A microscopic image showing several purple, X-shaped chromosomes against a black background. The chromosomes are arranged in a somewhat circular pattern, with some overlapping. The text is overlaid on the right side of the image.

# Els transposons, uns individus egoistes dins nostre

*PSEUDÒNIM: Tulipa*

---

*“If you know you are on the right track, if you have this inner knowledge, then nobody can turn you off... no matter what they say.”*

*“Si tu saps que estàs en el camí correcte, si tu tens aquest coneixement intern, llavors ningú et pot apagar aquest desig... no importa el que diguin.”*

**Barbara McClintock**

---

## Contingut

<b>1. INTRODUCCIÓ</b> .....	2
<b>2. PART TEÒRICA</b> .....	4
<b>2.1. Què són els elements transposables?</b> .....	5
<b>2.2. Història i descobriment</b> .....	6
<b>2.3. Transposició</b> .....	8
<b>2.4. Mecanismes de transposició</b> .....	8
<b>2.5. Classificació segons els mecanismes de transposició</b> .....	10
<b>2.6. Impacte dels transposons en el genoma</b> .....	19
<b>2.6.1. Impacte negatiu: mutacions</b> .....	24
<b>2.7. Mecanismes de regulació o silenciament de la transposició</b> .....	28
<b>2.7.1. Silenciament posttranscripcional (PTGS)</b> .....	29
<b>2.7.2. Silenciament transcripcional (TGS): la metilació</b> .....	33
<b>3. PART EXPERIMENTAL</b> .....	35
<b>3.1. Fonament teòric</b> .....	35
<b>3.2. Objectiu</b> .....	37
<b>3.3. Tècniques i material utilitzat</b> .....	38
<b>3.4. Pràctica</b> .....	46
<b>4. CONCLUSIONS</b> .....	60
<b>5. BIBLIOGRAFIA I WEBGRAFIA</b> .....	62
<b>6. AGRAÏMENTS</b> .....	65
<b>7. ANNEXOS</b> .....	66

# 1. INTRODUCCIÓ

---

## ***Presentació***

En aquest treball em proposo parlar dels elements transposables, també anomenats transposons o elements mòbils, que són unes seqüències de DNA que constitueixen una elevada proporció dins del genoma d'organismes eucariotes i procariotes. El primer indici de la seva existència se situa a mitjans del segle XX, amb la genetista Barbara McClintock. En aquell moment es va considerar "DNA brossa" ja que consistia en seqüències de DNA no codificants, però avui, s'està demostrant que tenen una gran importància dins del nostre genoma.

Fins on coneixem avui, un nombre d'aquests elements es troben activats i salten dins del nostre genoma. Conseqüentment, aquestes insercions generen una font de variació genètica i, en rars casos, aquests esdeveniments causen mutacions que donen lloc a malalties les quals s'han estudiat tant en humans com en ratolins. No obstant això, no es pot entendre el perquè d'aquestes insercions ni tampoc la seva causa.

Durant dècades, els transposons s'han qualificat com elements egoistes ja que es mantenen dins del genoma perquè allí es poden replicar junt amb ell. No obstant això, aquests elements repetitius amb la capacitat de duplicar-se, de moure's lliurement pel genoma i de provocar reordenaments, possibiliten una important capacitat evolutiva en els genomes hostes<sup>1</sup>. Actualment, s'està començant a considerar que aquests elements juguen un paper important en l'evolució dels organismes, probablement com a resultat del desenvolupament d'una relació simbiòtica amb l'hoste, és a dir, una relació en què ambdós, tant l'hoste com l'element transposable, es beneficien recíprocament.

Totes aquestes qüestions argumentades fins ara són els punts que tractaré al llarg del treball.

## ***Metodologia***

Per desenvolupar-lo he utilitzat majoritàriament recursos bibliogràfics: des d'un gran nombre d'articles científics – la majoria en anglès – fins a enciclopèdies de biologia i genètica. Per altra banda, també m'he ajudat de pàgines webs, tot i que la informació en castellà o en català era

---

<sup>1</sup> No utilitzarem el significat clàssic d'*hoste* com a l'organisme que dona allotjament o nodriment, o les dues coses alhora, a un altre; sinó com a l'organisme en el qual es troben els transposons. Doncs els transposons formen part de l'organisme, i no són organisme per sí mateixos, sinó seqüències de DNA.

totalment escassa i m'he hagut de recolzar de pàgines en anglès. Una gran dificultat, doncs, pel que fa a la recerca teòrica.

Per altra banda, la part pràctica ha estat més fàcil, dins del que cap, ja que durant l'estiu vaig estar a la Universitat Autònoma de Barcelona (UAB) realitzant l'estada a l'empresa tot participant al Programa Argó, el qual es caracteritza per facilitar el contacte de l'alumnat amb el món de la universitat. Dins de la gran diversitat de temes i projectes que oferien, em vaig decantar per "L'estudi dels transposons i els seus gens reguladors en el genoma de la *Drosophila*". No és un tema que n'hagués sentit a parlar abans i és també aquest un dels motius que em va portar a tenir una gran intriga per saber-ne més sobre el tema. Allí vaig realitzar diverses pràctiques en un laboratori i em vaig endinsar en el món de la investigació, en aquest cas, de la genètica. Per altra banda també he pogut experimentar el primer contacte amb la bioinformàtica. A causa del poc temps que vam tindre, durant l'estada (només dues setmanes), per a realitzar la pràctica, la part de bioinformàtica va ser una tasca que vaig realitzar casa. És per això que aquesta va ser una altra part que va requerir molt d'esforç, donat que mai abans havia utilitzat programes d'aquell tipus.

### ***Justificació i objectius***

La temàtica del treball de recerca va ser un punt bastant complicat al principi. Tenia molt clar que el volia relacionar amb l'àmbit biològic i de l'ésser humà, però no sabia quin tema podria ser el més adequat, ni quin estaria al meu abast pel que fa a la part pràctica.

Aleshores, vaig decidir participar al Programa Argó, tal i com ja he explicat abans, i gràcies a ell vaig poder gaudir d'una gran estada envoltada de matrassos, vasos de precipitats i de tot tipus de material utilitzat en els laboratoris. Al cap i a la fi, un altre dels motius pel què he escollit aquesta temàtica és perquè es troba estretament lligada al futur al qual aspiro professionalment. L'àmbit de la investigació és el que em crida més l'atenció, sobretot per poder respondre les causes i les conseqüències de qüestions encara no aclarides. Qüestions que ajudaran a millorar la qualitat de vida de la nostra societat i a obrir un gran nombre de portes al món de la ciència, la qual es troba evolucionant dia rere dia.

Conseqüentment, l'objectiu que ens marquem és donar a conèixer el món dels transposons i del material genètic en general, el qual conté tota la informació del nostre ser. Al mateix temps, des d'un punt de vista pràctic, pretenem donar resposta a una qüestió: tenint en compte la diferent activitat observada d'alguns transposons en l'organisme *Drosophila subobscura*, més coneguda com a mosca de la fruita, pot, aquesta, ser deguda a una alteració d'un dels mecanismes de regulació de la transposició?

Com ja veurem més endavant, donar resposta a aquesta pregunta ens resultarà molt complicat ja que les variacions donades en el material genètic no es regeixen només a un canvi en la regulació d'aquest, sinó també a d'altres factors externs com la latitud en què viu l'organisme, l'hàbitat d'aquest o la temperatura. Tot i així, els experiments realitzats m'han permès augmentar els meus coneixements, en diferència, als què tenia abans de començar.

### ***Eixos del treball***

Aquest es pot dividir en dos grans parts: una primera, la part teòrica, en què parlaré sobre els transposons com a elements mòbils, la seva classificació, les seves conseqüències... i en una segona, la part experimental, en la qual utilitzo els conceptes coneguts a partir de la part teòrica per poder estudiar en precisió un dels mecanismes de regulació de la transposició. Així doncs, he realitzat el treball a partir de la part pràctica: coneixent l'objectiu d'aquesta vaig acabar de concretar en què s'havia de fonamentar la part teòrica del treball en qüestió.

Abans de començar, recomano a tots els lectors que facin un cop d'ull a l'*annex 1*, donat que aquest tema és bastant específic, de certa complexitat i també fàcil de perdre's. Allí hi trobareu una petita introducció a la genètica amb els conceptes bàsics i necessaris per poder comprendre millor el contingut del treball i perquè sigui el màxim entenedor possible, des de les parts de la cèl·lula, passant pel nucli i material genètic fins a la teoria d'«un gen, un enzim».

## 2. PART TEÒRICA

### 2.1. Què són els elements transposables?

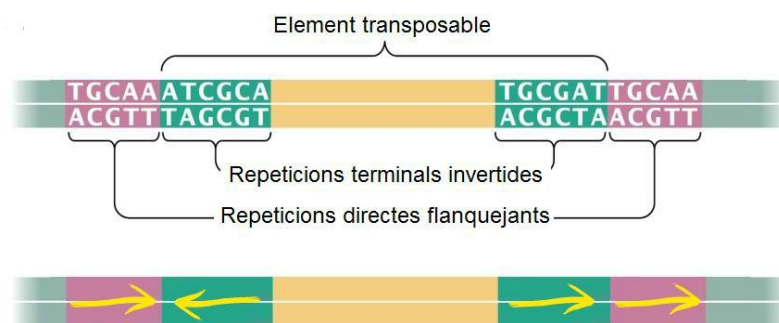
Els **elements transposables (ETs)** o **transposons** són seqüències de DNA que es troben en els genomes de tots els organismes i que tenen la capacitat de moure's d'un lloc a l'altre dins del genoma. La seva presència en els genomes és bastant abundant donat que representen aproximadament un 45% del genoma humà.

Encara que molts d'aquests elements poden codificar proteïnes, aquestes proteïnes no realitzen funcions cel·lulars. És per això que aquests elements, sovint, es descriuen com a **DNA brossa (junk DNA)**, juntament amb d'altres seqüències repetitives.

Freqüentment aquests elements donen lloc a mutacions a través de la inserció en un altre gen tot interrompent-lo, o a través de la inducció de modificacions, és a dir, de mutacions en la seqüència de DNA, com per exemple delecions, duplicacions i inversions.

A diferència dels plasmidis, els ETs no existeixen mai de forma independent, sinó que sempre formen part del DNA del cromosoma o del mateix plasmidi. És per això que sovint són descrits com a paràsits de DNA "egoistes", de l'anglès "*selfish DNA parasites*".

Hi ha molts tipus diferents d'ETs, des dels que posseeixen una estructura molt simple per poder moure's, moviment conegut amb el nom de **transposició**, fins els que tenen una estructura més complexa i codifiquen funcions que no venen relacionades de manera directa amb la transposició. Tot i així, existeixen característiques comunes en tots els transposons (**Figura 1**):

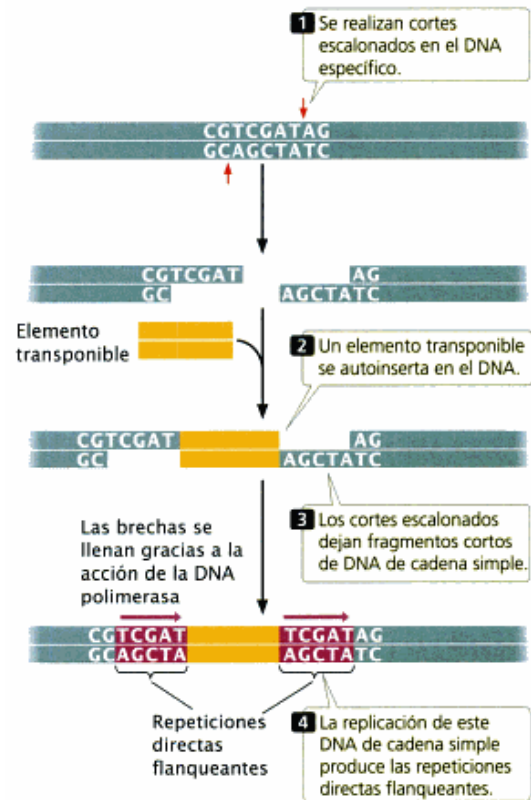


**Figura 1. Característiques comunes en els transposons**

Font: [http://www.science20.com/curious\\_cub/jumping\\_genes\\_and\\_replication-82396](http://www.science20.com/curious_cub/jumping_genes_and_replication-82396)

- **Repeticions directes flanquejants:** són seqüències de DNA relativament curtes que mesuren entre 3 i 12 pb<sup>2</sup> de longitud i que poden trobar-se a ambdós costats de la majoria de transposons. No formen part de l'ET i no es mouen amb ell, sinó que es formen durant el procés de transposició en el lloc en el que s'insereix l'element. En un mateix tipus d'ET pot variar-ne la seqüència d'aquesta repetició, però la mida serà la mateixa.

La presència de repeticions directes flanquejants indica que quan el transposó s'insereix en el DNA produeix talls escalonats en el filament. Els talls escalonats deixen fragments curts de DNA de cadena simple a cada costat de l'ET. Després, la replicació del DNA de cadena simple a través de l'ADN polimerasa produeix les repeticions directes flanquejants (**Figura 2**).



**Figura 2. Repeticions directes flanquejants, formades per la inserció d'un transposó.** Font: llibre Biología (Ed. Médica Panamericana)

- **Repeticions terminals invertides:** seqüències que mesuren entre 9 i 40 pb de longitud que són antiparal·leles però complementàries al mateix temps. Es troben en els extrems de molts ETs, tot i que no hi són presents en tots. Aquestes seqüències són necessàries per tal que es produeixi la transposició i són reconegudes pels enzims que catalitzen aquest mateix procés: les *transposases*.

## 2.2. Història i descobriment

La primera evidència dels ETs prové dels experiments de creuaments amb blat de moro de la genetista nord-americana **Barbara McClintock** (Hartford, Estats Units, 1902 – Huntington, Estats Units, 1992) en les dècades de 1940 i 1950, fa més de 50 anys (**Figura 3**).

El descobriment dels ETs realitzat per McClintock es basa en l'estudi inicial del genetista Rollins A. Emerson (1873 – 1947) relacionat amb els gens del blat de moro que produïen grans de molts colors. Gran part d'aquests grans presenten una pigmentació completa o són incoloros (grocs),

<sup>2</sup> Parells de bases: mesura de longitud d'àcids nucleics de cadena doble. S'entén per dos nucleòtids oposats en cadenes de DNA o RNA complementàries enllaçats per ponts d'hidrogen.



però Emerson va anar més enllà i quan va observar que alguns grans grocs tenien taques o ratlles de color va plantejar que aquests grans provenien d'una mutació inestable sense poder-ne trobar la raó: una mutació en el gen del pigment produïa un gra incolor, però si en algunes cèl·lules el gen tornava al seu estat natural apareixien en el gra taques de pigment.



**Figura 3.** McClintock estudiant l'efecte dels elements transposables sobre el color del gra de blat de moro. Font: [https://en.wikipedia.org/wiki/Barbara\\_McClintock](https://en.wikipedia.org/wiki/Barbara_McClintock) / <http://blogthinkbig.com/barbara-mcclintock-genes-saltarines/>

En canvi, McClintock va endinsar-se més en el tema i va descobrir que la causa de la mutació inestable era l'existència d'elements genètics capaços de traslladar-se entre i a través dels gens del genoma. McClintock va observar que es produïa un trencament en el cromosoma del blat de moro a partir d'un gen que va anomenar **Dissociació** (*Dissociation, Ds*) però només quan hi havia

un altre gen que va anomenar **Activador** (*Activator, Ac*). Basant-se en aquest fet, va poder deduir que la regulació de l'activació i desactivació de certs gens implicats en la coloració del blat de moro podia alterar-se com a conseqüència de la presència dels gens *Dissociació* i *Activador* amb la capacitat de transposició, als quals va anomenar **elements de control** perquè controlaven l'expressió d'altres gens.

Quan McClintock el 1948 va publicar els resultats del seu treball, aquests van ser mal interpretats i ignorats durant molts anys. Tot i que McClintock es va sentir decebuda per la reacció de la comunitat científica, va continuar amb la seva investigació.

No va ser fins el 1960 que es van descobrir els ETs en els bacteris gràcies a l'avanç en tècniques moleculars i es va acceptar universalment la importància de la transposició. Entre 1970 i 1980, gràcies al desenvolupament de les tècniques de DNA recombinant, es va demostrar l'existència d'ETs en tots els organismes.

Des d'aleshores, un elevat nombre d'elements mòbils han estat identificats tant en el genoma d'organismes eucariotes com en el d'organismes procariotes. Avui en dia, el treball de McClintock es troba entre els descobriments fonamentals de la genètica.

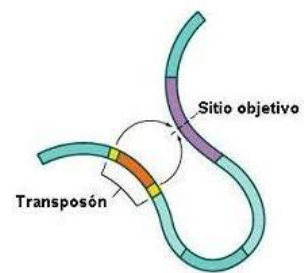
El 1983 es va reconèixer la importància dels descobriments de McClintock i va rebre el Premi Nobel de Fisiologia o de Medicina.

### 2.3. Transposició

La **transposició** és el moviment d'un ET d'un lloc a un altre. Hi ha diversos mecanismes de transposició que es duen a terme tant en les cèl·lules eucariotes com en les cèl·lules procariotes. Tot i així, existeixen característiques comunes en aquests mecanismes (**Figura 1**):

- 1) En el filament de DNA on es produeix la inserció de l'ET s'hi generen **talls escalonats**.
- 2) L'ET s'uneix als extrems de cadena simple de la seqüència diana de DNA.
- 3) El DNA present en les esclatxes de cadena simple es replica.

A vegades, aquests elements s'anomenen "**gens saltadors**", però es pot mal interpretar el concepte perquè mai es desenganxen completament del DNA de la cèl·lula, sinó que el lloc original del DNA i el nou es reuneixen mitjançant un plegament del DNA (**Figura 4**).



Els transposons varien en la seva selectivitat pels llocs diana, però la majoria poden moure's a moltes localitzacions alternatives del DNA on abans mai havien existit gens d'aquell tipus.

**Figura 4.** Font: <https://ydequehablamosahora.wordpress.com/2013/06/26/como-los-transposones-se-duplican-y-saltan-en-el-adn-sin-invasor/>

### 2.4. Mecanismes de transposició

Tal com ja hem dit anteriorment, hi ha diferents mecanismes de transposició:

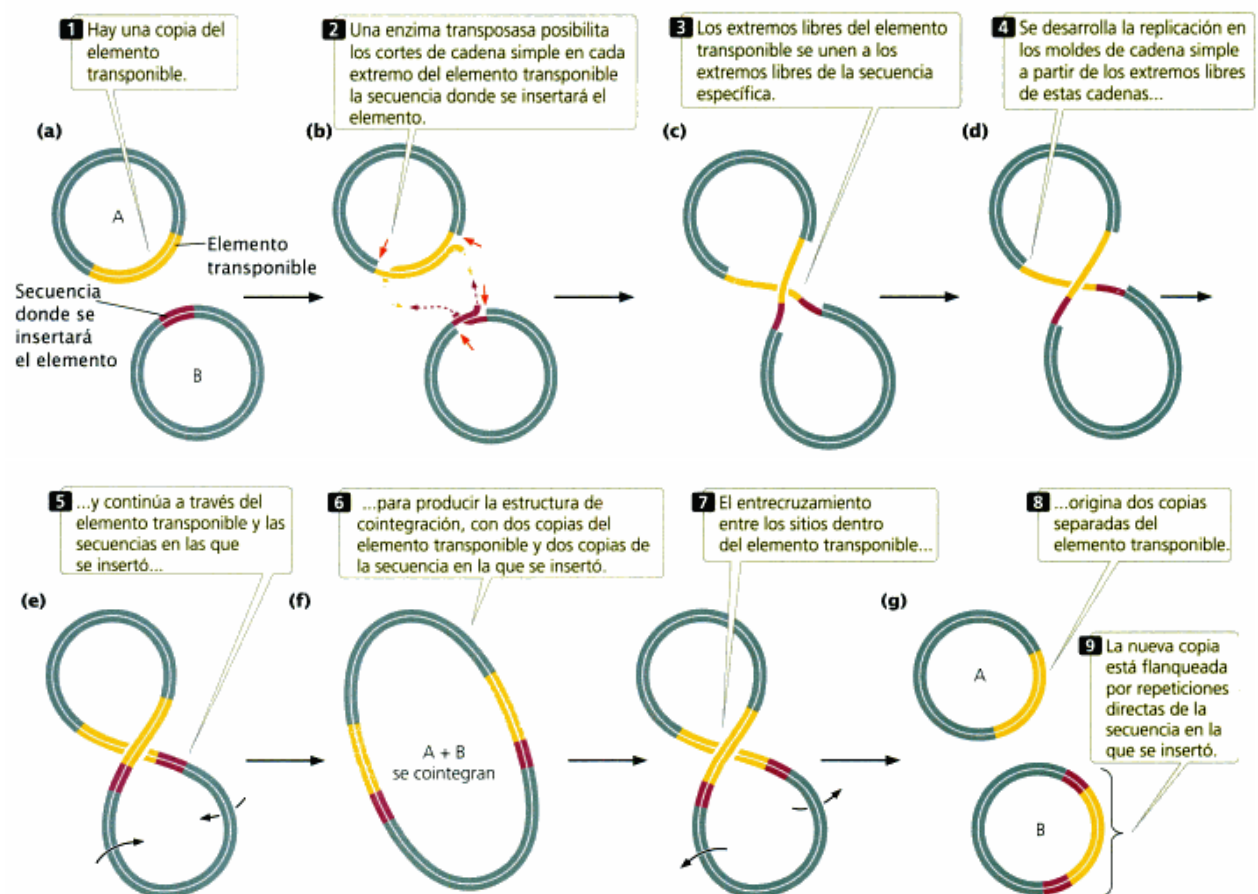
#### **La transposició replicativa ("de copiar i enganxar")**

Consisteix en la introducció d'una còpia nova de l'ET en un lloc nou mentre que la còpia vella roman en el lloc original. Conseqüentment, hi ha un augment de còpies de l'ET.

Els passos que se segueixen en la transposició replicativa són els següents (**Figura 5**):

1. Abans de la transposició només hi ha la presència d'una sola còpia de l'ET.
2. **Formació de la cointegració:** les dues molècules de DNA s'uneixen i l'ET es replica per donar lloc a l'*estructura de cointegració* formada per les dues molècules fusionades amb dues còpies de l'ET. Aquest pas està format per 4 fases:
  - a. L'enzim **transposasa**, freqüentment codificat per l'ET, produeix talls d'una sola cadena a cada extrem de l'ET i a cada costat de la seqüència on s'inserirà l'ET.

- b. Els extrems lliures de l'ET s'uneixen als extrems lliures de la seqüència on s'insereix aquest.
  - c. Es produeix la replicació sobre els motlles de cadena simple de les seqüències i del transposó.
  - d. Aquesta replicació dóna lloc a l'*estructura de cointegració* formada per les 2 còpies de l'ET i les 2 còpies de la seqüència on s'havia d'insereix l'ET.
3. Resolució de la cointegració: consisteix en l'entrecruament de regions dins de les còpies de l'ET que dóna lloc a dues molècules, cadascuna d'elles amb una sola còpia de l'ET. Aquest pas depèn dels enzims **resolvases**, codificats per l'ET o per un gen cel·lular.



**Figura 5. Mecanisme de transposició per replicació el qual permet un increment de còpies de l'ET.** Font: llibre *Genética: Un enfoque conceptual* (Ed. Médica Panamericana)

**La transposició no replicativa ("de tallar i apear")**

Consisteix en la escissió de l'ET del lloc on es trobava i la seva inserció en un lloc nou del DNA sense augmentar-ne la quantitat de còpies. Encara que l'ET es mou d'un lloc a un altre sense replicar-se del tot, sí que es repliquen les seqüències de DNA que formen les repeticions directes flanquejants.

Per l'escissió és necessària l'enzim **transposasa** codificada per l'ET. Després de l'escissió queda un tall en el lloc de la inserció original. Aquests talls són nocius per la cèl·lula per això es reparen eficientment: es replica el segment de DNA trencat a partir del motlle homòleg present en la cromàtide germana i, per tant, es restableix la còpia original. Abans de la transposició les dues cromàtides tenien una còpia de l'ET. Després de la transposició i de la reparació del trencament la quantitat de còpies de l'ET haurà augmentat en una unitat. Per tant, el nombre de còpies d'ETs no augmenta durant la transposició, sinó que augmenta gràcies al mecanisme de reparació.

## 2.5. Classificació segons els mecanismes de transposició

Existeixen diverses formes de classificar els transposons, com la forma taxonòmica (Hull 2001), que es basa en les relacions de parentesc entre els ETs, o en funció de les proteïnes implicades en la transposició (Curcio 2003). Ara bé, no existeix cap sistema que classifiqui clarament tots els tipus d'elements descrits ni que determini la relació filogenètica que hi ha entre ells. Per aquest motiu, la classificació més utilitzada és la més simple, la proposada per D. Finnegan el 1989 (veure *annex 2*) en dues grans classes, la classe I i la classe II, en funció del seu mecanisme de transposició.

La classificació presentada a continuació inclou alguns exemples d'ETs dins de cada classe, però no hi apareixen tots els transposons coneguts fins avui ja que n'hi ha molts i no són rellevants per poder fer-se una idea general del concepte i classificació d'aquests.

### **Elements transposables de CLASSE I o retrotransposons.**

Utilitzen el mecanisme de **transposició a través d'un intermediari de RNA**. És a dir, l'ET (DNA) es transcriu a RNA, es mobilitza, es retrotranscriu a DNA utilitzant un enzim especial que ells mateixos codifiquen, la *transcriptasa inversa*, que genera repeticions directes flanquejants curtes a ambdós costats del retrotransposó, i finalment el retrotransposó s'insereix a la seva nova destinació.

Per tant, els retrotransposons es transposen per transcripció inversa d'un RNA intermediari mitjançant un mecanisme ADN-ARN-ADN (*Figura 6*). A més, no es troben en organismes procariotes, sinó que només en eucariotes. En els organismes eucariotes hi són presents tant els transposons de DNA com els retrotransposons, encara que aquests últims hi són més freqüents.

Fins ara, es creia que els retrotransposons, especialment els retrotransposons LTR, derivaven de retrovirus per la semblança en l'estructura, les funcions, les seqüències genòmiques o els moviments però, actualment, la hipòtesi més acceptada és que podria ser al revés, és a dir, que fossin els retrovirus els derivats dels retrotransposons.

Els retrotransposons són la única família d'elements mòbils que es troben actius en els genoma dels humans i dels primats i són ells mateixos els que serveixen com a font de variació genètica tot generant noves insercions.

Es classifiquen en elements autònoms, que són els capaços de codificar els enzims necessaris per la seva transposició, i en elements no autònoms. Els primers inclouen dues subclasses, i els no autònoms inclouen principalment les seqüències SINEs, encara que també n'hi ha d'altres com ara les SVAs.

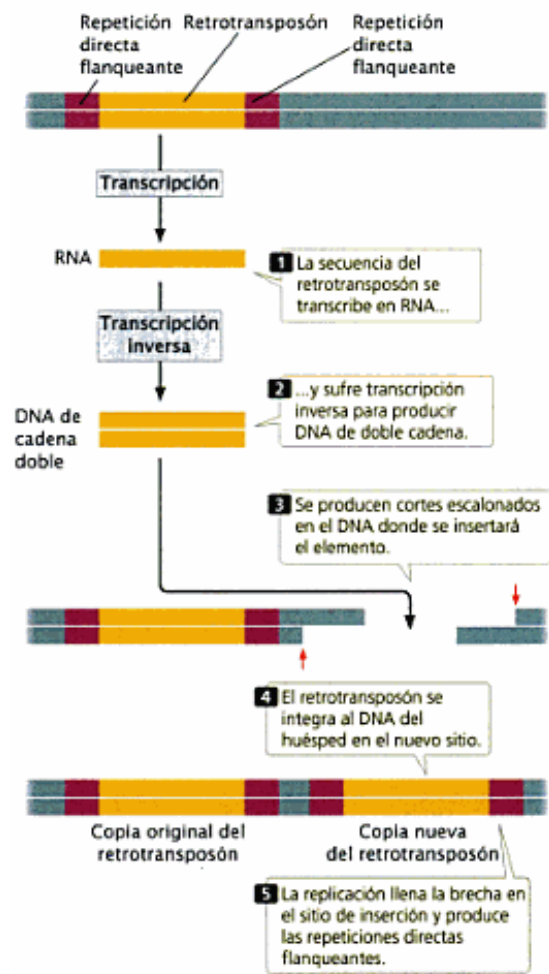
➤ **Elements autònoms amb LTR (Long Terminal Repeat o Repetició Terminal Llarga):**

comprehen el 8% del genoma humà i posseeixen repeticions terminals llargues (LTR) formades per entre 200 i 600 pb en els extrems 5' i 3' que contenen senyals per la iniciació i la terminació de la transcripció del ARN intermediari. Per tant, aquestes repeticions terminals llargues tenen un paper fonamental en el mecanisme de transposició. Tal com hem dit, s'anomenen autònoms ja que tenen la **capacitat de codificar** les proteïnes necessàries per a la seva transposició.

La transcripció inversa de l'ARN té lloc en el citoplasma.

Alguns tipus d'elements autònoms amb LTR són els següents:

- Retrovirus endògens (ERV). Són restes de virus que han perdut l'habilitat de tornar a infectar cèl·lules.
- Elements còpia en *Drosophila*. Els elements còpia són un dels millors estudiats en *Drosophila* i es tracta d'un retrotransposó que mesura unes 5000 pb de longitud. Aquest retrotransposó té repeticions directes, és a dir, no invertides, de 27 pb en



**Figura 6. Mecanisme de transposició dels retrotransposons.** Font: llibre *Genética: Un enfoque conceptual* (Ed. Médica Panamericana)

cada extrem i dins de cadascuna hi ha repeticions terminals invertides. Quan l'element *cop* es transposa, produeix repeticions directes flanquejants de 5 pb de longitud en el lloc d'inserció. La quantitat d'elements còpia en el genoma de la *Drosophila* oscil·la entre 20 i 60.

→ Elements *Ty* (*Transposon Yeast*) en llevats. En cada extrem d'un element *Ty* es troben repeticions directes denominades **seqüències delta** que mesuren 334 pb de longitud. Aquestes seqüències contenen promotors que permeten la transcripció dels gens *Ty* a RNA per possibilitar-ne la transposició.

➤ **Elements autònoms sense LTR o non-LTR:** la transcripció inversa i la inserció es realitza en el DNA del nucli.

Encara que hi ha una certa similitud entre els elements sense LTR i els elements LTR, el mecanisme de transposició i integració dels elements sense LTR és diferent al dels elements LTR a causa de l'absència de les seqüències LTR essencials per aquests processos.

Tenen la **capacitat de codificar** les proteïnes necessàries per la seva transposició, per això se'ls defineix com a retrotransposons autònoms.

Els retrotransposons non-LTR també s'anomenen LINE (*Long Interspersed Nuclear Element o element nuclear intercalat llarg*). Són els retrotransposons autònoms més abundants en els humans i representen aproximadament entre el 18 i el 21% del DNA humà. S'anomenen *llargues* ja que les seqüències LINE completes tenen al voltant de 6000 pb. Tot i així, la major part de les còpies estan escurçades i, per tant, la longitud mitjana és de només 900 pb aproximadament. Per altra banda, s'anomenen *intercalades* perquè es troben entre repeticions directes flanquejants.

Al igual que les SINE (*veure pàgina 13*), la major part de les LINE estan truncades en l'extrem 5'.

Al llarg de diverses investigacions, s'han anat trobant en el genoma de diferents organismes (insectes, protozoous, fongs, aus, plantes, amfibis i mol·luscs) la presència de seqüències amb una gran homologia amb l'element L1, present en tots els mamífers, pel que fa a l'estructura i a la seqüència, però que es troben en un nombre de còpies bastant baix i inclús tenen una localització específica. És per això que s'han determinat unes propietats globals dels elements LINE trobades comunament: són elements mòbils actius capaços de codificar les proteïnes involucrades en el procés de la transposició, posseir en l'extrem 3'

una cua de poli (A) – regió rica en adenines – i contenir repeticions directes flanquejants d'entre 5 i 10 nucleòtids.

Dins dels elements LINE es troben dues classes:

- \* Elements de lloc específic: són els elements que poden integrar-se en una regió específica del genoma de l'hoste.
- \* Elements de lloc no específic: elements que es troben inserits de manera dispersa al llarg del genoma. En aquest grup s'hi troba l'element **L1 d'humans** o **L1Hs**, que representa al voltant del 17% del DNA en humans. La majoria de les seqüències dels elements L1, el 95% d'aquests, es troben inactius i per tant no es poden moure a noves localitzacions del genoma; però una petita part de L1 específics en humans es poden retrotransposar-se de forma autònoma a noves destinacions. Aquestes insercions estimulen l'aparició de mutacions en el genoma de l'hoste.

➤ **SINEs (Short Interspersed Nuclear Element o Element Nuclear Dispers Curt)**. Són retrotransposons **no autònoms** que necessiten les proteïnes codificades pel transposó LINE-1 (L1) per poder mobilitzar-se. Les SINE representen al voltant de l'11% del genoma humà.

Aquests elements, majoritàriament, són còpies de transposons que estan escurçats en l'extrem 5' a causa, probablement, que el procés de transcripció acabés abans que es copiés la seqüència completa. S'ha determinat que les SINE produeixen les mutacions observades en més de 20 casos de malalties genètiques humanes.

Usualment són seqüències menors de 500 pb que es troben disperses al llarg del genoma de l'hoste.

Les seqüències SINE més conegudes són les *Alu* en els éssers humans, però també n'hi ha d'altres com ara les B1 de rosegadors, les ID de rates, les B2 de ratolins o les C de conills.

- \* Seqüències *Alu* en els éssers humans. Totes les cèl·lules humanes contenen més d'1 milió de còpies d'*Alu* relacionades però no idèntiques en els seus cromosomes que representen un 10% del genoma humà aproximadament. Les seqüències *Alu* estan formades per uns 300 pb de llargada i produeixen repeticions directes flanquejants curtes quan s'insereixen en el DNA.

No codifiquen cap proteïna encara que són transcrits a RNA, i si tenen alguna funció cel·lular, es desconeix.

Cal observar que els ETs són de gran importància, doncs 1 de cada 600 mutacions que donen lloc a malalties són degudes a la transposició d'una seqüència LINE o SINE (veure apartat 2.6).

### **Elements transposables de CLASSE II o transposons de DNA.**

Es mobilitzen en forma de DNA. Utilitzen els mecanismes de transposició replicativa i el de transposició no replicativa, però mai utilitzen intermediaris de RNA. Per poder realitzar la transposició codifiquen una *transposasa*.

