dos gens, el nombre més elevat de substitucions totals en el gen *Adh-dup* respecte l'*Adh*, semblaria recolzar aquesta hipòtesi d'evolució lenta. No obstant, quan es comparen les espècies del subgrup *obscura* amb *D.mauritiana* (subgrup *melanogaster*) l'increment de substitucions és degut a canvis silenciosos i, a nivell de proteïna es troba més conservat el gen *Adh-dup* que el gen *Adh*.

S'han proposat moltes hipòtesis sobre la divisió de les regions codificants en exons i la seva relació amb els diferents dominis proteics. En particular, en el gen *Adh*, es creu que els dos primers exons codifiquen per la regió d'unió al cofactor NAD⁺ i el centre catalític. Per altra part, és obvi que en l'evolució i divergència de les espècies es produeixen canvis en les seqüències de DNA que a causa de la diferent contribució a la funcionalitat no es distribueixen de forma homogènia. Així, és interessant estudiar la distribució d'aquestes substitucions, ja que pot revelar quines són les seqüències més conservades inter-específicament, i per tant, amb més constrenyiment funcional. La distribució de substitucions al llarg dels tres exons presenta diferències molt significatives. En general, les

substitucions silencioses del gen *Adh* es distribueixen a l'atzar entre els tres exons, independentment de les espècies comparades, en canvi, les substitucions de reemplaçament estan fortament esbiaixades, acumulades en el tercer exó, quan es compara qualsevol espècie del subgrup *obscura* amb una espècie del subgrup *melanogaster*, exemplificat per *D.mauritiana*. No obstant, quan es comparen les espècies del subgrup *obscura* entre elles, totes les substitucions es troben distribuïdes a l'atzar entre els tres exons. Aquest fet, juntament amb l'increment significatiu de substitucions de reemplaçament en el tercer exó només s'ha descrit quan s'analitzen les espècies d'aquest subgrup (Sullivan et al., 1990), fet que suggereix que es tracta d'un tret propi de l'evolució del subgrup *obscura*. A més, aquests canvis del tercer exó també es reflecteixen a nivell proteic, ja que un anticòs monoclonal específic per a un epítot de la regió carboxi-terminal de l'ADH de *D.melanogaster* no es capaç de reconèixer l'enzim de qualsevol espècie del subgrup *obscura* mentre que sí reconeix l'enzim d'espècies d'altres subgrups (Fibla i González-Duarte, en prep.).

Aquests resultats contrasten amb la comparació inter-específica del gen *Adh-dup*. Quan es compara la seqüència d'aquest gen entre qualsevol espècie del subgrup *obscura* amb *D.mauritiana*, totes les substitucions es distribueixen a l'atzar en els tres exons, contràriament al que passa quan aquesta anàlisi és dins del subgrup *obscura*. En aquest cas, tots els tipus de substitucions estan significativament esbiaixats, acumulant-se preferentment en el tercer exó del gen *Adh-dup*. D'aquesta anàlisi, es poden deduir dues conclusions, una d'àmbit general, i l'altra més específica. La primera és que sobre un mateix gen o regió gènica poden actuar diferents taxes de divergència i per tant, la selecció o el constrenyiment funcional d'una seqüència varia al llarg del temps evolutiu, de forma que pot divergir molt ràpidament o bé enlentir-se durant certs períodes de temps. La segona revela que dins de la regió genòmica que hem analitzat, el tercer exó del gen *Adh* és la seqüència que es va veure més afectada pels processos que es van produir en la separació dels subgrups *obscura* i *melanogaster*, mentre que en la pròpia radiació del subgrup *obscura*, el tercer exó del gen *Adh-dup* és el que ha divergit més ràpidament.

S'han proposat diferents hipòtesis per explicar les diferències observades en la freqüència i distribució de substitucions al llarg d'alguns gens i per il·lustrar que determinades seqüències puguin evolucionar sota taxes de substitució variables (Perler et al., 1980; Gillespie, 1984; Palumbi, 1989). Certes regions genòmiques poden acumular més substitucions que d'altres durant períodes de

temps específics, però la taxa de substitucions de reemplaçament presenta una restricció, la preservació de la funció. Si aquest límit es sobrepassa, poden aparèixer noves funcions. Aquestes zones que divergeixen més ràpidament poden constituir uns bons marcadors moleculars per estudiar les relacions filogenètiques durant períodes definits de temps (Perler et al., 1980). Es pot considerar que les substitucions de reemplaçament del gen *Adh* constitueixen un bon marcador per a la radiació *obscura-melanogaster*, mentre que les de reemplaçament de l'*Adh-dup* poden constituir un marcador informatiu dins de la radiació del subgrup *obscura*.

Com a resum es pot concloure que els dos gens, *Adh* i *Adh-dup* estan evolucionant independentment, seguint un patró que és específic d'espècie i subgrup.

D.ambigua

Malgrat que es poden extreure conclusions generals, com les exposades, sobre l'evolució d'aquesta regió genòmica, l'anàlisi concreta de cada espècie proporciona una informació de caire més puntual però valuós a l'hora d'inferir les diferents tendències evolutives. Una anàlisi particularment informativa ha estat la comparació de les seqüències dels gens *Adh* i *Adh-dup* de *D.subobscura* amb els de *D.ambigua* i *D.pseudoobscura*. Les regions codificants de *D.subobscura* són més similars a les de *D.pseudoobscura* que a les de *D.ambigua*, mentre que la comparació de les seqüències no codificants apropa més *D.subobscura* i *D.ambigua*, que cap d'aquestes dues a *D.pseudoobscura*. Aquests resultats són una mica desconcertants, donat que si com és habitual, s'estableixen les relacions filogenètiques a partir de regions codificants *D.subobscura* i *D.pseudoobscura* queden més properes entre sí que a *D.ambigua*, quan aquesta última espècie s'ha considerat tradicionalment la més propera a *D.pseudoobscura*. L'explicació a aquest fet podria ésser que *D.ambigua* fós una de les espècies que ha evolucionat més depressa dins del subgrup *obscura*, i per tant la proximitat amb d'altres espècies hauria quedat distorsionada.

D.subobscura

D'altres resultats obtinguts en *D.subobscura* respecte l'evolució d'aquests dos gens indiquen que la majoria de substitucions han incrementat el percentatge de A+T en la composició de bases. Aquesta tendència, que alguns autors han considerat poc afavorida per la selecció natural (Ticher i Graur, 1989), queda particularment de manifest quan s'analitzen els canvis que afecten a terceres

TAULA VI.- A) Substitucions en la tercera posició dels codons de les seqüències dels gens *Adh-dup* i *Adh* per a *D.subobscura* versus *D.ambigua* i *D.pseudoobscura*. B) Composició de bases en la tercera posició dels codons dels gens *Adh-dup* i the *Adh* en nou *Drosophílids*. (α -extret de Starmer i Sullivan,1989).

A) Substitutions in the third-codon-position						
	A	T	C	G	Total	%G+C
<i>Adh-dup</i>						
<i>D.subobscura</i> vs. <i>D.ambigua</i>	26	17	20	9	72	40.3
<i>D.subobscura</i> vs. <i>D.pseudoobscura</i>	23	11	7	3	44	22.7
<i>Adh</i>						
<i>D.subobscura</i> vs. <i>D.ambigua</i>	16	32	4	14	66	27.3
<i>D.subobscura</i> vs. <i>D.pseudoobscura</i>	16	14	8	8	46	34.8
B) Third-codon-position base						
	A	T	C	G	Total	%G+C
<i>Adh-dup</i>						
<i>D.subobscura</i>	47	62	90	79	279	60.6
<i>D.ambigua</i>	30	62	93	96	281	67.3
<i>D.pseudoobscura</i>	26	63	98	91	278	68.0
<i>D.mauritiana</i>	50	65	73	84	272	57.7
<i>Adh</i>						
<i>D.subobscura</i>	22	61	97	74	254	67.3
<i>D.ambigua</i>	5	47	115	87	254	79.5
<i>D.pseudoobscura</i> α	8	52	116	78	254	76.4
<i>D.mauritiana</i> α	11	37	132	76	256	81.2
<i>D.melanogaster</i> α	10	37	130	79	256	81.6
<i>D.affinidisjuncta</i> α	32	71	85	66	254	59.5
<i>D.mulleri Adh-1</i> α	24	47	109	74	254	72.1
<i>D.mojavensis Adh-1</i> α	26	53	103	72	254	68.9
<i>D.hydei Adh-1</i> α	30	61	99	64	254	64.2

posicions de codons i es compara el valor global obtingut per al gen *Adh* a *D.subobscura* amb el que presenten d'altres espècies de *Drosophila* (Taula VI). Com es pot observar el gen *Adh* tendeix a presentar un alt percentatge de G+C en terceres posicions i és particularment evident en les espècies del subgènere *Sophophora*, on s'inclouen el subgrup *melanogaster* i el subgrup *obscura*. No obstant, *D.subobscura* presenta un percentatge de G+C més baix que l'apropa a l'observat a espècies del subgrup *repleta*, molt allunyades filogenèticament. Així

doncs, l'ús de codons per l'*Adh* a *D.subobscura* és menys esbiaixat que en d'altres espècies del mateix subgrup (Marfany i González-Duarte, 1991c). Aquest fenòmen també s'observa quan l'anàlisi es fa amb el gen *Adh-dup*, tot i que la diferència amb d'altres espècies no és tant elevada.

Es interessant també la relació que s'ha establert entre els l'ús esbiaixat de codons en un gen i el nivell d'expressió gènica, ja que s'ha observat que els gens d'un organisme amb una expressió més elevada, presenten un ús de codons més esbiaixat que els gens d'expressió més restringida (Ticher i Graur, 1989; Bulmer, 1990; Li i Graur, 1991). Aquest fenòmen s'ha intentat explicar per l'increment de certs tipus de gens de tRNA en front d'altres, de forma que hi hauria tRNAs més freqüents que d'altres, i per co-evolució, la selecció natural afavoriria la fixació d'aquelles substitucions que incrementessin la presència dels corresponents codons als gens d'expressió més elevada. En aquest cas, tant el gen *Adh* (d'expressió elevada) com l'*Adh-dup* (d'expressió quasi indetectable) de *D.subobscura* presenten la tendència a un menor biaix en l'ús de codons. Per extreure'n conclusions més generals i determinar si es tracta d'una tendència general del genoma de *D.subobscura*, d'evolució gènica convergent, deriva genètica, o de diferències en l'accessibilitat a diferents tRNAs, s'hauria de disposar de les seqüències de més gens.

D.madeirensis i *D.guanche*

Aquestes dues espècies es poden analitzar de forma conjunta, comparant-les amb *D.subobscura*, donada la gran relació de proximitat filogenètica d'aquesta tríade. Els resultats de la comparació de seqüències confirmen aquesta proximitat, ja que el nombre de substitucions entre les espècies és molt baix, sobretot entre les espècies *D.madeirensis* i *D.subobscura*. L'interès d'aquesta anàlisi rau en la possibilitat de comparar el patró evolutiu seguit pels dos gens quan les espècies comparades no han tingut gaire temps per a divergir.

Els resultats han estat força interessants: quan es compara les seqüències dels gens *Adh* i *Adh-dup* de *D.guanche* amb *D.madeirensis* i *D.subobscura*, els canvis observats presenten la distribució esperada per a l'evolució de gens funcionals. En canvi, quan es comparen les seqüències de *D.madeirensis* i *D.subobscura*, el patró obtingut és diferent, ja que el nombre de substitucions silencioses i de reemplaçament són iguals, la seva distribució en les posicions dels codons és a l'atzar, com també ho és el nombre de transicions i transversions, contrastant clarament amb el que s'obté en d'altres comparacions inter-

específiques. Aquestes tres observacions estan clarament relacionades i són consistents entre elles, i podrien suggerir que durant els primers estadis d'especiació, la divergència ràpida entre espècies es veuria afavorida, permetent un increment de substitucions de reemplaçament respecte les silencioses. No obstant, aquesta explicació sembla contradir alguns dels principis evolutius establerts tot i que s'han proposat hipòtesis similars per explicar l'evolució del gen *Amy1* de *D.pseudoobscura* respecte el de *D.melanogaster* (Brown et al., 1990). En l'avaluació d'aquests resultats s'han de considerar els possibles efectes distorsionadors causats tant pel nombre limitat de canvis entre aquestes dues espècies properes, en total 4 pel gen *Adh* i 6 pel gen *Adh-dup*, com per l'existència de deriva genètica o d'un possible efecte fundador. No s'ha d'oblidar que *D.madeirensis* és una espècie confinada a les Illes Madeira. De totes maneres, el fet que a *D.guanche* no s'observi aquest tipus de resultats i que aquest fenomen aparegui simultàniament en els dos gens són dades a ponderar. La comparació estructural d'altres gens en aquestes dues espècies podria ésser molt valuosa a l'hora d'emetre conclusions sobre l'evolució dels seus genomes.

Per altra part, cal destacar l'existència de diferències en les taxes de divergència, que poden tenir una explicació en el constrenyiment funcional quan es refereixen a les substitucions de reemplaçament, però que són de difícil explicació en la distribució de les substitucions silencioses. En particular, les posicions silencioses del primer exó del gen *Adh* es destaquen com la regió que més ha divergit entre les analitzades, contrastant amb la completa conservació del mateix tipus de posicions del primer exó del gen *Adh-dup*, que a més, presenta una mida molt similar.

3.2.- Evolució de les regions no codificants

Com ja s'ha comentat, la comparació de seqüències de regions no codificants és difícil i imprecisa. Normalment només es pot aconseguir l'alineament de seqüències implicades en la regulació de la transcripció i en el cas del gen *Adh* es pot establir un bon alineament de promotors distals i proximals en espècies amb un únic gen estructural i duplicitat de promotors, encara que l'alineament no és sempre tant clar en les regions *leader*. En aquestes regions, es defineixen zones de seqüència més conservada i d'altres més relaxades, potser indicant diferents contribucions funcionals a l'estabilitat del RNAm, o al reconeixement del RNAr. El mateix succeeix amb les regions *trailer*. Per altra part, en les seqüències del gen *Adh-dup*, dues regions no codificants es conserven en la regió promotora, una caixa CCAAT i una caixa TATA, i també les regions

leader i *trailer* presenten zones de conservació de seqüència que permeten el seu alineament. La conservació de certes seqüències en la regió intergènica (d'aproximadament 200 pb a 300 pb) molt probablement està relacionada amb el fet que en aquesta regió es troben solapades nombroses seqüències que intervenen en la regulació de l'expressió tant del gen *Adh* com del gen *Adh-dup*.

Per a la delimitació de regions implicades en la regulació gènica i a falta d'experiments més directes, com ara *footprinting*, transformacions temporals o d'integració en el genoma de construccions amb diferents parts de regions promotores, un mètode alternatiu d'aproximació, pot ésser la comparació i conservació de seqüències en les regions no codificants. A més, en el cas del gen *Adh* es coneixen les seqüències implicades en la regulació gènica a espècies com *D.melanogaster* (unió a factors de transcripció, Heberlein i Tjian, 1988) i *D.mulleri* (*enhancers* de l'expressió del gen *Adh-1*, caixes A i B, Fisher i Maniatis, 1988). Es poden detectar regions amb elevada homologia amb seqüències que s'han revelat determinants en la regulació del gen *Adh* a d'altres espècies de *Drosophila* com ara dianes d'unió al factor de transcripció Adf-1 (Taula VII). Així mateix, es pot efectuar un alineament de les seqüències properes al promotor proximal del gen *Adh* entre diverses espècies i s'observa la conservació de determinats motius (Fig.47). Aquests resultats no són determinants però poden ser indicatius d'una possible funcionalitat, donada la poca conservació de seqüència en les regions no codificants a excepció de les regions promotores, i el fet que les construccions inter-específiques demostren una conservació dels elements implicats en la regulació d'aquest gen.

```

MUL1  GCCGACCGCGCGGCCAGTGGTATTGATAAGACA.....
MEL   AGCGCCGAGATCGCGTAACGGTA.GATAAT.....GAAAAGCTCTACGTAACCGA
PSE   CGAACACGTAATGCGAGA.....GATAAG.AAACA.....GAAAAGCT....CGACGTGA
SUB   ACGACACGTAATGCGAGA.....GATAAG.AAAGCA.....AAAGCTTCCTTCACGCGA
AMB   ACGACACGTAATGCAGAGA.....GATAAG.AAACCAAAAAAAAAATAAAAAAAGCTTCACGTGA

MUL1  TGTGCTGCGTGCGCAGCGTGGCCG.....TGTAGCTATAAATA
MEL   AGCTTCT.....GCTGT.....ACGGATCTTCCTATAAATA
PSE   ...AAGAAGCTTCTGGCGGAA.....GCTCTTGCCG.....AACTCCCTATAAATA
SUB   ...AATAAGCTTTTCGCGTGAAAGAGCTTTGCTTTGAAACGAAATAAATTCCCTATAAATA
AMB   TGGTGGCGCGTTCATGTGGAAAAGC.TTCCTTCAAATGAAATAAATTCCCTATAAATA

```

Fig.47.- Alineació de les seqüències properes al promotor proximal del gen *Adh*, possiblement implicades en la regulació de la seva expressió. En subratllat es destaquen els promotors proximals, part de l'*enhancer* descrit al gen *Adh-1* de *D.mulleri*, i motius conservats. MUL1- *D.mulleri*; MEL- *D.melanogaster*; PSE-*D.pseudoobscura*; SUB-*D.subobscura*; AMB-*D.ambigua* (adaptat a partir de Sullivan et al., 1990).

TAULA VII.- Detecció a la seqüència de la regió genòmica del gen *Adh* de *D.ambigua*, de diferents regions amb similitud a seqüències reguladores de l'expressió del gen *Adh* descrites a d'altres espècies.

Comparació entre la seqüència de *D.ambigua* i les dianes d'unió del factor de transcripció Adf-1 al promotor distal de *D.melanogaster* (Heberlein et al, 1985). La numeració de la seqüència està referida a la posició respecte al promotor distal

	Gaps: 3	Longitud: 31	Aparellaments: 24	% Aparellaments: 77.41
<i>D.ambigua</i>	-90	GCAGC .GCTGGCGTCGCGTCGGCGTCGACAG	-61	
<i>D.melanogaster</i>	-84	GCTGCTGCT .GCATC .CGTCGACGTCGACTG	-56	

Comparació entre la seqüència de *D.ambigua* i les dianes d'unió del factor de transcripció Adf-1 al promotor proximal de *D.melanogaster* (Heberlein et al, 1985). La numeració de la seqüència està referida a la posició respecte al promotor proximal

	Gaps: 5	Longitud: 32	Aparellaments: 23	% Aparellaments: 71.81
<i>D.ambigua</i>	-322	ATAGACATAATTTACT .ATA .TAATGC . .ATA	-292	
<i>D.melanogaster</i>	-257	ATATAC .TAA . .TACTAATACTAATACTAATA	-225	

Comparació entre la seqüència de *D.ambigua* i la caixa B, enhancer específic de l'expressió en cos gras del gen *Adh-1* a *D.mulleri* (Fischer i Maniatis, 1988). La numeració de la seqüència està referida a la posició respecte al promotor proximal

	Gaps: 1	Longitud: 41	Aparellaments: 27	% Aparellaments: 65.85
<i>D.ambigua</i>	-198	AGCGAAGAGCCGAAACCGAAGCGACGAAACGAACGAACAAA	-152	
<i>D.mulleri</i>	-256	AGCGAACAGACGAAGACAAAGTAA AACGAACAAA	-188	

Comparació entre la seqüència de *D.ambigua* i la caixa A, enhancer general de l'expressió del gen *Adh-1* a *D.mulleri* (Fischer i Maniatis, 1988). La numeració de la seqüència està referida a la posició respecte la seqüència disponible

	Gaps: 0	Longitud: 11	Aparellaments: 10	% Aparellaments: 90.91
<i>D.ambigua</i>	2657	GTGGCCAGTGG	2667	
<i>D.mulleri</i>	-118	GCGGCCAGTGG	-129	

D.subobscura, *D.madeirensis* i *D.guanche*

La gran proximitat d'aquestes espècies amb *D.subobscura* ha permès un estudi molt més acurat de les regions no codificants, ja que es pot obtenir un alineament correcte en aquestes regions, no només en les regions que intervenen en la regulació de l'expressió del gen sinó també en els introns o seqüències que no tenen cap relació, al menys, directa amb la funció gènica. A més, quan es comparen les seqüències d'aquestes espècies, les delecions i insercions es poden posicionar amb bastant de precisió i es poden comptabilitzar com un únic fenomen evolutiu. El nivell de divergència observat per al conjunt de regions no codificants és comparable a l'obtingut per a les substitucions silencioses en regions no codificants.

Quan la comparació s'analitza per zones, el resultat més notable són els diferents graus de divergència. Per exemple, els *leaders* dels dos gens i els dos introns del gen *Adh-dup* presenten valors dobles de divergència respecte l'intró de l'adult, el primer intró del gen *Adh* o la regió intergènica. Tot i que aquestes dues últimes regions contenen elements de regulació de l'expressió gènica del gen *Adh* i *Adh-dup*, i per tant, possiblement limitades en la seva divergència, quan es comparen les mateixes regions entre d'altres espècies, aquesta conservació de seqüències no és sempre tan evident. I a més, en el cas de les diferències en les taxes de divergència dels introns dels gens *Adh* i *Adh-dup*, aquesta explicació no és vàlida.

3.3.- Anàlisi evolutiva de la seqüència de la regió genòmica de l'*Adh*

Com ja s'ha esmentat, la regió genòmica del gen *Adh* ha sofert nombroses duplicacions i reorganitzacions (Oakeshott et al., 1982; Batterham et al., 1984; Fisher i Maniatis, 1985; Atkinson et al., 1988; Menotti-Raymond et al., 1991), un fenomen també descrit per a d'altres regions gèniques de *Drosophila*, com els gens de l' α -amilasa (Gemmill et al., 1985; Levy et al., 1985; Brown et al., 1990), i la sn-glicerol-3-fosfatdeshidrogenasa (Bewley et al., 1989; Takano et al., 1989). Una duplicació ancestral en la regió analitzada va originar dos gens, l'*Adh* i l'*Adh-dup*. Si assumim la taxa de divergència dins el subgrup *obscura* de 0.4% substitucions/pb/milió d'anys (Caccone i Powell, 1990), tindríem per a aquesta duplicació uns valors propers als 130 milions d'anys. Tot i que aquest tipus d'estimació no és gaire acurat, és suficientment informatiu com per suggerir que es tracta d'una duplicació antiga i que probablement totes o quasi totes les radiacions del gènere contenen aquests dos gens.

D.subobscura, *D.madeirensis* i *D.guanche*

La comparació de les seqüències d'aquestes tres espècies s'ha realitzat a més, emprant un criteri independent de la funcionalitat. En aquest cas es considera la posició de la seqüència i és necessari un correcte alineament tant en regions codificants com no codificants. Una seqüència es divideix en grups de nucleòtids, per exemple de 100 pb en 100 pb. El nombre de pb/grup pot ésser un altre, però quan més elevat sigui, menys acurada serà l'anàlisi, mentre que una subdivisió excessiva perd significació. El sentit d'aquesta anàlisi és donar prevalència al constrenyiment de les pròpies seqüències en lloc del constrenyiment funcional, i delimitar regions on la divergència de la seqüència és diferent a la del promig.

En primer lloc, cal assenyalar que els valors de divergència obtinguts per als mateixos grups de seqüències comparades entre les tres espècies, segueixen el mateix patró, de forma que amb aquesta anàlisi es poden identificar regions importants per a la conservació de la funció gènica i també proporciona una millor visió sobre la pròpia evolució de les seqüències. Per exemple, s'observa que hi ha regions dins de l'intró de l'adult que es conserven inter-específicament. Aquestes regions poden contenir elements de regulació de l'expressió, com a *D.mulleri* (Fisher i Maniatis, 1988) o bé pot ésser una regió més protegida i per tant, menys accessible a agents mutagenics. Un altre exemple el constitueix el segon exó del gen *Adh*, on s'hi distingeixen regions molt conservades, i d'altres que divergeixen més ràpid. Aquests resultats es poden relacionar amb una diferent contribució de les regions a la funció de l'enzim. Per contra, una regió tan conservada com el primer exó de l'*Adh-dup* queda agrupada amb les seqüències del primer intró d'aquest gen, que divergeix molt ràpid, donant en conjunt, un valor moderat de divergència. Òbviament, la informació obtinguda en els dos tipus d'anàlisi: funcionalitat i posició, són complementàries.

En algunes espècies aquestes diferències en les taxes de divergència al llarg dels gens, s'han associat a conversió gènica. Per exemple, entre els gens *Adh-1* i *Adh-2* de *D.mojavensis*, que presenten un intró més conservat que un exó (Atkinson et al., 1988), o també per explicar la semblança en algunes regions de l'*Adh* entre les espècies *D.planitibia* i *D.differens* (Rowan i Hunt, 1991). Però el fet que nosaltres trobem aquestes diferències entre tres espècies, i en zones allunyades entre sí, requiriria fenòmens de conversió gènica recurrents i de gran complexitat, i per tant, no constitueix una explicació gaire plausible.

4.- ALTRES SEQÜÈNCIES HOMÒLOGUES AL GEN *Adh* EN EL GENOMA DEL SUBGRUP *obscura*: RETROSEQÜÈNCIES.

En tres de les espècies analitzades: *D.subobscura*, *D.madeirensis* i *D.guanche* existeixen seqüències homòlogues a l'*Adh*, apart del gen funcional. Evidències indirectes com: el nombre de bandes obtingudes en un *Southern* genòmic, en les hibridacions *in situ* i en el aïllament de clons positius amb diferent mapa de restricció (veure apartat 1 de la discussió) suggerien la presència d'aquestes seqüències addicionals. Ara sabem que els seus trets les situen en la categoria de retroseqüències, és a dir, seqüències de DNA copiat del mRNA d'un gen estructural, i posteriorment insertades en el genoma. Aquest és un resultat molt interessant, pel fet que fins fa poc, es creia que aquest tipus de seqüències sols es trobaven en genomes de mamífers, o com molt, de vertebrats (Rogers, 1985; Vanin, 1985; Weiner et al., 1986; Wagner, 1986). Aquestes, junt amb un element semblant al grup *melanogaster* que acaben d'ésser publicats (Jeffs i Ashburner, 1991) són les primeres retroseqüències descrites al genoma d'invertebrats .

