

**Aproximació molecular a l'estudi dels primats:
Evolució dels gens *RPS4Y* i
aplicació d'SNPs en conservació**

Memòria presentada per
Olga Andrés Viñas

Per optar al grau de
Doctora

Barcelona, 4 d'abril del 2007

**Aproximació molecular a l'estudi dels primats:
Evolució dels gens *RPS4Y* i
aplicació d'SNPs en conservació**

Memòria presentada per
Olga Andrés Viñas

Per optar al grau de
Doctora

Tesi Doctoral realitzada sota la direcció de la Dra. Montserrat Bosch Gallego al Departament de Ciències Experimentals i de la Salut (Universitat Pompeu Fabra) i al laboratori de Genètica de la Conservació Animal (Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentàries) i sota la tutoria de la Dra. Carme Segarra Robert del Departament de Genètica (Universitat de Barcelona).

La directora

La tutora

L'autora

Dra. M. Bosch

Dra. C. Segarra

Olga Andrés

Barcelona, 4 d'abril del 2007

Als meus pares,
al David i la Carla,
al Jose,
pilars de la meva vida
que sempre em fan costat.

En memòria del Xavier,
de la meva abuelita,
de la meva àvia,
persones fonamentals que he anat
perdent al llarg d'aquest viatge.

La realització d'aquesta tesi no hagués estat possible sense el finançament de la Comissió Europea amb el projecte INPRIMAT (Ref. INPRIMAT QLRI-CT-2002-01325) i la beca predoctoral concedida pel Departament d'Universitats, Recerca i Societat de la Informació, Generalitat de Catalunya (Ref. 2003-FI-00787), que he gaudit durant quatre anys. D'altra banda, ha estat fonamental l'ajut de tots els col·laboradors que ens han proporcionat mostres i informació.

Aquesta tesi va ser iniciada sota la direcció del Dr. Xavier Domingo-Roura, qui malauradament morí l'any 2005. A partir de llavors la Dra. Montserrat Bosch Gallego ha exercit de directora de la meva tesi doctoral. El suport de tots dos directors ha estat essencial en el desenvolupament d'aquest treball.

AGRAÏMENTS

Ja m'havien advertit que l'apartat dels agraïments és especialment difícil d'escriure per la pressió de saber que aquestes són les pàgines més llegides de les tesis i per la por a deixar-se algú. Tots sabeu que tinc molt mala memòria i, tot i que espero no oblidar ningú, demano disculpes ara per si he comès algun descuit involuntari. Un cop feta aquesta petita introducció per trencar el gel, ja puc començar.

I he de començar, com no, agraint molt, moltíssim, el suport incondicional de la meva família, una família meravellosa que no canviaria per res del món i que, sense entendre ni un borrall del que feia, sempre m'ha fet costat i ha suportat els meus alt i baixos, tan comuns durant la realització d'una tesi. Tinc uns pares que no em mereixo, que han fet possible que hagi arribat fins aquí i que sempre han cregut en mi. I uns germans *estupendos*, el David i la Carla, que rient del "lab", la "uni" i els "ximpas" han aportat sempre l'alegria que a vegades falta durant aquesta etapa. I una àvia guapíssima que durant l'escriptura de la tesi m'ha pujat els ànims amb els seus plats cada dijous al migdia, i que ara fa poc ens ha deixat. I tota la resta de l'enorme família que tinc la sort de tenir i que, qui més qui menys, ha anat seguint la meva aventura de prop. GRÀCIES!

El cuquet per la ciència i el món de la recerca ja se'm va despertar a l'escola, gràcies al meu professor de biologia, en Josep Marlès, i a les tincions d'arrels de ceba que fèiem per observar mitosis, i es va anar fent gros durant els anys de carrera, amb la col·laboració al grup del Miquel Llobera i les pràctiques al grup de l'Hervé Tricoire, experiències que em van començar a ensenyar com és el món de la ciència, què s'hi pot fer i de quines maneres. El viatge pel món de la investigació va seguir amb l'oportunitat que em va oferir el Xavier Domingo per fer la tesi sobre genètica de primats. El Xavier era capaç de contagiar el seu entusiasme a qualsevol, així que sense pensar-ho ni dues vegades ja em trobava embarcada en aquesta aventura. Gràcies a tots per mostrar-me que una part essencial de la recerca està en la passió per allò que fas.