Aquests elements es troben relativament inactius en els mamífers i en poca freqüència. Per exemple, en els humans, els transposons de DNA representen una petita fracció del genoma, un 3%.

Posseeixen *repeticions terminals inverses curtes* i generen *repeticions directes flanquejants curtes* en els llocs on s'insereixen.

#### ❖ Transposons en bacteris (procariotes):

En els bacteris no s'hi troben retrotransposons, sinó que només s'hi troben **transposons de DNA**. Els ETs en organismes procariotes podrien haver estat una font evolutiva de virus, ja que tenen certes similituds, com ara el fet que ambdós són considerats **elements genètics mòbils**.

La principal funció dels transposons en bacteris és que permeten ajudar-los a adaptar-se a nous ambients, com pot ser un ambient ric en antibiòtics, on la selecció natural afavoreix aquells bacteris que posseeixen més gens per la resistència antibiòtica els quals poden haver estat transposats.

Podem trobar dos tipus principals de transposons de DNA en organismes procariotes:

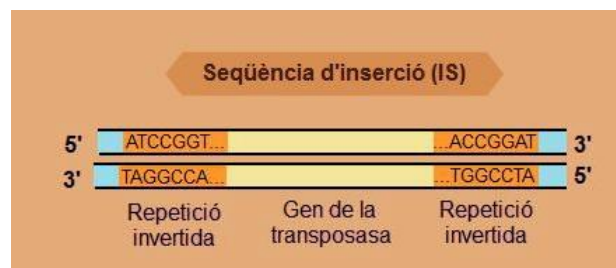
1. Elements transposables simples: només contenen la informació genètica necessària pel seu moviment. Els més coneguts són:

- **Seqüències d'inserció (IS)**. És el transposó més simple present en els cromosomes bacterians i en els plasmidis. Es poden trobar en els bacteris, però també poden infectar plasmidis i virus per tal de poder passar d'una cèl·lula a una altra.

S'han trobat més de 20 tipus diferents de IS en els bacteris i els quals s'anomenen IS seguit d'un número d'identificació. En el cas de l'organisme *Echerichia coli* representen l'1'5% del genoma. Normalment tenen entre 800 i 2000 pb de longitud i posseeixen tant repeticions terminals invertides com repeticions directes flanquejants que produeixen en el lloc on s'insereixen, ja hem repetit moltes vegades.



Majoritàriament, contenen un o dos gens que codifiquen únicament **transposases**, un enzim, que tal com ja s'ha dit, catalitza el moviment de la IS d'un lloc a un altre dins del genoma. El gen de la transposasa es troba delimitat per un parell de seqüències de DNA no codificant del voltant de 20 a 40 nucleòtids d'allargada que s'anomenen repeticions invertides perquè la seqüència de bases en un extrem de la IS es repeteix al revés en l'altre extrem (**Figura 7**). La transposasa reconeix aquestes repeticions invertides com els límits de la IS. Durant la transposició, la transposasa s'uneix amb les repeticions invertides i amb el lloc diana, i catalitza el tallat i apegat necessari del DNA.



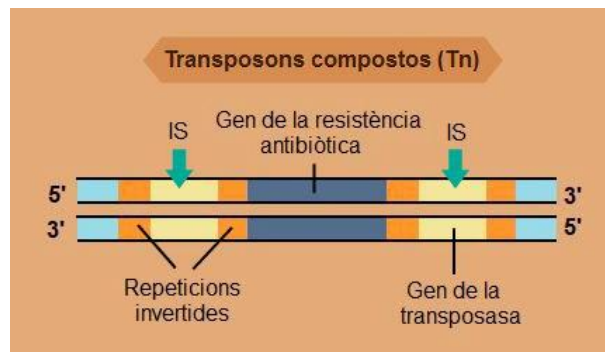
**Figura 7.** Esquema de l'estructura d'una seqüència d'inserció. Realització pròpia

Una IS pot provocar mutacions com la majoria de transposons si es transposa dins de la seqüència de codificació d'un gen o en una regió del DNA que regula l'expressió genètica. Aquest mecanisme de mutació és propi de la cèl·lula, a diferència de la mutagènesis deguda a factors externs, com ara la radiació ambiental i les substàncies químiques.

2. Elements transposables complexes: contenen seqüències de DNA les quals no estan relacionades directament amb la transposició, sinó que transporten una informació addicional com pot ser un gen. N'hi ha de dos tipus:

- **Transposons compostos (Tn)**. Cada tipus de transposó compost s'anomena **Tn** seguit d'un número. Produeixen repeticions directes flanquejants en els llocs on s'insereixen.

Són transposons que a més del gen de la transposasa, el qual és necessari per poder moure's, inclouen altres gens que els acompanyen durant la transposició, com ara els gens de la resistència antibiòtica. Aquests gens addicionals, no necessaris per transposar-se, es troben entre dues seqüències d'inserció, que sí que són necessàries per transposar-se, ja que contenen el gen de la transposasa (**Figura 8**). Les IS presents en els extrems d'un transposó compost poden tenir la mateixa orientació o estar invertides una respecte l'altra.



**Figura 8.** Esquema de l'estructura dels transposons compostos. Realització pròpia

Per tant, probablement, els transposons compostos es deuen formar quan una IS s'insereix en una zona propera a un altre IS, i a partir d'allà es transposen conjuntament amb el DNA que engloben entre elles.

El mecanisme que utilitzen els *Tn* consisteix en que una de les dues IS produeix la transposasa la qual catalitza la transposició d'ambdós IS, el que permet el transport del DNA comprès entre aquestes dues IS. En el cas en que una de les IS sigui defectuosa, la transposició dependrà de la síntesi de transposasa de l'altra IS.

- **Transposons no compostos.** Són transposons que no contenen IS però que posseeixen repeticions terminals invertides, generen repeticions directes flanquejants en els punts d'inserció i porten informació no relacionada amb la transposició.

### ❖ Transposons en eucariotes amb una estructura similar als que es troben en bacteris

Generalment finalitzen amb repeticions terminals invertides curtes. Els més coneguts són els *elements Ac i Ds* que es troben en el blat de moro, i els *elements P* que es troben en *Drosophila*.

→ Elements Ac i Ds en el blat de moro. Tal com hem vist, McClintock va denominar a aquests gens "elements de control" perquè controlaven l'expressió d'altres gens.

L'estructura i la funció dels elements Ac i Ds del blat de moro són similars a les dels ETs que es troben en els bacteris: són transposons de DNA que posseeixen repeticions terminals invertides i generen repeticions directes flanquejants en els llocs on s'insereixen.

**Elements Ac.** Són transposons de DNA que mesuren al voltant de 4500 pb de longitud que inclouen les repeticions terminals invertides d'11 pb i les repeticions directes flanquejants que generen de 8 pb de longitud. Cada element Ac conté un sol gen que codifica un enzim transposasa. Això significa que els elements Ac són autònoms, és a dir, que són capaços de transposar-se per sí mateixos.

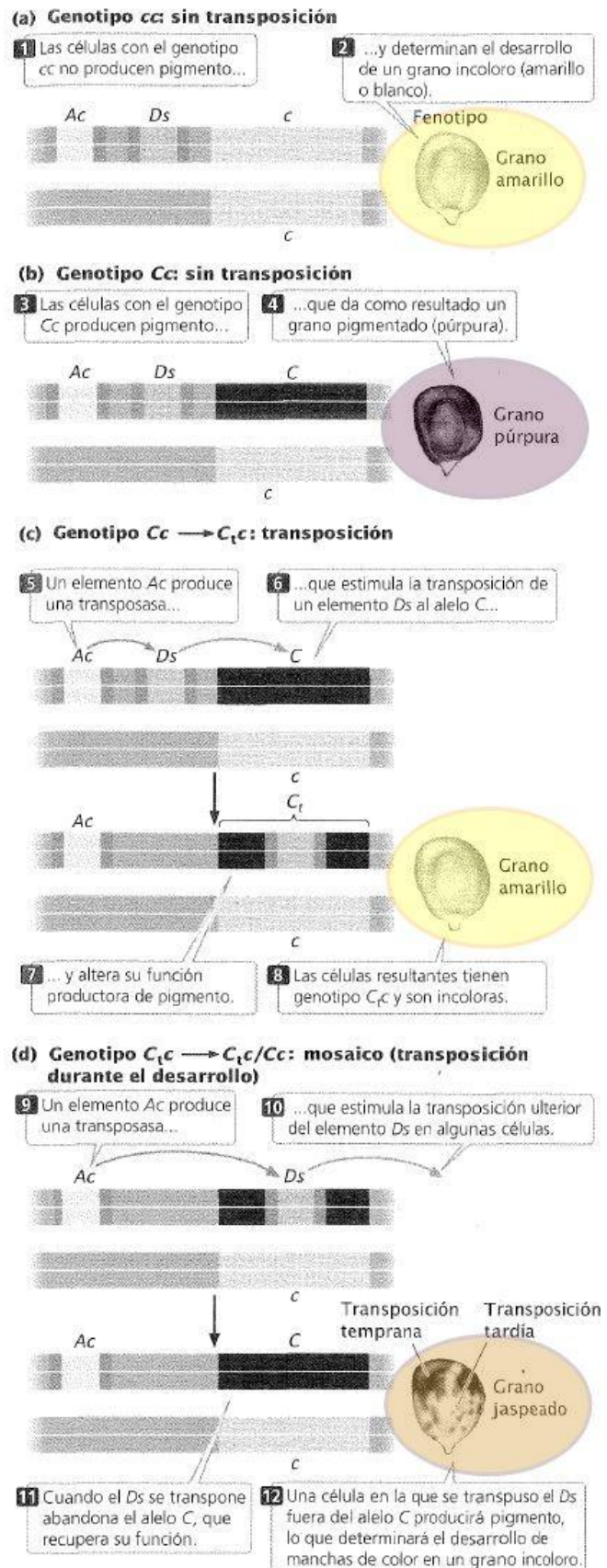
**Elements Ds.** Són elements Ac, i per tant, transposons de DNA, amb una o varies delecions que van desactivar el gen que codifica la transposasa. Com que no són autònoms, els elements Ds només poden traslladar-se en presència dels elements Ac.

Opcions del genotip davant la combinació d'al·lels relacionats amb la pigmentació dels grans de blat de moro (Figura 9):

Cada gra d'una espiga de blat de moro és un individu separat de la resta, i per tant la pigmentació de cada gra depèn d'uns al·lels codificadors de pigment:

**C:** al·lel codificador de pigment  
**c:** al·lel que no produeix pigmentació

- GENOTIP 1: **cc** → incolor, blanc o groc
- GENOTIP 2: **CC** o **Cc** → pigmentat, púrpura
- GENOTIP 3: **C<sub>t</sub>c** → incolor, blanc o groc. Quan un element Ds rep la influència d'un element Ac, es transposa i s'insereix en l'al·lel C, tot impedit la capacitat de produir pigment. Llavors, el gra serà incolor perquè ni l'al·lel C<sub>t</sub> ni el c atribuiran pigmentació.



**Figura 9. La transposició en els grans de blat de moro estudiats per McClintock pel que fa a la pigmentació.**  
 Font: llibre *Genética: Un enfoque conceptual* (Ed Médica Panamericana)

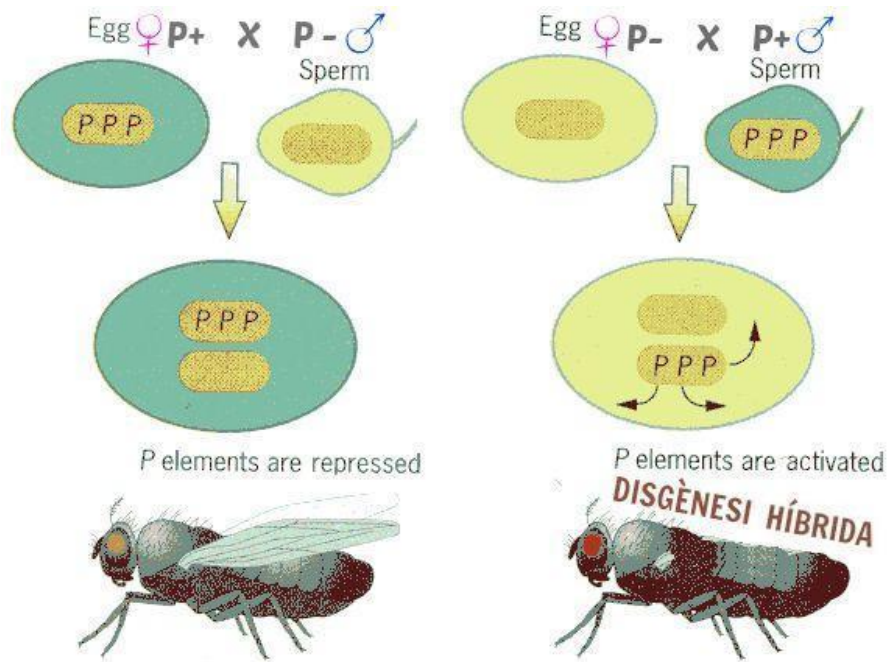
- GENOTIP 4: **Cc** → incolor amb taques de color, conegut com a *gra jaspiat*.

Podríem pensar que es tracta del mateix cas que en el genotip 2, però en aquest cas, partim d'un genotip  $C_t c$ . És a dir, si l'element transposable se separa de l'al·lel  $C_t$  i es trasllada a una nova localització, l'al·lel  $C_t$  tornarà a ser funcional i el genotip, ara, serà  $Cc$  sent incolor amb taques o ratlles púrpures anomenades **sectors**. La mida del sector varia segons el moment en que es produeix l'escissió entre l'ET i l'al·lel  $C_t$ . Si l'escissió es produeix aviat durant el desenvolupament, moltes cèl·lules conservaran l'al·lel C funcional i el sector pigmentat serà gran. En canvi, si l'escissió es produeix tard durant el desenvolupament, poques cèl·lules conservaran l'al·lel C funcional i el sector pigmentat serà petit.

→ Elements P en *Drosophila*. Transposons de DNA que mesuren al voltant de 2900 pb de longitud, encara que també hi ha elements P més curts a causa de delecions. Tots els elements P posseeixen repeticions terminals invertides que mesuren 31 pb de longitud i produeixen repeticions directes flanquejants de 8 pb en el lloc on s'insereixen.

Tots els elements codifiquen tant una **transposasa** com un **repressor de la transposició**. La funció d'aquest repressor en el control de la transposició es demostra en la **disgènesi híbrida**. La disgènesi híbrida és l'aparició sobtada de nombroses mutacions, d'aberracions cromosòmiques i d'esterilitat en la descendència d'un creuament entre una mosca mascle amb elements P ( $P^+$ ) i una mosca femella sense elements P ( $P^-$ ): ♂ $P^+$  x ♀ $P^-$  (**Figura 10**). En canvi, el creuament de ♂ $P^-$  x ♀ $P^+$  produeix una descendència normal.

La disgenèsia híbrida és provocada per nombroses transposicions produïdes quan s'introdueixen elements P en una cèl·lula que no els posseïa anteriorment i quan una mosca femella  $P^+$  produeix òvuls, la proteïna repressora s'incorpora en el citoplasma de l'òvul i això impedeix el desenvolupament de transposicions en l'embrió i, per tant, de l'aparició de mutacions. La descendència serà fèrtil. En canvi, una mosca femella  $P^-$  no produeix el repressor i no l'emmagatzema en el citoplasma dels seus òvuls. Quan es produeix la fecundació entre ♂ $P^+$  x ♀ $P^-$ , l'absència del repressor permet que els elements P aportats pels espermatozoides desenvolupin una transposició ràpida en l'embrió i, per tant, de mutacions, i determinen la disgenèsia híbrida.



**Figura 10.** La *disgènesi híbrida* causada per la transposició de l'element P en *Drosophila*  
 Font: <http://oamigodewigner.blogspot.com.es/2010/01/o-elemento-p-das-drosophilas.html>

Recentment, a més de les dues classes nombrades anteriorment, s'ha afegit un nou tipus de transposons anomenats **MITE**, que es troben en els genomes eucariotes i els quals comparteixen propietats amb els retrotransposons (classe I) i amb els transposons de DNA (classe II). Són seqüències curtes de 100 a 400 pb que es troben presents en un alt nombre de còpies per genoma, de 3.000 a 10.000, i *no tenen capacitat codificadora*. Per tant, han perdut la capacitat de transposar-se independentment.

## 2.6. Impacte dels transposons en el genoma

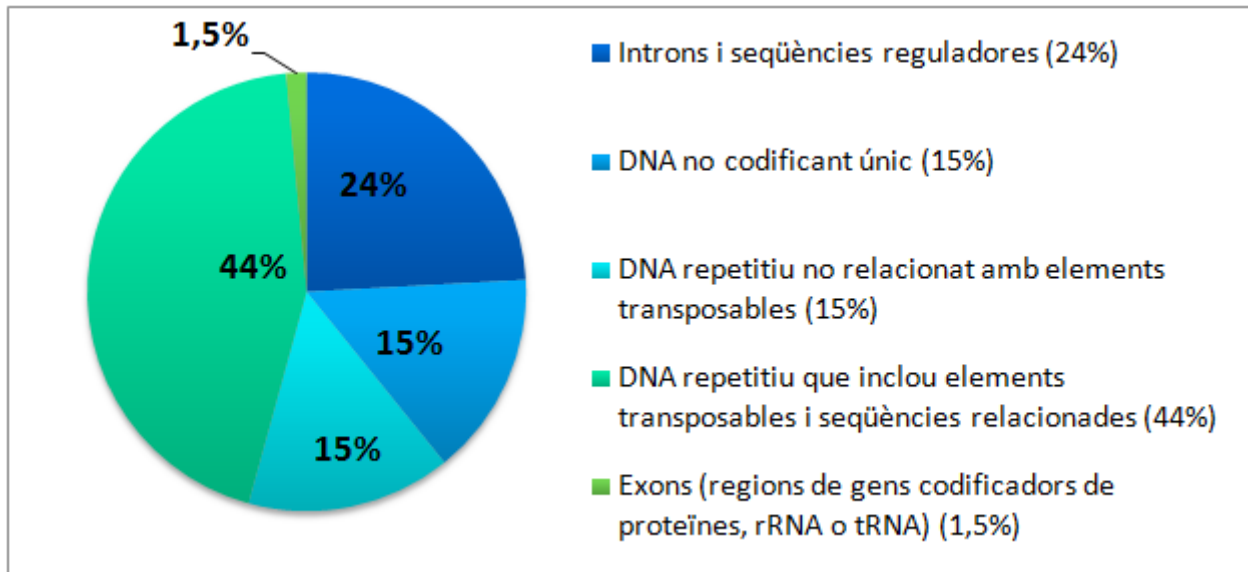
El genoma humà és el més ben caracteritzat a tots els nivells i és molt similar al del ratolí, al de rata i al de gos. Tots ells es caracteritzen per la massiva presència de DNA repetitiu en forma de repeticions disperses. Aquestes repeticions són, principalment, retrotransposons non-LTR, SINEs, retrotransposons LTR, i transposons de DNA (**Taula 1**).

	Retrotransposons non-LTR	SINEs	Retrotransposons LTR	Transposons de DNA	Total
<b>Home</b>	20,42%	13,14%	8,29%	2,84%	44,83%
<b>Ratolí</b>	19,2%	8,22%	9,87%	0,88%	38,55%
<b>Rata</b>	23,11%	7,05%	9,04%	0,81%	40,31%
<b>Gos</b>	18,74%	10,57%	3,68%	1,98%	35,15%

**Taula 1.** Realització pròpia

Avui en dia es coneix la seqüència complerta del genoma humà. A partir d'aquí, sabem que l'1'5% del genoma codifica per a proteïnes. Per altra banda, coneixem de què està format el 98'5% restant, el qual no codifica per a proteïnes, rRNA o tRNA.

Quasi bé el 45% del genoma humà està compost per seqüències derivades d'ETs, encara que avui la major part d'aquests elements es troben desactivats i ja no poden transposar-se (**Figura 11**). Tot i així, hi ha transposons que es troben activats dins del genoma que realitzen insercions que poden resultar ser perjudicials o beneficioses segons la regió en que l'element sigui inserit.

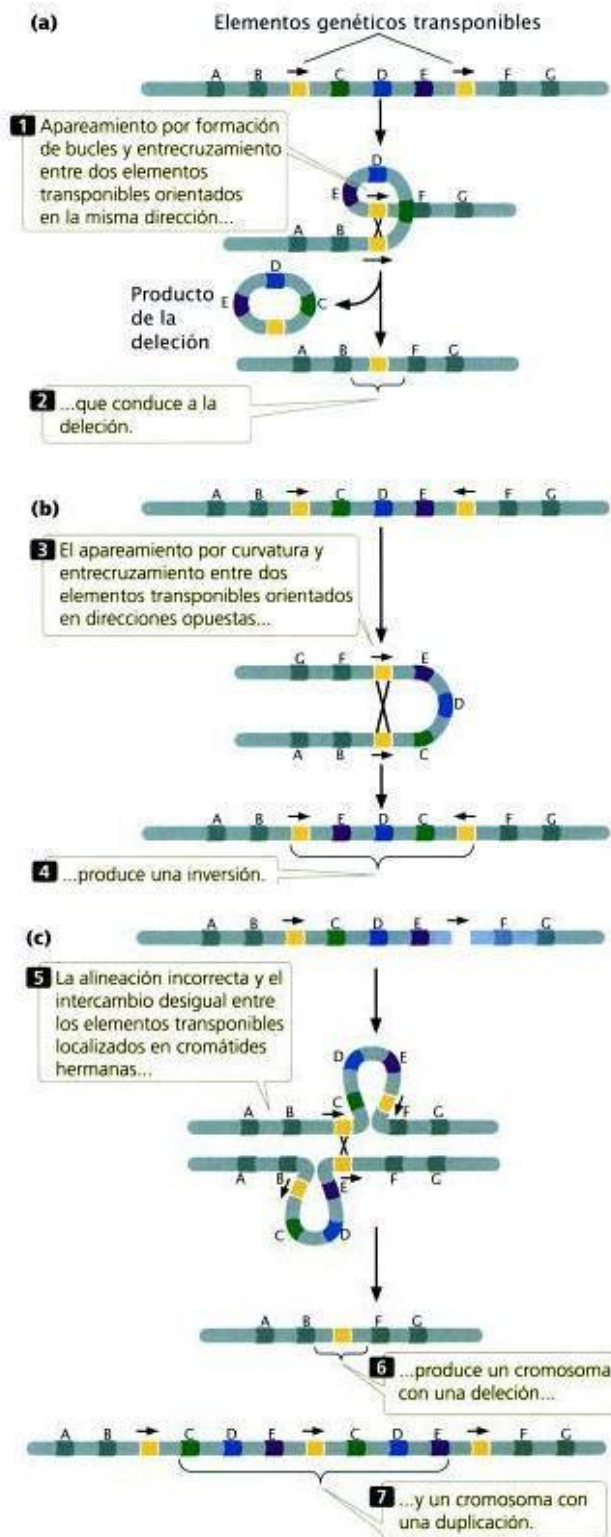


**Figura 11. Tipus de seqüències de DNA en el genoma humà.** Tot i que una part del DNA repetitiu està format pels transposons (veure *annex 3*), també hi ha DNA repetitiu que no es relaciona amb ETs (15%) i s'origina per errors produïts durant la replicació o la recombinació del DNA. Es troba en els telòmers.

Generalment la transposició és **mutagènica** ja que els transposons es poden inserir en altres gens i alterar-ne la seva funció. Se sap, per exemple, que més de la meitat de totes les mutacions espontànies que es produeixen en l'organisme *Drosophila* són degudes a la inserció d'un ET en un gen funcional o prop d'ell. Per altra banda, tenint en compte que la transposició implica un intercanvi de seqüències de DNA, una recombinació homòloga i una modificació de l'estructura i de l'expressió del gen, es produeix un **reordenament del DNA** que dóna lloc a duplicacions<sup>3</sup>, delecions<sup>4</sup> i inversions<sup>5</sup> (**Figura 12**). Tot i així, els reordenaments del DNA també poden ser el

<sup>3</sup> Repetició d'un segment d'un cromosoma que permet augmentar el material genètic i, gràcies a mutacions posteriors, poden determinar l'aparició de nous gens durant el procés evolutiu.

<sup>4</sup> Pèrdua de nucleòtids o de, fins i tot, un fragment del cromosoma. Les conseqüències que comporten solen ser greus podent arribar a ser letals.



**Figura 12. La transposició també produeix un reordenament del DNA en el genoma.**

Font: llibre *Genética: Un enfoque conceptual* (Ed. Médica Panamericana)

resultat de l'escissió d'ETs en una transposició no replicativa ("de tallar i apegar"), ja que si el DNA trencat no es repara correctament, es pot desencadenar un reordenament cromosòmic.

Des del punt de vista evolutiu s'estableix que les insercions inútils i perjudicials d'ETs haurien d'estar seleccionades en contra, mentre que les insercions beneficioses haurien de tindre un avantatge i ser conservades.

La major part de les insercions d'ETs s'espera que tinguin poques conseqüències pel genoma de l'hoste i que, per tant, tinguin poc o cap impacte en la funció dels gens. Ocasionalment, al llarg de l'evolució, la transposició pot activar un gen o canviar el fenotip d'una cèl·lula beneficiosament. Rarament, les insercions d'ETs tenen un efecte perjudicial en el genoma de l'hoste que poden provocar canvis mortals per l'organisme.

Per exemple, els ETs bacterians poden ser portadors de gens que codifiquen resistència als antibiòtics i diversos ETs han creat mutacions en insectes que generen resistència a insecticides. De fet, els transposons que han induït a contribucions innovadores en el genoma han evolucionat juntament amb els seus hosts.

<sup>5</sup> És el canvi de sentit d'un fragment en el cromosoma. No solen comportar perjudicis a l'individu, però poden arribar a afectar la descendència.

Tot i així, la transposició en teixits somàtics<sup>6</sup> probablement només resultaria una pèrdua de funcionalitat en l'hoste, sense cap benefici per l'element.

Es pensa que la transposició de l'element L1 d'humans es limita a inserir-se en cèl·lules indiferenciades, és a dir, en cèl·lules germinals primerenques i cèl·lules tumorals. Això pot deure al fet que hi ha menys metilació<sup>7</sup> en les cèl·lules indiferenciades, és a dir, que l'element L1 té una facilitat més gran en inserir-se en aquest tipus de cèl·lules. De fet, s'ha proposat que un dels propòsits de la metilació és reduir la expressió d'elements mòbils en cèl·lules diferenciades, probablement per no repercutir en el genoma.

Un altre mecanisme de control que protegeix l'organisme de mutacions perjudicials és l'especificitat d'inserció d'alguns transposons en zones no codificants del genoma. Per exemple, l'endonucleasa, l'enzim codificat per l'element L1, ha patit una evolució positiva pel reconeixement d'estructures d'ADN no codificants per tal d'evitar insercions perjudicials.

L'altre cas d'inserció beneficiosa és la inserció d'un ET en l'enzim  $\alpha$ -amilasa salival humana. Al llarg de la història evolutiva dels mamífers, aquest gen que es manifesta en el pàncrees, s'ha duplicat diverses vegades, però fa uns 20 milions d'anys, un retrotransposó es va mobilitzar i es va inserir a prop d'una de les còpies del gen, fet que va permetre que el gen s'expressés en les glàndules salivals. Aquest esdeveniment només va ser present en la rama dels primats incloent homínids, ximpanzés, goril·les i orangutans, i va ser molt important ja que va permetre la capacitat de degustar el gust de la glucosa i probablement això va ajudar a reconèixer l'aliment.

Un altre exemple molt clar de transposició és el cas del raïm. Existeixen diverses varietats: n'hi ha de negre, vermell i blanc, les quals són el resultat d'una alteració de la producció de pigments vermells anomenats *antocianines*. No podem categoritzar aquesta transposició de beneficiosa o perjudicial, sinó que simplement és el resultat de l'evolució.

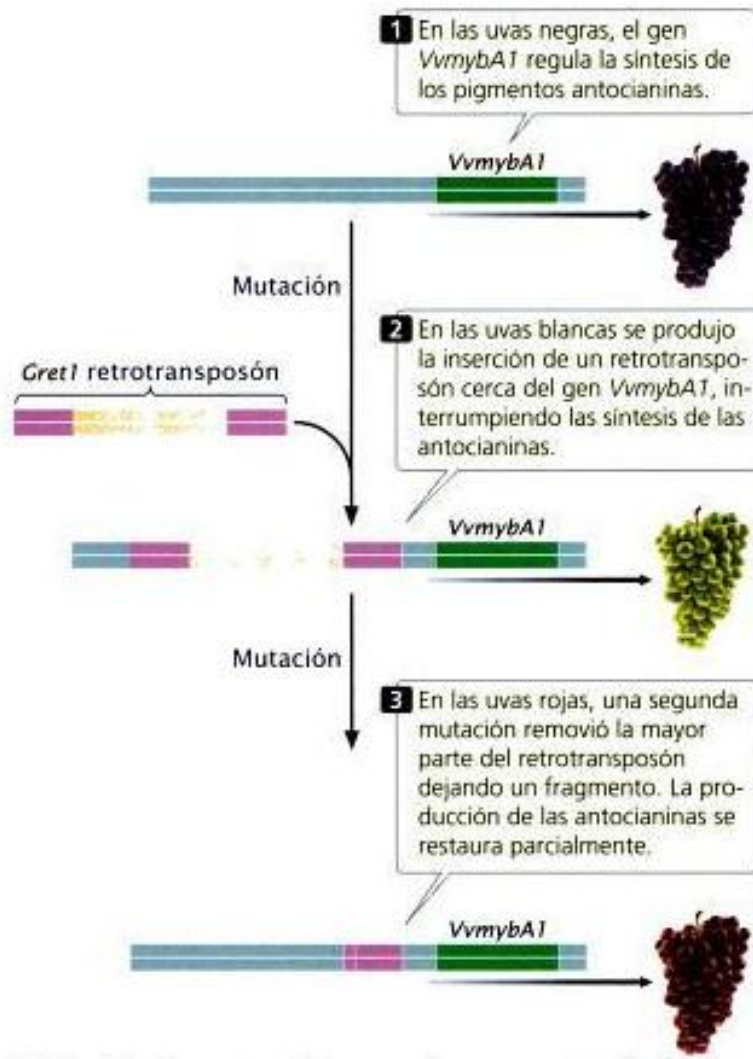
El raïm vermell prové d'una mutació en el raïm blanc, i aquest prové d'una mutació del raïm negre. La mutació en el raïm negre consisteix en la inserció d'un retrotransposó de 10.442 pb anomenat **Gret1** a prop d'un gen que promou la producció d'antocianines: *VvmybA1*; d'aquesta manera Gret1 altera les seqüències que regulen el gen i anul·la la producció de les antocianines, fet que dóna lloc al raïm blanc. En canvi, la mutació en el raïm blanc es deu a la deleció de gairebé tot el

---

<sup>6</sup> S'anomena teixit somàtic al teixit format per un conjunt de cèl·lules somàtiques que són aquelles que conformen el creixement dels teixits i òrgans d'un ésser viu pluricel·lular.

<sup>7</sup> Consisteix en afegir grups metils (-CH<sub>3</sub>) a les bases nitrogenades de l'ADN que té com a funció regular l'expressió gènica.





**Figura 13.** La mutació en el raïm que dona lloc a les diferents varietats és una alteració de la producció de pigments vermells anomenats antocianines. Font: llibre *Genética: Un enfoque conceptual* (Ed. Médica Panamericana)

retrotransposó que permet l'expressió parcial del gen encarregat de la producció de les antocianines. Aquesta segona mutació dóna lloc al raïm vermell, on la producció del pigment no és tan intensa com en el raïm negre original (Figura 13).

A més, els ETs i la seva habilitat per a transposar-se han ajudat a les cèl·lules a desenvolupar unes funcions específiques. Per exemple, en la planta *Arabidopsis thaliana*, una proteïna transposasa codificada per un ET regula els gens de la planta i ha esdevingut essencial pel seu creixement. Un altre exemple podria ser un mecanisme que genera la diversitat d'anticossos en el sistema immunitari de vertebrats el qual hauria pogut estar originat

per un ET que s'insereix en la línia germinal d'un avantpassat fa uns 450 milions d'anys.

S'han proposat diverses hipòtesis per explicar la presència universal dels ETs, però no s'ha arribat a poder entendre'n la raó.

- 1) **Hipòtesi de la funció cel·lular:** postula que els transposons tenen una funció beneficiosa dins de la cèl·lula, com ara el control de l'expressió dels gens.
- 2) **Hipòtesi de la variació genètica:** proposa que els ETs tenen una activitat mutagènica que proporciona una variabilitat genètica útil perquè permet que les espècies s'adaptin als canvis ambientals. Encara que algunes mutacions causades per transposons podrien permetre un benefici per les espècies, la major part de les mutacions produïdes per transposicions solen tindre efectes perjudicials i/o nocius. A més, tenint en compte que molts organismes han desenvolupat mecanismes per tal de regular la transposició, porta a

pensar que no té una funció massa beneficiosa dins del genoma i és per això que el que intenta la cèl·lula és regular-ne l'expressió.

- 3) **Hipòtesi del DNA "egoista"**: planteja que els transposons no tenen cap funció dins de la cèl·lula, sinó que només existeixen per la seva capacitat de replicar-se i escampar-se. Es considera que no aporten beneficis a la cèl·lula i que inclús poden arribar a ser nocius.

Tot i no poder-ne concloure una funció concreta el que se sap és que la capacitat d'aquests elements per augmentar el seu nombre de còpies ha contribuït a la gran mida de molts genomes d'organismes eucariotes.

En resum, donat que els ETs es propaguen per inserció en noves localitzacions en el genoma que habiten, es podria pensar que la mobilització d'aquests elements no portaria cap benefici a l'organisme hoste i que per això serien desactivats per, finalment, desaparèixer. Tot i així, existeixen evidències que demostren l'activitat d'aquests elements i a més s'han descrit nombrosos casos que mostren que la inserció d'un element no és necessàriament perjudicial, sinó que pot exercir importants funcions i inclús donar lloc a un nou patró d'expressió gènica que podria oferir un avantatge evolutiu. D'aquesta manera, l'anàlisi, des d'un punt de vista evolutiu, de l'efecte de les transposicions dels elements mòbils sobre els organismes hostes, mostra com aquests elements en alguns casos evolucionen coincidentment amb l'hoste. És a dir, s'està començant a considerar als ETs, com a fonts de variabilitat amb un paper important en l'evolució dels organismes, com a resultat del desenvolupament d'una espècie de relació simbiòtica entre els ETs i el seu hoste.

