



ROSANE NUNES GARCIA

**VARIABILIDADE GENÉTICA E ECOLÓGICA DE *Drosophila willistoni*
(DIPTERA, DROSOPHILIDAE): UMA BORDAGEM MOLECULAR ATRAVÉS
DO ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE FRAGMENTOS
HETEROGÊNEOS DE DNA.**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal do Instituto de Biociências da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito à obtenção do título de Doutor em Biologia Animal.

Área de Concentração: Insetos.

Orientadora: Prof^a Dra Vera Lúcia S. Valente Gaiesky

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
PORTO ALEGRE**

2004



ROSANE NUNES GARCIA

**VARIABILIDADE GENÉTICA E ECOLÓGICA DE *Drosophila willistoni*
(DIPTERA, DROSOPHILIDAE): UMA BORDAGEM MOLECULAR ATRAVÉS
DO ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE FRAGMENTOS
HETEROGÊNEOS DE DNA.**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal do Instituto de Biociências da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito à obtenção do título de Doutor em Biologia Animal.

Área de Concentração: Insetos.

Orientadora: Prof^a Dra Vera Lúcia S. Valente Gaiesky

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
PORTO ALEGRE**

2004

Dedico este trabalho à minha família, em especial
minha mãe e meu esposo, pois sem eles nada seria
possível.

“O universo é a condensação do amor de Deus
e somente através do amor poderá ser sentido
enquanto pela inteligência será compreendido.”

Joanna de Ângelis

AGRADECIMENTOS

À Dra. Vera pela sua acolhida, quando cheguei faz algum tempo no laboratório com a idéia maluca de ver cromossomos de carrapatos. Ali foi o início de tudo! Muito obrigado! O resto é sem palavras...

Ao Dr. Elgion Loreto pelos sábios conselhos e críticas, que muito contribuíram para orientação do nosso trabalho.

À minha família, em especial à minha mãe, companheira das horas difíceis e que cuidou de meus filhos com todo amor nas minhas ausências.

Ao meu esposo por todo o seu apoio e compreensão.

À Juju.....sem palavras muuuuito obrigado! Se eu fosse listar tudo que te devo, o espaço desta Tese seria insuficiente.

À todos os meus amigos do coração: Clau, Ilsete, Nezir, Tina, Mar, vó Ilsa. Obrigado pelas vibrações de amor.

Ao meu grande sobrinho Chapa: obrigado pelo computador, hein?

Ao pessoal do Lab: desculpem a Tia Velha. Vocês todos moram no meu coração. Um agradecimento especial para a Mari, companheira do "Vamos fazer

mais um Southernzinho?”, para a Adri (eu odeio referência.....), pro Fabrício, pela disponibilidade, pra Clau pelo apoio nas “cito difíceis”, para Aninha (valeu a capa!). Obrigado também para o Marco, Mônica “Maria” por ouvirem as minhas divagações. Norma, Maríndia, que acolheu a Yanina, Ronaldo, enfim, todos. Aos agregados, especialmente o Andres pelo apoio nos “Southern difíceis” e o Léo pelas dicas na clonagem.

À minha amigona do coração, Fabi, pelo apoio e críticas que amadureceram o trabalho. Boa hora de vir da França, hein?

Ao pessoal do apoio técnico pelos quatro anos nos dando suporte para mantermos nossos estoque de moscas.

Ao programa de Pós-Graduação em Biologia Animal por acreditar no potencial do nosso Projeto.

Ao Dr. Henrique do Laboratório de Cestódeos, Centro de Biotecnologia, UFRGS e todo o seu pessoal, pela orientação correta para realizar as minhas clonagens.

À Dra. Nance do Laboratório de Imunogenética, Departamento de Genética, UFRGS pela sua disponibilidade.

À Dra. Karen Haag pela ajuda na análise das minhas seqüências.

Ao Elmo por todo apoio técnico.

À Dra Yanina Panzera da Universidad de la República del Uruguay pelas discussões tão esclarecedoras e pelos ensinamentos sobre a técnica de FISH.

Ao prof. Casemiro e a Sônia: foi lá que tudo começou...carrapateando!

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo suporte financeiro através da Bolsa de Doutorado.

Às agências que financiaram os recursos: FAPERGS, FINEP, PROPESQ-UFRGS.

À Deus, este é sem palavras....

SUMÁRIO

Resumo.....	2
Summary	4
Capítulo 1 – INTRODUÇÃO	
1.1. Revisão e Justificativa.....	6
1.2. Objetivos.....	46
1.3. Referências bibliográficas.....	47
Capítulo 2	
Análise de bandas sexo-específicas do genoma de <i>Drosophila willistoni</i> geradas pela clivagem com <i>AluI</i> e <i>HaellI</i>	65
Capítulo 3	
Algumas evidências de metilação no genoma de <i>Drosophila willistoni</i> . ..	122
Capítulo 4	
Investigation of the presence of <i>TART</i> retroelement in some <i>Drosophila</i> species by <i>Southern blot</i>	143
Capítulo 5	
5. 1. Discussão, conclusões e perspectivas	151
5. 2. Referências bibliográficas.....	160
Apêndices	
I. Normas das Revistas	
<i>Drosophila</i> Information Service	163
Genética.....	165

RESUMO

O grupo *willistoni* de *Drosophila* é o grupo de espécies mais bem representado nas comunidades neotropicais de insetos da família Drosophilidae. Ele é constituído por 6 espécies crípticas e por 19 não crípticas e a este grupo de espécies é atribuída origem no Brasil Central, em associação com habitats de florestas quentes e úmidas.

Drosophila willistoni, tida como a remanescente do ancestral comum, chama particularmente a atenção dentro do grupo, por possuir uma grande "versatilidade ecológica" diversas vezes comprovada, o que se expressa pela capacidade de exploração bem sucedida de diversos tipos de ambientes, tais como matas, formações abertas, cidades, bem como de diferentes tipos de substratos alimentares e de criação. Sua distribuição geográfica vai desde o sul dos Estados Unidos (Flórida) e México na América do Norte, até o norte da Argentina na América do Sul. Além desta versatilidade ecológica, e talvez subjacente a ela, *D. willistoni* apresenta uma grande variabilidade genética expressa através de diferentes marcadores genéticos já estudados, tais como polimorfismo cromossômico para inversões paracêntricas e polimorfismo enzimático.

Tendo em vista este panorama, o presente trabalho teve como objetivo amplo fazer uma busca no genoma de *D. willistoni*, no sentido de encontrar alguma indicação para explicar esta variabilidade genética e versatilidade ecológica em nível de DNA repetitivo.

A primeira tentativa que realizamos de isolar e caracterizar este tipo de DNA em *D. willistoni* está descrita no capítulo 4, onde verificamos que as seqüências que compõe os telômeros desta espécie são muito divergentes do modelo *D. melanogaster*.

Partimos, então, para o passo seguinte da investigação descrito no capítulo 2, que seria isolar seqüências repetitivas do genoma de *D. willistoni*. Nossos resultados iniciais demonstraram a existência de um padrão sexo-específico na clivagem do DNA genômico de machos e fêmeas com as enzimas de restrição *AluI* e *HaellI*. À medida que foi sendo investigado este padrão, levou-

nos à descrição de um fenômeno biológico tido como inexistente no genoma de *D. melanogaster*: a metilação.

Isolamos e seqüenciamos parcialmente 44 clones que consideramos ser segmentos do genoma de *D. willistoni* que estão envolvidos neste processo de metilação, sendo que identificamos entre estas o gene ribossomal 18S.

No capítulo 3 aprofundamos estas investigações referentes à metilação e concluímos que no genoma de *D. willistoni* ocorrem compartimentos metilados, tais como ocorre em Molusca, Cnidários e outros animais e um destes compartimentos corresponde à uma parte dos genes ribossomais.

A partir destes resultados nosso trabalho propõe uma mudança num conceito estabelecido no Gênero *Drosophila* sobre metilação. Nós estamos demonstrando que este mecanismo epigenético de controle da expressão gênica existe no genoma de *D. willistoni* e que, portanto, ela estaria fazendo parte do grupo de organismos que tem o seu DNA fracionalmente metilado.

ABSTRACT

The *Drosophila willistoni* species group is the most abundant in Neotropical assemblies. It is native from Central Brazil and is constituted by 6 sibling and 19 non-sibling species, living in association with hot and humid forests. In this group, *Drosophila willistoni* call special attention because it have a recognized great "ecological versatility", expressed by the ability to explore several types of environments, as forests, open formations, cities and to breed in several types of substrates. Its geographical distribution comprehends since Florida, in the South of United States of America and Mexico, until the North of Argentina, in South America. Besides this ecological versatility, *D. willistoni* also presents an ample genetic variability detected by several genetic markers, exemplified by the chromosomal polymorphism for paracentric inversions and the enzymatic polymorphism.

Considering this scenario, the present study have the main objective to make a molecular screening in the genome of *D. willistoni*, trying to found some clue that could explain such genetic and ecological variability at the level of repetitive DNA.

The results of our first attempt to isolate and to characterize this type of DNA in *D. willistoni* are described in Chapter 4, where we verify that the telomeric sequences of this species are very divergent of those occurring in the model-species *D. melanogaster*.

The next step of our investigation was to isolate repetitive sequences of the *D. willistoni*'s genome. This attempt is described in Chapter 2 and our results showed sex-specific patterns of cleavage of genomic DNA of males and females with the restriction enzymes *AluI* e *HaellI*. These results demonstrated by the first time, the existence of a phenomenon not found in *D. melanogaster*: the metylation in the genome of *D. willistoni*.

Isolating and partially sequencing 44 clones considered by us as segments of the genome of *D willistoni* involved in the mechanism of methylation, we found the 18S ribosomal gene among them. In Chapter 3, we continued the investigations about methylation in the genome of *D. willistoni* and concluded that in this species, as occurs in the genomes of other animals, as Mollusca and

Cnidaria, exists methylated compartments, and that one of these compartments, correspond to part of the ribosomal genes.

Considering all our findings, we propose a change in the previously established concept about lack of methylation in the Genus *Drosophila*. We demonstrated that this epigenetic mechanism of control of gene expression exists in the genome of *D. willistoni*, and so, this species needs to be considered as member of the group of organisms which have its DNA fractionally methylated.

CAPÍTULO 1
INTRODUÇÃO

1. 1. Revisão e Justificativa

O Gênero *Drosophila*.

O gênero *Drosophila* Fallén faz parte da ordem Diptera, Sub Ordem Cyclorrhapha (considerados os dípteros mais avançados), Divisão Schizophora e Seção Acalyptratae. Quinze sub gêneros são conhecidos em *Drosophila*, além de 133 espécies de afinidade incerta. Entre os sub gêneros, o *Drosophila* e o *Sophophora* são os mais numerosos, contendo respectivamente 788 e 249 espécies, até Wheeler (1981).

O gênero *Drosophila* é o maior, o mais diverso e mais amplamente distribuído. Seus membros são encontrados desde o nível do mar até altitudes maiores e dos trópicos até próximo à Tundra. Planícies, desertos, pântanos e savanas também são habitados por drosofilídeos, mas florestas e matas são os habitats onde ocorrem maior abundância de espécies (Throckmorton, 1975).

Nos diferentes ecossistemas, as espécies de *Drosophila* são importantes nas cadeias de alimentação saprofítica, porque durante os estágios imaturos são dependentes dos organismos fermentadores ou decompositores (leveduras e fungos). A exploração eficiente destes nichos de alimentação pode ser a causa do sucesso do gênero e do padrão de ampla distribuição geográfica (Throckmorton, 1975).

Diversos trabalhos de levantamento de assembléias de drosofilídeos apontam para esta diversidade. De Toni & Hofmann (1995), fazendo um levantamento taxonômico preliminar do gênero *Drosophila* no Morro da Lagoa da Conceição (Ilha de Santa Catarina) durante período de um ano, fizeram o registro da ocorrência de 27 espécies, sendo que *Drosophila willistoni* foi a mais abundante. Esta região possui Mata Atlântica com ambiente sombrio e úmido e está a uma altitude de aproximadamente 300m do nível do mar.

Ampliando este estudo, De Toni (2002), avaliou seis comunidades insulares e duas continentais em visitas estacionais ao longo de dois anos no Estado de Santa Catarina. Estes pontos de coletas também eram de Mata Atlântica e revelaram um alto grau de riqueza das comunidades de drosofilídeos. De 40 a 50 espécies foram registradas em cada ponto, sendo

que o subgrupo *willistoni* apresentou alto grau de dominância em alguns locais.

Porém, a abundância de espécies de drosofilídeos não se restringe a ambientes de mata. Recentemente, Gottschalk (2004), realizou um levantamento taxonômico de espécies de drosofilídeos em áreas de Mata Atlântica e urbanas da Ilha de Florianópolis, Santa Catarina e verificaram a ocorrência de 100 espécies nestes ambientes. Tanto os pontos de coletas urbanizados como os de mata apresentavam um grande número de espécies, mudando somente os grupos dominantes. Em ambientes de mata, as espécies do subgrupo *willistoni* (*D. willistoni* e *D. paulistorum*) estavam presentes em maior número e nas regiões urbanizadas, duas espécies do grupo *melanogaster* (*D. malerkottiana* e *D. simulans*) foram as mais abundantes. Anteriormente, estudos de Dobzhansky & Pavan (1950), realizados em diferentes regiões do Brasil, já haviam apontado as espécies do subgrupo *willistoni* como dominantes nas assembléias de drosofilídeos neotropicais.

A espécie *Drosophila willistoni*

O grupo *willistoni*, o grupo de espécies mais bem representado nas comunidades neotropicais, é constituído por 6 espécies crípticas e por 19 não crípticas (Val et al., 1981). As espécies crípticas são *D. willistoni*, *D. paulistorum* (que apresenta várias raças ou semi-espécies), *D. tropicalis*, *D. equinoxialis*, *D. insularis*, e *D. pavlovskiana*. A este grupo de espécies é atribuída origem no Brasil Central (Da Cunha et al., 1950) em associação com as florestas quentes e úmidas daquela região.

Drosophila willistoni chama particularmente a atenção dentro do grupo, por possuir uma grande "versatilidade ecológica" diversas vezes comprovada, o que se expressa pela capacidade de exploração bem sucedida de diversos tipos de ambientes, tais como matas, formações abertas (Da Cunha et al., 1950, 1959; Da Cunha & Dobzhansky 1954; Dobzhansky & Powell, 1975), e cidades (Valente et al., 1989; 1993; Santos & Valente 1990; Valiati & Valente 1997; Goñi et al., 1997, 1998), bem como de diferentes tipos de substratos (Carson 1965; Valente & Araújo 1986). Sua distribuição geográfica vai desde o

sul dos Estados Unidos (Flórida) e México na América do Norte, até o norte da Argentina (Spassky et al., 1971).

Além desta versatilidade ecológica, *D. willistoni* apresenta uma grande variabilidade genética expressa através de diferentes marcadores genéticos, tais como polimorfismo cromossômico para inversões paracêntricas e polimorfismo enzimático. Cerca de 42 inversões heterozigotas foram inicialmente descritas em populações naturais (Burla et al., 1949). Em algumas espécies de *Drosophila*, tais como *D. pseudoobscura*, *D. persimilis* e *D. nebulosa*, as inversões são concentradas em um único cromossomo ou uma boa parte e até o cromossomo inteiro são livres de inversão. As inversões de *D. willistoni*, no entanto, são distribuídas em todos os cinco braços dos cromossomos politênicos, sendo que nenhum deles está livre de inversões (Da Cunha et al., 1950). Quanto ao seu polimorfismo enzimático, já foi descrito que em *D. willistoni* 28 locos são em média 58% polimórficos nas populações desta espécie (Ayala & Powell, 1972).

Recentemente, Rohde (2000) verificou em várias populações recém coletadas de *D. willistoni* um alto grau de polimorfismo cromossômico, registrando a ocorrência de 29 inversões autossômicas e 12 arranjos diferentes nos dois braços politênicos do cromossomo X. Descreveu também, pela primeira vez, a ocorrência de uma inversão pericêntrica em populações naturais de Santa Catarina. Uma grande variabilidade nos tipos de inversões é observada nas populações do centro do Brasil, enquanto que nas regiões geográficas periféricas esta variabilidade se reduz (Rohde, 2000).

Polimorfismo de inversões cromossômicas em *Drosophila* e outros insetos é uma importante fonte de variabilidade genética comprovadamente adaptativa (revisão em Krimbas & Powell, 1992; Cordeiro & Winge, 1995). Por exemplo, em populações urbanas de *D. willistoni* da cidade de Porto Alegre foi detectado polimorfismo cromossômico relacionado a variações ambientais. Este polimorfismo se reduz proporcionalmente ao grau de urbanização na cidade e as freqüências das inversões do cromossomo IIR mudam mais que no cromossomo IIR e III, os quais são relativamente insensíveis a mudanças ambientais (Valente et al., 1993). Também conforme o substrato em que as

larvas se desenvolvem, ocorrem diferenças seletivas com relação a determinadas inversões (Birch & Battaglia, 1956; Valente & Araújo, 1985).

Populações de muitas espécies de *Drosophila* carregam variações estruturais nos cromossomos devido à ocorrência de inversões de blocos de genes (Da Cunha et al., 1950). Com o evento do seqüenciamento completo do genoma de *D. melanogaster* (Adams et al., 2000) foi possível verificar que alguns genes importantes deste organismo agrupam-se em blocos semelhantes ao sistema de operons nas bactérias. Isto facilitaria a expressão dos genes e sua regulação (Lee & Sonnhammer, 2003). Certamente todos estes fatores estão encadeados e devem ser a resposta para a importância do polimorfismo cromossômico, tanto em *D. willistoni* como nas demais espécies de *Drosophila*.

Torna-se relevante, portanto, investigar as questões relacionadas a grande variabilidade genética e à versatilidade ecológica de *D. willistoni* na tentativa de explicar o quanto o primeiro atributo influencia o segundo. O problema pode ser equacionado como: o que exatamente existe no genoma desta espécie que a torna diferente das demais do grupo?

Nesta procura, uma abordagem passou a ser a de caracterizar o papel de elementos genéticos móveis, elementos transponíveis ou transposons, na geração de variabilidade genética (essencialmente a cromossômica) nesta espécie. Os elementos transponíveis (TEs) são elementos genéticos capazes de moverem-se de forma autônoma no genoma dos organismos (Berg & Singer, 1992). Foram primeiro caracterizados por Barbara McClintock em 1940 a partir de estudos genéticos no milho e hoje sabe-se que estão amplamente distribuídos em vários organismos, sendo uma grande fonte de variabilidade genética. O papel dos elementos transponíveis no rearranjo de seqüências genômicas, por exemplo, tem sido bem documentado em vários estudos e relações foram estabelecidas entre pontos de quebra para inversões cromossômicas em *Drosophila* e a presença de elementos transponíveis neste local (Lim, 1988; Tsubota et al., 1989; Cáceres et al., 1999; Cáceres et al., 2001).

Um dos primeiros esforços na investigação de elementos transponíveis no genoma de *D. willistoni* foi realizado por Regner et al. (1996), que através da avaliação da presença de elemento transponível *P* no genoma desta espécie,

verificaram que existia uma associação de vários sítios de inserção do elemento com pontos de quebra de inversão nos braços cromossômicos.

A partir desta investigação, outros trabalhos de análise molecular e citogenética foram realizados (Bonorino et al., 1993a; Rohde et al., 1994; Bonorino et al., 1993b) abrindo um novo campo para a pesquisa de *D. willistoni*, sempre visando uma melhor compreensão dos diversos aspectos particulares desta espécie.

Explorando a estrutura dos cromossomos politênicos de *D. willistoni* através de técnicas de bandeamento com as enzimas de restrição *AluI* e *HaeIII* e com fluorocromos DAPI e Cromomicina A3, Garcia (1997), verificou que estavam presentes várias regiões de DNA repetitivo em regiões eucromáticas, sendo que muitas destas regiões coincidiam com regiões de quebra de inversão e pontos de inserção de elementos transponíveis, conforme Regner et al. (1996).

Estes resultados abriram mais uma perspectiva de investigação do genoma de *D. willistoni*, pois levaram ao questionamento sobre a natureza molecular de certas regiões cromossômicas. É sabido que o estudo de repetições no genoma, tais como elementos transponíveis, DNA satélite, DNA microsátelite e agrupamentos de genes repetidos do tipo rDNA, são de extrema importância para abordagens desde evolutivas, até regulação da expressão gênica. Torna-se, portanto, interessante revisarmos alguns aspectos relevantes relacionados à heterocromatina e DNAs repetitivos, principalmente em insetos.

Heterocromatina: alguns conceitos gerais e estudos citogenéticos.

Heterocromatina é, talvez, um dos componentes mais polêmicos do genoma dos eucariotos. Depois de ser chamada de "lixo" por muito tempo e de não lhe ser atribuída nenhuma função importante, passou nos últimos anos a ser um dos temas mais intrigantes e investigados sob os aspectos citológico, genético e também molecular. O organismo modelo no qual encontramos uma boa parcela destas pesquisas é sem dúvida, *Drosophila melanogaster*, mas muitos outros eucariotos também vem sendo bastante estudados. Características da heterocromatina, por exemplo, já são bem conhecidas em

leveduras (Partridge et al., 2000), em gafanhotos (John & King, 1983), peixes (Fujiwara et al., 1998) e diversos mamíferos (Singer, 1982; Verma et al., 1986). Nestes grupos, extensas pesquisas na área de citogenética, utilizando técnicas de bandeamento, analisam posição e composição de blocos heterocromáticos a fim de avaliar os caminhos e as conseqüências que os arranjos da heterocromatina nos cromossomos podem gerar ao longo da evolução das espécies.

Para entendermos melhor o que é **heterocromatina**, é importante também definirmos o que é **euromatina**. Entende-se por euromatina o DNA que permanece descondensado durante a interfase e condensado durante a mitose e meiose, com um máximo de condensação na metáfase. É na euromatina que está a maioria do DNA codificante (Zhimulev, 1998).

Quanto à **heterocromatina**, é importante chamar a atenção para como a sua conceituação foi se modificando ao longo do tempo, passando de uma definição puramente citológica para uma compreensão sobre a sua constituição e funções ao nível molecular. A primeira descrição para estas regiões do DNA foi feita por Heitz (1928) (*apud* Zhimulev, 1998). A partir de uma série de observações, ele reconheceu que os cromossomos contém dois tipos de cromatina, uma que se condensa durante a mitose e descondensa na interfase (euromatina) e outra que permanece condensada em todo o ciclo da célula (heterocromatina) e que se cora diferentemente nos preparados citológicos. Mais tarde, Schultz (1947) (*apud* Zhimulev, 1998), formulou um conceito para heterocromatina, definindo estas regiões como as que possuem a propriedade específica de reter a aparência de blocos compactados no estágio intermitótico.

Hoje encontramos a definição citológica clássica de heterocromatina em qualquer livro de citogenética como sendo blocos grandes de cromatina e, em alguns casos até cromossomos inteiros, que mostram um grau de compactação e coloração maior do que outras partes do genoma. A heterocromatina está geralmente associada aos telômeros e regiões pericentroméricas dos cromossomos e pode ser classificada em dois tipos: a **heterocromatina facultativa** e a **heterocromatina constitutiva** (Swanson et al., 1987). A primeira define regiões ou cromossomos inteiros que podem estar

heterocromatinizados em apenas um estágio de desenvolvimento. A definição da segunda está ligada às suas propriedades. Os termos facultativa e constitutiva foram sugeridos por Brown (1966) (*apud* Hsu, 1973) que classificaram a heterocromatina em dois tipos básicos: um contendo genes estruturais, mas citologicamente condensada e geneticamente inativa, dependendo do estado fisiológico e do processo de desenvolvimento (facultativa); o outro que não contém nenhum gene estrutural (constitutiva).

De um modo geral, pode-se afirmar que a heterocromatina constitutiva é um segmento do cromossomo que se apresenta permanentemente condensada, geneticamente inativa, composta por DNA altamente repetitivo, que replica tardiamente na fase S (síntese da divisão celular). Essa heterocromatina possui a característica de corar diferencialmente se submetida a determinados tratamentos (bandamentos), que promovem o aparecimento de bandas (faixas) transversalmente ao comprimento dos cromossomos (Pieczarka, 1995). Para cada item citado acima, no entanto, ocorrem exceções.

Em *Drosophila melanogaster*, contrariando a idéia de material genético inerte, existem inúmeros locos genéticos identificados em regiões de heterocromatina cêntrica (dentre os quais o de rDNA ou DNA ribossomal que será discutido adiante) que estão envolvidos na fertilidade e na viabilidade do organismo (Gatti & Pimpinelli, 1992). Atualmente é possível ainda acrescentar a habilidade da heterocromatina de silenciar a expressão gênica (como será discutido mais adiante).

Também em *D. melanogaster*, a heterocromatina constitutiva não está permanentemente condensada. Um sinal epigenético para identificação de regiões cromossômicas que podem potencialmente ser heterocromáticas (epigenético = processo pelo qual ocorrem modificações herdáveis no funcionamento gênico que não por modificações na composição de bases do DNA) é geralmente a base para a formação da heterocromatina, sendo que este sinal pode ocasionalmente ser removido. Isto é observado durante os estágios embrionários iniciais do desenvolvimento de *Drosophila*, onde nenhuma heterocromatina pode ser vista (Henning, 1999).

Como um exemplo de heterocromatina facultativa, temos os cromossomos X de mamíferos. As células da fêmea desenvolveram um mecanismo para inativar permanentemente um dos dois cromossomos X em cada célula, presumivelmente porque uma dose dupla dos produtos vindos deste cromossomo seria letal. O cromossomo X inativo é visto em núcleos de células durante a interfase como uma estrutura distinta, conhecida como corpúsculo da Barr (Alberts et al., 1997). Tanto o cromossomo materno como o paterno podem ser inativados, indicando que a decisão é ao acaso na maioria das espécies de mamíferos, sendo herdada clonalmente pelas células filhas (Schoenherr & Tilghman, 2000).

A técnica clássica para o reconhecimento de regiões de heterocromatina constitutiva em eucariotos surgiu a partir de observações feitas por Pardue & Gall (1970), em um experimento feito para determinar a localização citológica do DNA satélite de camundongo através de hibridação *in situ*. A heterocromatina centromérica de cromossomos metafásicos deste animal corou mais intensamente com Giemsa após a desnaturação e renaturação dos preparados. A partir deste achado, outros pesquisadores propuseram diferentes protocolos para obtenção de padrões de bandamento nos cromossomos (Arrighi & Hsu, 1971; Sumner, 1972), originando o que os investigadores chamaram de coloração para heterocromatina constitutiva, ou técnica de coloração C ou técnica de banda C (Zhimulev, 1998).