4.1.- Estructura de les retroseqüències de l'*Adh* a *D.subobscura*

Es van analitzar dues seqüències amb homologia a l'*Adh* a *D.subobscura* que eren diferents entre elles i al gen funcional. De fet es van aïllar 6 clons diferents, que podien agrupar-se per restricció en dos patrons diferents, i es van analitzar només dos clons, un representant de cada grup, S135 i S812. Les característiques essencials d'aquestes seqüències eren la falta d'introns, que havien estat perfectament escindits i l'absència d'elements promotors reconeixibles. En canvi presentaven seqüències molt similars al *leader* i al *trailer*, però no cua poliadenilada. Aquests trets són característics d'elements retrotranscrits, i en aquest cas, en procedir d'un mRNA d'un gen codificant estructural, s'anomenen retroseqüències (Hull i Will, 1989; Temin, 1989).

És de destacar que la homologia d'aquestes retroseqüències s'allarga més enllà de la regió derivada del gen *Adh*, de forma que es poden alinear les seqüències situades tant a 5' com a 3' de les dos retroseqüències. Aquesta similitud suggereix que les dues retroseqüències deriven d'un ancestre comú, a partir d'una duplicació. És a dir, es poden separar dos processos en la formació de les retroseqüències de l'*Adh* en el genoma de *D.subobscura*: d'una banda el fenomen de retrotranscripció i inserció en el genoma i de l'altra, la multiplicació d'aquestes seqüències, fenomen que també va afectar les seqüències veïnes.

A 3' de les dues retroseqüències, just on s'acaba l'homologia amb el gen funcional, es troba un dels terminals d'una repetició invertida de 196 pb. Aquesta repetició invertida delimita una regió estructuralment peculiar, ja que conté dues repeticions directes, alternades, de 40 pb i 52 pb, i també conté una seqüència palindròmica de prop de 100 pb. Aquesta regió que conté la repetició invertida forma part d'una família de DNA moderadament repetit en el genoma de *D.subobscura*, resultats comprovats per la seva detecció sobre cromosomes politènics, i per *Southern* de DNA genòmic. La localització cromosòmica detecta seqüències homòlogues prop de les regions centromèriques, riques en heterocromatina, també en alguns telòmers i en bandes disperses al llarg dels braços dels cromosomes. Per altra part, el patró d'hibridació sobre DNA genòmic total és de bandes múltiples, típic dels DNA moderadament repetits.

A més, s'han detectat per hibridació, seqüències amb homologia a aquesta repetició invertida en la regió genòmica del gen funcional, a 5' i 3' del conjunt format pels gens *Adh* i *Adh-dup*. En aquesta regió genòmica hi ha polimorfisme de restricció associat a la presència o no d'aquestes seqüències amb homologia a la repetició invertida, i per tant, no es tracta solament de mutació de dianes, sinó d'inserció o deleció de seqüències. Aquesta repetició invertida no conté cap pauta de lectura oberta de longitud acceptable i la recerca de seqüències similars en el GenBank/EMBL no ha donat un resultat clar, encara que s'obté una similitud més o menys dispersa amb alguns elements transponibles de *Drosophila*, com ara el transposó N10 de *D.nebulosa*., els retrotransposons 412 i 1731 de *D.melanogaster*, foldback, etc.

4.2.- Estructura de les retroseqüències de l'*Adh* a *D.madeirensis* i *D.guanche*

Com ja s'ha esmentat, es troben també seqüències homòlogues a l'*Adh*, addicionals, en el genoma de *D.madeirensis* i *D.guanche*. Una nova evidència en favor de la presència de retroseqüències d'*Adh* en aquestes espècies va ésser proporcionada per un experiment de PCR. Emprant dos oligonucleòtids de dos zones conservades de dos exons diferents (el segon i el tercer exons) i DNA genòmic de les espècies: *D.melanogaster*, *D.ambigua*, *D.subobscura*, *D.madeirensis* i *D.guanche*, es va determinar que només en les tres últimes s'obtenen dues bandes producte d'amplificació: la corresponent al gen funcional, amb una longitud superior perquè conté un intró, i una de longitud inferior, producte de l'amplificació de retroseqüències, que presenten l'intró processat.

Per altra part, s'ha efectuat la seqüenciació parcial de clons positius d'aquestes espècies, diferents als que contenen el gen funcional, i els resultats, tot i ser parcials, confirmen el seu origen retrotranscripcional, ja que no contenen introns. A més, la seva organització seria molt similar a les que s'han aïllat a *D.subobscura*, ja que per hibridació s'ha determinat la presència de seqüències homòlogues a la repetició invertida, molt properes a les retroseqüències. Això i el fet que en *Southern* genòmics amb DNA de *D.madeirensis* i *D.guanche* es detecten també seqüències homòlogues a la repetició invertida amb un patró en bandes múltiples, recolza un origen comú per a les retroseqüències d'aquestes espècies tant properes.

4.3.- Evolució i origen de les retroseqüències de l'*Adh*

Disposar de la seqüència complerta de dues de les retroseqüències de *D.subobscura* ha permès la comparació evolutiva entre elles i amb el gen funcional. S'ha determinat que només hi ha un enzim ADH a *D.subobscura*, de característiques cinètiques i bioquímiques molt similars al d'altres espècies (Hernández et al., 1988), i per altra part, només hem detectat un transcrit en transferències *Northern*. Són molt rars els casos descrits de retroseqüències que s'expressin o que siguin funcionals, degut a la pèrdua d'elements promotors i reguladors de l'expressió (Perler et al., 1980; Stein et al., 1983; Bento-Soares et al., 1985; Clark et al., 1986; Boer et al., 1987; Gruskin et al., 1987; McCarrey i Thomas, 1987; Ashworth et al., 1990). En les retroseqüències de l'*Adh* que hem aïllat no es detecta cap seqüència putativament promotora, i per tant, és molt probable que no s'expressin i per tant, no siguin funcionals, al menys en l'actualitat.

Tot i això, quan s'analitza l'evolució d'aquestes seqüències, s'observa una certa conservació, més elevada que la de regions no codificants. Es detecta una certa restricció en el tipus de substitucions de reemplaçament, en particular hi ha un nombre més petit de substitucions que afectin segones posicions de codó, i aquesta tendència queda especialment de manifest quan es compara qualsevol de les retroseqüències amb el gen *Adh*. Aquest tipus de restricció també s'ha detectat en d'altres retroseudogens (Li i Johnson, 1989). Probablement aquestes retroseqüències no són funcionals, i a més, el fet que una d'elles presenti una deleció d'un pb que provoca un canvi de pauta de lectura, és una prova més de no funcionalitat. Hem aplicat un model matemàtic (Miyata i Yasunaga, 1981) per provar la possible funcionalitat d'aquestes retroseqüències i alhora obtenir una idea més clara de l'evolució d'aquestes seqüències dins el genoma de *D.subobscura*. Les conclusions més interessants serien:

a) La retroposició (retrotranscripció i inserció en el genoma) de l'*Adh* ha estat un esdeveniment recent des d'un punt de vista de temps evolutiu,

b) les dues retroseqüències han divergit molt recentment a partir d'una retroseqüència ancesra (aproximadament fa uns 50,000 anys), d'aquí la seva gran similitud estructural. A més, aquesta duplicació va afectar les regions properes,

c) la retroseqüència ancesral va evolucionar durant un període considerable sota algun tipus de restricció, aproximadament la meitat de la seva existència.

Tot i que el model va ésser formulat per explicar l'evolució de gens de mamífers i assumeix taxes constants de substitució, el temps relatiu en que s'han anat produint la sèrie de fenòmens sembla plausible. De fet, els valors obtinguts són aproximats i cal notar que les taxes obtingudes per a les substitucions silencioses de l'*Adh* a *Drosophila* són el doble de les descrites per a gens de mamífer mentre que les de reemplaçament són del mateix ordre. Aquesta diferència pot relacionar-se amb una taxa evolutiva del DNA més elevada per als insectes que per als mamífers (Sharp i Li, 1989; Caccone i Powell, 1990).

Per altra part, el fet que es detectin retroseqüències d'*Adh* en una tríade d'espècies molt properes filogenèticament, però que no s'hagin trobat evidències de la seva existència a *D.ambigua* (espècie del mateix grup) i que l'organització d'aquestes retroseqüències sigui molt similar en aquestes tres espècies, fins i tot estan situades en bandes homòlogues en els cromosomes, indicaria que amb molta probabilitat, el fenomen de retrotranscripció va tenir lloc abans de la especiació dins d'aquesta tríade, però posteriorment a les primeres radiacions dins del subgrup *obscura*. Aquesta hipòtesi pot rebre confirmació amb la inclusió de les retroseqüències complertes de *D.madeirensis* i *D.guanche* en la comparació. L'anàlisi preliminar realitzat en aquest sentit, indica que les retroseqüències de les tres espècies s'assemblen tant entre sí com els gens funcionals entre ells (Taula V), de fet les dues retroseqüències més semblants són les de *D.madeirensis* i *D.subobscura*. Aquests resultats concorden amb la hipòtesi d'un únic origen de les retroseqüències, previ a la separació d'aquesta tríade (Fig.48)

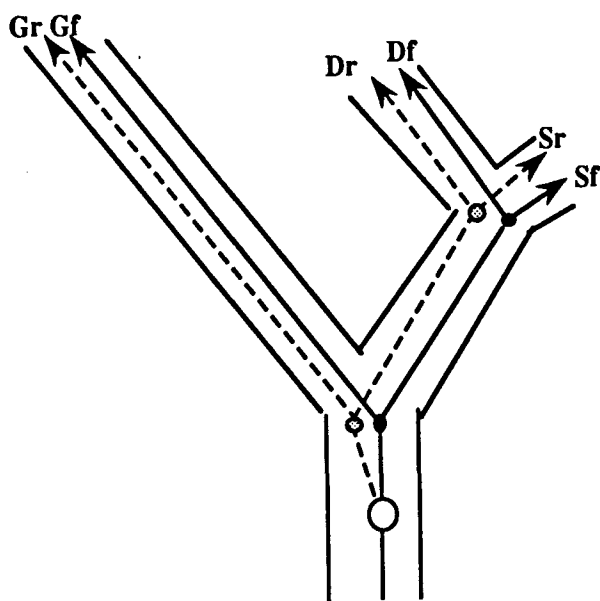


Fig.48.- Esquema hipotètic en forma d'arbre de l'evolució del gen funcional (f) i les retroseqüències (r) d'*Adh* a les espècies *D.subobscura* (S), *D.madeirensis* (D) i *D.guanche* (G). Les fletxes contínues i discontinües indiquen, respectivament, l'evolució de les seqüències funcionals i de les retroseqüències. El cercle blanc assenjala el fenomen original de retrotranscripció, i els cercles negre i puntejat la divergència gènica prèvia a la separació de les espècies. La diferent longitud de les branques indica la diferent taxa evolutiva que experimenta cada espècie (veure text). No s'indiquen les posteriors multiplicacions que hagin sofert les retroseqüències en cada branca.

Un elevat percentatge dels membres de les famílies multigèniques dels genomes de mamífers són retroseqüències. Habitualment, es tracta de gens *housekeeping*, és a dir, d'expressió generalitzada, o bé, de gens d'elevada expressió. L'*Adh* a *Drosophila* és un gen que s'expressa molt i a més, s'han descrit activitats transcriptasa inversa a *Drosophila* (Finnegan, 1989) associades a elements transponibles. L'origen de les retroseqüències de l'*Adh* ha d'estar lligat a la còpia d'un transcrit per una transcriptasa inversa, i després s'hauria d'integrar en el genoma, probablement per unió a llocs de trencament. Perquè aquesta integració sigui heretable, s'ha de produir en el genoma de cèl·lules germinals, ara bé això no sembla ésser excessivament problemàtic, donat que l'*Adh* s'expressa en les cèl·lules nutrícies de l'òdit (Sullivan et al., 1990; Visa et al., sotmés), amb les quals formen un sincici. D'altra banda, és probable que la presència d'un DNA moderadament repetit en el genoma, immediatament adjacent a les retroseqüències, tingui alguna relació amb l'origen

retrotranscripcional, sobretot tenint en compte que s'ha proposat que la distribució d'aquest tipus de DNA es relaciona amb elements mòbils a *Drosophila subobscura* (Martin et al., 1983; Felger i Sperlich, 1989), com és el cas dels genomes de mamífer on la majoria de famílies de repeticions disperses s'han originat mitjançant mecanismes de retroposició (Deininger i Daniels, 1986). Per tant, creiem que a mesura que incrementi el coneixement sobre l'estructura del genoma a *Drosophila* i a d'altres organismes invertebrats, es descriuran més retroseqüències, de forma que es pot concloure que els mecanismes evolutius que actuen sobre la versatilitat i plasticitat del genoma en vertebrats són també rellevants per a explicar la dinàmica de l'evolució dels genomes d'organismes considerats inferiors.

5- RELACIONS FILOGENÈTIQUES ENTRE LES ESPÈCIES DEL SUBGRUP *obscura*.

Com ja s'ha esmentat a la Introducció, les posicions filogenètiques de les espècies analitzades han estat objecte de nombrosa controvèrsia. Els nostres resultats poden aportar nova informació sobre aquest aspecte: les dades obtingudes indiquen clarament que dins de la tríade *D.subobscura*, *D.madeirensis* i *D.guanche*, les dues primeres són les més properes filogenèticament, d'altra banda, l'espècie *D.ambigua* presenta una filiació més imprecisa. Hem intentat establir les relacions filogenètiques entre les espècies estudiades mitjançant la comparació de dades dels dos gens que hem seqüenciat, tenint en compte que també disposavem de les dades de comparació amb *D.mauritiana*, una espècie grup *melanogaster*, que s'ha emprat com a espècie *outgroup* o de referència.

Aprofitant les dades de divergència, un exercici entretingut i alhora informatiu pot ésser l'aproximació als temps de separació d'espècies. El problema que es presenta és que la taxa de divergència no es manté constant entre branques ni dins les branques. S'han estimat taxes de divergència aproximades per a les espècies del subgrup *obscura*, 0.4% de substitucions per milió d'anys (Caccone i Powell, 1990) que són més baixes que les estimades per al subgrup *melanogaster*, que són aproximadament el doble. Emprant les dades de divergència del gen *Adh* i les retroseqüències de *D.subobscura*, s'obté una estimació de la taxa promig de divergència d'aquesta espècie de 1.28×10^{-8} substitucions per nucleòtid i any (aproximadament un 1.28% de substitucions per milió d'anys). Si aquest valor s'aplica a la separació de *D.guanche* i *D.madeirensis*, degut a la seva proximitat, s'obtenen les estimacions de 4.5 a 5.2 milions d'anys per a la divergència de *D.guanche* respecte el parell *D.subobscura/D.madeirensis* i prop d'un milió per a

la separació de *D.madeirensis* i *D.subobscura*, tots dos valors són similars als proposats per altres autors, basant-se amb un altre tipus de dades (Loukas et al., 1984; González et al., 1990). Tot i això, la validesa d'aquestes extrapolacions, sobretot entre espècies molt llunyanes o de taxes de divergència molt diferents, és relativa

Quan s'intenta l'aproximació a l'establiment de relacions filogenètiques sorgeixen diversos problemes, d'una banda, el gran nombre de mètodes, basats en una gran diversitat de criteris i algorismes matemàtics, fan difícil l'elecció i d'altra, la decisió sobre quin tipus de dades es fa servir. Per començar, es poden fer servir les seqüències senceres, o bé matrius de distàncies a partir de l'elaborament de les dades. La comparació a partir de les seqüències complertes és un requisit per fer servir programes de màxima parsimònia com l'UPGMA i el BOOTSTRAPS, mentre que per utilitzar programes com el de mínims quadràtics de Fitch-Margoliash (Fitch i Margoliash, 1967) es necessiten matrius de distàncies. Es poden utilitzar les dades obtingudes de la comparació de totes les posicions de la regió codificant, o bé només les obtingudes per comparació de substitucions silencioses o les obtingudes per les substitucions de reemplaçament. Per altra part, el criteri bàsic per emprar un o un altre programa depèn dels axiomes que cada programa fa i dels requisits i tipus de dades que necessiti: hi ha programes que suposen un rellotge molecular, d'altres que permeten un creixement asincrònic de les branques, i per tant que actuïn diferents taxes de divergència, alguns produeixen arbres amb arrel, mentre que d'altres no tenen arrels però poden emprar una espècie *outgroup* de referència, etc...

Hem emprat tres tipus diferents de programes en l'establiment de relacions filogenètiques:

- FITCH (paquet PHYLIP, de J.Felsenstein, Universitat de Washington) basat en el mètode dels mínims quadràtics de Fitch-Margoliash. Les dades s'introdueixen com una matriu de distàncies, en la que s'han de comparar totes les espècies objecte d'anàlisi. Les dades poden procedir de la seqüència sencera o bé haver estat elaborades, com ara matrius de distàncies de les posicions silencioses o de les de reemplaçament, etc... Accepta la introducció d'una espècie *outgroup*. Es caracteritza per donar arbres sense arrel, i amb creixement independent i no sincrònic de les branques i per tant, evidència les diferències en les taxes de divergència entre diferents espècies.

- KITSCH (paquet PHYLIP, de J.Felsenstein, Universitat de Washington) també basat en el mètode dels mínims quadràtics de Fitch-Margoliash. La única diferència amb el programa anterior és l'assumpció del creixement sincrònic de les branques, és a dir, d'un rellotge molecular, i produir arbres amb arrel. No accepta espècies *outgroup*.

- DNABOOT (paquet PHYLIP, de J.Felsenstein, Universitat de Washington) que obté bootstraps sobre arbres de màxima parsimònia. Il·lustra la fiabilitat dels diferents arbres obtinguts, donant un valor a cada ramificació segons el percentatge d'ocurrència seguint el mètode de màxima parsimònia.

Les dades que hem emprat, ja sia les seqüències senceres o dades elaborades, són totes les seqüències de l'*Adh* de les nostres espècies, juntament amb les retroseqüències de *D.subobscura*, i les *Adh* funcionals de *D.pseudoobscura* i *D.mauritiana* i les seqüències de l'*Adh-dup* de les mateixes espècies. Els millors arbres s'han obtingut emprant el programa FITCH, tot i que el DNABOOT ofereix l'avantatge de donar un valor a la fiabilitat d'un determinat arbre. Els avantatges del FITCH rauen en què els mètodes additius permeten evidenciar les diferències en les taxes de divergència de cada espècie, i el fet de permetre emprar una espècie *outgroup* facilita la ubicació d'espècies. En el cas de les nostres espècies, la posició de *D.ambigua* és, fent honor al seu nom, ambigua, i fins i tot, emprant un programa com el KITSCH, és col·locada en alguns arbres fora del grup *obscura*, quedant *D.mauritiana* més propera a la resta d'espècies. Per altra part, l'assumpció del rellotge molecular és avui en dia, si més no, controvertida.

En la Fig.49 es presenten les matrius de dades de distàncies obtingudes per a l'*Adh* i l'*Adh-dup*, per a la seqüència total, per a les posicions silencioses i les de reemplaçament, i el valor de les diferències procedeix de la correcció del percentatge de les diferències trobades (Jukes i Cantor, 1969). De tots els arbres obtinguts amb el programa FITCH presentem aquells les topologies dels quals siguin representatives o bé interessants (Fig.50).

AdhSubstitucions totals

	mau	pse	amb	sub	mad	gua	812	135
mau								
pse	0.167							
amb	0.151	0.087						
sub	0.184	0.095	0.094					
mad	0.181	0.094	0.099	0.005				
gua	0.176	0.094	0.097	0.022	0.020			
812	0.188	0.111	0.114	0.061	0.060	0.056		
135	0.194	0.121	0.125	0.068	0.068	0.064	0.013	

Substitucions silencioses

	mau	pse	amb	sub	mad	gua	812	135
mau								
pse	0.702							
amb	0.480	0.241						
sub	0.643	0.353	0.267					
mad	0.680	0.370	0.339	0.009				
gua	0.636	0.370	0.332	0.059	0.064			
812	0.632	0.303	0.309	0.100	0.100	0.089		
135	0.611	0.309	0.316	0.095	0.100	0.089	0.019	

Substitucions de reemplaçament

	mau	pse	amb	sub	mad	gua	812	135
mau								
pse	0.049							
amb	0.056	0.022						
sub	0.062	0.014	0.027					
mad	0.053	0.009	0.024	0.004				
gua	0.054	0.009	0.024	0.007	0.004			
812	0.068	0.049	0.051	0.046	0.044	0.043		
135	0.080	0.060	0.063	0.058	0.056	0.055	0.011	

*Adh-dup*Substitucions totals

	mau	pse	amb	sub	mad	gua
mau						
pse	0.202					
amb	0.200	0.112				
sub	0.213	0.081	0.115			
mad	0.215	0.086	0.131	0.007		
gua	0.234	0.096	0.142	0.025	0.031	

Substitucions silencioses

	mau	pse	amb	sub	mad	gua
mau						
pse	>1.38					
amb	>1.01	0.388				
sub	>1.21	0.262	0.352			
mad	>1.11	0.266	0.481	0.014		
gua	>1.41	0.298	0.526	0.062	0.067	

Substitucions de reemplaçament

	mau	pse	amb	sub	mad	gua
mau						
pse	0.028					
amb	0.067	0.036				
sub	0.044	0.026	0.032			
mad	0.051	0.032	0.038	0.005		
gua	0.054	0.036	0.043	0.013	0.018	

Fig.49.- Matrius de distàncies emprades per a establir les relacions filogenètiques entre les seqüències dels gens *Adh* i *Adh-dup*, per a la seqüència total, per a les posicions silencioses i les de reemplaçament. El valor obtingut procedeix de la correcció del percentatge de les diferències trobades (Jukes i Cantor, 1969).

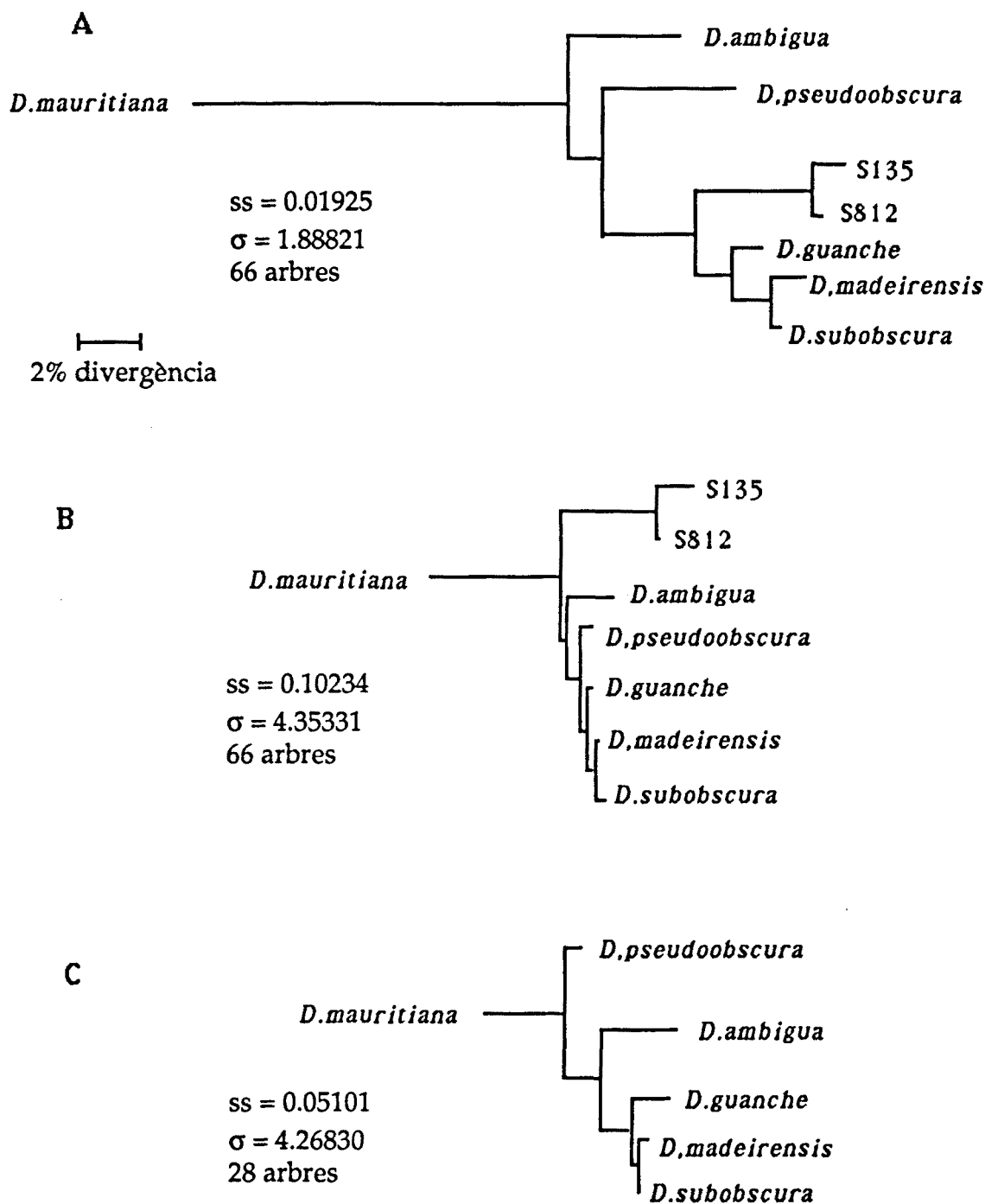


Fig.50.- Arbres filogenètics sense arrel obtinguts amb el programa FITCH, segons les matrius de distàncies de la Fig.49. *D.mauritiana* és l'espècie *outgroup*.

A) Arbre filogenètic per a les seqüències d'*Adh*, obtingut emprant la matriu de distàncies per a les substitucions totals.