No obstant això, ens trobem en les primeres etapes de poder comprendre com les insercions dels elements mòbils influeixen en fenotips específics i en quin grau contribueixen a la diversitat genètica i al desenvolupament de malalties.

### *2.6.1. Impacte negatiu: mutacions*

Tal com s'ha dit anteriorment, les insercions dels ETs poden desencadenar a l'aparició de mutacions i al seu torn de malalties. Els nous gens i els nous al·lels només s'originen per mutacions, canvis en la seqüència de nucleòtids del DNA. Tot i així, la mutació d'un gen determinat per transposició es produeix rarament, al voltant d'un milió en 10 milions de generacions.

Quan es produeix una mutació no es possible predir com alterarà el DNA ni quines seran les conseqüències. La major part de les mutacions es produeixen en les cèl·lules somàtiques i es perden quan l'individu mor. Però les mutacions en les cèl·lules reproductores o gàmetes poden ser transmeses a la descendència, i només una petita fracció d'aquestes es dispersa en les poblacions.

Un dels ETs més estudiats que han donat lloc a malalties és l'element L1 en humans. El 1988, per primera vegada, es va trobar que l'element mòbil L1 era l'agent causant de l'**hemofilia del tipus A**<sup>8</sup> quan es va comprovar que la inserció de l'element L1 en el gen del factor VIII donava lloc a un procés patològic de la mateixa malaltia.

Al llarg dels últims anys, s'han descrit noves insercions de l'element L1 com ara en el gen de la  $\beta$ -globina, en el gen APC<sup>9</sup>, mutació que causa l'aparició de **càncer de colon** com veurem més endavant; o més recentment en el gen DMD en pacients amb **distròfia muscular de Duchenne**<sup>10</sup>. També s'han trobat insercions d'aquests elements en gens que desenvolupen la malaltia de la **immunodeficiència combinada greu (SCID, severe combined immunodeficiency)** que es tracta d'una malaltia hereditària que es caracteritza per una deficiència immunitària greu que afecta tant la *immunitat cel·lular*<sup>11</sup> com la *immunitat humoral*<sup>12</sup>. A més, en alguns casos, les insercions dels transposons han estat responsables del desenvolupament de la **porfíria**, malaltia hereditària que consisteix en una alteració metabòlica basada en un augment de la síntesi de *porfirines*<sup>13</sup>. Actualment, 8000 persones a Sud Àfrica posseeixen el gen causant d'aquesta malaltia metabòlica la qual ha anat passant de pares a fills a través de la línia germinal.

Mentre que la majoria de les insercions anomenades succeeixen en la línia germinal o durant el desenvolupament primerenc, la inserció en el gen APC es va trobar en cèl·lules de **càncer de colon**, però no en altres cèl·lules del pacient. Això vol dir que la transposició no només pot passar en cèl·lules germinals sinó també en cèl·lules somàtiques.

Durant els últims anys, s'ha descobert que el cervell humà conté un gran nombre de transposons; descobrint que podria aclarir les causes de certes malalties neurològiques, com l'**esquizofrènia**, malaltia que es caracteritza per alteracions de personalitat, al·lucinacions i pèrdues del contacte amb la realitat. Anteriorment, s'havia descobert que els transposons LINE-1 saltaven de forma atzarosa d'un lloc a l'altra del genoma en les cèl·lules cerebrals dels ratolins. És per això que el següent estudi va ser descobrir si aquest mateix fet també passava en el cervell humà. L'estudi es va basar en treballar sobre mostres de DNA agafades del cervell, fetge i cor d'humans adults i comparar-ne els nivells d'activitat dels LINE-1. Tal i com s'esperava, en cada mostra d'un mateix

---

<sup>8</sup> Dèficit de coagulació de la sang.

<sup>9</sup> Gen supressor tumoral que codifica una proteïna que juga un paper important en la supressió de tumors.

<sup>10</sup> Trastorn hereditari que provoca debilitat muscular que empitjora de forma molt ràpida.

<sup>11</sup> Tipus de resposta immunitària contra microorganismes intracel·lulars capaços de sobreviure i proliferar-se a l'interior de les cèl·lules de l'organisme hoste, lloc al que no tenen accés els anticossos.

<sup>12</sup> Mecanisme de defensa en contra de microorganismes extracel·lulars que no ataquen a la cèl·lules, sinó que ataquen a macromolècules, com per exemple, els anticossos.

<sup>13</sup> Pigment natural de color roig-púrpura.

individu existien moltes més còpies de LINE-1 en les cèl·lules cerebrals que en les de fetge i cor. Aquest fet va permetre comprovar que els ETs realment salten en les neurones, i a més, es troben actius, fet que contrasta amb la presència de LINE-1 a la resta de teixits corporals.

De fet, a part de conèixer que hi ha un cert augment en la quantitat d'elements LINE-1 en el teixit cerebral, s'ha trobat, també, un augment considerable del nombre de còpies de l'element L1 en cervells de persones que pateixen esquizofrènia.

Per altra banda s'ha observat una relació entre l'expressió d'elements LINE amb processos cancerígens. El càncer és un conjunt de malalties en les que les cèl·lules escapen dels mecanismes de control que normalment limiten el seu creixement i es produeix un creixement tumoral dels teixits, de caràcter maligne que altera les funcions biològiques normals. Els mecanismes de regulació gènica que funcionen malament en el càncer són els mateixos que desenvolupen tasques importants en el desenvolupament embrionari, la resposta immunitària i molts altres processos biològics.

Les mutacions que alteren qualsevol dels gens que regulen el creixement i la divisió cel·lular en les cèl·lules somàtiques poden conduir al càncer. L'agent responsable de tal modificació pot ser la **mutació espontània** a l'atzar. Tot i així, és probable que moltes mutacions que causen càncer siguin resultat d'influències ambientals, com els carcinògens químics, els rajos X i certs virus tumorals els quals transformen les cèl·lules normals en canceroses.

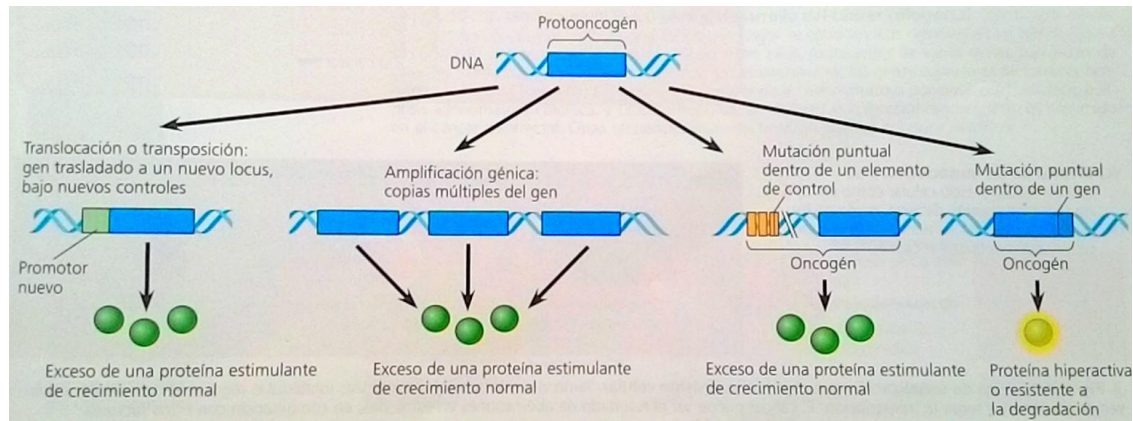
Poder conèixer les causes del càncer significa poder conèixer com un **protooncogen**, un gen que codifica proteïnes que estimulen el creixement i la divisió cel·lular normal, pot convertir-se en un **oncogen**, un gen causant de càncer. Generalment, un oncogen s'origina a partir d'un canvi genètic que comporta un augment de la quantitat de proteïnes codificades o procedents del protooncogen. Els canvis que converteixen els protooncogens en oncògens són **(Figura 14)**:

- ~ el **moviment del DNA dins del genoma** com pot ser la translocació o la transposició. Si un protooncogen translocat acaba a prop d'un element de control actiu, la seva transcripció pot augmentar i transformar-se en un oncogen. Per altra banda, el moviment d'ETs també pot col·locar a un promotor més actiu a prop d'un protooncogen i incrementar-ne la seva expressió.

Seria el cas de la inserció d'un element Alu dins dels gens BRCA1 i BRCA2, els quals estan associats a certs càncers de mama i ovari.

- ~ l'**amplificació d'un protooncogen**: augment del nombre de còpies del protooncogen en la cèl·lula.

~ les **mutacions puntuals en un element de control** les quals causen un augment de l'expressió del protooncogen, o bé les **mutacions puntuals en la seqüència codificadora del protooncogen mateix** les quals transformen el producte del gen en una proteïna més activa o més resistent a la degradació que la proteïna normal.



**Figura 14.** Font: llibre *Biología* (Ed. Médica Panamericana)

En un carcinoma humà de mama, és a dir, un **càncer maligne de mama**, s'ha identificat la inserció d'un element LINE dins del segon intró, o seqüència sense sentit, del gen c-myc, un gen de cèl·lules normals denominat protooncogen que en activar-se passa a ser un oncogen, un gen causant del càncer. Tenint en compte que la inserció de l'element LINE només és present en el teixit de mama maligne i no en el teixit de mama benigne de la pacient, es pot concloure que és aquesta inserció en el gen c-myc que activa les cèl·lules normals i provoca que aquestes perdin el control de la divisió, tot produint una proliferació exagerada sense cap tipus de regulació o control.

S'ha observat també una expressió generalitzada de l'element L1 en tumors de cèl·lules germinals de testicle humà, observant-se també la seva expressió en les cèl·lules metastatitzades. Estudis epidemiològics mostren que almenys el 10% dels càncers de cèl·lules germinals de testicle expressen l'element L1. De la mateixa manera s'expressa en un 5% de cèl·lules de tumor ovàric i en un 30% de *tumors extragonadals*<sup>14</sup>. Per això es postula que la inserció dels elements mòbils L1 origina mutacions que poden jugar un paper important en la etiologia<sup>15</sup> d'algunes neoplàsies<sup>16</sup>.

<sup>14</sup> Els tumors extragonadals de cèl·lules germinals es formen a partir d'espermatozoides o òvuls en desenvolupament que es desplacen des dels gònades a altres parts del cos.

<sup>15</sup> Estudi sobre les causes de les coses.

<sup>16</sup> Tumor de teixit anormal.

## 2.7. Mecanismes de regulació o silenciament de la transposició

Els mecanismes per a regular la transposició, desenvolupats per la cèl·lula, són deguts a que molts ETs es mouen per transposició replicativa la qual produeix un increment de la quantitat de transposons molt gran. A mesura que el nombre de transposons augmenta, també augmenta la velocitat de transposició ja que la concentració de l'enzim transposasa és major. Conseqüentment, el nombre de transposons aniria augmentant sense control i el DNA hoste es lesionaria a causa de l'alta taxa de mutació produïda per la transposició continuada. A més, també es necessitaria una gran quantitat d'energia i de recursos per a replicar el DNA addicional dels ETs com ara poden ser les repeticions terminals invertides o les repeticions directes flanquejants.

Quan un ET "salta" per primera vegada en una cèl·lula que no posseeix altres còpies d'aquell element, es produeix una transposició de forma freqüent. A mesura que el nombre de còpies del transposó augmenta, el ritme de la transposició va disminuint fins que s'aconsegueix un estat estable. Aquesta regulació de la transposició implica que la majoria de les cèl·lules tinguin una quantitat característica de còpies d'un ET en particular.

Moltes cèl·lules regulen la transposició controlant la producció de transposasa necessària pel moviment tot regulant la transcripció del gen de la transposasa o més freqüentment controlant la traducció del mRNA d'aquest enzim. Per altra banda també regulen tot impedit directament la transposició.

Els ETs s'han involucrat en diversos processos de regulació de l'expressió gènica, tant en processos de regulació transcripcional com posttranscripcional. El 1969 ja es postulava que els transposons podrien estar implicats en la regulació de gens i més tard, es va evidenciar que les variacions en les regions de regulació de gens eren fonamentals per a l'evolució i que per tant, les seqüències repetitives són una important font de variabilitat evolutiva.

Donat que aquests ETs poden potencialment actuar com a forts agents mutàgens, i per tant, exercir una acció perjudicial per l'hoste, la seva mobilitat ha d'estar altament regulada, tant a nivell de freqüència com de especificitat d'inserció. Per la seva part, aquests transposons han de mantindre un cert nivell d'activitat que els permeti assegurar la seva propagació i supervivència en el genoma. Per tot això, el nivell de transposició és probablement el resultat d'un equilibri entre els interessos de l'ET i els interessos de l'organisme hoste. Els elements es mouen rarament i de forma imprevisible, el que fa sospitar que existeix una forta regulació de la seva transposició.

Existeixen dues classes de regulació gènica: el **silenciament gènic transcripcional (TGS)**, el qual impedeix la transcripció de l'ADN, i el **silenciament gènic posttranscripcional (PTGS)**, el qual actua sobre el transcrit de RNA missatger.

### 2.7.1. *Silenciament posttranscripcional (PTGS)*

La transcripció sola no constitueix l'expressió gènica sinó que l'expressió d'un gen codificador de proteïnes depèn de la quantitat de proteïna funcional que fabrica una cèl·lula i és un procés molt llarg des de la síntesi del transcrit de RNA fins l'activitat de la proteïna en la cèl·lula. S'ha trobat un número elevat d'exemples dels mecanismes reguladors que es produeixen en diverses etapes després de la transcripció.

El **silenciament posttranscripcional (Figura 15)** es pot dur a terme durant el processament del RNA, només apte pels organismes eucariotes, o en la degradació del mRNA. També es pot regular l'expressió gènica al principi de la traducció o també durant el processament i la degradació de les proteïnes.

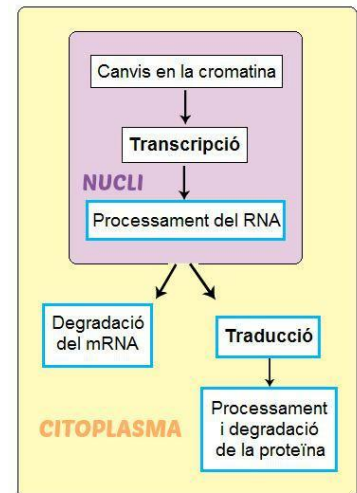


Figura 15. Realització pròpia.

#### **Processament o maduració del RNA**

El processament del RNA en el nucli i l'exportació del RNA madur al citoplasma proporciona oportunitats per regular l'expressió gènica que no existeixen en els organismes procariotes ja que no duen a terme un procés de maduració en el mRNA.

El processament del RNA consisteix en una **maduració** del transcrit primari (pre-mRNA) que es produeix durant la transcripció, procés en el que s'obté una cadena d'RNAm a partir d'una cadena de DNA motlle. Els gens estan fragmentats de manera que sempre cal un procés de maduració en el qual s'eliminin les seqüències sense sentit o **introns** i s'empalmin les seqüències amb sentit o **exons**. Per altra banda, durant aquest procés també s'afegeix un casquet o caputxa constituïda per una metilguanositratrifosfat invertida (*m7-Gppp*) en l'extrem 5' del mRNA i una cua de poli-A formada per uns 200 ribonucleòtids d'adenina en l'extrem 3' (Figura 16).

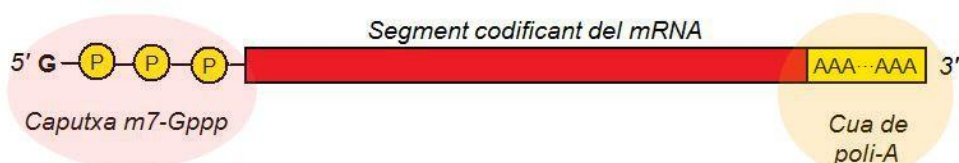
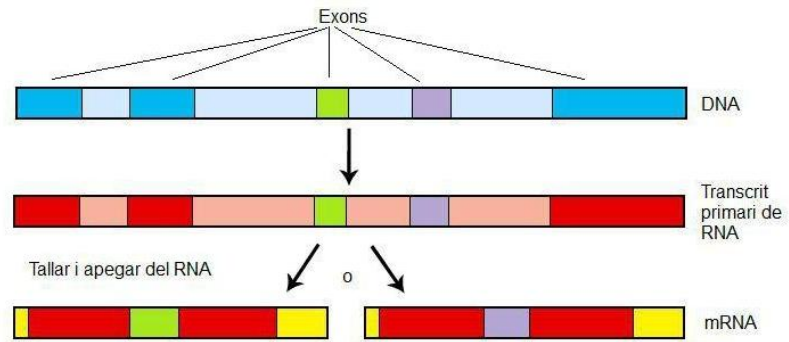


Figura 16. Esquema d'un mRNA després del processament o maduració del transcrit primari. Realització pròpia.

Un exemple de regulació a nivell del processament del RNA és el “tallat i enganxat” alternatiu del RNA, en el que es produeixen molècules diferents de RNA a partir del mateix transcrit primari, depenent de quins segments de RNA es tractin com exons i quins com introns (Figura 17).



**Figura 17. Tallat i enganxat alternatiu del RNA.** Realització pròpia.

### **Degradació del mRNA**

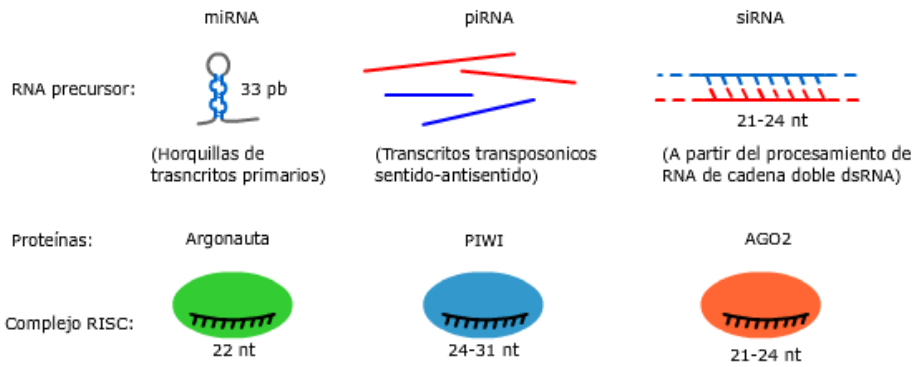
La duració de la vida de les molècules de mRNA en el citoplasma és un factor important per a determinar la síntesi proteica d'una cèl·lula. En els organismes procariontes els enzims degraden a les molècules de mRNA als pocs minuts de la seva síntesi. Aquesta vida tan curta dels mRNA és una raó per la que els procariontes poden variar tan ràpidament els nivells de síntesi proteica degut als canvis ambientals. D'altra banda, els mRNA dels organismes eucariotes pluricel·lulars solen viure durant hores, dies i inclús setmanes.

La via comú de degradació del mRNA comença amb l'escurçament enzimàtic de la cua de poli-A. Aquest procés ajuda a desencadenar l'acció dels enzims que eliminen el casquet 5' i també l'acció d'unes seqüències determinades de nucleòtids que també contribueixen en l'eliminació d'aquest casquet. Un cop eliminat el casquet 5', els enzims nucleases destrueixen ràpidament l'RNAm (Figura 16).

Durant els últims anys, s'ha descobert un altre mecanisme que bloqueja l'expressió de molècules específiques de mRNA, és a dir, que duu a terme una regulació de l'expressió gènica. Aquest altre mecanisme el duen a terme unes petites molècules d'RNA amb una llargada de 20 a 30 nucleòtids, anomenades **smallRNA** que actuen sobre la cromatina i els transcrits de RNAm. El que diferencia els smallRNAs és el mecanisme a través del que actuen, la seva petita mida de **20 a 30 nucleòtids** i el tipus de proteïna Argonauta al que estan associats (Ago o Piwi). Es classifiquen en tres grups: microRNAs (**miRNAs**), RNAs petits d'interferència (**siRNAs**) i RNAs d'interacció amb Piwi (**piRNAs**) (Figura 18).



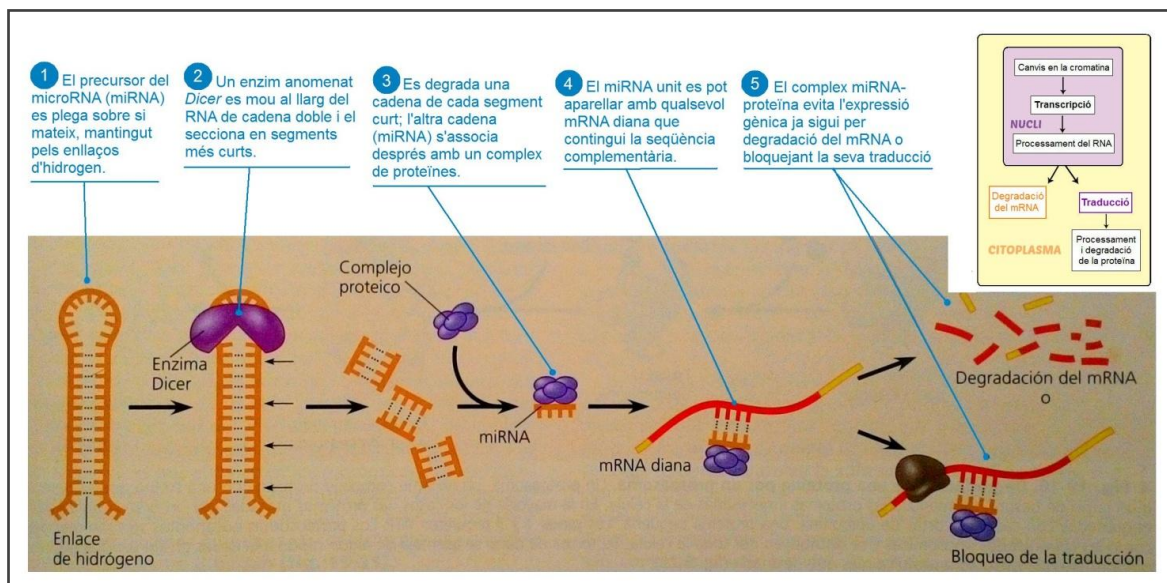
Tres tipus de smallRNAs:



**Figura 18. Clases de smallRNAs.** Font: <http://medmol.es/temas/87/>

precursors de RNA més llargs que es pleguen sobre sí mateixos, donant origen a estructures de forquetes de doble cadena que es mantenen unides per enllaços d'hidrogen. Un enzim anomenat Dicer talla la molècula de RNA de cadena doble en fragments curts. Es degrada una de les cadenes i l'altra (*miRNA* de 22 nucleòtids) s'associa amb un gran complex proteic pertanyent a la família de proteïnes Ago. Aquest complex *proteïna-miRNA* es dirigeix cap a qualsevol molècula de mRNA que tingui la seqüència complementària. Depenent de diversos factors, el complex *proteïna-miRNA* degrada després el mRNA diana o en bloqueja la seva traducció (**Figura 19**).

Els investigadors han trobat molècules petites de RNA de cadena simple, anomenades **microRNA (miRNA)**, que poden unir-se a seqüències complementàries en les molècules de mRNA. Els *miRNAs* es formen a partir de



**Figura 19. Regulació de l'expressió gènica pels microRNA (miRNA).** Imatge pròpia.

Per altra banda, els biòlegs van descobrir una nova forma de regular l'expressió gènica quan es van adonar que injectant molècules de RNA de cadena doble en una cèl·lula desactivaven d'alguna manera el gen que tenia la mateixa seqüència. Per tant, es va observar que les molècules de RNA impedièien l'expressió gènica. Aquest fenomen es va anomenar **interferència del RNA** o **RNAi**. Més tard, es va poder demostrar que era degut a **RNA de interferència petits** o **siRNA** (*small interfering*

RNA) els quals tenen una mida i funció similar als *miRNA*, i que la maquinària cel·lular que genera els *siRNA* és la mateixa que la responsable de produir els *miRNA*. A més, els dos s'associen amb les proteïnes de la subfamília Ago. Tot i així, es diferencien pel fet que els *siRNA* deriven d'una llarga molècula d'RNA de doble cadena, i els *miRNA* deriven de forquetes de doble cadena.

Finalment, els **piRNAs** (*Piwi-interacting RNAs*), són els RNAs petits més grans, amb una llargada de 24 a 31 nucleòtids, descoberts, fa relativament poc, analitzant l'expressió dels small RNAs en el desenvolupament de *Drosophila melanogaster*. Són molècules que es troben en abundància en cèl·lules germinals. Per dur a terme el control de l'expressió gènica, concretament, dels ETs, els piRNAs s'associen a la subfamília Piwi de proteïnes, unes proteïnes essencials per l'autoregeneració de cèl·lules mare germinals i pel control de la mobilitat de transposons.

Aquestes proteïnes han estat extensament estudiades al gènere *Drosophila*, en ratolins (anomenades MIWI) i en humans (HIWI), i tot apunta que el nostre coneixement sobre els mecanismes de regulació dels ETs es troba en fase inicial.

Cal tindre en compte que els mecanismes de regulació en la línia germinal són molt especialitzats ja que és important per a l'hoste mantenir la informació genètica que cal passar a la descendència amb una màxima fidelitat per tal de minimitzar la taxa de mutació al màxim possible.

### **Iniciació de la traducció**

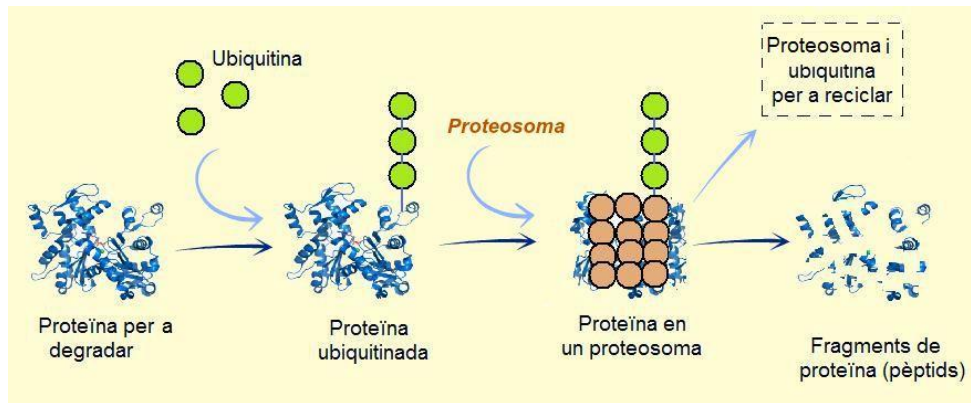
La regulació de l'expressió gènica durant l'inici de la traducció consisteix bàsicament en que diverses proteïnes reguladores que s'uneixen a seqüències o estructures específiques dins de la regió no traduïda del mRNA poden bloquejar la iniciació de la traducció de determinats mRNA i evitar la fixació dels ribosomes.

### **Processament i degradació de les proteïnes**

Després de la traducció, les proteïnes obtingudes han de ser processades per tal d'obtenir molècules proteiques funcionals. A més, moltes proteïnes pateixen modificacions químiques que les converteixen en funcionals i d'altres necessiten ser transportades al seu destí en la cèl·lula per tal que puguin funcionar correctament.

La regulació de l'expressió gènica en aquesta etapa pot produir-se durant la modificació o el transport d'una proteïna. Per a poder destruir una proteïna determinada, la cèl·lula primer la "marca" tot afegint molècules d'una proteïna petita anomenada **ubiquitina** i, després, uns

complexes proteics anomenats **proteasomes** reconeixen les proteïnes marcades amb ubiquitina i les degraden (*Figura 20*).



**Figura 20. Degradació de una proteïna per un proteosoma.**  
Realització pròpia.

Els proteasomes tenen una gran importància perquè s'han trobat mutacions que fa que les proteïnes es tornin impermeables a la degradació dels proteasomes, que aquestes proteïnes persisteixin intactes i que puguin arribar a causar càncer. És per això que és de gran importància la funció dels proteasomes: degradar proteïnes.

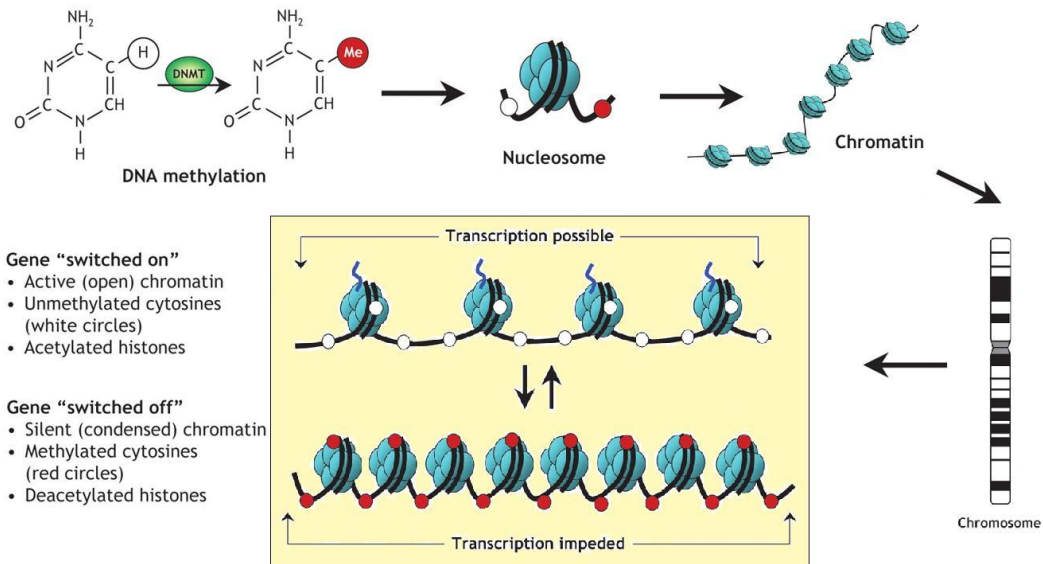
### *2.7.2. Silenciament transcripcional (TGS): la metilació*

Encara que en les cèl·lules és més comú trobar processos de silenciament posttranscripcional, els mecanismes de **silenciament transcripcional** són especialment importants pel fet que es realitzen abans del procés de la transcripció tot regulant l'expressió gènica.

Aquest procés es produeix en el nucli de la cèl·lula. Mitjançant el TGS s'impedeix la síntesi del RNAm, és a dir, no es realitza la transcripció. En aquest cas, els gens estan silenciats per modificacions a nivell d'ADN, que impliquen la seva **metilació**, és a dir, l'addició d'un grup metil (-CH<sub>3</sub>) a una molècula de DNA; usualment es metila la base nitrogenada citosina (*Figura 21*).

L'augment de metilació de l'ADN indueix a la formació d'heterocromatina, és a dir, zones d'ADN d'alta densitat que impedeixen l'accés de tots els components de la transcripció i consegüentment, els gens no s'expressen.

La metilació de citosines silencia els elements LTR i els non-LTR tot bloquejant la transcripció dels retrotransposons de RNA. És la metilació, potser, el mecanisme més entès que està involucrat en la regulació dels ETs en la línia germinal de plantes, fongs i mamífers.



**Figura 21.** Font: <https://primeravocal.org/epigenetica-mucho-mas-que-genes-de-carlos-roma-mateo/>

Les modificacions de la cromatina que acabem de veure, degudes a la metilació, no impliquen un canvi estricte en la seqüència del DNA i tot i així poden passar-se a generacions futures de cèl·lules. L'herència de trets transmesos per mecanismes que no afecten directament a la seqüència de nucleòtids s'anomena **herència epigenètica**. Cada vegada existeixen més evidències sobre la importància de la informació epigenètica en la regulació de l'expressió gènica.

## 3. PART EXPERIMENTAL

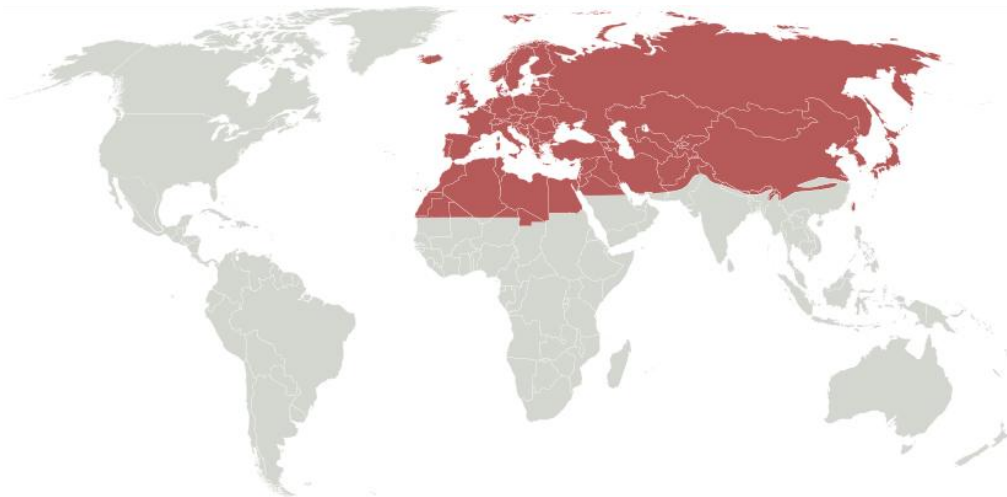
### 3.1. Fonament teòric

Actualment sabem que els genomes tenen com a funció principal conservar els gens essencials per permetre la continuïtat de la vida. Aquests gens es troben directament relacionats amb l'ambient en què viu l'organisme. Tot i així, desconeixem quan i com es duen a terme les interaccions entre ambient i genoma.

Per estudiar aquestes interaccions i veure quins són els mecanismes que permeten l'adaptació d'una població a un nou ambient, s'ha experimentat amb les espècies del gènere *Drosophila*. Una de les espècies estudiades ha estat *Drosophila subobscura* (Figura 22), una espècie originària de la regió paleàrtica (Figura 23) la qual ha estat capaç d'adaptar-se amb força èxit a diverses regions del continent americà en relativament poc temps. El que s'ha volgut estudiar és si aquesta adaptació tan ràpida ha tingut repercussions en el genoma i, en cas que n'hagi tingut, veure quines i de quina forma, com veurem més endavant.