O bandamento C foi bastante valioso para uma melhor diferenciação longitudinal dos cromossomos de diferentes organismos mas não foi a primeira técnica utilizada. As primeiras tentativas para detectar diferenças estruturais dos cromossomos foram feitas com diferentes fluorocromos afins com DNA, em núcleos de plantas e animais, com o objetivo principal de melhor diferenciar cromossomos humanos (Hsu, 1973).

Existe ainda um terceiro tipo de heterocromatina: a **heterocromatina intercalar** que é encontrada nos braços eucromáticos dos cromossomos politênicos. Estas regiões se caracterizam por apresentarem pareamento ectópico (contatos que se formam devido à homologia de proteínas que estão presentes em certos fragmentos do genoma), são particularmente susceptíveis a quebras induzidas por radiação e exibem replicação tardia

(Gatti & Pimpinelli, 1992). A heterocromatina intercalar foi primeiro descrita em cromossomos politênicos de *Drosophila melanogaster* por Kaufmann (1939) (*apud* Gatti & Pimpinelli, 1992), que induzindo quebras nos cromossomos por radiação, observou as particularidades destas regiões no cromossomo X politênico.

Cromossomos politênicos são também conhecidos como cromossomos gigantes e ocorrem em muitos órgãos de larvas de dípteros, principalmente nas glândulas salivares, facilitando tremendamente investigações ao nível citogenético, pelas suas dimensões. Também podem ocorrer cromossomos politênicos em outros insetos como *Collembola*, em algumas plantas angiospermas e em poucas espécies de protozoários ciliados (Guerra, 1988). Cromossomos politênicos surgem por ciclos endomitóticos, ou seja, a célula duplica seu DNA várias vezes sem ocorrer separação das cromátides filhas. Em *Drosophila*, por exemplo, o núcleo passa nove vezes pela fase S, resultando em um núcleo interfásico com 1024 fitas de DNA nos homólogos de cada cromossomo.

Os dados obtidos com as técnicas de localização de heterocromatina constitutiva em cromossomos metafásicos contribuíram significativamente para a compreensão de filogenias, dinâmica de populações e assuntos relacionados, sendo um dos exemplos mais interessantes o estudo feito através de técnicas de bandamento em cromossomos humanos e de chimpanzés realizado por Turleau & de Grouchy (1972) (*apud* Hsu, 1973), onde foi demonstrado que somente um grupo de translocações Robertsonianas e algumas possíveis inversões ocorreram na história da divergência das duas famílias. Translocações Robertsonianas são fusões cêntricas dos cromossomos e, alguns autores, interpretam estas fusões como uma translocação recíproca envolvendo dois cromossomos acrocêntricos ou telocêntricos (Guerra, 1988).

A análise do cariótipo quanto à heterocromatina constitutiva, também tem sido uma importante ferramenta para diferenciar espécies que não poderiam ser distinguidas somente através de métodos de análise morfológica. Existem várias pesquisas feitas com grupos importantes de organismos que só puderam ter alguns problemas da sua taxonomia resolvidos através de análise citogenética.

Baimai (1998), faz uma extensa revisão sobre o acúmulo de heterocromatina e evolução cariotípica em alguns insetos dípteros, ressaltando que diferenças quantitativas na heterocromatina dos cromossomos mitóticos podem ser empregadas com sucesso como marcadores genéticos para separação de espécies crípticas ou isomórficas. Embora o papel funcional da heterocromatina na diferenciação das espécies seja um problema ainda não resolvido, o acúmulo de heterocromatina no genoma está claramente envolvido na diferenciação genética e evolução cariotípica.

No grupo *Drosophila repleta* de espécies neotropicais, por exemplo, inúmeros de seus membros são espécies que utilizam cactus como recurso alimentar, incluindo *D. meridionalis* e *D. serido*, sendo que estas duas espécies tem associação com cactus do gênero *Opuntia*. A distribuição destas populações do grupo *repleta* reflete a distribuição esparsa e descontínua das suas plantas hospedeiras na América do Sul. Cada espécie consiste de inúmeras populações isoladas geograficamente e oferecem um bom modelo para estudos de diferenciação genética e especiação (Baimai, 1998).

A análise dos cromossomos metafásicos de estoques de laboratório e de populações naturais de *D. serido* e *D. meridionalis* apontam para um cariótipo metafásico básico uniforme. As duas espécies incluem algumas diferenças, distintas geograficamente, nos blocos maiores de heterocromatina constitutiva presentes nos cromossomos sexuais e/ou minicromossomos. Estas diferenças cromossômicas são maiores devido ao ganho de heterocromatina extra. Além disso, evidências citológicas demonstraram que populações de ambas as espécies tem um padrão de distribuição descontínuo. Por exemplo, *D. meridionalis* mostra 5 padrões diferentes de heterocromatina no cariótipo mitótico em paralelo com o isolamento geográfico. Semelhantemente, *D. serido* exibe seis diferentes tipos de cariótipos mitóticos em termos de variação de heterocromatina constitutiva nos cromossomos sexuais e minicromossomos. *D. meridionalis* e *D. serido* representam, portanto, outro interessante grupo de *Drosophila* com diferenciação de espécies e evolução cariotípica a partir de aquisição de heterocromatina no genoma. Tais diferenças citológicas refletem a existência de complexos subespecíficos ou específicos no taxa *D.*

meridionalis e *D. serido* com uma diferenciação morfológica mínima (Baimai, 1998).

Natureza molecular da heterocromatina, evolução em concerto e DNAs repetitivos.

Se a contribuição do estudo da heterocromatina sob o ponto de vista citogenético é de extrema importância para resolver inúmeras questões biológicas, a investigação molecular da heterocromatina trouxe contribuições incalculáveis para a compreensão de muitos fenômenos ao nível de DNA.

Os primeiros passos nas investigações moleculares da heterocromatina levaram à descoberta do tipo de seqüências que compõe estas regiões. A heterocromatina em *D. melanogaster* ocupa cerca de 59 megabases (59 milhões de pares de bases-Mb) de um total de 146 Mb do genoma de fêmeas e 41 Mb do cromossomo Y de machos que é inteiramente heterocromático (Hoskins et al., 2002). Estas regiões heterocromáticas são ricas em repetições curtas de DNA arranjadas em "tandem" (**DNA satélite**), elementos medianamente repetitivos (**Elementos de Transposição - TEs**) e algumas seqüências cópia única, bem como grupos de genes, como os de **rDNA**, que se repetem muitas vezes em um mesmo loco heterocromático (Jones 1970; Pardue & Gall, 1970; Rae, 1970; Weiler & Wakimoto, 1995).

Outros elementos repetitivos podem ocorrer também em **euromatina**. São os locos de **DNAs microsatélite** (2-4 pares de bases), que formam repetições de dezenas de milhares de pares de bases, bem como os **minisatélites** (10-20 pares de bases por repetição) que se organizam em arranjos de tamanhos variáveis (Pilgrim, 1998). O estudo destas regiões apontou para sua adequação como marcadores, principalmente os relacionados à evolução e genética de populações.

Com o seqüenciamento total do genoma de *D. melanogaster* concluído em março de 2000 (Adams et al., 2000) foi possível conhecer com mais detalhes a organização molecular da heterocromatina em insetos. No entanto, como estas seqüências tem um grande conteúdo de DNA repetitivo, ficou difícil de estabelecer uma ordem para montagem das seqüências.

Devido a esta dificuldade, uma proporção significativa do genoma de *D. melanogaster* (20,7Mb) foi apenas recentemente analisada utilizando outras metodologias. Assim, foi possível verificar que ocorrem 297 genes codificantes de proteínas (incluindo os já descritos para regiões heterocromáticas) e 6 não codificantes nas regiões citologicamente definidas como heterocromatina. Destes genes, 32 estão envolvidos na viabilidade e fertilidade. Embora os genes da heterocromatina sejam diferentes em alguns aspectos da sua estrutura em relação aos eucromáticos, eles não parecem estar segregando por um caminho óbvio baseado na sua função. Os produtos dos diferentes genes estão envolvidos em diversas atividades bioquímicas de várias funções essenciais (Hoskins et al., 2002).

Seqüências de **DNA satélite** são repetições relativamente curtas (5 – 200 pares de bases) tipicamente arranjadas em grupos com tamanhos de milhões de pares de bases na heterocromatina constitutiva das regiões teloméricas e pericentroméricas dos cromossomos (Pilgrim, 1998). Este tipo de DNA pode estar associado com fatores complexos de organização para o funcionamento de genomas eucarióticos, tais como a formação de compartimentos genômicos heterocromáticos importantes para o comportamento adequado dos cromossomos na mitose e meiose (Csink & Henikoff, 1998). DNAs satélite são os maiores constituintes dos centrômeros funcionais em *D. melanogaster* e humanos (Ugarkovic & Plohl, 2002) e representam aproximadamente 20% do genoma de *D. melanogaster* (Hoskins et al., 2002).

O DNA satélite de *D. melanogaster* é composto de quatro tipos bem definidos que formam bandas a 1672, 1686, 1688, 1705 g/cm³ em gradiente de CsCl. O DNA satélite 1672 g/cm³ é rico em AT (Gatti & Pimpinelli, 1992) e está presente em 3,5 Mb do DNA do cromossomo X (Dernburg et al., 1996). Três DNAs satélites de *D. melanogaster* (1672, 1686 e 1705 g/cm³) são formados por unidades repetidas de somente 5, 7 ou 10 pares de bases. Em contraste, o DNA satélite de 1688 g/cm³ é formado por repetições complexas de 359 pb arranjadas em "tandem" em 11 Mb do DNA do cromossomo X (Lohe & Brutlag, 1986; Dernburg et al., 1996). As famílias de DNA satélite já foram mapeadas em cromossomos metafásicos e politênicos de *D. melanogaster*

através do isolamento, clonagem e hibridação *in situ* destas seqüências. O 1705 g/cm³ está distribuído em vários cromossomos. Já o 1688 g/cm³ é restrito à heterocromatina proximal do cromossomo X (Ashburner, 1989).

Além de presentes em regiões pericentroméricas, DNAs satélites também ocorrem em sítios eucromáticos, precisamente localizados por hibridação *in situ*, na região 1A1 no cromossomo X (1688 g/cm³), na seção 21D1.2 no cromossomo 2L (1672, 1686 e 1705 g/cm³) e 81F no cromossomo 3R (1672 g/cm³) (Ashburner, 1989). A seqüência AATAC clonada do DNA satélite 1672 g/cm³ mapeia em uma região do braço longo do cromossomo Y (Gatti & Pimpinelli, 1992). Também em *D. virilis*, a maioria das seqüências repetitivas estão localizadas na α e β - heterocromatina (α - heterocromatina: mais compacta no centro do cromocentro; β - heterocromatina: periférica no cromocentro fazendo a transição para eucromatina), estando somente uma pequena porcentagem em regiões eucromáticas (Gall et al., 1971).

Tem sido postulado que seqüências repetitivas evoluem por meio de **evolução em concerto** (Dover, 1982). Neste contexto, membros de uma família gênica não evoluem independentemente de outros membros da mesma família. As repetições na família trocam de informações recíproca e não reciprocamente, sendo mantido um alto grau de homogeneidade intrafamiliar das diferentes cópias. O resultado da evolução em concerto é uma homogeinização no arranjo de seqüências homólogas não alélicas. É importante notar que a evolução em concerto necessita não somente de transferência horizontal das mutações dentro dos membros da família (homogeinização), mas também da disseminação de todas as mutações para os indivíduos na população (fixação) (Graur & Li, 1999).

Conversão gênica e *crossing over* com recombinação desigual são considerados os dois mecanismos mais importantes responsáveis pela evolução em concerto. Além destes, **deslizes de replicação que levam à um mal pareamento e transposição duplicativa** podem criar famílias homólogas de seqüências repetidas.

Conversão gênica é um processo de recombinação não recíproca, no qual duas seqüências interagem e uma é convertida na outra, ou seja, é uma substituição desigual de uma seqüência por outra, ocorrendo perda de uma

das variantes das seqüências envolvidas num evento de recombinação. De acordo com as cromátides envolvidas no processo, a conversão gênica pode ser dividida em inúmeros tipos. Do ponto de vista do processo evolucionário em concerto, o mais importante tipo de conversão gênica são as conversões não alélicas, ou seja, conversões entre genes localizados em diferentes locos e não entre formas alélicas. Conversão gênica tem sido sugerida como um mecanismo de homogeneização de algumas famílias gênicas tais como as α - e γ -globinas bem como os genes de proteínas de resposta a estresse em *Drosophila*. Este fenômeno também tem sido sugerido como um importante mecanismo para a geração de polimorfismo no complexo maior de histocompatibilidade em mamíferos (Graur & Li, 1999).

Crossing over desigual pode ocorrer entre duas cromátides irmãs durante mitose em células da linhagem germinal ou entre dois cromossomos homólogos na meiose. É um processo de recombinação recíproca que cria uma duplicação de uma seqüência em uma cromátide ou cromossomo e uma deleção correspondente em outro (Graur & Li, 1999).

A conversão gênica é proposta por alguns autores (Baltimore, 1981; Nagylaki & Petes, 1982; Dover, 1982 *apud* Graur & Li, 1999) como tendo o papel mais importante na evolução em concerto do que o *crossing over* desigual. Isto, porém, seria verdadeiro somente para repetições dispersas e para famílias multigênicas de pequeno tamanho, onde o *crossing over* desigual poderia causar efeitos adversos. Em famílias de repetições em *tandem* maiores, no entanto, o *crossing over* desigual pode ser mais rápido e mais eficiente do que a conversão na condução da evolução em concerto por várias razões (Graur & Li, 1999)

Nas famílias grandes de repetição em *tandem*, por exemplo, o número de repetições pode variar sem causar efeitos adversos significantes. Isto é sugerido pela observação do número de genes de *rDNA* em *Drosophila* que varia muito entre indivíduos da mesma espécie e entre espécies diferentes (Ritossa et al., 1966; Brown & Sugimoto, 1973 *apud* Graur & Li, 1999). Também o evento de conversão gênica normalmente envolve somente uma pequena região, enquanto no "crossing over" desigual o número de repetições que são trocadas entre os cromossomos pode ser bem maior (Graur & Li, 1999).

Como no *crossing over* desigual, deslizos de replicação que levam à um mal pareamento é um processo de expansão-contração que leva à homogeneização de membros de uma família de repetições em *tandem*. No entanto, enquanto o *crossing over* afeta grandes frações do DNA, estes deslizos de replicação estão envolvidos na geração de arranjos em *tandem* de repetições curtas (Graur & Li, 1999).

Outro mecanismo que está envolvido na dinâmica de amplificação de DNA satélite, é a replicação por círculos rolantes. Este mecanismo já foi sugerido para um gênero de roedores fossoriais, *Ctenomys*, onde um processo explosivo de especiação foi alavancado por um grande número de rearranjos cromossômicos. Várias cópias de diferentes tamanhos de um tipo de DNA satélite ocorre em 11, de 12 espécies analisadas do gênero, demonstrando que mesmo depois da divergência das espécies, uma amplificação continuada destas seqüências ocorreu, sendo somente possível explicar este resultado somando as teorias de evolução cromossômica com processo de amplificação de DNA por círculos rolantes (Rossi et al., 1990).

DNA circular extracromossômico é encontrado em células de vários organismos, oferecendo evidências diretas do envolvimento destes mecanismos na amplificação de DNA repetitivo. Em *D. melanogaster*, entre 6-10% do DNA repetitivo total do genoma de embriões é circular (lembrando que a maioria do DNA repetitivo em *Drosophila* está localizada na heterocromatina que compreende em torno de um terço do genoma). Isto corresponderia a uma parcela de 1-2% do DNA total. Do DNA circular total, 7% é formado por DNA satélite 1688g/cm³, enquanto 5% é rDNA 5S. Também foram encontrados DNAs circulares formados pelos espaçadores de 240pb que ocorrem entre os genes 28S e 18S. DNAs circulares variam de tamanho desde 1Kb até 20Kb e a quantidade muda durante o ciclo de vida, sendo mais abundante em embriões na fase anterior à gastrulação. Arranjos em *tandem* são pré-requisitos para a formação de DNA extracromossômico circular, sendo que seqüências dispersas no genoma não estão presentes nestas moléculas (Cohen et al., 2003).

O isolamento de seqüências satélite de diversos organismos, além de *Drosophila*, pode ser feito com o auxílio de enzimas de restrição atuando sobre

o DNA genômico, e a localização cromossômica destas seqüências através de hibridação *in situ*.

Em *Rhynchosciara americana*, por exemplo, quando o DNA genômico de adulto é sujeito à digestão com as enzimas *EcoR1* ou *BamH1*, inúmeras bandas são visualizadas em gel de agarose. A clonagem e o seqüenciamento de uma banda de 1Kb gerada por *EcoR1* demonstrou uma família altamente polimórfica de seqüências repetitivas (duas seqüências são ricas em AT intercaladas com GC e outra tem baixa porcentagem de AT), sendo que, por hibridação *in situ* em cromossomos politênicos, estas seqüências estavam presentes nos telômeros e em algumas junções banda - interbanda (Yussa et al., 1995).

As enzimas de restrição também são utilizadas em técnicas de bandamento, a fim de localizar sub classes de heterocromatina constitutiva pela digestão diferencial dos cromossomos. A idéia de extração diferencial de DNA para a produção de padrões de bandas particulares, ampliou-se com o uso das enzimas de restrição que reconhecem e clivam sítios específicos ao longo de sua extensão. As bandas cromossômicas induzidas pelas enzimas de restrição podem representar regiões cromossômicas que teriam uma baixa freqüência dos sítios reconhecidos pela enzima ou ausência total dos mesmos (Bianchi et al., 1985). A endonuclease de restrição *HaeIII*, por exemplo, reconhece e cliva sítios ricos em seqüências de bases GG↓CC produzindo um padrão de bandas semelhantes ao bandamento G em cromossomos metafásicos de alguns organismos (principalmente mamíferos), pois as regiões interbandas são geralmente ricas em guaninas e a endonuclease acaba extraíndo-as preferencialmente (Miller et al., 1983). Já a endonuclease de restrição *AluI* produz um padrão de bandas semelhantes ao bandamento C, também em cromossomos de mamíferos, pois esta enzima reconhece e cliva seqüências ricas em AG↓CT que estariam localizadas em regiões de DNA satélite (Mezzanotte & Ferrucci, 1983). Nestes processos, os fragmentos maiores que 1Kb gerados pela clivagem permanecem nos cromossomos, formando as bandas positivas (Pieczarka, 1995).

Em cromossomos politênicos e metafásicos de *D. melanogaster* e *D. virilis*, as técnicas de bandamento com enzimas de restrição indicam que as

bandas geradas são correspondentes a regiões que contém diferentes famílias de DNA satélite, demonstrando que é possível localizá-las *in situ* por ação destas enzimas (Ellison & Barr, 1972; Mezzanotte, 1978; Mezzanotte, 1986; Mezzanotte et al., 1987).

Outros Elementos Repetitivos do DNA heterocromático

Um grupo de elementos repetitivos do DNA importante é o dos **Elementos Transponíveis** (TEs). Estão distribuídos na sua grande maioria em heterocromatina, mas também podem ocorrer dispersos pela eucromatina. Podem ser definidos como seqüências de DNA que se movem no genoma hospedeiro de uma posição para outra e são um dos constituintes maiores do DNA repetitivo de muitos eucariotos e procariotos. Eles são fontes de mutações espontâneas e podem promover importantes rearranjos cromossômicos, tais como deleções, inversões e translocações (Capy, 1998), matéria prima para a seleção natural. Estão presentes em grandes frações no genoma hospedeiro, como por exemplo, 12% em *Drosophila melanogaster* (Kidwell & Lisch, 1997).

Os TEs podem ser divididos em duas grandes classes, de acordo com seu modo de transposição. Os elementos de classe I são aqueles que se transpõe por replicação envolvendo um intermediário de RNA, que é reversamente transcrito antes da inserção. São chamados de retrotransposons e incluem os retrotransposons com LTR, os quais são estruturalmente similares aos retrovírus integrados. Os elementos de classe II usam somente DNA como intermediários diretos para transposição e se movem principalmente através do mecanismo de "corte-e-cola" (cut-and-past). A excisão do elemento doador é seguido pela sua reinserção em outro local no genoma. A integração dos elementos de classe I e II no genoma resultam na duplicação de seqüências curtas de DNA no sítio alvo. O tamanho destes sítios alvo, os quais são repetições diretas que flanqueiam os TEs, é específica e constante para cada elemento, exceto para os SINES, que são uma superfamília de TEs pequenos - >500 pares de bases - e sem ORFs (Capy et al., 1998).

Existe uma estreita associação entre elementos de transposição e regiões heterocromáticas. Isto foi demonstrado pela caracterização molecular da heterocromatina cêntrica do minicromossomo Dp 1187 de *D.*

melanogaster, onde o DNA satélite intercala-se com “ilhas” de DNA complexo, onde foi detectada a presença de elementos transponíveis. A inserção de elementos de transposição junto ao DNA satélite poderia ser uma explicação para o início da formação destas regiões de DNA complexo (Le et al., 1995). As ilhas de seqüências complexas podem ser particularmente receptivas à integração (e excisão) de elementos de transposição, acumulando uma variedade de inserções deste tipo. Vários elementos transponíveis em *D. melanogaster* mapeiam em cromossomos mitóticos nas regiões de β - heterocromatina e próximos aos centrômeros (Carmena & Gonzales, 1995).

O significado da associação heterocromatina/TE vem sendo investigada. Recentemente Dimitri et al. (2003) analisaram um total de 79Kb de 48 íntrons de 5 genes heterocromáticos e codificantes de *D. melanogaster* quanto à natureza de suas seqüências. Cerca de 50% do DNA testado era constituído de seqüências de diferentes famílias de TEs. Seqüências curtas não mostravam nenhuma similaridade com TEs, enquanto os íntrons maiores são mosaicos de seqüências homólogas a estes. Nenhuma correlação foi estabelecida entre tamanho de íntron e abundância de seqüências de TEs. Íntrons de tamanho comparável podem diferir bastante na porcentagem de seqüências relacionadas aos TEs e, ao contrário, íntrons de substancial diferença de tamanho podem carregar frações similares de TEs.

É importante salientar que a heterocromatina de *D. melanogaster* apresenta quatro a cinco vezes mais TEs do que a eucromatina e que os íntrons de genes heterocromáticos são normalmente grandes, com vários kbs de comprimento. Além disso, estes íntrons podem ser bastante polimórficos quanto ao seu tamanho tanto dentro como entre espécies (Dimitri et al., 2003). Sem dúvida todos estes fatores refletem o efeito das inserções múltiplas dos TEs em regiões heterocromáticas.

O modo como a seleção age sobre regiões heterocromáticas e a maneira como elas se comportam dentro do ciclo de divisão celular, pode favorecer este cenário de inserções múltiplas. A seleção contra efeitos deletérios de rearranjos cromossômicos pode ser baixa em regiões heterocromáticas onde a recombinação é baixa ou nula (Charlesworth & Langley, 1989 *apud* Dimitri et al., 2003). Consistente com esta hipótese é o fato

de que a recombinação meiótica é negativamente correlacionada com densidade de TEs em *D. melanogaster* (Bartolomé et al., 2002 *apud* Dimitri et al., 2003).

***HeT-A* e *TART*: repetições na heterocromatina telomérica formada por retroelementos.**

Os telômeros são estruturas nucleoprotéicas nas extremidades dos cromossomos eucarióticos que desempenham uma função vital, mantendo a integridade funcional necessária dos cromossomos durante a progressão do ciclo celular (Biessman & Mason, 1997). Os eucariotos possuem os telômeros de seus cromossomos formados por repetições curtas arranjadas em seqüência que se estendem por ação de uma transcriptase reversa, a telomerase.

Em *Drosophila*, entretanto, o mecanismo de alongação dos telômeros é diferente dos demais organismos. Neste caso, eles são mantidos por inserções múltiplas de dois retroelementos de classe I: *HeT-A* e *TART*. Estes retrotransposons formam cadeias de repetições sobre a extremidade dos cromossomos (numa extensão de 75 a 100kb), sendo as repetições mais longas e mais complexas do que as repetições geradas pelas telomerasas dos cromossomos em geral. Além disso, tem um comportamento que os difere totalmente dos demais retroelementos: se transpõe exclusivamente em heterocromatina telomérica (Pardue & DeBaryshe, 2002).

As extremidades dos cromossomos diferem na quantidade das seqüências que carregam. Híbridações *in situ* utilizando como sonda *HeT-A* em cromossomos politênicos, demonstraram que estas diferenças são características herdáveis nos estoques de *D. melanogaster* estudados e podem ocorrer mudanças abruptas no comprimento dos telômeros (Pardue & DeBaryshe, 2002). O alongamento poderia ocorrer por transposição de novos elementos, por recombinação ou por conversão gênica ocorrida durante pequenos reparos no DNA (Kahn et al., 2000). Tendo em vista, no entanto, que já foram encontradas subfamílias de *TART* evoluindo diferentemente nos telômeros de *D. yakuba*, é mais provável que eventos de transposição sejam os maiores responsáveis deste alongamento (Casacuberta & Pardue, 2002).

Estas seqüências, da mesma forma que outros DNAs repetitivos, também evoluem em concerto. Isto torna difícil, por exemplo, analisar a presença de *HeT-A* em espécies que sejam mais distantes de *D. melanogaster*, pois estas seqüências podem ser tão divergentes que já pertençam a outra família de retroelementos (Pardue & DeBaryshe, 2002). A análise de inúmeras seqüências isoladas de *HeT-A* de *D. melanogaster* mostrou que elementos intactos e potencialmente funcionais podem diferir tanto nas regiões codificantes como nas não codificantes. Seqüências isoladas da espécie críptica de *D. melanogaster*, *D. simulans*, sugerem que a divergência entre estas não é grande. No entanto, diferenças aumentam proporcionalmente à divergência evolucionária (Pardue & DeBaryshe, 2002).