Quan vaig arribar a la UPF, també coneguda com a Pompeu, de seguida em vaig sentir com a casa, tot i haver aterrat en un petit grup dins d'un gran grup i formar part de "los otros". He d'agrair el bon acolliment i totes les ensenyances rebudes per part dels doctorands amb experiència: l'Aida, el Jordi, l'Stephie, l'Òscar, la Marta; per part dels sèniors del laboratori: el David, l'Ana G, l'Elena, el Carles, el Francesc i l'Arcadi; i per part dels serveis genòmics: l'Anna Pérez i el Roger. I res hauria estat igual sense la Mònix i el seu *salero*. Quan jo vaig arribar de *novata*, no ho vaig fer sola, la Lourdes, el Tomàs i la Michelle

m'acompanyaven, junts vam patir els cursos de doctorat, la burocràcia i les *novatades* inicials i junts hem anat passant per totes les etapes de l'evolució d'una tesi (amb la Glòria, l'Ester i el Damià, *pringadillos* com nosaltres d'altres grups). A més, al llarg de la meva tesi es van anar incorporant nous fitxatges al grup que han anat donant nous aires: la Gemma, l'Anna petita, l'Anna R, l'Andrés, l'Elodie i la Carla, a més dels visitants que han passat algunes temporades, com la Chiara, el Ville i el Thomas.

Després de la temporada a la UPF, el grup de Genètica de la Conservació ens vam traslladar a l'IRTA, on hem estat molt ben acceptats (després de cert escepticisme i recel inicials i de preguntar-nos "on estan les gàbies de les mones?"). A la caseta 1 hem passat bons moments amb l'Ibo, la Mireia, la Iria, l'Eduard, el Roger, l'Ali, etc. (és que van creixent tant!) i les visites del Mourad i l'Àngel. Durant els dinars al menjador sempre s'aprenen coses interessants i s'expliquen històries curioses, com la de la boa *tíesa* o els tipus de pinyol de préssec; gràcies a tots per aquests instants. Gràcies també a la Carmen, la Conxita i l'Eva, que sempre ens han ajudat amb els temes burocràtics, institucionals i de bon funcionament del centre.

El grup de Genètica de la Conservació sempre ha estat un grup petitet però amb ganes d'anar endavant i sempre recordaré amb alegria els moments passats junts. El Josep (o Marmota) i la seva passió pels dinosaures i el dibuix; el Francesc (o l'ídol, segons ell) i les seves ganes de xinxar i de fer programets informàtics; l'Aïnhua (o Lludri), que m'ha ensenyat a distingir caques de llúdriga i a fer sudokus; el Bruno, l'organitzador de trobades i cercador de solucions a tots els problemes; la Roby (o Petarda Sarda), que és una font d'energia i humor italià; la Yolanda (o la MamaJuana), sempre disposada a ajudar i a apuntar-se a un *bombardeo*; i la Irene, recent incorporació, que arriba amb les piles ben carregades d'energia positiva. Gràcies a tots pel bon rollo, el companyerisme i l'amistat, pel munt de coses que m'heu ensenyat (amb més o menys paciència!) i per haver-me aguantat tot aquest temps. A més, he d'agrair moltíssimes coses a la Montse, que ha passat de ser una postdoc a ser directora de la meva tesi sense adonar-se'n, que ha hagut de patir el procés d'escriptura d'aquesta memòria i dels articles sense queixar-se i que m'ha ajudat moltíssim, tot i que la situació no era fàcil per a ningú; moltes gràcies, Montsina!

La meva tesi s'ha emmarcat en el projecte europeu INPRIMAT. He d'agrair a tots els *partners* la seva col·laboració, les seves ensenyances, el bon ambient i els bons sopars durant les reunions. Gràcies Mike, Amy, Brigitte, Maxime, Gaby, Ernst, Mariano, Mario,

Hans, i, especialment, Ann-Christine i Lotta, per haver-me acollit durant tres estius al laboratori d'Uppsala. Durant aquestes estades a Uppsala he estat molt a gust al laboratori (gràcies Lotta, Annika, Sneavar, Andreas, Lovisa, Ulrika, etc.) i a la ciutat (gràcies JuanRa, Marina, Omar, Kerstin, etc.). Espero tornar-hi un cap de setmana d'hivern per retrobar la gent i per veure la ciutat coberta de neu!