B) Arbre filogenètic per a les seqüències d'*Adh*, obtingut emprant la matriu de distàncies per a les substitucions de reemplaçament.

C) Arbre filogenètic per a les seqüències del gen *Adh-dup*, obtingut emprant la matriu de distàncies per a les substitucions de reemplaçament.

En particular, destaquen les topologies obtingudes amb el gen *Adh* per a la seqüència total i per a les posicions silencioses que, a més d'ésser molt similars entre elles, presenten tres punts notables:

- l'agrupació de *D.madeirensis* i *D.subobscura*, més properes entre elles que a *D.guanche*, tot i que formen una tríade molt relacionada, tal i com es deduia directament de la comparació de seqüències,

- l'agrupació de les dues retroseqüències de *D.subobscura*, però separades de l'*Adh* funcional d'aquesta espècie i separant-se just abans de la tríade *D.guanche*, *D.madeirensis* i *D.subobscura*, recolzant la hipòtesi que la retroposició de l'*Adh* va tenir lloc abans de l'especiació dins aquesta tríade,

- la posició de *D.ambigua* com més llunyana a les espècies europees, i per tant, situant a *D.pseudoobscura* més propera a *D.subobscura*

En canvi, si es tenen en compte només les posicions de reemplaçament, es produeix un canvi qualitatiu important en la situació de les retroseqüències de *D.subobscura*, ja que aquestes es situen en la primera ramificació dins de la radiació del subgrup *obscura* (Fig.50). Aquesta situació topològica no és acceptable com a real, donat que a *D.ambigua* no existeixen retroseqüències i a *D.pseudoobscura* no s'han descrit. Té una explicació plausible en el fet que les retroseqüències en no presentar constrenyiment funcional, evolucionen molt més ràpidament, sense selecció negativa per a les substitucions de reemplaçament. En aquest cas, doncs, la topologia obtinguda per a la comparació de la seqüència, en conjunt, és més informativa quant l'origen, mentre aquestes diferències topològiques reflecteixen les diferències en la funció. Per altra part, s'ha de destacar que les retroseqüències es van originar una vegada ja s'havia separat el subgrup *melanogaster* del subgrup *obscura*, ja que les diferències principals en les comparacions d'aquesta regió genòmica dels dos subgrups, es troben en les posicions de reemplaçament del gen *Adh*, i la situació de les retroseqüències demostra que comparteixen la majoria de substitucions que les espècies del subgrup *obscura* presenten en relació amb les del subgrup *melanogaster*.

No obstant, la situació de *D.ambigua* queda relativament poc clara, donat que queda molt allunyada de les espècies europees. Com ja s'ha esmentat en

l'evolució molecular d'aquesta regió genòmica, la regió més afectada durant la radiació del subgrup *obscura* ha estat la de les posicions de reemplaçament del gen *Adh-dup*, amb una distribució no a l'atzar de les substitucions. La topologia obtinguda per al conjunt de la seqüència és comparable a l'obtinguda pel gen *Adh*, mentre que l'obtinguda amb les posicions silencioses es diferencia en la major proximitat de *D.guanche* i *D.madeirensis*. Però les dades més informatives són les posicions de reemplaçament, que produeixen una topologia diferenciada de la resta (Fig.50). Cal ressaltar:

- la situació de *D.ambigua* és més propera a la tríade de *D.subobscura* que *D.pseudoobscura*, és a dir, les espècies europees queden agrupades i també es posa de manifest, l'elevada taxa de divergència que presenta *D.ambigua*, indicant una evolució ràpida

- la relativa poca divergència de *D.subobscura* respecte *D.madeirensis*,

- la taxa de divergència relativament elevada que presenta *D.guanche*, que l'està fent divergir ràpidament de *D.madeirensis* i *D.subobscura*,

- la taxa de divergència relativament baixa de *D.pseudoobscura* des de la seva ramificació.

Una dada addicional confirmatòria per a les diferències en les taxes de divergència de la tríade *D.subobscura*, *D.madeirensis* i *D.guanche* s'obté en l'anàlisi de la divergència de les seves retroseqüències, ja que es posa de manifest que *D.guanche* divergeix més ràpidament i en canvi, *D.subobscura* seria l'espècie que divergiria menys ràpid, concordant amb els resultats d'altre tipus de dades (Cabrera et al., 1983). Aquestes diferències en les taxes de divergència d'aquestes espècies s'explicaria, en part, pel fet que les dues espècies insulars tenen un nombre efectiu de població petit, i que el temps necessari per a la fixació de mutacions en la població és menor. Aquest fenomen es veu encara més afavorit si les poblacions han passat per freqüents colls d'ampolla, com sembla ser el cas de *D.guanche*.

Tenint en compte aquesta diversitat en les taxes de divergència relatives, es comprèn que la posició filogenètica de les espècies quedi distorsionada segons el tipus de dades que s'emprin per aquest tipus d'estudi. Diferents autors han proposat que aquelles regions que millor il·lustren la divergència en determinats

períodes de temps constituïrien uns bons marcadors moleculars per a establir relacions filogenètiques en aquells períodes. Aquest sembla ésser un bon exemple de la utilitat d'aquest tipus de marcadors.

Així, doncs, es confirma la proximitat filogenètica de *D.guanche*, *D.madeirensis* i *D.subobscura*, éssent aquestes últimes les més properes. *D.guanche* és l'espècie que divergeix més ràpidament dins de la tríade. L'espècie *D.ambigua* està situada més aprop de les espècies europees que de les espècies americanes, tot i que la seva elevada taxa de divergència, al menys, en aquesta regió genòmica, emmascara aquesta proximitat i distorsiona la seva filogènia. Per altra part, la retroseqüència ancestre de S135 i S812 va tenir el seu origen en fenòmens posteriors a la radiació del subgrup *obscura* i anteriors a l'especiació de la tríade *D.subobscura*, *D.madeirensis* i *D.guanche*, éssent aquesta l'explicació més plausible de la presència d'aquests elements en el genoma de les tres espècies.

CONCLUSIONS

CONCLUSIONS

A) Estructura de la regió genòmica del gen *Adh*

- 1.- La comparació de l'anàlisi de restricció de la regió genòmica del gen *Adh* a les quatre espècies analitzades mostra que no hi ha una gran conservació de dianes, excepte entre espècies molt properes. Les dianes conservades es troben situades en regions properes als promotors o bé es cavalquen amb els senyals de maduració dels introns.

- 2.- En les quatre espècies analitzades, l'organització genòmica del gen *Adh* és similar a la que presenta el de *D.melanogaster*. Es tracta d'un gen de còpia única, compost per tres exons codificants, i la seva expressió ve regulada per dos promotors, un proximal i l'altre distal.
 - 2.a.- La mida dels exons es conserva, a excepció de sis pb menys (els que codifiquen per als aminoàcids segon i tercer) en les espècies del subgrup *obscura* respecte les del subgrup *melanogaster*. La mida dels introns també es manté, éssent el que presenta més variació de longitud l'anomenat intró de l'adult, que es troba en la regió no codificant intermèdia dels dos promotors.

 - 2.b.- La similitud estructural de les seqüències promotores i d'altres probablement implicades en la regulació i l'existència d'un transcrit de mida similar en els mateixos estadis del desenvolupament, permet suposar que la seva expressió és molt similar a la que presenta el mateix gen a *D.melanogaster*.

- 3.- En les quatre espècies analitzades, s'ha trobat en una posició immediatament adjacent a 3' del gen *Adh*, una nova pauta de lectura oberta, recentment descrita en d'altres espècies. La seva gran conservació de seqüència, i la presència d'elements típics de gens que s'expressen (caixes TATA i CCAAT, seqüències de maduració dels introns) indiquen que es tracta d'un gen funcional. L'elevada similitud estructural i de seqüència amb el gen *Adh* confirma que ambdós gens han divergit a partir de la duplicació d'un gen precursor. Aquest nou gen s'anomena *Adh-dup*.

3.a.- La mida dels exons es conserva, a excepció del tercer, en el qual varia la posició del codó de terminació, de forma que per a diferents espècies, varia la longitud d'aquest exó, i per tant, la part carboxi-terminal de la putativa proteïna codificada. La mida del segon intró és petita, però la del primer és més gran i variable.

3.b.- Els nostres estudis sobre l'expressió d'aquest gen no han donat un resultat clar. Sembla tractar-se d'un gen d'expressió molt baixa o bé d'expressió molt específica, i probablement els transcrits no processats co-existeixen amb els processats.

B) Evolució de la regió genòmica del gen *Adh*

4.- L'anàlisi de l'evolució molecular d'aquesta regió genòmica indica que el gen *Adh* té una taxa de divergència més baixa que la del gen *Adh-dup*, i que existeix una gran variació en les taxes de divergència observades tant per a regions codificants com per a no codificants.

4.a.- Les substitucions silencioses són significativament més nombroses que les de reemplaçament, degut al constrenyiment funcional, i per tant, les substitucions estan esbiaixades cap a les terceres posicions de codó i cap a transicions respecte transversions. L'única excepció és la comparació de les seqüències de *D.madeirensis* amb *D.subobscura*, degut probablement a la seva gran proximitat filogenètica, i al baix nombre de substitucions que presenten.

4.b.- La comparació de seqüències entre qualsevol espècie del subgrup *obscura* analitzada amb espècies del subgrup *melanogaster* (representat per *D.mauritiana*) presenta una distribució no a l'atzar de les substitucions de reemplaçament entre els tres exons del gen *Adh*, de forma que s'acumulen significativament en el tercer exó. Aquesta tendència no es posa de manifest quan es comparen les seqüències del gen *Adh-dup* ni quan es comparen les espècies del subgrup *obscura* entre elles.

- 4.c.- En canvi, la comparació de seqüències de les espècies del subgrup *obscura* posa de manifest la distribució no a l'atzar de les substitucions de reemplaçament del gen *Adh-dup*, acumulant-se també en aquest cas en el tercer exó.
- 4.d.- L'espècie *D.subobscura* presenta un ús de codons menys esbiaixat per al gen *Adh* i per al gen *Adh-dup* que d'altres espècies del mateix subgrup.
- 4.e.- La tríade d'espècies *D.subobscura*, *D.madeirensis* i *D.guanche* és molt propera filogenèticament, de tal manera que es pot efectuar un bon alineament tant en regions codificants com no codificants, i es pot complementar l'anàlisi la seva evolució emprant un criteri de prevalència a la seqüència en lloc de a la funció. Els patrons de divergència obtinguts amb aquest tipus d'anàlisi són els mateixos per a les tres comparacions inter-específiques, evidenciant zones que contribueixen de forma diferent a la funció i regulació gèniques.

C) Retroseqüències del gen *Adh*

- 5.- Existeixen diferents tipus d'evidència que proven l'existència de seqüències addicionals al gen funcional, homòlogues a l'*Adh*, al genoma de *D.subobscura*, *D.madeirensis* i *D.guanche*: la multiplicitat de bandes en *Southern*s genòmics que no concorden amb la restricció del gen funcional; la multiplicitat de localitzacions cromosòmiques, l'aïllament de clons positius amb restricció diferent a la del gen funcional, i la seqüenciació total o parcial d'alguns d'aquests clons.
- 5.a.- L'estructura deduïda a partir de la seqüenciació d'aquests clons addicionals mostra el seu origen retrotranscripcional, com ara la falta d'introns, perfectament escindits, i l'absència de regions promotores reconeixibles, tot i que presenten seqüències homòlogues al *leader* i *trailer* del gen.

- 5.b.- L'anàlisi comparativa de dues retroseqüències aïllades a *D.subobscura*, S135 i S812, mostra que ambdues són més similars entre elles que al gen funcional i que han divergit a partir d'una duplicació d'una retroseqüència ancestral i a més, comparteixen homologia més enllà de la retroseqüència. Per tant, els fenòmens de retrotranscripció i inserció en el genoma han estat independents de la seva multiplicitat, que també ha afectat a les regions veïnes.
- 5.c.- Per altra part, la comparació de seqüències permet dir que aquest fenomen és relativament recent en el temps evolutiu. La seva evolució, tot i no ésser funcionals (apart de no transcriure's, S135 presenta una deleció d'un pb que origina un canvi en la pauta de lectura) ha presentat durant un cert temps una certa restricció.
- 5.d. Les seqüències addicionals, homòlogues al gen *Adh*, als genomes de *D.madeirensis* i *D.guanche* també són retroseqüències.

D) Seqüència de repetició invertida

- 6.- Inmediatament adjacent a les retroseqüències de *D.subobscura*, s'ha trobat una repetició invertida de 196 pb que delimita una regió de característiques peculiars (repeticions directes alternades, palíndrom).
- 6.1.- Aquesta repetició invertida forma part d'una família de DNA moderadament repetida en el genoma de *D.subobscura*, de localització preferent, encara que no exclusiva, en les zones centromèriques.
- 6.2.- Es troben seqüències amb homologia amb aquesta repetició invertida en la regió genòmica del gen *Adh* funcional, i algunes d'aquestes regions s'han vist afectades per reordenacions.
- 6.3.- Existeixen evidències que aquesta repetició invertida es troba també adjacent a les retroseqüències de *D.madeirensis* i *D.guanche*, i que també en el genoma d'aquestes espècies forma part d'una família de DNA moderadament repetit.

6.4.- Una hipòtesi plausible suggereix que el fenomen de retrotranscripció de l'*Adh* va tenir lloc poc abans de l'especiació de la tríade *D.subobscura*, *D.madeirensis* i *D.guanche*, i que per això, les retroseqüències d'aquestes espècies comparteixen l'organització estructural. Una anàlisi més exhaustiva de les retroseqüències d'aquestes últimes espècies seria molt informativa. Per altra part, si aquesta repetició invertida tingués alguna relació amb elements transponibles, podria estar relacionada amb l'origen de les retroseqüències.

E) Relacions filogenètiques

7.- S'han establert relacions filogenètiques entre les espècies analitzades, de forma temptativa. El programa que proporciona millors resultats és el basat en els mínims quadrats de Fitch-Margoliash, sense arrel, i sense suposar creixement sincrònic de les branques.

7.1.- Les dades més informatives han estat les matrius de distàncies a partir de : a) la seqüència total dels gens *Adh* i b) les posicions de reemplaçament dels gens *Adh-dup*.

7.2.- S'ha confirmat la proximitat de la tríade *D.subobscura*, *D.madeirensis* i *D.guanche*, éssent les dues primeres més properes.

7.3.- Dins d'aquesta tríade, *D.guanche* és l'espècie que relativament divergeix més ràpid, i *D.subobscura*, la que menys.

7.4.- S'ha confirmat que l'ancestre de les dues retroseqüències va divergir poc abans de la separació de la tríade *D.subobscura*, *D.madeirensis* i *D.guanche*.

7.5.- La posició de *D.ambigua* tot i estar controvertida sembla situar-se més a prop de les espècies europees que *D.pseudoobscura*. La seva posició distorsionada sembla explicar-se per la seva ràpida divergència que contrasta amb la més lenta de *D.pseudoobscura*.

MATERIAL I MÈTODES

MATERIALS I MÈTODES GÈNERALS

L'apartat de Material i Mètodes d'aquest treball no pretén ser un compendi de tècniques que avui ja estan ben establertes als laboratoris de Genètica Molecular, com la restricció del DNA, l'electroforesi en gels d'agarosa, o les extraccions fenòliques, etc. A més, els protocols emprats es troben àmpliament descrits en manuals de laboratori molt coneguts i referenciats: Maniatis et al. (1982), Sambrook et al. (1989) i Ausubel et al. (1987). Només es farà esment d'aquelles modificacions o mètodes que han sigut posats a punt especialment per desenvolupar aquest projecte.

1. MATERIAL BIOLÒGIC

Quatre espècies del subgrup *obscura* han estat l'objecte d'aquest estudi: *D.ambigua*, capturada a Vidrà (Barcelona, 1985), *D.guanche*, originària de les Illes Canàries (Monclús, 1976), *D.madeirensis*, originària de les Illes Madeira (Monclús, 1984) i *D.subobscura* (soca H27, amb ordenacions cromosòmiques estàndard, facilitada per R. de Frutos (Departament de Genètica, Universitat de València). S'ha fet servir una cinquena espècie, *D.melanogaster*, com control en diferents experiments degut a la extensiva caracterització i informació relativa al gen *Adh* de la qual es disposa. Dues soques d'aquesta espècie han estat particularment informatives en estudis d'expressió: *Adh^F* (homozigòtica per a l'al·lel fast, construïda per B. Clarke, University of Nottingham, United Kingdom), com control positiu, i *Adhⁿ⁴* (ADH negativa, CRM⁻, descrita a Chia et al., 1987) com control negatiu. La font de DNA i RNA en tot el treball va ésser soques de diferents espècies de *Drosophila* establertes a partir de poblacions naturals i mantingudes al nostre laboratori durant els anys assenyalats.

2. OBTENCIÓ I PURIFICACIÓ DE DNA GENÒMIC DE *Drosophila*

Es va obtenir DNA genòmic pur per a la construcció de llibreries genòmiques i per a la preparació de transferències *Southern*. Per aquestes finalitats, s'ha d'obtenir DNA de mida gran, ja que s'ha de procedir a una posterior restricció. Els dos mètodes descrits a continuació són igualment útils: un és bó per obtenir-ne quantitats grans i l'altre, és una mini-preparació.

2.1. Aïllament a gran escala de DNA genòmic de *Drosophila*

El protocol utilitzat constitueix una variació del descrit per Chirgwin et al. (1979) per aïllar RNA amb isotiocianat de guanidina.

Protocol

- 1.- Es trituren 4-5 gr d'adults de *Drosophila* en nitrògen líquid, i la pols resultant s'introdueix en un tub amb 10 ml d'isotiocianat de guanidina, durant 10 min a temperatura ambient. Es pot aconseguir una millor homogenització amb un Dounce. Els fragments grossos es separen mitjançant filtració.
- 2.- Extracció fenòlica.
- 3.- Es dialitza la fase aquosa resultant en front:
 - 10 mM Tris-HCl pH 8.0
 - 50 mM EDTA pH 8.0
- 4.- Digestió amb RNasa A (100 µg/ml) 1h a 37°C.
- 5.- S'afegeix SDS i NaCl fins una concentració final de 1% v/v i 0.1M, respectivament.
- 6.- Digestió amb Proteinasa K (200 µg/ml) durant 2h a 50°C.
- 7.- Extracció fenòlica.
- 8.- Si cal reduir volum es realitzen extraccions front n-butanol.
- 9.- Es dialitza front TE x 1. Es fan tres canvis d'una hora cadascun.
- 10.- Electroforesi en gel d'agarosa (de 0.4% a 0.6%) per quantificar i determinar la qualitat del DNA obtingut.

2.2. Mini-preparació de DNA genòmic de *Drosophila*

El rendiment aproximat és de 4 a 8 µg de DNA total a una concentració de 0.1 a 0.2 µg/µl. Es calcula la concentració mitjançant electroforesi en gel d'agarosa i comparació amb un estàndard de concentració coneguda.

Protocol

- 1.- S'homogenitzen 10 mg d'adults de *Drosophila* (equival a 10 individus aproximadament) en un tub eppendorf amb 200 µl de solució d'isotiocianat de guanidina 4M. Posteriorment s'afegeixen 100 µl de la mateixa solució.
- 2.- Es centrifuga 2 min en una microfuga i es descarta el sobrenedant.
- 3.- Extracció fenòlica.
- 4.- Precipitació amb:
 - 0.1 vol NaAcO 3M pH 5.2
 - 2 vol etanol
- 5.- Centrifugació 30 min en una microfuga. Es descarta el sobrenedant.
- 6.- El sediment es resuspèn en 400 µl de:
 - 0.1 M Tris-HCl pH8.0
 - 0.1 M NaCl
 - 0.02 M EDTA pH8.0
 Es deixa 2h a 65°C.

- 7.- Es repeteix els punts 3, 4 (però la precipitació es realitza a -20°C de 4h a tota una nit) i 5 (es renta el sediment amb etanol al 70% i es deixa assecar al buit).
- 8.- Resuspensió amb $40\ \mu\text{l}$ d'aigua estèril, 10 min a 65°C .

NOTA: El RNA no s'ha eliminat de la mostra. Caldrà un tractament ulterior amb RNasa A.

3. CONSTRUCCIÓ DE LLIBRERIES GENÒMIQUES

El fag emprat en la construcció de llibreries genòmiques ha estat EMBL4 degut a la conveniència del seu lloc de clonatge múltiple i al mètode de selecció dels fags recombinants pel fenotip Spi⁻ (Frischauf et al., 1983). Preparacions de fag a gran escala s'han utilitzat tant per a obtenir vector de clonatge com per a una posterior amplificació dels fags recombinants positius.

3.1. Obtenció de fag lambda a gran escala.

Tots els protocols especificats en manuals de laboratori són efectius. Aquí especificuem el que nosaltres hem adaptat amb bon rendiment (de 0.2 mg a 1 mg de DNA total).

Protocol

- 1.- Es pica una calva única de fag i s'el·lueix en 1 ml de SM (o qualsevol tampó d'el·lució de fags) amb unes gotes de cloroform. Es pot el·luir suaument a 4°C durant unes 4h, o bé amb un VORTEX durant 2 min.
- 2.- Es fa créixer un cultiu saturat de bacteris K802 (no selectives per al fenotip Spi⁺) en LB suplementat amb maltosa (0.2% w/v).
- 3.- La infecció es realitza afegint a 1 ml de bacteris K802:
 - 1ml d'una solució 10 mM MgCl₂, 10 mM CaCl₂
 - 0.9 ml de fags el·luïts
 Es deixa de 10 min a 20 min a 37°C .
- 4.- S'inoculen 800ml de LB suplementats amb MgCl₂ (10 mM final) i es deixa tota la nit a 37°C , remenant fortament.
- 5.- Es facilita la lisi afegint 1 ml de cloroform i deixant el cultiu a 37°C uns 15 min més.
- 6.- Es precipiten les restes bacterianes en una centrifugació a 8000 rpm durant 10 min a 10°C en pots de 250 ml ó de 500 ml de capacitat.
- 7.- Es transfereix el sobrenedant al mateix flascó del cultiu, amb RNasa A (1 µg/ml final) i DNasa I (2.5 µg/ml final). Es deixa remenant suaument 1h a 37°C .
- 8.- La precipitació dels fags es realitza amb NaCl i PEG-6000. Remenant-ho fins que es disolgui, i després es manté en gel un mínim d'1h.

- 9.- Centrifugació en ampolles de 250 ml ó de 500 ml a 8000 rpm durant 30 min a 4°C.
- 10.- Es separa acuradament el sobrenedant del sediment i aquest es resuspèn en 10 ml de SM (en total), tractant d'evitar al màxim que es faci escuma. Es recull tot el líquid i es transfereix a tub COREX.
- 11.- S'extreu el PEG-6000 amb una solució de cloroform:isoamflic (24:1), afegint-hi un volum i centrifugant 15 min a 2000-3000 rpm per separar les fases.
- 11.- Es barregen 8.6 ml de sobrenedant amb 6.44 g de CsCl (densitat resultant al voltant de 1.5 g/ml). Es posa la solució en tubs d'ultracentrífuga *quick-seal*.
- 12.- Centrifugació en una ultracentrífuga a 32000 rpm durant un mínim de 14 h a 5°C-10°C en rotor d'angle fix.
- 13.- S'obté la banda del fag amb una xeringa, i es posa a dialitzar dins un tub de diàlisi en front:

Solució de Diàlisi

- 10 mM NaCl
- 10 mM Tris-HCl pH8.0
- 10 mM MgCl₂

Es realitzen dos canvis, un cada dues hores.

- 14.- A la suspensió dialitzada s'afegeix (concentració final):

- 20 mM EDTA pH 8.0
- 50 µg/ml Proteinasa K
- 0.5% w/v SDS

Es deixa 1h a 65°C.

- 15.- Extracció fendèlica.
- 16.- Precipitació del DNA del fag amb:
 - 0.1 vol NaAcO 3M pH 5.2
 - 2 vol etanol
- 17.- Es centrifuga a 12500 rpm durant 30 min amb un rotor basculant.
- 18.- Es disol el precipitat en 0.5 ml de TE x 1, 10 min a 65°C. Es pot mantenir a 4°C.
- 19.- La concentració es calcula per O.D. o per comparació amb un estàndard de concentració coneguda fent una electroforesi en gel d'agarosa.

NOTA: El punt més important és obtenir una bona lisi en el punt 4. Aquesta es pot produir entre les 14 h a les 16 h d'infecció i es detecta per un aclariment del cultiu bacterià i per la presència de fils o floquets dins del medi que provenen de membranes i restes dels bacteris lisats. Si no és bona, millor tornar a començar tot el procés, canviant la proporció dels fags en la infecció.

3.2. Preparació de fag vector EMBL4

El fag EMBL4 (Fristchauf et al., 1983) és un vector lambda de substitució especialment dissenyat per a la construcció de llibreries genòmiques. En els vectors de substitució el

fragment de DNA a clonar substitueix una regió interna del fag, anomenada *stuffer* o farcidor, que no conté informació indispensable per al seu cicle vital.