HeT-A têm em torno de 6kb e apresenta na sua estrutura uma região não codificante 5' (5'-UTR), uma ORF contendo o gene *gag*, que codifica uma proteína semelhante à de retrovírus, uma região não codificante 3' (3'-UTR) e uma cauda poli (A). *TART* é maior que 10kb e apresenta uma 5'-UTR não muito bem conhecida, a ORF1 com gene *gag*, a ORF2 com o gene *pol* que codifica a transcriptase reversa, uma região 3'-UTR e uma cauda poli (A). *TART* apresenta também duas PNTRs (Perfect Non-Terminal Repeat), que são completamente idênticas nas suas seqüências no mesmo elemento (Pardue & DeBaryshe, 2003). *HeT-A* não codifica transcriptase reversa como *TART* e depende de genes celulares para produção desta enzima para efetuar a transposição (Pardue et al., 1996). O elemento mais conservado dos retroelementos são os genes *pol* e estas seqüências podem ser usadas para análises de relações filogenéticas (Malik et al., 1999).

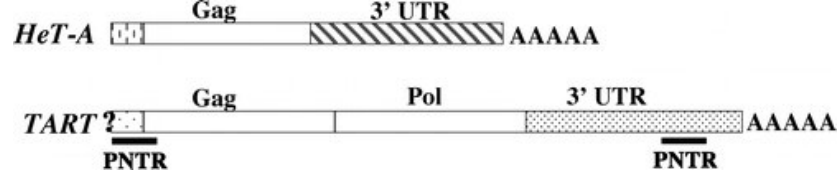


Fig. 1. Diagrama de dois retrotransposons de telômero de *D. melanogaster*, onde o desenho mostra o provável RNA que intermedia a transposição. As caixas pintadas das regiões não traduzidas estão no sentido 5' and 3'. As caixas brancas representam as regiões codificantes para as proteínas Gag e Pol. AAAAA indicam a cauda poli(A) do RNA, e o (dA/T)_n ligando cada cópia de DNA ao cromossomo. O ? na extremidade 5' de TART indica que esta região não está completamente definida. Cada PNTR (Perfect Non-Terminal Repeat) é um segmento de seqüência completamente idêntica à seqüência da outra PNTR no mesmo elemento (modificado de Pardue & DeBaryshe, 2003)

O elemento *TART* é menos abundante no genoma de *Drosophila* do que o *HeT-A*. A diferença na quantidade dos elementos nos telômeros pode ser devida ao fato de que longos processos de “erosão” do cromossomo podem ter deletado algumas repetições antes da ocorrência de nova transposição. A deleção destes retroelementos dos telômeros de *Drosophila* revela o progressivo encurtamento dos cromossomos que ocorre nas extremidades devido à replicação incompleta do DNA. Estes elementos, então, não previnem a perda dos nucleotídeos terminais, mas eles contrabalançam esta ocorrência pela transposição para as extremidades (Walter et al., 1995). Esta diferença entre a abundância dos dois retroelementos, porém, não afeta as suas funções principais para os telômeros dos cromossomos e pela sua essencialidade, assumem um papel de “cidadão honesto” (ou DNA sacrificial), ao invés de DNA egoísta (ou “velhacos”) (Pardue et al., 1996).

Heterocromatina: estrutura e algumas de suas funções no genoma

Mas qual a **função** da heterocromatina e que **efeito** ela exerce sobre o genoma? Talvez estes sejam os pontos mais discutidos em relação a estas regiões do DNA. Inicialmente alguns pesquisadores tinham a idéia de que as regiões heterocromáticas seriam material genético inerte. Por muito tempo esta idéia foi postulada, mas sucessivamente, foram sendo descobertas funções importantes e efeitos significativos do DNA heterocromático dentro do genoma. Entre alguns eventos mais conhecidos, nos quais a heterocromatina está envolvida, podemos citar os que seguem.

Pareamento ectópico

Foi primeiro descrito por Bridges (1935) (apud John, 1988) que verificou que certas bandas não homólogas nos braços politênicos eucromáticos de *D. melanogaster*, no mesmo ou em diferentes cromossomos, bem como com heterocromatina telomérica, podem se associar através de filamentos de cromatina. Estas regiões que se associam são conhecidas por regiões de heterocromatina intercalar e mostram propriedades características já descritas anteriormente. Mas o que acontece ao nível molecular que promove a ocorrência do pareamento ectópico? Diferentemente do que normalmente é postulado, a homologia do DNA não é determinante para que o pareamento ocorra. Numerosos sítios de inserção de elementos transponíveis de muitas famílias estão espalhados nos cromossomos eucarióticos. Se somente a homologia do DNA fosse suficiente para o estabelecimento dos contatos ectópicos, eles ocorreriam com mais frequência onde os elementos transponíveis estão localizados e mudariam quando a transposição ocorresse. No entanto, nenhum destes eventos é observado. Uma das explicações para o pareamento ectópico é a hipótese de que estes contatos resultam da homologia de proteínas que estão presentes em certos fragmentos do genoma, inativando genes e compactando a cromatina (Zhimulev, 1998), ou seja, regiões heterocromatinizadas.

Outra explicação é o processo de subreplicação que ocorre nas regiões heterocromáticas. Subreplicação heterocromática em células politênicas ocorre quando a fase S termina antes que a replicação tardia do DNA heterocromático tenha sido completada. Esta replicação tardia ocorre devido à barreira formada pelas repetições satélite presentes em abundância na heterocromatina. Estas possuem uma forte curvatura intrínseca que pode causar paradas nas DNA polimerases (as enzimas responsáveis pela duplicação do DNA). Quando a forquilha de replicação na segunda fase S se estende para a posição onde a forquilha de replicação ficou mal resolvida na primeira fase S, é gerado um DNA linear truncado que irá sucessivamente ser replicado ao longo da politenização. A célula politênica pode tentar reparar as extremidades livres deste DNA truncado, podendo criar, então os pareamentos ectópicos (Leach et al., 2000).

Variegação por Efeito de Posição

Nos últimos anos uma gama de conhecimentos em nível molecular acumulou-se em relação à Variegação por Efeito de Posição (PEV). É muito difícil compilar tudo o que se sabe hoje sobre este assunto em poucas palavras. Porém, seguem algumas poucas observações, a fim de se ter uma idéia geral do fenômeno.

Entre os anos de 1930 e 1940, pesquisadores descreveram mudanças na morfologia de regiões em cromossomos politênicos de *D. melanogaster* que eram transportadas para próximo da heterocromatina, verificando uma intensificação na coloração e perda de bandas próximas às regiões heterocromáticas. Foi encontrada uma correlação destes acontecimentos com variegação. A explicação para este fenômeno veio mais tarde, quando Schultz (1965) afirmou que a inativação genética devido ao efeito de posição ocorre pela compactação que a eucromatina sofre ao se colocar junto às regiões heterocromáticas (Morgan et al., 1938; Schultz, 1941b, 1943a, 1947; Schultz, 1956 *apud* Zhimulev, 1998). De acordo com os conceitos de Sutton-Gersh (Gersh, 1973 *apud* Zhimulev, 1998), o DNA de regiões heterocromáticas do cromocentro poderia ser mantido em um estado condensado extremo, através de ligações cruzadas com proteínas e, quando fragmentos livres dos cromossomos são levados para tais regiões, este efeito de ligações cruzadas se estende compactando as bandas proximais.

Variegação por efeito de posição (PEV) tornou-se, então, um dos fenômenos mais estudados, principalmente em *D. melanogaster*, mas pode ocorrer também em leveduras, plantas e mamíferos. PEV pode ser observada em *Drosophila*, por exemplo, quando o gene *white*⁺, necessário para a pigmentação vermelha do olho, é levado por uma inversão para próximo a heterocromatina cêntrica. Isto faz com que este gene seja "silenciado" no núcleo de algumas células do olho e não em outras, o que produz um mosaicismo de vermelho e branco na coloração do olho composto deste inseto. Aparentemente, o rearranjo remove uma barreira e permite que a heterocromatina se "espalhe" para regiões adjacentes (Grewal & Elgin, 2002).

Dois mecanismos principais estariam envolvidos neste fenômeno; o primeiro seriam **alterações na estrutura da cromatina**, tornando o gene inacessível a fatores regulatórios e o segundo, a **compartimentalização nuclear** (Wallrath, 1998).

No primeiro, ocorre associação do DNA com complexos protéicos multiméricos específicos que levam à modificação da cromatina para o aspecto heterocromático. Numerosas proteínas componentes da heterocromatina já foram identificadas. Alguns exemplos são as proteínas SIR em leveduras (específicas para telômeros); HP1, Su(var)3-7 e ORC (que recrutam fatores de silenciamento, tais como SIR1) em eucariotos superiores (Leach et al., 2000). Estes complexos interagem com histonas modificadas. Geralmente, as histonas heterocromáticas estão hipoacetiladas, com acetilação na lisina 12 da histona H4. É possível que fatores específicos eucromáticos tenham acesso limitado a seus sítios de ligação, quando empacotados em nucleossomos hipoacetilados (Wallrath, 2000). A montagem de tais complexos de repressão transcricional proteína/histona pode se propagar para incluir seções mais extensas do DNA, uma vez depositados em certas regiões genômicas, impedindo assim a expressão gênica (Henning, 1999).

Algumas mutações podem aumentar ou suprimir PEV, onde estão envolvidos os genes *E(var)s* ("Enhancer of variegation") e *Su(var)s* ("Suppressor of variegation"), respectivamente. Também um decréscimo nas proteínas necessárias para formar ou limitar a eucromatina pode levar a um aumento de PEV. Este é o caso dos fatores de transcrição *GAGA* e *hsp26*, que parecem ser a chave para estabelecer a estrutura de cromatina "aberta" antes da ativação (Wilkins & Lis, 1997). Complexos silenciados podem excluir estes fatores do seu sítio de ligação, o que pode levar a uma deficiência na formação de um promotor potencial (Wallrath, 1998). As proteínas associadas à heterocromatina codificadas pelos genes *Su(var)2-5*, *Su(var)3-7* e *Su(var)3-9* têm sido extensivamente estudadas.

Su(var)205, por exemplo, é uma mutação no gene *Su(var)2-5* que codifica a proteína HP1. Alelos mutantes destes genes são homocigotos letais no estágio de larva, indicando ter um papel essencial no desenvolvimento.

HP1 é uma proteína altamente conservada (proteínas homólogas ocorrem desde *Sacharomyces pombe* até *Homo sapiens*) que se localiza principalmente em regiões centroméricas dos cromossomos de *Drosophila*. Também ocorrem no quarto cromossomo (que é predominantemente heterocromático), em muitos sítios eucromáticos e nos telômeros (ou seja, nas pontas livres dos cromossomos), onde HP1 pode ter um papel de encapamento (James et al., 1989 *apud* Grewal & Elgin, 2002).

Esta proteína interage com sítios específicos de ligação de inúmeras proteínas da cromatina (através do seu cromo-domínio) e com outras proteínas (através do domínio *shadow*), funcionando como módulo de ligação de complexos proteicos na heterocromatina que determinam a estrutura necessária para inativar genes. O cromo domínio de HP1 é um motivo de interação específica com o peptídeo amino terminal da histona H3 modificada pela metilação da lisina 9 (H3-mLys9) (Lachner et al., 2001). O domínio "shadow", além da interação com proteínas, pode proporcionar um sítio de ligação para a enzima metiltransferase direta ou indiretamente (Eissenberg & Elgin, 2000 *apud* Grewal & Elgin, 2002). HP1 funciona como um adaptador estrutural, moldando complexos macromoleculares à cromatina (Lamond & Earnshaw, 1998).

Su(var)3-7 codifica uma proteína que interage com HP1 e tem potencial para se ligar ao DNA. Recentemente foi demonstrado que a proteína SU(VAR)3-9 controla silenciamento gênico dependente da heterocromatina através da metilação da lisina 9 da histona H3 junto à heterocromatina do cromocentro. As localizações de SU(VAR)3-9 e HP1 são interdependentes (Schotta et al., 2002)

O segundo mecanismo principal envolvido na PEV, a **compartimentalização nuclear**, implica na observação feita nos últimos anos de que o núcleo está organizado em territórios, ou compartimentos (como dito anteriormente) e que esta organização está diretamente relacionada com o desempenho correto das funções nucleares. Cada cromossomo ocupa um território discreto. Estes territórios estão separados por domínios intercromossômicos nos quais acredita-se que ocorram os processamentos e transportes de RNA. Junto aos territórios individuais, as fibras de cromatina

parecem estar dobradas com os locais de replicação tardia do DNA próximos à periferia do núcleo e os locais de replicação num estágio mais inicial no interior (Lamond & Earnshaw, 1998). A cromatina transcricionalmente inativa localiza-se na periferia nuclear. Isto pode indicar que fatores que sustentam e dificultam a expressão gênica possam ser compartimentalizados em certos locais do núcleo (Wallrath, 1998).

Experimentos envolvendo translocação de um cromossomo 4 (que é um cromossomo pequeno, tendo largos blocos heterocromáticos) modificado com um gene *hsp70-white* de *D. melanogaster*, demonstraram que, ao ser transportado para a ponta do segundo cromossomo, ele ficou localizado em uma região nuclear que não apresentava a presença dos fatores silenciadores, tais como HP1, por exemplo. O gene inicialmente silenciado, passou a expressar-se, indicando que eventos de translocação podem resultar em uma alteração na localização nuclear que se correlaciona com alterações na expressão gênica e com estrutura da cromatina (Wallrath, 2000).

No entanto, HP1 não interage somente com proteínas cromossômicas, mas também com o receptor B da lâmina (uma proteína interna da membrana nuclear). A região amino-terminal desta proteína é disposta nucleocitoplasmicamente e interage com as histonas H3/H4 que estão desacetiladas e metiladas na lisina 9 da histona H3. Estas histonas modificadas também interagem com proteínas HP1. Nesta interação, HP1 dimeriza lado à lado os domínios *shadow*, promovendo uma conexão internucleossomo, que leva a um empacotamento da cromatina em inúmeras camadas. Este acúmulo de camadas só é interrompido pela acetilação de histonas (Singh & Georgatos, 2002).

Existem muitos outros aspectos moleculares importantes da heterocromatina que estão sendo intensamente investigados, tais como o seu papel na meiose, no *imprinting* (em *Drosophila*, por exemplo, este fenômeno está invariavelmente associado a regiões heterocromáticas ou a estruturas de cromatina incomuns) e na regulação da expressão gênica nos eucariotos. Sem dúvida, estas regiões do DNA, independente do nível de análise que se faça (citogenética ou molecular), oferecem recursos valiosos para a compreensão de diferentes aspectos da biologia de organismos eucariotos.

Metilação, *imprinting* e epigenética em *Drosophila*

Em 1948, R. D. Hotchkiss descobriu o que ele chamou de quinta base do DNA: a 5-metilcitosina. Em eucariotos, estas bases são feitas enzimaticamente após a replicação do DNA e em torno de 5% das citosinas dos mamíferos são convertidas em 5-metilcitosina. Esta conversão somente ocorre quando os resíduos de citosina estão seguidos de uma guanosina (CpG). Vários estudos tem demonstrado que o grau de metilação das citosinas de um gene controla a sua transcrição, ou seja, a metilação do DNA pode alterar a estrutura de um gene, bem como regular a sua atividade (Gilbert, 1994).

O padrão de metilação diferencial do DNA veio a explicar uma grande questão: se as seqüências de DNA das células de um indivíduo são as mesmas, porque as do olho permanecem assim e não ativam genes específicos de músculo, por exemplo? A resposta veio pela demonstração de que promotores de genes inativos estão metilados, resultando em nucleossomos estáveis que impedem a ligação de fatores de transcrição (Gilbert, 2000). Ao longo do desenvolvimento, os genes que não necessitam ser expressos vão sucessivamente sendo “desligados” resultando no processo de diferenciação celular.

Um exemplo bastante estudado sobre metilação dentro do processo de desenvolvimento, é o que ocorre com os genes de globina das células sangüíneas de humanos e galinhas. O DNA dos promotores destes genes não apresenta metilação nas células sangüíneas, enquanto que os mesmos promotores em outras células que não produzem globina apresentam as citosinas metiladas (Gilbert, 2000).

Além da sua implicação na regulação da expressão gênica, o processo de metilação do DNA também tem relações com *imprinting* parental, inativação do cromossomo X de mamíferos, bem como pode ser a causa de algumas doenças humanas e contribuir para a tumorigênese (Mandrioli & Volpi, 2003). Metilação no DNA também está envolvida no processo de modificação, em muitos organismos eucariotos, de seqüências repetitivas que podem ter efeito deletério para o genoma hospedeiro, tais como elementos transponíveis (TEs) e vírus. A metilação pode silenciar a expressão destes, bem

como de promotores dos TEs dentro de genes hospedeiros. Também a metilação de seqüências repetitivas pode suprimir recombinação entre repetições em diferentes posições no genoma, as quais poderiam levar a translocações ou outros rearranjos cromosômicos desfavoráveis (Bender, 1998).

A formação dos nucleossomos estáveis e a metilação do DNA estão ligados ao processo de desacetilação das histonas. Enquanto as histonas estão acetiladas, elas são instáveis e podem causar a dispersão dos nucleossomos, favorecendo a ligação ao DNA das proteínas envolvidas no processo de transcrição. A acetilação da histona H3 e H4, especificamente nos resíduos de lisina, está fortemente associada à atividade transcricional (Grunstein, 1997). A metilação do DNA é um potente inibidor da expressão gênica, recrutando as proteínas que se ligam em CpG metilados e em histonas desacetiladas (HDAC), para criar um estado de cromatina transcricionalmente repressivo (Pollack & Iyer, 2002).

Em mamíferos, uma proteína chamada MeCP2 liga-se seletivamente às regiões metiladas de DNA, podendo estabilizar os nucleossomos em uma região particular da cromatina. DNA metilado pode preferencialmente se ligar com histonas H1, a histona que associa nucleossomos em complexos de dobras altamente organizados. Estes padrões são mantidos em todo o ciclo de divisão celular pelas enzimas DNA citosina-5-metiltransferases. Durante a replicação, uma fita de DNA (a fita molde) retém o padrão de metilação, enquanto a nova fita sintetizada, não. A DNA(citosina-5)-metiltransferase, como tem uma forte preferência por DNA metilado fita simples, liga-se ao DNA em processo de replicação e promove a metilação de todos os resíduos CpG da nova fita de DNA (Gilbert, 2000).

Por muito tempo, devido à falta de sensibilidade dos métodos de análise e ao uso de apenas uma espécie do gênero, o genoma de *Drosophila* foi considerado livre ou com níveis não detectáveis de metilação (Urieli-Shoval et al., 1982), mas trabalhos recentes tem detectado outras evidências relacionadas a este fenômeno.

Os padrões de metilação do DNA são estabelecidos, mantidos e interpretados por sistemas que consistem de **metiltransferases** e **proteínas que se ligam em DNA metilado** (Lyko, 2001).

Baseado na homologia das seqüências, as **metiltransferases** animais podem ser subdivididas dentro de três famílias: Dnmt1, Dnmt2 e Dnmt3 (Colot & Rossignol, 1999 apud Kunert et al., 2003). Devido à sua preferência por dinucleotídeos CpG hemimetilados (Bestor & Ingram, 1983; Gruenbaum et al., 1982 apud Kunert et al., 2003), a enzima Dnmt1 é geralmente considerada a metiltransferase que tem como função primária copiar o padrão de metilação da fita parental para a nova fita de DNA, durante ou logo após a replicação (Kunert et al., 2003).

A função da segunda família de DNA metiltransferases, Dnmt2, não está bem estabelecida, mas evidências recentes tem apontado que estas enzimas não tem função como DNA metiltransferase, apesar de funcionar como tal em células de camundongos e humanos (Liu et al., 2003).

O papel da terceira família de metiltransferases tem sido definida pela sua preferência por DNA "desmetilado". Dnmt3a e Dnmt3b teriam a função de metiltransferase de novo (Hsieh, 1999; Lyko et al., 1999; Okano et al., 1999 apud Kunert et al., 2003) e são consideradas importantes para o estabelecimento dos padrões de metilação do DNA durante a embriogênese (Kunert et al., 2003).

Já foram identificadas, em *D. melanogaster*, algumas proteínas relacionadas à família das DNA metiltransferases de vertebrados. Uma DmMTR1 similar à dnmt1 de vertebrados, que interage com outra proteína (PCNA) envolvida na replicação e reparo do DNA, e DNMT2 (ou *dDnmt2*) que apresenta homologia à região carboxi-terminal (domínio catalítico) da Dnmt2 de mamíferos (essencial no desenvolvimento embrionário inicial) e com a enzima dcm de bactérias (Hung et al., 1999). Também um homólogo às proteínas da família MDB2/3 de vertebrados (que pode ou não ligar-se em DNA metilado), a dMBD2/3, já foi descrita para *D. melanogaster*, sendo que esta proteína apresenta uma perda do domínio de ligação metil-CpG, corroborando uma hipótese de que *D. melanogaster* poderia ter perdido ao longo da evolução a capacidade de metilação do DNA (Tweedie et al., 1999). Interessante salientar que a metilação em *D. melanogaster* não ocorre somente em dinucleotídeos CpG, mas também em CpA e CpT (Lyko et al., 2000).

DNA de embriões de *D. melanogaster* analisados através da técnica de HPLC (high-performance liquid chromatography) demonstram diferentes níveis de 5-metilcitosina. Embriões jovens (1-2 horas de desenvolvimento) apresentam níveis maiores de 5-metilcitosina de que embriões mais velhos (15-16 horas). Ovários, machos adultos e fêmeas adultas apresentam apenas traços de metilação (Lyko et al., 2000).

Não é possível detectar 5-metilcitosina em tecidos internos de adultos, consistente com a indicação de que a metilação do DNA se reduz durante o desenvolvimento da mosca. *dDnmt2* tem um padrão que sugere ter uma especificidade no desenvolvimento, apresentando expressão mais elevada em larva. Todos estes resultados apontam para a possibilidade de que a metilação em *Drosophila* é restrita a estágios definidos de desenvolvimento, podendo ser de difícil detecção (Lyko, 2001). Como o pico de metilação genômica de *D. melanogaster* está em torno de 0,4% (abaixo do nível mínimo do genoma de mamíferos), isto indicaria que a 5-metilcitosina não está amplamente distribuída no genoma, mas está restrita a certos locos ou compartimentos (Lyko, 2001) ou apresenta uma distribuição fracional, como descrito para mamíferos primitivos (Tweedie, et al., 1997).

Em contraste, portanto, com o sistema complexo de mamíferos, que apresenta inúmeras metil-transferases e proteínas de ligação em DNA metilado, *D. melanogaster* parece ter um sistema mais simples, com apenas um representante para cada grupo de proteínas (Lyko, 2001).

Dentro deste contexto, no entanto, não se sabia exatamente qual das proteínas identificadas em *D. melanogaster* seria a responsável em promover a metilação. Só recentemente é que ficou estabelecido que a metiltransferase *dDnmt2* é a mais forte candidata para exercer esta função, tendo em vista que, em experimentos onde havia superexpressão desta enzima em cultura de células, o DNA comprovadamente aumentava os seus níveis de metilação. A atividade catalítica de *dDnmt2* precisa, entretanto, da formação de multicomplexos *in vivo* e estes componentes ainda necessitam ser identificados (Reddy et al., 2003).

Experimentos utilizando RNA de interferência (RNAi - RNA dupla fita que é capaz de silenciar a expressão do gene que codifica este RNA)

demonstraram que realmente existe somente uma DNA metiltransferase (dDnmt2) em *D. melanogaster*, mas não revelaram uma função para a metilação na mosca. O silenciamento da expressão de dDnmt2 parece não ter nenhuma consequência detectável para o desenvolvimento embrionário. Os dados parecem indicar que o papel da metilação deve estar relacionado à estabilidade da heterocromatina (Kunert et al., 2003).

Em contraste, a interrupção da atividade da DNA metiltransferase, promovendo hipometilação do DNA, causa efeitos danosos no desenvolvimento de camundongos, sapos e plantas. A análise dos fenótipos resultantes a partir de DNA hipometilado, identificou o papel da metilação na regulação da atividade gênica, no controle de elementos forasteiros do DNA e na estabilidade do genoma (Chen et al., 1998). A análise da síndrome de pacientes ICF (imunodeficiência, instabilidade centromérica, anomalias faciais), por exemplo, revelou que a maioria deles perdeu a maior parte da atividade da DNMT3B metiltransferase e mostram surpreendentes aberrações cromossômicas que têm sido atribuídas à desmetilação do DNA e à concomitante descondensação do DNA satélite pericentromérico (Smeets et al., 1994 *apud* Weissmann et al., 2003). Estes resultados sugerem que a metilação do DNA pode influenciar aspectos ainda indefinidos da organização superior da estrutura da cromatina, mais do que em informação codificante sítio-específica em torno da atividade gênica (Weissmann et al., 2003).

A análise das proteínas de ligação em DNA metilado, tem revelado que estas atuam como moléculas bifuncionais, ligando-se a ele e recrutando complexos de histonas desacetiladas em seus sítios de ligação. Isto resulta no estabelecimento de estruturas de cromatina que são caracterizadas por níveis reduzidos de acetilação na extremidade N-terminal das histonas H3 e H4 (Weissmann et al., 2003).

Experimentos que promoveram a hipermetilação em DNA de *D. melanogaster* transgênicas através da superexpressão de Dnmt3a, demonstraram que inúmeros defeitos no desenvolvimento podem ocorrer devido à redução no ritmo da progressão do ciclo celular e à condensação irregular dos cromossomos. Cromossomos hipermetilados apresentam elevadas

taxas de histona H3 metilada na lisina-9 e um padrão restrito de fosforilação na serina 10 da histona H3 (Weissmann et al., 2003). Portanto, a modificação das histonas que tem um papel chave (como dito anteriormente) no silenciamento gênico em regiões de heterocromatina constitutiva e facultativa parece também estar ligada ao processo de metilação do DNA.

Mas o que exatamente significam os termos **imprinting genômico** e **herança epigenética** nos quais está envolvida a metilação do DNA?

Desde o descobrimento da estrutura do DNA, as atenções sempre foram voltadas para a molécula em si, ocorrendo uma estruturação de toda a genética e biologia molecular na compreensão do funcionamento desta molécula nos seres vivos. A medida em que os estudos foram desvendando processos regulatórios que atuam na expressão gênica e que as proteínas que formam a cromatina foram cada vez mais conhecidas, uma nova visão começou a se formar em relação ao genoma como um todo. Padrões de herança mendeliana passaram a ser insuficientes para explicar alguns fenômenos que envolvem não somente a molécula de DNA em si, mas todo um conjunto de proteínas, bem como a organização espacial no núcleo eucariótico.

