

USO DE MARCADORES MOLECULARES EN EL ANÁLISIS CROMOSÓMICO DE LA HETEROCROMATINA Y DE SUS IMPLICACIONES EVOLUTIVAS EN INSECTOS COLEÓPTEROS

E. Petitpierre

Lab. Genética, Dep. Biología Ambiental, UIB

La existencia de una fracción de la cromatina que permanece condensada durante todo el ciclo celular, muestra replicación tardía de su ADN y es completa o casi completamente inactiva en la transcripción, se conoce desde hace ya muchos años y ha sido objeto de múltiples estudios. Esta fracción cromatínica, llamada heterocromatina, es fácilmente observable en la profase y la interfase del ciclo celular por su heteropicnosis, es decir su tinción diferencial respecto a la fracción restante de cromatina o eucromatina. Los datos experimentales obtenidos en gran número de organismos demuestran que la heteropicnosis afecta a segmentos de la mayoría de los cromosomas o, incluso, a cromosomas enteros. Se distinguen dos tipos de heterocromatina: a) la heterocromatina constitutiva, de presencia constante en todo tipo de células, y b) la heterocromatina facultativa, variable según los tipos celulares y los estadios del desarrollo, y que por tanto no es permanente como la anterior. De estos dos tipos de heterocromatina nos vamos a centrar en el primero, que corresponde a la heterocromatina propiamente dicha, de acuerdo con la mayoría de los autores.

Las regiones heterocromáticas se suelen localizar en la vecindad del centrómero (regiones pericéntricas o procéntricas), en las partes distales de los cromosomas y, menos frecuentemente, en las intersticiales. El bandeo C y los bandeos con fluorocromos, como DAPI y cromomicina A₃, detectan las regiones y los cromosomas heterocromáticos de manera relativamente sencilla, y por lo que se refiere a los fluorocromos, aportan además datos acerca de su posible heterogeneidad molecular, en cuanto a su riqueza en bases de AT o GC.

La composición molecular de la heterocromatina constitutiva es ADN satélite en su mayor parte, una clase de ADN altamente repetitivo dispuesto en tandem, con un grado de redundancia entre 10^4 y $>10^6$ copias por genoma y, a menudo, con fuertes diferencias cuantitativas aún entre especies estrechamente emparentadas. Se conocen diversos métodos para separar ADN satélite del total

del ADN genómico, el mas sencillo y mas frecuentemente utilizado es el de digerir el ADN genómico con endonucleasas de restricción y realizar una electroforesis de los fragmentos resultantes de la acción hidrolítica ejercida por estas enzimas. Una vez aislados, los ADNs satélites pueden clonarse en bacterias para ser usados mas tarde, por ejemplo, como sondas en hibridaciones *in situ* y conocer su secuencia de nucleótidos.

Se han atribuido distintas funciones a la heterocromatina constitutiva y a su equivalente molecular, el ADN satélite, relacionadas principalmente con diversas características biológicas: 1) organización cromosómica (centrómeros y telómeros), 2) metabolismo celular, 3) apareamiento cromosómico, y 4) especiación y evolución. Aunque ninguna de estas funciones ha sido completamente probada, las relacionadas con la organización y el apareamiento cromosómico parecen ser bastante verosímiles porque estan apoyadas por datos empíricos.

Los coleópteros Tenebrionidae son un modelo excelente para el estudio de la heterocromatina constitutiva y el ADN satélite, como se ha demostrado por nuestros trabajos y los de otros autores publicados desde 1988. Mediante técnicas convencionales de tinción, Smith (1952a y 1952b) detectó bloques heterocromáticos pericéntricos muy conspicuos en paquitos de la meiosis, en todos los cromosomas del escarabajo molinero, *Tenebrio molitor*, y los escarabajos de la harina, *Tribolium confusum* y *T. castaneum*.

En *Tenebrio molitor*, aproximadamente la mitad del genoma corresponde a un ADN satélite rico en AT, cuyo monómero posee 142 pb y está muy conservado en su secuencia básica. La digestión *in situ* de los cromosomas de esta especie con *EcoRI*, extrae el ADN satélite de las regiones pericéntricas de todos los cromosomas, en cantidades semejantes a las detectadas mediante la separación electroforética de los fragmentos del ADN genómico, digeridos con esta misma endonucleasa de restricción. La hibridación *in situ* fluorescente (FISH) de este ADN satélite sobre los cromosomas de *Tenebrio molitor* confirma también estos resultados.

No obstante, los datos obtenidos en una especie congénica con la anterior, *Tenebrio obscurus*, no coinciden con aquellos, porque, en primer lugar, existen dos en vez de un solo ADN satélite, uno de 142 pb homólogo en un 80% de su secuencia al de *T. molitor*, y otro de 350 pb completamente distinto al precedente, y, en segundo lugar, la digestión *in situ* de los cromosomas de *T. obscurus* mediante endonucleasas de restricción que cortan y separan al ADN satélite del ADN genómico restante, no lo hacen *in situ* sobre la cromatina a diferencia de *T. molitor*, a menos que los cromosomas sean tratados previamente con proteinasa K. Por tanto, parece probable que la organización ultraestructural de la heterocromatina, por la configuración espacial propia del ADN satélite o por las interacciones entre ADN-proteínas de la heterocromatina, sea distinta en las dos especies de *Tenebrio*, a pesar de sus estrechas similitudes morfológicas.