**Figura 22.** *Drosophila Subobscura*, més coneguda amb el nom de mosca de la fruita. Font: <http://obbard.bio.ed.ac.uk/photo-gallery/Drosophilasubobscura.html>



**Figura 23.** La regió paleàrtica és una de les vuit ecozones que divideixen la superfície terrestre. Inclou les zones pintades en el mapa. Font: <https://es.wikipedia.org/wiki/Pale%C3%A1rtico>

L'estudi del que he format part s'ha centrat en la variabilitat del locus *Piwi*, un gen des d'on són codificades unes proteïnes que actuen a la línia germinal de *Drosophila* tot silenciant diverses famílies d'elements transposables (ETs). L'objectiu és minimitzar els danys que poden causar

aquests elements, com per exemple, mutacions, cada vegada que són tallats i inserits a un nou lloc del genoma.

Existeixen diversos motius que porten a pensar que l'activitat d'aquests elements podria relacionar-se amb el fet que el locus *Piwi* presenti variabilitat entre poblacions que viuen en hàbitats radicalment diferents, perquè s'ha vist que l'activitat d'aquests ETs pot variar sota l'efecte de diverses condicions estressants.

Els genomes d'eucariotes han desenvolupat un seguit de mecanismes de regulació per tal de limitar-ne la mobilitat, perquè tal com hem explicat anteriorment, la seva activitat va associada a mutacions per a l'hoste. Durant la darrera dècada, s'han descrit un seguit de proteïnes pertanyents a la família *Piwi*, molt conservada en procariotes i eucariotes, anomenades "PIWI". Un paper important d'aquestes proteïnes, a més de participar en el manteniment de la línia germinal, és silenciar els ETs que poden mobilitzar-se i ser transmesos a la descendència. Per dur a terme el silenciament dels ETs actius que estan inserits en altres llocs del genoma, les proteïnes PIWI interaccionen amb una classe d'ARNs petits anomenats "piRNAs" (veure apartat 2.7.1).

L'espècie *Drosophila subobscura* és originària de la regió Paleàrtica, com ja hem dit, i no va ser fins a finals de la dècada de 1970 que es va trobar al continent americà, on probablement hi devia arribar gràcies al comerç de productes i també de persones entre les zones nombrades. Des d'aleshores, sembla que aquesta espècie s'ha adaptat amb èxit al nou hàbitat, i ja ha estat descrita en nombroses poblacions distribuïdes principalment a Xile i a la costa oest de dels EUA. Conèixer els mecanismes que a nivell de genoma han permès o facilitat aquesta adaptació tan ràpida és de gran interès per part dels genetistes evolutius ja que s'ha trobat una relació entre el tipus de polimorfisme<sup>17</sup> i les condicions ambientals i geogràfiques en diferents espècies del gènere *Drosophila*. Com que es creu que la causa d'aquests polimorfismes és l'activitat de certs ETs, una pregunta interessant de respondre seria si existeix certa variació a nivell de proteïnes PIWI entre poblacions adaptades o en fase d'adaptació a diferents condicions climàtiques, i en cas afirmatiu, de quina manera afectaria aquesta variació a la regulació de les diferents famílies d'ETs, per exemple, facilitant-ne o reprimint-ne encara més la taxa de transposició.

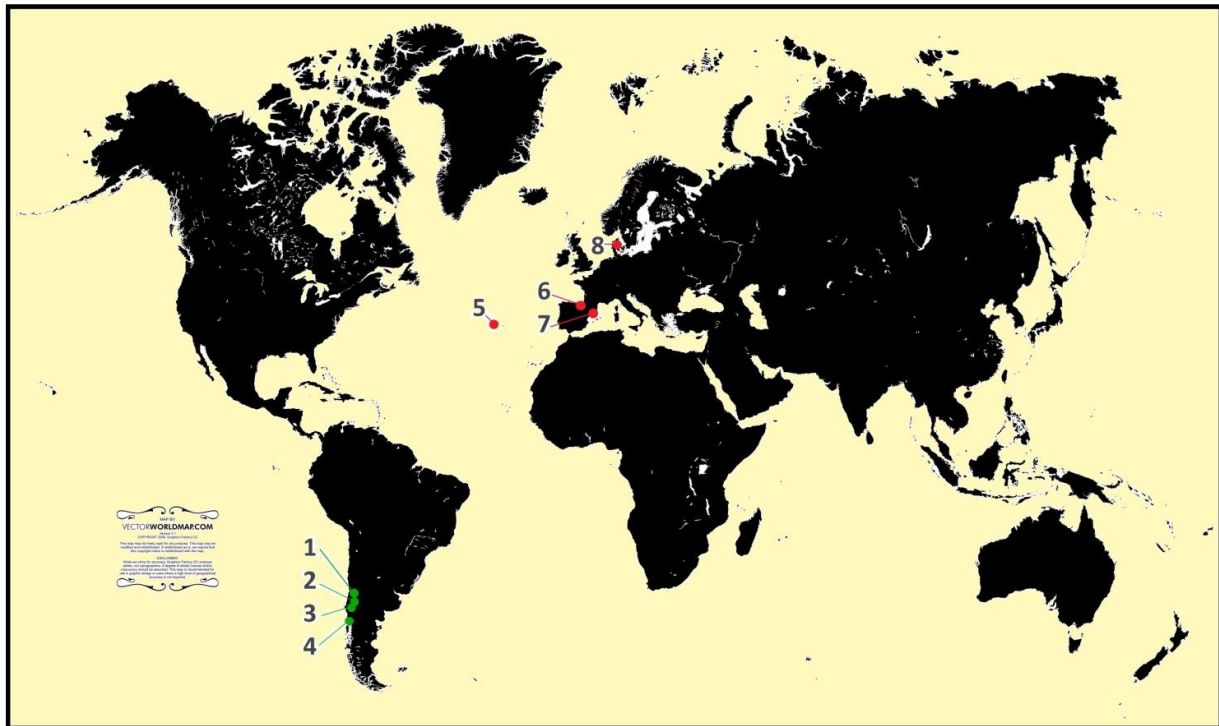
En aquest treball s'ha seqüenciat el gen *Piwi* de dues poblacions naturals de l'espècie *Drosophila subobscura*, de les quals una és originària de la regió paleàrtica, de Bilbao, i l'altra és colonitzadora

---

<sup>17</sup> Presència de diverses formes d'un caràcter o d'un gen en una població.

i procedent de Puerto Montt, Xile. Hem treballat amb aquestes dues poblacions, tot i que en el laboratori on vaig estar treballant hi havia mosques procedents de diversos llocs (**Figura 24**):

<b>POBLACIONS COLONITZADORES – Xile</b>		<b>POBLACIONS ORIGINÀRIES – Europa</b>	
1	Santiago	5	Illes Madeira (Portugal)
2	Curicó	6	Bilbao (Espanya)
3	Chillán	7	Bellaterra (Espanya)
4	Puerto Montt	8	Aarhus (Dinamarca)



**Figura 24.** Procedència de les diferents mosques: unes de poblacions originals i d'altres de colonitzadores.  
Font: <http://www.vectorworldmap.com/>

### 3.2. Objectiu

Un dels sistemes de regulació dels elements transposables són els gens. Nosaltres estudiarem concretament el gen *PIWI*, codificador de la proteïna *PIWI* la qual és la responsable del silenciament d'ETs, en mosques de l'espècie *Drosophila subobscura*, pertanyents a zones relativament allunyades l'una de l'altra: Sud Amèrica i Europa, tal i com ja hem vist.

Els objectius són intentar descriure i caracteritzar el locus *Piwi* en aquestes poblacions. També veurem les característiques més notables dels polimorfismes a nivell de seqüència nucleotídica i aminoacídica. L'objectiu final és intentar establir una **relació entre el polimorfisme de *Piwi* i la diferent activitat observada d'alguns ETs en aquestes poblacions**. És a dir, si hi ha diferències en

la regulació dels ETs entre dues poblacions de la mateixa espècie a nivell d'un gen essencial pel silenciament d'ETs, el gen PIWI, ja que les poblacions colonitzadores presenten més transposició.

Alguns estudis han observat diferències en l'activitat de certs ETs entre poblacions del vell (mosques de la regió paleàrtica) i el nou món (mosques d'Amèrica del Sud). És per això que es mira si hi ha una gran diferència entre els gens Piwi: la descripció del polimorfisme d'aquest gen en diverses poblacions originals i colonitzadores podria donar-nos pistes del paper que juga aquest gen en la regulació de la taxa de transposició.

### 3.3. Tècniques i material utilitzat

- La reacció en cadena de la polimerasa (PCR):

Per poder aconseguir moltes còpies d'un determinat segment de DNA s'utilitza la **clonació**, si la quantitat de DNA és molt petita, o la tècnica de biologia molecular de la **PCR (*Polymerase Chain Reaction*, *Reacció en Cadena de la Polimerasa*)**, si la quantitat de DNA és gran. Aquesta tècnica va ser inventada per **Kary Banks Mullis** el **1985**, guardonada amb el Premi Nobel de Química.

L'objectiu de la PCR és **obtenir un gran nombre de còpies d'un determinat fragment de DNA a partir d'una quantitat mínima** que pot ser a partir d'una sola còpia. Per tant, serveix per amplificar un fragment de DNA. Per poder fer-ho s'utilitzen DNA polimerases les quals tenen la capacitat de replicar filaments de DNA utilitzant cicles que alternen temperatures altes i baixes per poder separar les dues cadenes de DNA, és a dir, per desnaturalitzar el DNA, replicar les cadenes i en últim terme deixar que es tornin a unir amb les polimerases per tornar a realitzar un altre cicle.

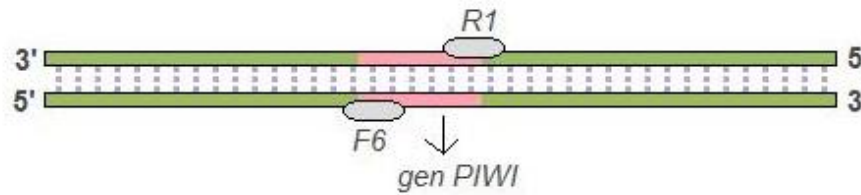
L'ADN ha d'amplificar si o si, per tant, si no s'amplifica significa que hi ha algun error. La comprovació de la PCR s'observa en l'electroforesi (*veure pàgina 42 – electroforesi*).

Els reactius que hi intervenen són:

- **Aigua (H<sub>2</sub>O)**
- Un **tampó, solució amortidora** o **buffer**: contenen MgCl<sub>2</sub> que permeten un bon funcionament de l'ADN polimerasa ja que manté el pH òptim.
- **Desoxinucleòtids trifosfats (dNTPs)**
- **DNA motlle** o **cadena principal**: conté el fragment de DNA que interessa amplificar.
- **2 encebadors o primers: L i R**. Cadascun d'ells és complementari a una regió dels filaments de DNA (**Figura 24**). Són seqüències curtes d'entre 18 i 30 nucleòtids que són reconegudes per la polimerasa ja que delimiten la zona de DNA per amplificar i això permet iniciar el



procés. Quan amplifiquem l'ADN en la PCR, només s'amplifica la zona compresa entre les seqüències complementàries al primer (**Figura 25**).



**Figura 25.** Exemple dels primers en el cas del gen *PIWI*. Realització pròpia

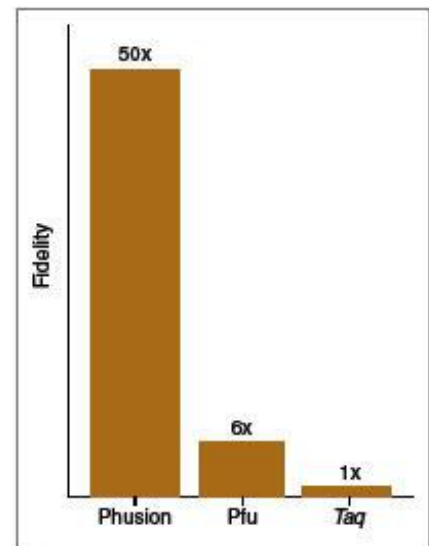
- **ADN polimerasa:** és l'enzim principal que intervé en la replicació. Quan reconeix una seqüència inicial anomenada primer o encebador, comença a recórrer la cadena principal de DNA i a mesura que avança afegeix els nucleòtids (dNTPs) corresponents per tal de construir la cadena complementària.

N'hi ha de diverses classes (**Figura 26**). Al principi s'utilitzaven polimerases que amb les altes temperatures es desnaturalitzaven i s'havien d'anar renovant a cadascun dels cicles del procés; és per això que es van buscar polimerases que suportessin temperatures molt altes davant les quals la seva estructura no es veïés afectada. Actualment s'utilitzen **DNA polimerases termostables** extretes de microorganismes adaptats per viure a aquestes temperatures, com per exemple els arqueobacteris.

Algunes d'elles i les més comunes són:

- \* **Taq polimerasa:** molt processada. Extreta del bacteri *Thermus aquaticus*, el qual viu en fonts hidrotermals submarines i està adaptat per viure a aquestes temperatures.
- \* *Pyrococcus furiosus* (PFU): permet la correcció d'errors
- \* *Thermococcus litoralis* (Vent): permet la correcció d'errors
- \* *Thermus thermophilus* (Tth)
- \* **Polimerasa DFS**
- \* **Polimerasa phusion:** capacitat de correcció dels errors en la col·locació de les bases.

A més, es caracteritza per la seva estructura la qual n'augmenta la fidelitat i la rapidesa. Té una taxa d'error 50 vegades menor que la *Taq DNA Polimerasa* i 6 vegades menor que la *polimerasa Pyrococcus furiosus*.



**Figura 26.** Fidelitat de les polimerases. Font:

<https://www.neb.com/products/m0530-phusion-high-fidelity-dna-polymerase>

- **Termociclador:** aparell que duu a terme els canvis de temperatura necessaris per a realitzar els diversos cicles i així poder amplificar la regió de DNA que ens interessa i obtenir un nombre de còpies més elevat.

- Preparació dels tubs de la reacció. Haurem de preparar tants tubs o eppendorfs com mostres de DNA diferents vulguem amplificar. En primer lloc, s'ha de fer la *mix* o barreja de tots els reactius comuns i necessaris en totes les mostres.

Les quantitats de reactius necessàries per obtenir la mix seran les de la **Taula 2** i cal afegir-les seguint l'ordre en què apareixen. Cal tindre en compte que aquestes quantitats només són aptes per obtenir la mix d'un sol tub de reacció i segons el nombre de tubs que tinguem, és a dir, segons el nombre de mostres, caldrà multiplicar-ne les quantitats. Això no vol dir que preparem la mix individualment per a cada mostra, sinó que es prepara col·lectivament i després es reparteix en els diferents tubs.

Quantitats per a una mostra		
<i>Aigua H<sub>2</sub>O</i>	12,4µL	
<i>Buffer HF</i>	4 µL	
<i>dNTPs</i>	0,4 µL	
Encebadors	<i>L</i>	1 µL
	<i>R</i>	1 µL
<i>Polimerasa</i> <sup>18</sup>	0,2 µL	
19 µL + 1 µL d'ADN		

**Taula 2.** Realització pròpia.

Un punt important és el fet que un dels tubs servirà de control i, per tant, ens servirà per vigilar que les mostres no s'hagin conteminat.

**NOTA:** Mentre realitzem la *mix*, pot ser que en algun dels reactius apareguin bombolletes d'aire. Per eliminar-les caldrà utilitzar una centrifugadora la qual té com a funció separar les molècules segons la seva densitat i també va bé per fer "explotar" les bombolletes d'aire (**Figura 27**). Si no n'és el cas, aquest pas no serà necessari.

Un cop obtinguda la *mix* final, centrifugarem el tub que conté



**Figura 27.** Centrifugadora. Font: imatge pròpia.

<sup>18</sup> Les quantitat de la polimerasa poden variar segons del tipus que sigui.

tota la *mix* per tal que tots els reactius es barregin i quedin acumulats en el fons de l'*ependorf*.

**NOTA:** Quan centrifuguem una sola mostra cal fer un contrapès amb un *blanc* del mateix pes per tal que quedi ben repartit. L'explicació és que el pes dels tubs s'incrementa a elevades velocitats. Així, una diferència de centígrams entre dos tubs pot generar una diferència de grams o fins i tot de quilograms dins la centrífuga en marxa. Si no utilitzéssim aquest contrapès, la mostra es podria fer malbé ja que la màquina estaria patint molt.

Amb l'ajuda d'una pipeta succionarem 19  $\mu\text{L}$  de la mix del tub i els posarem en d'altres tubs. És important assignar un número o una lletra a cada tub i mostra per tal de conèixer-ne el contingut i no confondre'ns.

A cadascun dels tubs s'hi afegeix 1  $\mu\text{L}$  de l'ADN de la mostra corresponent, a excepció del tub de control que no s'hi afegeix 1  $\mu\text{L}$  d'ADN sinó 1  $\mu\text{L}$  d'aigua.

Per exemple, si tinguéssim 3 mostres de DNA, amb la preparació dels tubs s'obtidria:

TUB 1: 19  $\mu\text{L}$  mix + 1  $\mu\text{L}$  d'ADN de la població 1

TUB 2: 19  $\mu\text{L}$  mix + 1  $\mu\text{L}$  d'ADN de la població 2

TUB 3: 19  $\mu\text{L}$  mix + 1  $\mu\text{L}$  d'ADN de la població 3

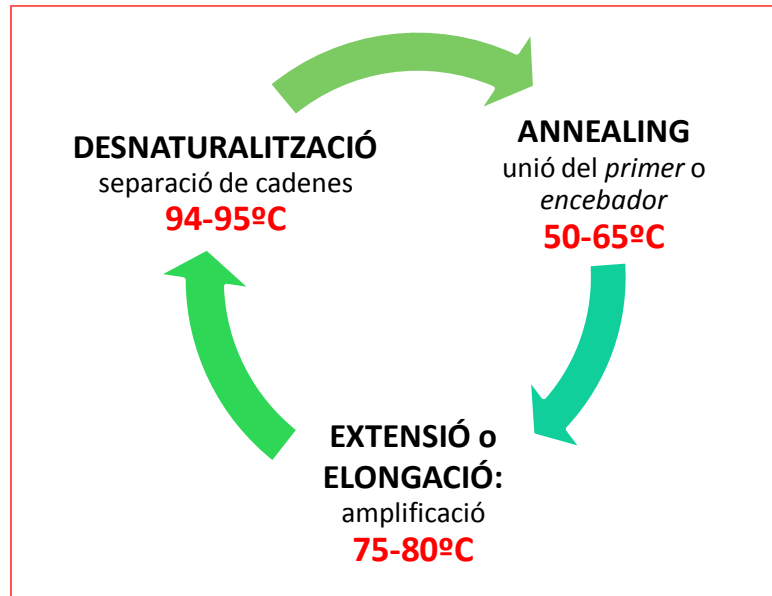
TUB 4 de control: 19  $\mu\text{L}$  mix + 1  $\mu\text{L}$  d' $\text{H}_2\text{O}$

Introduïrem les diverses mostres en un *vórtex de laboratori* (**Figura 28**) per tal d'agitar-les i que els reactius es mesclin correctament. A més, són centrifugades 30 segons per tal d'eliminar les possibles bombolletes.

- **Termociclador:** consisteix en col·locar les diferents mostres al **termociclador**, el qual permet escalfar i refredar els tubs de reacció per tal de controlar la temperatura necessària a cada etapa de la reacció. Allí s'hi duen a terme les fases de **desnaturalització**, **annealing** i **elongació** a diferents temperatures (**Figura 29**).



**Figura 28. Vórtex de laboratori** Font: <http://www.directindustry.es/prod/harvard-apparatus/product-22358-1325713.html>



**Figura 29. Etapes d'una PCR**  
Realització pròpia

El procés de la PCR consisteix en general en una sèrie de 20 a 35 canvis repetits de temperatura anomenats cicles; cada cicle sol consistir en 3 passos a diferents temperatures. Les temperatures utilitzades i el temps aplicat a cada cicle depenen d'una gran varietat de paràmetres.

- **Inicialització.** Aquest pas consisteix a escalfar la reacció fins a una temperatura de 94-96 °C que es manté durant 1-9 minuts. Això només és necessari per a l'ADN polimerasa, que requereix l'activació per calor.
- **Desnaturalització.** Se separen les 2 cadenes que componen l'ADN, és a dir, es desnaturalitza. Aquest pas es realitza a una temperatura d'entre 94 i 95 °C.
- **Alineament/unió de l'encebador.** A continuació l'encebador és acoblat a la seva seqüència complementària de l'ADN motlle, és a dir, es formen ponts d'hidrogen, uns tipus d'enllaços, entre les cadenes de DNA ja que la seqüència de l'encebador és molt similar a la de l'ADN motlle. Per fer-ho, cal baixar la temperatura a 50-65 °C durant 20-40 segons permetent així l'alineament. Els encebadors limiten la regió que han d'amplificar, per això la polimerasa sap a on s'ha d'unir. Un cop unida comença a sintetitzar.
- **Extensió/elongació de la cadena.** L'ADN polimerasa compleix la seva funció, prenent l'ADN motlle per sintetitzar la cadena complementària i partint de l'encebador com a suport inicial necessari per la síntesi del nou ADN. Per realitzar aquest procés cal que la mostra estigui a una temperatura de 75–80 °C. La polimerasa sintetitza una nova cadena d'ADN complementària a

la cadena motlle afegint els dNTPs complementaris en direcció 5' → 3', unint el grup 5' -fosfat dels dNTP al grup 3'- hidroxil del final de la cadena d'ADN creixent. La temperatura d'aquest pas depèn de l'ADN polimerasa que es faci servir. El temps d'extensió depèn tant de l'ADN polimerasa utilitzada com de la longitud del fragment d'ADN per amplificar. Com a regla general, a la seva temperatura òptima, la polimerasa d'ADN és capaç de polimeritzar 1000 bases en un minut.

- **Elongació final.** Etapa única que es duu a terme a una temperatura de 70-74 °C durant 5-15 minuts després de l'últim cicle de la PCR. Assegura que qualsevol ADN de la cadena simple restant sigui totalment ampliada.
- **Conservació.** Aquest pas es duu a terme a 4-15 °C durant un temps indefinit per conservar la reacció a curt termini.

A la pràctica, la PCR pot fallar per diverses raons, però normalment els errors són deguts a la seva sensibilitat a la contaminació, que a vegades provoca l'amplificació d'ADN "fals".

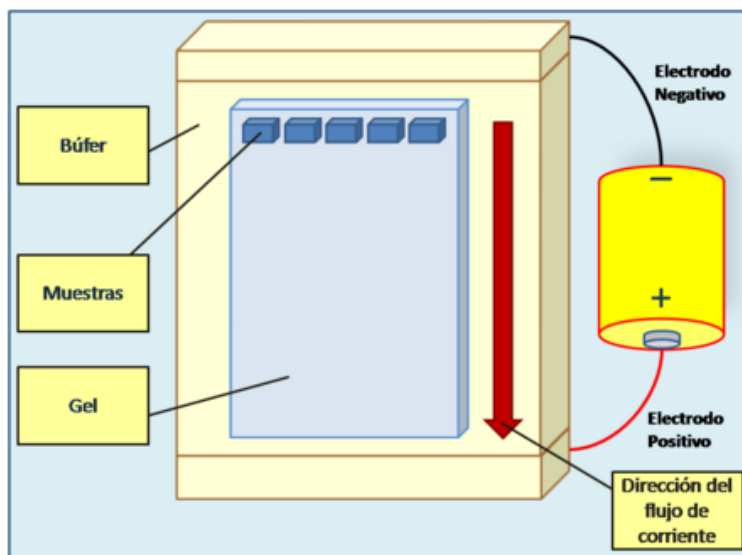
La contaminació amb ADNs estranys es pot solucionar mitjançant protocols i procediments que consisteixen en:

- separar els llocs de treball on es realitza la PCR dels d'anàlisi o purificació dels productes de PCR
- mantindre una bona neteja de la superfície de treball entre la realització d'una PCR i la següent
- millorar el disseny dels encebadors per millorar el resultat de la PCR.

- **Electroforesi:**

Serveix per comprovar que la PCR ha sortit correctament i, per tant, que l'ADN ha amplificat.

Consisteix en sotmetre molècules a un camp elèctric. Les molècules seran de càrrega positiva o de càrrega negativa, i segons la seva càrrega es mouran cap al pol positiu o cap al negatiu (**Figura 30**). En el cas de l'ADN, la càrrega és negativa i ve donada pel grup fosfat; per tant, les partícules de DNA es mouran cap al pol positiu.



**Figura 30. Esquema de l'electroforesi**

Font: [http://creationwiki.org/es/Electroforesis\\_en\\_gel](http://creationwiki.org/es/Electroforesis_en_gel)

## 1. Preparació del gel d'agarosa

1.1. Necessitem una concentració del 0'6% d'agarosa, per això pesem 0'6g d'agarosa a la balança i els introduïm en un matràs d'Erlenmeyer.

1.2. Afegim 100 mL de tampó en el matràs.

1.3. L'escalfem al microones fins que no quedin grums d'agarosa, és a dir, fins que es vegi transparent, o sigui, una solució homogènia.

1.4. Deixem que es refredi (a ull) fins que estigui tebi per poder posar el colorant que reaccionarà amb el DNA. Ens podem ajudar d'aigua freda per tal de disminuir la temperatura més ràpidament.

1.5. Una vegada tebi, afegim 5 µL de la solució de tinció de l'àcid nucleic *Midori Green*, un colorant el qual s'intercala entre les dues cadenes de DNA i permet detectar-lo. A més, permet l'observació de les bandes en els raigs UV.

**NOTA:** Actualment s'utilitza *Midori Green*, però fins fa poc s'utilitzava el *bromur d'etidi (EtBr)* el qual és tòxic (**Figura 31**).

1.6. Afegim la solució en la cubeta d'electroforesi la qual conté tampó per poder cobrir el gel i evitar que aquest s'escalfi massa i es trenqui.

AGAROSA
100 mL de gel → 0'6 g d'agarosa
MIDORI GREEN
100 mL de gel → 5 µL de midori

**Taula 3.** Realització pròpia.



**Figura 31.** Imatge pròpia.

1.7. Col·loquem les pintes en la cubeta junt amb la solució del gel. Quan es retirin aquestes pintes quedaran uns forats anomenats **pous** que són els llocs on es col·locaran les mostres d'ADN les quals hem amplificat anteriorment en la PCR.

Cadascun dels pous és el començament d'un **carril**. Un d'aquests carrils serà un carril guia o *ladder* el qual servirà per veure la mida de les bandes.

1.8. Deixem reposar la solució durant uns 20 min per tal que es formi el gel.

## 2. Preparació de les mostres:

2.1. Agafem tants eppendorfs com mostres tenim i hi afegim 2  $\mu\text{L}$  d'aigua en cadascun d'ells amb l'ajuda de la pipeta.

2.2. Afegim 1  $\mu\text{L}$  de tampó de càrrega en cadascun dels eppendorfs.

El **tampó de càrrega**, de color blau, és el que avança en conjunt però l'ADN es pot quedar a mig lloc depenent de la seva mida o directament pot no ser-hi; per això caldrà revelar amb llum ultraviolada per tal de veure la posició de les bandes.

2.3. Afegim 1  $\mu\text{L}$  de cada mostra obtinguda en la PCR el qual contindrà, si tot ha anat bé, l'ADN amplificat amb els gens PIWI. En aquest pas és important anar canviant les puntes de la pipeta per tal d'evitar que les mostres es contaminin.

2.4. Centrifuguem les mostres preparades per a poder realitzar l'electroforesi.

3. **Càrrega del pous amb les mostres.** Agafem 4  $\mu\text{L}$  de cada mostra i amb l'ajuda d'una pipeta els col·loquem en els **pous del gel d'agarosa**; es diu que *carreguem els pous*. L'agarosa és porosa, o sigui, conté porus; per tant, el DNA petit farà més via a passar a través dels porus i les bandes avançaran més. Si el DNA és més gran, li costarà més córrer a través dels porus i, per tant, les bandes avançaran menys.

És important apuntar quin carril hem carregat amb cada mostra per després poder-ne fer una valoració.

4. Una vegada carregats els pous, col·loquem la gradeta a l'aparell i **encenem el corrent** a 80V durant 1 hora.

Tenint en compte que l'ADN té una càrrega negativa i que el corrent circula de negatiu a positiu, l'ADN tindrà tendència a desplaçar-se cap al pol contrari, és a dir, cap al positiu.

5. Passada l'hora, traiem la cubeta d'electroforesi i la portem a la **màquina de raigs UV**. Aquesta és la que ens permetrà veure les bandes d'ADN.

Com més fosques siguin les bandes, més ADN hi haurà però no es podrà quantificar.

- **Purificació:**

La purificació serveix per extreure només el filament d'ADN que obtenim del PCR i el qual ja ha estat amplificat un nombre determinat de vegades que està junt amb el buffer, la polimerasa, etc.

**PASSOS:**

1. Afegim un buffer, en aquest cas NTI (**Figura 32**), en totes les mostres.

2. Filtració de les diferents mostres per tal d'obtenir només l'ADN  
2.1. Col·loquem les diferents mostres en tubs amb filtres (**Figura 33**).

2.2. Les centrifuguem durant 30 segons per tal que es filtri allò que no ens interessa.

2.3. Llancem allò que no vulguem.

2.4. Afegim 700 µL del buffer NT3 (**Figura 32**) i centrifuguem per tal que es torni a filtrar l'ADN i així poder eliminar les impureses. Descartem el líquid filtrat.

2.5. Repetim el procés 2.4. per tal d'obtenir resultats més acurats.

2.6. Centrifuguem per assegurar-nos que no quedin ni etanols ni impureses.

2.7. Col·loquem els tubs amb filtre dins d'un tub normal.

2.8. Afegim entre 15 i 30 µL d'H<sub>2</sub>O, en aquest cas 16 µL, a cadascuna de les mostres.

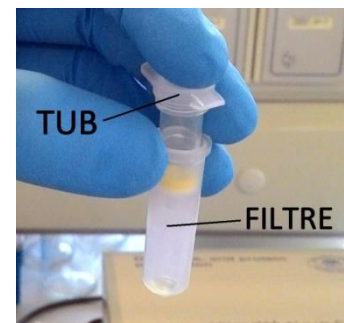
2.9. Durant 1 minut mantenim les mostres a temperatura ambient (18 – 25°C).

2.10. Centrifuguem les mostres: l'H<sub>2</sub>O precipitarà tot filtrant-se junt amb el DNA.

2.11. Realitzem la quantificació per saber-ne la concentració del DNA (*veure pàgina 52*).



**Figura 32.** Imatge pròpia.



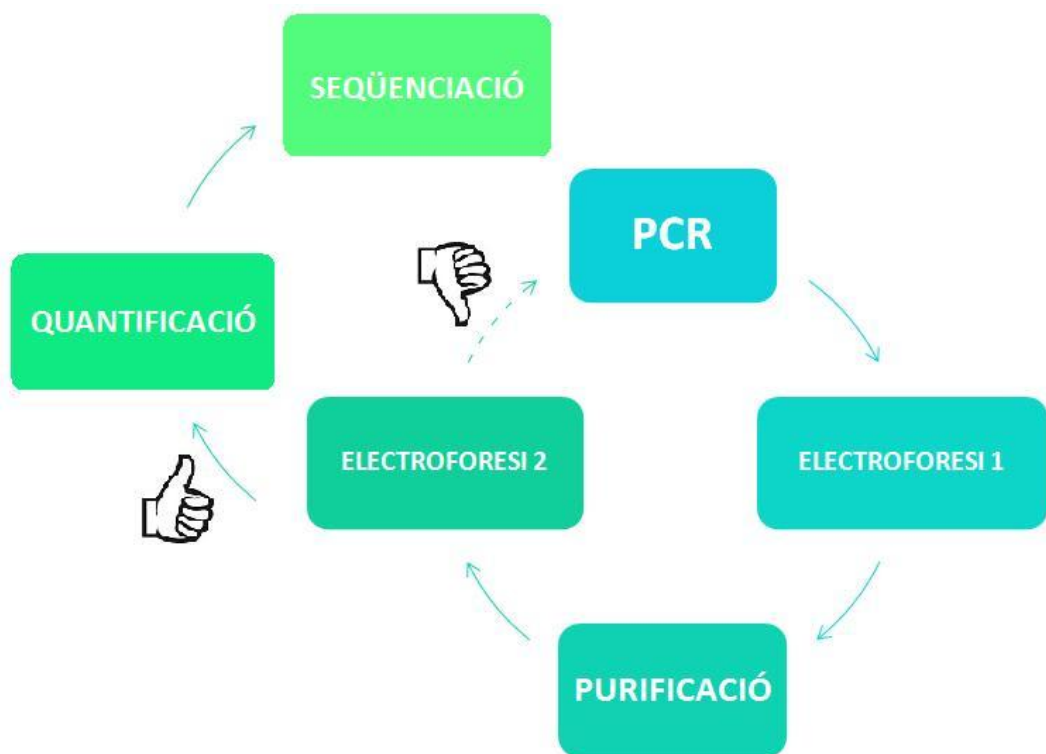
**Figura 33.** Imatge pròpia.

### **3.4. Pràctica**

Fins ara hem explicat en què consisteix cadascun dels processos que realitzarem, però ara ve el que realment és la pràctica d'aquest treball. Aquesta es divideix en dues parts: una primera, la qual es basa en el treball al laboratori, i una segona que consisteix en treballar els resultats obtinguts en el laboratori mitjançant la bioinformàtica.



## Treball al laboratori



**Figura 34. Procés de la primera part:** s'iniciarà amb la PCR, seguit d'una electroforesi, una purificació i una altra electroforesi. Si aquesta segona electroforesi no sortís bé, tornariem a començar el procés. En cas contrari, continuariem amb una quantificació de l'ADN i, finalment, una seqüenciació.  
Realització pròpia.