Com o seqüenciamento completo do genoma de muitos organismos, a era da Genômica se iniciou mostrando que não basta conhecer as seqüências dos nucleotídeos para explicar a estrutura e funcionamento dos organismos, bem como a sua evolução. Os seqüenciamentos são a ponta de um "iceberg" que precisa ser trabalhado arduamente até que se chegue às conclusões finais sobre assunto de tamanha complexidade, sendo necessário conhecer em profundidade as interações que ocorrem entre proteínas e ácidos nucleicos.

A informação contida junto à seqüência linear de bases (o genoma) é fielmente replicada em cada ciclo celular, com um balanço entre estabilidade e variação dentro do curso da evolução. Recentemente, foi estabelecido que informações adicionais importantes para a regulação genética, estão contidas nas proteínas da cromatina associadas ao DNA (o **epigenoma**). Informações epigenéticas também podem ser fielmente duplicadas em cada ciclo celular, com um balanço entre estabilidade e

variação ao longo do curso do desenvolvimento para realizar a diferenciação, enquanto se mantém a identidade nas linhagens celulares. Genoma e epigenoma são sintetizados na forquilha de replicação, sendo a fase S a oportunidade crítica para a ocorrência de mudanças ou de manutenção dos estados genéticos existentes (McNairn & Gilbert, 2003).

Modificações **epigenéticas**, portanto, influenciam a expressão gênica mas não mudam a seqüência de DNA e são relativamente estáveis na mitose. Em geral, o estabelecimento de modificações epigenéticas para alelos de mamíferos durante a fase de desenvolvimento inicial é um processo previsível. Para alguns alelos, no entanto, o estabelecimento é estocástico. Uma vez estabelecido, o estado epigenético é mantido ao longo da vida do indivíduo (Rakyan & Whitelaw, 2003).

Silenciamento estável e herdável de domínios cromossômicos específicos formam uma parte importante dos mecanismos epigenéticos no genoma eucarioto, sendo a base que resulta na interpretação diferencial de informações genéticas idênticas na mesma célula (Lyko & Paro, 1999).

Imprinting genético é uma forma de **silenciamento epigenético**. Um exemplo simples de *imprinting* genético envolve um único gene do tipo selvagem que é fielmente expresso (ON) após a transmissão por um dos pais, mas completamente silenciado (OFF) após a transmissão por outro. Este efeito de silenciamento depende somente do sexo dos pais e não do sexo da descendência, repetindo-se por todas as gerações (Lloyd, 2000).

Imprinting tem sido melhor caracterizado em mamíferos, devido ao fato de que genes importantes são assim regulados nestes organismos, sendo que aberrações neste mecanismo tem profundas implicações médicas e no desenvolvimento (Lloyd, 2000). Em humanos e camundongos, por exemplo, já foram identificados mais de 20 genes que sofrem *imprinting*. Para alguns deste genes, o silenciamento afeta todas as células de um organismo, enquanto para outros, parece ser altamente tecido-específico (Lyko & Paro, 1999). Recentemente, a partir de estimativas feitas de locos de doenças com origem específica parental, tem sido estimado que o *imprinting* pode afetar centenas de genes em humanos (Barlow, 1995 apud Maggert & Golic, 2002). O maior

grupo de genes que sofrem *imprinting* em humanos são os do cromossomo X (Lyon, 1999 apud Maggert & Golic, 2002).

Em mamíferos, um exemplo prático que ilustra o envolvimento de *imprinting* em doenças, é o que é descrito para as Síndomes de Angelman e de Prader-Willi. Estas síndromes se caracterizam em humanos pela perda de um segmento particular do braço longo do cromossomo 15, resultando em diferentes fenótipos, dependendo se a perda é no cromossomo derivado do macho ou da fêmea. Se o cromossomo defectivo vem do pai, a criança nasce com a síndrome de Prader-Willi e se vem da mãe, a criança apresenta síndrome de Angelman. Estas diferenças envolvem metilação nas células germinais (Gilbert, 2000).

O termo *imprinting* foi primeiro utilizado por Helen Crouse em 1960 para descrever o silenciamento parental específico de cromossomos no mosquito do fungo, *Sciara*. Mas o fenômeno em si, já havia sido descrito algumas décadas antes em *Drosophila* (Lloyd, 2000), sendo que ainda existem algumas dificuldades quanto à descrição do fenômeno neste organismo.

Como os genes de ambos os cromossomos X de fêmeas de *Drosophila* são expressos, não é possível observar inativação específica, do tipo que é visto em mamíferos. Além disso, não há nenhuma evidência que indique que genes autossômicos em *Drosophila* mostrem comportamento regulado por *imprinting* onde, de fato, os genes parecem expressar-se igualmente quando herdados de machos ou de fêmeas. Todos estes fatores levaram à crença que não ocorre *imprinting* neste inseto. Somando-se a isto, diplóides uniparentais de *D. melanogaster* são viáveis e não tem nenhum fenótipo visível; pouquíssimos casos de *imprinting* genômico foram descritos, sustentando o argumento errôneo de que não existiria *imprinting* em *Drosophila*. No entanto, uma forma de inativação epigenética ocorre neste organismo: a Variação por Efeito de Posição (PEV) (já descrito anteriormente). (Maggert & Golic, 2002)

O estado de inativação gênica gerado por PEV em *D. melanogaster*, é herdado epigeneticamente através de múltiplas mitoses, sendo que machos e fêmeas são capazes de estabelecer e manter estes estados epigenéticos da cromatina. Os poucos casos de *imprinting* genômico que afetam a expressão gênica em *Drosophila* são devidos a rearranjos cromossômicos que causam

PEV (Golic et al., 1998; Haller & Woodruff, 2000; Lloyd, 2000 *apud* Maggert & Golic, 2000). Genes eucromáticos transpostos para o cromossomo Y, apresentam um comportamento típico de PEV e podem ser herdados maternalmente ou paternalmente, já que em *Drosophila* o cromossomo Y não determina o sexo. Em dois casos estudados em *D. melanogaster*, descendências geneticamente idênticas com cromossomos Y maternos ou paternos exibiam diferentes níveis de inativação gênica (Golic et al., 1998; Haller & Woodruff, 2000 *apud* Maggert & Golic, 2002).

Mais recentemente, experimentos que inseriam dois genes (*yellow* e *white*) por transposição em 23 diferentes regiões de heterocromatina do cromossomo Y e de cromossomos autossômicos, demonstraram que apenas uma região apresentava expressão diferencial de acordo com a herança (se herdado do pai ou da mãe) para um ou ambos os genes. Em contraste, genes inseridos em heterocromatina autossômica não mostraram expressão regulada por *imprinting*. O *imprinting* nestes casos foi estabelecido sobre os transgênicos inseridos em diferentes seqüências e localizações no cromossomo Y, indicando que este fenômeno, que afeta a expressão gênica, é propriedade deste cromossomo em *Drosophila* (Maggert & Golic, 2002).

A dificuldade, portanto, em caracterizar *imprinting* em *Drosophila* está relacionada ao fato de que este evento ocorre exclusivamente em heterocromatina, sem conseqüências fenotípicas óbvias (Lloyd, 2000).

Outro elemento repetido do genoma de *Drosophila*: o rDNA.

Em *D. melanogaster*, os genes codificadores dos rRNAs (genes rDNA) são uma família multigênica que formam um agrupamento (*cluster*), ou unidade de repetição, com cerca de 250 cópias. Cada cópia codifica um transcrito primário que é rapidamente processado para formar um rRNA precursor (45S), o qual é novamente processado para resultar nos rRNAs 18S, 28S, e 5.8S. Cada unidade transcricional é composta por um espaçador externo transcrito (ETS), uma região codificante de rRNA 18S, um espaçador interno não codificante transcrito (ITS-1), uma região codificante de rRNA 5.8S, uma segunda região não codificante (ITS-2), uma região codificante de rRNA 28S e um segmento espaçador não transcrito intergênico (IGS). As IGS são

compostas de diferentes tipos de subrepetições arranjadas em *tandem* que podem variar no comprimento e promover um polimorfismo no tamanho destas regiões (Polanco et al., 1998).

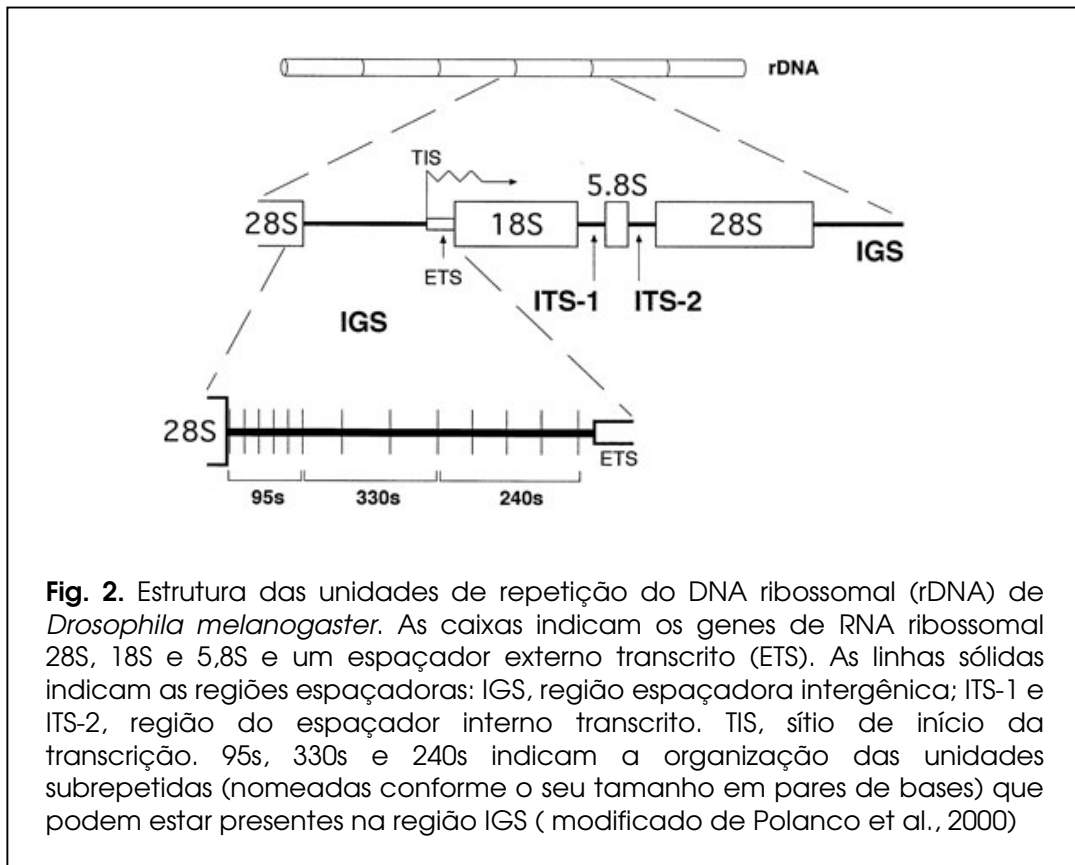


Fig. 2. Estrutura das unidades de repetição do DNA ribossomal (rDNA) de *Drosophila melanogaster*. As caixas indicam os genes de RNA ribossomal 28S, 18S e 5,8S e um espaçador externo transcrito (ETS). As linhas sólidas indicam as regiões espaçadoras: IGS, região espaçadora intergênica; ITS-1 e ITS-2, região do espaçador interno transcrito. TIS, sítio de início da transcrição. 95s, 330s e 240s indicam a organização das unidades subrepetidas (nomeadas conforme o seu tamanho em pares de bases) que podem estar presentes na região IGS (modificado de Polanco et al., 2000)

Em *Drosophila melanogaster*, ambos os cromossomos X e Y contêm genes rDNA que localizam-se no locus *bobbed* (*bb*). Mapeamentos por deleção e experimentos de hibridação *in situ*, tem mostrado em núcleos politênicos, que o locus *bb* e os genes ribossomais co-mapeiam na região organizadora de nucléolo (NORs) dos cromossomos X e Y. Em cromossomos metafásicos, eles mapeiam na heterocromatina cêntrica do cromossomo X e

no braço curto do cromossomo Y (que é totalmente heterocromático) de *D. melanogaster*.

Os genes ribossomais contidos nas NORs exibem baixos níveis de recombinação meiótica, quando comparados com genes eucromáticos, possuindo propriedades típicas de heterocromatina constitutiva podendo ser considerado um loco heterocromático repetitivo. A NOR, por localizar-se em heterocromatina constitutiva, pode induzir PEV em genes eucromáticos colocados na sua proximidade (Gatti & Pimpinelli, 1992).

Os genes de rDNA apresentam três características principais durante o processo de politenização dos cromossomos em *Drosophila*: a) sofrem baixa replicação; b) a politenização é independente do número de NORs diplóide e c) ocorre uma replicação desigual das unidades repetidas das NOR (Franz et al., 1983). O processo de replicação desigual está envolvido em um mecanismo de aumento no número de genes ribossomais chamado compensação. Compensação normalmente ocorre quando uma única NOR está presente no cromossomo X, como em machos X/0 ou em fêmeas X/X_{NO}. Nestas moscas, o nível de rDNA é mais alto do que o encontrado em moscas 2NOR. Este aumento na redundância não tem nenhum efeito fenotípico, não é herdável, e não ocorre em machos X_{NO}/Y. Um mecanismo para explicar este comportamento, seria que em tecidos politênicos os genes ribossomais não ficam subreplicados. O mesmo número de genes ribossomais é encontrado em tecidos politênicos X/0 e X/X, enquanto que o nível de rDNA em células diplóides permanece proporcional ao número de NORs. Moscas com rDNA X/0 fariam um ciclo à mais de replicação durante a politenização do que moscas X/X (Lang & Dawid, 1980).

O número de genes ribossomais pode variar tanto intraespecificamente como entre espécies. No entanto, as seqüências tendem a sofrer uma homogeneização espécie-específica, o que demonstra a característica de evolução em concerto dos genes ribossomais, como discutido anteriormente (Dover, 1994). Embora os locos *bobbed* do cromossomo X e Y contribuam para a produção de rRNA, aproximadamente 150 genes são suficientes para produzir indivíduos do tipo selvagem. Abaixo deste número (entre 90-110 cópias), os mutantes apresentam fenótipo que inclui cerdas extremamente

curtas e finas e aumento no tempo de desenvolvimento, refletindo o decréscimo da habilidade da célula na síntese de proteínas. Arranjos com menos de 90 cópias são letais (Hawley & Marcus, 1989).

Em indivíduos geneticamente normais, a redundância do *rDNA* é geralmente estável. A taxa de reversões espontâneas do alelo *bb²*, que leva aproximadamente 110 cópias dos genes, para *bb⁺* é menor do que um em vinte mil. Esta expressiva estabilidade, no entanto, pode sofrer alterações. Alterações na redundância do *rDNA* do cromossomo X ocorrem em alta frequência nas linhagens germinais de machos que levam um cromossomo Y *bobbed-deficiente* (*Ybb* ou *Ybb⁺*). Estas mudanças na redundância podem ser observadas como reversão de *bb* para *bb⁺* e são o resultado de acréscimo herdável na redundância do *rDNA*. Este processo que promove ou facilita este aumento na redundância dos genes ribossomais é conhecido como **magnificação** (Hawley & Marcus, 1989). O principal mecanismo envolvido na magnificação, seriam trocas desiguais entre cromátides irmãs, através de recombinação induzida especificamente entre *rDNA*, sendo que os mecanismos que induzem estas trocas não estão ainda elucidados (Komma & Atwood, 1994).

Alguns dos genes *rDNA*, os *rDNAs* 28S, são interrompidos por dois retroelementos sem-LTRs, *R1* e *R2* (Jakubczak et al., 1991), que foram inicialmente chamados de seqüências de inserção do tipo I e II, respectivamente (Granadino et al., 1996). Um grande número de espécies de insetos (43 espécies de 9 ordens diferentes), apresenta retroelementos *R1* e *R2* inseridos em genes *rRNA* 28S, variando o número de inserções em poucos genes até em mais de 50% dos genes 28S. Esta presença em várias espécies demonstra que ou o retroelemento invadiu o genoma destes organismos antes da sua radiação e se manteve estável por mais de 300 milhões de anos, ou foi capaz de se transferir horizontalmente (Jakubczak et al., 1991).

Estes retroelementos diferem na sua distribuição cromossômica. Os *R1* (ISI) são encontradas nos genes *rDNA* do cromossomo X, e os *R2* (ISII) são encontrados nos genes *rDNA* de ambos os cromossomos X e Y. No entanto, algumas inserções ISI são também encontradas fora dos genes *rDNA* no cromocentro. Inserções do tipo I de 5kb do gene 28S apresentam alterações

no tamanho que podem gerar *crossing-over* desigual (Rae, 1981). Um fragmento correspondente ao TE utilizado como sonda em hibridação *in situ*, demonstrou que, além de existirem múltiplas cópias no genoma de *D. melanogaster* em regiões eucromáticas, também ocorrem diferenças no número e na localização em diferentes linhagens, sugerindo que o elemento está móvel (Bell et al., 1985). Esta mobilidade do retroelemento foi recentemente confirmada em *D. melanogaster*, onde 300 novos eventos de inserção e eliminação foram registrados ao longo de 350 gerações de 19 linhagens (Pérez-González & Eickbush, 2002).

O *cluster* de rDNA tem crucial importância para a meiose em machos de *D. melanogaster*. O pareamento meiótico dos cromossomos X e Y nos machos necessita dos espaçadores intergênicos dos genes ribossomais (Gatti & Pimpinelli, 1992). Estudos sobre o papel dos espaçadores do rDNA e das seqüências de unidades transcricionais no pareamento meiótico dos cromossomos X-Y de *Drosophila melanogaster*, têm demonstrado que 240pb dos "repeats" IGS (espaçador intergênico) da NOR tem um papel importante no pareamento meiótico. O pareamento dos cromossomos X e Y, sob o ponto de vista citológico, ocorre entre a heterocromatina centromérica do X (Xh) e a base do braço curto do Y, regiões que correspondem às NORs de ambos os cromossomos (Ren et al., 1997).

Existem atualmente duas possibilidades para explicar, em nível molecular, como as IGS podem determinar o pareamento meiótico. Uma delas seria a de que o pareamento envolveria uma seqüência "pareadora especial", localizada junto às repetições IGS de 240pb e que esta seria reconhecida por uma proteína ou complexo protéico que promoveria o pareamento. A outra possibilidade seria a de que o pareamento pode ser mais estrutura-específico do que sítio-específico. Um atrativo especial para esta idéia é que este modelo pode envolver pareamento de promotores ativos. Cada repetição de 240pb contém uma cópia perfeita do promotor para DNA polimerase I e este tipo de repetição de promotor tem se mostrado transcricionalmente ativa na NOR nativa e nas inserções transgênicas (Ren et al., 1997). A recombinação meiótica é geralmente ausente em machos de

Drosophila, embora ocasionalmente possa ser observada em baixa frequência entre os cromossomos X e Y ou X e X (Hawley & Marcus, 1989).

As questões envolvendo pareamento entre as regiões de rDNA, principalmente as trocas desiguais, levantam alguns aspectos importantes em relação ao processo de evolução em concerto. A análise das regiões espaçadoras dos genes ribossomais tem revelado que o processo de evolução destas seqüências pode ser diferente, quando comparado com os demais genes nucleares, não seguindo o caminho da homogeneização. A análise de regiões IGS e ITS em diferentes populações de *D. melanogaster*, revelaram padrões contrastantes de homogeneização, apesar de estarem localizadas na mesma unidade de rDNA. Baseado no papel das regiões IGS no pareamento dos cromossomos X e Y, o mecanismo de trocas entre uma única fita de DNA pode explicar as diferenças nas trajetórias evolutivas seguidas por estas regiões (Polanco et al., 2000).

Considerando-se que os genomas nucleares são extremamente conservados entre taxa distantes e essencialmente entre espécies aparentadas, como a asiática *D. melanogaster* e a neotropical *D. willistoni* (ambos membros do mesmo subgênero *Sophophora*), o potencial do DNA repetitivo para controlar diferencialmente a expressão de genomas similares, bem como as grandes diferenças ecológicas entre estes organismos, esta Tese tem os seguintes objetivos.

1. 2. OBJETIVOS

1. Isolar do DNA genômico de duas linhagens de *D. willistoni* (WIP-4 e 17A2), diferentes fragmentos gerados pela clivagem desses DNAs com as enzimas de restrição *AluI* e *HaellI*, a fim de caracterizar a natureza molecular destas bandas através de clonagem e seqüenciamento, avaliando possíveis diferenças intra-populacionais.
2. Analisar a distribuição *in situ* dos fragmentos clonados do genoma de *D. willistoni* em WIP-4 e 17A2, buscando estabelecer associação entre estas seqüências e os resultados anteriormente obtidos por Garcia (1997), através de técnicas de bandamento em cromossomos politênicos desta espécie com as enzimas *AluI* e *HaellI*.
3. Explicar o padrão sexo-específico que ocorre ao clivarmos o DNA genômico de *D. willistoni* com as enzimas *AluI* e *HaellI*.
4. Verificar a presença ou não no genoma de *D. willistoni* dos retroelementos *HeT-A* e *TART*, responsáveis pela formação dos telômeros em *D. melanogaster*, na procura de uma possível associação destes retroelementos com DNA telomérico, caracterizado pelas técnicas de bandamento.

1. 3. Referências Bibliográficas

- Adams, M.D., E.S. Celniker, R.A. Holt, *et al.* 2000. The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science* 287: 2185-2195.
- Alberts, B., D. Bray., J. Lewis., M. Raff., K. Roberts & J.D. Watson, 1997. Controle da Expressão Gênica in Capítulo 9. *Biologia Molecular da Célula*. 3. ed., Porto Alegre: Artes Médicas, 1294 p.
- Arrighi, F.E. & T.C. Hsu, 1971. Localization of heterochromatin in human chromosomes. *Cytogenetics* 10: 81-86.
- Ashburner, M., 1989. Molecular Biology. Chapter 6 in *Drosophila*, a laboratory handbook. Cold Spring Harbor Laboratory Press. USA. 1331p.
- Ayala, F.J. & J.R. Powell, 1972. Allozymes as diagnostic character of sibling species of *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 69: 1094-1096.
- Baimai, V., 1998. Heterochromatin accumulation and karyotypic evolution in some dipteran insects. *Zool. Studies* 37(2): 75-88.
- Baltimore, D., 1981. Gene conversion: some implications for immunoglobulin genes. *Cell* 24: 592-594 *apud* Graur, D. & W.H. Li, 1999. Gene Duplication, exon shuffling, and concerted evolution. Chapter 6. *In: Fundamentals of molecular evolution*. Sinauer Associates, Inc., Publishers. Sunderland, Massachusetts, pp.480.
- Barlow, D.P., 1995. Gametic imprinting in mammals. *Science* 270: 1610-1613 *apud* Maggert, K.A. & K.G. Golic, 2002. The Y chromosome of *Drosophila melanogaster* exhibits chromosome-wide imprinting. *Genetics* 162: 1245-1258.
- Bartolomé, C., X. Maside & B. Charlesworth, 2002. On the abundance and distribution of transposable elements in the genome of *Drosophila melanogaster*. *Mol. Biol. Evol.* 19: 926-937 *apud* Dimitri, P., J. Nikolaj & B. Arcà, 2003. Colonization of heterochromatic genes by transposable elements in *Drosophila*. *Mol. Biol. Evol.* 20(4): 503-512.
- Bell, J.R., A.M. Bogardus, T. Schmidt & M. Pellegrini, 1985. A new copia-like transposable element found in a *Drosophila* rDNA gene unit. *Nucl. Acid. Res.* 13(11): 3861-3871.

- Bender, J., 1998. Cytosine methylation of repeated sequences in eukaryotes: the role of DNA pairing. *TIBS* 23: 252-256.
- Berg, P. & M. Singer, 1992. Some genes move around in Chapter 8, p. 276. *Dealing with genes. The language of heredity.* University Science Books, California.
- Bestor, T. H. & V.M. Ingram, 1983. Two DNA methyltransferases from murine erythroleukemia cells: purification, sequence specificity, and mode of interaction with DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80: 5559-5563 *apud* Kunert, N., J. Marhold, D. Stach & F. Lyko, 2003. A Dnmt2-like protein mediates DNA methylation in *Drosophila*. *Development* 130: 5083-5090.
- Bianchi, M.S., N.O. Bianchi., G.E. Pantelias & S. Wolff, 1985. The mechanism and pattern of banding induced by restriction endonucleases in human chromosomes. *Chromosoma* 91: 131-136.
- Biessmann, H. & J.M. Mason, 1997. Telomere maintenance without telomerase. *Chromosoma* 106: 63-69.
- Birch, L.C. & B. Battaglia, 1956. Selection in *Drosophila willistoni* in relation to food. *Evolution* 11: 94-105.
- Bonorino, C.B.C., M. Pereira, C.E.V. Alonso, V.L.S. Valente & E. Abdelhay, 1993. *In situ* mapping of the hsp70 locus in seven species of the *willistoni* group of *Drosophila*. *Rev. Brasil. Genet.* 16 (3): 561-571.
- Bonorino, C.B.C., T.C. Silva, E. Abdelhay & V.L.S. Valente, 1993. Heat shock genes in the *willistoni* group of *Drosophila*: induced puffs and proteins. *Cytobios* 73: 49-64.
- Bridges, C.B., 1935. Salivary chromosomes maps. *J. Hered.* 26: 60-64 *apud* John, B., 1988. The biology of heterochromatin in Chapter I. Heterochromatin. Molecular and structural aspects. 1st ed. Ed. Verma, R.S. Cambridge University Press, New York, Vol. 1: 1-147.
- Brown, D.D. & K. Sugimoto, 1973. 5S DNAs of *Xenopus laevis* and *Xenopus mulleri*: Evolution of tandem genes. *J. Mol. Biol.* 63: 57-73 *apud* Graur, D., W.H. Li, 1999. Gene Duplication, exon shuffling, and concerted evolution. Chapter 6 in *Fundamentals of molecular evolution.* Sinauer Associates, Inc., Publishers. Sunderland, Massachusetts, 480 p.
- Brown, S.W., 1966. Heterochromatin. *Science* 151: 417-425.