Els principals problemes en la construcció de llibreries genòmiques són obtenir una llibreria ben representada, amb fragments encavalcats i evitar la contaminació per fags reconstituïts (sense insert) que solen ser més eficients en la lligació, empaquetament i la infecció, que els fags recombinants. El primer inconvenient es resol mitjançant la digestió parcial del DNA genòmic amb un enzim de restricció que reconegui una diana de 4 pb. Respecte el segon problema, els fags vectors de la sèrie EMBL permeten la selecció dels fags recombinants pel seu fenotip Spi^- però a més, la particular disposició de dianes dins del lloc de clonatge múltiple d'EMBL4 permet, mitjançant una doble digestió amb enzims de restricció, preparar el fag com a vector de clonatge i alhora defugir la reconstitució del fag salvatge. En primer lloc, el fag vector es digereix amb *Bam*HI, enzim que reconeix una diana de 6 pb que és compatible amb la diana de 4 pb que deixa l'enzim *Mbo*I (o l'isosquizòmer *Sau*3AI) amb què s'ha digerit de forma parcial el DNA genòmic a insertar. Per altra part, una segona digestió amb l'enzim *Sal*I, que reconeix quatre dianes més internes, dues al lloc de clonatge múltiple i dues que parteixen el fragment del mig o *stuffer* fan quasi bé impossible la reconstitució del vector. Així doncs, la primera digestió permet la clonació de l'insert i l'última digestió ens assegura una millor separació dels dos braços del vector amb una menor o nul·la contaminació del fragment intermediari (Fig.51)

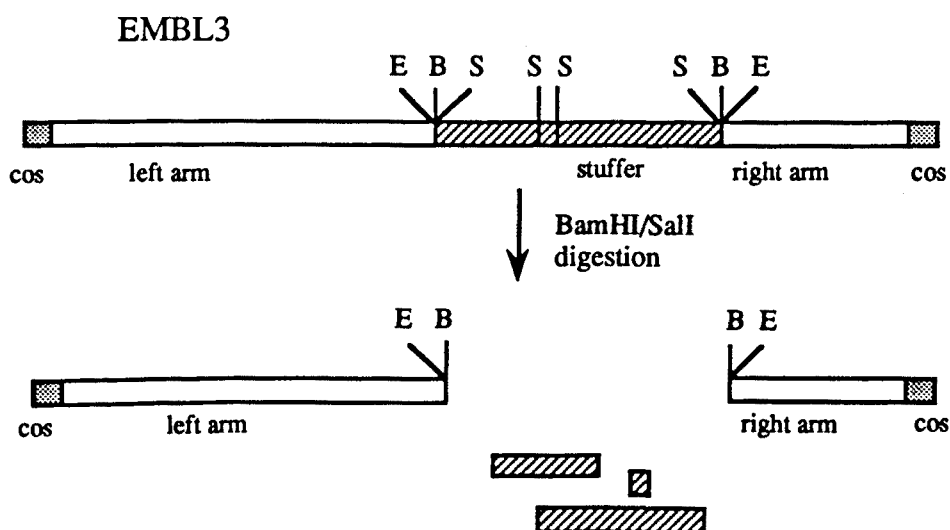


Fig.51.- Preparació del fag vector EMBL3 per al clonatge de fragments per substitució. E-*Eco*RI, B-*Bam*HI, S-*Sal*I.

L'obtenció dels dos braços del vector es pot fer :

- per separació amb gradient de sucrosa (Maniatis et al., 1982). Consisteix en la separació de les diferents molècules de DNA segons el seu pes molecular al llarg d'un gradient pre-creat de sucrosa.

- per separació mitjançant electroforesi en gel d'agarosa i obtenció per electroel·lució dins un tub de diàlisi (Maniatis et al., 1982). Una explicació breu del mètode es troba al punt 9.1.4. Un possible problema és la contaminació per agarosa i el gran volum obtingut, de forma que la concentració del DNA és petita. Aquests desavantatges es poden compensar fent passar el volum obtingut de l'electroel·lució per una columna de bescanvi iònic, tipus ELUTIP (Schleicher and Schüell).

En tots dos casos es convenient efectuar un anellament previ dels dos braços, que tenen extrems cohesius, i així, es pot separar una banda única de mida gran (23 kb + 9 kb), del fragment o fragments intermedis. L'anellament es realitza a 42°C amb 10 mM de MgCl₂ durant un mínim de 2 h.

3.3. Preparació de DNA genòmic insert

La mida d'insert més adient pel vector de substitució EMBL4 és entre 15 i 20 kb. A més, ens interessa obtenir una llibreria de fragments genòmics encavalcats, per tenir la seguretat de poder completar la regió genòmica que ens interessa analitzar. L'estratègia més indicada és obtenir una digestió parcial amb un enzim que reconegui una diana de 4 pb, que dóna una sèrie de fragments de mida variable, a l'atzar. L'enzim utilitzat per digerir parcialment el DNA de les espècies de *Drosophila* ha estat *MboI*, de diana compatible amb la que deixa l'enzim *BamHI* (de 6 pb) al lloc de clonatge múltiple del fag. S'ha de determinar experimentalment quina és la concentració d'enzim (normalment menys d'1 unitat per µg de DNA) i el temps per a una digestió parcial adequada, que és aquella que deixa el major nombre de fragments de restricció de mida compresa entre 15 kb i 20 kb.

La separació d'aquests fragments es pot fer de la mateixa manera que en el cas de l'obtenció dels braços del vector, és a dir:

- per separació amb gradient de sucrosa (Maniatis et al., 1982). Per l'explicació del principi del mètode consultar l'apartat 3.2.

- per separació mitjançant electroforesi en gel d'agarosa i obtenció per electroel·lució dins un tub de diàlisi (Maniatis et al., 1982). El principi del mètode es descriu a l'apartat 9.1.4. També en aquest cas es pot recórrer a una purificació i concentració del DNA mitjançant l'ELUTIP.

3.4. Lligació. Empaquetament *in vitro*

La ligasa i el tampó de lligació van ser subministrats per Boehringer Mannheim. La lligació es fa a 14°C, o bé mitjançant un gradient de temperatura de 0°C fins a temperatura ambient durant un mínim de 24 h. Cal remarcar que:

- La lligació s'ha de realitzar en poc volum, el mínim possible, millor i tot si és menys de 10 µl, i això implica una alta concentració de DNA del vector i de l'insert.

- A *Drosophila* una lligació de 0.4 µg de DNA total dóna suficient rendiment com per obtenir una llibreria de 10^6 fags. Per obtenir aquest rendiment és requisit indispensable que el DNA sigui molt pur.

- La quantificació de la concentració del DNA vector i insert ha de ser acurada perquè la relació vector/insert és un paràmetre essencial per a un bon rendiment. A més, encara que la relació teòrica òptima sigui la d'1 molècula de vector (els dos braços sumats) a 1 molècula d'insert, en la pràctica rarament és l'òptim, sinó que depèn de l'estat dels dos tipus de DNA. La millor opció es troba de forma empírica, fent unes quantes relacions i observant quin és el rendiment en una mini-lligació i en un mini-empaquetament.

- Les lligacions es van realitzar totes a 14°C (de 16 a 24 h) donat que segons les proves prèvies va resultar més eficaç.

Per a l'empaquetament, vam fer servir extractes comercials PACKAGENE (Promega, Biotec), seguint les intruccions del subministrador.

3.5. Titulació i plaquejament de la llibreria

La titulació ens permet calcular el nombre de fags per ml. Es van fer una sèrie d'infeccions amb dilucions progressives dels fags, p.ex: 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} i 10^{-6} . El recompte de clapes per dilució ens dóna un valor aproximat del títol de la llibreria. Si el nombre de fags és elevat, p. ex. a *Drosophila* es necessiten entre 5×10^4 i 3×10^5 fags, es procedeix a plaquejar la llibreria.

El plaquejament de la llibreria es pot fer en una sola placa quadrada de 21.5 x 21.5 cm (aproximadament 200,000 fags en cultiu confluent), o en plaques de Petri circulars de 15 cm de diàmetre, i en aquest cas se'n necessiten de 3 a 5 (uns 40,000 fags en cultiu confluent). Convé que les plaques no estiguin recent fetes i que estiguin equilibrades per evitar la formació d'aigües i que els fags s'escorrin per la superfície de l'agar. S'han d'evitar els grumolls a la solució de top-agarosa perquè dificultarien la transferència Benton i Davis (punt 8).

3.6. Amplificació de la llibreria

Quan la llibreria ja no es necessita més, perquè ja s'han aïllat els fags o perquè ja fa més de tres mesos que ha estat plaquejada, és convenient recollir-ne els fags, ja que es poden conservar més temps. L'amplificació es va fer seguint Maniatis et al.(1982). La llibreria amplificada es guarda a 4°C amb un volum de cloroform i protegida de la llum. El títol va baixant, de forma que en un any es perden aproximadament dos ordres de magnitud.

4. MARCATGE D'ÀCIDS NUCLEICS

L'estratègia seguida per marcar sondes d'àcids nucleics varia segons les seves característiques. En el nostre treball, només hem emprat dos tipus de sondes:

- fragments de DNA de cadena doble (obtinguts per restricció), i el seu marcatge ha estat bé per *nick-translation* (escissió ambulat), o bé per *random-hexamer priming* (encebadors de 6 nt a l'atzar). Els isòtops radioactius emprats han estat o bé α - ^{32}P -dATP, o bé α - ^{32}P -dCTP.

- oligonucleòtids 17-mer de DNA marcats en 5' mitjançant la polinucleòtid kinasa (PNK). L'isòtop radioactiu emprat en aquest cas ha estat γ - ^{32}P -dATP.

4.1. Marcatge per *nick-translation*

Aquest tipus de marcatge va ésser el primer utilitzat en aquest treball. Es basa en el mètode inicialment descrit per Rigby et al. (1977) que combina l'acció controlada de la DNasaI amb l'activitat polimeràsica de la DNAPolI (*E.coli*) emprant un precursor radioactiu. El protocol seguit es troba descrit àmpliament a Maniatis et al.(1982). Es marquen eficientment de 0.2 μg fins 2 μg de DNA, quantitat que sobrepassa en molt la quantitat necessària per a la majoria d'experiments. El marcatge de sondes de mida petita (de 100 a 400 pb) és poc eficient.

4.2. Marcatge per *random-hexamer priming*

Aquest tipus de marcatge presenta certs avantatges sobre l'anterior ja que marca eficientment des de 20 ng fins 0.5 µg de DNA. De fet, l'activitat específica obtinguda per a la sonda és considerablement superior respecte el mètode anterior, i això el fa particularment útil per a tots aquells experiments en que la quantitat d'àcid nucleic a detectar es troba en quantitats petites, cas d'alguns *Southern*s, *Northern*s, o bé quan es disposa de sondes heteròlogues de baixa homologia. També millora molt l'eficiència de marcatge de sondes de mida petita (de 100 a 400 pb). El mètode va ésser descrit per Feinberg and Vogelstein (1983) i es basa en la polimerització de DNA a partir d'un conjunt d'encebadors de 6nt combinats de forma aleatòria i amb nucleòtids marcats. S'han emprat les solucions i instruccions del kit subministrat per Boehringer Mannheim.

4.3. Marcatge amb polinucleòtid kinasa

El marcatge en l'extrem 5' dels oligonucleòtids s'ha efectuat seguint el protocol descrit per Maniatis et al. (1982). Es basa en la substitució o en la incorporació d'un fosfat radioactiu procedent de γ -³²P-dATP.

4.4. Separació de la sonda marcada dels nucleòtids radioactius no incorporats

Aquesta separació es pot efectuar de diferents maneres i si la incorporació és superior al 90%, molts autors consideren que aquest pas no és necessari. En d'altres casos es segueixen protocols alternatius per a la separació de radionucleòtids no incorporats per evitar al màxim la possible hibridació inespecífica (Ausubel et al., 1987).

4.4.1. Separació per cromatografia en Sephadex G-50

La cromatografia d'exclusió es pot dur a terme de dues formes. En una d'elles la filtració de la solució marcada es fa per centrifugació i en l'altre per gravetat. En ambdós casos, el principi de separació és el mateix, els nucleòtids no incorporats queden retardats dins la columna mentre que la sonda marcada, de mida molt més gran s'el·lueix més ràpidament.

- **El·lució per centrifugació.** La columna es prepara en una xeringa d'1 ml i després de carregar-hi la mostra, es centrifuga dins d'un tub on es recull la sonda marcada. La centrifugació ha d'ésser suau, i es pot dur a terme a 2000 rpm en una centrífuga clínica de sobretaula.

- **El·lució per gravetat.** Alternativament la mostra pot ser el·luida per gravetat, i en aquest cas, la columna pot ser una pipeta Pasteur. Es carreguen 200 µl de mostra i es

van afegint fraccions de 200 µl de tampó (TNE) mentre es recullen alíquotes de 200 µl. La sonda s'el·lueix en les primeres fraccions (3-6) i els nucleòtids no incorporats s'el·lueixen més tard (fraccions 8-10).

4.4.2. Separació per precipitació i centrifugació diferencials

El principi d'aquest mètode consisteix en el fet que, a determinades condicions de força iònica i temperatura, les molècules de DNA precipiten, mentre els nucleòtids no incorporats es mantenen en solució. La centrifugació varia lleugerament, segons es tracti de DNA de doble cadena de mida considerable o bé d'oligonucleòtids, de mida més propera a la dels nucleòtids no incorporats.

- **Precipitació diferencial de dsDNA** . Es sol fer amb l'ajut d'un àcid nucleic *carrier*, p.ex.: tRNA o DNA d'esperma de salmó, perquè s'arribi a la concentració crítica de precipitació. Les condicions de precipitació són:

10-15 mg de *carrier*
 0.4 vol NH₄AcO 10M
 3 vol Etanol

Les condicions de centrifugació i resuspensió són les habituals (Maniatis et al.,1982).

- **Precipitació diferencial d'oligonucleòtids marcats**..Es un procés complex i, en general, d'eficiència baixa. La mida crítica de l'oligonucleòtid es situa al voltant dels 15 i 17 nt de longitud. La precipitació s'ha de dur a terme en presència de *carrier* i amb 3 vol d'etanol en lloc dels 2 vol habituals. Les centrifugacions es poden allargar fins a 1h. El procés es sol repetir 3 cops. El sediment es desprèn fàcilment del fons del tub i cal anar amb molta cura per no perdre'l.

4.5. Eficiència del marcatge

Els mètodes emprats per a mesurar l'eficiència d'incorporació del marcatge difereixen lleugerament si la sonda és de dsDNA o oligonucleòtid.

4.5.1. Cerenkov.

S'aplica a sondes de dsDNA. Es un mètode senzill, dóna valors aproximats però fiables. Es basa en la mesura d'una alíquota de la solució on s'ha realitzat el marcatge abans i després de la separació de la sonda i els nucleòtids no incorporats. Es pot fer amb tantes alíquotes com calgui. Es mesura en un comptador β, en el canal del triti i

sense líquid d'escintil·lació. El valor de cpm del canal B obtingut es multiplica per 3 i es considera que és equivalent a les cpm de ^{32}P .

4.5.2. Líquid d'escintil·lació.

S'aplica tant a sondes de dsDNA com, en condicions particulars, a oligonucleòtids. Els valors obtinguts són, en principi, més acurats, però s'ha d'evitar l'esmoreïment o *quenching* que es produeix si la mostra no es troba perfectament seca. Per tant, la mostra es diposita sobre un suport sòlid i s'asseca per evaporació. La preparació del líquid de centelleig està descrit per Maniatis et al. (1982).

- **Sonda de dsDNA.** El suport sòlid és paper Whatman 3MM. S'hi diposita la mostra, es deixa assecar i ja es pot posar dins del vial amb líquid d'escintil·lació.

- **Oligonucleòtid marcat.** El suport sòlid és paper de nitrocel·lulosa DEAE (Schleicher and Schüell). S'agafen dues alíquotes de la mostra, una es mesura directament i l'altra, es neteja amb tampó LSB (tampó *Low Salt Buffer* del sistema ELUTIP, Schleicher and Schüell), que degut a la baixa força iònica, el·lueix els nucleòtids no incorporats. Es deixa assecar i es mesura. La diferència relativa ens dóna idea de l'eficiència d'incorporació. Si aquesta és superior al 90%, no cal procedir a la separació de l'oligonucleòtid marcat dels nucleòtids no incorporats, sempre i quan la hibridació i els rentats es facin en presència de 0.1% w/v de pirofosfat sòdic (NaPPi)

5. HIBRIDACIÓ D'ÀCIDS NUCLEICS

La determinació de les condicions d'hibridació i de rentat són empíriques, i depenen de molts factors: longitud, composició nucleotídica, estabilitat i homologia de la sonda. Una bona revisió es troba a Hames i Higgins, 1985. En la majoria dels casos es calcula la temperatura de fusió (T_m) de l'híbrid que es formarà i es treballa entre 5°C i 10°C per sota d'aquest valor. Les fórmules per calcular la T_m dels híbrids, així com una guia de condicions experimentals es troben a la majoria de manuals de laboratori (Maniatis et al., 1982; Sambrook et al., 1989; Ausubel et al., 1987). En el nostre treball hem emprat sondes de DNA de doble cadena, homòlogues o heteròlogues, i oligonucleòtids. En tots els casos, a la hibridació l'ha precedida una pre-hibridació de 3 h a 12 h, exactament en les mateixes condicions que la hibridació, però sense sonda marcada.

5.1. Condicions de les hibridacions

- **Sondes de dsDNA.** En cas de sondes heteròlogues, les condicions han estat les següents: 46% formamida a 42°C entre 16 h a 24 h en presència de 10% de dextransulfat

sòdic, aquest darrer reactiu no cal a no ser que es tracti de *Southern*s genòmics o llibreries. La concentració de sals i elements saturants (Denhardt's, esperma de salmó,...) s'ha fet segons s'especifica als manuals de laboratori. Si la sonda era homòloga la hibridació s'ha fet en les mateixes condicions però incrementant la presència de formamida al 50%.

- **Oligonucleòtids.** Es fan sempre sense formamida, i si no s'ha separat dels nucleòtids no incorporats, en presència del 0.1% w/v de pirofosfat sòdic (NaPPi). Les hibridacions s'han realitzat a 5°C per sota la T_m calculada. Les condicions es troben a Sambrook et al. (1989) i són més estabilitzants (concentració més elevada de SSC) i fortament saturants, per evitar les hibridacions inespecífiques.

5.2. Condicions dels rentats

- **Sondes de dsDNA.** En cas de sondes heteròlogues, la sonda hibridada de forma inespecífica s'extreu amb els següents rentats: un rentat amb 2xSSC/0.1%SDS a temperatura ambient durant 10 min, després dos rentats amb 2xSSC/0.1%SDS a 65°C de 10 min cadascun, i finalment dos rentats més amb 1xSSC/0.1%SDS a 65°C també de 10 min (1xSSC és 0.15M NaCl/0.015M citrat sòdic, pH 7.5). Si la sonda és homòloga es poden proseguir els rentats amb 0.5xSSC/0.1%SDS a 65°C o fins i tot amb 0.1xSSC/0.1%SDS a temperatura ambient.

- **Oligonucleòtids.** Les condicions són més suaus (perquè la sonda no és tan estable) i en presència de 0.05% de pirofosfat sòdic. Es fan dos o tres rentats amb 6xSSC/0.1%SDS a temperatura ambient durant 10 min. Per obtenir un grau d'astringència molt elevat, es pot anar aixecant la temperatura de rentat fins arribar a 5°C per sota la T_m .

5.3. Exposició

La temperatura òptima d'exposició és a -70°C donat que permet obtenir una bona impressió dels films d'autoradiografia. El temps d'exposició i la presència o no de pantalles depèn del tipus d'experiment i de la quantitat aproximada de marcatge que s'ha de detectar. De forma general, si la sonda està fortament marcada: en llibreries calen 24 h amb una pantalla, al re-crivellatge i mapes de restricció 24 h sense pantalla, als *Southern*s genòmics i *Northern*s, de 4 a 5 dies amb una pantalla o dues pantalles. Quan s'ha intentat detectar l'expressió del gen *Adh-dup* l'exposició s'ha allargat de 15 dies a 1 mes amb dues pantalles.

5.4. Re-hibridació de filtres

Per deshibridar la sonda i re-aprofitar tant els filtres de nitrocel·lulosa com els de nylon hem seguit les condicions recomanades per la marca subministradora (Amersham). Per terme mig, els filtres de nitrocel·lulosa no resisteixen més de dues hibridacions, i els de nylon perden molta resolució a partir de 6 a 8 hibridacions.

6. CRIVELLATGE DE LLIBRERIES GENÒMIQUES

6.1. Benton and Davis

Les solucions, les condicions i el mètode d'obtenció de rèpliques ha estat descrit (Benton and Davis, 1977) i es troba àmpliament detallat (Maniatis et al., 1982). Es basa en els següents passos: 1) adsorció del DNA sobre el filtre de nitrocel·lulosa; 2) desnaturalització del DNA; 3) neutralització del medi, i 4) fixació dels àcids nucleics sobre el filtre. Es recomana fer rèpliques per tal d'evitar falsos positius deguts a hibridacions inespecífiques. També es recomana fer servir tinta insoluble en aigua quan es marquen asimètricament els filtres sobre les plaques.

Després de la fixació es procedeix al marcatge de la sonda, i a la pre-hibridació i hibridació dels filtres (veure apartats 4 i 5). Després dels rentats i l'autoradiografia es procedeix a la identificació dels clons positius.

6.2. Aïllament de fags recombinants positius. Re-crivellatges.

Sobre el film revel·lat es marquen els senyals de tinta que serveixen de referència. Els senyals d'hibridació presents a les dues rèpliques es consideren clons positius. Si corresponen a fags aïllats es piquen amb un capil·lar estèril, si corresponen a fags confluents, es pica tota la zona. S'el·lueixen els fags i es procedeix a una nova infecció i re-crivellatge (transferència, hibridació,...) a efectes d'aïllar un fag o clon únic.

6.3. Mini-preparació de DNA de fags lambda

El principal problema per a l'aplicació dels protocols per a la mini-preparació de fags és el càlcul de la relació fags/cèl·lules adient per tal d'aconseguir una bona lisi i obtenir un DNA suficientment purificat. S'han seguit dos protocols diferents, un d'ells es basa en una cromatografia de bescanvi iònic i l'altre en una precipitació diferencial de la càpside mitjançant acetat potàsic. El primer protocol permet obtenir un DNA pur amb baix rendiment, mentre el segon permet obtenir més quantitat de DNA però aquest sovint és més difícil de digerir.

6.3.1. Mini-preparació de fags mitjançant bescanvi iònic

Hem seguit el protocol descrit per Helms et al. (1985). Es basa en la purificació dels fags passant la mostra per columnes que contenen resines amb càrregues iòniques.

6.3.2. Mini-preparació de fags mitjançant precipitació diferencial

El mètode utilitzat és una adaptació d'altres protocols ja descrits.

Protocol

1.- Es procedeix a la infecció amb:

100 µl de cèls. K802 (recent crescudes amb maltosa 0.2%)

100 µl de CaCl₂, MgCl₂ 10mM cadascun

100 µl de fags el·luïts a partir d'una placa única

Es deixa entre 10' i 20' a 37°C sense agitació i després s'inocula a 4 ml de LB, deixant-ho tota una nit amb agitació forta a 37°C.

2.- Si la lisi és bona (s'observen floculs dins d'un cultiu clarós), aquesta s'accelera afegint 30 µl de cloroform i deixant-ho en agitació 15 min més.

3.- Es reparteix el volum en 3 tubs eppendorf i es centrifuga 5 min a 4°C.

4.- Es canvia el sobrenedant del tub eppendorf (1 ml/tub) i s'afegeix RNasa A i DNasa I a una concentració final per cadascuna de 10 µg/ml. Es deixa de 30 min a 1h a 37°C.

5.- S'afegeix a cada tub 200 µl d'una solució fresca de LPB (Lysis Phage Buffer):

0.5 M Tris-HCl pH 8.0

0.25 M EDTA pH 8.0

2.5% SDS

S'hi afegeixen també 12.5 µl de Proteinasa K. Es deixa 30 min a 65°C.

6.- S'hi afegeixen 250 µl de 8 M KAcO fred i es deixa un mínim de 10 min en gel.

7.- Centrifugació 30 min a 4°C (El sediment que es forma és la proteïna del fag lisat).

8.- S'agafa el sobrenedant, sense apurar, i es posa 1 ml dins d'un tub eppendorf nou. S'hi afegeix 0.6 ml d'isopropanol. Es deixa 15 min a temperatura ambient.

9.- Es centrifuga 30 min. Es renta amb etanol de 70%, i s'asseca el sediment a la bomba de buit. Es resuspen amb 80 µl de TEx1, deixant-ho 10 min a 65°C. Després s'ajunten tots els volums del mateix fag. Volum final de 400 µl aproximadament .

10.- Extraccions fenòliques.

11.- Precipitació amb:

0.1 vol NaAcO 3M pH5.2

2 vol etanol

Es deixa a -70°C uns 45 min o bé tota la nit a -20°C.

- 12.- Es centrifuga 30 min. Es renta amb etanol al 70% i s'asseca el sediment a la bomba de buit. Es resuspèn amb 25 µl de TEx1, deixant-ho 10 min a 65°C. Es pot determinar la concentració i l'estat del DNA en un gel d'agarosa.

7. RESTRICCIÓ

Les digestions amb enzims de restricció s'han efectuat seguint el protocol bàsic descrit a tots els manuals de laboratori. Les restriccions de fags s'han fet amb 300-400 ng de DNA, amb un volum final de 20 µl i les de plasmidis amb 150-250 ng amb 10 µl de volum final. El subministrador d'enzims de restricció ha estat principalment Boehringer Mannheim.

7.1. Enzims emprats

Per a les digestions parcials de DNA genòmic utilitzat en la construcció de llibreries genòmiques s'ha emprat *MboI* (diana de 4 pb, compatible amb l'enzim de diana de 6pb, *BamHI*).

Quan es tractava d'alliberar un insert del vector, o d'efectuar una anàlisi de restricció del DNA insert, s'han emprat enzims de restricció que reconeixen dianes de 6pb, en concret:

- *EcoRI*, *BamHI*, *HindIII*, *PvuII*, *PstI*, *Sall* i *XbaI*. Tots ells, són enzims que presenten dianes tant en el lloc de clonatge múltiple del plasmidi pUC18 com dels fagsmidis BLUESCRIPT, els vectors de subclonatge que han estat utilitzats.

7.2. Digestions parcials i digestions complertes de DNA genòmic

L'estat de les digestions parcials o complertes del DNA genòmic s'han de controlar molt bé, doncs, habitualment són digestions amb gran quantitat de mostra. En el cas de les digestions parcials, es fan una sèrie de proves amb diferents relacions DNA/enzim i a diferents temps, ja que aquests paràmetres varien segons la mostra i les condicions d'extracció. Es fa una separació electroforètica del DNA sobre gel d'agarosa. Una digestió parcial correcta és aquella en què la llapisada o *smear* de DNA digerit no és gaire extensa, i on no queda gaire DNA genòmic intacte, sinó que la màxima representació de DNA es troba a mides intermèdies (entre 40 i 10 kb). Una vegada fixades les condicions, es fa una digestió a l'engrós amb una quantitat elevada de DNA genòmic, p. ex. a partir de 50 µg.