- PCR:

Treballarem diferents mostres cadascuna de les quals correspon a l'ADN d'una població diferent formada pel material genètic d'entre 5 i 10 mosques (**Figura 35**):

1. Puerto Montt I3 XVII
2. Bilbao I3b V 2
3. Control negatiu



**Figura 35. Pots en els quals viuen les mosques en el laboratori.** Font: Imatge pròpia

Els reactius i les quantitats que utilitzarem per preparar la *mix* seran les següents (**Taula 4**):

MIX	1 reacció		3 reaccions	
	<i>Aigua H<sub>2</sub>O</i>	12,4 µL	<i>Aigua H<sub>2</sub>O</i>	37,2 µL
	<i>Buffer HF</i>	4 µL	<i>Buffer HF</i>	12 µL
	<i>dNTPs</i>	0,4 µL	<i>dNTPs</i>	1,2 µL
	<i>L1 (L)</i>	1 µL	<i>L1 (L)</i>	3 µL
	<i>F6 (R)</i>	1 µL	<i>F6 (R)</i>	3 µL
	<i>Polimerasa Phusion</i>	0,2 µL	<i>Polimerasa Phusion</i>	0,6 µL
	19 µL + 1 µL d'ADN		57 µL	+3 µL
		Puerto Montt I3 XVII	19 µL	+ 1 µL de DNA
		Bilbao I3b V 2	19 µL	+ 1 µL de DNA
		Control negatiu	19 µL	+ 1 µL d'H <sub>2</sub> O

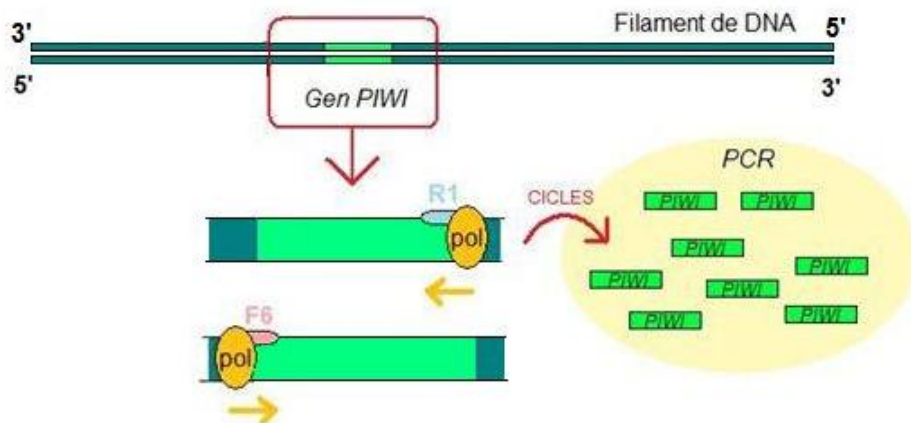
**Taula 4.** Realització pròpia.

Els primers utilitzats són els que anomenem L1 i F6 i les seves seqüències, les quals seran complementàries a les del filament de DNA, són les següents:

**L (F6):** 5' – ACT CTG TGG AAT GGC GTG CAA – 3'

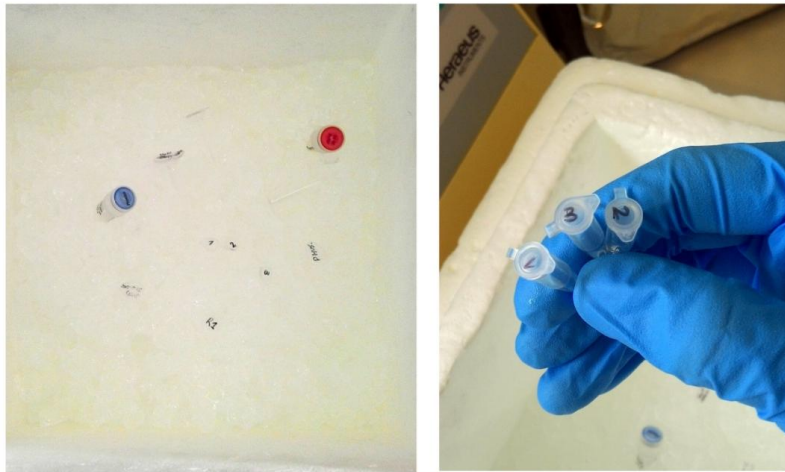
**R (R1):** 5' – GAG CCG CCA ATC CCA TCA AG – 3'

Si necessitem dos primers és perquè volem delimitar la zona que ens interessa. El primer L (F6) és el que delimita la zona per l'esquerra i el R (R1) per la dreta (**Figura 36**); d'aquí ve la L de *left* que vol dir *esquerra* i la R de *right* que significa *dreta* en anglès.



**Figura 36.** Realització pròpia

Quan estem fent la mix, mantindrem els reactius en gel i quan col·loquem els 19 µL de *mix* a cada eppendorf de 0,2mL s'han d'anar posant en gel. Això és perquè hi ha reactius delicats, com ara la polimerasa o els ADNs (**Figura 37**).



**Figura 37.** Els reactius de la mix en gel i les mostres obtingudes. Font: imatge pròpia

Centrifuguem les 3 mostres obtingudes durant 1 minut per tal de barrejar els 19  $\mu$ L de mix i l'ADN correctament i per portar tots els reactius al fons de l'ependorf. Després, col·locarem les 3 mostres en el termociclador (**Figura 38**).



**Figura 38.** Mostres a la centrifugadora i al termociclador respectivament. Font: imatge pròpia.

• **ELECTROFORESI 1:** (**Figura 39**)

1. Preparació del gel d'agarosa: 20 minuts d'espera
2. Preparació de les mostres

<i>Nº de mostra</i>	<i>Reactius per preparar les mostres</i>		
2'	1 $\mu$ L de TC	+2 $\mu$ L de H <sub>2</sub> O	+1 $\mu$ L de DNA Puerto Montt I3 XVII
3'	1 $\mu$ L de TC	+2 $\mu$ L de H <sub>2</sub> O	+1 $\mu$ L de DNA Bilbao I3b V 2
4'	1 $\mu$ L de TC	+2 $\mu$ L de H <sub>2</sub> O	+1 $\mu$ L de H <sub>2</sub> O

**Taula 5.** Realització pròpia.

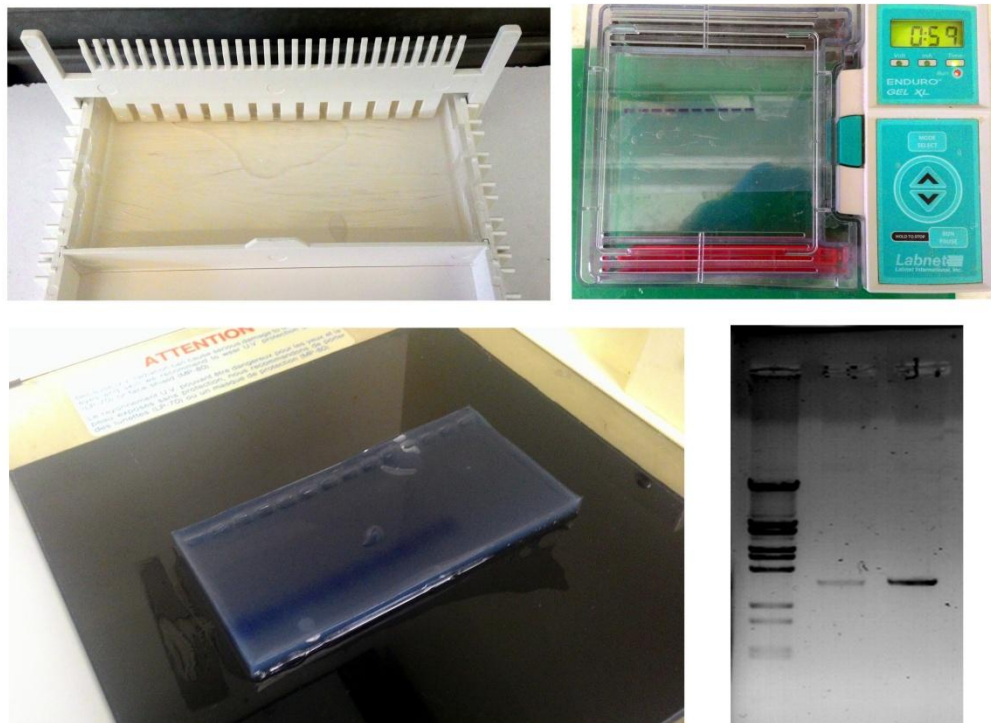
**3. Càrrega dels pous amb les mostres**

<b>POUS</b>	<b>ADN de les mosques</b>	<b>Número de mostra</b>
<b>1</b>	Ladder	
<b>2</b>	Puerto Montt I3 XVII	2'
<b>3</b>	Bilbao I3b V 2	3'
<b>4</b>	Control negatiu	4'

**Taula 6.** Realització pròpia

**4. Corrent en la gradeta d'electroforesi: 80 volts durant 1h**

**5.** Un cop ha passat aquesta hora, comprovem en la **màquina de raigs UV** si l'ADN ha amplificat (apareixeran unes bandes).



**Figura 39. Electroforesi.**

Dalt esquerra: mostra de la pinta col·locada de manera que donarà lloc als diversos pous.

Dalt dreta: gradeta d'electroforesi en marxa.

Baix esquerra: gel d'agarosa després que les mostres hagin corregut.

Baix dreta: resultats de la màquina de raigs UV on podem apreciar les bandes que verifiquen que l'ADN ha amplificat.

Font: Imatges pròpies.

• **PURIFICACIÓ:**

Consisteix en eliminar tots aquells reactius utilitzats en la PCR i en la 1a electroforesi per tal d'obtenir només l'ADN ja amplificat.

Nom de les mostres
2' → 1
3' → 2

No utilitzarem el control negatiu ja que no conté DNA, i purificarem les mostres 2' i 3'. Abans però, canviarem el nom de les mostres per 1 i 2 per una qüestió de comoditat.

1. Per cada 1 volum de mostra utilitzarem 2 volums de buffer NTI. Aleshores, si disposem de 19  $\mu\text{L}$  (en la PCR hem obtingut 20  $\mu\text{L}$  però hem utilitzat 1  $\mu\text{L}$  per l'electroforesi) , necessitarem 38  $\mu\text{L}$  del buffer NTI.

Per tant, afegim 38  $\mu\text{L}$  del buffer NTI a cadascuna de les mostres. Tindrem en total 57  $\mu\text{L}$  de mostra en cadascun dels eppendorfs.

2. Posem els 57  $\mu\text{L}$  de mostra a una columna amb filtre la qual es troba a l'interior d'un tub col·lector.
3. Centrifuguem durant 30 segons.
4. Afegim 700  $\mu\text{L}$  del buffer NT3 a cadascun dels tubs.
5. Centrifuguem durant 30 segons.
6. Eliminem els residus que s'han filtrat del tub col·lector.
7. Afegim 700  $\mu\text{L}$  del buffer NT3 a cadascun dels tubs.
8. Centrifuguem durant 30 segons.
9. Eliminem els residus que s'han filtrat del tub col·lector.
10. Centrifuguem durant 1 minut.
11. Canviem les columnes amb filtres dels tubs col·lectors i les situem en eppendorfs.
12. Afegim 16  $\mu\text{L}$  d' $\text{H}_2\text{O}$  al filtre.
13. Incubem durant 1 minut a temperatura ambient.
14. Centrifuguem durant 1 min per tal que el DNA es filtri i quedi a l'eppendorf ja que passarà junt amb l'aigua.
15. Finalment, obtenim l'ADN purificat.

- **ELECTROFORESI 2:**

Per tal de comprovar ja no possibles contaminacions, sinó que realment l'ADN ha amplificat. No és necessari el control negatiu ja que les contaminacions ja han estat descartades en la primera electroforesi. Partim dels 16  $\mu\text{L}$  d' $\text{H}_2\text{O}$  amb DNA que hem obtingut de la purificació.

**1. Preparació del gel d'agarosa:** 20 minuts d'espera

**2. Preparació de les mostres**

<b>Nº de mostra</b>	<b>Reactius per preparar les mostres</b>		
1	1 $\mu\text{L}$ de TC	+2 $\mu\text{L}$ de $\text{H}_2\text{O}$	+1 $\mu\text{L}$ de DNA Puerto Montt I3 XVII
2	1 $\mu\text{L}$ de TC	+2 $\mu\text{L}$ de $\text{H}_2\text{O}$	+1 $\mu\text{L}$ de DNA Bilbao I3b V 2

**Taula 7.** Realització pròpia

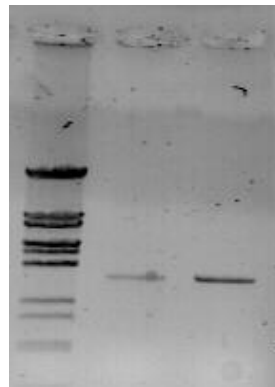
3. **Càrrega dels pous amb les mostres:** abans, fem un vòrtex a les mostres 1 i 2.

<b>POUS</b>	<b>ADN de les mosques</b>	<b>Número de mostra</b>
<b>1</b>	Ladder	
<b>2</b>	Puerto Montt I3 XVII	1
<b>3</b>	Bilbao I3b V 2	2

**Taula 8.** Realització pròpia

4. **Corrent en la gradeta d'electroforesis:** 80 volts durant 1h.

5. Tornarem a comprovar que l'ADN realment ha amplificat mitjançant la màquina de raigs UV, i obtenim uns bons resultats (**Figura 40**).



**Figura 40.** Resultats de l'electroforesi 2. Les bandes que hi ha en la 2a i 3a columna ens indiquen que l'ADN ha amplificat correctament. Imatge pròpia.

• **QUANTIFICACIÓ:**

Des dels 15 µL restants de les mostres obtingudes en la purificació podrem quantificar el DNA per conèixer-ne la seva concentració.

Aquí tornarem a utilitzar un control negatiu que serà aigua (H<sub>2</sub>O).

La concentració és mesurada per la màquina **NANODROP** (**Figura 41**) la qual compara la longitud d'ona del control negatiu amb la longitud d'ona de la mostra 1 i 2. Per tant, la concentració de DNA és mira a partir de la longitud d'ona.



**Figura 41.** Imatge pròpia.

Consisteix en agafar 1 µL de cada mostra i del control i, individualment, col·locar aquesta gota en un punt indicat de la màquina (**Figura 41**). És així com la *nanodrop* podrà calcular la concentració de cada mostra (**Taula 9**).

Mostres		Concentració
1	Curicó I3b VI 1	38,4 ng/ $\mu$ L
2	Bilbao I3b V 2	49,2 ng/ $\mu$ L
3	Control negatiu	0'3 ng/ $\mu$ L

Taula 9. Realització pròpia

• SEQÜENCIACIÓ:

Agafem les mostres 1 i 2 de la quantificació, és a dir, les quals contenen 15  $\mu$ L de DNA juntament amb aigua, i s'etiqueten amb el nom que vulguem. En el meu cas, les he nombrat de la següent forma:

Mostres	Etiqueta
1	Puerto Montt I3 XVII
2	Bilbao I3b V 2

Taula 10. Realització pròpia

Per seqüenciar el que es fa és localitzar la seqüència de DNA que es trobi més vegades replicada i llavors interpretar-ne la seqüència a partir d'uns processos realitzats a laboratoris especials que es dediquen únicament a aquesta tasca. És per això que enviarem les mostres (Figura 42) a una empresa, *Macrogen*, i aquesta ens enviarà els resultats.



Figura 42. Mostres llestes per enviar. Imatge pròpia.

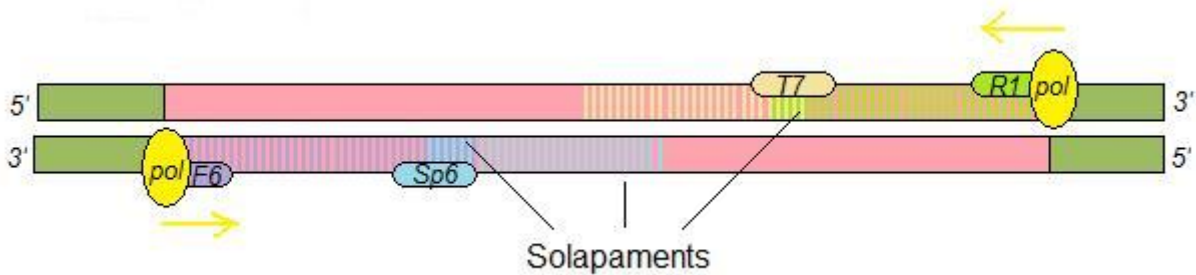
A més de les mostres de DNA que volem seqüenciar, també enviarem els encebadors o primers els quals són necessaris per a realitzar la reacció de seqüenciació. Però no només s'enviaran els primers que abans hem utilitzat per la PCR, és a dir, els externs, sinó que s'enviaran uns altres primers que no s'havien utilitzat abans, que són els interns. Això és perquè en la primera ronda de seqüenciació només es poden aconseguir unes 100 bases de la seqüència per cada primer, però la nostra seqüència té moltes més que aquestes bases. És per això que l'empresa utilitza una "guia" que són els primers interns per fer una segona ronda i així aconseguir cobrir tota la seqüència que ens interessa (Figura 43).

**R (R1):** 5' – ACT CTG TGG AAT GGC GTG CAA – 3'

**L (F6):** 5' – GAG CCG CCA ATC CCA TCA AG – 3'

**SP6:** 5' – CCT CTC GCA AAG GTA TAG CA – 3'

**T7:** 5' – GCA ACT CAA TCA TCC ATG GT – 3'



**Figura 43.** Realització pròpia.

En el nostre cas el que volem és aconseguir seqüenciar el gen PIWI de cada mostra, el qual estarà repetit moltes vegades gràcies a la PCR. És per això que no interessa que les mosques siguin heterozigòtiques perquè les seqüències d'ADN d'aquest gen poden arribar a variar molt i, per tant, a donar lloc resultats confosos. Per aconseguir que els dos al·lels pel gen Piwi de les mosques siguin iguals, el que es fa és aconseguir línies isogèniques que consisteix en anar creuant mosques entre germans dels mateixos pares durant diverses generacions.

## INTERPRETACIÓ GRÀCIES A LA BIONFORMÀTICA

Una vegada els resultats de la seqüenciació ens han arribat, els hem d'interpretar. Per a interpretar-los el que volem és poder comparar la seqüència de nucleòtids del gen PIWI de la mostra *Puerto Montt 13 XVII* i la seqüència del gen PIWI de la mostra *Bilbao 13b V 2* tot col·locant-les una damunt de l'altra, pas que rep el nom d'**alineament**. Tot i així, no és tan fàcil i per arribar a tindre les dues seqüències alineades són necessaris diversos passos entremitjos.

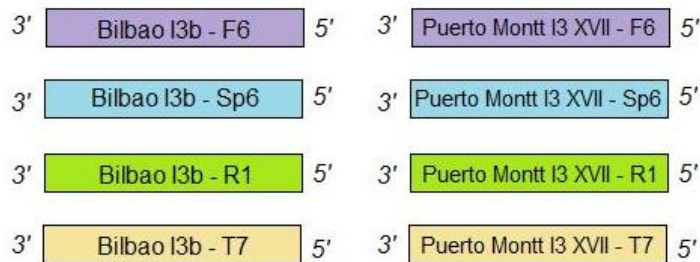
Com ja he explicat abans, aquesta és la part en que es toca la bioinformàtica, una *ciència estratègica imprescindible per donar sentit a l'allau de dades biològiques noves generades, per explicar el funcionament dels sistemes biològics i per generar nous recursos, béns i serveis que derivin dels nous coneixements i tecnologies*; segons la Universitat Autònoma de Barcelona. O sigui, consisteix en l'aplicació de tècniques informàtiques a la informació biològica.



Els programes bioinformàtics que he utilitzat són eines molt potents. Alguns d'ells són programes en línia (*Augustus bioinformatics*, *Blast*, *Clustal* i *Bioinformatics*), i d'altres s'han de descarregar (*Bioedit*: totalment gratuït). Aniran apareixent a mesura que avança el procés d'alineament.

Treballarem amb seqüències de nucleòtids, cadascun d'ells representats per la base nitrogenada que té. Per exemple: 5'...TCCCGACCAGTTATAGTAGA..3'.

1. L'empresa ens envia les seqüències de les mostres que vam enviar: *Puerto Montt I3 XVII* i *Bilbao I3b V 2*. Cadascuna de les seqüències de cada mostra està formada per 4 seqüències diferents: una seqüència per cada primer o encebador (F6, R1, SP6, T7) que ha permès a l'empresa determinar cadascun dels trossos que formen la seqüència total d'una mostra. A partir d'ara ens dirigirem a cada seqüència rebuda pel nom del primer que hagi permès seqüenciar aquella seqüència (**Figura 44**).



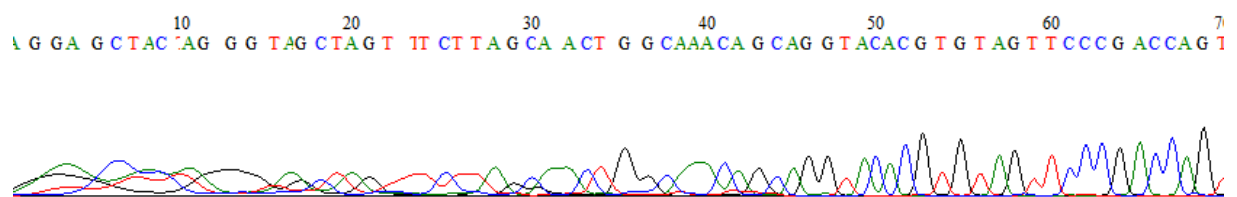
**Figura 44.** Realització pròpia

En conclusió, rebem 4 arxius amb 4 seqüències corresponents al gen *PIWI* de la mostra Curicó I3b, i 4 arxius més amb les 4 de la mostra Bilbao I3b. Per tant, tenim un total de 8 arxius diferents, i ara el que hem de fer és treballar amb ells per obtenir una seqüència de cada mostra i després fer-ne l'alineament.

Anem a veure com transformem els 4 fragments de DNA en un de sol de més llarg.

2. "Neteja" de les diverses seqüències utilitzant el programa *Bioedit*.

El *Bioedit* és un programa que treballa amb cromatogrames que ens mostren diversos pics pertanyents a diferents gràfiques, una de cada color. Cada gràfica d'un color diferent pertany a una base nitrogenada, i allà on apareguin els pics serà el nucleòtid en el que hi haurà aquella base nitrogenada (**Figura 45**). Per exemple:



**Figura 45.** Cromatograma de DNA vist des del programa *Bioedit*. Podem observar els diferents pics, on cadascun d'ells correspon a una base nitrogenada diferent. Font: realització pròpia.

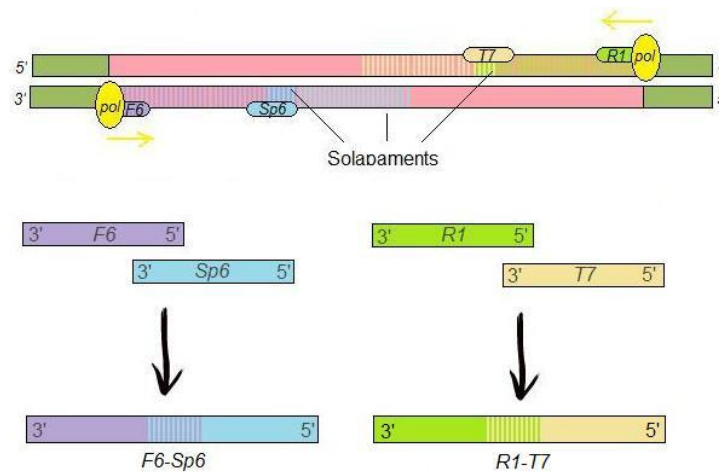
El problema és que, tal i com es mostra a la imatge, al principi (des del nucleòtid 0 fins el 40) i al final de cadascuna de les seqüències, els pics es troben poc definits, per tant, no podem confiar que el programa ens estigui dient la veritat. És per això que haurem de “netejar” les diferents seqüències tant del principi com del final tot seleccionant amb el cursor aquell tros de seqüència i del qual ens fiem (Figura 46). Copiarem el fragment que volem en una llibreta de l'ordinador.

Repetirem aquest procés pels 8 arxius diferents que tenim.



**Figura 46.** Part seleccionada que ens interessa del cromatograma d'una de les seqüències. Realització pròpia.

3. Unió de les diverses seqüències: F6 amb Sp6 (sintetitzades en sentit 5'→3') i R1 amb T7 (sintetitzades en sentit 3'→5'), de manera que obtindrem dues seqüències per cada mostra: una seqüència F6Sp6 i una altra R1T7 (Figura 47).



**Figura 47.** Realització pròpia

En aquest pas haurem de tindre en compte, a l'hora d'unir les seqüències, els diferents solapaments que es poden donar entre aquestes seqüències. Així doncs, haurem de cercar el tros del final de F6 que està repetit al principi de Sp6, i el tros del final de R1 que està repetit al principi de T7, i eliminar-lo d'una de les seqüències.

Repetirem aquest pas 2 vegades, 1 per mostra (Figura 48).

```
>F6_sp6_Bilbao_I3b
TACTTTTTATTAACTTTTACATATTTTCACAAAAATAAATAAACACATAGCTGCGTGAAGAAGTATGATGATCGCATGAATGTACCAATACGTTCCACATACGAATAAAACTGTAATAATGAATATAATT
GTAATCTAATTTGTTCTCATATTTTCGACGGTGCACAAAAATTTTCAAAGGACCTTCGAGGCTTCCACATCGGGTCCGTTCAAGTGGCACATTCAGCCACCTGTGAACCATCTCATGCATCATCGAGACGGG
AAGTGGTCCGACACAGGAACGGCAGCACCTGGATCGCATGATGATTTGTGAAGACCCGTCCAGCTGATGTCGTGTCGAAGAAAGGCCATGAGGGAGAGCCTATTCGATTGCAATCAAACTTCCTTTCGAATA
CAAACCAAGCCAGAGTGGCGGTAGTTTCACTACCATGTCGATTTTGAGCCTGAGTTGGAAAAATACGCCTGCTATGGGCATCTCTCAAATCACGCTAATATTTTGGGATCCGGCTATTTATTTGATGG
AAAAACAATGTTCCACAAACAAAAATTTGAGAAGGAGCTAACTGTGCTGTGGACAATCAAAAAATGGGTATTGACTACAAAAATCCCGTAAAGATATGTTGGAGTTATATCGAACCCAGAACCCCGGTTTTT
TGAAGTTCATAACCTTATTTTGCGCCGCTCCATGAAAGGACTGAAACTTGAGTTGGTTGGAACCAATCTTTTGGCTCTCGCAAAGGTATAGCAGATCGATGTAATATATTTTTTTTACTTTTATAA
AAAAATAATTTCTAGATACGATCCGATCCGAGAAATTTCAAATGGAACCTGCGCCAGGATACGAAACCCTGATCCGACCAATGAAAAAGATATTGCTGTACTGAAATAACACATAAAGTTATGCGCAT
GAAACTGTGTATTGAGATCGAGACGTTGTTTAAATAACCTTCAAGCCATCAAGACGAGTTTCCGCTGAAAGTATTCAGATTTAGTTTCTTACAGATTATAACAAACAAAAACATATCGAATTAACGATTG
AGATTTTGCACAAACCCCAAAATCTACATTTAGCTGCAAGGGGAAAGATGTTAGTTTTATCGAGTACTATCTGACTGTAAGTACAAATAAAAAACGGCCGGAAGCCTATAAAATAACATGGAATAACATATC
ATTTATATATTTTCTATTTTAGAAATATAACATACGCAATTCGTGACCAACATCAACCTTGTAAATTTCAAAAAATAGGGACAAGGCTCAGAAGACCAATGCAATGAACTCGTAGTCTTTATCCAGAA
CTATGCCGGGTACGGGACTAACTGACAATATGCTTCAAATTTTCAGTAAGACTTGAATAACAGCTATTTAAGCATTTATGATTACATCTTTCAAATGTGCCACTTCTTTTATACAGACTGATG
CGCCAATGTCTGATCACACGCATGAATCCCGACCGCGTATTGATGTTGCGTAGATTTCAACAATCGTTTGAACCCACATGACAGATAGTGAAAAGTTCATAAAGACTGGGACATGAAAACTCGATGG

>R1_T7_Bilbao_I3b
CAGCAGGTACACGTGATGTTCCCGACAGTTATAGTAGAGATGGCACATCTTATATGTGAGCTTTTGGATTTGATCAGGGCTGAGACGTATGTTGCTGTAGAGCACATTGAGCTCGTTGGCCGAAACGGTTC
CTTGGCGAACCGTCTGTGACACCAAGTAGAAGTCGTATCGTTCCGGCAGAGTGCACAAATACATCTACTACCGTTCAGGGGGGGGATTTCTACCCTGTTAAAGAAAACGTGTTGCAAGATTTAGTGACCA
CAATGTATGCCAGCATCGTGGAGCATTGGCACGCTTATATTCAGTATCAAGCTTTCCACAATCTCTTTCATCTTGTATTCAAAACACATGCTTCAAAGATCTCGCCTAACACCCTCACGATAGAATA
GTATGCGTGTGGTAACTTATCATGCTCTCTGTTATTGCTTAAGGGCCCTTAAAGCAATCAATGAGGCAAGGTTATTAGACAGCACATCAAAGGCACCTGACTGTATACCCCTGC TAAAGTAAAGTTGAAATTC
GCTGGAGATCCATGAAGCAAC TAAAGCACCATAAGCCCTGCGGCCGTCACGTGCTTTTGGCAATGCAAAAGCCAAATGGTCA TAAACC GGAAGGCGCACTCAATCCATGTTGTAATACCCAAAT
TACAATTAATTTGAAATGCTATTTTGGTTGCAATGCTAATTAGGCCCTCGATTTTTTGCAGTTTTTACAGTCAACAATTTGAGTAGGAACGGCTCTATCAATACAGCCCTCTTTTTTATAGAAGAAATATCTGA
AAAAATATGGATTAATTTGTCATTTGAAATTTTATTTGAGGCTATTTAGATTTAACAACCTTCTTCAATTTGTTGGGAAACAAAACACAAGATTAATTTTGGATCCATGCGAACACACATCCATAGCTCGCA
CATATGTCGCAAGTGCATCATCGTAAATTTTTTATCTAAAAGTTAAGGCAGTTATTTAAGAAGAGCACATTTGGAAGTGTGTTAGCTTACCTGTTGGGGGCTTCTTATTTTGAATCCCATACCAGAAGCTGCT
CGAAACAACTTTCAAGCAATTTTAAAGGTCAAACGAATTTGCTCCGGTGCATTTACGGCCCAACGGTCCGAGACCATCAC TGGGAGTAGTGAGCATACGTTGGTCCAGGAAGCATCTTGTCCAAATCAGCT
GTTTCGCCAGCAGAACATCTGAAATACACAATTTTTATGCCCGGTACTCAGTCAAGTATTGAGGAGCGGAAACGTTTCTGTTTAC TCGTTATGCAAAATGCAATCCAC TTTAGAGCACAAAATCTGAAAGTA
CCTCTTTTACTCTCAAAATACAGGTATAAAAACATTTTCAATTTGGGACTCACTTTGATTGATTAAAGCAATTTTCTCGGGTGAATTTATACGCTCCCTGTACTTCTGTAAGATTTCCATCGAGTTTCAATG
CCAGTCTTTTAGAAC TTTTCAACTATCTGCAAGTGGTTTGAACGATTTGTTGAATCTACGCAACGATCAATACGGCGGCTGGGATTCATGCGTGTGTGATCAGACATTGCGGCCATCAGTCTGTAATA
```

Figura 48. Exemple dels 2 trossos que obtenim en aquest pas. Imatge pròpia.

- Reversió i complementació de R1T7: L'objectiu final es obtindre la seqüència F6-Sp6-T7-R1 ja que Sp6 i T7 són les seqüències fetes pels primers interns respectius. Tenint en compte que tenim R1T7 (3'→5'), el que haurem de fer és revertir aquesta seqüència, és a dir, fer un efecte mirall de la seqüència per obtindre T7R1 (5'→3'). No obstant això, un cop revertida a T7R1, ens trobem que és una seqüència pertanyent a la cadena no codificant, i que per tant haurem de trobar la seqüència complementària corresponent a la cadena motlle o codificant. Aleshores tindrem T7R1 en sentit 3'→5' (Figura 49).

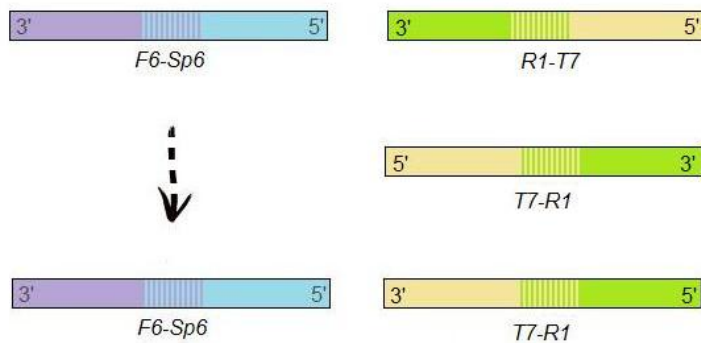


Figura 49. Realització pròpia

Per fer tot aquest llarg i complexa pas utilitzarem un programa en línia anomenat *Bioinformatics* que el farà directament. Només caldrà introduir la seqüència R1T7 i el mateix programa te la revertirà i et donarà la seqüència complementària directament (Figura 50).