- Brutlag, D.L., 1980. Molecular arrangement and evolution of heterochromatic DNA. *Ann. Rev. Genet.* 14: 121-144.
- Burla, H., B. Da Cunha, A.R. Cordeiro, T. Dobzhansky, C. Malagolowkin & C. Pavan, 1949. The *willistoni* group of sibling species of *Drosophila*. *Evolution* 3: 300-314.
- Cáceres, M., J.M. Ranz, A. Barbadilla, M. Long & A. Ruiz, 1999. Generation of a widespread *Drosophila* inversion by a transposable element. *Science* 285: 415-418.
- Cáceres, M., M. Puig & A. Ruiz, 2001. Molecular characterization of two natural hotspots in the *Drosophila buzzatii* genome induced by transposon insertions. *Genome Res.* 11: 1353-1364.
- Cáceres, M.; RANZ, J. M.; BARBADILLA, A.; LONG, M.; RUIZ, A., 1999. Generation of a widespread *Drosophila* inversion by a transposable element. *Science* 285: 415-418.
- Capy, P., C. Bazin, D. Hlguet & T. Lajin, 1998. Dynamics and evolution of transposable elements, Landes Biosciences, Austin, Texas. 197 p.
- Carmena, M. & C. Gonzalez, 1995. Transposable elements map in a conserved pattern of distribution extending from beta-heterochromatin to centromeres in *Drosophila melanogaster*. *Chromosoma* 103: 676-684.
- Carson, H.L., 1965. Chromosomal morphism in geographically widespread species of *Drosophila* in *The Genetics of Colonizing Species*. H.G. Baker & G.L. Stebbins (eds) Academic Press, New York & London. p. 503-527.
- Casacuberta, E. & M.L. Pardue, 2002. Coevolution of telomeric retrotransposons across *Drosophila* species. *Genetics* 161: 1113-1124.
- Charlesworth, B. & C.H. Langley, 2003. The population genetics of *Drosophila* transposable elements. *Annu. Rev. Genet.* 23: 251-257 *apud* Dimitri, P., J. Nikolaj & B. Arcà, 1989. Colonization of heterochromatic genes by transposable elements in *Drosophila*. *Mol. Biol. Evol.* 20(4): 503-512.
- Chen, R.Z., U. Peterson, C. Beard, L. Jackson-Grusby & R. Jaenisch, 1998. DNA hypomethylation leads to elevated mutation rates. *Nature* 395: 89-93 *apud* Weissmann, F., I. Muyrers-Chen, T. Musch, D. Stach, M. Wiessler, R. Paro & F. Lyko, 2003. DNA hypermethylation in *Drosophila melanogaster* causes

- irregular chromosome condensation and disregulation of epigenetic histone modifications. *Mol. Cell. Biol.* 23(7): 2577-2586.
- Cohen, S., K. Yacobi & D. Segal, 2003. Extrachromosomal circular DNA of tandemly repeated genomic sequences in *Drosophila*. *Gen. Res.* 13: 1133-1145.
- Colot, V. & J.L. Rossignol, 1999. Eukariotic DNA methylation as an evolutionary device. *BioEssays* 21: 402-411 *apud* Kunert, N., J. Marhold, , D. Stach & F. Lyko, 2003. A Dnmt2-like protein mediates DNA methylation in *Drosophila*. *Development* 130: 5083-5090.
- Crouse, H.V., 1960. The controlling element in sex chromosome behaviour in *Sciara*. *Genetics* 45: 1429-1443 *apud* Lyko, F. & R. Paro, 1999. Chromosomal elements conferring epigenetic inheritance. *BioEssays* 21: 824-832.
- Csink, A.K. & S. Henikoff, 1998. Something from nothing: the evolution and utility of satellite repeats. *Trends Genet.* 14: 200-204 *apud* Ugarkovic, D. & M. Plohl, 2002. Variation in satellite DNA profiles-causes and effects. *EMBO J.* 21(22): 5955-5959.
- Da Cunha, A.B., T. Dobzhansky, O. Pavlovsky & B. Spassky, 1959. Genetics of natural populations. XXVIII. Supplementary data on the chromosomal polymorphism in *Drosophila willistoni* in its relation to the environment. *Evolution* 13: 389-404.
- Da Cunha, A.B. & T. Dobzhansky, 1954. A further study of chromosomal polymorphism of *Drosophila willistoni* in its relation to the environment. *Evolution* 8: 119-134.
- Da Cunha, A.B., H. Burla & T. Dobzhansky, 1950. Adaptive chromosomal polymorphism in *Drosophila willistoni*. *Evolution* 4: 212-235.
- De Toni, D.C. & P.R.P. Hofmann, 1995. Preliminary taxonomic survey of the genus *Drosophila* (Diptera, Drosophilidae) at Morro da Lagoa da Conceição; Santa Catarina Island; Brazil. *Rev. Brasil. Biol.* 55(3): 347-350.
- De Toni, D.C., 2002. Estudo de assembléias de drosofilídeos em áreas continentais e de ilhas cobertas por vegetação de Mata Atlântica de Santa Catarina, Brasil in Estudo da variabilidade genética e ecológica de comunidades de *Drosophila* em regiões de Mata Atlântica de ilhas do

- continente de Santa Catarina. Tese de Doutorado, UFRGS. Porto Alegre, RS. 182 p.
- Dernburg, A.F., J.W. Sedat, R.S. Hawley, 1996. Direct evidence of role for heterochromatin in meiotic chromosome segregation. *Cell* 86: 135-146.
- Dimitri, P., J. Nikolaj & B. Arcà, 2003. Colonization of heterochromatic genes by transposable elements in *Drosophila*. *Mol. Biol. Evol.* 20(4): 503-512.
- Dobzhansky, T. & J.R. Powell, 1975. The *willistoni* group of sibling species of *Drosophila* in Handbook of Genetics. New York: Plenum Publ Corp 3: 539-622.
- Dobzhansky, Th. & C. Pavan, 1950. Local and sazonal variation in frequencies of species of *Drosophila* in Brazil. *J. An. Ecol.* 19: 1-14.
- Dover, G.A., 1982. Molecular drive: A cohesive mode of species evolution. *Nature* 299: 111-117 *apud* Graur, D. & W.H. Li, 1999. Gene Duplication, exon shuffling, and concerted evolution. Chapter 6 in Fundamentals of molecular evolution. Sinauer Associates, Inc., Publishers. Sunderland, Massachusetts, 480 p.
- Dover, G.A., 1994. Concerted evolution, molecular drive and natural selection. *Curr. Biol.* 4: 1165-1166.
- Eissenberg, J.C. & S.C. Elgin, 2000. The HP1 protein family: getting a grip on chromatin. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 10: 204-210 *apud* Grewal, S.I.S. & S.C.R. Elgin, 2002. Heterochromatin: new possibilities for the inheritance of structure. *Curr. Opin Genet. Dev.* 12: 178-187.
- Ellison, J.R. & H.J. Barr, 1972. Quinacrine fluorescence of specific chromosome regions. *Chromosoma* 36: 375-390.
- Franz, G., W. Kunz & C. Grimm, 1983. Determination of the Region of rDNA Involved in Polytenization in Salivary Glands of *Drosophila hydei*. *Mol. Gen. Genet.* 191: 78-80.
- Fujiwara, A., S. Abe, E. Yamaha, F. Yamazaki, M.C. Yoshida, 1998. Chromosomal localization and heterochromatin association of ribosomal RNA gene loci and silver-stained nucleolar organizer regions in salmonid fishes. *Chromosome Res.* 6(6): 463-471.
- Gall, G.J., E.H. Cohen & M.L. Polan, 1971. Repetitive DNA sequences in *Drosophila*. *Chromosoma* 33: 319-344.

- Garcia, R.N., 1997. Estudo da organização estrutural dos cromossomos politênicos de *Drosophila willistoni* através de métodos de bandamento. Dissertação de Mestrado. Curso de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular. UFRGS. Porto Alegre, 116 p.
- Gatti, M. & S. Pimpinelli, 1992. Functional elements in *Drosophila melanogaster* heterochromatin. *Annu. Rev. Genet.* 26: 239-275.
- Gersh, E.S., 1973. Studies on the *sal* locus in *Drosophila subobscura*. III. The molecular pattern of DNA in active chromosome regions. *Can. J. Genet. Cytol.* 15: 497-507 *apud* Zhimulev, E., 1998. Polytene chromosomes, heterochromatin and position effect variegation in *Advances in Genetics*. Hall, J. C.; Friedmann, T.; Dunlap, J. C.; Giannelli, F. eds. Academic Press 37 : 555 p.
- Gilbert, D., J. Hirsh & T.R.F. Wright, 1984. Molecular mapping of a gene cluster flanking the *Drosophila Dopadecarboxylase* gene. *Genetics* 106: 679-694.
- Gilbert, S.F., 2000. The genetics core development: differential gene expression in Chapter 5. *Developmental Biology*; sixth edition. Sinauer Associates, Inc., Publishers Sunderland, Massachusetts, p. 109-141.
- Golic, K.G, M.M. Golic & S. Pimpinelli, 1998. Imprinted control of gene activity in *Drosophila*. *Curr. Biol.* 8: 1273-1276 *apud* Maggert, K.A. & K.G. Golic, 2002. The Y chromosome of *Drosophila melanogaster* exhibits chromosome-wide imprinting. *Genetics* 162: 1245-1258.
- Goñi, B., M.E. Martinez & P. Daguerre, 1997. Studies of two *Drosophila* (Diptera, Drosophilidae) communities from urban Montevideo, Uruguay. *Rev. Bras. de Ent.* 41(1): 89-93.
- Goñi, B., M.E. Martinez, V.L.S. Valente & C.R. Vilela, 1998. Preliminary data on the *Drosophila* species (Diptera, Drosophilidae) from Uruguay. *Rev. Bras. de Ent.* 42(3/4): 131-140.
- Gottschalk, M., 2004. Levantamento taxonômico das espécies da família Drosophilidae (Diptera) em áreas de mata Atlântica e urbanas na cidade de Florianópolis, SC, Brasil in *Influência da urbanização e da sazonalidade sobre assembléias de Drosophilidae na cidade de Florianópolis, SC, Brasil*. Dissertação de Mestrado, UFRGS. Porto Alegre, RS. 90pp.

- Granadino, B., L.O.F. Penalva & L. Sanchez, 1996. Indirect evidence of alteration in the expression of the rDNA genes in interspecific hybrids between *Drosophila melanogaster* and *Drosophila simulans*. *Mol. Gen. Genet.* 250: 89-96.
- Graur, D. & W.H. Li, 1999. Gene Duplication, exon shuffling, and concerted evolution. Chapter 6 in *Fundamentals of molecular evolution*. Sinauer Associates, Inc., Publishers. Sunderland, Massachusetts, 480 p.
- Grewal, S.I.S. & S.C.R. Elgin, 2002. Heterochromatin: new possibilities for the inheritance of structure. *Curr. Opin Genet. Dev.* 12: 178-187.
- Gruenbaum, Y., H. Cedar & A. Razin, 1982. Substrate and sequence specificity of a eukaryotic DNA methylase. *Nature* 295: 620-622 *apud* Kunert, N., J. Marhold, D. Stach & F. Lyko, 2003. A Dnmt2-like protein mediates DNA methylation in *Drosophila*. *Development* 130: 5083-5090.
- Grunstein, M., 1997. Histone acetylation in chromatin structure and transcription. *Nature* 389: 349-352.
- Guerra, M.S., 1988. *Introdução à citogenética geral*. Editora Guanabara, 142pp.
- Haller, B. & R.C. Woodruff, 2000. Varied expression of a Y-linked P(w⁺) insert due to imprinting in *Drosophila melanogaster*. *Genome* 43: 285-292 *apud* Maggert, K.A. & K.G. Golic, 2002. The Y chromosome of *Drosophila melanogaster* exhibits chromosome-wide imprinting. *Genetics* 162: 1245-1258.
- Hawley, S.R. & C.H. Marcus, 1989. Recombinational controls of rDNA redundancy in *Drosophila*. *Ann. Rev. Genet.* 23: 87-120.
- Heitz, E., 1928. Das Heterochromatin der Moose. *Jb. Wiss. Bot.* 69: 762-818 *apud* Zhimulev, E., 1998. Polytene chromosomes, heterochromatin and position effect variegation in *Advances in Genetics*. Hall, J. C.; Friedmann, T.; Dunlap, J. C.; Giannelli, F. eds. Academic Press 37: 555 p.
- Henning, W., 1999. Heterochromatin. *Chromosoma* 108: 1-9.
- Hoskins, R.A., C.D. Smith, J.W. Carlson, A.B. Carvalho, A. Halpern, J.S. Kaminker, C. Kennedy, C.J. Mungall, B.A. Sullivan, G.G. Sutton, J.C. Yasuhara, B.T. Wakimoto, E.W. Myers, S.E. Celniker, G.M. Rubin & G.H. Karpen, 2002.

- Heterochromatic sequences in a *Drosophila* whole-genome shotgun assembly. *Gen. Biol.* 3(12): 0085.1-0085.16.
- Hotchkiss, R.D., 1948. The quantitative separation of purines, pyrimidines, and nucleosides by paper chromatography. *J. Biol. Chem.* 175: 315-332 *apud* Gilbert, S.F., 1994. Transcriptional regulation of gene expression-The activation of chromatin in Chapter 11. *Developmental Biology*; fourth edition. Sinauer Associates, Inc., Publishers Sunderland, Massachusetts, p. 411-437.
- Hsieh, C.L., 1999. In vivo activity of murine de novo methyltransferases, Dnmt3a and Dnmt3b. *Mol. Cell Biol.* 19: 8211-8218 *apud* Kunert, N., J. Marhold, D. Stach & F. Lyko, 2003. A Dnmt2-like protein mediates DNA methylation in *Drosophila*. *Development* 130: 5083-5090.
- Hsu, T.C., 1973. Longitudinal differentiation of chromosomes. *Annu. Rev. Genet.* 7: 153-176.
- Hung, M.S., N. Karthikeyan, B. Huang, H.C. Koo, J. Kinger & J. Shen, 1999. *Drosophila* proteins related to vertebrate DNA (5-cytosine) methyltransferases. *PNAS* 96(21): 11940-11945.
- Jakubczak, J.L., W.D. Burke & T.H. Eickbush, 1991. Retrotransposable elements R1 and R2 interrupt the rRNA genes of most insects. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 3295-3299.
- James, T.C., J.C. Eisenberg, C. Craig, V. Dietrich, A. Hobson & S.C. Elgin, 1989. Distribution patterns of HP1, a heterochromatin-associated nonhistone chromosomal protein of *Drosophila*. *Eur. J. Cell Biol.* 50: 170-180 *apud* Grewal, S.I.S. & S.C.R. Elgin, 2002. Heterochromatin: new possibilities for the inheritance of structure. *Curr. Opin Genet. Dev.* 12: 178-187.
- John, B. & M. King, 1983. Population cytogenetics of *Atractomorpha similis*. I. C band variation. *Chromosoma* 88: 57-68.
- John, B., 1988. The biology of heterochromatin in Chapter I. Heterochromatin. Molecular and structural aspects. 1st ed. Vol. 1: 1-147 (Ed: Verma, R. S.) Cambridge University Press, New York.
- John, B., M. King, 1983. Population cytogenetics of *Atractomorpha similis*. I. C band variation. *Chromosoma* 88: 57-68.

- Jones, K.W., 1970. Chromosomal and nuclear localization of mouse satellite DNA in individual cells. *Nature* 225: 912-15.
- Kahn, T., M. Savitsky & P. Georgiev, 2000. Attachment of *HeT-A* sequences to chromosome termini in *Drosophila melanogaster* may occur by different mechanism. *Mol. Cell. Biol.* 20: 7634-7642.
- Kaufmann, B.P., 1939. Distribution of induced breaks along the X chromosome of *Drosophila melanogaster*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 25: 571-77 *apud* Gatti, M. & S. Pimpinelli, 1992. Functional elements in *Drosophila melanogaster* heterochromatin. *Annu. Rev. Genet.* 26: 239-275.
- Kidwell, M.G. & D. Lisch, 1997. Transposable elements as source of variation in animals and plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 7704-7711.
- Kidwell, M.G. & D. Lisch, 2002. Transposable elements as sources of variation in animals and plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 11428-11433.
- Komma, D.J. & K.C. Atwood, 1994. Magnification in *Drosophila*: evidence for an inducible rDNA-specific recombination system. *Mol. Gen. Genet.* 242(3): 321-326.
- Krimbas, C.D. & J.R. Powell, 1992. *Drosophila* Inversion Polymorphism. Boca Raton, Florida, CRC Press, 560p.
- Kunert, N., J. Marhold, D. Stach & F. Lyko, 2003. A Dnmt2-like protein mediates DNA methylation in *Drosophila*. *Development* 130: 5083-5090.
- Lamond, A.I. & W.C. Earnshaw, 1998. Structure and function in the nucleus. *Science* 280: 547-553.
- Lanchner, M., D. O'Carroll, S. Rea, K. Mechtler & T. Jenuwein, 2001. Methylation of histone H3 lysine 9 creates a binding site for HP1 proteins. *Nature* 410: 116-120.
- Le, M.H., D. Duricka & G.H. Karpen, 1995. Islands of complex DNA are widespread in *Drosophila* centric heterochromatin. *Genetics* 141: 283-303.
- Leach, T.J., L.C. Heather, M.G. Wotring, R.L. Dilwith & R.L. Glister, 2000. Replication of heterochromatin and structure of polytene chromosomes. *Mol. Cell. Biol.* 20(17): 6308-6316.
- Lee, J.M. & E.L. Sonnhammer, 2003. Genomic gene clustering analysis of pathways in eukaryotes. *Genome Res.* 13(5): 875-882.

- Lim, J.K., 1988. Intrachromosomal rearrangements mediated by *hobo* transposons in *Drosophila melanogaster*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 9153-9157.
- Liu, K., Y.F. Wang, C. Cantemir, & M.T. Muller, 2003. Endogenous assays of DNA methyltransferases: Evidence for differential activities of DNMT1, DNMT2, and DNMT3 in mammalian cells in vivo. Mol. Cell. Biol. 23: 2709-2719 *apud* Kunert, N., J. Marhold, , D. Stach & F. Lyko, 2003. A Dnmt2-like protein mediates DNA methylation in *Drosophila*. Development 130: 5083-5090.
- Lloyd, V., 2000. Parental imprinting in *Drosophila*. Genetica 109: 35-44.
- Lohe, A.R. & D.L. Brutlag, 1986. Multiplicity of satellite DNA sequences in *Drosophila melanogaster*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83: 696-700.
- Long, E.O. & I.B. Dawid, 1980. Repeated genes in eukaryotes. Ann. Rev. Biochem. 49: 727-764.
- Lyko, F. & R. Paro, 1999. Chromosomal elements conferring epigenetic inheritance. BioEssays 21: 824-832.
- Lyko, F., 2001. DNA methylation learns to fly. Trends Genet. 17(4): 169-172.
- Lyko, F., B.H. Ramsahoye & R. Jaenisch, 2000. DNA methylation in *Drosophila melanogaster*. Nature 408(30): 538-540.
- Lyko, F., B.H. Ramsahoye, H. Kashevsky, M. Tudor, M.A. Mastrangelo, T.L. Orr-Weaver & R. Jaenisch, 1999. Mammalian (cytosine-5) methyltransferases cause genomic DNA methylation and lethality in *Drosophila*. Nat. Genet. 23: 363-366 *apud* Kunert, N., J. Marhold, , D. Stach & F. Lyko, 2003. A Dnmt2-like protein mediates DNA methylation in *Drosophila*. Development 130: 5083-5090.
- Lyon, M., 1999. Imprinting and X-chromosome inactivation, pp. 73-90 in Results and Problems in Cell Differentiation, edited by R. Ohlsson. Springer, New York *apud*.
- Maggert, K.A. & K.G. Golic, 2002. The Y chromosome of *Drosophila melanogaster* exhibits chromosome-wide imprinting. Genetics 162: 1245-1258.
- Malik, H.S., W.D. Burke & T.H. Eickbush, 1999. The age and evolution of non-LTR retrotransposable elements. Mol. Biol. Evol. 16: 793-805.

- Mandrioli, M. & N. Volpi, 2003. The genome of the lepidopteran *Mamestra brassicae* has a vertebrate-like content of methyl-cytosine. *Genetica* 119: 187-191.
- McNairn, A.J. & D.M. Gilbert, 2003. Epigenomic replication: linking epigenetics to DNA replication. *BioEssays* 25(7): 647-656.
- Mezzanotte, R. & L. Ferrucci, 1983. The metaphase banding pattern produced in the chromosomes of *Culiseta longiareolata* (Diptera: Culicidae) by *AluI* restriction endonucleases of actinomycin-D treatment followed by acridin-orange staining. *Genetica* 26: 47-50.
- Mezzanotte, R., 1978. Differential banding induced in polytene chromosomes of *Drosophila melanogaster* stained with acridine orange. *Experientia* 34: 322-323.
- Mezzanotte, R., 1986. The selective digestion of polytene and mitotic chromosome of *Drosophila melanogaster* by *AluI* and *HaeIII* restriction endonucleases. *Chromosoma* 93: 249-255.
- Mezzanotte, R., U. Bianchi & A. Marchi, 1987. *In situ* digestion of *Drosophila virilis* polytene chromosomes by *AluI* and *HaeIII* restriction endonucleases. *Genome* 29: 630-634.
- Miller, D.A., Y. Choi & O.J. Miller, 1983. Chromosome localization of highly repetitive human DNA's and amplified ribosomal DNA with restriction enzymes. *Science* 219: 395-397.
- Morgan, T.H., C.B. Bridges & J. Schultz, 1938. Constitution of the germinal material in relation to heredity. *Carnegie Inst. Wash. Yearbook* 37: 304-309
- apud* Zhimulev, E., 1998. Polytene chromosomes, heterochromatin and position effect variegation in *Advances in Genetics*. Hall, J. C., T. Friedmann, J.C. Dunlap & F. Giannelli. Eds. Academic Press 37: 555 p.
- Nagylaki, T. & T.D. Petes, 1982. Intrachromosomal gene conversion and maintenance of sequence homogeneity among repeated genes. *Genetics* 100: 315-337
- apud* Graur, D. & W.H. Li, 1999. Gene Duplication, exon shuffling, and concerted evolution. Chapter 6 in *Fundamentals of molecular evolution*. Sinauer Associates, Inc., Publishers. Sunderland, Massachusetts, 480 p.

- Okano, M., D.W. Bell, D.A. Haber & E. Li, 1999. DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for *de novo* methylation and mammalian development. *Cell* 99: 247-257 *apud* Kunert, N., J. Marhold, , D. Stach & F. Lyko, 2003. A Dnmt2-like protein mediates DNA methylation in *Drosophila*. *Development* 130: 5083-5090.
- Pardue, M.L. & P.G. De Baryshe, 2002. Telomeres and Transposable Elements. Chapter 36. *In: Mobile DNA II*, Craig, N.L., R. Craigie, M. Gellert & A.M. Lambowitz, eds. ASM Press, Washington, D.C., pp 447.
- Pardue, M.L. & P.G. De Baryshe, 2003. Retrotransposons provide an evolutionary robust non-telomerase mechanism to maintain telomeres. *Ann. Rev. Genet.* 37, p. 485-511,
- Pardue, M.L. & P.G. De Baryshe, 2003. Retrotransposons provide na evolutionary robust non-telomerase mechanism to maintain telomeres. *Ann. Rev. Genet.* 37: 485-511.
- Pardue, M.L., O.N. Danilevskaya, K. Lowenhaupt, F. Slot & K. Traverse, 1996. *Drosophila* telomeres : new views on chromosome evolution. *TIG* 12(2): 48-51.
- Pardue, M.L., S.A. Gerbi, R.A. Eckhardt & J.G. Gall, 1970. Cytological localization of DNA complementary to ribosomal RNA in Polytene Chromosomes of Diptera. *Chromosoma* 29: 268-290.
- Partridge, J.F., B. Borgstrom, R.C. Allshire, 2000. Distinct protein interaction domains and protein spreading in a complex centromere. *Genes Dev.* 14: 783-791.
- Pérez-González, C. & T.H. Eickbush, 2002. Rates of R1 and R2 retrotransposition and elimination from the rDNA locus of *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 162: 799-811.
- Pieczarka, J., 1995. A natureza e a variabilidade da heterocromatina constitutiva em primatas Sul-americanos. Tese de Doutorado. Curso de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular. UFRGS. Porto Alegre. 190 pp.
- Pilgrim, D., 1998. CeRep25B forms chromosome-specific minisatellite arrays in *Caenorhabditis elegans*. *Genome Res.* 8: 1192-1201.

- Polanco, C., A. González & G.A. Dover, 2000. Patterns of variation in the intergenic spacers of ribosomal DNA in *Drosophila melanogaster* support a model for genetic exchanges during X-Y pairing. *Genetics* 155: 1221-1229.
- Polanco, C., A.I. González, A. Fuente & G.A. Dover, 1998. Multigene family of ribosomal DNA in *Drosophila melanogaster* reveals contrasting patterns of homogenization for IGS and ITS spacer regions: a possible mechanism to resolve this paradox. *Genetics* 149: 243-256.
- Pollack, J.R. & V.R. Iyer, 2002. Characterizing the physical genome. *Nature Genet.* 32: 515-521.
- Rae, P.M.M., 1970. Chromosomal distribution of rapidly reannealing DNA in *Drosophila melanogaster*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 67: 1018-1025.
- Rae, P.M.M., 1981. Coding region deletions associated with the major form of rDNA interruption in *Drosophila melanogaster*. *Nucl. Ac. Res.* 9(19) 4997-5010.
- Rakyan, V. & E. Whitelaw, 2003. Transgenerational epigenetic inheritance. *Curr. Biol.* 13(1)R6.
- Reddy, M.N., L.Y. Tang, T.L. Lee, C.K. Shen & J. Shen, 2003. A candidate gene for *Drosophila* genome methylation. *Oncogene* 22: 6301-6303.
- Regner, L.P., M.S.O. Pereira, C.E.V. Alonso, E. Abdelhay, & V.L.S. Valente, 1996. Genomic distribution of *P* elements in *Drosophila willistoni* and search for their relationship with chromosomal inversions. *J. Hered.* 87(2): 190-211.
- Ren, X., L. Eisenhour, C. Hong, Y. Lee & B.D. McKee, 1997. Roles of rDNA spacer and transcription unit-sequences in X-Y meiotic chromosomes pairing in *Drosophila melanogaster* males. *Chromosoma* 106: 29-36.
- Ritossa, F.M., K.C. Atwood, D.L. Lindsley & S. Spiegelman, 1966. On the chromosomal distribution of DNA complementary to ribosomal and soluble RNA. *Cancer Inst. Monogr.* 23: 449-472 *apud* Graur, D. & W.H. Li, 1999. Gene Duplication, exon shuffling, and concerted evolution. Chapter 6. *In: Fundamentals of molecular evolution.* Sinauer Associates, Inc., Publishers. Sunderland, Massachusetts, pp.480.
- Rohde, C. & V.L.S. Valente, 1996. Analysis of chromosomal polymorphism and *P* elements in populations of *Drosophila willistoni*. *Braz. J. Genet.* 19(3): 128.