Se han estudiado los ADNs satélites y, en algunas especies también la heterocromatina constitutiva, de otros coleópteros tenebrionidos, cuatro especies del género *Tribolium*, cinco del género *Pimelia*, y una especie de cada uno de los siguientes géneros: *Palorus*, *Latheticus*, *Alphitobius* y *Misolampus*. En conjunto,

se han reunido datos sobre los ADN_s satélites de 15 especies. Las cantidades de ADN satélite varían desde un 20% hasta más de un 50% del genoma. Cada especie tiene uno o, menos frecuentemente, dos ADN_s satélites propios y específicos, ricos en AT (>60% excepto en un caso), con una baja tasa de variación intraespecífica (<5%), y, en la mayoría, con estructuras secundarias y terciarias de orden superior, que determinan una menor movilidad electroforética en geles no desnaturizantes de poliacrilamida, relativa a la de las secuencias lineales. Si tenemos en cuenta el tamaño de los monómeros, estos ADN_s satélites pertenecen a dos grandes grupos, en uno de ellos, los monómeros o subunidades monoméricas son de 100-160 pb, y en el otro de aproximadamente 350 pb. El hecho de que todos ellos posean algún tipo de señal susceptible de ser reconocida por proteínas de la heterocromatina, como superhélice curvada, estructuras cruciformes, o grupos de A o de T, apunta hacia la posibilidad de usar estas señales como puntos de anclaje de proteínas, responsables de las propiedades específicas de la heterocromatina.

Los análisis de las secuencias de nucleótidos de varios clones en diversos ADN_s satélites, permiten reconocer los mecanismos implicados en su evolución. Las sustituciones nucleotídicas son mucho más abundantes que las inserciones o deleciones de nucleótidos, pero el origen de nuevas variantes puede haberse producido por diversas causas a la vez, entrecruzamiento desigual, deslizamiento de la replicación y conversión génica, como ocurre en *Alphitobius diaperinus*, o únicamente por entrecruzamiento desigual en el caso de *Tribolium madens* y *Misolampus goudoti*, o por conversión génica en el de *Tenebrio obscurus*.

Los experimentos de hibridación *in situ* fluorescente (FISH) en aquellas especies de tenebriónidos que presentan dos clases de ADN_s satélites, hacen posible determinar su localización cromosómica en regiones heterocromáticas específicas. Así, en *Misolampus goudoti*, las dos clases de ADN_s satélites, las familias *EcoRI* y *PstI*, se encuentran en las regiones pericéntricas de todos los cromosomas, pero además algunos cromosomas poseen heterocromatina subteloamérica, y en estas regiones aparece únicamente el ADN satélite *PstI*. En *Tenebrio obscurus*, donde también existen dos clases de ADN_s satélites, se observa una localización cromosómica parecida a la de *Misolampus goudoti*. Por tanto, se da una cierta compartimentalización de estos ADN_s satélites en regiones pericéntricas y subteloamericanas. Como tan solo algunos cromosomas manifiestan señales subteloamericanas de hibridación, a diferencia de las pericéntricas comunes a todos ellos, cabe pensar que la localización cromosómica subteloamericana de estos ADN_s satélites fue probablemente posterior y derivada de la pericéntrica.

A modo de resumen, en los coleópteros tenebriónidos, la heterocromatina constitutiva y los ADN_s satélites que la conforman, deben desempeñar, probablemente, un papel importante para la organización cromosómica y, quizás también, en la actividad centromérica y el apareamiento meiótico. Desde una perspectiva evolutiva, parece razonable suponer que cada especie de tenebriónido haya amplificado uno o dos tipos de secuencias de ADN_s satélites de manera aleatoria, a partir de una hipotética "biblioteca" ancestral de secuencias moderadamente repetitivas, siempre y cuando estas secuencias reunieran los requisitos necesarios para poder expresarse como heterocromatina,

en sus propiedades intrínsecas distintivas. Como cada especie suele poseer un ADN satélite peculiar y propio, las secuencias nucleotídicas no aportan ningún tipo de información susceptible de ser utilizada para establecer las relaciones filogenéticas entre especies de tenebriónidos, lo cual concuerda con los resultados obtenidos en otras especies de animales, aunque también se han descrito casos de ADNs satélites que se han conservado considerablemente a lo largo de una línea evolutiva.

REFERENCIAS

- Smith, S.G. *Chromosoma* 4: 585-610 (1952a).
Smith, S.G. *J. Morph.* 91: 325-364 (1952b).