En el cas de les digestions complertes, el DNA ha d'estar totalment digerit i la llapisada s'ha d'extendre al llarg de tot el gel d'agarosa, arribant fins a mides petites (prop de 0.5 kb). La presència de DNA repetit es manifesta per bandes de DNA més intenses

que sobresurten sobre el fons homogeni. Per a un DNA net, la relació 5 unitats d'enzim per μg de DNA durant 4 h de tractament sol donar bons resultats.

7.3. Digestions per a una anàlisi de restricció

Habitualment, les digestions de DNA procedent de fags necessiten dos vegades més temps de digestió que el DNA de plasmidis o fagsmidis. En el darrer cas s'ha aplicat 1h 30 min per digestions senzilles o dobles utilitzant el mateix tampó i 3 h si es tractava de diferents tampons per a una digestió doble, mantenint la relació de 5 unitats d'enzim per μg de DNA. En canvi, en el cas de DNA de fags, la relació enzim/DNA s'ha d'incrementar a 10 u/ μg amb 3-4 h de digestió. A menys que no es tracti d'una digestió preparativa, es carrega tot el volum de la digestió en el pou. El volum final de digestió habitual és de 10 μl a 20 μl .

7.4. Digestions preparatives

Quan es coneix la restricció d'un DNA i la mida del fragment que interessa es pot dur a terme una digestió preparativa en les condicions ja establertes de relació DNA/enzim i temps de digestió.

7.5. Anàlisi de restricció

Una vegada efectuada la restricció, es procedeix a una electroforesi (punt 8) i s'elabora el mapa de restricció per comparació dels fragments obtinguts en les digestions senzilles i doble. La localització d'un fragment d'ADN concret en el mapa de restricció s'ha realitzat mitjançant sondes homòlogues i sondes diferencials de les regions 5' i 3'.

7.6. Transferència *Southern*

Inicialment descrita per Southern (1975), aquesta transferència es troba ben detallada a tots els llibres de protocols (Maniatis et al., 1982). Variacions sobre el protocol estàndard són la despurinització per tractament amb HCl 0.25 M, i la transferència semi-seca, que comença amb solució d'elevada força iònica i acaba amb el propi tampó del gel com a suport d'aquesta transferència.

8. ELECTROFORESI D'ÀCIDS NUCLEICS

8.1. Electroforesi en gels d'agarosa

S'han seguit les recomanacions dels protocols ressenyats als manuals de laboratori (Maniatis et al., 1982, Sambrook et al., 1989), com p.ex: la variació de la concentració d'agarosa segons la mida del DNA o RNA que ens interessa separar, el voltatge i temps de correguda, etc.

8.1.2. Electroforesi de DNA. El tampó utilitzat per a totes les electroforesis ha estat TBE x 1. Com a norma general, en les digestions de DNA genòmic es carreguen de 4 µg a 10 µg de DNA i la separació electroforètica es deixa durant tota la nit. Si els DNA procedeixen de fags o plasmidis es carreguen entre 150 ng i 400 ng i la separació electroforètica dura de 2 h a 3 h.

8.1.3. Electroforesi de RNA. S'han efectuat en gels desnaturalitzants d'agarosa/formaldehid seguint la tècnica descrita a Collet (1990). S'han carregat entre 4 µg i 10 µg per pou si es tractava de RNA total i entre 100 ng i 2 µg si es tractava de la fracció poli A⁺. S'han emprat com a marcadors de pes molecular RNA ribosomal de procariotes 16S i 23S(*E.coli*) i d'eucariotes 18S i 26S(blat de moro o reticulòcit).

8.2. Electroforesi en gels de poliacrilamida

S'han seguit les condicions i protocols que es troben al llibre explicatiu de la casa subministradora (BRL) de l'aparell d'electroforesi per a la seqüenciació d'àcids nucleics, fixant la potència a 60 W. Per a una bona resolució de les bandes s'ha de mirar d'ajustar molt bé el gel, ja que es poden produir pèrdues de pou a pou. Els dos vidres suport han estat tractats de diferent manera, ja que en un d'ells s'hi adhereix el gel de poliacrilamida, de forma que tot el procés de fixació, assecat i autorradiografia del gel s'efectua sobre el vidre:

8.2.1. Tractament dels vidres

Protocol per al tractament del vidre amb orelles (amb repel·lent)

- 1.- Es netegen els vidres bé amb aigua i sabó. S'esbandeixen finalment amb aigua destil·lada i s'assequen.
- 2.- Es netegen amb acetona, i es deixen assecar.
- 3.- S'hi extenen uns 3 ml de repel·lent REPEL-SILANE de Pharmacia-LKB i es deixa assecar.
- 4.- Es torna a netejar amb acetona, i es deixa assecar.

NOTA: El tractament amb repel·lent serveix per 3-4 gels.

Protocol per al tractament del vidre gran (amb adherent)

- 1.- Es netegen els vidres bé amb aigua i sabó. S'esbandeixen finalment amb aigua destil·lada i s'assequen.
- 2.- Es netegen amb etanol i es deixen assecar.
- 3.- Es prepara una solució:

5 ml d'etanol

15 ml d'àcid acètic

15 µl de Silane-A-174 (Pharmacia-LKB)

Es reparteix bé per tot el vidre.

4- Es torna a netejar el vidre amb etanol.

NOTES: a) Massa adherent té un efecte invers, és a dir, actúa com a repel·lent.

b) Una vegada autorradiografiat el gel, es desfà l'adherència de la poliacrilamida al vidre mitjançant un tractament amb una solució 0.2 M de NaOH.

8.2.2. Tipus de gels.

- **Gels standard:** 8% d'acrilamida:bis (19:1) i 8M urea. Gruix del gel 0.4 mm.

- **Gels en gradient:** 6% d'acrilamida:bis (19:1) i 7M urea. Es tracta de gels de gruix variable construïts amb uns separadors especials de 0.2 mm (zona superior) a 1.2 mm (zona inferior).

- **Gels de separació d'oligonucleòtids:** 20% d'acrilamida:bis (19:1) i 8M urea. Gruix del gel 0.7 mm. S'han utilitzat suports de gels tipus Mini-Protean (Bio-Rad). L'avantatge d'aquest suport és que els gels són molt més petits, corren molt més ràpids i la resolució és igualment bona.

8.2.3. Marcadors de pes molecular. Per a les electroforesis de seqüenciació d'àcids nucleics, s'han emprat com a referència els dos colorants (xylene-cyanol i bromophenol-blue) que porten les solucions mostra. En el cas de la purificació d'oligonucleòtids s'ha emprat també com a referència l'encebador universal 17-mer de M13.

9. PURIFICACIÓ DE DNA A PARTIR DE GELS D'AGAROSA O D'ACRILAMIDA

9.1. Purificació de DNA a partir d'una separació electroforètica en gels d'agarosa.

Un cop identificat el fragment de restricció necessari del fag o del plasmidi es va procedir a una digestió i electroforesi preparatives (apartats 7.4 i 8.1.2). S'han provat diferents protocols per a la purificació i obtenció d'un fragment de DNA a partir d'un gel d'agarosa.

9.1.1. Agarosa de baix punt de fusió. Es fa servir una agarosa diferent de la estàndard, ja que és de baix punt de fusió (65°C). El mètode es troba descrit a Maniatis et

al. (1982) i es basa en retallar la banda del gel i fer-la fondre en un bany a 65°C. El seu principal inconvenient és que una vegada fosa l'agarosa s'ha d'eliminar amb extraccions fènoliques, sense deixar que la temperatura baixi dels 65°C, ja que llavors l'agarosa gelifica i dificulta l'extracció del DNA. Tampoc s'ha de deixar que la temperatura pugi per sobre dels 65°C, ja que el DNA es podria malmetre.

9.1.2. Electroel·lució. També es retalla la banda (Maniatis et al., 1982), però aquest cop s'introdueix en un tub de diàlisi que conté un cert volum de tampó d'electroforesi, deixant passar la corrent a fi i efecte que el DNA surti del gel i quedi en el volum de tampó dins del tub de diàlisi. El principal inconvenient d'aquest sistema és l'increment considerable de volum i la dilució del DNA, que no precipitarà de forma eficient, i per altra part, que el DNA no sol quedar lliure al tampó, sinó que queda adherit a la pared del tub de diàlisi, i s'ha de separar d'allí sense que torni a entrar dins del gel. Es pot recórrer a un ELUTIP (Schleicher and Schuell) per concentrar el volum o purificar d'agarosa.

9.1.3. DEAE-80 (Schleicher and Schuell). Aquest mètode es basa en el lligament inespecífic del DNA a una nitrocel·lulosa carregada positivament. Després s'allibera el DNA amb un tampó ric en sals. Es un mètode relativament eficient per DNA de mida entre 300 pb i 1 kb, però no amb mides petites (que no pot retenir per haver-hi poques càrregues en la interacció) ni mides grans (on hi ha tantes càrregues, que no es pot el·luir del paper). El protocol és el següent:

Protocol

- 1.- Es retalla un quadradet del paper DEAE-80 de forma que sigui lleugerament més alt i més ample que el pou on s'ha carregat la mostra de DNA. Es mulla amb tampó d'electroforesi.
- 2.- Es retalla el gel per sota la banda que volem obtenir, sense tallar els costats del gel. Es clava en aquesta incisió el paper DEAE, de forma que queda retingut en el gel.
- 3.- Es deixa proseguir l'electroforesi a 80V durant 5'. La direcció del corrent ha de ser tal i que el DNA surti del gel i quedi retingut al paper.
- 4.- Es visualitza amb un transil·luminador que el DNA es troba en el paper. Aquest i es retalla acuradament en fragments petits per facilitar l'extracció. Es posen els trocets en un tub eppendorf i es neteja amb TE x 1. Es deixa el paper sol.
- 5.- L'el·lució es fa amb :
 - 100 µl de TE x1
 - 50 µl de NaCl 5M
 Es deixa 15 min a 65°C. Es recull el líquid i es passa a un tub eppendorf nou.
- 6.- Es torna a repetir l'el·lució (pas 5). Tenim al final 300 µl.

- 7.- Extraccions fenòliques.
- 8.- Es precipita amb:
 - 5 µl de tRNA (1 µg/µl)
 - 10 µl de NaCl 5M
 - 2 vol d'etanol fred.

Es deixa 45 min a -70°C o tota la nit a -20°C.
- 8.- Centrifugació en una microfuga 30 min. Rentat amb etanol de 70% i assecat.
- 9.- Resuspensió amb 10 µl a 15 µl de TE x 1. Es deixa 10 min a 65°C i ja es pot guardar o assajar la concentració.

9.1.4. Mètode del nitrogen líquid/clorur de liti. Es el més eficient dels emprats i permet obtenir DNA de totes les mides des de 100 pb a 15 kb, amb una eficiència elevada. Es basa en trencar la matriu d'agarosa per congelació i una precipitació diferencial amb clorur de liti.

Protocol

- 1.- Es retalla la banda que es vol, i es posa dins d'un tub eppendorf de 0.5 ml, que ha estat foradat pel fons i omplert amb una petita quantitat de llana de vidre estèril.
- 2.- Es submergeix el tub 5 min en nitrogen líquid.
- 3.- Centrifugació 5 min dins d'un eppendorf de 1.5 ml que fa d'adaptador i recollidor. Ens quedem amb el volum que es recull en el tub de 1.5 ml.
- 4.- S'hi afegeix
 - 0.5 vol de LiCl 8M
 - 3 vol d'etanol fred (-20°C)
- 5.- Precipitació, centrifugació i resuspensió com és habitual. Volum final de 10 µl a 20 µl.

9.2. Purificació d'oligonucleòtids en gels de poliacrilamida.

Deinent del procés de síntesi i de la casa subministradora aquest pas és obvia. De totes maneres, sempre que sospiti una possible contaminació d'oligonucleòtids truncats, aquest pas és imprescindible si l'oligonucleòtid es fa servir com a sonda o com a encebador sobre DNA genòmic o RNA. Hi ha molts protocols, el que hem fet servir està adaptat al pas per un ELUTIP, que ens purifica l'oligonucleòtid de possible acrilamida contaminant i a més, ens concentra el volum.

Protocol

- 1.- Una vegada corregut el gel, es visualitzen les bandes amb una pantalla de TLC i un transil·luminador de mà, fent un ombrejat.
- 2.- Es retalla acuradament la banda (el trocejament és opcional) i es posa en un FALCON de 15 ml (o similar) amb 6 ml de solució d'el·lució:
 - 20 mM NaCl
 - 20 mM Tris-HCl pH 7.5
 - 1mM EDTA pH 8.0
 Agitació orbital a 37°C tota una nit.
- 3.- Es prepara un ELUTIP (Schleicher and Schuell) amb pre-filtre. Es segueixen les intruccions del fabricant quant a la preparació de la columna, pas de la mostra i el·lució.
- 4.- S'afegeix $MgCl_2$ fins 10 mM final, i 2 vol d'etanol fred. Es deixa 1h a -70°C.
- 5.- Centrifugació 1 h a una microfuga a 4°C.
- 6.- Rentat amb etanol absolut fred. Centrifugació de 10 min.
- 7.- Assecat i resuspensió del sediment en un volum petit, calculat. Es considera una recuperació bona a partir del 50% de la quantitat d'oligonucleòtid inicial.

10. CLONATGE DE DNA EN L'HOSTE *Escherichia coli*

Per al clonatge de fragments de DNA per a anàlisi de restricció hem emprat el plasmidi pUC18 (Yanisch-Perron et al., 1985) i per seqüenciar, el fagsmidi BLUESCRIPT (Stratagene).

- pUC18. És un derivat de pBR322, que conté el gen *lacZ* del fag M13 amb un lloc de clonatge múltiple intern al gen. Permet la detecció de transformants perquè conté el gen de resistència a l'ampicil·lina, i la detecció de recombinants, pel sistema IPTG/X-GAL. Té una mida de 2.7 kb i és un vector òptim per al clonatge i amplificació ja que produeix un alt nombre de còpies. No l'hem emprat per seqüenciar en doble cadena, ja que tots els clonatges s'han realitzat per la diana EcoRI, que està allunyada 50 pb de l'encebador universal de M13, i no es disposava d'encebadors més propers.

- BLUESCRIPT. Fagsmidi derivat del fag M13 (IG) (Stratagene TM), la seva forma replicativa és un plasmidi de DNA bicatenari (3kb) però que quan es co-infecta amb un fag M13 (IG) és capaç de produir DNA monocatenari i empaquetar-se com si fós DNA d'un fag. En principi es tracta d'un sistema de 4 vectors, amb totes les combinacions possibles de dues direccions d'un lloc de clonatge múltiple i d'obtenció de les dues cadenes senzilles. Per a la seqüenciació de DNA bicatenari i disposant d'un nombre adient d'encebadors interns, n'hi ha prou amb un sol tipus de vector. Nosaltres hem fet

servir el +SK. La detecció de transformants és possible per resistència a l'ampicil·lina, i la detecció de recombinants, pel sistema IPTG/X-GAL. No és un vector d'amplificació òptim però és molt versàtil, permetent des de la seqüenciació amb cadena bi- o monocatenària, a la construcció de deleccions unidireccionals, o fins la transcripció del DNA insertat.

10.1. Preparació del vector i lligació.

El vector es digereix amb els enzims de restricció amb què també s'ha digerit el fragment de DNA que es vol clonar. Si aquest és únic, per evitar que el vector es relligui (amb una eficiència molt més elevada que la de lligació a l'insert), és convenient desfosforilar el vector amb un tractament amb fosfatasa alcalina (Maniatis et al., 1982). En aquest cas, la relació vector/insert ha de ser superior a 1.

En cas de clonatge d'un fragment de DNA procedent d'una doble digestió, la possibilitat de recomposició del vector es redueix moltíssim i no és necessària la desfosforilació.

En cas que el fragment de DNA no provingui d'una restricció (p.ex. després d'obtenir deleccions direccionals) és convenient realitzar una reacció d'ompliment dels extrems o *fill-in* de l'insert amb la DNAPol de Klenow i desoxinucleòtids (Maniatis et al., 1982). En aquest cas, el vector és digereix amb un enzim que deixi els extrems roms (habitualment *SmaI*). La lligació d'extrems roms no és tant eficient com la d'extrems cohesius, i a més, també hi ha la possibilitat de relligament del vector, que es pot evitar amb una desfosforilació. Per això, és convenient fer una lligació amb més quantitat de DNA i durant més temps.

- Lligació. La ligasa i el tampó de lligació van ésser subministrats per Boehringer Mannheim. La lligació es va fer a 14°C, un mínim de 12 h i habitualment en un volum de 10 µl.

10.2. Transformació de bacteris competents

Els protocols de transformació es basen en un *shock* tèrmic a 42°C de cèl·lules bacterianes competents (Maniatis et al., 1982). S'han fet servir els dos protocols clàssics: el de la competència amb CaCl₂ i el de la competència amb RbCl₂. Els resultats són comparables, tot i que potser les cèl·lules preparades amb CaCl₂, en ser fresques, semblen comportar-se més eficientment. La conveniència de tenir les cèl·lules congelades quan es preparen amb RbCl₂ compensen el fet d'emprar aquest últim protocol.

10.3. Detecció de les colònies transformades amb plasmidi recombinant.

Donat que els plasmidis utilitzats com vector de clonatge posseeixen el gen de resistència a l'ampicil·lina i el lloc de clonatge múltiple dins del gen *lacZ*, els bacteris transformats es detecten sobre plaques de Petri amb medi suplementat amb l'antibiòtic, i les cèl·lules amb plasmidi recombinant pel mètode de selecció d'IPTG/X-GAL.

10.4. Mini-preparació de DNA plasmídic.

El protocol emprat, inicialment descrit per Meyerowicz, es basa en una lisi suau del bacteri, i una protecció contra la degradació dels àcids nucleics per la presència de DEPC (dietilpirocarbonat, agent fortament inhibidor de totes les nucleases). El rendiment és bó, variant entre 4 i 12 mg de DNA plasmídic, que equival a una concentració de DNA de 80 ng/ml a 250 ng/ml. El DNA obtingut és suficientment pur, tant per a realitzar una anàlisi de restricció com per a seqüenciar molècules bicatenaries.

Protocol

- 1.- S'inocula un tub de 3 ml de LB estèril suplementat amb l'antibiòtic, amb la colònia o *stock* bacterià que es desitja amplificar. Es deixa en agitació a 250 rpm, a 37°C tota una nit (de 14 a 20 h).
- 2.- Es centrifuga 1.5 ml del cultiu en un tub eppendorf 2 min a 4°C.
- 3.- Es descarta el sobrenedant i es resuspèn el sediment per agitació en un VORTEX.
- 4.- S'hi afegeix 250 µl d'una solució fresca de 2mg/ml de lizozima en solució A.

Solució A:

50mM Tris-HCl pH 8.0

50mM EDTA pH 8.0

15% sucrosa

Es deixa 10 min a temperatura ambient.

- 5.- S'hi afegeix 250 µl de solució B.

Solució B:

50mM Tris-HCl pH 8.0

50mM EDTA pH 8.0

0.1% Tritó X-100

- 6.- S'hi afegeix 2 µl de DEPC (25% de dietilpirocarbonat en etanol). Es barreja tot per inversió.
- 7.- Es deixa en un bany a 70°C durant 20 min.
- 8.- Es deixa en gel un mínim 30 min.
- 9.- Centrifugació 15 min a 4°C.
- 10.- Es treu el precipitat (que té consistència mucosa) amb un escuradents estèril i ens quedem amb el sobrenedant, del qual es mesura el volum.
- 11.- Precipitem el DNA amb 2 vol d'etanol a temperatura ambient.
- 12.- Centrifugació, rentat i resuspensió com és habitual. Volum final de 50 µl de TE x 1.

NOTES: a) Es pot assajar la presència de plasmidi i si aquest és recombinant o salvatge. Es carreguen 10 µl de solució en un gel, després de treure el DNA bacterià (sediment mucós, pas 10). Així se sap si s'ha de continuar el procés i amb quines mostres.

b) El RNA no s'ha eliminat de la mostra. Es pot afegir RNasa A en el moment de la resuspensió, o bé abans de carregar les mostres en el gel, Si aquest DNA es destina a la seqüenciació, s'ha de fer un tractament exhaustiu amb RNasa A.

10.5. Preparació a l'engròs de DNA plasmídic.

S'ha seguit un protocol descrit per Boffey (1984). El rendiment varia: en el cas de pUC18 s'ha obtingut des de 250 mg a 500 mg, en canvi, amb BLUESCRIPT els rendiments han estat més baixos, de 50 mg a 200 mg.

11.- SEQÜENCIACIÓ DE DNA PEL MÈTODE DIDEOXI DE SANGER

11.1. Seqüenciació en cadena senzilla

El mètode es basa en el descrit per Sanger et al. (1977), amb modificacions: el precursor nucleotídic radioactiu va ésser α -³⁵S-dATP (NEN-Dupont o Amersham), l'enzim utilitzat ha estat la polimerasa modificada del fag T7 (Sequenase, USB; Pharmacia-LKB).

11.1.1. Obtenció de cadena senzilla a partir del fagsmidi BLUESCRIPT.

Els fagsmidis BLUESCRIPT són marca registrada de la casa STRATAGENE. El producte va acompanyat d'un manual de protocols i especificacions sobre les característiques, possibilitats i utilitzacions d'aquest sistema de plasmidis derivats del fag M13. S'han seguit les instruccions recomanades per obtenir DNA de cadena senzilla a partir d'un BLUESCRIPT recombinant. Una co-infecció amb una soca de fags defectius (VCSM13 i R409) permet al fagsmidi produir cadenes senzilles, que són empaquetades i alliberades al medi. Aquests fags es poden recuperar del líquid del cultiu. Per seqüenciar les dues cadenes d'un determinat DNA s'efectua un doble clonatge en BLUESCRIPTS que tenen el lloc de clonatge múltiple en orientació invertida. La quantificació de DNA de cadena senzilla s'ha realitzat en gels d'agarosa no desnaturalitzants per comparació amb un estàndard de ssDNA de concentració coneguda, com p. ex. el DNA del fag defectiu, el qual s'obté en gran quantitat i es pot quantificar acuradament. Habitualment el protocol proporcionat per la casa STRATAGENE permet l'obtenció de cadena senzilla en quantitat suficient, però si el rendiment no és bo, pot millorar-se incrementant:

- la quantitat de fags defectius utilitzats en la infecció,
- fins 1/3 més de volum de solució de precipitació de fags (composta d'acetat amònic i polietilenglicol) i fins 1 h el temps d'actuació d'aquesta solució,

- la força centrífuga i el temps de centrifugació en la precipitació dels fags (p. ex. 30 min a 15000 rpm).

11.1.2. Reacció de seqüenciació

Les reaccions de seqüenciació s'han realitzat seguint les instruccions de Sequenase-USB o Pharmacia-LKB. Cal assenyalar que el volum final obtingut a partir dels dos protocols és diferent: 10 µl per Sequenase i 20 µl per Pharmacia, i això és important a l'hora de calcular el volum de càrrega en el gel. La quantitat mínima de DNA necessària per a una bona seqüència amb ³⁵S com precursor radioactiu és de 1 µg a 2 µg per inserts entre 200 pb a 1 kb, i per una quantitat d'encebador equivalent a 5 ng (ó 0.5 pmol). Si l'insert és més gran s'ha de fer la correcció corresponent per tal que es mantingui la relació molar encebador/DNA d' 1/1 aproximadament.

11.2. Seqüenciació de DNA bicatenari

La major part de seqüències s'han realitzat sobre DNA bicatenari, éssent el millor motllo, el DNA plasmídic: fagsmidis BLUESCRIPT i, en casos excepcionals, pUC18. A més, el mateix DNA obtingut en una mini-preparació de plasmidi és suficient per servir com a motllo per a la reacció polimeràsica.

S'ha de preveure el següent:

- a) La reacció de seqüència s'ha de realitzar en un DNA molt net de RNA,
- b) el DNA bicatenari s'ha de desnaturalitzar per tal que pugui servir de motllo per a la reacció de polimerització i
- c) donat que les dues cadenes complementàries de DNA es troben en el mateix medi, hi ha un tant per cent de motllo que es perd per recomposició de la doble cadena, per tant s'ha d'incrementar la relació encebador/DNA a 5/1 o a vegades fins 50/1. Això implica per a una reacció completa una quantitat d'encebador entre 30ng-50ng i una quantitat de DNA motllo de 4 µg a 8 µg.

11.2.1. Preparació dels plasmidis

El tractament previ dels plasmidis a la seqüenciació és el següent, partint dels 50 µl obtinguts d'una mini-preparació:

Protocol

- 1.- S'incrementa el volum a 100 µl final amb aigua estèril.
- 2.- Es digereix amb RNasa A (100 ng/µl final) durant 15 min a 37°C.
- 3.- Extraccions fenòliques.

- 4.- Precipitació amb:
 - 0.1 vol NaAcO 3M pH5.2
 - 2 vol etanol fred (-20°C)
 Es deixa a -70°C uns 45 min o bé tota una nit a -20°C.
- 5.- Centrifugació 30 min. Rentat amb etanol de 70%, i assecat del sediment a la bomba de buit. Es resuspèn amb 10 µl de:
 - 0.4 M NaOH
 - 2 mM EDTA pH 8.0
 Agitació opcional amb VORTEX.
- 6.- Precipitació amb:
 - 5 µl NaAcO 1M pH 4.5
 - 40 µl etanol fred (-20°C)
 Es deixa a -70°C uns 45 min o bé tota una nit a -20°C.
- 7.- Centrifugació 30' en una microfuga. Rentat amb etanol de 70%, i assecat del sediment a la bomba de buit. Es resuspèn directament amb la solució d'anellament (veure punt 11.2.2.).