- Rohde, C., 2000. Polimorfismo cromossômico e elementos transponíveis em *Drosophila willistoni*. Tese de Doutorado, UFRGS. Porto Alegre, RS. 237 p.
- Rohde, C., H. Pinto Jr., V.H. Valiati, A. Schrank & V.L.S. Valente, 1994. Localization of the Cu/Zn superoxidase dismutase gene in the *Drosophila willistoni* species group by *in situ* hybridization. *Cytobios* 80: 193.
- Rossi, M.S., O.A. Reig & J. Zorzópulos, 1990. Evidence for rolling-circle replication in a major satellite DNA from the Southern American rodents of the genus *Ctenomys*. *Mol. Biol. Evol.* 7(4): 340-350.
- Santos, R.A. & V.L.S. Valente, 1990. On the occurrence of *Drosophila paulistorum* Dobzhansky & Pavan (Diptera: Drosophilidae) in an urban environment: ecologic and cytogenetic observations. *Evol. Biol.* 4: 253-268.
- Schoenherr, C.J. & S.M. Tilghman, 2000. Epigenetics in mammals in *Chromatin structure and gene expression*, 2nd ed. Edited by S.C.R. Elgin, J. L. Workman. Oxford, UK: Oxford University Press p. 252-257 *apud* Shiv, I.S. & S.C.R. Elgin, 2002. Heterochromatin: new possibilities for the inheritance of structure. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 12: 178-187.
- Schotta, G., A. Ebert, V. Krauss, A. Fischer, S.R. Hoffmann, T. Jenuwein, R. Dorn & G. Reuter, 2002. Central role of *Drosophila* SU(VAR)3-9 in histone H3-K9 methylation and heterochromatic gene silencing. *EMBO J.* 21(5): 1121-1131.
- Schultz, J., 1941. The function of heterochromatin. *Proc. 7th. Intern. Congr. Genet.* 257-262 *apud* Zhimulev, E., 1998. Polytene chromosomes, heterochromatin and position effect variegation in *Advances in Genetics*. Hall, J. C.; Friedmann, T.; Dunlap, J. C.; Giannelli, F. eds. Academic Press 37: 555 p.
- Schultz, J., 1943. Physiological aspects of genetics. *Annu. Rev. Physiol.* 5: 35-62 *apud* Zhimulev, E., 1998. Polytene chromosomes, heterochromatin and position effect variegation in *Advances in Genetics*. Hall, J. C.; Friedmann, T.; Dunlap, J. C.; Giannelli, F. eds. Academic Press 37 : 555 p.
- Schultz, J., 1947. The nature of heterochromatin. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 12: 179-191 *apud* Zhimulev, E., 1998. Polytene chromosomes, heterochromatin and position effect variegation in *Advances in Genetics*.

- Hall, J. C.; Friedmann, T.; Dunlap, J. C.; Giannelli, F. eds. Academic Press 37 : 555 p.
- Schultz, J., 1956. The relation of the heterochromatin chromosome regions to the nucleic acids of the cell. Cold. Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 21: 307-328 *apud* Zhimulev, E., 1998. Polytene chromosomes, heterochromatin and position effect variegation in Advances in Genetics. Hall, J. C.; Friedmann, T.; Dunlap, J. C.; Giannelli, F. eds. Academic Press 37 : 555 p.
- Schultz, J., 1965. Genes, differentiation and animal development. Brookhaven Symp. Biol. 18: 116-147 *apud* Zhimulev, E., 1998. Polytene chromosomes, heterochromatin and position effect variegation in Advances in Genetics. Hall, J. C.; Friedmann, T.; Dunlap, J. C.; Giannelli, F. eds. Academic Press 37 : 555 p.
- Singer, M.F., 1982. Highly repeated sequences in mammalian genomes. Int. Rev. Cytol. 76: 67-112.
- Singh, P.B. & S.D. Georgatos, 2002. HP1: Facts, open questions, and especulations. J. Estruc. Biol. 140: 10-16.
- Smeets, D.F., U. Moog, C.M. Weemaes, G. Peeters-Vaes, G.F. Merckx, J.P. Niehof & G. Hamers, 1994. ICF syndromes: a new case and review of the literature. Hum. Genet. 94: 240-246 *apud* Weissmann, F., I. Muyrers-Chen, T. Musch, D. Stach, M. Wiessler, R. Paro & F. Lyko, 2003. DNA hypermethylation in *Drosophila melanogaster* causes irregular chromosome condensation and dysregulation of epigenetic histone modifications. Mol. Cel. Biol. 23(7): 2577-2586.
- Spassky, B., R.C. Richmond, J. Perez-Salas, O. Pavlovsky, C.A Mourão, A.S. Hunter, H. Hoenigsberger, T. Dobzhansky, & F.J. Ayala, 1971. Geography of the sibling species related to *Drosophila willistoni* and of the semispecies of the *Drosophila paulistorum* complex. Evolution 25: 129-143.
- Sumner, A.T., 1972. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. Exp. Cell Res. 75: 304-306.
- Swanson, C.P., T. Merz & W.J. Young, 1987. Architecture of the chromosome: II. Eukaryotic chromosomes in Chapter 3. Cytogenetics. 2. ed. USA, Prentice-Hall, Inc. 577 p.

- Throckmorton, L.H., 1975. The phylogeny, Ecology, and Geography of *Drosophila* 3: 421-469 in Robert C. King (Ed.). Handbook of Genetics. Plenum Publ. Corp. N. York.
- Tsubota, S.I., D. Rosenberg, H. Szostak, D. Rubin & P. Schedl, 1989. The cloning of *Bar* region and *B* breakpoint in *Drosophila melanogaster*: evidence for transposon-induced rearrangement. *Genetics* 122: 881-890.
- Turleau, C. & de J. Grouchy, 1972. Caryotypes de l'homme et du chimpanzé. Comparaison de la topographie des bandes. *C. R. Acad. Sci., Paris* 274: 2355-57 *apud* Hsu, T.C., 1973. Longitudinal differentiation of chromosomes. *Annu. Ver. Genet.* 7: 153-176.
- Tweedie, S., H.H. Ng, A.L. Barlow, B.M. Turner, B. Hendrich, A. Bird, 1999. Vestigies of a methylation system in *Drosophila melanogaster*? *Nat. Genet.* 23: 389-390.
- Tweedie, S., J. Charlton, V. Clarck & A. Bird, 1997. Methylation of genomes and genes at the invertebrate-vertebrate boundary. *Mol. Cell. Biol.* 17: 1469-1475.
- Ugarkovic, D. & M. Plohl, 2002. Variation in satellite DNA profiles-causes and effects. *EMBO J.* 21(22): 5955-5959.
- Urieli-Shoval, S., Y. Gruenbaum, J. Sedat & A. Razin, 1982. The absence of detectable methylated bases in *Drosophila melanogaster* DNA. *Febs Lett.* 6(146)(1): 148-152.
- Val, F.C., C.R. Vilela & M.D. Marques, 1981. *Drosophilidae* of Neotropical region in *The Genetics and Biology of Drosophila*. Vol. 3A Ashburner M, Carson HL & Thompson Jr, JN eds. Academic Press, London, p. 123-168.
- Valente, V.L.S. & A.M. Araújo, 1985. Observations on the chromosomal polymorphism of natural populations of *Drosophila willistoni* and its association with the choice of feeding and breeding sites. *Rev. Brasil. Genet.* 8(2): 271-284.
- Valente, V.L.S. & A.M. Araújo, 1986. Chromosomal polymorphism, climatic factors, and variation in population size of *Drosophila willistoni* in southern Brazil. *Heredity* 57: 149-159.
- Valente, V.L.S., A. Ruzczyk & R.A. Santos, 1993. Chromosomal polymorphism in urban *Drosophila willistoni*. *Rev. Bras. Genet.* 16(2): 307-319.

- Valente, V.L.S., A. Ruzsczyk, R.A. Santos, C.B.C. Bonorino, B.E.P. Brum, L. Regner & N.B. Morales, 1989. Genetic and ecological studies on urban and marginal populations of *Drosophila* in the south of Brazil. *Evol. Biol.* 3: 19-35.
- Valiati, V.H. & V.L.S. Valente, 1997. Chromosomal polymorphism in urban populations of *Drosophila paulistorum*. *Braz. J. Genet.* 20(4): 567-582.
- Verma, R.S., J.P. Jacob, A. Babu, 1986. Heterochromatin organization in the nucleus of Indian muntjac (*Muntiacus muntjac*). *Can. J. Genet. Cytol.* 28: 628-630.
- Wallrath, L.L., 1998. Unfolding the mysteries of heterochromatin. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 8: 147-153.
- Wallrath, L.L., 2000. *Drosophila* telomeric transgenes provide insights on mechanisms of gene silencing. *Genetica* 109: 25-33.
- Walter, M.F., C. Jang, B. Kasravi, J. Donath, B.M. Mechler, J.M. Mason & H. Biessmann, 1995. DNA organization and polymorphism of a wild-type *Drosophila* telomere region. *Chromosoma* 104: 229-241.
- Weiler, K.S. & B.T. Wakimoto, 1995. Heterochromatin and expression in *Drosophila*. *Annu. Rev. Genet.* 29: 577-605.
- Weissmann, F., I. Muyrers-Chen, T. Musch, D. Stach, M. Wiessler, R. Paro & F. Lyko, 2003. DNA hypermethylation in *Drosophila melanogaster* causes irregular chromosome condensation and dysregulation of epigenetic histone modifications. *Mol. Cell. Biol.* 23(7): 2577-2586.
- Wheeler, M.R., 1981. The Drosophilidae: A taxonomic overview in *The Genetics and Biology of Drosophila*. Vol. 3A Ashburner M, Carson HL & Thompson Jr, JN eds. Academic Press, London, p 1-98.
- Wilkins, R.C. & J.T. Lis, 1997. Dynamics of potentiation and activation: GAGA factor and its role in heat shock gene regulation. *Nuc. Acids Res.* 25: 3963-3968 *apud* Wallrath, L.L., 2000. *Drosophila* telomeric transgenes provide insights on mechanisms of gene silencing. *Genetica* 109: 25-33.
- Yussa, M., C.E.V. Alonso & E. Abdelhay, 1994. Highly polymorphic repetitive sequences in *Rhynchosciara americana* genome. *Insect. Biochem. Molec. Biol.* 25(8): 909 - 914.

Zhimulev, E., 1998. Polytene chromosomes, heterochromatin and position effect variegation in *Advances in Genetics*. Hall, J. C.; Friedmann, T.; Dunlap, J. C.; Giannelli, F. eds. Academic Press 37 : 555 p.

CAPÍTULO 2

**Análise de bandas sexo-específicas do genoma de *Drosophila willistoni*
geradas pela clivagem com *AluI* e *HaeIII*.**

(trabalho a ser submetido ao periódico Genetica)

Análise de bandas sexo-específicas do genoma de *Drosophila willistoni* geradas pela clivagem com *AluI* e *HaeIII*.

Rosane Nunes Garcia¹, Fabiana de Oliveira Herédia², Elgion Lúcio da Silva Loreto², Vera Lúcia da Silva Valente³.

1. Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal.
2. Departamento de Biologia, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Universidade Federal de Santa Maria.
3. Departamento de Genética, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Caixa Postal 15053. CEP 91501-970 porto alegre, RS, Brasil. Fone: 55++51 33166729; Fax: 55++51 33167311; E-mail: vera.gaiesky@ufrgs.br

Key words: *D. willistoni*, DNA rico em AT, metilação.

Resumo

Entre as espécies de *Drosophila* mais bem representadas nas comunidades neotropicais encontram-se as representantes do grupo *willistoni*. *Drosophila willistoni* chama particularmente a atenção dentro do grupo por possuir uma grande "versatilidade ecológica", que se expressa pela capacidade de exploração bem sucedida de diversos tipos de ambientes, tais como matas, formações abertas e cidades, bem como de diferentes tipos de substratos. Sua distribuição geográfica vai desde o sul dos Estados Unidos (Flórida) e México na América do Norte, até o norte da Argentina. Além disso, *D. willistoni* apresenta uma grande variabilidade genética, observada através de diferentes marcadores, tais como polimorfismo cromossômico para inversões paracêntricas e polimorfismo enzimático. A fim de investigar possíveis fatores no genoma de *D. willistoni* que sejam responsáveis pela variabilidade desta espécie, iniciamos um estudo, em nível molecular, de segmentos de DNA isolados pela clivagem das enzimas de restrição *AluI* e *HaeIII*. Nossos resultados indicam que, além de inúmeras seqüências ricas em AT estarem presentes no genoma de *D. willistoni*, estas são relacionadas com metilação diferencial entre machos e fêmeas. Não foi possível esclarecer qual a função, mas este fator pode, de alguma forma, estar contribuindo para o sucesso biológico desta espécie.

Introdução

Entre as espécies de *Drosophila* mais bem representadas nas comunidades neotropicais, encontram-se as representantes do grupo *willistoni*, constituído por 6 espécies crípticas e por 19 não crípticas (Val et al 1981). Acredita-se que a origem deste grupo de espécies foi no Brasil Central (Da Cunha et al., 1950) em associação com as florestas quentes e úmidas. *Drosophila willistoni* chama particularmente a atenção dentro do grupo, por possuir uma grande "versatilidade ecológica" que se expressa pela capacidade de exploração bem sucedida de diversos tipos de ambientes, tais como matas, formações abertas (Da Cunha et al 1950, 1959; Da Cunha & Dobzhansky 1954; Dobzhansky & Powell, 1975) e cidades (Valente et al 1989; 1993; Santos & Valente 1990; Valiati & Valente 1997; Goñi et al 1997, 1998), bem como de diferentes tipos de substratos (Carson 1965; Valente & Araújo 1986). Sua distribuição geográfica vai desde o sul dos Estados Unidos (Flórida) e México na América do Norte, até o norte da Argentina (Spassky et al 1971).

Além disso, *D. willistoni* apresenta uma grande variabilidade genética observada através de diferentes marcadores, tais como polimorfismo cromossômico para inversões paracêntricas e polimorfismo enzimático. As inversões de *D. willistoni*, são distribuídas em todos os cinco braços dos cromossomos politênicos (Da Cunha et al., 1950). Quanto ao seu polimorfismo enzimático, uma variação considerável (58% de polimorfismo, em média) já foi descrita para populações desta espécie (Ayala & Powell, 1972).

Um esforço, no sentido de buscar explicações biológicas para a versatilidade ecológica e variabilidade genética encontradas no genoma de *D. willistoni*, foi feito, através de um estudo inicial de análise da estrutura dos cromossomos politênicos, usando técnicas de bandamentos com as enzimas de restrição *AluI* e *HaeIII*. Estas técnicas demonstraram a produção de um padrão de bandas positivo, ou seja, blocos específicos nos cromossomos não sofrem digestão pela ação das enzimas em vários locais nos braços cromossômicos, bem como no cromocentro (Garcia, 1997).

Em cromossomos politênicos e metafásicos de *D. melanogaster* e *D. virilis*, as técnicas de bandamento com enzimas de restrição indicam que as bandas

geradas são correspondentes a regiões que contêm diferentes famílias de DNA satélite, demonstrando que é possível localizá-las *in situ* por ação destas enzimas (Ellison & Barr, 1972; Mezzanotte, 1978; Mezzanotte, 1986; Mezzanotte et al., 1987).

O DNA satélite em *D. melanogaster* está localizado, principalmente, na heterocromatina. Esta ocupa em torno de 59 megabases (59 milhões de pares de bases-Mb) de um total de 146 Mb do genoma de fêmeas e 41 Mb do cromossomo Y de machos, que é inteiramente heterocromático (Hoskins et al., 2002). As regiões heterocromáticas são ricas em repetições curtas de DNA, 5 – 200 pares de bases, arranjadas em *tandem* (**DNA satélite**), elementos medianamente repetitivos (**Elementos de Transposição – TEs**) e algumas seqüências cópia única, bem como grupos de genes, como os de **rDNA**, que se repetem muitas vezes em um mesmo loco heterocromático (Jones 1970; Pardue & Gall, 1970; Rae, 1970; Weiler & Wakimoto, 1995). Além de presentes em regiões pericentroméricas, DNAs satélites também ocorrem em alguns sítios eucromáticos nos cromossomos politênicos de *D. melanogaster*, localizados por hibridação *in situ*, em regiões específicas dos cromossomos X, 2L e 3R (Ashburner, 1989).

Seqüências de DNA repetitivo, podem estar associadas com fatores complexos de organização para o funcionamento de genomas eucarióticos, tais como, por exemplo, a formação de compartimentos genômicos heterocromáticos importantes para o comportamento adequado dos cromossomos na mitose e meiose em *Drosophila* (Csink & Henikoff, 1998). Também como sinalizadoras de regiões que devem ser modificadas por metilação e conseqüentemente, silenciadas, como ocorre em fungos (*Neurospora crassa*). Neste caso, este mecanismo pode funcionar como defesa para silenciar DNAs invasores (tais como Elementos Transponíveis) ou silenciar duplicações de genes essenciais, que seriam letais na fase sexual destes organismos (Bender, 1998).

O isolamento de seqüências repetitivas de diversos organismos, além de *Drosophila*, pode ser feito com o auxílio de enzimas de restrição atuando sobre o DNA genômico, e a localização cromossômica destas seqüências através de hibridação *in situ*. Em *Rhynchosciara americana*, por exemplo, quando o DNA genômico de adulto é sujeito à digestão com as enzimas *EcoR1* ou *BamH1*, inúmeras bandas são visualizadas em gel de agarose. A clonagem e

seqüenciamento de uma banda de 1Kb gerada por *EcoRI* demonstraram uma família altamente polimórfica de seqüências repetitivas (duas seqüências são ricas em AT intercaladas com GC e outra tem baixa porcentagem de AT), sendo que, por hibridação *in situ* em cromossomos politênicos, estas seqüências estavam presentes nos telômeros e em algumas junções banda – interbanda, indicando função estrutural importante para estas repetições (Yussa et al., 1994).

Tendo em vista o fato de que as enzimas de restrição *AluI* e *HaeIII* produzem um padrão de bandamento em cromossomos politênicos de *D. willistoni* (Garcia, 1997), resolvemos, então, iniciar um estudo em nível molecular, na tentativa de isolar e caracterizar seqüências repetitivas do genoma desta espécie através da clivagem do DNA genômico com estas mesmas enzimas.

Material e Métodos

Estoques de *Drosophila*

As linhagens 17A2 e WIP-4 de *Drosophila willistoni* foram utilizadas neste trabalho para todas as análises. Foi feita a escolha destas duas linhagens por já terem sido utilizadas em estudos prévios com técnicas de bandamento em cromossomos politênicos com *AluI* e *HaeIII* (Garcia, 1997). Para as análises por *Southern blot*, além destas, mais 5 populações naturais, geograficamente distintas, foram utilizadas. As localidades de onde as linhagens provêm são as que seguem: Distrito de Coronilla, Montevideú, Uruguai (COR); cidade de Dois Lajeados, Estado do Rio Grande do Sul, Brasil (DLA); Ilha de Santa Catarina, Estado de Santa Catarina, Brasil (ISC); a Universidade de Ribeirão Preto, Estado de São Paulo, Brasil (RIB); Serra do Cipó, Estado de Minas Gerais (CIP₂); Estado da Bahia, Brasil (WIP-4); cidade de Eldorado do Sul, Estado do Rio Grande do Sul, Brasil (17A2); e *D. melanogaster* (linhagem Oregon-R). Os estoques foram mantidos como culturas massais em meio de cultura de Marques et al. (1966), em câmaras a 17°C ± 1°C, com 60% U.R. A Figura 1 mostra a localização geográfica das populações de *D. willistoni* utilizadas neste trabalho.

Extração de DNA, clivagem e isolamento de sondas de DNA; análises em géis de acrilamida e agarose

O DNA genômico de moscas adultas, machos e fêmeas, das linhagens WIP-4 e 17A2, foram extraídos de acordo com o método de Jowett (1986) e cerca de 20µg a 30µg do DNA de cada amostra foi digerido com as enzimas de restrição *AluI* ou *HaeIII* (Invitrogen) e fracionados em gel de agarose 1%. Do produto desta digestão, três bandas de DNA foram isoladas (Figura 2) e utilizadas como sondas em análise por *Southern blot*: o fragmento de 5 kb obtido a partir digestão do DNA genômico de machos (WIP-4) com *HaeIII*; fragmento entre 2 e 3 kb obtido a partir da digestão do DNA de machos (17A2) com *AluI*; fragmento com tamanho entre 6 and 7 kb obtido a partir da digestão do DNA de machos (17A2) com *HaeIII*. As bandas foram isoladas utilizando o "kit" Concert™ Matrix Gel Extraction Systems (Invitrogen). Os fragmentos foram marcados com o método *random prime* com o "kit" Gene Images® (Amersham Biosciences), seguindo recomendações do fabricante.

O DNA genômico (10µg) de moscas machos e fêmeas adultas das linhagens WIP-4 e 17A2 digeridos com as enzimas de restrição *AluI* ou *HaeIII* (Invitrogen), foram também fracionados em gel de acrilamida 6%, porque em gel de agarose as bandas de fragmentos menores (> 2kb) não são distinguíveis. O peso molecular (em kb) dos fragmentos detectados foi determinado utilizando fragmentos do marcador 1 kb Plus DNA ladder (Invitrogen), λ /*HindIII* (Invitrogen) e o fragmento de 0,5kb do retroelemento *gypsy* de *D. melanogaster*.

O DNA genômico (10µg) de moscas machos e fêmeas adultas das linhagens COR, RIB, DLA, CIP, ISC, WIP-4 and 17A2 digeridos com as enzimas de restrição *AluI* ou *HaeIII* (Invitrogen), foram fracionados em gel de agarose 1% para verificação das diferenças entre populações a partir de bandas maiores (< 2kb) e também utilizados para as análises por *Southern blot*.

Southern blot

O DNA das sete linhagens de *D. willistoni* fracionados em gel de agarose 1% foi transferido para membranas Hybond N+ (Amersham Biosciences) e hibridados

de acordo com o protocolo do fabricante do "kit" Gene Images® (Amersham Biosciences). As membranas foram hibridadas a 60°C em uma mistura contendo 0,1% SDS, 5% dextran sulfato e uma diluição de 20 vezes do líquido bloqueador em 5xSSC. A membrana foi lavada duas vezes a 60°C, primeiramente com 1xSSC e 0,1% SDS e depois com 0,5xSSC e 1% SDS, em ambas as lavagens agitando por 15 minutos. Para detecção, foi utilizado o método do "kit" CPD-Star (Amersham Biosciences). O peso molecular (em kb) dos fragmentos detectados foi determinado com o marcador 1 kb Plus DNA ladder (Invitrogen) como controle.

Clonagem e seqüenciamento

Quatro bandas do DNA foram escolhidas (Fig. 2) para clonagem: o fragmento com tamanho entre 2 e 3 kb obtido a partir da clivagem do DNA genômico de machos da linhagem 17A2 com *AluI* (também utilizado nas análises de *Southern blot*) – fragmento 1; o fragmento com tamanho entre 3 e 4 kb obtido a partir da digestão do DNA de fêmeas da linhagem WIP-4 com *AluI* – fragmento 2. O fragmento de 5 kb obtido a partir da digestão do DNA genômico de machos da linhagem 17A2 – fragmento 3 - e da linhagem WIP-4 com *HaeIII* – fragmento 4 (também utilizado nas análises por *Southern blot*); como os três fragmentos utilizados na análise através de *Southern blot* eram de machos e não conseguimos clonar o fragmento com tamanho entre 6 e 7 kb, o fragmento de fêmea foi escolhido para ser clonado. As bandas foram isoladas utilizando o "kit" Concert™ Matrix Gel Extraction Systems (Invitrogen). As seqüências foram ligadas ao plasmídeo pBluescript II KS+, previamente digerido com a enzima de restrição *EcoRV* e defosforilado com Fosfatase Alcalina de Camarão (USB). Os plasmídeos recombinantes foram clonados em células competentes XL1-Blue e estas foram plaqueadas em meio seletivo com ampicillin/IPTG/X-Gal. Os plasmídeos contendo a inserção foram purificados e as seqüências foram determinadas em três laboratórios independentes: 1) O laboratório ACTGene (Centro de Biotecnologia, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil) utilizando o seqüenciador automático ABI-PRISM 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems); 2) o laboratório LABDROS (Departamento de Biologia, UFSM, Santa Maria, RS, Brasil) utilizando o seqüenciador automático MegaBACE 500; 3) o Laboratório do Centro de Biologia

Genômica e Molecular (Faculdade de Biociências, PUC, Porto Alegre, RS, Brasil) utilizando o seqüenciador automático MegaBACE 1000. A busca da similaridade das seqüências dos insertos foi feita na base de dados do GeneBank/EMBL usando o formato FASTA e o programa BLASTN. Foi feito um alinhamento múltiplo das sequências com o programa Clustal W (Thompson et al., 1994). Os mapas de restrição das seqüências foram determinados utilizando o programa BioEdit Restriction Mapping Utility, versão 5.0.9.

Hibridação *in situ*

Um clone de cada fragmento foi escolhido para análise por hibridação *in situ*: o clone 35M (gene 18S obtido do fragmento 1); o clone 62F (obtido do fragmento 2) e o clone 72M (obtido do fragmento 4). Os dois últimos foram escolhidos ao acaso, pois as buscas no GenBank/EMBL não identificam estas seqüências.

Cromossomos politênicos de glândula salivar de larvas machos e fêmeas de terceiro ínstar das linhagens WIP-4 e 17A2 de *D. willistoni*, foram preparados e hibridados pelos métodos descritos por Montgomery et al. (1987) e Lim (1993) com modificações. Foram selecionadas as duas melhores lâminas, por sexo para cada linhagem, para serem hibridadas com as três diferentes sondas. O DNA cromossômico foi desnaturado em formamida 70%, solução 2xSSC a 75°C por 2 minutos e 30 segundos. As sondas foram marcadas com nucleotídeos biotinilados (biotin-7-dATP RL) pelo método nick translation. As hibridizações foram detectadas utilizando o "kit" Vectastain ABC (Vector Labs) e reveladas pela coloração com diaminobenzidina (Sigma) e peroxidase (Sigma). Os cromossomos foram corados com orceína aceto-lática e examinados em um aumento de 1000x com óleo de imersão. A posição dos sítios de hibridização de cada sonda foi identificada, usando cópias do fotomapa de cromossomos politênicos de glândulas salivares de *D. willistoni* (Regner et al., 1996)

Resultados

A clivagem do DNA genômico com *AluI* e *HaeIII* revelou a presença de fragmentos sexo-específicos e com diferentes tamanhos.