En l'última etapa també ha estat fonamental el suport de la Carmen Segarra, que m'ha fet de tutora a la UB i m'ha ajudat en l'elaboració de la memòria i en els tràmits burocràtics; moltes gràcies!

I, com no, he d'agrair l'amistat, el suport, la comprensió, la complicitat i un munt de coses més als meus amics de la *uni*, molts en la mateixa situació que jo, amb qui he compartit penes i alegries tots aquests anys. Gràcies a les nenes, per acollir-me a casa vostra de tant en tant, per l'intent dels Dijous Artístics i per ser meravelloses; gràcies, Antònia, per ser tan a prop tot i que ja hagis tornat a la teva terra; gràcies, Neus, per entendre'm tan bé; gràcies, Anna, per haver estat la primera i ensenyar-nos com es fa una tesi. Gràcies a la Gemma, per haver permès redescobrir-nos. Gràcies a l'Enric, que, tot i ser un carallot, sempre hi és. Gràcies a la Núria i l'Albert, amb qui vaig començar l'aventura de la ciència. Gràcies a la Esti pels acudits i a la Noelia pels riures. I gràcies al Xavi, a l'Àfrica i a la Fina i al Mario, que tot i veure'ns poc sempre ens retrobem amb *carinyo*.

Finalment, vull donar les gràcies al Jose. No sé si al leer los agradecimientos ya pensabas que me había olvidado de ti. No. Te he dejado para el final porque lo bueno se hace esperar, ¿no? Y es que sin ti quizás ya habría abandonado este barco hace tiempo. Gracias por estar siempre a mi lado, a pesar de mi mal humor (puntual) y de mi histerismo (momentáneo). Gracias por las cosquillas, por las risas, por saber cambiar la tristeza por alegría en un momento. Gracias por ser como eres y elegir estar a mi lado. Juntos hemos pasado por muchas cosas y sobrevivir a mi tesis y a tus oposiciones ha sido... interesante, ¿verdad?

ÍNDEX

PRESENTACIÓ	13
INTRODUCCIÓ	17
1. Primats	19
1.1. Descripció general	19
1.2. Hàbitat i distribució al planeta	20
1.3. Taxonomia i Filogènia	21
1.4. Estat de conservació	24
1.5. Protecció de les espècies	26
1.6. Ximpanzés	28
1.6.1. Taxonomia i distribució geogràfica	28
1.6.2. Morfologia, reproducció i alimentació	29
1.6.3. Estructura social i comportament	30
1.6.4. Estat de conservació	32
2. Genètica de la conservació	33
2.1. La conservació de les espècies	33
2.2. Genètica de la conservació	34
2.3. Mostreig no invasiu	38
2.4. El genoma eucariota	41
2.4.1. El DNA mitocondrial	41
2.4.2. El DNA nuclear	41
2.4.3. Marcadors moleculars	42
2.4.4. Tècniques de genotipatge	44
• Comparació entre marcadors	48
2.5. SNPs	49
2.5.1. Descobriment d'SNPs	50
• DHPLC	51
2.5.2. Genotipatge d'SNPs	53
• <i>Microarray</i> de miniseqüència	53
3. Duplicació i evolució dels genomes	56
3.1. Evolució: conceptes i mecanismes	56
3.2. Evolució per duplicació	58