11.2.2. Reacció de seqüenciació

Hem disminuït els volums de reacció de seqüenciació a la meitat respecte les instruccions subministrades per Pharmacia-LKB. S'han mantingut les proporcions, per tal d'estalviar encebador, enzim i precursor radioactiu. L'únic desavantatge és la reducció dels volums, especialment els d'enzim i precursor (0.25 ml), però es pot minimitzar fent una barreja general per a tots els tubs. El següent protocol és la continuació del punt 7 del protocol 11.2.1.:

Protocol

- 1.- Resuspensió en la solució d'anellament:
 - 1 µl de l'encebador escollit (a 30 ng/µl-50 ng/µl).
 - 1 µl del tampó de reacció.
 - 5 µl d'aigua estèril.
 Sol costar de resuspendre ja que hi ha uns 8 µg de DNA. S'agita en un VORTEX i es deixa 10 min a 65°C per ajudar a resuspendre.
- 2.- Es deixa a 37°C durant 20 min per anellar el motllo amb l'encebador. Després es pot deixar a temperatura ambient fins que es faci la reacció de seqüència.
- 3.- Es realitza una barreja general que es repartirà per als 12 tubs de reacció:
 - x µl de T7 polimerasa (1.5 u de T7 pol/tub).
 - (12-x) µl de Tampó de dilució de l'enzim
 - 12 µl de Solució de dNTPs
 - 3 µl d' α -³⁵S-dATP

9 µl d'aigua estèril

Es reparteix 3 µl a cada tub on s'ha efectuat l'anellament (volum final 10 µl).

- 4.- Es deixa 1 min a temperatura ambient, perquè tingui lloc el marcatge de les cadenes per incorporació del precursor radioactiu. La reacció s'atura a 4°C o en gel.
- 5.- Es reparteix 2.2 µl a quatre tubs on hi ha 1.25 µl del corresponent dideoxinucleòtid.
- 6.- Es deixa 15 min a 37°C.
- 7.- S'hi afegeix 2.5 µl de tampó d'atur. Després d'aquest pas es pot congelar a -70°C, o bé, directament.
- 8.- S'escalfen les mostres entre 3 min i 5 min a 90°C per a desnaturalitzar-les abans de la càrrega, que és de 3 µl a 5 µl en un gel de seqüenciació.

11.3. Progressió de les seqüències

Per tal de llegir un fragment de seqüència més llarg en una sola reacció, es poden seguir les estratègies següents (apart de la síntesi d'oligonucleòtids que cobreixin les seqüències llegides):

- **dobles càrregues.** Es tracta de correr l'electroforesi el doble de temps. Per això, es carrega una primera part de la reacció al començament de la correguda (càrrega llarga) i una segona part a la meitat (càrrega curta). A vegades els kits de seqüència porten dos barreges de dideoxis de proporcions diferents, una proporció per fer lectures curtes i una altra per fer lectures llargues, però s'han de fer dues reaccions de seqüència diferents sobre el mateix clon.

- **gels en gradient.** Consisteix en fer gels de poliacrilamida en gradient de gruix. És un mètode eficient si es tracta de llegir entre 50 i 100 nt addicionals, donat que es produeix una compressió en la part baixa del gel, on la diferència relativa de pes molecular entre les diferents cadenes terminades és més significativa. La millora és substancial, i per tant, aquest mètode és molt recomanable. La casa BRL subministra els separadors en gradient de 0.2 mm a 1.2 mm.

11.4. Delecions direccionals. Mètode de l'ExoIII/S1.

El mètode que hem emprat per llegir al llarg d'un fragment de DNA de longitud relativament gran es basa en una combinació de l'acció controlada de dos enzims nucleàsics: l'exonucleasa III i la nucleasa S1 i va ésser descrit originalment per Henikoff (1984). S'ha procedit a una doble digestió d'enzims de restricció orientada de tal manera que un enzim que deixi extrems 3' protuberants quedi a prop de l'encebador que s'utilitza per seqüenciar, mentre que un enzim que deixi extrems roms o 5' protuberants quedi a prop de l'insert. L'exonucleasa III és una exonucleasa que degrada només una de les cadenes del DNA bicatenari a partir d'extrems 3' no protuberants, és a dir, extrems

roms o 5' protuberants. En canvi, la nucleasa S1 actúa digerint cadenes monocatenàries de DNA, en aquest cas la cadena complementària a la que ha digerit l'exonucleasa III, i també la cua cohesiva de nucleòtids que ha deixat l'enzim que ha deixat extrems 3' protuberants. Després d'aquestes dues digestions controlades, el plasmidi resultant està a punt d'ésser relligat i utilitzat per a transformar i seqüenciar (Fig.52). El mètode és força elegant encara que de difícil control donat que les condicions experimentals són variables i s'han de definir empíricament. El protocol i condicions que s'han seguit han estat establerts per Jordi Garcia-Fernàndez (comunicació personal).

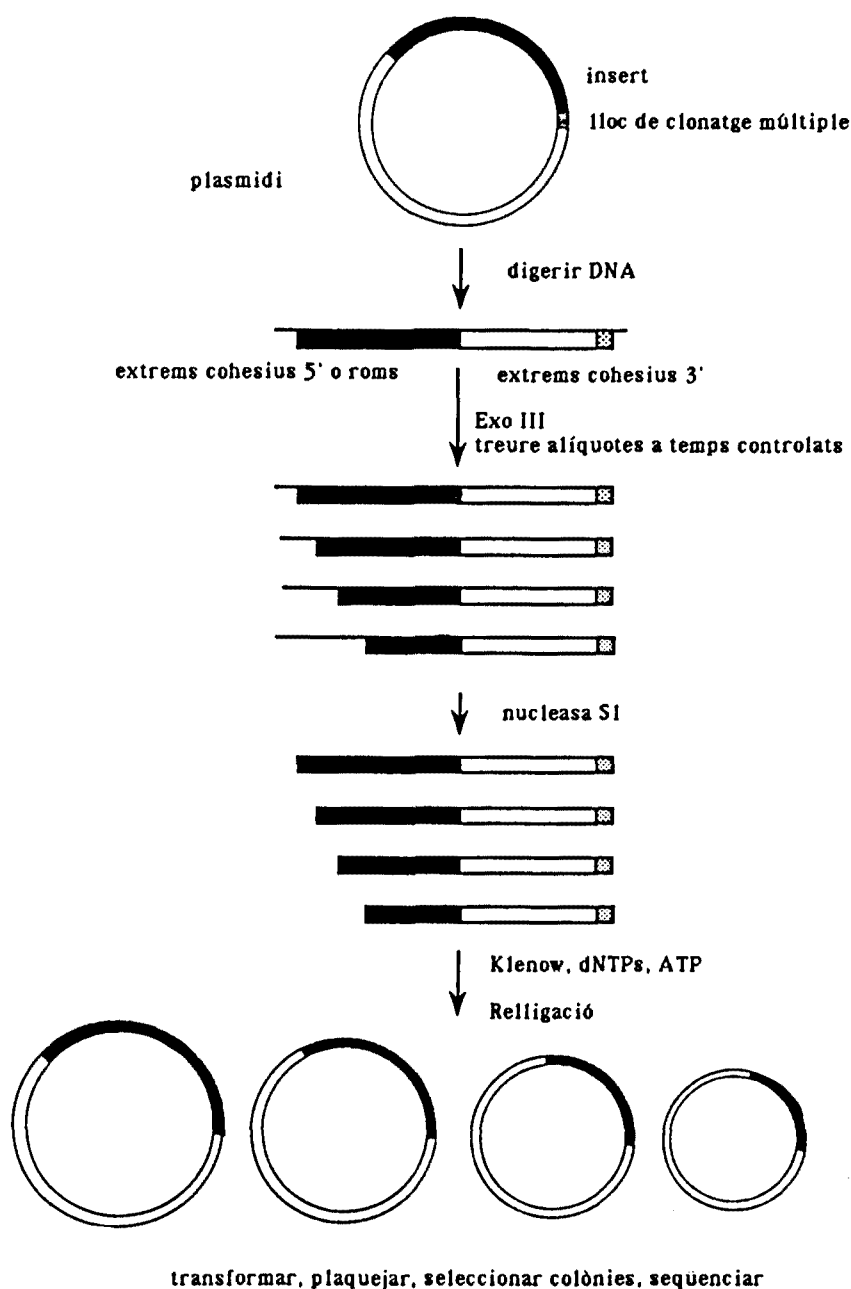


Fig.52.- Esquema del procediment emprat per a obtenir deleccions unidireccionals pel mètode d'Exo III/ S1

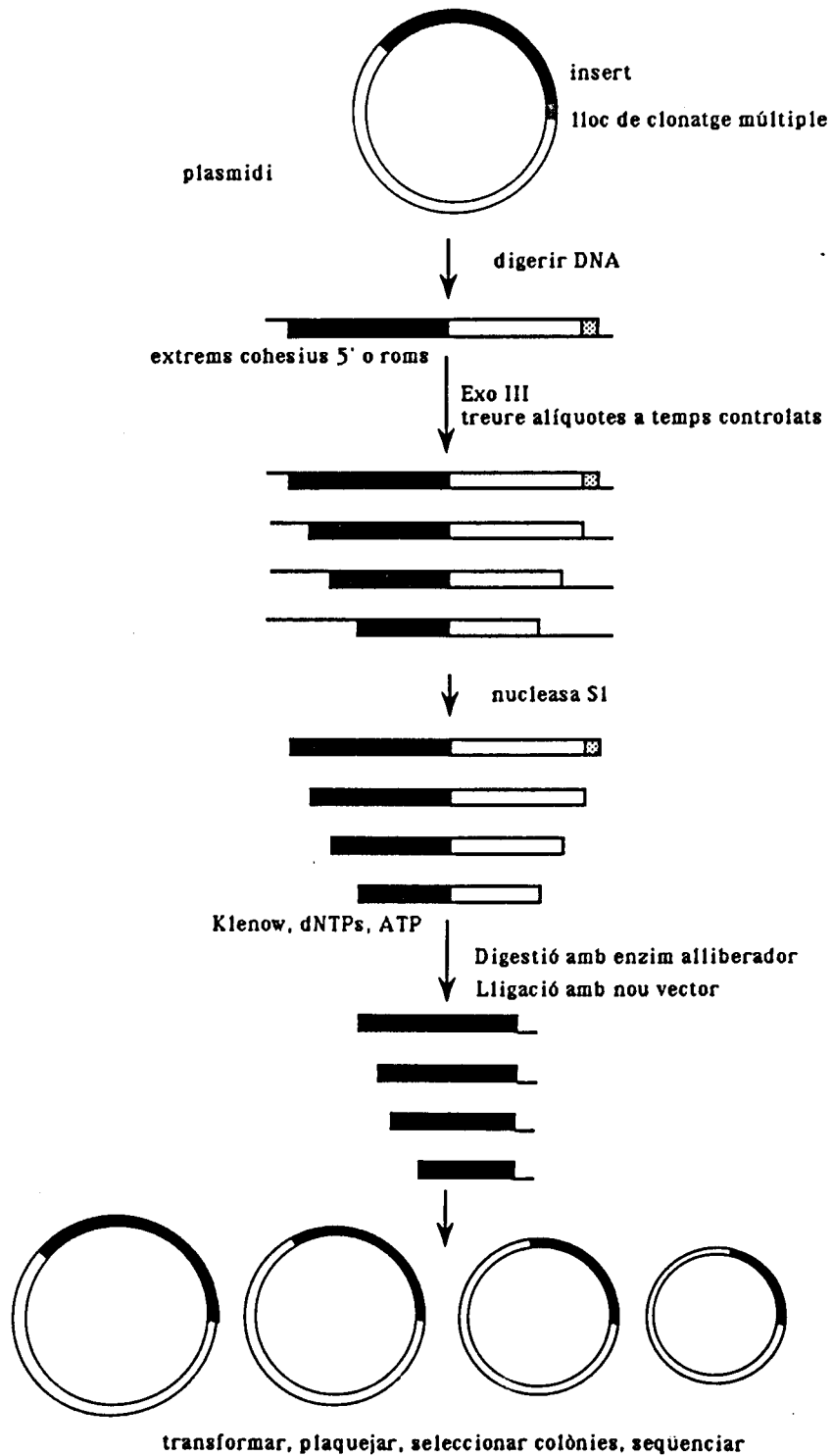


Fig.53.- Esquema del procediment emprat per a l'obtenció de delecions bidireccionals pel mètode d'Exo III/S1.

11.4.1. Deleccions bidireccionals, sense protecció d'extrems.

No sempre és possible protegir l'extrem on es troba l'encebador de seqüència, degut a diverses raons. Per altra part, la religació directa del plasmidi després del tractament amb *exoIII/S1* sol incrementar el nombre de transformants artefactuals.

En la gran majoria dels casos s'ha optat per la no protecció de cap extrem. S'ha digerit el plasmidi o fagsmidi amb un sol enzim de restricció que deixa extrems compatibles per a l'exonucleasa III i permet una digestió progressiva de l'insert de DNA pels dos extrems. Quan les reaccions de digestió d'ambdues nucleases hagi acabat, es procedeix a una restricció de totes les mostres que han estat digerides progressivament, per tal d'alliberar l'insert del plasmidi. L'insert de DNA es purifica i es clona de nou en un nou plasmidi amb extrems compatibles (Fig.53).

11.4.2. Protocols d'ExoIII/S1.

Prèviament a les reaccions de degradació nucleàsica s'han de determinar una sèrie de paràmetres, en concret: si les deleccions seran uni- o bi-direccionals, la longitud de DNA a deleccionar en cada punt (temps d'actuació de l'exonucleasa III) i en total i, per últim, la velocitat de digestió de l'Exonucleasa III, que depèn del lot de l'enzim, la seqüència i puresa del DNA a digerir, etc. i que s'ha de determinar empíricament.

11.4.2.1. Deleccions unidireccionals (amb protecció d'un extrem).

Protocol

- 1.- Es digereix el DNA amb dos enzims de restricció: un d'ells, situat més proper a la zona de l'encebador que deixi extrems 3' protuberants i l'altre més proper a l'insert que deixi extrems roms o 5' protuberants (consultar punt 7). Les digestions no s'han d'allargar més de 2 h. Es necessita un mínim de 0.5 µg/punt d'ExoIII/S1. La digestió ha de ser completa i es controla mitjançant càrrega d'una petita alíquota en un gel d'electroforesi.
- 2.- S'incrementa el volum (opcional). Extraccions fenòliques.
- 3.- Precipitació i centrifugació del DNA segons les condicions habituals.
- 4.- Es resuspèn el DNA amb aigua estèril (NO amb TE x 1). El volum calculat ha de deixar una concentració final òptima de 250 ng/µl. Es deixa 10 min a 65°C.

5.- Digestió amb exoIII:

x µl DNA (a 250 ng/µl, es necessiten 500 ng mínim /punt).

x µl Tampó de digestió d'exoIII x 10: 660mM Tris-HCl pH 8.0

6.6 mM Mg Cl₂

1 mM β-mercaptoetanol

x µl d'aigua estèril fins volum final (concentració final DNA =100 ng/µl)

Es pre-escalfa el tub a 37°C, abans d'afegir-hi l'enzim:

x µl d'exoIII (es necessiten 40 u/µg, de fet són 100 u/pmol d'extrem 5')

Remenar acuradament sense treure el tub del bany. Deixar a 37°C.

6.- S'atura la reacció treient alíquotes de 5 µl en 5 µl en els temps establerts per cada punt, i es posen en un tub en gel on hi ha 15 µl del tampó de digestió x 1 per a la nucleasa S1.

tampó x 10 de la nucleasa S1: 0.3 M Na AcO pH 4.5

2.5 M NaCl

50 % glicerol

18.5 mM ZnSO₄

Es deixa 1 min en gel.

7.- S'inactiva l'enzim deixant els tubs 15 min a 68°C. Es deixen refredar 5 min en gel.

8.- Digestió amb nucleasa S1:

S'afegeixen 5 u/µg de DNA, de fet 2.5 u/punt (tub). Habitualment cal fer una dilució prèvia fresca, de l'enzim amb aigua. Es deixa actuar 15 min a 25°C. La concentració de DNA serà de 25 ng/µl.

9.- S'afegeixen 2 µl de Solució d'atur x 10: 1 M Tris-HCl pH 8.0

50 mM EDTA pH 8.0

Es deixen els tubs 5 min en gel.

10.- S'inactiva l'enzim deixant els tubs 10 min a 70°C. Es tornen a deixar en gel.

11.- Reacció d'omplenament d'extrems (opcional):

S'afegeixen 2 µl de Solució de Klenow fresca: 10 mM Tris-HCl pH 8.0

200 mM MgCl₂

0.1 u de Klenow/µl

Es deixen els tubs 2 min a 37°C.

12.- S'afegeixen 2 µl dels quatre dNTPs a 0.125 mM cadascun. Es deixen 5 min a 37°C.

13.- Es pot comprovar com ha anat la reacció carregant 1/10 (uns 2.5 µl) de cada reacció en un gel d'agarosa.

14.- S'incrementa el volum a 100 µl final amb TE x 1. Extraccions fenòliques.

15.- Precipitació i centrifugació del DNA segons el mètode habitual.

16.- Resuspensió del DNA a 8.5 µl d'aigua estèril, 10 min a 65°C.

17.- S'hi afegeix:

1 µl de tampó de lligació

0.5 µl de ligasa

Es procedeix a una lligació i transformació segons està especificat en els punts 10.1, 10.2 i 10.3.

11.4.2.2. Delecions sense protecció d'extrems.

Es manté el protocol anterior però a partir del punt 17 hi ha variació:

Protocol

- 17 bis.- S'ha de decidir l'enzim de restricció amb què s'alliberarà l'insert. S'hi afegeix:
- 1 µl de tampó de digestió adient.
 - 0.5 µl de l'enzim de restricció.
- Es deixa de 2 h a 2 h 30 min digerint a 37°C.
- 18 bis.- Es carreguen tots els punts en un gel preparatiu d'agarosa i després s'obtindran les bandes necessàries per al posterior clonatge, segons està especificat en els punts 8.1, 9.1.4 i 10.

NOTES: a) De fet el pas 6 del protocol ja suposa la inactivació de l'exonucleasa III, ja que el tampó necessari per a la posterior digestió amb la nucleasa S1 porta ió zenc, que inactiva a l'exoIII.

b) Encara que es segueixi el protocol de les delecions bidireccionals és recomanable obtenir un conjunt homogeni de plasmidis digerits per cada punt. Això implica passar el DNA digerit de cada punt per un gel d'agarosa per tal de purificar una banda homogènia, en quant a mida, per cada punt.

c) La nostra experiència assenyala que és millor procedir a delecions sense protegir extrems, i una vegada efectuada la posterior clonació dels fragments aïllats, s'ha de disposar de dianes de restricció informatives internes al fragment, per assegurar-nos la procedència de l'insert i evitar els artefactes de clonació.

11.5. Fixació, assecat i autorradiografia

La fixació dels gels de seqüència es fa tenint en compte que el gel està adherit a un vidre, i per altre part depèn del gruix del gel. Com tots el gels de poliacrilamida, s'ha fixat en una solució 10% (v/v) àcid acètic i 10% (v/v) metanol. El temps oscil·la des de 30 min quan el gel té un gruix uniforme de 0.4 mm, a 1 h 30 min quan és en gradient.

L'assecat del gel pot variar. Si no és en gradient, són 2 h a 80°C. Si és en gradient, es deixa de 12 h a 14 h a 50°C, o bé, 12 h a temperatura ambient més 6 h a 60°C. És molt important que el gel estigui ben sec, especialment a la regió més gruixuda del gel.

L'autorradiografia dels gels dura de 2 a 5 dies. El revel·lat i fixació dels films s'ha fet seguint el mètode habitual.

12. OBTENCIÓ DE RNA DE DIFERENTS ESTADIS DEL DESENVOLUPAMENT

Tot el material de treball ha estat tractat per evitar contaminacions de RNases. El material de vidre, metàl·lic i morters es van sotmetre a dos cicles en un forn de 200°C. Les puntes i tubs eppendorf van ésser autoclavats un mínim de dos cops i les solucions, fetes amb aigua tractada amb DEPC i autoclavades també un mínim de dues vegades. S'ha d'anar amb compte amb les solucions que continguin Tris, ja que el DEPC el precipita. Sempre s'ha de tocar tot el material amb guants, o amb altre material estèril, incloent-hi el paper d'alumini i les espàtules. El pH es va mesurar amb paper indicador.

12.1. Preparació de RNA a gran escala

Per a l'obtenció i purificació de RNA en grans quantitats s'ha seguit el protocol posat a punt per Collet (1990) a planària. El RNA obtingut conté una bona representació de transcrits de totes les mides sense degradació aparent, però cal assenyalar que el RNA ribosomal 28S sol presentar-se trencat en dos fragments, de mida similar al 18S. Aquest RNA es pot utilitzar per a transferències *Northern*, per a purificar la fracció poliadenilada, com a motllo per a la transcriptasa inversa o per a reaccions de PCR.

12.2. Mini-preparació de RNA

Exposem dos protocols: el primer amb isotiocianat de guanidina i el segon amb fenol calent/clorur sòdic. S'ha obtingut RNA a partir de 100 mg de larves, pupes i adults que havien estat congelats amb nitrògen líquid i conservats a -70°C. El segon mètode permet obtenir un RNA de *Drosophila* de bona qualitat que es resuspèn bé. El RNA obtingut pel primer mètode costa més de resuspendre. La quantitat de RNA obtinguda ha oscil·lat entre 4 µg i 8 µg segons el tipus de mostra.

12.2.1. Mètode de l'isotiocianat de guanidina

Protocol

- 1.- Homogenització en un morter amb nitrogen líquid.
- 2.- L'homogenat es dissol a 65°C en 6 ml d'una solució 1:1 de fenol calent: 4M d'isotiocianat de guanidina. S'agita suaument durant 10 min.
- 3.- S'afegeixen 100 µl de NaAcO 3M pH5.2. S'agita suaument durant 5 min més.
- 4.- Es reparteix tot el volum en tubs eppendorf i es centrifuga 5 min a 4°C.
- 5.- Es continuen les extraccions fendliques, amb la variant que el fenol/cloroform està pre-escalfat a 65°C i les centrifugacions es fan a 4°C.
- 6.- Precipitació amb 2 vol d'etanol. Es centrifuguen els tubs 30 min.
- 7.- El sediment es resuspèn en 25 µl d'aigua tractada amb DEPC, 10 min a 65°C.

12.2.2. Mètode del fenol calent amb clorur sòdic

El protocol seguit està basat en el descrit per Arribas (1986) amb lleugeres modificacions.

Protocol

- 1.- Homogenització en un morter amb nitrògen líquid.
- 2.- L'homogenat es dissol a 65°C en 6 ml d'una solució 1:1 de fenol calent: tampó d'extracció.
 - tampó d'extracció:
 - 100 mM NaCl
 - 50 mM EDTA
 - 20 mM Tris-HCl pH7.5
 - 1% w/v SDS

S'agita suaument durant 10 min.
- 3.- Es reparteix tot el volum en tubs eppendorf i es centrifuga 5 min.
- 4.- Es continuen les extraccions fenòliques.
- 5.- Precipitació amb
 - 0.1 vol NaAcO 3M pH5.2
 - 2 vol etanol
- 6.- Centrifugació 30 min.
- 7.- Resuspensió en 25 µl d'aigua tractada amb DEPC, 10 min a 65°C.

12.3. Purificació de la fracció de RNA poli A⁺

La fracció poliadenilada suposa només entre un 1% i un 5% del RNA total. La seva purificació es basa en la retenció del RNA poli A⁺ en passar per una columna d'alta afinitat amb resina d'oligo(dT). La retenció de la fracció de RNA poliadenilada es fa en condicions d'elevada força iònica, mentre que l'el·lució posterior es fa mitjançant un tampó de baixa força iònica. La resina oligo(dT) que s'ha emprat era de Pharmacia-LKB i la columna era una Econo column BIO-RAD de 10 ml de volum.

Protocol

- 1.- Es resuspensen 100 mg-200mg de resina oligo(dT) en 10 ml d'aigua DEPC i s'omplena una columna.
- 2.- S'equilibren les columnes amb:
 - 3 ml d'aigua DEPC.
 - 3 ml de 0.1 M NaOH
 - 5 mM EDTA
 - 6 ml d'aigua DEPC

El pH de l'el·luit ha de ser menor de 8.0.

3.- Es renta la columna amb 10 ml de tampó de càrrega x 1:

0.5 M NaCl
20 mM Tris-HCl pH 7.6
1 mM EDTA
0.1% SDS

4.- S'escalfa la mostra de RNA total durant 5 min a 65°C.

5.- S'afegeix un volum igual de tampó de càrrega x 2 (queda x 1 final). La composició correspon al tampó de càrrega x 1 del punt 3 d'aquest protocol amb el doble de tots els components.

6.- S'aplica la mostra de RNA i es recull l'el·luït .

7.- L'el·luït es torna a escalfar 5 min a 65°C, i es deixa refredar.

8.- Es torna a carregar la columna amb aquest primer el·luït.

9.- Es renta amb 10 ml de tampó de càrrega x 1 (punt 3 del protocol).

10.- Es renta amb 4 ml de tampó de baixa concentració de sals:

0.1 M NaCl
20 mM Tris-HCl pH 7.6
1 mM EDTA
0.1% SDS

11.- S'acaba d'el·luir amb 1.2 ml de tampó de baixa concentració de sals (punt 10 del protocol) i es recullen 3 fraccions de 400 ml.

12.- A cada fracció s'hi afegeix: 0.1 vol d'acetat sòdic 3M pH 5.3
 2.5 vol d'etanol fred (-20°C)

Es barreja bé.

13.- Es deixa tota una nit a -20°C o bé 15 min en gel sec.

14.- Es centrifuga 30 min a 4°C.

15.- S'asseca el sediment, però no de forma excessiva.

16.- Es resuspèn en 100 µl d'aigua DEPC. Es deixa 15 min a 65°C. Es guarda a -20°C o a -70°C. Per mesurar-ne la concentració, es pot fer per lectura de densitat òptica.