Quando o DNA genômico de machos e fêmeas das linhagens WIP-4 e 17A2 de *D. willistoni* são clivados com as enzimas de restrição *AluI* ou *HaeIII* e fracionados em gel de agarose 1%, produzem-se fragmentos com tamanhos que variam de aproximadamente 2,5kb até 12kb (Fig. 2). Surpreendentemente, pelo padrão de bandas apresentado, é possível diferenciar qual a amostra é proveniente de macho e qual é de fêmea. Uma banda que ocorre entre 3 e 4 kb quando o DNA de fêmeas é clivado com *AluI*, por exemplo, não ocorre nas amostras de DNA de machos clivados com a mesma enzima.

Entre as linhagens WIP-4 e 17A2 não foram encontradas diferenças para as bandas acima de 2 kb, mas quando as amostras são fragmentadas em gel de poliacrilamida 6%, é possível analisar o padrão de bandas abaixo deste tamanho e verificar que ocorrem algumas variações. O DNA de fêmeas da linhagem 17A2 clivado com a enzima *HaeIII*, apresenta uma banda abaixo de 0,2 kb que não ocorre no DNA de fêmeas da linhagem WIP-4, clivado com a mesma enzima. Também é possível observar uma banda com tamanho entre 0,3 e 0,4 kb que só ocorre em DNA de fêmeas de 17A2 clivado com *HaeIII* (Figs. 3 e 4).

Como foi detectada esta variação entre as linhagens WIP-4 e 17A2, a análise em gel de agarose 1% foi feita para outras 5 linhagens, a fim de verificar se o padrão sexo-específico se mantém para a espécie *D. willistoni*, se a variação entre sexos também ocorre em outra espécie (*D. melanogaster*) e se diferenças mais amplas entre linhagens poderiam ser detectadas.

Foi possível observar, então, que como ocorre em WIP-4 e 17A2, o padrão de clivagem entre machos e fêmeas se mantém diferente em todas as linhagens analisadas. Também algumas diferenças para fragmentos maiores de 2kb, que não são vistas entre WIP-4 e 17A2 (Figs. 5 e 6) foram detectadas. O DNA de fêmeas DLA e RIB, por exemplo, quando clivado com *AluI*, apresenta em cada linhagem, duas bandas de tamanho aproximado, sendo que uma banda que tem tamanho de 4 kb, não está presente nas demais linhagens (Fig. 5).

Interessante notar que o padrão de clivagem do DNA de machos e fêmeas de *D. melanogaster* não difere entre os sexos e, quando comparados com as populações de *D. willistoni*, os padrões assemelham-se principalmente com o padrão de clivagem de machos desta última espécie (Fig. 6). As semelhanças ocorrem para uma banda com tamanho em torno de 6kb e outra um pouco maior que 12 kb. No entanto, como a intensidade das bandas é fraca, optamos por utilizar a técnica de *Southern blot*, por ser uma técnica com maior sensibilidade.

A análise dos fragmentos gerados pela clivagem do DNA genômico com *AluI* e *HaeIII* através de *Southern blot*, revelou com mais clareza os diferentes padrões entre sexos e entre linhagens.

O resultado da análise através de *Southern blot* para as linhagens de *Drosophila willistoni*, bem como para uma linhagem da espécie *D. melanogaster* (Oregon-R) (Figs. 7, 8, 9, 10, 11 e 12) hibridados com os fragmentos de tamanho entre 2 e 3 kb, 5 kb e tamanho entre 6 e 7 kb, confirmou um padrão sexo-específico para estes três fragmentos, conforme observado anteriormente em gel de agarose 1% e possibilitou ver com mais clareza as diferenças entre linhagens.

O fragmento de 5 kb isolado do DNA de machos da linhagem WIP-4 clivado com *HaeIII*, apresentou um padrão diferente entre sexos, tanto quando o DNA genômico era clivado com *AluI* (Fig. 7) como com *HaeIII* (Fig 8). Na membrana onde o DNA genômico está clivado com *HaeIII* o fragmento hibrida em *D. melanogaster*, e em quase todos os machos das linhagens de *D. willistoni*, no tamanho esperado para o fragmento (5 kb). Este padrão é similar ao observado nas clivagens em gel de agarose 1% (Fig. 6), onde se vê duas bandas no DNA de machos das linhagens de *D. willistoni* que se assemelham ao padrão de clivagem de *D. melanogaster*, quando o DNA é clivado com *HaeIII*. Entre linhagens, somente no DNA genômico clivado com *AluI* se notam diferenças marcantes no padrão de bandas.

O fragmento de tamanho entre 2 e 3 kb isolado do DNA de machos da linhagem 17A2 clivado com *AluI*, hibridou com várias bandas, além dela própria, tanto quando o DNA genômico foi clivado com *AluI* (Fig. 9), como quando foi

clivado com *HaeIII* (Fig. 10), apresentando padrões bem diferenciados para cada enzima. Na membrana com DNA clivado com *AluI*, as bandas com hibridação mais forte ficam próximas de 3 kb para quase todas as fêmeas (com exceção de *D. melanogaster*) e próximas de 1 kb para quase todos os machos, indicando serem estas as seqüências de maior homologia com a sonda. Já na membrana clivada com *HaeIII* as seqüências mais homólogas com à sonda (com sinais de hibridação mais fortes), foram de tamanho em torno de 1kb e não apresentaram padrões diferentes entre sexos ou entre linhagens. Porém, as bandas com hibridação mais fraca, mantiveram as diferenças entre sexos e entre linhagens. Este fragmento de tamanho entre 2 e 3 kb foi o que apresentou sinal de hibridação mais intenso com o DNA de *D. melanogaster*, sugerindo ser a seqüência mais homóloga entre as duas espécies.

O fragmento com tamanho entre 6 e 7 kb (Figs 11 e 12) apresentou um padrão de hibridação diferente entre os sexos das diferentes linhagens, como os anteriores, e também na membrana onde o DNA genômico é clivado com *HaeIII*, as diferenças entre populações não são tão marcantes como quando o DNA é clivado com *AluI*. Novamente em *D. melanogaster* não são observadas diferenças entre sexos para o padrão das bandas. Tanto para o fragmento de 5 kb como para o fragmento de tamanho entre 6 e 7 kb de *D. willistoni*, o sinal de hibridação com *D. melanogaster* é mais fraco se comparado com o de tamanho entre 2 e 3 kb. Este último apresenta um sinal de hibridação mais intenso, podendo ser a seqüência mais homóloga entre as duas espécies.

O resultado do seqüenciamento dos clones revelou uma grande heterogeneidade na composição das bandas geradas pela clivagem do DNA genômico de *D. willistoni* com *AluI* e *HaeIII*.

Dos três fragmentos isolados para análise através de *Southern blot*, somente foi possível clonar dois deles (o de tamanho entre 2 e 3 kb e de 5 kb, ambos de machos, da linhagem WIP-4). As tentativas de clonar o fragmento de tamanho entre 6 e 7 kb foram infrutíferas, provavelmente por ser uma seqüência relativamente grande. Optamos por clonar, então, um fragmento de fêmea, com tamanho menor (entre 3 e 4 kb), onde obtivemos maior sucesso, e também outro

fragmento de 5kb da linhagem 17A2. Ao todo obtivemos 20 clones para o fragmento 1, 19 clones para o fragmento 2. Dois clones para o fragmento 3 e Trés clones para o fragmento 4. A dificuldade de obter um número maior de recombinantes para as seqüências de 5kb, obviamente se deve também ao tamanho do fragmento, somado ao fato de que as enzimas *AluI* e *HaeIII* geram extremidades *blunt*. Esta última dificuldade foi superada com a defosforilação do vetor.

Dos 20 clones obtidos a partir do fragmento 1, 600 pares de bases foram alinhados e analisados. Oito destas seqüências clonadas são correspondentes a uma região do rDNA 18S de *D. melanogaster* (Figs. 13 e 14), com uma similaridade de 99%. Foi possível alinhar também, separadamente, os insertos dos clones 15M, 16M e 17M (Fig. 15) e os insertos dos clones 11BM e 21M (Fig. 16). No entanto, estes dois grupos de seqüências não apresentam identidade com nenhuma seqüência conhecida, sendo o clone 21M rico em AT (67,8%) (Tabela 1). Os demais insertos (Fig. 17) não alinham entre si e não apresentam identidade com outras seqüências conhecidas, mas são seqüências ricas em AT (dados indicados na Fig. 17), com exceção do clone 109M que apresenta iguais quantidades no conteúdo de AT e GC.

Os 19 clones obtidos a partir do fragmento 2, apresentam uma grande heterogeneidade nas seqüências dos insertos (Fig. 18), não alinham entre si e apresentam uma quantidade maior de AT na sua composição (Tabela 2). Um dos clones (42F) apresentou identidade com uma região de DNA mitocondrial de várias organismos. Ao realizar o alinhamento da seqüência deste inserto com a seqüência completa do genoma mitocondrial de *D. melanogaster*, foi possível identificar quatro genes mitocondriais em *D. willistoni* com uma similaridade de 95% (fig. 18 e 19).

Os clones obtidos a partir de fragmentos de 5kb (das linhagens WIP-4 e 17A2), também mostraram heterogeneidade nas seqüências dos insertos. Os clones 72MWIP e 82MWIP (fragmento 4) alinharam entre si (Fig. 20) e apresentam um conteúdo de AT maior na composição das suas seqüências (53%) (Tabela 3). Também foi possível fazer alinhamento entre os clones 73MWIP (fragmento 4) e 45M17A2 (fragmento 3), sendo que as duas seqüências apresentam um conteúdo

maior em GC (53,9%) (Fig. 21). O único clone que não foi possível alinhar foi o 48M17A2 (fragmento 3) e que apresenta uma grande quantidade de AT na composição das suas bases (70,3%) (Fig. 22).

Interessante salientar que, ao fazer o mapa de restrição dos fragmentos clonados, foi possível localizar sítios de restrição para *AluI* e *HaeIII* em muitos deles (Tabelas 1, 2, e 3). Nos insertos clonados a partir do fragmento 1, somente um apresenta sítios de clivagem para *AluI*. Já dos 19 insertos clonados a partir do fragmento 2, apenas 4 não apresentavam sítios de restrição para *AluI*. Para os insertos clonados a partir dos fragmentos 3 e 4, dois apresentavam sítios de clivagem para a enzima *HaeIII*.

A hibridação *in situ* de 3 insertos obtidos a partir de 3 fragmentos diferentes, revelou que eles se co-localizam principalmente em nucléolo.

Um clone de cada fragmento foi escolhido para a realização de hibridação *in situ* em cromossomos politênicos de larvas macho e fêmea de *D. willistoni* (linhagem WIP-4 e 17A2): clone 35M (obtido a partir do fragmento 1) que corresponde à uma parte do gene 18S; clone 62F (obtido a partir do fragmento 2) e clone 72MWIP (obtido a partir do fragmento 4). A escolha dos clones foi aleatória, com exceção do 35M que foi identificado. Os dois últimos não tiveram a suas seqüências identificadas no GenBank/EMBL.

Os resultados da hibridação para o clone 35M confirmaram a sua identidade com o gene ribossomal 18S (Fig. 24 A e B). Como a cromatina das regiões organizadoras de nucléolo ficam sub replicadas e inseridas no interior desta estrutura, as marcações assumem um aspecto de cromatina dispersa e não de bandas (Fig. 23), sendo que mais de uma região, em diferentes cromossomos, apresentaram sinais de hibridação em *D. willistoni*.

Os clones 62F (Fig. 25 A e B) e 72MWIP (Fig. 26 A e B) também apresentaram um sinal de hibridação similar ao clone 35M em vários cromossomos, indicando que estas duas seqüências estão co-localizadas com região organizadora de nucléolo (NOR).

Como as marcações ficam no nucléolo e, pela ação mecânica da preparação da lâmina (*squash*), este pode romper a sua ligação com o

cromossomo, não foi possível estabelecer diferenças na localização e número das marcações entre linhagens e entre sexos em todas as lâminas examinadas. O fator constante foi a presença de mais de uma região de DNA ribossomal, além da esperada na base do cromossomo XL (Garcia, 1997). Para algumas poucas marcações, no entanto, foi possível verificar que se repetiam. O clone 62F, por exemplo, além de marcar estruturas semelhantes a pequenos nucléolos em várias regiões de diferentes cromossomos, também marca uma banda na seção 67/68 do cromossomo IIR em fêmeas da linhagem WIP-4 de *D. willistoni*. Já o clone 35M, geralmente apresenta uma marcação positiva próximo à base do cromossomo III em cromossomos de fêmeas da linhagem WIP-4.

Discussão

Neste estudo, foi feita a tentativa de isolar DNAs repetitivos em *D. willistoni*, a fim de identificar algum fator existente no genoma relacionado a sua variabilidade genética. Na busca desta resposta, foi possível constatar que as enzimas de restrição *AluI* e *HaeIII* não isolaram DNA repetitivo, mas uma população de seqüências heterogêneas, algumas ricas em AT, envolvidas em um fenômeno ainda não descrito para *Drosophila*. A explicação para este fenômeno não é imediata. Experimentos mais refinados serão necessárias para elucidar o padrão de clivagem diferencial entre os sexos.

De uma forma global, entretanto, pode-se dizer que a clivagem do DNA genômico de *D. willistoni* com as enzimas de restrição *AluI* e *HaeIII*, isola, em cada banda sexo-específica uma população de seqüências diferentes entre si, embora de mesmo tamanho, que podem estar se agrupando por mais de uma razão.

Uma das razões para esta seleção poderia ser pela composição das seqüências. Neste trabalho isolamos várias seqüências ricas em AT particulares desta espécie, além de uma parte de um DNA repetitivo importante que integra a heterocromatina, o gene ribossomal 18S.

Seqüências ricas em AT estão presentes em várias regiões do genoma de *D. melanogaster* (Dowsett & Young, 1982), bem como DNAs satélites ricas em AT, que estão localizados em regiões heterocromáticas (Gatti & Pimpinelli, 1992). Nas regiões organizadoras de nucléolo também ocorrem regiões ricas em AT nos

espaçadores intergênicos (IGS) (Tautz et al., 1988) bem como no DNA mitocondrial de *D. melanogaster*, sendo que algumas destas regiões são altamente conservadas em várias espécies de *Drosophila* (Lewis et al., 1994). Em *D. willistoni*, a técnica de bandamento em cromossomos politênicos utilizando o fluorocromos DAPI, demonstrou a presença de regiões ricas em AT nos cromossomos X, XL, IIR e cromocentro (Garcia et al. em preparação).

Em *D. melanogaster*, os genes codificadores de rRNAs (genes rDNA) localizam-se em heterocromatina e são uma família multigênica que forma um agrupamento (*cluster*), ou unidade de repetição, com cerca de 250 cópias. Cada unidade transcricional é composta por um espaçador externo transcrito (ETS), uma região codificante de rRNA 18S, um espaçador interno não codificante transcrito (ITS-1), uma região codificante de rRNA 5,8S, uma segunda região não codificante (ITS-2), uma região codificante de rRNA 28S e um segmento espaçador não transcrito intergênico (IGS). As IGS são compostas de diferentes tipos de subrepetições arranjadas em *tandem* que podem variar no comprimento e promover um polimorfismo no tamanho destas regiões (Polanco et al., 1998).

Uma análise inicial, através de hibridação *in situ* de uma amostra das seqüências de DNA isoladas do genoma de *D. willistoni*, confirmou a identidade de uma delas com o gene ribossomal 18S, pois o nucléolo ficou marcado. Nucléolos menores também aparecem marcados em outras regiões, semelhante ao que já foi observado para *D. melanogaster* por Ananiev et al. (1981). Estes autores, utilizando técnica de hibridação *in situ* descrevem, além de um nucléolo que se liga por um filamento de cromatina à seção 20 (base) do cromossomo X (um aspecto desta marcação pode ser visto na figura 23), outras estruturas do tipo nucléolo, com diferentes tamanhos, que são encontradas em outros sítios dos cromossomos politênicos. A explicação para isto, seria o fato de que as regiões heterocromáticas adjacentes aos genes ribossomais permanecem subreplicadas, ficando mais suscetíveis à quebra. Isto pode gerar fragmentos livres de rDNA que acabam formando nucléolos secundários, geralmente pequenos, por apresentarem um número menor de genes ribossomais (Ananiev et al., 1981).

Não foi possível saber a identidade dos outros dois clones utilizados como sonda na hibridação *in situ* através das suas seqüências. Os resultados da análise

através de *Southern blot* demonstram que são seqüências com baixa homologia com o DNA de *D. melanogaster*, diferentemente do que ocorre com o gene 18S (fragmento com tamanho entre 2 e 3kb), que apresenta um sinal de hibridação mais intenso. No entanto, as hibridações *in situ* indicam que os clones 62F e 72M estão relacionados com a região organizadora de nucléolo, pois co-localizam com as marcações do clone 35M (gene 18S). Como as IGS das NOR de *D. melanogaster* são seqüências ricas em AT (Tautz et al., 1988), é possível que estes clones, que também apresentam uma quantidade maior de AT na composição das suas seqüências, estejam relacionados à seqüências não codificantes da NOR, ou sejam uma fração de DNA heterocromático junto destas regiões. O clone 62F além de mapear em NOR, também mapeia na seção 67/68 do cromossomo III e isto pode estar indicando ser esta uma outra região rica em AT, não relacionada à nucléolo.

Nesta população de seqüências ricas em AT que foram isoladas do genoma de *D. willistoni*, foi casualmente clonado um fragmento de DNA mitocondrial que possivelmente foi isolado pela enzima pelo padrão de repetitividade na composição das suas seqüências, já que, como observado na Tabela 2, não apresenta sítios internos de clivagem para *AluI*.

Porém, é necessário admitir que a composição rica em AT da maioria das seqüências não explica o fato de machos e fêmeas apresentarem padrões diferentes de clivagem em seu DNA para as mesmas enzimas. As seqüências repetitivas podem ter variação entre espécies ou até mesmo entre linhagens da mesma espécie, mas não existe registro de variações como as encontradas em nossos experimentos entre sexos diferentes dentro de uma mesma espécie.

Os resultados aqui descritos nos levam a cogitar uma segunda razão determinando a heterogeneidade das bandas sexo-específicas: as enzimas *AluI* e *HaeIII* são sensíveis à metilação. A enzima *AluI* não cliva quando no seu sítio de reconhecimento (5'AG↓CT3'), A ou C estão metilados. Da mesma forma, *HaeIII* não cliva quando o seu sítio de reconhecimento (5'GG↓CC3'), C 5' estiver metilado. A heterogeneidade na seqüência dos clones estaria demonstrando, então, regiões do DNA de *D. willistoni* que estariam sujeitas a esta modificação e que não permitiriam o acesso das enzimas aos seus sítios de clivagem. O que

reforça esta hipótese é o fato de que a maioria dos insertos, como demonstrado nas Tabelas 2 e 3, apresentam sítios de clivagem para as enzimas que foram utilizadas para isolá-los do DNA genômico. Isto pode ser um indicativo de que estas seqüências estavam “protegidas” da clivagem pela metilação, explicando de alguma forma o porquê do padrão diferenciado das bandas entre sexos.

Por muito tempo, o genoma de *Drosophila melanogaster* foi considerado livre de metilação (Urieli-Shoval et al., 1982), mas trabalhos recentes tem detectado algumas evidências relacionadas a este fenômeno. Já foram identificadas em *D. melanogaster* algumas proteínas relacionadas à família das DNA metiltransferases de vertebrados (Hung et al., 1999; Tweedie et al., 1999). Em DNA de embriões de *D. melanogaster* analisados através da técnica de HPLC (high-performance liquid chromatography) foram demonstrados diferentes níveis de 5-metilcitosina. Embriões jovens (1-2 horas de desenvolvimento) apresentam níveis maiores de 5-metilcitosina do que embriões mais velhos (15-16 horas). Ovários, machos adultos e fêmeas adultas apresentam apenas traços de metilação (Lyko et al., 2000). O pico de metilação genômica de *D. melanogaster* está em torno de 0,4% (abaixo do nível mínimo do genoma de mamíferos), indicando que a 5-metilcitosina não está amplamente distribuída no genoma, mas está restrita a certos locos ou compartimentos (Lyko, 2001) ou que apresenta uma distribuição fracional, como descrito para mamíferos primitivos (Tweedie, et al., 1997).

Além disso, a metilação em *D. melanogaster* não ocorre somente em dinucleotídeos CpG, mas também em CpA e CpT (Lyko et al., 2000). Recentemente, Kunert et al. (2003), em um experimento onde foi induzida a super expressão de Dnmt2 (metilcitosina-2 de *Drosophila melanogaster*) no genoma de *D. melanogaster*, isolaram várias seqüências ao acaso, que foram metiladas. Estas seqüências metiladas (de um total de 40 clones), com exceção de uma que apresentou alinhamento consistente, não apresentavam nenhuma seqüência consenso. No entanto, todos os resíduos 5-metilcitosina (detectados pelo método de seqüenciamento bisulfito), foram encontrados em um contexto de dinucleotídeos CpA.e CpT. Este achado em parte coincide com nossos resultados,

pois a maioria dos clones de *D. willistoni* são ricos em AT na composição das suas seqüências e em todos os insertos ocorrem vários sítios CpA e CpT (Fig. 18).

Nas análises feitas em géis de agarose e acrilamida, bem como nas de *Southern blot*, a metilação diferencial é uma explicação bem atrativa para os padrões diferentes entre machos e fêmeas. Para os três fragmentos isolados e utilizados como sonda para análise, foi possível constatar que todos eles mantinham um padrão diferente, tanto entre machos como entre fêmeas, como foram observadas também algumas diferenças entre populações. Para *D. melanogaster*, no entanto, este padrão diferente entre sexos não ocorre, demonstrando ser este um fenômeno próprio da espécie *D. willistoni*.

O padrão de hibridação esperado para o gene 18S, por exemplo, deveria ser o mesmo, independente do sexo (como é observado em *D. melanogaster*, onde as bandas são iguais nos machos e nas fêmeas) ou da linhagem. É sabido que os genes ribossomais são altamente conservados ao longo da evolução dos organismos, ao mesmo tempo que as regiões dos espaçadores intergênicos não. Isto é devido ao importante papel funcional destes genes na síntese de proteínas, o qual os torna resistentes às mudanças evolucionárias. Dos genes ribossomais nucleares, o gene 18S é o que muda mais lentamente, quando comparado com o 28S (Mindell & Honeycutt, 1990).

É improvável, portanto, que as grandes diferenças observadas no *Southern* sejam originadas por diferenças nas seqüências dos genes entre linhagens e muito menos entre sexos. Os outros dois fragmentos que foram escolhidos para análise através de *Southern blot* (fragmento de 5kb e fragmento com tamanho entre 6 e 7kb) também mantém os padrões sexo específico somente em *D. willistoni*.

A função da metilação no genoma de *D. willistoni*, no entanto, não é ainda clara, principalmente pelo fato de que um gene como 18S estar envolvido neste processo. Também em *D. melanogaster*, a função da metilação em embriões ainda não está esclarecida. Experimentos utilizando RNA de interferência (RNAi- RNA dupla fita que é capaz de silenciar a expressão do gene que codifica este RNA) nesta espécie, confirmaram que existe somente uma DNA metiltransferase (dDnmt2) em *D. melanogaster*, mas não revelaram uma função

para a metilação na mosca. O silenciamento da expressão de dDnmt2 parece não ter nenhuma consequência detectável para o desenvolvimento embrionário (Kunert et al., 2003).

Nossos dados estão, portanto, apontando para uma possível relação entre uma classe de DNAs ricos em AT relacionada a sítios diferencialmente metilados no genoma de machos e fêmeas da espécie *D. willistoni*. A explicação para este fenômeno e a relação dele com a variabilidade desta espécie, no entanto, ainda não estão esclarecidos e necessitam mais investigações, principalmente no sentido de verificar quais são, efetivamente, os níveis e a função da metilação nesta espécie em comparação com *D. melanogaster*.

Referências

- Ananiev, E.V., V.E. Barsky, Y.V. Ilyn, N.A. Churikov, 1981. Localization of nucleoli in *Drosophila melanogaster* polytene chromosomes. *Chromosoma*, 81: 619-628.
- Ashburner, M. & E. Novitski, 1989. The polytene chromosomes. Chapter 2 in *The Genetics and Biology of Drosophila*. Academic press. Vol. 1a: 31-66.
- Ayala, F.J. & J.R. Powell, 1972. Allozymes as diagnostic character of sibling species of *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 69: 1094-1096.
- Bender, J., 1998. Cytosine methylation of repeated sequences in eukaryotes: the role of DNA pairing. *TIBS*, 23: 252-256.
- Carson, H.L., 1965. Chromosomal morphism in geographically widespread species of *Drosophila* in *The Genetics of Colonizing Species*. H.G. Baker & G.L. Stebbins (eds) Academic Press, New York & London. p. 503-527.
- Csink, A.K. & S. Henikoff, 1998. Something from nothing: the evolution and utility of satellite repeats. *Trends Genet.* 14: 200-204.
- Da Cunha, A.B., T. Dobzhansky, O. Pavlovsky & B. Spassky, 1959. Genetics of natural populations. XXVIII. Supplementary data on the chromosomal polymorphism in *Drosophila willistoni* in its relation to the environment. *Evolution* 13: 389-404.
- Da Cunha, A.B. & T. Dobzhansky, 1954. A further study of chromosomal polymorphism of *Drosophila willistoni* in its relation to the environment. *Evolution* 8: 119-134.
- Da Cunha, A.B., H. Burla & T. Dobzhansky, 1950. Adaptive chromosomal polymorphism in *Drosophila willistoni*. *Evolution* 4: 212-235.
- Dobzhansky, T. & J.R. Powell, 1975. The *willistoni* group of sibling species of *Drosophila* in *Handbook of Genetics*. New York: Plenum Publ Corp 3: 539- 622.
- Dobzhansky, T., 1970. *Genetics of evolutionary process*. New York: Columbia Univ. Pr.
- Dowsett, A. & M. Young, 1982. Differing levels of dispersed repetitive DNA among closely related species of *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 79: 4570-4574.
- Ellison, J.R. & H.J. Barr, 1972. Quinacrine fluorescence of specific chromosome regions. *Chromosoma* 36: 375-390.