• Generació de gens duplicats	59
3.3. Destí dels gens duplicats	61
3.4. Forces evolutives rere la divergència funcional dels gens duplicats	65
3.5. Detecció de selecció positiva	66
• PAML	68
4. Cromosoma Y	69
4.1. Cromosomes sexuals en mamífers: Origen i evolució	69
4.2. Cromosomes Y en primats: Evolució	74
4.3. Inactivació del cromosoma X – Deteriorament del cromosoma Y	76
4.4. Malalties associades a cromosoma Y	78
4.5. Variabilitat i marcadors de DNA al cromosoma Y	79
<u>OBJECTIUS</u>	83
<u>RESULTATS</u>	87
Capítol 1: <i>Sequence quality is maintained after multiple displacement amplification of non-invasively obtained macaque semen DNA</i>	84
Capítol 2: <i>A microarray system for Y-chromosomal and mitochondrial SNP analysis in chimpanzee populations</i>	95
Capítol 3: <i>Molecular evolution of primate RPS4Y gene family</i>	115
<u>RESUM GLOBAL</u>	137
1. Potenciar el mostreig no invasiu	139
2. Cromosoma Y com a font d'informació	141
3. Marcadors: SNPs versus Microsatèl·lits	143
4. Marcadors i genotipatge del futur (en genètica de la conservació)	147
5. Evolució del cromosoma Y. Efecte de la selecció sexual	153
6. Destí del cromosoma Y	161
7. Genètica de la conservació i conservació de les espècies. Futur	166
<u>CONCLUSIONS</u>	171
<u>REFERÈNCIES</u>	175

PRESENTACIÓ

De la fascinació que sempre m'ha produït la mirada penetrant i sàvia dels primats, de la consciència que és fonamental conservar la biodiversitat, de la curiositat vers el petit i extravagant cromosoma masculí dels vertebrats i de la seducció produïda per la genètica, de tot això, i de les casualitats de la vida, i del treball, il·lusió i suport constant de molta gent, ha sorgit la tesi que teniu a les vostres mans.

Així doncs, aquesta tesi vol ser una petita i modesta contribució a l'estudi dels primats, tant des d'un punt de vista del desenvolupament i aplicació d'eines moleculars per a la conservació de les espècies, com des del punt de vista evolutiu per conèixer millor aquests éssers.

Aquest manuscrit es divideix en cinc apartats principals. Comença amb una *Introducció* que pretén acostar el lector cap als primats i el porta a fer una immersió dins del món de la biologia molecular per captar el gran ventall de possibilitats que obre la genètica de la conservació, la importància de les duplicacions en l'evolució de les espècies i l'apassionant història del cromosoma Y.

A continuació s'estableixen els *Objectius* fonamentals d'aquesta tesi. Les fites principals són: determinar l'aplicabilitat de la tècnica de l'MDA sobre mostres no invasives, contribuir a desenvolupar un *microarray* de miniseqüència per a l'estudi dels primats i desemascarar la història evolutiva de la família gènica *RPS4Y* en primats.

El cos principal de la tesi està format pels tres capítols que constitueixen l'apartat dels *Resultats* i on es mostren els fruits dels nostres esforços. En el primer treball, publicat a *Biotechnology Journal*, es vol provar la possibilitat d'utilitzar la tècnica de l'MDA d'amplificació de genomes complets sobre mostres recollides de manera no invasiva i que els productes amplificats obtinguts siguin aptes per realitzar estudis genètics. El segon treball, enviat a *Molecular Ecology*, pretén demostrar l'aplicabilitat de la tecnologia àmpliament utilitzada per a l'estudi dels humans a l'estudi d'altres espècies i contribuir així a la seva conservació i per això s'ha desenvolupat un *microarray* de miniseqüència que permet genotipar simultàniament SNPs de cromosoma Y i de DNA mitocondrial per analitzar alhora els llinatges patern i matern dels ximpanzés. En l'últim treball, enviat a la revista *Molecular Biology and Evolution*,

s'exposen els resultats de l'estudi de l'evolució en primats dels gens *RPS4* lligats a cromosoma Y, tant de la primera còpia, suposadament present a tots els primats, com de la segona, de la que gairebé no hi havia informació prèvia.

Finalment, els resultats obtinguts durant el desenvolupament d'aquesta tesi es discuteixen d'una manera general dins l'apartat del *Resum global*. La memòria acaba amb les *Conclusions* més rellevants a què s'ha pogut arribar, exposades de manera específica i resumida.

Espero que gaudiu de la lectura, almenys tant com jo he gaudit de l'aventura.