L'electroforesi del RNA poli A⁺ es fa com si es tractés de RNA total (veure punt 8.1.3.).

12.4. Transferència *Northern*.

Consisteix en el mateix tipus de transferència que la de *Southern* encara que l'àcid nucleic transferit és RNA. El RNA, a diferència del DNA, no requereix un tractament previ a la transferència, ja que és un àcid nucleic monocatenari. Les millors transferències són les semi-seques, és a dir, aquelles que a l'inici es fan amb una solució d'elevada força iònica, i finalitzen amb el propi tampó del gel com a suport físic de la transferència. Donat que l'extracció i obtenció de RNA presenta dificultats, les membranes emprades són de nylon, per a permetre la seva reutilització i rehibridació

amb diferents sondes. Es convenient realitzar diferents tipus de controls, a part dels controls positiu i negatiu d'hibridació, hem fet un control de càrrega: hibridant amb una sonda que, en principi, detecta un gen d'expressió constant al llarg del desenvolupament. La sonda elegida ha estat la del gen de l'actina *Hd19* de *D.melanogaster*. (Fyrberg et al., 1979).

13. PCR. REACCIÓ DE POLIMERITZACIÓ EN CADENA

L'establiment de les condicions de la PCR sol ser empíric. Es proven unes certes condicions generals depenents de la longitud i seqüència del DNA, que serveixen especialment per conèixer la T_m dels oligonucleòtids. Aquestes condicions s'han assajat sobre un plasmidi control que sabem que conté el DNA que es volia amplificar.

13.1. Disseny dels oligonucleòtids.

S'han dissenyat quatre oligonucleòtids 17-mer corresponents a seqüències molt conservades del primer i segon exó del gen *Adh*: 5' ATTGGCCTGGACACCAG 3' i 5' ACGGGCACCTGGTAGAT 3' i al segon i tercer exó del gen *Adh-dup*: 5' CAAGGTTCTCATGACCA 3' i 5' CTGGACCCGTCGCCAGT 3'.

13.2. Condicions experimentals de la PCR amb DNA genòmic

Aquest experiment s'ha realitzat per determinar l'existència de retroseqüències del gen *Adh* en el genoma de les espècies: *D.melanogaster*, *D.ambigua*, *D.subobscura*, *D.madeirensis*, i *D.guanche*. S'ha emprat en cada cas 1 µg de DNA genòmic i 20 mM dels dos encebadors. S'han seguit les instruccions recomanades per la casa manufacturadora de la Taq polimerasa (BRL). Les condicions experimentals per als cicles han estat:

- 1 min a 94°C per a la desnaturalització
 - 2 min a 55°C per a l'anellament
 - 5 min a 72°C per a la polimerització del DNA
- Aquest cicle es repeteix 35 vegades.

Es va carregar 1/10 del volum de la reacció en un gel d'electroforesi (veure punt 8.1.2.).

NOTES: a) Els resultats milloren si la concentració de $MgCl_2$ és aproximadament entre 4 i 6 mM, en lloc de 1.5 mM.

b) És interessant assenyalar que aquestes condicions són relativament astringents, donat que la temperatura d'anellament és la mateixa que la T_m , quan normalment s'aconsella que sigui inferior en 5°C.

13.3. Condicions experimentals de la PCR amb RNA total

Aquest experiment s'ha realitzat per determinar l'expressió del gen *Adh-dup* a les espècies estudiades, en particular, hem intentat posar-ho a punt sobre RNA d'adults de *D.melanogaster* i *D.ambigua*. Donat que en l'obtenció de RNA total podia haver-hi una certa contaminació de DNA genòmic, s'ha efectuat un tractament previ amb DNasa (lliure de RNases). Es va procedir a la síntesi de cDNA mitjançant transcriptasa inversa, i per últim, la reacció de PCR. En els experiments de PCR sobre RNA genòmic, es varen emprar 2 µg de RNA total.

Protocol

1.- Tractament amb DNasa (lliure de RNases)

10 µl tampó x 2: 0.2 mM NaAcO
 5 mM MgSO₄
 x µl RNA (2 mg)
 0.5 µl DNasa
 x µl H₂O

El volum final és 20 µl. Es deixa 15 min a 37°C.

2.- Extraccions fenòliques.

3.- Precipitacions segons el mètode habitual.

4.- Resuspensió en 2 µl d'aigua. Es deixa 10 min a 65°C.

5.- Síntesi de cDNA

2 µl de RNA tractat
 8 µl de dNTPs (1 mM cadascun)
 0.5 µl d'inhibidor de RNasa
 x µl d'oligonucleòtid de seqüència complementària del RNA (20 mM)
 x µl de MoMuLV (200 u)
 x µl de MgCl₂ (6mM final)

El volum final és 20 µl. Es deixa 10 min a 23°C

6.- Es deixa 60 min a 42°C .

7.- S'inactiva amb 10 min a 95°C.

8.- Reacció de PCR

S'hi afegixen als 20 µl:

8 µl de tampó PCR x 10
 x µl de l'altre oligonucleòtid
 0.5 µl de Taq polimerasa
 x µl de MgCl (de 2 mM a 4 mM final)
 x µl d'aigua

El volum final és de 100 µl. Els cicles del PCR es fan segons les mateixes condicions especificades a 13.2.

Es carrega 1/10 del volum de la reacció en un gel d'electroforesi (veure 8.1.2.)

14. HIBRIDACIONS *in situ* SOBRE CROMOSOMES POLITÈNICS

Aquesta tècnica s'ha realitzat seguint les indicacions inicialment descrites per Gall i Pardue (1968). Per a l'obtenció dels cromosomes politènics es van extreure glàndules salivals de larves del tercer estadi de diverses espècies de *Drosophila*, que es van fixar en àcid acètic al 45%. Després del *squash* i la congelació en nitrògen líquid es varen deshidratar les preparacions mitjançant una sèrie alcohòlica. A partir d'aquest punt es va seguir el protocol següent:

Protocol

- 1.- S'incuben les preparacions en 2 x SSC durant 30 min a 65°C.
- 2.- Es deshidraten en una sèrie alcohòlica i s'assequen a l'aire.
- 3.- Abans de la hibridació es submergeixen les preparacions de 2 min a 3 min en una solució 0.07N de NaOH per desnaturalitzar el DNA cromosòmic.
- 4.- Seguidament es renten en 2 x SSC per 3 vegades durant 5 min.
- 5.- Es deshidraten en una sèrie alcohòlica i s'assequen a l'aire.
- 6.- S'escalfa la solució d'hibridació durant 10 min a 90°C. Per a 10 preparacions es necessita 1 µg de sonda biotinada marcada pel mètode de *nick-translation* (veure punt 4.1.) i diluïda fins 200 µl de volum final en:

Solució d'hibridació:

- 1 µg de sonda biotinada
 - 50% de formamida (v/v)
 - 10 % de sulfat de dextrà (w/v)
 - 0.4 µg d'esperma de salmó
 - 2 x SSC
- 7.- D'aquesta solució es posen 20 µl a cada preparació, que es cobreixen mitjançant un cobreobjectes, i es sellen amb goma.
 - 8.- Es deixen en una càmera humida a 80°C durant 10 min.
 - 9.- La hibridació es realitza en la càmera humida de 16 h a 20 h a 37°C.
 - 10.- Es procedeix als rentats després de treure els cobreobjectes, sumergint les preparacions en 2 x SSC durant 10 min per 5 vegades. El primer rentat es fa a temperatura ambient, els dos següents a 42°C i els dos últims a temperatura ambient.
 - 11.- S'incuben en una solució que conté 0.1% (v/v) de Tritó X-100 en PBS durant 5 min.

- 12.- Es fan dos rentats més de 5 min en PBS.
- 13.- Es submergeixen en una solució de 1% BSA (w/v) en PBS a temperatura ambient durant 20 min.
- 13.- La detecció es fa mitjançant un complex d'estreptavidina-peroxidasa (Boehringer Mannheim) durant 90 min.
- 14.- Es renten les preparacions en 2 x SSC durant 5 min per 2 vegades.
- 15.- Es fa un altre rentat amb una solució que conté 0.1% (v/v) de Tritó X-100 en PBS durant 5 min.
- 16.- Per últim, es fan dos rentats més de 5 min en PBS.
- 17.- L'activitat peroxidasa es detecta amb 0.005% (w/v) de diaminobenzidina com a cromògen i en presència de 0.0003% (v/v) de peròxid d'hidrògen (al 30%) de 5 min a 7 min. La reacció es finalitza per dilució en aigua.
- 18.- Els cromosomes es poden tenyir mitjançant GIEMSA: dilució al 10% del colorant (Merck) en tampó fosfat (Na_2HPO_4 0.0412 M, NaH_2PO_4 0.0252 M) i es deixa tenyint durant uns 7 min. Per evitar el precipitat del GIEMSA sobre les preparacions, es destenyeix per dilució a l'infinit amb aigua corrent, per sobreiximent del colorant.

Per a la identificació de les bandes s'han seguit els mapes del cromosomes politènics establerts: per *D.subobscura*, Kunze-Mühl i Muller (1958); *D.ambigua*, Mainx et al. (1953); *D.guanche*, Moltó et al. (1987) i *D.madeirensis*, Papaceit (1988).

15. SOFTWARE

Comparació de seqüències

Dos programes s'han emprat per als alineament de seqüències: el GAP i el BESTFIT del paquet GCG de la Universitat de Wisconsin (Devereux et al., 1984). Mentre que el GAP utilitza tota la seqüència per a l'alineament, el BESTFIT utilitza només aquella regió que presenti una similitud o homologia més gran.

Recerca de seqüències amb homologia al GenBank/EMBL

S'ha emprat el programa WORDSEARCH del paquet GCG de la Universitat de Wisconsin (Devereux et al., 1984).

Prediccions d'estructura secundària

S'han emprat els programes PEPTIDESTRUCTURE i PLOTSTRUCTURE del paquet GCG de la Universitat de Wisconsin (Devereux et al., 1984). Els perfils d'hidrofobicitat/hidrofilicitat han estat calculats amb l'algoritme de Hopp i Woods (1981) i les prediccions segons l'algoritme de Chou i Fassman (1978).

Arbres filogenètics

S'han emprat els programes FITCH, KITS i DNABOOTS del paquet PHYLIP (J.Felsenstein, Universitat de Washington). Els programes FITCH i KITS es basen en el mètode dels mínims quadràtics de Fitch i Margoliash (1967), però mentre que el KITS assumeix un rellotge molecular, amb creixement sincròmic i produeix arbres amb arrel, el FITCH no pressuposa rellotge molecular ni creixement sincrònic de les branques, no produeix arbres amb arrel però accepta la introducció d'espècies de referència o *outgroup*. El DNABOOT calcula els bootstraps per a un determinat arbre, mitjançant el mètode de màxima parsimònia.

BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA

- ALBALAT, R., and R. GONZÁLEZ-DUARTE, 1990 Nucleotide sequence of the *Adh* gene of *Drosophila lebanonensis*. *Nucleic Acids Res.* 18 (22): 6076.
- ALONSO, C., and H. D. BERENDES, 1975 The location of 5S (ribosomal) RNA genes in *Drosophila hydei*. *Chromosoma* 51: 347-356.
- ARRIBAS, C., 1986 Caracterización del gen de la ubiquitina en *Drosophila* y aislamiento de su homólogo en humanos. Tesis Doctoral. U.A.M. España.
- ASHBURNER, M., BODMER, M., and F. LEUMENIER, 1984 On the evolutionary relationships of *Drosophila melanogaster*. *Dev Genet* 4: 295-312
- ASHWORTH, A., SKENE, B., SWIFT, S., and R. LOVELL-BADGE, 1990 *Zfa* is an expressed retroposon derived from an alternate transcript of the *Zfx* gene. *EMBO J.* 9: 1529-1534.
- ATKINSON, P. W., MILLS, L. E., STARMER, W., and D. T. SULLIVAN, 1988 Structure and evolution of the *Adh* genes of *Drosophila mojavensis*. *Genetics* 120: 713-723.
- ATRIAN, S., and R. GONZÁLEZ-DUARTE, 1986 Asimilación metabólica de los alcoholes en *Drosophila*: nutrición y detoxificación. *Anales de Biología* 10: 3-19.
- AUSUBEL, F. M., BRENT, R., KINGSTON, R. E., MOORE, D. D., SEIDMAN, J. G., SMITH, J. A., and K. STRUHL, (eds) 1987 *Current Protocols in Molecular Biology*. Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience.
- BATTERHAM, P., CHAMBERS, G. K., STARMER, W. T., and D.T. SULLIVAN, 1984 Origin and expression of an alcohol dehydrogenase duplication in the genus *Drosophila*. *Evolution* 38: 644-657.
- BENTON, W. D., and R. W. DAVIS, 1977 Screening lambda-gt recombinant clones by hybridization to single plaques *in situ*. *Science* 196: 180-182.
- BENYAJATI, C., AYERS, S., MCKEON, J., EWEL, A., and J. HUANG, 1987 Roles of cis-acting elements and chromatin structure in *Drosophila Adh* expression. *Nucleic Acids Res.* 15: 7903-7921.
- BENYAJATI, C., and T. F. DRAY, 1984. Cloned *Drosophila* alcohol dehydrogenase genes are correctly expressed after transfection into *Drosophila* cells in culture. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81: 2717-2721.

- BENYAJATI, C., PLACE, A., POWERS, D., and W. SOFER, 1981. Alcohol dehydrogenase gene of *D.melanogaster*: relationship to intervening sequences to functional domains in the protein. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78: 2717-2721.
- BENYAJATI, C., SPOEREL, N., HAYMERLE, H., and M. ASHBURNER, 1983 The messenger RNA for alcohol dehydrogenase differs in its 5' end in different developmental stages. Cell 33: 125-133.
- BENYAJATI, C., WANG, N., REDDY, A., WEINBERG, E. and W. SOFER, 1980. Alcohol dehydrogenase in *D.rosophila*: isolation and characterisation of messenger RNA and cDNA clone. Nucleic Acids Res. 8: 5649-5667.
- BERENDES, H. D., W. Th. M. THIJSSSEN, 1971 Developmental changes in genome activity in *Drosophila lebanonensis casteeli* Pipkin. Chromosoma 33: 345-360.
- BERG, D. E., HOWE, M. M.(eds), 1989 *Mobile DNA*. American Society for Microbiology, Washington, DC.
- BEWLEY, G. C., COOK, J. L., KUSAKABE, S., MUKAI, T., RIGBY, D. L., and G. K. CHAMBERS, 1989. Sequence, structure and evolution of the gene coding for sn-glycerol-3-phosphate dehydrogenase in *Drosophila melanogaster*. Nucleic Acids Res. 17: 8553-8567.
- BIRCHLER, J. A., HIEBERT, J. C., and K. PAIGEN, 1990 Analysis of autosomal dosage compensation involving the alcohol dehydrogenase locus in *Drosophila melanogaster*. Genetics 124: 677-686.
- BODMER, M., and M. ASHBURNER, 1984 Conservation and change in the DNA sequences coding for alcohol dehydrogenase in sibling species of *Drosophila*. Nature 309: 425-430.
- BOER, P. H., ADRA, C. N., LAU, Y.-F. and M. W. MCBURNEY, 1987 The testis-specific phosphoglycerate kinase gene *pgk-2* is a recruited retroposon. Mol. Cell. Biol. 7(9): 3107-3112.
- BOFFEY, S. A., 1984 Purification of plasmid DNA by the cleared lysate method, p. 177 in *Methods in Molecular Biology*, vol. 2, Nucleic Acids, edited by J. M. WALKER. Humana Press.
- BREATHNACH, R., and P. CHAMBON, 1987 Organization and expression of eucaryotic split genes coding for proteins. Ann. Rev. Biochem. 50: 349-383.
- BRENNAN, M. D., and W. J. DICKINSON, 1988 Complex developmental regulation of the *Drosophila affinisdisjuncta* alcohol dehydrogenase gene in *Drosophila melanogaster*. Dev. Biol. 125: 64-74.
- BROWN, C. J., AQUADRO, C. F., and W. W. ANDERSON, 1990 DNA sequence evolution of the Amylase multigene family in *Drosophila pseudoobscura*. Genetics 126: 131-138.

- BULMER, M., 1990 The effect of context on synonymous codon usage in genes with low codon usage bias. *Nucleic Acids Res.* 18: 2869-2873.
- BUZZATI-TRAVERSO, A. A., and R. E. SCOSSIROLI, 1955 The *obscura* group in the genus *Drosophila*. *Adv. Genet.* 7: 47-92.
- CABRERA, V. M., GONZALEZ, A. M., LARRUGA, J. M., and A. GULLON, 1983 Genetic distance and evolutionary relationships in the *Drosophila obscura* group. *Evolution* 37: 675-689.
- CACCONI, A., AMATO, G. D., and J. R. POWELL, 1988 Rates and patterns of scnDNA and mtDNA divergence within the *Drosophila melanogaster* subgroup. *Genetics* 118: 671-683.
- CACCONI, A., and J. R. POWELL, 1990 Extreme rates and heterogeneity in insect DNA evolution. *J. Mol. Evol.* 30: 273-280.
- CHAMBERS, G. K., 1988 The *Drosophila* alcohol dehydrogenase gene-enzyme system, pp 39-107 in *Advances in Genetics*, vol 25, edited by E. W. CASPARI and J. G. SCANDALIOS, Academic Press, Inc.
- CHAMBERS, G. K., Gene expression, adaptation and evolution in higher organisms. Evidence from studies of *Drosophila* alcohol dehydrogenases. (en premsa).
- CHIA, W., KARP, R., MCGILL, S., and M. ASHBURNER, 1985 Molecular analysis of the *Adh* region of the genome of *Drosophila melanogaster*. *J. Mol. Biol.* 186: 689-706.
- CHIA, W., SAVAKIS, C., KARP, R., and M. ASHBURNER, 1987 *Adhⁿ⁴* of *Drosophila melanogaster* is a nonsense mutation. *Nucleic Acids Res.* 15: 3931.
- CHIRGWIN, J. M., PRZYBYLA, A. E., MACDONALD, R. J. and W. J. RUTTER, 1979 Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. *Biochemistry* 18: 5294-5299.
- CHOU, P. V., and G. D. FASSMAN, 1978 Prediction of the secondary structure of proteins from their amino acid sequence. *Adv. Enzymol.* 47: 45-148.
- CLARK, B. D., COLLINS, K. L., GANDY, M. S., WEBB, A. C., and P. E. AURON, 1986. Genomic sequences for human prointerleukin 1 beta: possible evolution from a reverse transcribed prointerleukin 1 alpha gene. *Nucleic Acids Res.* 14: 7897-7914.
- CLAYTON, F. E., and W. C. GUEST, 1986 Overview of chromosomal evolution in the family Drosophilidae, pp 1-58 in *The genetics and biology of Drosophila*, 3E, edited by M. ASHBURNER, H. L. CARSON and J. N. THOMPSON, Academic Press, New York.

- CLEGG, M. T., and B. K. EPPERSON, 1985 Recent developments in population genetics. *Adv. Genetics* 23: 235-269.
- COHN, V., THOMPSON, M., and G. MOORE, 1984 Nucleotide sequence comparison of the *Adh* gene in three *Drosophilids*. *J. Mol. Evol.* 20: 31-37.
- COHN, V., and G. MOORE, 1988 Organization and evolution of the alcohol dehydrogenase gene in *Drosophila*. *Mol. Biol. Evol.* 5: 154-166.
- COLLET, J., 1990 Síntesi de RNA i anàlisi del patró proteic durant la regeneració de la planària *Dugesia (G) tigrina*. Tesis Doctoral. Universitat de Barcelona.
- COLLIN, J. E., 1936 *Drosophila subobscura* n. sp.. *J. Genet.* 39: 60.
- CORBIN V., and T. MANIATIS, 1989a Role of transcriptional interference in the *Drosophila melanogaster Adh* promoter switch. *Nature* 337: 279-282.
- CORBIN V., and T. MANIATIS, 1989b The role of specific enhancer-promoter interactions in the *Drosophila Adh* promoter switch. *Genes and Dev.* 3: 2191-2200.
- COYNE, J. A., and M. KREITMAN, 1986 Evolutionary genetics of two sibling species, *Drosophila simulans* and *Drosophila sechellia*. *Evolution* 40: 673-691.
- DEININGER, P. L. and G. R. DANIELS, 1986 The recent evolution of mammalian repetitive DNA elements. *T.I.G.*, 2(3): 76-80.
- DEVEREUX, J. P., HAEBERLI, P., and O. SMITHIES, 1984 A comprehensive set of sequence analysis programs for the VAX. *Nucleic Acids Res.* 12: 387-395.
- DICKINSON, W. J., 1980 Evolution of patterns of gene expression in Hawaiian picture-winged *Drosophila*. *J. Mol. Evol.* 16: 73-94.
- DICKINSON, W. J., and H. L. CARSON, 1979 Regulation of the tissue specificity of an enzyme by a *cis*-acting genetic element: Evidence from *Drosophila* hybrids. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76: 4559-4562.
- DICKINSON, W. J., ROWAN, R. and M. BRENNAN, 1984 Regulatory gene evolution: Adaptive differences in expression of alcohol dehydrogenase in *D.melanogaster* and *D.simulans*. *Heredity* 52: 215-225.
- DINOCERA, P. P., DIGAN, M. E. and I. B. DAWID, 1983 A family of oligoadenylated transposable sequences in *Drosophila melanogaster*. *J. Mol. Biol.*, 168: 715-727.

- DUESTER, G., JÖRNVALL, H. and G. W. HATFIELD, 1986 Intron-dependent evolution of the nucleotide-binding domains within alcohol dehydrogenase and related enzymes. *Nucleic Acids Res.* 14: 1931-1941.
- EASTEL, S., and J. G. OAKESHOTT, 1985 Estimating divergence times of *Drosophila* species from DNA sequence comparisons (letter to the editor). *Mol. Biol. Evol.* 2: 87-91.
- EICKBUSH, T.H. and B. ROBINS 1985 *Bombyx mori* 28S ribosomal genes contain insertion elements similar to the Type I and II elements of *Drosophila melanogaster*. *EMBO J.*, 4: 2281-2285.
- EWEL, A., J. R. JACKSON, and C. BENYAJATI, 1990. Alternative DNA-protein interactions in variable-length internucleosomal regions associated with *Drosophila Adh* distal promoter expression. *Nucleic Acids Res.* 18: 1771-1781.
- FÄLLEN, C. F. 1823. *Diptera Sueciae*, *Geomyzides* 2: 1-8
- FARRIS, J. S. 1983 Estimating phylogenetic trees from distance matrices. *Amer. Natur.* 106: 645-668.
- FAWCETT, D. H., LISTER, C. K., KELLETT, E. and D. J. FINNEGAN, 1986 Transposable elements controlling I-R hybrid dysgenesis in *D. melanogaster* are similar to mammalian LINES. *Cell* 47: 1007-1015.
- FEINBERG, A. P., and B. VOGELSTEIN, 1983 A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal Biochem* 132: 6-13
- FELGER, I. and D. SPERLICH, 1989 Cytological localization and organization of dispersed middle repetitive DNA sequences of *Drosophila subobscura*. *Chromosoma* 98: 342-350.
- FENG, D. F., JOHNSON M. S., and R. F. DOOLITTLE, 1985. Aligning amino acid sequences: comparison of commonly used methods. *J. Mol. Evol.* 21: 112-125.
- FINNEGAN, D.F, 1989 F and related elements in *Drosophila melanogaster*, pp. 503-521 in *Mobile DNA*, edited by D. E. BERG, and M. M. HOWE, American Society for Microbiology, Washington, DC.
- FISHER, J. A., and T. MANIATIS, 1985 Structure and transcription of the *Drosophila mulleri* alcohol dehydrogenase genes. *Nucleic Acids Res.* 13: 6899-6917.
- FISHER, J. A., and T. MANIATIS, 1986 Regulatory elements involved in *Drosophila Adh* gene expression are conserved in different species and separate elements mediate expression in different tissues. *EMBO J.* 5: 1275-1289.

- FISHER, J. A., and T. MANIATIS, 1988 *Drosophila Adh*: a promoter element expands the tissue specificity of an enhancer. *Cell* 53: 451-461.
- FITCH, W. M. and E. MARGOLASH, 1967 Construction of phylogenetic trees. *Science* 155: 279-284.
- FRISCHAUF, A.-M., LEHRACH, H., POUSTSKA, A., and N. MURRAY, 1983 Lambda replacement vectors carrying polylinker sequences. *J Mol Biol* 170: 827-842
- FYRBERG, E. A., BOND, B. J., HERSHEY, N. D., MIXTER, K. S. and N. DAVIDSON, 1981 The actin genes of *Drosophila*. A dispersed multigenic family. *Cell*, 24: 107-116.
- GALL, J. G., and M. L. PARDUE, 1968 Nucleic acid hybridization in Cytological preparations. *Methods in Enzymol.* 21: 470-480.
- GASSER, S.-M., and U. K. LAEMMLI, 1986 Cohabitation of scaffold binding regions with upstream enhancer elements of three developmentally regulated genes of *Drosophila melanogaster*. *Cell* 46: 521-530.
- GEMMILL, R. M., LEVY, J. N., and W. W. DOANE, 1985 Molecular cloning of α -amylase genes from *Drosophila melanogaster*. I. Clone isolation by use of a mouse probe. *Genetics* 110: 299-312.
- GILLESPIE, J. H., 1984 The molecular clock may be an episodic clock. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81: 8009-8013.
- GODDARD, K., CACCONI, A., and J. R. POWELL, 1990 Evolutionary implications of DNA divergence in the *Drosophila obscura* group. *Evolution* 44: 1656-1670.
- GOLDBERG, D. A., 1980 Isolation and partial characterization of the *Drosophila* alcohol dehydrogenase gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77: 5794-5798.
- GOLDBERG, D. A., POSAKONY, J. W., and T. MANIATIS, 1983 Correct developmental expression of a cloned alcohol dehydrogenase gene transduced into the *Drosophila* germ line. *Cell* 34: 59-73.
- GONZALEZ, A. M., HERNANDEZ, M., VOLZ, A., PESTANO, J., LARRUGA, J. M., SPERLICH, D. and V. M. CABRERA, 1990 Mitochondrial DNA evolution in the *obscura* species subgroup of *Drosophila*. *J. Mol. Evol.* 31: 122-131.
- GONZALEZ-DUARTE, R., JUAN, E., VILAGELIU, Ll., and S. ATRIAN, 1986 El sistema alcoholdehidrogenasa. *Investigación y Ciencia* 113: 56-69.
- GRELL, E. H., JACOBSON, K. B., and J. B. MURPHY, 1965 Alcohol dehydrogenase in *Drosophila melanogaster* isozymes and genetic variants. *Science* 149: 80-82.