>Puerto\_Montt\_I3\_XVII

```
TTCATGTTTTCCCTACITTTTATTAACITTTTACATATTTTCACAAAGTAAATAAAACAACAAAGCTGCC TGAGAAGAAAGATGATCGCATGAATGTACC AATACGTTTACATACGAATTAATAATCTGTAA
4ATGAATATAATTTGTAATCTAATTTGTCTCATATTTTTCAGCAGGCTGCAAGATTTTCAAGGACCTTCTGAGGCTCCACATCGGGTGGTCAAGTGGCACCTCAGCCACTCGTGAACCATCTCATGCA
TCATCGAGACGGGAAGGTGTCCGACACAGGAACGGCAGCAC TTGGATCGCTATGATATTTGTGAAGACCCGTCCAGCTGATGTGTCGAAGAAAGGCCATGAGGGAGAGCC TATTCTGTTTCCAATCAA
CTTCTTTCGAATACAAACCAGCCAGAGTGGCAGCTAGTGTCTACATCCATGTGCAATTTTGAACCTGAGTTGGAAAAATACGCGTGC GAATGGGCATTTCTCAAAATCACGCTAATATTTTGGGATCCGGCT
ATTTATTTGATGAAAAACAACGTTCACAAACAAAAATTTGAGAAGGAGCTAACTGTGCTGTGTGGACAATCAAAAAATGGGTATTGACTACAAAAATCCGTAAGATGTTGGAGTTATATCGAACGCA
GAACCCGGTTTTGCAAGTCTAAACCTTATTTTGGCCGCTCCATGAAAGGACTAAAGCTTGTAGTTGGTTGGACGAATCTTTTGTATCTCTCGCAAGGATAGCAGATGATGTAATATTTTAA
ATTACTTTATAAAAAACATAAATTTCTAGATACC GATCCGAGAATTTCAAATGGAACCTCGGCCAGGATACGAAACATCGATCCGACAACACGAAAAAGATATATCTGTGTACTGAAATAACACATAAA
S1TATGGCAGCTGAAACCTGTGATGAGATCTGAGACGTTGTTCTAATAACCCCTTACGCCATCAAGACGAGTTTCGCGTGAATGTTCTGGATTTAGTTGTCTTACAGATTAACAACAACAAACATATCG
CTATAACGATGTTGATTTTGCACAAACCCCAAATCTACATTTAGCTGCAAGGGGAAAGATGTTAGTTTATCGAGTACTATCTGACTGTAAGTACAAAATAAAAAAGCCGTTCCGCTATAAATATACTCG
AAAAAATACATCATTTATATATTTTCTATTTTAGAAATATAACATACGCTTCTGTGACCAACAATCAGCCCTTGTAAATTTCAAAAAATAGGGACAGGGCTCAGAAGACCAATGCCAATGAACTCTGATGCT
CTTATTTCCAGAACATATCCCGGGTACGGGACTAAC TGACAATAATGCCGTTCAAATTTTCAAGTAAGACTTGAAAAAACAGCTATTTTAAAGCATTATGATTACATTCATTTCAAATGTGCCACTTCTTTAT
TACAGACTGATGCGCGCAATGTCTGATCACACACCCATGAATCCCGCCGCTATTGATCTGTTGCGGTAGATTCACAACTGTTTGC AAAACCACTGCAGATAGTGAAGTTCTAAAAAGCTGGGACAT
GAAAACCGATGGAATCTTACAGAAATACAGGACGTATAATGACCGCAGAAAAATGCTTTAATCAATTAAGAGTGGTCCAAATGAAATGGTTTTATACCTGGTATTTGAAGAGTAAAAGAGGT
ACTTCAGATTTGTCTCTAAAGAGGATGCATATAACGAATAACAGAAACCTTTCCGACTCCATAATACTTGTAGTACCGGGCATAAAAAGGTGAACGCGTTCCGAGCGGCTCAACATTTCCGCTCG
TTTATATAAATATTGTATTTTCAGATGTTCTGCTGGCGAAACAGCTGATGGACAGATGCTTCCGTGACCAACGTATGCTCACTACTCCAGTGTGGTCTCGACCGTTGGCCGTAATGCACCCGGAG
CGCAATTCGTTTGGACCTTAAAAATTTGCTCGAAAATTTGTTTTCGAGCAGCTTCTGGATGGGATCAAAAAAAGAGGCCCCACGAGTAAGCTAAACACTTCCAAATGTGCTCTCTTAAAAATAACTGCT
TAACTTTTAGAAATAAAAAATTTACGATGATCGACTGCGACATATGTGCGAGCTATGGATGAGTGTGTCGATGGATCCAAAAATAACTTGTGTTTTGTTCCCAACAACAATGAAGAAAGGTTTGTAAAT
CTAAATAGCCCAATAAATTTCAATGCACAATTTAATCCATATGTTTTTCAGATATTTCTCTATAAAAAAAGAGAGGCTGATTTGATAGAGCCGTTCCCTACTCAAGTTGTGACTGTA AAAAATCGAAAAATCG
AGGCCCTATGAGCATTGCAACCAAAATAGCAATTTCAAATGAATGTAAATGGGTTATACACCATGGATGATTGAGTTGCCGCTTTCCGGTTTTAATGACCATTGGCTTTGACATTTGCCAAAAGCGCACGTG
ACCGCCGCAAGGCTTATGGTGCCTTAGTTGCTTCAATGGATCTCCAGCGAAATCAACTTACTTTAGCAGGGTATCAGAGTGCAGTGCCCTTTGATGTGCTCTAAATAACCTTTGGCCAAATGATTGCTAAG
SCCTTTAGACAATACAGAGAGAGCATGATAAGTTACCAGCACGCATACTATTCTATCTGTGACGGTGTAGCGCAGGATCTTTGAAGCAGTTGTTTGAATACGAAGTGAAGATATTTGGAAAAGCTTGA
TACTGAATATAAGCGTCCCAATAGTGTCTCCAGGATGCTGGCATAACATTGTGGTCTACTAAATCTTGC AACACAGCTTCTTTAAACACGGTAGAAATCCCCCTTGGAACAGTAGTATGATATTGTGA
CTCTGCCGAACGATACGACTTCTACTTGTGTCTACAGACGGTTCGCCAAGGAACGTTTCGCCAACGAGCTACAAATGTGCTCTACAGCAACATTCGTCTACGCCCTGACCAAAATCCAAAAGCTCAACATAT
AGATGTGCCATCTACTATAACTGGTGGGAACACAGCTG
```

6. Ara, haurem d'alinejar les 2 seqüències per tal d'observar-ne les semblances i les diferències. Per fer-ho podem utilitzar dos programes en línia: el *Blast* o el *Clustal*. Tenen algunes diferències pel que fa a la nomenclatura utilitzada per mostrar l'alineament, però no són importants. En el meu cas he utilitzat el *Clustal*.

Una vegada obtingut l'alineament, cal estudiar detingudament tots i cadascun dels canvis que s'hi observen a nivell nucleotídic. En el meu cas, un petit percentatge d'aquests canvis corresponien a errors de seqüència que van haver de ser corregits manualment, i la resta de canvis corresponien a diferències reals.

*(Per veure les seqüències nucleotídiques obtingudes, veure l'annex 5)*

7. Un pas adicional seria buscar l'alineament de la seqüència d'aminoàcids. Per fer-ho, primer haurem de transformar la seqüència de nucleòtids o de DNA a seqüència d'aminoàcids o proteïna tot utilitzant el programa en línia *Augustus Bioinformatics*. Altra vegada tornarem a utilitzar el programa *Clustal*, o el *Blast* per tal d'alinejar les proteïnes.

*(Per veure les seqüències proteiques obtingudes, veure l'annex 5)*

## 4. Conclusions

---

Les conclusions que he extret d'haver realitzat aquest treball es poden dividir en les procedents de la part teòrica i les procedents de la part pràctica.

La part teòrica m'ha permès endinsar-me en el món de la genètica, concretament conèixer millor aquests característics individus, els transposons. Quan vaig iniciar la meua recerca, em vaig interessar molt per les conseqüències negatives que aquests podien tindre dins d'un organisme, ja que no m'imaginava, ni molt menys, que poguessin arribar a ser tan importants: doncs algunes de les seves insercions poden provocar, en alguns casos (i molt pocs), malalties tan greus com el càncer o la distròfia muscular. És per això que he intentat aprofundir al màxim possible aquest apartat donat que en un inici volia encaminar el meu treball en la relació que hi havia entre els ETs i les malalties. Malgrat tot, els transposons no deixen d'estar poc estudiats per la comunitat científica, encara que faci bastant temps que van ser descoberts per la genetista Barbara McClintock. El motiu d'aquest fet, probablement, és que la informació genètica té una estructura molt complexa, i els constants canvis d'aquesta n'augmenta la dificultat per estudiar-ne els seus components i el seu mecanisme.

També he pogut ampliar els meus coneixements al respecte dels mecanismes de regulació que utilitza l'organisme per restringir l'expressió gènica, ja que en els cursos anteriors no s'arriba a aquest grau d'aproximació ni d'amplificació. Tampoc s'arriba a conèixer què són aquests elements, i aquest treball, de ben segur, que ha permès resoldre els meus dubtes al respecte.

Pel que fa a la part pràctica, no he pogut treure'n cap conclusió en general, donat que les dades i el nivell de coneixement necessari per poder establir una resposta segura i verdadera al cent per cent no es troben al meu abast, tal i com veurem a continuació.

A partir del gen i la proteïna predita a través de la seqüència codificant no ens és possible afirmar, amb les dues seqüències que hem obtingut, que hi hagi una clara separació entre poblacions que podria correlacionar-se amb la seva situació geogràfica i/o climàtica.

Amb les dades disponibles, podem dir relativament poc de les implicacions evolutives que podrien tenir certs polimorfismes d'aquestes seqüències nucleotídiques de cara a l'activitat dels ETs. És a dir, no podem afirmar que el polimorfisme present en el gen *Piwi* sigui l'agent culpable de la variació de la transposició que s'ha observat darrerament.

Tot i així, aquest estudi ens permet aproximar-nos millor al paper que juguen els ETs en el remodelatge genòmic i les implicacions que podrien tenir a nivell de població, així com també de quins mecanismes disposa el genoma per silenciar-los.

Amb aquest treball, podríem especular sobre el perquè de l'existència d'aquest polimorfisme tan elevat en un gen que sembla complir funcions essencials per a l'organisme, com veurem a continuació.

Per una banda, podria ser que aquesta elevada variabilitat de Piwi ajudés al genoma a fer front a les constants invasions per ETs. Així, Piwi s'hauria d'anar "actualitzant" constantment perquè fos capaç de regular totes les insercions d'aquests elements mòbils per evitar conseqüències negatives i perjudicials per l'organisme.

En segon lloc, no podem afirmar amb aquestes dues seqüències si hi ha molta diferenciació entre poblacions originals i colonitzadores. De totes maneres, les diferències a nivell de polimorfisme són notables entre aquestes dues seqüències, fins i tot trobem canvis a nivell de proteïna.

En últim lloc, malgrat tot aquest elevat nivell de polimorfisme, les proteïnes continuen essent viables, és a dir, aparentment, la proteïna PIWI és capaç de dur a terme exitosament les seves funcions a la línia germinal, malgrat incorporar els canvis.

Els canvis observats en la proteïna PIWI des les dues poblacions són 3: un V-G (valina – glicina), un M-I (metionina-isoleucina) i un H-R (histidina-arginina). És a partir del programa en línia *Mutation Analyzer* que hem pogut determinar si aquests canvis se solen donar a la natura i si poden repercutir en la funcionalitat de la proteïna (veure *annex 6*). La primera diferència és un canvi que no s'observa en la natura i el segon i el tercer són canvis que possiblement no repercuteixin en la funcionalitat de la proteïna. És per això que podem parlar d'una proteïna PIWI viable en ambdós casos.

Ha estat molt gratificant poder realitzar aquest estudi sobre uns elements tan desconeguts com ho són els transposons i espero que els lectors d'aquest treball hagueu pogut arribar a fer-vos una idea general, per petita que sigui, de què són i de la importància que arriben a tindre. No s'ha d'ignorar que aquests elements es troben dins de tots nosaltres, és més, formen part de la nostra informació genètica i, per tant, a grans trets "*estem formats de transposons*". A més, es troben presents en tots els genomes eucariotes, i també en els procariotes, en més o menys quantitat, però la vida sense la seva existència seria molt diferent a tal com la coneixem.

## 5. BIBLIOGRAFIA I WEBGRAFIA

---

- Articles:

- ~ PREVOSTI, ANTONIO; RIBO, GRISELDA; SERRA, LUIS; AGUADE, MONTSERRAT; BALAÑA, JOAN; MONCLUS, MARIA; MESTRES, FRANCISCO. *Colonization of America by Drosophila subobscura: Experiment in natural populations that supports the adaptive role of chromosomal-inversion polymorphism* [En línia] Proc.Natl. Acad.Sci. USA Vol.85, pp.5597-5600, August 1988. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC281806/#>>
- ~ JAMY C PENG; HAIFAN LIN. *Beyond transposons: the epigenetic and somatic functions of the Piwi-piRNA mechanism* [En línia] Elsevier, 2013.
- ~ ZHOU, XUE; XU, YA-LONG; CHENG, LUO-GEN; LI, FEI. *Computational identification and evolutionary analysis of Piwi subfamily in 11 Drosophila species.* [En línia] The Authors, 2008; Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences, Insect Science.
- ~ GARCÍA GUERREIRO, M<sup>a</sup> PILAR. *Interspecific as a genomic stressor inducing mobilization of transposable elements in Drosophila.* [En línia] Mobile Genetic Elements, Landes Bioscience, 2014. <<http://dx.doi.org/10.4161/mge.34394>>
- ~ ZHOU, XUE; LIAO, ZHEN; JIA, QUIDONG; CHENG, LUOGEN; LI, FEI. *Identification and characterization of Piwi subfamily in insects.* [En línia] Elsevier, 2007.
- ~ O'DONNELL, K.A; BURNS, K.H. *Mobilizing diversity: transposable element insertions in genetic variation and disease.* [En línia] Mobile DNA 2010 1:21.
- ~ REILLY, M.T; FAULKNER, G.J.; DUBNAU, J.; PONOMAREV, I.; GAGE, F.H. *The Role of Transposable Elements in Health and Diseases of the Central Nervous System.* The Journal of Neuroscience, November 6, 2013. 33(45):17577-17586 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3818539/>
- ~ LÓPEZ, M.C.; OLIVARES, M.; GONZÁLEZ, C.I.; MARTÍN, F.; GARCÍA PÉREZ, J.L.; THOMAS, M.C. *Elementos móviles: ¿Ventaja evolutiva o parasitismo molecular?* Ars Pharmaceutica, 40:1; 5-24, 1999. <http://farmacia.ugr.es/ars/pdf/142.pdf>



- ~ AYALA, FRANCISCO J.; SERRA, LUIS; PREVOSTI, ANTONIO. *A grand experiment in evolution: the Drosophila subobscura colonization of the Americas*. Genome, 1989, 31(1): 246-255. 10.1139/g89-042 <http://www.nrcresearchpress.com/doi/abs/10.1139/g89-042#.VmV81tLJVoo>

- *Llibres, enciclopèdies i treballs:*

- ~ CAMPBELL, NEIL A.; REECE, JANE B. *Biología*. 7a edició. Madrid: Médica Panamericana, 2007. ISBN 978-84-7903-998-1
- ~ PIERCE, Benjamin A. *Genética: Un enfoque conceptual*. 3a edició. Ed. Médica Panamericana, 2009. ISBN 978-849-835-216-0
- ~ JIMENO A.; UGEDO L.; *Biología 1 Batxillerat*. Barcelona: Santillana, 2008. ISBN 978-84-7918-334-9
- ~ GIRIBETS, Marta. *Estudi de la variabilitat al locus Piwi en poblacions naturals de Drosophila subobscura*. Treball de recerca de màster en genètica avançada. Departament de Genètica, Facultat de Biociències, Universitat Autònoma de Barcelona, 2012-2013.
- ~ PERMANYER, JON. *Elements transposables de tipus non-LTR als ascidis, amfioxos i àgnats*. Programa de Doctorat del Departament de Genètica, Facultat de Biologia, 2002-2004. <[http://www.tdx.cat/bitstream/handle/10803/1889/01.JP\\_U\\_Intro.pdf?sequence=1](http://www.tdx.cat/bitstream/handle/10803/1889/01.JP_U_Intro.pdf?sequence=1)>

- *Pàgines web:*

- ~ Mobile DNA: <http://users.rcn.com/jkimball.ma.ultranet/BiologyPages/T/Transposons.html>
- ~ ETs: <[http://bioinformatica.uab.es/biocomputacio/treballs00-01/TaranconGemma/elementos\\_transponibles.htm](http://bioinformatica.uab.es/biocomputacio/treballs00-01/TaranconGemma/elementos_transponibles.htm)>
- ~ Mutació i reparació del ADN: <<http://www4.ujaen.es/~tpalome/Tema%2023.%20Transposones%20de%20procariotas.pdf>>
- ~ PCR: [https://es.wikipedia.org/wiki/Reacci%C3%B3n\\_en\\_cadena\\_de\\_la\\_polimerasa](https://es.wikipedia.org/wiki/Reacci%C3%B3n_en_cadena_de_la_polimerasa)
- ~ Retrotransposons: <https://en.wikipedia.org/wiki/Retrotransposon>
- ~ Elements LTR: [https://en.wikipedia.org/wiki/Long\\_terminal\\_repeat](https://en.wikipedia.org/wiki/Long_terminal_repeat)
- ~ Elements LINE: [https://en.wikipedia.org/wiki/Long\\_interspersed\\_nuclear\\_element](https://en.wikipedia.org/wiki/Long_interspersed_nuclear_element)
- ~ Era7 Information Technologies S.L.U. *Small RNAs* <http://medmol.es/temas/87/>

- ~ Cuaderno nº115: *Expresión génica y silenciamento génico* <<http://www.porquebiotecnologia.com.ar/index.php?action=cuaderno&opt=5&tipo=1&note=115>>
- ~ BORONAT, ALBERT; PUIGDOMÈNECH, PERE. *Gens saltadors i el treball pioner de Barbara McClintock*. Institut de Biologia de Barcelona del CSIC (Volum 4) <[http://revistes.iec.cat/index.php/ciencia2/article/view File/129309/128037](http://revistes.iec.cat/index.php/ciencia2/article/view/File/129309/128037)>
- ~ Servicio de Información Comunitario sobre Investigación y Desarrollo (CORDIS). Científicos, Comisión Europea, 2009. *Científicos identifican transposones en el cerebro humano*. [http://cordis.europa.eu/news/rcn/31113\\_es.html](http://cordis.europa.eu/news/rcn/31113_es.html)
- ~ Diccionari de l'Institut d'Estudis Catalans (DIEC). <http://dlc.iec.cat/>
- ~ Bioinformatics. [www.bioinformatics.org/sms2/rev\\_comp.html](http://www.bioinformatics.org/sms2/rev_comp.html)
- ~ Blast: [http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?CMD=Web&PAGE\\_TYPE=BlastHome](http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?CMD=Web&PAGE_TYPE=BlastHome)
- ~ Clustal: <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>
- ~ Mutation Analyzer: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Class/Structure/aa/aa\\_explorer.cgi?mode=translate](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Class/Structure/aa/aa_explorer.cgi?mode=translate)
- ~ Augusts bioinformatics: <http://bioinf.uni-greifswald.de/augustus/submission.php>

## **6. AGRAÏMENTS**

---

Abans de finalitzar m'agradaria poder agrair a diverses persones l'ajut i el recolzament que m'han ofert al llarg de l'elaboració d'aquest treball, que no ha estat pas un procés curt ni fàcil.

Agraeixo, en primer lloc, a la tutora del treball pel suport. Des d'un principi m'ha resolt tots aquells dubtes que es trobaven al seu abast i m'ha encaminat en les pautes que havia de seguir.

En segon lloc, també m'agradaria agrair l'ajuda del Programa Argó, concretament a la Dra. M<sup>a</sup> Pilar García Guerreiro, coordinadora de la Unitat de Genètica del Departament de Genètica i Microbiologia de la Universitat Autònoma de Barcelona, qui va ser la meva supervisora durant l'estada. A la Marta Puig Giribets i a la Laia Ortiz López, que durant l'estada i després d'aquesta m'han estat ajudant i resolent tots els dubtes que, sense elles, no hauria pogut resoldre per mi mateixa, pels articles i per tota la informació cedida. A més, a la Marta Puig per ajudar-me en la revisió del treball. Gràcies, pel vostre temps i per la vostra confiança en mi.

Finalment, vull agrair tot el recolzament per part de la família, un pilar fonamental, sobretot dels meus pares qui han fet els viatges necessaris per poder realitzar la meva part pràctica. I als amics, en especial a la Júlia Aragonès i a la Marta Queralt, que d'una manera o altra han aportat un granet de sorra en la realització del meu treball de recerca.

## 7. ANNEXOS

### \* ANNEX 1: Breu introducció a la genètica

Per tal que aquest treball pugui ser el màxim entenedor possible tenint en compte que es tracta d'un tema bastant complexa, cal tindre una base del què és la genètica: des de les parts de la cèl·lula, passant pel nucli i material genètic fins a la teoria d'«un gen – un enzim».

### La cèl·lula, les seves parts i l'ADN

La **cèl·lula** és l'estructura viva més senzilla que existeix ja que té la capacitat realitzar les tres funcions vitals: **nutrició**, **relació** i **reproducció**. La teoria cel·lular anuncia que la cèl·lula és la **unitat morfològica** (o *estructural*), **fisiològica** (o *funcional*) i **genètica** (o *reproductora*) de tots els éssers vius. La forma de les cèl·lules depèn moltes vegades de la funció que exerceixen, i nosaltres ens centrarem pel que fa a la funcionalitat genètica de la cèl·lula: l'ADN.

### ESTRUCTURA BÀSICA DE LA CÈL·LULA:

- **Membrana plasmàtica:** *paret* que té la funció de **separar** el medi intern cel·lular del medi extern i de **regular** els intercanvis amb l'exterior.
- **Citoplasma:** inclou el medi intern anomenat citosol i unes estructures anomenades òrgans cel·lulars que són les responsables del metabolisme cel·lular.
- **Material genètic o DNA:** format per molècules filamentoses de DNA.

### TIPUS DE CÈL·LULES:

Les cèl·lules es classifiquin en **procariotes** o **eucariotes** segons si el material genètic es troba envoltat per una membra anomenada **nucli** o no.

### Cèl·lula procariota (Figura 51)

- Cèl·lula **primitiva** i molt més **senzilla** que l'eucariota.
- El material genètic *no està envoltat* pel nucli. Es troba dispers en una regió del citoplasma anomenada **nucleoide**.
- En el citoplasma hi ha **ribosomes** i uns plects interiors de la membrana plasmàtica, els **mesosomes**.

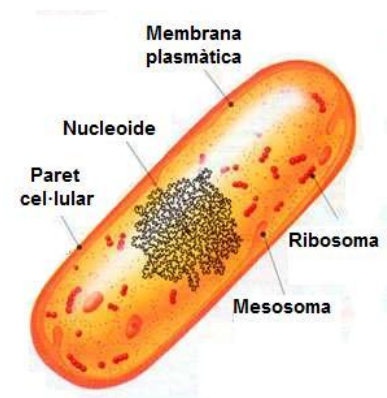


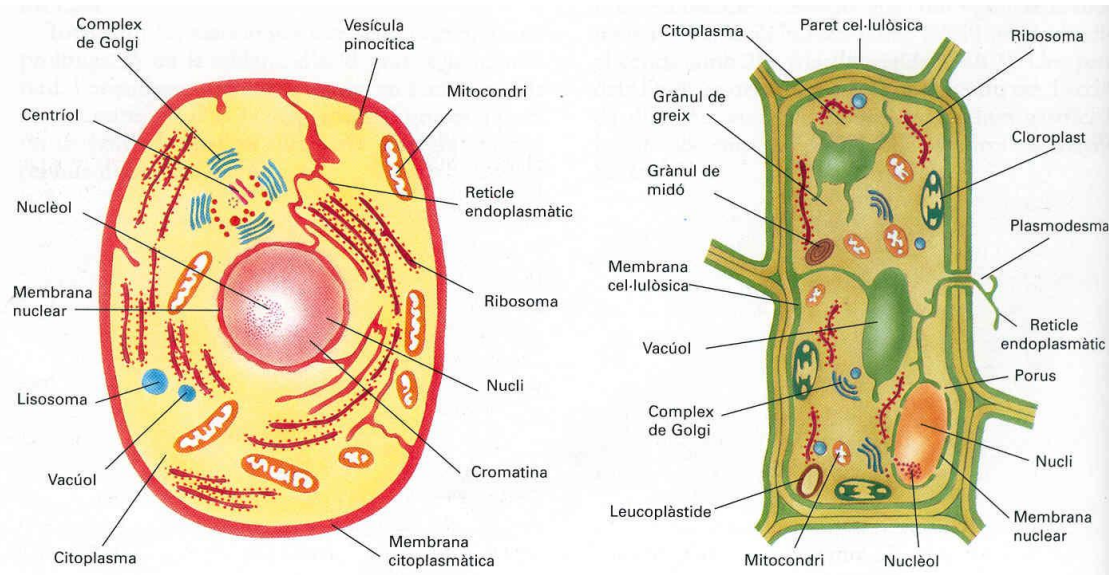
Figura 51. La cèl·lula procariota, la més senzilla

Font: <http://www.xtec.cat/~jqurrer/a/classes.htm>

- Tenen una coberta gruixuda i rígida per fora de la membrana plasmàtica anomenada **paret cel·lular**.

### Cèl·lula eucariota:

- Cèl·lula molt complexa i més evolucionada ja que posseeix més orgànuls cel·lulars.
- El material genètic està envoltat pel **nucli**. El nucli és una estructura formada per una membrana doble, anomenada **embolcall nuclear**, que envolta el material genètic (DNA) de la cèl·lula. El medi intern nuclear s'anomena **nucleoplasma**, i conté fibres de DNA, en diferents graus de condensació, que reben el nom de **cromatina**, i un o dos corpuscles, rics en RNA, anomenats **nuclèols**.
- Hi ha dos tipus d'organització segons si es troben formant organismes animals o vegetals. Per això es parla de **cèl·lules animals** i de **cèl·lules vegetals** (**Figura 52**).



**Figura 52. Classes de cèl·lules eucariotes: animal i vegetal respectivament.** Font:

<http://www.glogster.com/belaro/poster-glog-by-belaro-webquest-la-cellula-1/q-6l33m0cpbbnt4p2hsb5qpa0>

### Els àcids nucleics

Els **àcids nucleics** són unes biomolècules que són molt riques en **fòsfor (P)**, concretament són riques en **àcid fosfòric (H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>)**, i també contenen **carboni (C)**, **hidrogen (H)**, **oxigen (O)** i **nitrogen (N)**.

Estan formats per unes molècules riques en nitrogen anomenades **bases nitrogenades**, que són l'**adenina (A)**, la **guanina (G)**, la **citocina (C)**, la **timina (T)** i l'**uracil (U)**; i una **pentosa**, una classe de glúcid simple formada per una estructura de cinc àtoms de carboni.

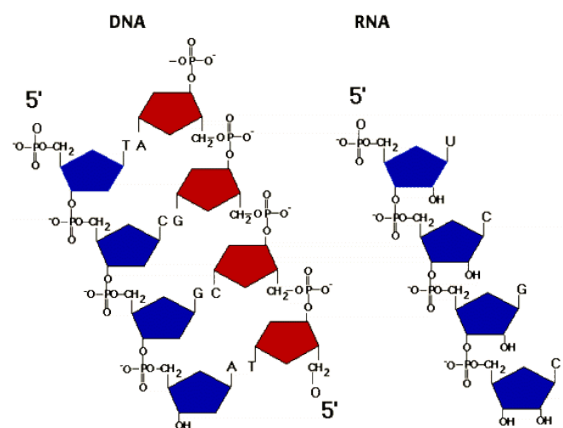
Els àcids nucleics poden ser **àcids ribonucleics (RNA)** si la pentosa que contenen és la **ribosa** o poden ser **àcids desoxiribonucleics (DNA)** si la pentosa que contenen és la **2-desoxiribosa**. Una altra diferència entre ambdós és que el RNA conté les bases nitrogenades AUGC i en canvi, el DNA conté ATGC (**Taula 11**).

		PENTOSA	BASES NITROGENADES	
ÀCIDS NUCLEICS	Àcid desoxiribonucleic (ADN)	2-desoxiribosa	Adenina (A) Guanina (G)	Citosina (C) Timina (T)
	Àcid ribonucleic (ARN)	Ribosa	Adenina (A) Guanina (G)	Citosina (C) Uracil (U)

**Taula 11.** Realització pròpia.

Els àcids nucleics es poden dividir en unes unitats anomenades **nucleòtids** que estan formades cadascuna d'elles per una pentosa, una base nitrogenada i un àcid fosfòric ( $H_3PO_4$ ). Si a un nucleòtid li manca el seu grup fosfat s'anomena **nucleòsid**. Així doncs, podem definir a un àcid nucleic com un **polímer<sup>19</sup> de nucleòtids**.

Des del punt de vista estructural, es diferencien dos extrems, l'extrem 5' on hi ha l'àcid fosfòric ( $H_3PO_4$ ) del primer nucleòtid i l'extrem 3' on hi ha un radical hidroxil (-OH) de l'últim nucleòtid (**Figura 53**).



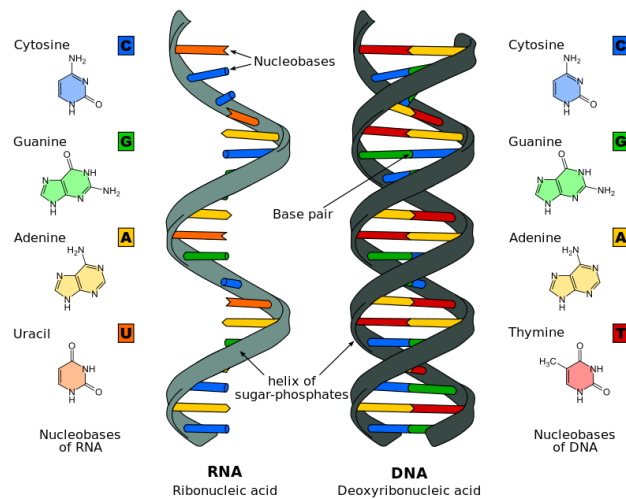
**Figura 53.** Font: [http://www.biologia.arizona.edu/biochemistry/problem\\_sets/large\\_molecules/06t.html](http://www.biologia.arizona.edu/biochemistry/problem_sets/large_molecules/06t.html)

### Nivells estructurals i nivells d'empaquetament de l'ADN (Figura 55)

**Estructura primària del DNA.** És la seqüència de nucleòtids d'una sola cadena o filament. A través de la seqüència de nucleòtids es pot emmagatzemar una determinada informació, l'anomenat **missatge biològic** o **informació genètica**. Si es canvia la seqüència de nucleòtids, aquest missatge també canviarà.

<sup>19</sup> Molècula de grans dimensions (macromolècula) formada per molècules més simples anomenades **monòmers**.

**Estructura secundària del DNA (doble hèlix de 20 Å) (Figura 54).** El DNA està format per dues cadenes de nucleòtids antiparal·leles<sup>20</sup>, complementàries<sup>21</sup> i enrotllades de forma plectonímica<sup>22</sup>, que formen una **doble hèlix** amb les bases nitrogenades enfrontades i unides entre sí de manera que els enllaços s'estableixen entre les adenines (A) i les timines (T) i, entre les citosines (C) i les guanines (G). Llavors diem que l'adenina amb la timina i la citosina amb la guanina són **bases complementàries**, i parlem de cadenes **complementàries**.



**Figura 54.** Font: [https://es.wikipedia.org/wiki/%C3%81cido\\_ribonucleico](https://es.wikipedia.org/wiki/%C3%81cido_ribonucleico)

### Desnaturalització i renaturalització del DNA

La doble hèlix de DNA en estat natural és molt estable però si s'escalfa, quan la temperatura arriba aproximadament a uns 100°C, els dos filaments de la doble hèlix se separen, és a dir, es produeix la **desnaturalització** del DNA. Per altra banda, si posteriorment es manté desnaturalitzat a 65°C, els dos filaments tornen a unir-se; fenomen que rep el nom de **renaturalització**.

**Estructura terciària del DNA.** La fibra de 20 Å es retorça sobre si mateixa formant una espècie de superhèlix, estructura que rep el nom de **DNA superenrotllat**. D'aquesta manera la longitud del DNA es redueix.

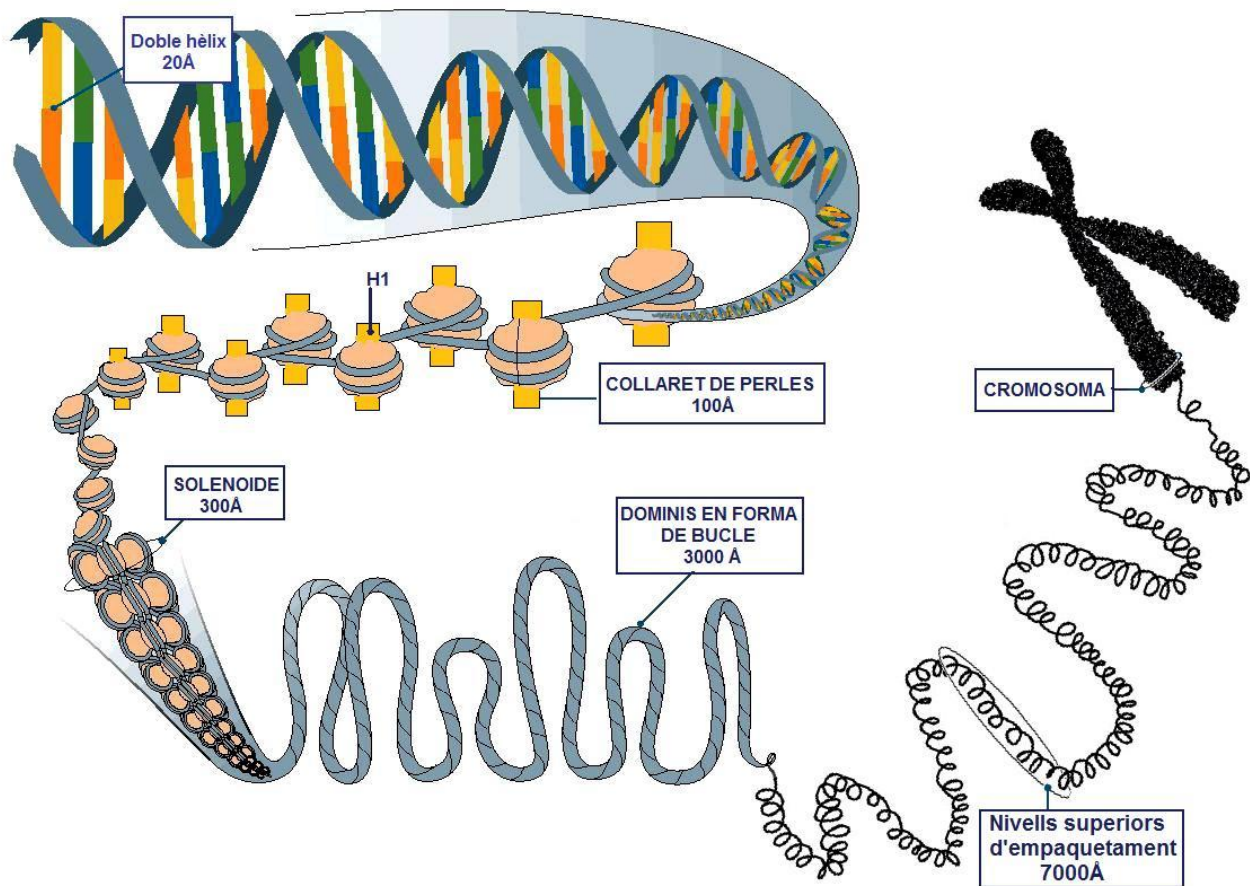
<sup>20</sup> Les dues cadenes de DNA es troben col·locades de manera que si una es troba orientada en sentit 5'→3', l'altra es troba en sentit 3'→5'

<sup>21</sup> Les dues cadenes no són iguals, sinó que les bases es troben enfrontades l'Adenina amb la Timina i la Citosina amb la Guanina. Així doncs, les seqüències de les dues cadenes són diferents però les bases són complementàries.

<sup>22</sup> Per poder separar els dos filaments cal girar-ne un respecte l'altre.

**Primer nivell d'empaquetament, fibra de cromatina de 100 Å o collaret de perles.** Està formada per la fibra de DNA de 20 Å (doble hèlix) associada a **histones**, una proteïnes bàsiques. Estructuralment, està formada per un conjunt de partícules de 100 Å de diàmetre anomenades **nucleosomes**, cadascun dels quals està format per vuit histones (**octàmer**) i per una fibra de DNA que s'enrotlla sobre l'octàmer.

Aquesta estructura s'anomena **forma laxa**, però quan cada nucleosoma s'associa a una histona anomenada **H1**, la fibra s'escurça i rep el nom de **forma condensada**.

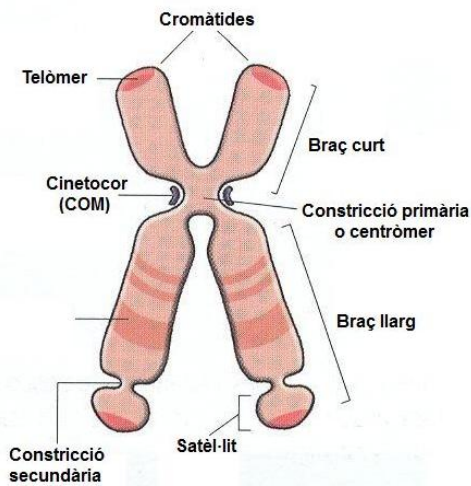


**Figura 55. Nivells d'empaquetament del DNA.** Font: [http://www.maristasgranada.net/webcole/documentos/Ciencias/Bach-2%BA/Biologia/2\\_Citologia/Cel\\_Graficos/CROMATINA.jpg](http://www.maristasgranada.net/webcole/documentos/Ciencias/Bach-2%BA/Biologia/2_Citologia/Cel_Graficos/CROMATINA.jpg)

**Segon nivell d'empaquetament, fibra de cromatina de 300 Å o solenoide.** Es forma per l'enrotllament sobre si mateixa de la fibra condensada de cromatina de 100 Å, és a dir, la que conté la histona H1.

**Tercer nivell d'empaquetament o dominis estructurals en forma de bucle.** La fibra de cromatina de 300 Å forma una sèrie de bucles que queden estabilitzats per un eix de proteïnes anomenat **bastida proteica**.





**Figura 56. Parts d'un cromosoma.** Font: <http://microrespuestas.com/como-se-llaman-las-partes-del-cromosoma/>

**Cromosomes.** És el grau màxim d'empaquetament de la fibra de cromatina i s'obté a partir de l'enrotllament sobre si mateix dels dominis estructurals en forma de bucle.

La funció dels cromosomes és facilitar el repartiment de la informació genètica continguda al DNA (**Figura 56**).

El nombre de cromosomes és constant en totes les **cèl·lules somàtiques**<sup>23</sup> de tots els individus d'una mateixa espècie, però varia segons l'espècie. Hi ha **organismes diploides** (**Taula 12**) els quals tenen dos exemplars que cada cromosoma en les cèl·lules somàtiques, per això se simbolitzen com a cèl·lules **2n** on **n** és el nombre de tipus de cromosomes diferents; i hi ha **organismes haploides**, és a dir, amb un sol exemplar de cada tipus, fet que se simbolitza com a cèl·lules **n**.

Espècie	Parells de cromosomes en les cèl·lules somàtiques	
Éssers humans ( <i>Homo sapiens</i> )	23	2n
Ximpanzés i goril·les	24	2n
Mosca de la fruita ( <i>Drosophila melanogaster</i> )	4	2n
Ratolí	20	2n
Blat de moro	10	2n

**Taula 12. Exemples d'organismes diploides i el nombre de cromosomes que tenen.** Realització pròpia.

### Classes d'àcids ribonucleics (RNA) i les seves funcions:

#### **RNA de transferència (RNAt)**

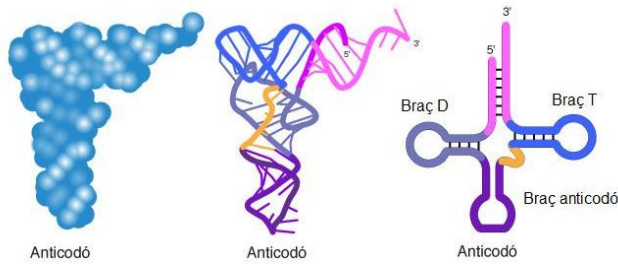
Es troba en el citoplasma en forma de molècula dispersa i té com a funció **transportar aminoàcids**<sup>24</sup> fins als ribosomes<sup>25</sup>, on, segons la seqüència especificada en un RNA missatger se sintetitzen les proteïnes (**Figura 57**). La seva estructura tridimensional té **forma de fulla de trèvol** i està formada per tres braços: el **braç D**, el **braç T**, el **braç anticodó** i el **braç acceptor d'aminoàcids**. En el braç anticodó conté un triplet de nucleòtids denominat

<sup>23</sup> Cèl·lules no especialitzades en la reproducció cel·lular, és a dir, cèl·lules no reproductores.

<sup>24</sup> Són les "peces" que formen les proteïnes.

<sup>25</sup> Estructures formades per una subunitat gran i una subunitat petita que tenen com a funció dur a terme la síntesi de proteïnes.

**anticodó** que és complementari d'un triplet de l'RNAm que rep el nom de **codó**. El braç acceptor d'aminoàcids és aquell que transporta els aminoàcids fins el ribosoma.



**Figura 57. Formes més comunes de representar l'RNAt.** Font: [http://www.genome.gov/GlossaryS/resources/transfer\\_rna\\_lq\\_adv.jpg](http://www.genome.gov/GlossaryS/resources/transfer_rna_lq_adv.jpg)

### RNA missatger (RNAm)

La seva funció és **copiar la informació** que conté en el DNA i portar-la fins als ribosomes, perquè s'hi sintetitzin les proteïnes a partir dels aminoàcids que aporten els RNAt (**Figura 58**).



**Figura 58. RNA de missatger amb les seves parts.** Font: <http://biologia.laquia2000.com/genetica/arn-mensajero>

L'**RNAm eucariòtic** es forma a partir del transcrit primari o preRNAm el qual té una sèrie de segments amb informació, denominats exons, alternats amb uns altres sense informació anomenats introns, que després són suprimits i no apareixen en l'RNAm. Aquest procés es denomina **maduració** i té lloc al nucli. A l'extrem 5' té una molècula que rep el nom de **caputxa**, i a l'extrem 3' hi té uns 200 nucleòtids d'adenina que reben el nom de **cua de poli-A**. Tant la caputxa com la cua tenen una funció protectora per tal que l'RNAm no sigui destruït per alguns enzims.

Per altra banda, l'**RNAm procariòtic** no presenta ni exons ni introns ni tampoc caputxa i cua de poli-A. A més, conté informacions separades per a diferents proteïnes.

### RNA ribosòmic (RNAr)

L'RNA ribosòmic forma els **ribosomes** i facilita el procés de síntesi de proteïnes.

### RNA nucleolar (RNAn)

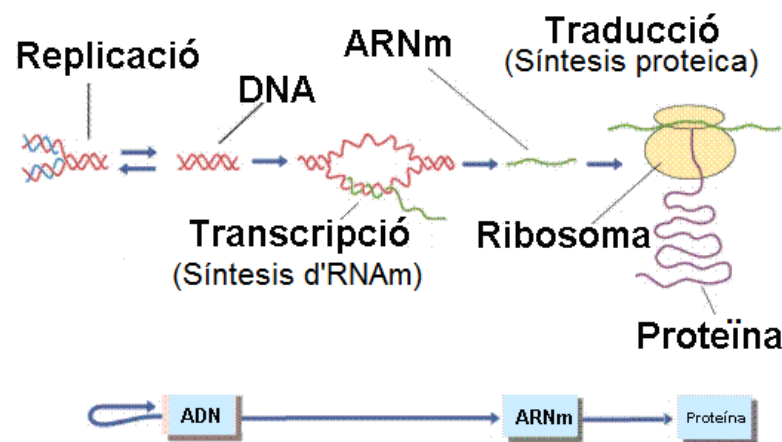
És un RNA que es troba **constituint el nuclèol** i que s'origina a partir de diferents segments de DNA. També intervé en la fabricació dels ribosomes perquè s'associa a proteïnes.

## Del gen a la proteïna

El DNA conté tota la informació genètica que defineix l'estructura i la funció d'un organisme. Hi ha tres processos diferents encarregats de la transmissió de la informació genètica: la **replicació**, la **transcripció** i al **traducció** (**Figura 59**).

Per altra banda, els gens aporten les instruccions per a elaborar proteïnes específiques. Però un gen no pot construir una proteïna directament, per això intervé l'RNA en la síntesi proteica.

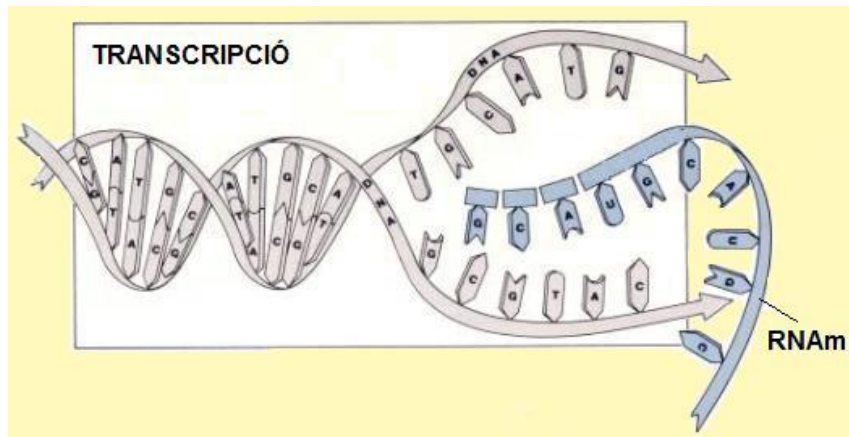
Els àcids nucleics, tal com hem dit, estan formats per un conjunt de nucleòtids; en canvi, les proteïnes estan formades per un conjunt d'aminoàcids. Així doncs, els àcids nucleics i les proteïnes contenen informació escrita en dos llenguatges químics diferents. Per arribar des del DNA fins a la proteïna necessita dues etapes fonamentals: la **transcripció** i la **traducció**.



**Figura 59.** Font: [http://mariajosevega22.blogspot.com.es/2014\\_01\\_01\\_archive.html](http://mariajosevega22.blogspot.com.es/2014_01_01_archive.html)

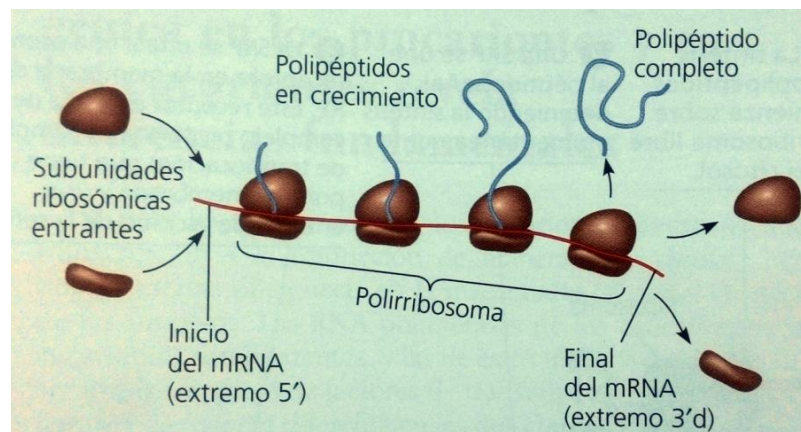
La **transcripció** és el pas d'una seqüència de DNA motlle a una seqüència complementària d'RNA, tant si és RNAm com RNAr o RNAt (**Figura 60**). Consta de quatre etapes: la iniciació, l'elongació, la terminació i la maduració.

Bàsicament aquest procés consisteix en que un enzim anomenat *RNA polimerasa* separa les dues cadenes del DNA i enganxa els nucleòtids d'RNA entre sí. Un detall a tindre en compte és que els nucleòtids de la seqüència d'RNA han de ser complementaris amb els nucleòtids de la seqüència de DNA motlle. L'*RNA polimerasa* només es desplaça per la cadena de DNA motlle en sentit **3'→5'** i sintetitza la cadena de RNA en direcció **5'→3'**.



**Figura 60.** Font: [http://www.xtec.cat/~mbarrio/talassemia/interficies\\_tala/coneixements\\_previs.htm](http://www.xtec.cat/~mbarrio/talassemia/interficies_tala/coneixements_previs.htm)

La **traducció** és el pas d'una seqüència de ribonucleòtids d'RNA missatger a una seqüència d'aminoàcids. Consta de tres passos: la iniciació, l'elongació i la terminació (**Figura 61**).

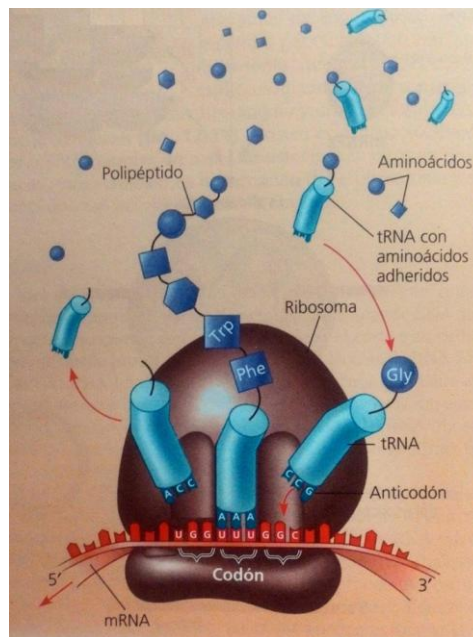


**Figura 61.** Font: llibre *Biología* (Ed. Médica Panamericana)

Durant la *iniciació*, l'RNAm s'associa a la *subunitat petita del ribosoma* i a aquest conjunt s'hi associa un RNAt que transporta l'aminoàcid que iniciarà la cadena polipeptídica: la *metionina* en eucariotes, que té l'anticodó UAC. Tot aquest conjunt es desplaçarà per l'RNAm fins que trobin el codó<sup>26</sup>, el qual és complementari amb l'anticodó UAC: AUG. Llavors, la subunitat gran del ribosoma s'hi unirà (**Figura 62**).

Un cop s'ha iniciat la cadena polipeptídica, ara el conjunt es desplaçarà al llarg de l'RNAm i aniran arribant la resta de RNAt amb l'aminoàcid corresponent segons el missatge que porti escrit l'RNAm. Aquests aminoàcids s'aniran unint entre sí fins que apareguin els **triplets sense sentit** en l'RNAm, que són triplets de nucleòtids que no codifiquen per a cap aminoàcid, i per tant, la traducció finalitzarà i la **cadena polipeptídica quedarà alliberada**.

<sup>26</sup> Seqüència de tres nucleòtids en l'RNAm que codifica un aminoàcid determinat.



**Figura 62.** Font: llibre *Biología* (Ed. Médica Panamericana)

### Conceptes de genètica

- **Caràcter (hereditari).** Cadascuna de les característiques que presenta un ésser viu.
- **Gen.** Seqüència de nucleòtids que duu informació hereditària.
- **Locus.** És el lloc que ocupa un gen en el cromosoma.
- **Diploide (2n).** Ésser o cèl·lula que té dos cromosomes de cada tipus (n). Un és heretat del pare i l'altre de la mare.
- **Haploide.** Ésser o cèl·lula que només té un cromosoma de cada tipus (n). En els ésser humans només són haploides les cèl·lules reproductores, els **gàmetes**.
- **Gen dominant.** Es tracta del gen que imposa la seva informació, és a dir, que no deixa que s'expressi l'altre gen que porta informació sobre el mateix caràcter i que s'anomena **gen recessiu**.
- **Caràcter.** Cadascuna de les particularitats morfològiques o fisiològiques d'un ésser viu.
- **Al·lel.** Cadascun dels diferents gens que poden ocupar un mateix locus. En un ser diploide, per a cada caràcter hi ha dos gens que són al·lells entre si. Per exemple, els al·lells pel caràcter "grup sanguini" són  $I^A$ ,  $I^B$  i  $i$ .
- **Mutació.** Són alteracions a l'atzar del material genètic. Normalment signifiquen deficiències i poden arribar a ser letals. Malgrat que normalment són negatives per a

l'individu, comporten un aspecte positiu per a l'espècie, ja que aporten variabilitat a la població.

Existeix una classificació segons la quantitat de DNA que afecta: **mutacions gèniques**, que són alteracions de la seqüència de nucleòtids d'un gen; **mutacions cromosòmiques**, alteracions de la seqüència de gens d'un cromosoma; i **mutacions genòmiques**, alteracions del nombre de cromosomes.

- **Plasmidi:** petites molècules de DNA circular que es troben en els bacteris i també en els llevats, que són organismes eucariotes i unicel·lulars. Són elements mòbils.
- **Genoma:** conjunt complet dels gens d'un organisme, és a dir, material genètic d'un organisme.
- **Fenotip:** conjunt de trets observables en un organisme, o no, com per exemple el grup sanguini. Depèn del genotip i de l'acció ambiental.
- **Genotip:** constitució genètica, o conjunt d'al·lels, d'un organisme.
- **Polimorfisme:** presència de diverses formes d'un caràcter o d'un gen en una població.

**\* ANNEX 2: Classificació de Thomas Wicker, 2008, basada en la classificació de Finnegan, 1989**

Classification		Structure	TSD	Code	Occurrence
Order	Superfamily				
<b>Class I (retrotransposons)</b>					
LTR	Copia	→ GAG AP INT RT RH →	4-6	RLC	P, M, F, O
	Gypsy	→ GAG AP RT RH INT →	4-6	RLG	P, M, F, O
	Bel-Pao	→ GAG AP RT RH INT →	4-6	RLB	M
	Retrovirus	→ GAG AP RT RH INT ENV →	4-6	RLR	M
	ERV	→ GAG AP RT RH INT ENV →	4-6	RLE	M
DIRS	DIRS	← GAG AP RT RH YR →	0	RYD	P, M, F, O
	Ngaro	→ GAG AP RT RH YR →	0	RYN	M, F
	VIPER	→ GAG AP RT RH YR →	0	RYV	O
PLE	Penelope	← RT EN →	Variable	RPP	P, M, F, O
LINE	R2	← RT EN →	Variable	RIR	M
	RTE	← APE RT →	Variable	RIT	M
	Jockey	← ORF1 APE RT →	Variable	RIJ	M
	L1	← ORF1 APE RT →	Variable	RIL	P, M, F, O
	I	← ORF1 APE RT RH →	Variable	RII	P, M, F
SINE	tRNA	—	Variable	RST	P, M, F
	7SL	—	Variable	RSL	P, M, F
	5S	—	Variable	RSS	M, O
<b>Class II (DNA transposons) - Subclass 1</b>					
TIR	Tc1-Mariner	← Tase* →	TA	DTT	P, M, F, O
	hAT	← Tase* →	8	DTA	P, M, F, O
	Mutator	← Tase* →	9-11	DTM	P, M, F, O
	Merlin	← Tase* →	8-9	DTE	M, O
	Transib	← Tase* →	5	DTR	M, F
	P	← Tase →	8	DTP	P, M
	PiggyBac	← Tase →	TTAA	DTB	M, O
	PIF-Harbinger	← Tase* ORF2 →	3	DTH	P, M, F, O
	CACTA	← Tase ORF2 →	2-3	DTC	P, M, F
Crypton	Crypton	← YR →	0	DYC	F
<b>Class II (DNA transposons) - Subclass 2</b>					
Helitron	Helitron	← RPA Y2 HEL →	0	DHH	P, M, F
Maverick	Maverick	← C-INT ATP CYP POL B →	6	DMM	M, F, O

**Structural features**

Long terminal repeats    
 Terminal inverted repeats    
 Coding region    
 Non-coding region  
 Diagnostic feature in non-coding region    
 Region that can contain one or more additional ORFs

**Protein coding domains**

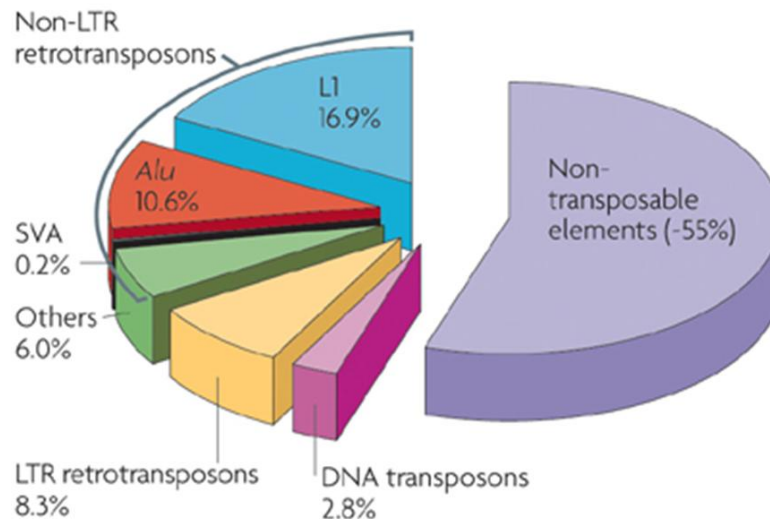
AP, Aspartic proteinase	APE, Apurinic endonuclease	ATP, Packaging ATPase	C-INT, C-integrase	CYP, Cysteine protease	EN, Endonuclease
ENV, Envelope protein	GAG, Capsid protein	HEL, Helicase	INT, Integrase	ORF, Open reading frame of unknown function	
POL B, DNA polymerase B	RH, RNase H	RPA, Replication protein A (found only in plants)	RT, Reverse transcriptase	Y2, YR with YY motif	
Tase, Transposase (* with DDE motif)		YR, Tyrosine recombinase			

**Species groups**

P, Plants     M, Metazoans     F, Fungi     O, Others

**\* ANNEX 3: Gràfic del material genètic de l'ésser humà**

A continuació, podem veure un gràfic on s'observa de què està format el 45% de DNA del genoma que són ETs. Observem que els percentatges més grans són dels elements L1 (*LINE 1*) amb un 16'9%, els Alu amb un 10'6% i els retrotransposons LTR amb un 8'3%. No cal dir, que aquestes xifres són orientatives i poden variar, en poca quantitat, segons la font d'on procedeixi la informació.



Font: [www.nature.com/nrg/journal/v8/n12/fig\\_tab/nrg2165\\_F1.html](http://www.nature.com/nrg/journal/v8/n12/fig_tab/nrg2165_F1.html)

**\* ANNEX 4: Aplicacions i utilitat dels elements transposables en la investigació**

Com que la majoria dels ETs s'insereixen a l'atzar en les seqüències de DNA, serveixen de gran ajuda pels investigadors per introduir mutacions en el genoma, el que els permet determinar les funcions de gens, estudiar fenòmens genètics i ubicar gens. A més, com que l'investigador coneix la seqüència de l'element transposable, pot servir com a marca per identificar el gen en el qual es produeix la mutació.

Per exemple, l'ET anomenat Bella Dorment (*Sleeping Beauty*), dissenyat per investigadors, s'utilitza per induir mutacions en ratolins i buscar gens que puguin causar càncer. Així doncs, introduint el transposó *Sleeping Beauty* en el ratolí, aquest s'insereix a l'atzar en diferents llocs del genoma. Ocasionalment, s'insereix en un gen que protegia en contra del càncer i destruïa el gen. Al buscar la localització de la seqüència *Sleeping Beauty* en el DNA de les cèl·lules tumorals, els investigadors van poder identificar diversos gens que protegeixen en contra del càncer.



**\* ANNEX 5: Seqüències alineades**

A continuació trobareu 3 seqüències alineades pertanyents a la població de *Drosophila subobscura* de Bilbao i de Puerto Montt, Xile. En cadascuna hi ha marcats aquells nucleòtids i/o aquelles proteïnes que són diferents d'una població respecte l'altra.

La primera d'elles fa referència a l'alineació de seqüències de nucleòtids abans que els canvis fossin corregits. Tal com hem dit anteriorment, hi ha canvis que són "falsos" i que el programa els ha marcat sense que verdaderament ho siguin, és per això que s'hauran de comprovar un per un.

En la segona alineació podem trobar les seqüències, també de nucleòtids, que aquesta vegada ja han estat corregides manualment. Tot i així, molts dels canvis romanen igual.

Finalment, i en últim lloc, trobem les seqüències de proteïnes les quals han estat codificades segons la informació que porta cada seqüència de DNA. Ja hem vist en l'annex 1 que cada seqüència de DNA dóna lloc a una seqüència de RNAm mitjançant el procés de la transcripció i, aquesta, dóna lloc a una seqüència d'aminoàcids mitjançant la traducció la qual agrupa tres nucleòtids d'RNAm que codifiquen un aminoàcid determinat (Figura 63). Una seqüència d'aminoàcids dóna lloc a una proteïna. Hi ha diverses formes d'anomenar els aminoàcids, normalment es fa una abreviació del nom complet, però també es pot utilitzar una nomenclatura basada en només una lletra per cada aminoàcid, com és el meu cas (Taula 13).

		Segona lletra				
		U	C	A	G	
Primera lletra (extrem 5')	U	UUU } Phe UUC } UUA } Leu UUG }	UCU } UCC } Ser UCA } UCG }	UAU } Tyr UAC } UAA } stop UAG } stop	UGU } Cys UGC } UGA } stop UGG } Trp	Tercera lletra (extrem 3')
	C	CUU } CUC } Leu CUA } CUG }	CCU } CCC } Pro CCA } CCG }	CAU } His CAC } CAA } Gln CAG }	CGU } Arg CGC } CGA } CGG }	
	A	AUU } Ile AUC } AUA } Met AUG }	ACU } ACC } Thr ACA } ACG }	AAU } Asn AAC } AAA } Lys AAG }	AGU } Ser AGC } AGA } Arg AGG }	
	G	GUU } Val GUC } GUA } GUG }	GCU } GCC } Ala GCA } GCG }	GAU } Asp GAC } GAA } Glu GAG }	GGU } GGC } Gly GGA } GGG }	

**Figura 63. Clau genètica.** Relació entre la seqüència de nucleòtids de RNA i la seqüència d'aminoàcids. Font: <http://aulatres.wikispaces.com/El+codi+gen%C3%A8tic>

ABREVIACIÓ		AMINOÀCID	ABREVIACIÓ		AMINOÀCID
<b>A</b>	<i>Ala</i>	Alanina	<b>M</b>	<i>Met</i>	Metionina
<b>C</b>	<i>Cys</i>	Cisteïna	<b>N</b>	<i>Asn</i>	Asparagina
<b>D</b>	<i>Asp</i>	Àcid aspàrtic	<b>P</b>	<i>Pro</i>	Prolina
<b>E</b>	<i>Glu</i>	Àcid glutàmic	<b>Q</b>	<i>Gln</i>	Glutamina
<b>F</b>	<i>Phe</i>	Fenilalanina	<b>R</b>	<i>Arg</i>	Arginina
<b>G</b>	<i>Gly</i>	Glicina	<b>S</b>	<i>Ser</i>	Serina
<b>H</b>	<i>His</i>	Histidina	<b>T</b>	<i>Thr</i>	Treonina
<b>I</b>	<i>Ile</i>	Isoleucina	<b>V</b>	<i>Val</i>	Valina
<b>K</b>	<i>Lys</i>	Lisina	<b>W</b>	<i>Trp</i>	Triptòfan
<b>L</b>	<i>Leu</i>	Leucina	<b>Y</b>	<i>Tyr</i>	Tirosina

**Taula 13. Formes d'anomenar els aminoàcids.** Realització pròpia.

**ALINEACIÓ 1:** seqüències de nucleòtids de DNA abans de ser corregides

ALINEAMENT EN DNA

```

Puerto_Montt_I3_XVII      TTCATGTTTTCCCTACTTTTTATTAACTTTTTACATATTTTCACAAAGTAAATAAAACAA
Bilbao_I3b                -----TACTTTTTATTAACTTTTTACATATTTTCACAAAATAAAATAAAACAA
                              *****

Puerto_Montt_I3_XVII      CAAAGCTGCC TGAGAAGAAAGATGATCGCATGAATGTACCAATACGTTTACATACGAATT
Bilbao_I3b                CATAGCTGCC TGAGAAGAAATGATGATCGCATGAATGTACCAATACGTTACATACGAATT
                              ** *****

Puerto_Montt_I3_XVII      AAAATCTGTAAAATGAATATAATTGTAATCTAATTTGTTCTCATATTTTTTCGCAGCGTGC
Bilbao_I3b                AAAATCTGTAAAATGAATATAATTGTAATCTAATTTGTTCTCATATTTTTTCGCAGCGTGC
                              *****

Puerto_Montt_I3_XVII      AAAGATTTTTCAAAGGACCTTCGAGGCTTCCACATCGGGTCGGTCAAGTGGCACTTCAGC
Bilbao_I3b                AAAAATTTTTCAAAGGACCTTCGAGGCTTCCACATCGGGTCGGTCAAGTGGCACTTCAGC
                              *** *****

Puerto_Montt_I3_XVII      CACTCGTGAACCATCTCATGCATCATCGAGACGGGAAGGTGTTCCGACACAGGAACGGCA
Bilbao_I3b                CACTCGTGAACCATCTCATGCATCATCGAGACGGGAAGGTGTTCCGACACAGGAACGGCA
                              *****

Puerto_Montt_I3_XVII      GCACTTGGATCGCTATGATATTGTGAAGACCCGTCCAGCTGATGTCGTGTCGAAGAAAGG
Bilbao_I3b                GCACTTGGATCGCTATGATATTGTGAAGACCCGTCCAGCTGATGTCGTGTCGAAGAAAGG
                              *****

Puerto_Montt_I3_XVII      CCATGAGGGAGAGCCTATTCGTTTGAATCAAAC TTC TTTC GAATACAAACC AAGCCAGA
Bilbao_I3b                CCATGAGGGAGAGCCTATTCGATTGCAATCAAAC TTC TTTC GAATACAAACC AAGCCAGA
                              *****

Puerto_Montt_I3_XVII      GTGGCAGTAGTTCACTACCATGTGCGATTTTGAACCTGAGTTGGAAAATATACGCGTGCG
Bilbao_I3b                GTGGCAGTAGTTCACTACCATGTGCGATTTTGAACCTGAGTTGGAAAATATACGCGTGCG
                              *****

Puerto_Montt_I3_XVII      AATGGGCATTCTCTCAAATCACGCTAATATTTGGGATCCGGCTATTTATTTGATGGAAA
Bilbao_I3b                AATGGGCATTCTCTCAAATCACGCTAATATTTGGGATCCGGCTATTTATTTGATGGAAA
                              *****

Puerto_Montt_I3_XVII      ACAACTGTTTCAAAAACAAAAAATTTGAGAAGGAGCTAACTGTGCTGTGTGGACAATCAA
Bilbao_I3b                ACAACTGTTTCAAAAACAAAAAATTTGAGAAGGAGCTAACTGTGCTGTGTGGACAATCAA
                              *****

Puerto_Montt_I3_XVII      AATGGGTATTGACTACAAAATCTCCGTAAGATGTTGGAGTTATATCGAACGCAGAACC
Bilbao_I3b                AATGGGTATTGACTACAAAATCTCCGTAAGATGTTGGAGTTATATCGAACGCAGAACC
                              *****

Puerto_Montt_I3_XVII      CCGGTTTTTGAAGTTCTAAACCTTATTTTGCGCCGCTCCATGAAAGGACTAAAGCTTGA
Bilbao_I3b                CCGGTTTTTGAAGTTCTAAACCTTATTTTGCGCCGCTCCATGAAAGGACTAAAGCTTGA
                              ***** ** *****
    
```

Puerto\_Montt\_I3\_XVII  
Bilbao\_I3b  
GTTGGTTGGACGCAATCTTTTTGATCCTCTCGCAAAGGTATAGCAGATTGATGTAATAT  
GTTGGTTGGACGCAATCTTTTTGATCCTCTCGCAAAGGTATAGCAGATCGATGTAATAT  
\*\*\*\*\*

Puerto\_Montt\_I3\_XVII  
Bilbao\_I3b  
TTTTA-AATTACTTTATAAAAAATAATATTCC TAGATACCGATCCGAGAATTTCAAATG  
ATTTTTTTTACTTTATAAAAAATAATATTCC TAGATACCGATCCGAGAATTTCAAATG  
\*\*\* \*\*\*\*\*

Puerto\_Montt\_I3\_XVII  
Bilbao\_I3b  
GAACTCTGGCCAGGATACGAAACATCGATCCGACAACACGAAAAAGATATTATGCTGTGT  
GAACTCTGGCCAGGATACGAAACCTCGATCCGACAACATGAAAAAGATATTATGCTGTGT  
\*\*\*\*\*

Puerto\_Montt\_I3\_XVII  
Bilbao\_I3b  
ACTGAAATAACACATAAAGTTATGCGCAC TGAACCTGTGTATGAGATACTGAGACGTTGT  
ACTGAAATAACACATAAAGTTATGCGCAC TGAACCTGTGTATGAGATACTGAGACGTTGT  
\*\*\*\*\*

Puerto\_Montt\_I3\_XVII  
Bilbao\_I3b  
TCTAATAACCC TTCACGCCATCAAGACGAGTTTCGCGTGAATGTTCTGGATTTAGTTGTT  
TCTAATAACCC TTCACGCCATCAAGACGAGTTTCGCGTGAATGTTCTAGATTTAGTTGTT  
\*\*\*\*\*

Puerto\_Montt\_I3\_XVII  
Bilbao\_I3b  
CTTACAGATTATAACAACAAAACATATCGCATTAACGATGTTGATTTTGCACAAACCCCA  
CTTACAGATTATAACAACAAAACATATCGCATTAACGATGATGATTTTGCACAAACCCCA  
\*\*\*\*\*

Puerto\_Montt\_I3\_XVII  
Bilbao\_I3b  
AAATCTACATTTAGCTGCAAGGGGAAAGATGTTAGTTTTATCGAGTACTATCTGACTGTA  
AAATCTACATTTAGCTGCAAGGGGAAAGATGTTAGTTTTATCGAGTACTATCTGACTGTA  
\*\*\*\*\*

Puerto\_Montt\_I3\_XVII  
Bilbao\_I3b  
AGTACAAATAAAAACGGCCGTTTCGCC TATAAATATACTCGAAAATAACTATCATTATTAT  
AGTACAAATAAAAACGGCCGGAAGCCTATAAATAAACATGAAAATAACTATCATTATTAT  
\*\*\*\*\*

Puerto\_Montt\_I3\_XVII  
Bilbao\_I3b  
ATTTTTCTATTTTAGAAATATAACATACGCATTCGTGACCACAAATCAGCCCTTGTTAATT  
ATTTTTCTATTTTAGAAATATAACATACGCATTCGTGACCACAAATCAGCCCTTGTTAATT  
\*\*\*\*\*