- GREGG, T. G., and L. A. SMUCKER, 1965 Pteridines and gene homologies in eye colour mutants of *Drosophila hydei* and *D.melanogaster*. *Genetics* 52: 1023-1034
- GRUSKIN, K. D., SMITH, T. F., and M. GOODMAN, 1987 Possible origin of a calmoduline gene that lacks intervening sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 1605-1608.
- HAMES, B. D., and S. J. HIGGINS, (eds) 1985 *Nucleic acid hybridization, a practical approach*. IRL Press, Oxford.
- HEBERLEIN, U., ENGLAND, B., and R. TJIAN, 1985 Characterization of *Drosophila* transcription factors that activate the tandem promoters of the alcohol dehydrogenase gene. *Cell* 41: 965-977.
- HEBERLEIN, U., and R. TJIAN, 1988 Temporal pattern of alcohol dehydrogenase gene transcription reproduced by *Drosophila* stage-specific embryonic extracts. *Nature* 331: 410-415.
- HELMS, C., GRAHAM, M. Y., DUTCHIK, J. E., and M. V. OLSON, 1985 A new method for purifying lambda DNA from phage lysates. *DNA* 4: 39-49.
- HENIKOFF, S, 1984 Unidirectional digestion with exonuclease III creates targeted breakpoints for DNA sequencing. *Gene* 28: 351-359.
- HENIKOFF, S., and J. C. WALLACE, 1988 Detection of protein similarities using nucleotide sequence databases. *Nucleic Acid Res.* 16: 6191-6205.
- HERNANDEZ, J. J., VILAGELIU, LL., and R. GONZALEZ-DUARTE, 1988 Functional and biochemical features of alcohol dehydrogenase in four species of the *obscura* group of *Drosophila*. *Genetica* 77: 15-24.
- HOLMQUIST, R., CANTOR, C., and T. JUKES, 1972 Improved procedures for comparing homologous sequences in molecules of protein and nucleic acids. *J. Mol. Biol.* 64: 145-161.
- HOPP, T. P., and K. R. WOODS, 1981 Prediction of protein antigenic determinants from amino acid sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78: 3824-3828.
- HULL, R. and H. WILL, 1989 Molecular biology of viral and nonviral retroelements. *T.J.G.* 5(11): 357-359.
- JEFFREY, J., and H. JÖRNVALL, 1983 Enzyme relationships in a sorbitol pathway that bypasses glycolysis and pentose phosphates in glucose metabolism. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78: 4226-4230.

- JEFFS, P. S., and M. ASHBURNER 1991 Processed pseudogenes in *Drosophila*. Proc R Soc London B 244:151-159.
- JELINEK, W. R., and C. W. SCHMID, 1982 Repetitive sequences in eukariotic DNA and their expression. Annu. Rev. Biochem. 51: 813-844.
- JÖRNVALL, H., PERSSON, M., and J. JEFFREY, 1981 Alcohol and poliol dehydrogenases are both divided into two protein types and structural properties cross relate the different enzyme activities within each type. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78: 4226-4230.
- JUAN, E., PAPACEIT, M., and A. QUINTANA, 1990 Nucleotide sequence of the *Adh* gene of *Drosophila lebanonensis*. Nucleic Acids Res. 18: 6420.
- JUKES, T. H., and C. R. CANTOR, 1969 Evolution of protein molecules, pp 21-132 in *Mammalian protein metabolism*, vol 3, edited by H. N. MUNRO, Academic Press, New York.
- KAPOUN, A. M. , GEER, W., HEINSTRA, W. H., CORBIN, V., and S. W. MCKECHNIE, 1990 Molecular control of the induction of alcohol dehydrogenase by ethanol in *Drosophila melanogaster* larvae. Genetics 124: 881-888.
- KREITMAN, M., 1983 Nucleotide polymorphism at the alcohol dehydrogenase locus of *Drosophila melanogaster*. Nature 304: 412-417.
- KREITMAN, M., and R. R. HUDSON, 1991 Inferring the evolutionary histories of the *Adh* and *Adh-dup* loci in *Drosophila melanogaster* from patterns of polymorphism and divergence. Genetics 127: 565-582.
- KRIMBAS, C. B., and M. LOUKAS, 1984 Evolution of the *obscura* group *Drosophila* species. I. Salivary chromosomes and quantitative characters in *D.subobscura* and two closely related species. Heredity 53: 469-482.
- KUNZE-MÜHL, E, and E. MÜLLER, 1958 Weitere Untersuchungen über die chromosomale Struktur und die natürlichen Strukturtypen von *Drosophila subobscura* Coll. Chromosoma 9: 559-570
- LAKOVAARA, S., and A. SAURA, 1982 Evolution and speciation in the *Drosophila obscura* group, pp 2-9 in *The genetics and biology of Drosophila*, vol 3., edited by M. ASHBURNER, H. L. CARSON, and J. N. SU. Academic Press, London.
- LATORRE, A., MOYA A., and F. J. AYALA, 1988 Mitochondrial DNA evolution in the *Drosophila obscura* group. Mol. Biol. Evol. 5: 717-728.

- LAURIE-AHLBERG, C. C., 1985 Genetic variation affecting the expression of enzyme-coding genes in *Drosophila* : An evolutionary perspective. *Isozymes Curr. Top. Biol. Med. Res.* **12**: 33-38.
- LE CALVEZ, J., 1953 Carte cytologique des chromosomes géants des glandes salivaires de *Drosophila immigrans sturt.* *Chromosoma* **6**: 170-174
- LEVY, J. N., GEMMILL, R. M., and W. W. DOANE, 1985 Molecular cloning of α -amylase genes from *Drosophila melanogaster*. II. Clone organization and verification. *Genetics* **110**: 313-324.
- LEWONTIN, R. C., 1986 Population genetics. *Annu. Rev. Genet.* **19**: 81-102.
- LI, D., and L. F. JOHNSON, 1989 A mouse thymidilate synthase pseudogene derived from an aberrantly processed RNA molecule. *Gene* **82**: 363-370.
- LI, W.-H., GOJOBORI, T., and M. NEI, 1981 Pseudogenes as a paradigm of neutral evolution. *Nature* **292**: 237-239.
- LI, W.-H., and D. GRAUR, 1991 *Fundamentals of molecular evolution*. Sinauer Associates, Inc. Sunderland, Massachusetts.
- LONBERG N., and W. GILBERT, 1985 Intron/exon structure of the chicken pyruvate kinase gene. *Cell* **40**: 81-90.
- LOUKAS, M., KRIMBAS, C. B., MAVRAGANI-TSIPIDOU, P., and C. D. KASTRITSIS, 1979 Genetics of *Drosophila subobscura* populations. VIII. Allozyme loci and their chromosome maps. *J Hered* **70**: 17-26.
- LOUKAS, M., KRIMBAS, C. B., and Y. VERGINI, 1984 Evolution of the *obscura* group *Drosophila* species. II. Phylogeny of ten species based on electrophoretic data. *Heredity* **53**: 483-493.
- LOUKAS, M., DELIDAKIS, C., and F. C. KAFATOS, 1986. Genomic blot hybridization as a tool of phylogenetic analysis: evolutionary divergence in the genus *Drosophila*. *J. Mol. Evol.* **24**: 174-188.
- LUCCHESI, J. C., 1978 Gene dosage compensation and the evolution of sex chromosomes. *Science* **202**: 711-716.
- MADHAVAN, K., CONSCIENCE-EGLI, M., SIEBER, F. and H. URSPRUNG, 1973 Farnesol metabolism in *Drosophila melanogaster*: Ontogeny and distribution of octanol dehydrogenase and aldehyde oxidase. *J. Insect Physiol.* **19**: 235-241.

- MAINX, F., KOSKE, T., and E. SMITAL, 1953 Untersuchungen über die chromosomale Struktur Europäischer Vertreter der *Drosophila obscura* Gruppe. Zeitschrift für indukt. Abstammungs und Vererbungslehre 85: S. 354-372.
- MANIATIS, T., FRITSCH, E. F., and J. SAMBROOK, 1982 *Molecular cloning: A laboratory manual*, 1st edition. Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor, New York.
- MARFANY, G., and R. GONZALEZ-DUARTE, 1991 The *Adh* genomic region of *Drosophila ambigua*: evolutionary trends in different species. J. Mol. Evol. 32: 454-462.
- MARFANY, G. and R. GONZÁLEZ-DUARTE, 1991 The *Drosophila subobscura Adh* genomic region contains valuable evolutionary markers. Mol Biol Evol (in press).
- MARONI, G., LAURIE-AHLBERG, C. C., ADAMS, D. A., and A. N. WILTON, 1982 Genetic variation in the expression of *Adh* in *Drosophila melanogaster*. Genetics 101: 431-446.
- MARTIN, G., WIERNASZ, D. and P. SCHEDL, 1983 Evolution of *Drosophila* repetitive-dispersed DNA. J. Mol. Evol. 19, 203-213.
- MARTINEZ-CRUZADO, J. C., SWIMMER, C., FENERJIAN, M. G., and F. C. KAFATOS, 1988 Evolution of the autosomal chorion locus in *Drosophila*. I. General organization of the locus and sequence comparisons of genes *s15* and *s19* in evolutionarily distant species. Genetics 119: 663-677.
- MCCARREY, J. R., and K. THOMAS, 1987 Human testis-specific PGK gene lacks introns and possesses characteristics of a processed gene. Nature 326: 501-505.
- MCDONALD, J. F., 1983 The molecular basis of adaptation: A critical review of relevant ideas and observations. Annu. Rev. Ecol. Syst. 14: 77-102.
- MCDONALD, J. H., and M. KREITMAN, 1983 Adaptive protein evolution at the *Adh* locus in *Drosophila*. Nature. 351: 652-654.
- MENOTTI-RAYMOND, M., STARMER, W. T., and D. T. SULLIVAN, 1991 Characterization of the structure and evolution of the *Adh* region of *Drosophila hydei*. Genetics 127: 355-366.
- MIYATA, T., 1982 Evolutionary changes and functional constraints in DNA sequences, pp 233-266 in *Molecular evolution and the neutral theory* edited by M. KIMURA. Japan Scientific Societies Press, Tokyo.
- MIYATA, T. and T. YASUNAGA, 1981 Rapidly evolving mouse α -globin-related pseudo gene and its evolutionary history Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78: 5450-453.

- MOLTO, M. D., DE FRUTOS, R., MARTINEZ-SEBASTIAN, M. J., 1987 The banding pattern of polytene chromosomes of *Drosophila guanche* compared with that of *D.subobscura*. *Genetica* 75: 55-70.
- MONCLUS, M., 1976 Distribución y ecología de Drosófilidos en España. III. Especies de *Drosophila* de las Islas Canarias, con la descripción de una nueva especie. *Bol. R. Soc. Española Hist. Nat. (Biol)* 74: 197-213.
- MONCLUS, M., 1984 The Drosophilidae of Madeira, with the description of *Drosophila madeirensis* n. sp. *Z. zool. Syst. Evolut. Forsch.* 22: 94-103.
- MONCLUS, M., and A. PREVOSTI, 1978-79 Cellars habitat and *Drosophila* populations. *Genética Ibérica* 30-31: 189-201.
- MULLER, H. J., 1940 Bearings of the *Drosophila* work on systematics, pp 185-268. in *The systematics* edited by J. Huxley. Clarendon Press, Oxford.
- NAVEIRA, H., PLA, C., and A. FONTDEVILA, 1986 The evolutionary history of *Drosophila buzzatii*. XI. A new method for cytogenetic localization based on asynapsis of polytene chromosomes in interspecific hybrids of *Drosophila*. *Genetica* 71: 199-212.
- NEI, M., 1972 Genetic distances between populations. *Amer. Natur.* 106: 283-292.
- NEVINS, J. R., 1983 The pathway of eucaryotic mRNA formation. *Ann Rev Biochem* 52: 441-466.
- OAKESHOTT, J., G., CHAMBERS, P., EAST, J., GIBSON, and J. BAKER, 1982 Evidence for a genetic duplication involving *Adh* in *D.buzatii* and related species. *Aust. J. Biol. Sci.* 35: 73-84.
- O'DONNELL, J., MANDEL, H. C., KRAUSS, M., and W. SOFER, 1977 Genetic and cytogenetic analysis of the ADH region in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 86: 553-566
- PALUMBI, S. R., 1989 Rates of Molecular evolution and the fraction of nucleotide positions free to vary. *J. Mol. Evol.* 29: 180-187.
- PAPACEIT, M., 1988 Estudio de las diferencias genéticas entre *D.subobscura* Collins y *D.madeirensis* Monclús. Tesis Doctoral, Universidad de Barcelona.
- PERLER, F., EFSTRATIADIS, A., LOMEDICO, P., GILBERT, W., KOLODNER, R., and J. DODGSON. 1980. The evolution of genes: the chicken preproinsulin gene. *Cell* 20: 555-566.
- PINSKER, W., and D. SPERLICH, 1984 Cytogenetic mapping of enzyme loci on chromosomes J and U of *Drosophila subobscura*. *Genetics* 108: 913-926

- POMINI, F. P., 1940 Contributi alla conoscenza delle *Drosophila* (Diptera, Acalyptera) europee. I. Deserzione di alcune specie riferibili al gruppo *obscura*. Boll. ist. entomol. univ. Bologna 12: 115-164.
- POSAKONY, J. W., FISHER, J. A., and T. MANIATIS. 1985. Identification of DNA sequences required for the regulation of *Drosophila* alcohol dehydrogenase gene expression. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 50: 515-520.
- PREVOSTI, A., RIBO, G., SERRA, L., AGUADÉ, M., BALAÑA, J., MONCLUS, M., and F. MESTRES. 1988. Colonization of America by *Drosophila subobscura*: Experiment in natural populations that supports the adaptative role of chromosomal -inversion polymorphism. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 5597-5600.
- RABINOW, L., and W. J. DICKINSON. 1981. A *cis*-acting regulator of enzyme tissue specificity in *Drosophila* is expressed at the RNA level. Mol. Gen. Genet. 183: 264-269.
- RABINOW, L., and W. J. DICKINSON. 1986. Complex *cis*-acting regulators and locus structure of *Drosophila* tissue ADH variants. Genetics 112: 523-537.
- RIBAS DE POUPLANA, LI., ATRIAN, S., GONZÁLEZ-DUARTE, R., FOTHERGILL-GILMORE, L., KELLY, S. M., and N. C. PRICE 1991. Structural properties of long- and short-chain alcohol dehydrogenases. Contribution of NAD⁺ to stability. Biochem J. 276: 433-438.
- RIGBY, P. W. J., DIECKMANN, M., RHODES, C., and P. BERG, 1977 Labeling deoxyribonucleic acid to high specific activity in vitro by nick translation with DNA polymerase I. J Mol Biol 113: 237-251
- ROGERS, J. H., 1983 Retroposons defined Nature 301: 460.
- ROGERS, J. H., 1985 The origin and evolution of retroposons Int. Rev. Cytol. 93: 187-279.
- ROSSMAN, M. G., LILJAS, A., BRANDEN, C., and L. J. BANASZAC. 1975. Evolutionary and structural relationships among dehydrogenases, pp. 61-102, in *The Enzymes. Oxidation-Reduction*, part A, edited by P. D. Boyer, Academic Press, New York.
- ROWAN, R., and W. J. DICKINSON, 1988 Nucleotide sequence of the genomic region coding for alcohol dehydrogenase in *Drosophila affinisdisjuncta*. J. Mol. Evol. 28: 43-54.
- ROWAN, R., and J. A. HUNT, 1991 Rates of DNA change and phylogeny from the DNA sequences of the alcohol dehydrogenase gene for five closely related species of hawaiian *Drosophila*. Mol. Biol. Evol. 8: 49-70.

- RUIZ, A., and A. FONTDEVILA, 1982 The evolutionary history of *Drosophila buzzatii*. III. Cytogenetic relationships between two sibling species of the *buzzatii* cluster. *Genetics* 101: 503-518.
- SANGER, F., NICKLEN, S., and A. R. COULSON, 1977 DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74: 5463-5467.
- SAMBROOK, J., FRITSCH, E. F., and T. MANIATIS,, 1989 *Molecular cloning: A laboratory manual*, 2nd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, U. S. A.
- SAVAKIS, C., and M. ASHBURNER, 1985 a simple gene with a complex pattern of transcription: the alcohol dehydrogenase gene of *Drosophila melanogaster*. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 50: 505-514.
- SAVAKIS, C., ASHBURNER, M., and J. H. WILLIS, 1986 The expression of the gene coding for alcohol dehydrogenase during the development of *Drosophila melanogaster*. *Dev. Biol.* 114: 194-207.
- SCHAEFFER, S. W., and C. F. AQUADRO, 1987 Nucleotide sequence of the *Adh* gene region of *Drosophila pseudoobscura*: evolutionary changes and evidence for an ancient gene duplication. *Genetics* 117: 61-73.
- SCWARTZ, M., and W. SOFER, 1976 alcohol dehydrogenase -negative mutants in *Drosophila*: defects at the structural locus. *Genetics* 83: 125-136.
- SHARP, P. M., and W-H. LI, 1989 On the rate of DNA sequence evolution in *Drosophila*. *J. Mol. Evol.* 28: 398-402.
- SHEN, N. L. L., SUBRAHMANYAM, G., CLARK, W., MARTIN, P., and W. SOFER, 1989 Analysis of *Adh* gene regulation in *Drosophila*: Studies using somatic transformation. *Dev. Genet.*, 10: 210-219.
- SINGER, M. F., 1982 SINES and LINES: Highly repeated short and long interspersed sequences in mammalian genomes. *Cell*.28: 433-434.
- SINGER, M., and P. BERG, 1991 *Genes and Genomes*, University Science Books and Blackwell Scientific Publications.
- SOARES, M. B., SCHON, E., HENDERSON, A., KARATHANASIS, S. K., CATE, R., ZEITLIN, S., CHIRGWIN, J. and A. EFSTRATIADIS, 1985 RNA-mediated gene duplication: the rat preproinsulin I gene is a functional retroposon. *Mol. Cell. Biol.*, 5 (8): 2090-2103.

- SOFER, W., and P. F. MARTIN, 1987 Analysis of alcohol dehydrogenase gene expression in *Drosophila*. *Ann Rev Genet* 21: 203-225.
- SOUTHERN, E. M., 1975 Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* 98: 503-517.
- SPRADLING, W., and P. F. MARTIN, 1987 Analysis of alcohol dehydrogenase gene expression in *Drosophila*. *Ann Rev Genet* 21: 203-225.
- STARMER, A. C., and G. M. RUBIN, 1981 *Drosophila* genome organization: Conserved and dynamic aspects. *Annu. Rev. Genet.* 15: 219-264.
- STEIN, J. P., MUNJAAL, R. P., LAGACE, L., LAI, E. C., O'MALLEY, B. W. and A. R. MEANS, 1983 Tissue-specific expression of a chicken calmodulin pseudogene lacking intervening sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80: 6485-6489.
- STEINEMANN, M., 1982 Analysis of chromosomal homologies between two species of the subgenus *Sophophora*: *D.miranda* and *D.melanogaster* using cloned DNA segments. *Chromosoma* 87: 77-88.
- STENEIMAN, M., PINSKER, W. , and D. SPERLICH, 1984 Chromosome homologies within the *Drosophila obscura* group probed by *in situ* hybridization. *Chromosoma* 91: 46-53.
- STEPHENS, J. C., and M. NEI, 1984 Estimation of evolutionary distance between nucleotide sequences. *Mol. Biol. Evol.* 1: 269-285.
- STONE, W. S., 1955 Genetic and chromosomal variability in *Drosophila*. *Cold Spring Harbor Symp Quant Biol* 20: 256-269.
- STUART, W. D., BISHOP, J. C., CARSON, H. L., and M. B. FRANK, 1981 Location of the 18/28S ribosomal RNA genes in two Hawaiian *Drosophila* species by monoclonal immunological identification of the RNA-DNA hybrids *in situ*. *Proc Natl Acad Sci USA* 78: 3751-3754.
- STURTEVANT, A. H., and E. NOVITSKI, 1941 The homologies of the chromosome elements in the genus *Drosophila*. *Genetics* 26: 517-541.
- SULLIVAN, D. T., ATKINSON, P. W., and W. T. STARMER, 1990 Molecular evolution of the alcohol dehydrogenase genes in the genus *Drosophila*, pp 107-147 in *Evolutionary Biology*, edited by M. K. HECHT, B. WALLACE, and R. J. MACINTYRE. Plenum, New York.

- TAKANO, T., KUSAKABE, S., KOGA, A., and T. MUKAI, 1989 Polymorphism for the number of tandemly multiplied glycerol-3-phosphate dehydrogenase genes in *Drosophila melanogaster*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 5000-5004.
- TEMIN, H. M., 1989 Retrons in bacteria. Nature 339: 254-255.
- THATCHER, D. R., 1980 The complete aminoacid sequence of three alcohol dehydrogenase alleloenzymes (Adhⁿ⁻¹¹, Adh^S and Adh^{UF}) from the fruitfly *D. melanogaster*. Biochem J 187: 875-886
- THROCKMORTON, L., 1975 The phylogeny, ecology, and geography of *Drosophila*, pp 421-469 in *Handbook of Genetics*, vol 3, edited by R. C. KING, Plenum, New York.
- TICHER, A., and D. GRAUR, 1989 Nucleic acid composition, codon usage, and the rate of synonymous substitution in protein-coding-genes. J. Mol. Evol. 28: 286-298.
- URSPRUNG, H., SOFER, W. H., and N. BURROUGHS, 1970 Ontogeny and tissue distribution of alcohol dehydrogenase in *Drosophila melanogaster*. Wilhem Roux' Archiv. 164: 201-208.
- VANDELLEN, W., 1982 The alcohol dehydrogenase polymorphism in *Drosophila melanogaster*. Selection at an enzyme locus, pp. 187-222 in *Evolutionary Biology*, vol 15, edited by M. K. HECHT, B. WALLACE, and R. J. MACINTYRE. Plenum, New York.
- VANIN, E. F., 1985 Processed pseudogenes: characteristics and evolution Ann. Rev. Genet. 19: 253-272.
- VILAGELIU, LI., and R. GONZÁLEZ-DUARTE, 1984 Alcohol dehydrogenase from *Drosophila funebris* and *Drosophila immigrans*: molecular and evolutionary aspects. Biochem Genet 22: 797-815.
- VILARROYA, A., and E. JUAN, 1991 ADH and phylogenetic relationships of *Drosophila lebanonensis*. (Scaptodrosophila). J. Mol. Evol. 32: 421-428.
- VILARROYA, A., JUAN, E., EGESTAD, B., and H. JÖRNVALL, 1989 The primary structure of alcohol dehydrogenase from *Drosophila lebanonensis*. Extensive variation within insect "short-chain" alcohol dehydrogenase lacking zinc. Eur. J. Biochem. 180: 191-197.
- VISA, N., 1991. Análisis citológico y ultraestructural de la expresión del gen *Adh*. Actividad transcripcional en cromosomas politénicos e inmunolocalización de la proteína ADH en *Drosophila melanogaster*. Tesis Doctoral, Universidad Autónoma de Barcelona.

- VISA, N., MARFANY, G., VILAGELIU, LL., ALBALAT, R., ATRIAN, S., and R. GONZALEZ-DUARTE, 1991 The *Adh* locus in *Drosophila*: chromosomal location and restriction analysis in species with different phylogenetic relationships. *Chromosoma* (in press).
- WAGNER, M. 1986 A consideration of the origin of processed pseudogenes T.I.G. 2(5): 134-137.
- WEINER, A. M., DEININGER, P. L. and A. EFSTRATIADIS, 1986 Nonviral retroposons: genes, pseudogenes, and transposable elements generated by the reverse flow of genetic information *Ann. Rev. Biochem.*,55: 631-661.
- WHITING, J. H. Jr., PLILEY, M. D. FARMER, J. L., and D. E. JEFFERY, 1989 *In situ* hybridization analysis of chromosomal homologies in *Drosophila melanogaster* and *Drosophila virilis*. *Genetics* 122: 99-109.
- WILHELMINE, A. M. L, and F. R. BLATTNER, 1983 Lambda Charon vectors (Ch32,33,34 and 35) adapted for DNA cloning in recombination-deficient hosts. *Gene* 26: 171-179.
- WINBERG, J.-O., HOVIK, R., MCKINLEY-MCKEE, J. S., JUAN, E.,and R. GONZÀLEZ-DUARTE, 1986 Biochemical properties of alcohol dehydrogenase from *Drosophila lebanonensis*. *Biochem. J.* 235: 481-490.
- WINBERG, J.-O., THATCHER, D. R., and J. S. MCKINLEY-MCKEE, 1982 Alcohol dehydrogenase from the fruitfly *Drosophila melanogaster*: Substrate specificity of the alleloenzymes Adh^S and Adh^{UF}. *Biochim. and Biophys. Acta* 704: 7-16.
- YANISCH-PERRON, C., VIEIRA, J., and J. MESSING, 1985 Improved M13 phage cloning vectors and host strains: Nucleotide sequences of M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* 33: 103-119.
- YOON, J. S., RESCH, K., and M. R. WHEELER, 1972 Intergenetic chromosomal homology in the family Drosophilidae. *Genetics* 71: 447-480.
- ZHIMULEV, I. F., SEMESHIN, V. F., KULICHKOV, V. A., and E. S. BELYAEVA, 1982 Intercalary heterochromatin in *Drosophila*. I. Localization and general characteristics. *Chromosoma* 87: 197-227.