Puerto\_Montt\_I3\_XVII  
Bilbao\_I3b  
TCAAAAATAGGGACAAGGCTCAGAAGACC AATGCCAATGAAC TCGTAGTCC TTATTCCA  
TCAAAAATAGGGACAAGGCTCAGAAGACC AATGCCAATGAAC TCGTAGTCC TTATTCCA  
\*\*\*\*\*

Puerto\_Montt\_I3\_XVII  
Bilbao\_I3b  
GAACATGCGCGGGTTACGGGACTAACTGAC AATATGCGTTCAAATTTTCAGTAAGACTTG  
GAACATGCGCGGGTTACGGGACTAACTGAC AATATGCGTTCAAATTTTCAGTAAGACTTG  
\*\*\*\*\*

Puerto\_Montt\_I3\_XVII  
Bilbao\_I3b  
AAAAACAGCTATTTTAAGCATTTATGATTACATTCATTTCAAATGTGCCACTTTC TTT  
AAAAACAGCTATTTTAAGCATTTATGATTACATTCATTTCAAATGTGCCACTTTC TTT  
\*\*\*\* \*\*\*\*\*

Puerto\_Montt\_I3\_XVII  
Bilbao\_I3b  
ATTACAGACTGATGCGCGCAATGTC TGATCACACACGCATGAATCCC GACCGCC GTATTG  
ATTACAGACTGATGCGCGCAATGTC TGATCACACACGCATGAATCCC GACCGCC GTATTG  
\*\*\*\*\*

Puerto\_Montt\_I3\_XVII  
Bilbao\_I3b  
ATCGTTTGC GTAGATTCAACAATCGTTT GCAAACCAC TGCAGATAGTGTGAAAGTTCTAA  
ATCGTTTGC GTAGATTCAACAATCGTTT GCAAACCAC TGCAGATAGTGTGAAAGTTCTAA  
\*\*\*\*\*

Puerto\_Montt\_I3\_XVII  
Bilbao\_I3b  
AAGACTGGGACATGAAAAC TCGATGGAAATCTTACAGAAGTACAGGGACGTATAATTGCA  
AAGACTGGGACATGA-AACTCGATGGAAATCTTACAGAAGTACAGGGACGTATAATTGCA  
\*\*\*\*\*

Puerto\_Montt\_I3\_XVII  
Bilbao\_I3b  
CCGCAGAAAATTGCTTTAATCAATTC AAAGTGAGTCCC AAATGAAATGGTTTTATACC  
CCGCAGAAAATTGCTTTAATCAA-TCAAAGTGAGTCCC AAATGAAATGGTTTTATACC  
\*\*\*\*\*

Puerto\_Montt\_I3\_XVII  
Bilbao\_I3b  
TGGTATTTGAAGAGTAAAAGAGGTACTTCAGATTTGTTCTCTAAAGAGGATGCATATAAC  
TGGTATTTGAAGAGTAAAAGAGGTACTTCAGATTTGTTCTCTAAAGAGGATGCATATAAC  
\*\*\*\*\*

Puerto\_Montt\_I3\_XVII  
Bilbao\_I3b  
GAATAAACAGAAACCTTT-----CCGACTCCATAATAC TTGACTGAGTACCGGGCATA  
ATATAACGAGTAAACAGAAACGTTTCCGCCCTCCATAATAC-----  
\*\*\*\* \* \* \* \* \* \*\* \*\*\*\*\*

Puerto\_Montt\_I3\_XVII  
Bilbao\_I3b  
AAAGGTGTAACGC GTTCGAGCGCGTCTCAACATTCCGCC TCGTTTATATAAATATTGTGT  
-----TGACTGAGTACCGGGCATAAATATTGTGT  
\* \*\*\*\*\*

Puerto\_Montt\_I3\_XVII  
Bilbao\_I3b  
ATTTTCAGATGTTCTGCTGGCGAAACAGCTGATTGGACAAGATGCTTCCGTGACC AACGTA  
ATTTTCAGATGTTCTGCTGGCGAAACAGCTGATTGGACAAGATGCTTCCGTGACC AACGTA  
\*\*\*\*\*

Puerto\_Montt\_I3\_XVII  
Bilbao\_I3b  
TGCTCACTACTCCAGTGATGGTCTCGACC GTTGGGCCGTAATTGCACCGGAGCGCAATT  
TGCTCACTACTCCAGTGATGGTCTCGACC GTTGGGCCGTAATTGCACCGGAGCGCAATT  
\*\*\*\*\*

Puerto\_Montt\_I3\_XVII  
Bilbao\_I3b  
CGTTTGACCTTAAAAATTTGCTCGAAAGTTTGTTTCGAGCAGCTTCTGGTATGGGATTCA  
CGTTTGACCTTAAAAATTTGCTTGAAGTTTGTTTCGAGCAGCTTCTGGTATGGGATTCA  
\*\*\*\*\*

Puerto\_Montt\_I3\_XVII  
Bilbao\_I3b  
AAATAAGAAGCCCCACGAGTAAGCTAAACACTTCCAAATGTGCTCTTCTTAAAAATAACT  
AAATAAGAAGCCCCACGAGTAAGCTAAACACTTCCAAATGTGCTCTTCTTAAAAATAACT  
\*\*\*\*\*

Puerto\_Montt\_I3\_XVII  
Bilbao\_I3b  
GCCTTAACTTTTAGAATAAAAAATTTACGATGATCGCACTGCGACATATGTGCGAGCTATG  
GCCTTAACTTTTAGAATAAAAAATTTACGATGATCGCACTGCGACATATGTGCGAGCTATG  
\*\*\*\*\*

Puerto\_Montt\_I3\_XVII  
Bilbao\_I3b  
GATGAGTGTGTTCCGATGGATCCAAAATTAATCTTGTGTTTTGTTCCCAACAACAATGAA  
GATGAGTGTGTTCCGATGGATCCAAAATTAATCTTGTGTTTTGTTCCCAACAACAATGAA  
\*\*\*\*\*

Puerto\_Montt\_I3\_XVII  
Bilbao\_I3b  
GAAAGGTTTGATAATCTAAATAGCCCAATAATTTCAATGCACAATTTAATCCATATGTTT  
GAAAGGTTTGATAATCTAAATAGCCCAATAATTTCAATGCACAATTTAATCCATATGTTT  
\*\*\*\*\*

Puerto\_Montt\_I3\_XVII  
Bilbao\_I3b  
TTCAGATATTC TCTATAAAAAAGAGAGGCTGTATTGATAGAGCCGTTCTACTCAAGTT  
TTCAGATATTC TCTATAAAAAAGAGAGGCTGTATTGATAGAGCCGTTCTACTCAAGTT  
\*\*\*\*\*

Puerto\_Montt\_I3\_XVII  
Bilbao\_I3b  
GTGACTGTAAAAACTGCAAAAAATCGAGGCC TTATGAGCATTGCAACCAAAAATAGCAATT  
GTGACTGTAAAAACTGCAAAAAATCGAGGCC TAATGAGCATTGCAACCAAAAATAGCAATT  
\*\*\*\*\*

Puerto\_Montt\_I3\_XVII  
Bilbao\_I3b  
CAAAATGAATTGTAATTTGGGTTATACACCATGGATGATTGAGTTGCCGCTTTCCGGTTTA  
CAAAATGAATTGTAATTTGGGTTATACACCATGGATGATTGAGTTGCCGCTTTCCGGTTTA  
\*\*\*\*\*

Puerto\_Montt\_I3\_XVII  
Bilbao\_I3b  
ATGACCATTGGCTTTGACATTGCCAAAAGCGCACGTGACC GCCGCAAGGC TTATGGTGCT  
ATGACCATTGGCTTTGACATTGCCAAAAGCGCACGTGACC GCCGCAAGGC TTATGGTGCT  
\*\*\*\*\*

Puerto\_Montt\_I3\_XVII  
Bilbao\_I3b  
TTAGTTGC TTCAATGGATCTCCAGCGGAATTC AAC TTACTTTAGCACGGTATCAGAGTGC  
TTAGTTGC TTCAATGGATCTCCAGCGGAATTC AAC TTACTTTAGCACGGTATCAGAGTGC  
\*\*\*\*\*

Puerto\_Montt\_I3\_XVII  
Bilbao\_I3b  
AGTGCC TTTGATGTGCTGTCTAATAACC TTTGGCCAATGATTGCTAAGGCC TTAGACAA  
AGTGCC TTTGATGTGCTGTCTAATAACC TTTGGCCAATGATTGCTAAGGCC TTAGACAA  
\*\*\*\*\*

Puerto\_Montt\_I3\_XVII  
Bilbao\_I3b  
TACCAGAGAGCATGATAAGTTACCAGCACGCATAC TATTCATCTGACGGTGTAGC  
TACCAGAGAGCATGATAAGTTACCAGCACGCATAC TATTCATCTGACGGTGTAGC  
\*\*\*\*\*

Puerto\_Montt\_I3\_XVII  
Bilbao\_I3b  
GCAGGATCTTTGAAGCAGTTGTTTGAATACGAAGTGAAGATATTGTGAAAAGCTTGAT  
GCAGGATCTTTGAAGCAGTTGTTTGAATACGAAGTGAAGATATTGTGAAAAGCTTGAT  
\*\*\*\*\*

Puerto\_Montt\_I3\_XVII  
Bilbao\_I3b  
ACTGAATATAAGCGTGCCAATAGTGCTCCACC GATGCTGGCATA CATTGTGGTCACTAAA  
ACTGAATATAAGCGTGCCAATAGTGCTCCACC GATGCTGGCATA CATTGTGGTCACTAAA  
\*\*\*\*\*

Puerto\_Montt\_I3\_XVII  
Bilbao\_I3b  
TCTTGCAACACACGTTTCTTTAACAACGGTAGAAATCCCCCCCC TGGAACAGTAGTAGAT  
TCTTGCAACACACGTTTCTTTAACAACGGTAGAAATCCCCCCCC TGGAACAGTAGTAGAT  
\*\*\*\*\*

Puerto\_Montt\_I3\_XVII  
Bilbao\_I3b  
GATATTGTGACTCTGCCCGAACGATACGACTTCTACTTGGTGTACAGACGGTTCGCCAA  
GATATTGTGACTCTGCCCGAACGATACGACTTCTACTTGGTGTACAGACGGTTCGCCAA  
\*\*\*\*\*

Puerto\_Montt\_I3\_XVII  
Bilbao\_I3b  
GGAACCGTTTCGCCAACGAGCTACAATGTGCTCTACAGCAACATTCGCTCAGCCCTGAC  
GGAACCGTTTCGCCAACGAGCTACAATGTGCTCTACAGCAACATTCGCTCAGCCCTGAC  
\*\*\*\*\*

Puerto\_Montt\_I3\_XVII  
Bilbao\_I3b  
CAAAATCCAAAAGCTCACATATAAGATGTGCCATCTCTACTATAACTGGTCCGGAAC TACA  
CAAAATCCAAAAGCTCACATATAAGATGTGCCATCTCTACTATAACTGGTCCGGAAC TACA  
\*\*\*\*\*

Puerto\_Montt\_I3\_XVII  
Bilbao\_I3b  
CGTGT-----  
CGTGACCTGCTG  
\*\*\*\*\*

**ALINEACIÓ 2:** seqüències de nucleòtids de DNA corregides

ALINEAMENT EN DNA Puerto Montt - Bilbao

```
Puerto_Montt_I3_XVII      TTCATGTTTTCCCTACTTTTTATTAACTTTTTACATATTTTCACAAAAGTAAATAAAACAA
Bilbao_I3b                TTCATGTTTTCCCTACTTTTTATTAACTTTTTACATATTTTCACAAAATAAAATAAAACAA
*****

Puerto_Montt_I3_XVII      CAAAGCTGCC TGAGAAGAAAGATGATCGCATGAATGTACCAATACGTTTACATACGAATT
Bilbao_I3b                CATAGCTGCC TGAGAAGAATGATGATCGCATGAATGTACCAATACGTTTACATACGAATT
** *****

Puerto_Montt_I3_XVII      AAAATCTGTAAAATGAATATAATTGTAATCTAATTTGTTCTCATATTTTTTCGCAGCGTGC
Bilbao_I3b                AAAATCTGTAAAATGAATATAATTGTAATCTAATTTGTTCTCATATTTTTTCGCAGCGTGC
*****

Puerto_Montt_I3_XVII      AAAGATTTTCAAAGGACCTTC TGAGGCTTCCACATCGGGTCGGTCAAGTGGCACTTCAGC
Bilbao_I3b                AAAAATTTTCAAAGGACCTTC TGAGGCTTCCACATCGGGTCGGTCAAGTGGCACTTCAGC
*** *****

Puerto_Montt_I3_XVII      CACTCGTGAACCATCTCATGCATCATCGAGACGGGAAGGTGTTCCGACACAGGAACGGCA
Bilbao_I3b                CACTCGTGAACCATCTCATGCATCATCGAGACGGGAAGGTGTTCCGACACAGGAACGGCA
*****

Puerto_Montt_I3_XVII      GCACTTGGATCGCTATGATATTGTGAAGACCCGTCCAGCTGATGTCGTGTCGAAGAAAGG
Bilbao_I3b                GCACTTGGATCGCTATGATATTGTGAAGACCCGTCCAGCTGATGTCGTGTCGAAGAAAGG
*****

Puerto_Montt_I3_XVII      CCATGAGGGAGAGCCTATTCGTTTGAATCAAAC TTC TTTTGAATACAAACC AAGCCAGA
Bilbao_I3b                CCATGAGGGAGAGCCTATTCGATTGCAATCAAAC TTC TTTTGAATACAAACC AAGCCAGA
*****

Puerto_Montt_I3_XVII      GTGGCAGTAGTTCACTACCATGTCGATTTTGAACCTGAGTTGGAAAATATACGCGTGCG
Bilbao_I3b                GTGGCAGTAGTTCACTACCATGTCGATTTTGAACCTGAGTTGGAAAATATACGCGTGCG
*****

Puerto_Montt_I3_XVII      AATGGGCATTCTCTCAAATCACGC TAATATTTGGGATCCGGCTATTTATTTGATGGAAA
Bilbao_I3b                TATGGGCATTCTCTCAAATCACGC TAATATTTGGGATCCGGCTATTTATTTGATGGAAA
*****

Puerto_Montt_I3_XVII      ACAACTGTTCAAAAACAAAAA TTTGAGAAGGAGCTAACGTGCTGTGTGGACAATCAAA
Bilbao_I3b                ACAACTGTTCAAAAACAAAAA TTTGAGAAGGAGCTAACGTGCTGTGTGGACAATCAAA
*****

Puerto_Montt_I3_XVII      AATGGGTATTGACTACAAAATCTCCG TAAAGTATGTTGGAGTTATATCGAACGCAGAACC
Bilbao_I3b                AATGGGTATTGACTACAAAATCTCCG TAAAGTATGTTGGAGTTATATCGAACGCAGAACC
*****

Puerto_Montt_I3_XVII      CCGGTTTTTGAAGTTCTAAACCTTATTTTGC GCCGCTCCATGAAAGGACTAAAGCTTGA
Bilbao_I3b                CCGGTTTTTGAAGTTCTAAACCTTATTTTGC GCCGCTCCATGAAAGGACTAAAGCTTGA
*****

Puerto_Montt_I3_XVII      GTTGGTTGGACGCAATCTTTTTGATCCTCTCGCAAAGGTATAGCAGATTGATGTAATAT
Bilbao_I3b                GTTGGTTGGACGCAATCTTTTTGATCCTCTCGCAAAGGTATAGCAGATTGATGTAATAT
*****

Puerto_Montt_I3_XVII      TTTTTTTTTTACTTTATAAAAACATAATATTCCTAGATACCGATCCGAGAATTTCAAATG
Bilbao_I3b                ATTTTTTTTTTACTTTATAAAAACATAATATTCCTAGATACCGATCCGAGAATTTCAAATG
*****

Puerto_Montt_I3_XVII      GAACTCTGGCCAGGATACGAAACATCGATCCGACAACACGAAAAAGATATTATGCTGTGT
Bilbao_I3b                GAACTCTGGCCAGGATACGAAACATCGATCCGACAACATGAAAAAGATATTATGCTGTGT
*****

Puerto_Montt_I3_XVII      ACTGAAATAACACATAAAGTTATGCGCACTGAAAC TGTGTATGAGATACTGAGACGTTGT
Bilbao_I3b                ACTGAAATAACACATAAAGTTATGCGCACTGAAAC TGTGTATGAGATACTGAGACGTTGT
*****

Puerto_Montt_I3_XVII      TCTAATAACCC TTCACGCCATCAAGACGAGTTTCGCGTGAATGTTCTGGATTTAGTTGTT
Bilbao_I3b                TCTAATAACCC TTCACGCCATCAAGACGAGTTTCGCGTGAATGTTCTAGATTTAGTTGTT
*****

Puerto_Montt_I3_XVII      CTTACAGATTATAACAACAAAACATATCGCATTAAACGATGTTGATTTTGCACAAACCCCA
Bilbao_I3b                CTTACAGATTATAACAACAAAACATATCGCATTAAACGATGTTGATTTTGCACAAACCCCA
*****

Puerto_Montt_I3_XVII      AAATCTACATTTAGCTGCAAGGGGAAAGATGTTAGTTTTATCGAGTACTATCTGACTGTA
Bilbao_I3b                AAATCTACATTTAGCTGCAAGGGGAAAGATGTTAGTTTTATCGAGTACTATCTGACTGTA
*****
```

Puerto\_Montt\_I3\_XVII  
Bilbao\_I3b  
AGTACAAATAAAAACGGCCGTTCCGCTATAAATATACTCGAAAATAACTATCATTATTAT  
AGTACAAATAAAAACGGCCGGAAGCCATAAATAAACATGGAAAATAACTATCATTATTAT  
\*\*\*\*\*

Puerto\_Montt\_I3\_XVII  
Bilbao\_I3b  
ATTTTTCTATTTTAGAAATATAACATACGCATTCTGTGACCACAATCAGCCCCTTGTTAATT  
ATTTTTCTATTTTAGAAATATAACATACGCATTCTGTGACCACAATCAACCCTTGTTAATT  
\*\*\*\*\*

Puerto\_Montt\_I3\_XVII  
Bilbao\_I3b  
TCAAAAAATAGGGACAAGGCTCAGAAGACCAATGCCAATGAACTCGTAGTCCATTATTCCA  
TCAAAAAATAGGGACAAGGCTCAGAAGACCAATGCCAATGAACTCGTAGTCCATTATTCCA  
\*\*\*\*\*

Puerto\_Montt\_I3\_XVII  
Bilbao\_I3b  
GAACTATGCCGGGTTACGGGACTAAGTACAAATATGCGTTCAAATTTTCAGTAAGACTTG  
GAACTATGCCGGGTTACGGGACTAAGTACAAATATGCGTTCAAATTTTCAGTAAGACTTG  
\*\*\*\*\*

Puerto\_Montt\_I3\_XVII  
Bilbao\_I3b  
AAAAAACAGCTATTTTAAGCATTTATGATTACATTCATTTCAAATGTGCCACTTCTTTT  
AAAATACAGCTATTTTAAGCATTTATGATTACATTCATTTCAAATGTGCCACTTCTTTT  
\*\*\*\*

Puerto\_Montt\_I3\_XVII  
Bilbao\_I3b  
ATTACAGACTGATGCGCGCAATGTCTGATCACACACGCATGAATCCCAGCCGCCGATTG  
ATTACAGACTGATGCGCGCAATGTCTGATCACACACGCATGAATCCCAGCCGCCGATTG  
\*\*\*\*\*

Puerto\_Montt\_I3\_XVII  
Bilbao\_I3b  
ATCGTTTGCGTAGATTCAACAATCGTTTGCAAACCACTGCAGATAGTGTGAAAGTCTTAA  
ATCGTTTGCGTAGATTCAACAATCGTTTGCAAACCACTGCAGATAGTGTGAAAGTCTTAA  
\*\*\*\*\*

Puerto\_Montt\_I3\_XVII  
Bilbao\_I3b  
AAGACTGGGACATGAAAACTCGATGGAAATCTTACAGAAGTACAGGGACGTATAATTGCA  
AAGACTGGGACATGAAAACTCGATGGAAATCTTACAGAAGTACAGGGACGTATAATTGCA  
\*\*\*\*\*

Puerto\_Montt\_I3\_XVII  
Bilbao\_I3b  
CCGCAGAAAATTGCTTTTAATCAATTCAAAGTGAGTCCCAAATGAAATGGTTTTTATACC  
CCGCAGAAAATTGCTTTTAATCAA - TCAAAGTGAGTCCCAAATGAAATGGTTTTTATACC  
\*\*\*\*\*

Puerto\_Montt\_I3\_XVII  
Bilbao\_I3b  
TGGTATTTGAAGAGTAAAAGAGGTACTTCAGATTTGTCTCTAAAGAGGATGCATATAAC  
TGGTATTTGAAGAGTAAAAGAGGTACTTCAGATTTGTCTCTAAAGAGGATGCATATAAC  
\*\*\*\*\*

Puerto\_Montt\_I3\_XVII  
Bilbao\_I3b  
GAATAAAC-----AGAAACCTTCCGACTCCATAAATACTGACTGAGTACCGGGCAT  
GAGTAAACGAGTAAACAAGAAACGTTTCCGCCCTCCATAAATACTGACTGAGTACCGGGCAT  
\*\* \*\*\*\*\*

Puerto\_Montt\_I3\_XVII  
Bilbao\_I3b  
AAAAGGTGTAACGCGTTTCGAGCGCTCTCAACATTCCGCCCTCGTTTATATAAATATTGTG  
AAAA-----TATTGTG  
\*\*\*\*

Puerto\_Montt\_I3\_XVII  
Bilbao\_I3b  
TATTTTCAGATGTTCTGCTGGCGAAACAGCTGATTGGACAAGATGCTTCCGTGACCAACGT  
TATTTTCAGATGTTCTGCTGGCGAAACAGCTGATTGGACAAGATGCTTCCGTGACCAACGT  
\*\*\*\*\*

Puerto\_Montt\_I3\_XVII  
Bilbao\_I3b  
ATGCTCACTACTCCCAGTGATGGTCTCGACCGTTGGGCCGTAATTGCACCGGAGCGCAAT  
ATGCTCACTACTCCCAGTGATGGTCTCGACCGTTGGGCCGTAATTGCACCGGAGCGCAAT  
\*\*\*\*\*

Puerto\_Montt\_I3\_XVII  
Bilbao\_I3b  
TCGTTTGACC TAAAAAATTTGCTCGAAAGTTTGTTCGAGCAGCTTCTGGTATGGGATTC  
TCGTTTGACC TAAAAAATTTGCTCGAAAGTTTGTTCGAGCAGCTTCTGGTATGGGATTC  
\*\*\*\*\*

Puerto\_Montt\_I3\_XVII  
Bilbao\_I3b  
AAAATAAGAAGCCCCACGAGTAAGCTAAACACTTCCAAATGTGCTCTTCTTAAAAATAAC  
AAAATAAGAAGCCCCACGAGTAAGCTAAACACTTCCAAATGTGCTCTTCTTAAAAATAAC  
\*\*\*\*\*

Puerto\_Montt\_I3\_XVII  
Bilbao\_I3b  
TGCCTTAAC TTTTAGAATAAAAAATTTACGATGATCGCACTGCGACATATGTGCGAGCTAT  
TGCCTTAAC TTTTAGAATAAAAAATTTACGATGATCGCACTGCGACATATGTGCGAGCTAT  
\*\*\*\*\*

Puerto\_Montt\_I3\_XVII  
Bilbao\_I3b  
GGATGAGTGTGTTTCGCATGGATCCAAAATTAATCTTGTGTTTTGTTCCCAACAACAATGA  
GGATGAGTGTGTTTCGCATGGATCCAAAATTAATCTTGTGTTTTGTTCCCAACAACAATGA  
\*\*\*\*\*

Puerto\_Montt\_I3\_XVII  
Bilbao\_I3b  
AGAAAGTTTGATAATCTAAATAGCCCAATAATTTCAATGCACAATTTAATCCATATGTT  
AGAAAGTTTGATAATCTAAATAGCCCAATAATTTCAATGCACAATTTAATCCATATGTT  
\*\*\*\*\*

Puerto\_Montt\_I3\_XVII  
Bilbao\_I3b  
TTTCAGATATCTTCTATAAAAAAGAGAGGCTGTATTGATAGAGCCGTTCCACTCAAGT  
TTTCAGATATCTTCTATAAAAAAGAGAGGCTGTATTGATAGAGCCGTTCCACTCAAGT  
\*\*\*\*\*

Puerto_Montt_I3_XVII Bilbao_I3b	TGTGACTGTAAAACTGCAAAAAATCGAGGCCATTATGAGCATTGCAACCAAAATAGCAAT TGTGACTGTAAAACTGCAAAAAATCGAGGCCAATGAGCATTGCAACCAAAATAGCAAT *****
Puerto_Montt_I3_XVII Bilbao_I3b	TCAAATGAATTGTAAATTGGGTTATACACCATGGATGATTGAGTTGCCGCTTTCCGGTTT TCAAATTAATTGTAAATTGGGTTATACACCATGGATGATTGAGTTGCCGCTTTCCGGTTT *****
Puerto_Montt_I3_XVII Bilbao_I3b	AATGACCATTGGCTTTGACATTGCCAAAAGCGCACGTGACC GCCGCAAGGC TTATGGTGC AATGACCATTGGCTTTGACATTGCCAAAAGCGCACGTGACC GCCGCAAGGC TTATGGTGC *****
Puerto_Montt_I3_XVII Bilbao_I3b	TTTAGTTGCTTCAATGGATCTCCAGCGGAATTCACCTTACTTTAGCACGGTATCAGAGTG TTTAGTTGCTTCAATGGATCTCCAGCGGAATTCACCTTACTTTAGCACGGTATCAGAGTG *****
Puerto_Montt_I3_XVII Bilbao_I3b	CAGTGCCCTTTGATGTGCTGTCTAATAACCTTTGGCCAATGATTGCTAAGGCCCTTAGACA CAGTGCCCTTTGATGTGCTGTCTAATAACCTTTGGCCAATGATTGCTAAGGCCCTTAGACA *****
Puerto_Montt_I3_XVII Bilbao_I3b	ATACCAGAGAGAGCATGATAAGTTACCAGCACGCATAC TATTCTATCGTGACGGTGTTAG ATACCAGAGAGAGCATGATAAGTTACCAGCACGCATAC TATTCTATCGTGACGGTGTTAG *****
Puerto_Montt_I3_XVII Bilbao_I3b	CGCAGGATCTTTGAAGCAGTTGTTTGAATACGAAGTGAAAGATATTGTGGAAAAGCTTGA CGCAGGATCTTTGAAGCAGTTGTTTGAATACGAAGTGAAAGATATTGTGGAAAAGCTTGA *****
Puerto_Montt_I3_XVII Bilbao_I3b	TACTGAATATAAGCGTGCCAATAGTGCTCCACCGATGCTGGCATACTTGTGGTCACTAA TACTGAATATAAGCGTGCCAATAGTGCTCCACCGATGCTGGCATACTTGTGGTCACTAA *****
Puerto_Montt_I3_XVII Bilbao_I3b	ATCTTGCAACACACGTTTCTTTAAACAACGGTAGAAATCCCCCCCCGGAACAGTAGTAGA ATCTTGCAACACACGTTTCTTTAAACAACGGTAGAAATCCCCCCCCGGAACGGTAGTAGA *****
Puerto_Montt_I3_XVII Bilbao_I3b	TGATATTGTGACTCTGCCCCAACGATACGACTTCTACTTGGTGTCACAGACGGTTCGCCA TGATATTGTGACTCTGCCCCAACGATACGACTTCTACTTGGTGTCACAGACGGTTCGCCA *****
Puerto_Montt_I3_XVII Bilbao_I3b	AGGAACCGTTTCGCCAACGAGCTACAATGTGCTCTACAGCAACATTCTGCTCAGCCCTGA AGGAACCGTTTCGCCAACGAGCTACAATGTGCTCTACAGCAACATACTGCTCAGCCCTGA *****
Puerto_Montt_I3_XVII Bilbao_I3b	CCAAATCCAAAAGCTCACATATAAGATGTGCCATCTCTACTATAACTGGTCCGGGAACACTAC TCAAATCCAAAAGCTCACATATAAGATGTGCCATCTCTACTATAACTGGTCCGGGAACACTAC *****
Puerto_Montt_I3_XVII Bilbao_I3b	ACGTGTACCTGCTGT ACGTGTACCTGCTGT *****

**ALINEACIÓ 3:** seqüències d'aminoàcids

ALINEAMENT PROTEÏNES Puerto Montt - Bilbao

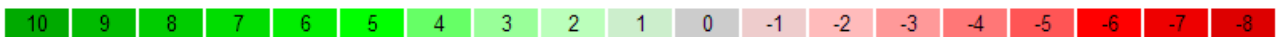
Puerto_Montt Bilbao	RAKIFKGPSEASTSGRSSGTSATREPSHASSRREGVPTQERQHLDRYDIVKTRPADVSK RAKIFKGPSEASTSGRSSGTSATREPSHASSRREGGPTQERQHLDRYDIVKTRPADVSK *****
Puerto_Montt Bilbao	KGHEGEPIRLQSNFFRIQTKPEWHVVHYHVDFEPELENIRVRMGILSNHANILGSGYLF KGHEGEPIRLQSNFFRIQTKPEWRVVHYHVDFEPELENIRVRMGILSNHANILGSGYLF *****
Puerto_Montt Bilbao	GKQLFTNKKFEKELTVLCGQSKMGIDYKISVKYVGVISNAEPRFLQVLNLILRRSMKGLK GKQLFTNKKFEKELTVLCGQSKMGIDYKISVKYVGVISNAEPRFLQVLNLILRRSMKGLK *****
Puerto_Montt Bilbao	LELVGRNLFDPKLAIPREFQMELWPGYETSIRQHEKDIMLCTEITHKVMRTETVYEILR LELVGRNLFDPKLAIPREFQMELWPGYETSIRQHEKDIMLCTEITHKVMRTETVYEILR *****
Puerto_Montt Bilbao	RCSNNPSRHHQDEFVRNVLDLVLVLDYNNKTYRINDVDFATPKSTFSCCKGKDVFSIEYYL RCSNNPSRHHQDEFVRNVLDLVLVLDYNNKTYRINDVDFATPKSTFSCCKGKDVFSIEYYL *****
Puerto_Montt Bilbao	TKYNIRIRDHNQPLLISKNRDKAQKTANLVLVPELRCRVTLTDNMRSNFQCSAGETA TKYNIRIRDHNQPLLISKNRDKAQKTANLVLVPELRCRVTLTDNMRSNFQCSAGETA *****
Puerto_Montt Bilbao	DWTRCFRDQRMLTTPSDGLDRWAVIAPERNSFDLKNLLESLFRAASGMGFKIRSPHEIKI DWTRCFRDQRMLTTPSDGLDRWAVIAPERNSFDLKNLLESLFRAASGMGFKIRSPHEIKI *****
Puerto_Montt Bilbao	YDDRTATYVRAMDECVRMDPKLILCFVPNNNEERYSSIKKRGCIDRAVPTQVVTVKAKN YDDRTATYVRAMDECVRMDPKLILCFVPNNNEERYSSIKKRGCIDRAVPTQVVTVKAKN *****
Puerto_Montt Bilbao	RGLMSIATKIAIQMNCKLGYTPWMIELPLSGLMTIGFDIAKSARDRRKAYGALVASMDLQ RGLMSIATKIAIQINCKLGYTPWMIELPLSGLMTIGFDIAKSARDRRKAYGALVASMDLQ *****
Puerto_Montt Bilbao	RNSTYFSTVSECSAFDVLNNLWPMIAKALRQYQREHDKLPARILFYRDGVSAGSLKQLF RNSTYFSTVSECSAFDVLNNLWPMIAKALRQYQREHDKLPARILFYRDGVSAGSLKQLF *****
Puerto_Montt Bilbao	EYEVKDIVEKLDTEYKRANSAPPMLAYIVVTKSCNTRFFNNGRNPPTVDDIVTLPER EYEVKDIVEKLDTEYKRANSAPPMLAYIVVTKSCNTRFFNNGRNPPTVDDIVTLPER *****
Puerto_Montt Bilbao	YDFYLVSQTVRQGTVSPTSYNVLYSNIRLSPDQIQKLTYKMCHLYNWSGTTR--- YDFYLVSQTVRQGTVSPTSYNVLYSNIRLSPDQIQKLTYKMCHLYNWSGTTRVPA *****



**\* ANNEX 6: Com afecten els canvis entre les dues poblacions a nivell de proteïna?**

En l'*annex 5*, i en aquesta mateixa pàgina, podem veure marcats els canvis que hi ha a nivell de proteïna entre les dues poblacions, la de Puerto Montt i la de Bilbao. Si més no, a simple vista no podem establir si aquests canvis influiran molt en la funcionalitat de la proteïna o gairebé ni es notaran. Per poder anar més enllà, hem utilitzat el programa *Mutation Analyzer*, el qual és totalment gratuït i es troba en línia.

Ara analitzarem cada canvi per separat. En el programa s'introdueixen els 2 aminoàcids que configuren cada canvi i ell, dins d'una escala del 10 al -8 (*Figura 64*) et diu si normalment es pot trobar aquest canvi (nombres positius) o rarament es pot trobar (nombres negatius).



**Figura 64. Escala utilitzada pel programa *Mutation Analyzer*.** Font: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Class/Structure/aa/aa\\_explorer.cgi](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Class/Structure/aa/aa_explorer.cgi)

CANVI EN LA SEQÜÈNCIA DE PROTEÏNES		NOMBRE / COLOR DONAT PEL PROGRAMA	SIGNIFICAT
Puerto Montt	<b>V</b> (Valina)	-3	No s'observa en la natura
Bilbao	<b>G</b> (Glicina)		
Puerto Montt	<b>H</b> (Histidina)	0	No repercutirà en la funcionalitat de la proteïna
Bilbao	<b>R</b> (Arginina)		
Puerto Montt	<b>M</b> (Metionina)	1	No repercutirà en la funcionalitat de la proteïna
Bilbao	<b>I</b> (Isoleucina)		

Per tant, podem veure que els canvis no són molt importants. Tot i així, no deixen de ser diferències, i per petites que siguin, alguna conseqüència tindrà en una de les poblacions, ja sigui positiva o negativa, en la regulació de l'expressió gènica, concretament dels transposons.