- Garcia , R.N., 1997. Estudo da organização estrutural dos cromossomos politênicos de *Drosophila willistoni* através de métodos de bandamento. Dissertação de Mestrado. Curso de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular. UFRGS. Porto Alegre, 116 p.
- Gatti, M. & S. Pimpinelli, 1992. Functional elements in *Drosophila melanogaster* heterochromatin. *Annu. Rev. Genet.* 26: 239-275.
- Goñi, B., M.E. Martinez & P. Daguere, 1997. Studies of two *Drosophila* (Diptera, Drosophilidae) communities from urban Montevideo, Uruguay. *Rev. Bras. de Ent.* 41(1): 89-93.
- Goñi, B., M.E. Martinez, V.L.S. Valente & C.R. Vilela, 1998. Preliminary data on the *Drosophila* species (Diptera, Drosophilidae) from Uruguay. *Rev. Bras. de Ent.* 42(3/4): 131-140.
- Hoskins, R.A., C.D. Smith, J.W. Carlson, A.B. Carvalho, A. Halpern, J.S. Kaminker, C. Kennedy, C.J. Mungall, B.A. Sullivan, G.G. Sutton, J.C. Yasuhara, B.T. Wakimoto, E.W. Myers, S.E. Celniker, G.M. Rubin & G.H. Karpen, 2002. Heterochromatic sequences in a *Drosophila* whole-genome shotgun assembly. *Gen. Biol.* 3(12): 0085.1-0085.16.
- Hung, M.S., N. Karthikeyan, B. Huang, H.C. Koo, J. Kinger & J. Shen, 1999. *Drosophila* proteins related to vertebrate DNA (5-cytosine) methyltransferases. *PNAS* 96(21): 11940-11945.
- Jones, K.W., 1970. Chromosomal and nuclear localization of mouse satellite DNA in individual cells. *Nature* 225: 912-15.
- Jowett, T., 1986. Preparation of nucleic acids, in Roberts, D.B. (Ed.). *Drosophila: a practical approach*. Oxford: IRL Press.
- Kunert, N., J. Marhold, , D. Stach & F. Lyko, 2003. A Dnmt2-like protein mediates DNA methylation in *Drosophila*. *Development* 130: 5083-5090.
- Lewis, D.L., C.L. Farr, A.L. Farquhar, L.S. Kaguni, 1994. Sequence, organization, and evolution of the A+T region of *Drosophila melanogaster* mitochondrial DNA. *Mol. Biol. Evol.*, 11: 523-538.
- Lim, J.K., 1993. *In situ* hybridization with biotinylated DNA. *DIS*,72: 73-76.
- Lyko, F., 2001. DNA methylation learns to fly. *Trends Genet.* 17(4): 169-172.

- Lyko, F., B.H. Ramsahoye & R. Jaenisch, 2000. DNA methylation in *Drosophila melanogaster*. *Nature* 408(30): 538-540.
- Marques, E.K., M. Napp, H. Winge, A.R. Cordeiro, 1966. A corn meal, soybean flour, wheat germ medium for *Drosophila*. *D.I.S.* 41: 187.
- Mezzanotte, R., 1978. Differential banding induced in polytene chromosomes of *Drosophila melanogaster* stained with acridine orange. *Experientia* 34: 322-323.
- Mezzanotte, R., 1986. The selective digestion of polytene and mitotic chromosome of *Drosophila melanogaster* by *AluI* and *HaeIII* restriction endonucleases. *Chromosoma* 93: 249-255.
- Mezzanotte, R., U. Bianchi & A. Marchi, 1987. *In situ* digestion of *Drosophila virilis* polytene chromosomes by *Alu I* and *Hae III* restriction endonucleases. *Genome* 29: 630-634.
- Mindell, K. & R. Honeycutt, 1990. Ribosomal RNA in vertebrates: evolution and phylogenetic applications. *Ann. Rev. Ecol. Syst.*, 21: 541-566.
- Montgomery, E., B. Charlesworth, C.H. Langley, 1987. A test for the role of natural selection in the stabilization of transposable element copy number in a population of *Drosophila melanogaster*. *Genet. Res.*, 49: 31-41.
- Pardue, M.L. & J.G. Gall, 1970. Chromosomal localization of mouse satellite DNA. *Science* 168: 1356-1358.
- Polanco, C., A.I. González, A. Fuente & G.A. Dover, 1998. Multigene family of ribosomal DNA in *Drosophila melanogaster* reveals contrasting patterns of homogenization for IGS and ITS spacer regions: a possible mechanism to resolve this paradox. *Genetics* 149: 243-256.
- Rae, P.M.M., 1970. Chromosomal distribution of rapidly reannealing DNA in *Drosophila melanogaster*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 67: 1018-1025.
- Regner, L.P., M.S.O. Pereira, C.E.V. Alonso; E. Abdelhay, V.L.S. Valente, 1996. Genomic distribution of P elements in *Drosophila willistoni* and search for their relationship with chromosomal inversions. *J. Hered.*, 87: 190-211.
- Santos, R.A. & V.L.S. Valente, 1990. On the occurrence of *Drosophila paulistorum* Dobzhansky & Pavan (Diptera: Drosophilidae) in an urban environment: ecologic and cytogenetic observations. *Evol. Biol.* 4: 253-268.

- Spassky, B., R.C. Richmond, J. Perez-Salas, O. Pavlovsky, C.A Mourão, A.S. Hunter, H. Hoenigsberger, T. Dobzhansky, & F.J. Ayala, 1971. Geography of the sibling species related to *Drosophila willistoni* and of the semispecies of the *Drosophila paulistorum* complex. *Evolution* 25: 129-143.
- Tautz, D., J. Hancock, D. Webb, C. Tautz, G. Dover, 1988. Complete sequences of the rRNA genes of *Drosophila melanogaster*. *Mol. Biol. Evol.*, 5: 366-376.
- Thompson, J.D., D.G. Higgins, T.J. Gibson, 1994. CLUSTAL W. Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, 22:4673-4680.
- Tweedie, S., H.H. Ng, A.L. Barlow, B.M. Turner, B. Hendrich, A. Bird, 1999. Vestiges of a methylation system in *Drosophila melanogaster*? *Nat. Genet.* 23: 389-390.
- Tweedie, S., J. Charlton, V. Clarck & A. Bird, 1997. Methylation of genomes and genes at the invertebrate-vertebrate boundary. *Mol. Cell. Biol.* 17: 1469-1475.
- Urieli-Shoval, S., Y. Gruenbaum, J. Sedat & A. Razin, 1982. The absence of detectable methylated bases in *Drosophila melanogaster* DNA. *Febs Lett.* 6(146)(1): 148-152.
- Val, F.C., C.R. Vilela & M.D. Marques, 1981. *Drosophilidae* of Neotropical region in *The Genetics and Biology of Drosophila*. Vol. 3A Ashburner M, Carson HL & Thompson Jr, JN eds. Academic Press, London, p. 123-168.
- Valente, V.L.S. & A.M. Araújo, 1986. Chromosomal polymorphism, climatic factors, and variation in population size of *Drosophila willistoni* in southern Brazil. *Heredity* 57: 149-159.
- Valente, V.L.S., A. Ruzsczyk & R.A. Santos, 1993. Chromosomal polymorphism in urban *Drosophila willistoni*. *Rev. Bras. Genet.* 16(2): 307-319.
- Valente, V.L.S., A. Ruzsczyk, R.A. Santos, C.B.C. Bonorino, B.E.P. Brum, L. Regner & N.B. Morales, 1989. Genetic and ecological studies on urban and marginal populations of *Drosophila* in the south of Brazil. *Evol. Biol.* 3: 19-35.
- Valiati, V.H. & V.L.S. Valente, 1997. Chromosomal polymorphism in urban populations of *Drosophila paulistorum*. *Braz. J. Genet.* 20(4): 567-582.
- Weiler, K.S. & B.T. Wakimoto, 1995. Heterochromatin and expression in *Drosophila*. *Annu. Rev. Genet.* 29: 577-605.

Yussa, M., C.E.V. Alonso & E. Abdelhay, 1994. Highly polymorphic repetitive sequences in *Rhynchosciara americana* genome. *Insect. Biochem. Molec. Biol.* 25(8): 909 - 914.

Legenda das figuras

Fig. 1. Local de coleta das populações utilizadas neste trabalho.

Fig. 2. Análise do DNA genômico de *D. willistoni* (WIP-4 e 17A2) clivado com as enzimas de restrição *AluI* e *HaeIII* em gel de agarose 1%. **1 e 10)** 1 kb Plus DNA ladder (Invitrogen). **2)** DNA de machos (WIP-4) e **3)** DNA de fêmeas (WIP-4) clivados com *AluI*. **4)** DNA de machos (17A2) e **5)** DNA de fêmeas (17A2) clivados com *AluI*. **6)** DNA de machos (WIP-4) e **7)** DNA de fêmeas (WIP-4) clivados com *HaeIII*. **8)** DNA de machos (17A2) e **9)** DNA de fêmeas (17A2) clivados com *HaeIII*. O fragmentos indicados pelas setas foram clonados. Os fragmentos indicados por * foram isolados e analisados através de *Southern blot*.

Fig. 3. Análise do DNA genômico de *D. willistoni* (WIP-4 e 17A2) clivado com as enzimas de restrição *AluI* e *HaeIII* em gel de acrilamida 6%. **1 e 12)** 1 kb Plus DNA ladder (Invitrogen). **2)** λ clivado com *HindIII* (Invitrogen). **3)** DNA de fêmeas (WIP-4) e **4)** DNA de fêmeas (17A2) clivados com *AluI*. **5)** DNA de fêmeas (WIP-4) e **6)** DNA de fêmeas (17A2) clivados com *HaeIII*. **7)** DNA de machos (WIP-4) e **8)** DNA de machos (17A2) clivados com *AluI*. **9)** DNA de machos (WIP-4) e **10)** DNA de machos (17A2) clivados com *HaeIII*. **11)** fragmento de retroelemento *gypsy* de *D. melanogaster*. As setas indicam as diferenças entre linhagens.

Fig. 4. Análise do DNA genômico de *D. willistoni* (WIP-4 e 17A2) clivado com as enzimas de restrição *AluI* e *HaeIII* em gel de acrilamida 6%. **1 e 12)** 1 kb Plus DNA ladder (Invitrogen) **3)** DNA de machos (WIP-4) e **4)** DNA de fêmeas (WIP-4) clivados com *AluI*. **5)** DNA de machos (17A2) e **6)** DNA de fêmeas (17A2) clivados com *AluI*. **7)** DNA de machos (WIP-4) e **8)** DNA de fêmeas (WIP-4) clivados com *HaeIII*. **9)** DNA de machos (17A2) e **10)** DNA de fêmeas (17A2) clivados com *HaeIII*. **11)** fragmento de retroelemento *Gypsy* de *D. melanogaster*. As setas indicam as diferenças entre linhagens.

Fig. 5. Análise do DNA genômico de *D. melanogaster* e de 7 linhagens de *D. willistoni* clivados com a enzima de restrição *AluI* e fracionado em gel de agarose 1%. **1)** *D. melanogaster* macho; **2)** *D. melanogaster* fêmea; **3)** WIP-4 macho; **4)** WIP-4 fêmeas; **5)** DLA macho; **6)** DLA fêmea; **7)** RIB macho; **8)** RIB fêmea; **9)** ISC macho; **10)** ISC fêmea; **11)** COR macho; **12)** COR fêmea; **13)** CIP2 macho; **14)** CIP2 fêmea; **15)** 17A2 macho **16)** 17A2 fêmeas. As setas da figura indicam diferenças entre linhagens. Marcador de peso molecular: 1 kb Plus DNA ladder (Invitrogen).

Fig. 6. Análise do DNA genômico de *D. melanogaster* e de 7 linhagens de *D. willistoni* clivados com a enzima de restrição *HaeIII* e fracionado em gel de agarose 1%. **1)** *D. melanogaster* macho; **2)** *D. melanogaster* fêmea; **3)** WIP-4 macho **4)** WIP-4 fêmeas; **5)** DLA macho; **6)** DLA fêmea; **7)** RIB macho; **8)** RIB fêmea; **9)** ISC macho; **10)** ISC fêmea; **11)** COR macho; **12)** COR fêmea; **13)** CIP2 macho; **14)** CIP2 fêmea; **15)** 17A2 macho **16)** 17A2 fêmeas. Os * indicam padrões de clivagem entre macho e fêmea de *D. melanogaster* semelhantes com o padrão de macho de diferentes linhagens de *D. willistoni*. Marcador de peso molecular: 1 kb Plus DNA ladder (Invitrogen).

Fig. 7. DNAs genômicos de várias linhagens de *Drosophila willistoni* e de uma linhagem de *Drosophila melanogaster* clivados com a enzima de restrição *AluI* e hibridado com fragmento de 5 Kb gerado por *HaeIII* em machos de WIP-4. Os números 1 e 2 correspondem ao DNA de *D. melanogaster* macho e *D. melanogaster* fêmea, respectivamente; 3 a 16 correspondem ao DNA das seguintes linhagens de *Drosophila willistoni*: 3. WIP-4 macho; 4. WIP-4 fêmea; 5. DLA macho; 6. DLA fêmea; 7. COR macho; 8. COR fêmea; 9. ISC macho; 10. ISC fêmea; 11. RIB macho; 12. RIB fêmea; 13. CIP2 macho; 14. CIP2 fêmea; 15. 17A2 macho; 16. 17A2 fêmea. Marcador de peso molecular: 1 kb Plus DNA ladder (Invitrogen).

Fig. 8. DNAs genômicos de várias linhagens de *Drosophila willistoni* e de uma linhagem de *Drosophila melanogaster* clivados com a enzima de restrição

HaeIII e hibridado com fragmento de 5 Kb gerado por *HaeIII* em machos de WIP-4. Os números 1 e 2 correspondem a *D. melanogaster* macho e *D. melanogaster* fêmea respectivamente; 3 a 16 correspondem as seguintes linhagens de *Drosophila willistoni*: 3. WIP-4 macho; 4. WIP-4 fêmea; 5. DLA macho; 6. DLA fêmea; 7. COR macho; 8. COR fêmea; 9. ISC macho; 10. ISC fêmea; 11. RIB macho; 12. RIB fêmea; 13. CIP2 macho; 14. CIP2 fêmea; 15. 17A2 macho; 16. 17A2 fêmea. Marcador de peso molecular: 1 kb Plus DNA ladder (Invitrogen). Os * indicam as bandas de 5kb que ocorrem em *D. melanogaster* e em machos de algumas linhagens de *D. willistoni*.

Fig. 9. DNAs genômicos de várias linhagens de *Drosophila willistoni* e de uma linhagem de *Drosophila melanogaster* clivado com a enzima de restrição *AluI* e hibridado com fragmento de 2,5 Kb gerado por *AluI* em machos de 17A2. Os números 1 e 2 correspondem a *D. melanogaster* macho e *D. melanogaster* fêmea respectivamente; 3 a 16 correspondem as seguintes linhagens de *Drosophila willistoni*: 3. WIP-4 macho; 4. WIP-4 fêmea; 5. DLA macho; 6. DLA fêmea; 7. COR macho; 8. COR fêmea; 9. ISC macho; 10. ISC fêmea; 11. RIB macho; 12. RIB fêmea; 13. CIP2 macho; 14. CIP2 fêmea; 15. 17A2 macho; 16. 17A2 fêmea. Marcador de peso molecular: 1 kb Plus DNA ladder (Invitrogen).

Fig. 10. DNAs genômicos de várias linhagens de *Drosophila willistoni* e de uma linhagem de *Drosophila melanogaster* clivados com a enzima de restrição *HaeIII* e hibridizado com fragmento de 2,5 Kb gerado por *AluI* em machos de 17A2. Os números de 1 a 2 correspondem a *D. melanogaster* macho e *D. melanogaster* fêmea; 3 a 16 correspondem as seguintes linhagens de *Drosophila willistoni*: 3. WIP-4 macho; 4. WIP-4 fêmea; 5. DLA macho; 6. DLA fêmea; 7. COR macho; 8. COR fêmea; 9. ISC macho; 10. ISC fêmea; 11. RIB macho; 12. RIB fêmea; 13. CIP2 macho; 14. CIP2 fêmea; 15. 17A2 macho; 16. 17A2 fêmea. Marcador de peso molecular: 1 kb Plus DNA ladder (Invitrogen).

Fig. 11. DNAs genômicos de várias linhagens de *Drosophila willistoni* e de uma linhagem de *Drosophila melanogaster* clivados com a enzima de restrição

AluI e hibridado com fragmento de tamanho entre 6 e 7 Kb gerado por *HaeIII* em machos de 17A2. Os números 1 e 2 correspondem a *D. melanogaster* macho e *D. melanogaster* fêmea, respectivamente; 3 a 16 correspondem as seguintes linhagens de *Drosophila willistoni*: 3. WIP-4 macho; 4. WIP-4 fêmea; 5. DLA macho; 6. DLA fêmea; 7. COR macho; 8. COR fêmea; 9. ISC macho; 10. ISC fêmea; 11. RIB macho; 12. RIB fêmea; 13. CIP2 macho; 14. CIP2 fêmea; 15. 17A2 macho; 16. 17A2 fêmea. Marcador de peso molecular: 1 kb Plus DNA ladder (Invitrogen).

Fig. 12. DNAs genômicos de várias linhagens de *Drosophila willistoni* e de uma linhagem de *Drosophila melanogaster* clivados com a enzima de restrição *HaeIII* e hibridizado com fragmento de tamanho entre 6 e 7 Kb gerado por *HaeIII* em machos de 17A2. Os números 1 e 2 correspondem a *D. melanogaster* macho e *D. melanogaster* fêmea; 3 a 16 correspondem as seguintes linhagens de *Drosophila willistoni*: 3. WIP-4 macho; 4. WIP-4 fêmea; 5. DLA macho; 6. DLA fêmea; 7. COR macho; 8. COR fêmea; 9. ISC macho; 10. ISC fêmea; 11. RIB macho; 12. RIB fêmea; 13. CIP2 macho; 14. CIP2 fêmea; 15. 17A2 macho; 16. 17A2 fêmea. Marcador de peso molecular: 1 kb Plus DNA ladder (Invitrogen).

Fig 13. Alinhamento da seqüência parcial de 8 insertos obtidos a partir do fragmento 1 de *D. willistoni* correspondentes ao gene 18S de *D. melanogaster* (mel) (GenBank, M21017; M29800).

Fig. 14. Representação esquemática do inserto de rDNA de *D. melanogaster* contido no plasmídeo pDm238 (GenBank M21017 M29800). Estão identificados somente os genes com as respectivas posições dos nucleotídeos de início e final de cada gene, sendo as demais regiões representados pelas linhas descontínuas. Abaixo está a representação do inserto de *D. willistoni* clonado correspondente ao gene 18S.

Fig 15. Alinhamento da seqüência parcial de 3 insertos obtidos a partir do fragmento 1 de *D. willistoni*. Os insertos não apresentam identidade com nenhuma seqüência de *D. melanogaster* e tem uma quantidade maior de GC

(52%) na composição das suas seqüências. Os números seguidos por letras indicam o nome dos clones.

Fig 16. Alinhamento da seqüência parcial de 2 insertos obtidos a partir do fragmento 1 de *D. willistoni*. Os insertos não apresentam identidade com nenhuma seqüência de *D. melanogaster* e são seqüências ricas em AT (67,83%). Os números seguidos por letras indicam o nome dos clones.

Fig 17. Seqüências parciais de 7 insertos obtidos a partir do fragmento 1 de *D. willistoni*. Os insertos não apresentam identidade com nenhuma seqüência de *D. melanogaster* e são ricos em AT, com exceção do clone 109M. Os números seguidos por letras indicam o nome dos clones.

Fig 18. Seqüências parciais dos insertos clonadas do genoma de *D. willistoni*, a partir do fragmento 2. A seqüência 42F (em negrito) corresponde à uma seqüência com 95% similaridade com DNA mitocondrial de *D. melanogaster* (GenBank NC 001709). Os demais clones são seqüências ricas em AT.

Fig. 19. Representação esquemática de uma região do DNA mitocondrial de *D. melanogaster* (GenBank NC001709). Estão identificados os genes desta região com as respectivas posições dos nucleotídeos do início e do final de cada um. Abaixo está a representação do inserto de *D. willistoni* clonado correspondente aos genes *ND4* (produto: NADH desidrogenase-subunidade 4), *ND4L* (produto: NADH desidrogenase-subunidade 4L), *mt: tRNA-T* (produto: tRNA-Thr) e *mt: tRNA-P* (produto: tRNA-Pro).

Fig. 20. Alinhamento da seqüência parcial de dois insertos obtidos a partir do fragmento 4. Os números seguidos por letras indicam o nome dos clones.

Fig. 21. Alinhamento das seqüências parciais dos insertos obtidos a partir dos fragmentos 3 (45M 17A2) e 4 (73M WIP).

Fig. 22. Seqüência parcial do inserto obtido a partir do fragmento 3.

Fig. 23. Cromossomos politênicos de *D. melanogaster* hibridados com plasmídeo pDm 238 que contém os genes ribossomais de *D. melanogaster*. Observar o aspecto da marcação sobre o nucléolo (Garcia, 1997) semelhante ao obtido com os clones 35M, 62F e 72M de *D. willistoni*. Barra = 10µm.

Figs. 24 A e B. Cromossomos politênicos de *D. willistoni* (17A2 fêmea em A e WIP-4 fêmea em B) hibridados com o clone 35M. As setas indicam as marcações dos nucléolos. Barra=10µm

Figs. 25 A e B. Cromossomos politênicos de *D. willistoni* (WIP-4 fêmea em A e B) hibridados com o clone 62F. As setas indicam as marcações dos nucléolos e na seção 67/68 do cromossomo IIR. Barra=10µm

Figs. 26 A e B. Cromossomos politênicos de *D. willistoni* (WIP-4 macho em A e B) hibridizados com o clone 72MWIP. As setas indicam as marcações dos nucléolos. Barra=10µm

Tabela 1. Sítios de clivagem para a enzima *AluI* nos 600 pares de bases seqüenciados dos insertos obtidos a partir do fragmento com tamanho entre 2 e 3 kb, gerado pela clivagem do DNA genômico de machos da linhagem 17A2 de *D. willistoni* (fragmento 1) com *AluI*. Também está indicado a porcentagem de bases AT que compõe as seqüências. Os insertos que apresentam seqüências similares são colocados na mesma linha. Os clones em negrito correspondem aos que possuem inserto do gene 18S.

Clone	Número de sítios de clivagem para <i>AluI</i> nos insertos	Posição dos nucleotídeos nos sítios de clivagem (5'-3')	Porcentagem (%) de AT que compõe os insertos
10BM	0	-	61,0
110M	2	234, 331	53,3
114M	0	-	67,5
11BM, 21M	0	-	67,8
11M	0	-	66,7
15M, 16M, 17M	0	-	48,0
20M, 22M, 35M, 138M, 135M, 120M, 132M, 147M	0	-	62,9
5M	0	-	71,0
6M	0	-	59,0
109M	0	-	48,9

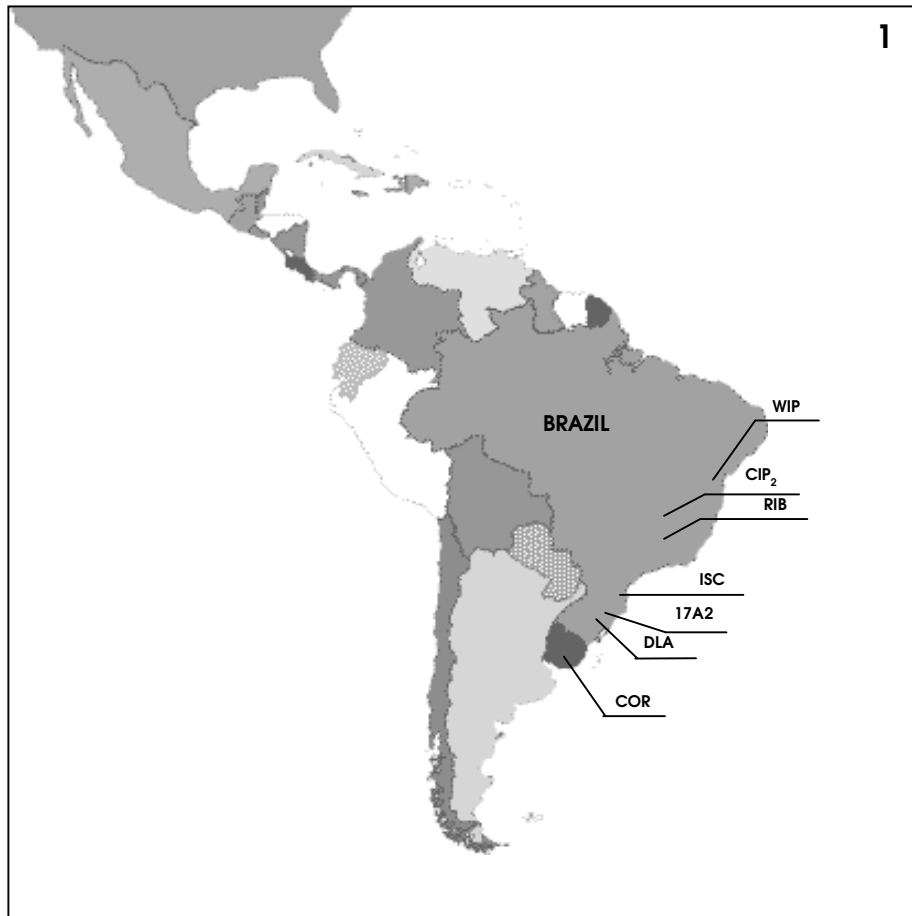
Tabela 2. Sítios de clivagem para a enzima *A**l**u**I* nos 600 pares de bases seqüenciados dos insertos obtidos a partir do fragmento com tamanho entre 3 e 4 kb, gerado pela clivagem do DNA genômico de fêmeas da linhagem WIP-4 de *D. willistoni* (fragmento 2) com *A**l**u**I*. Também está indicada a porcentagem de bases AT que compõe as seqüências. O clone em negrito corresponde ao que possui inserto com genes mitocondriais.

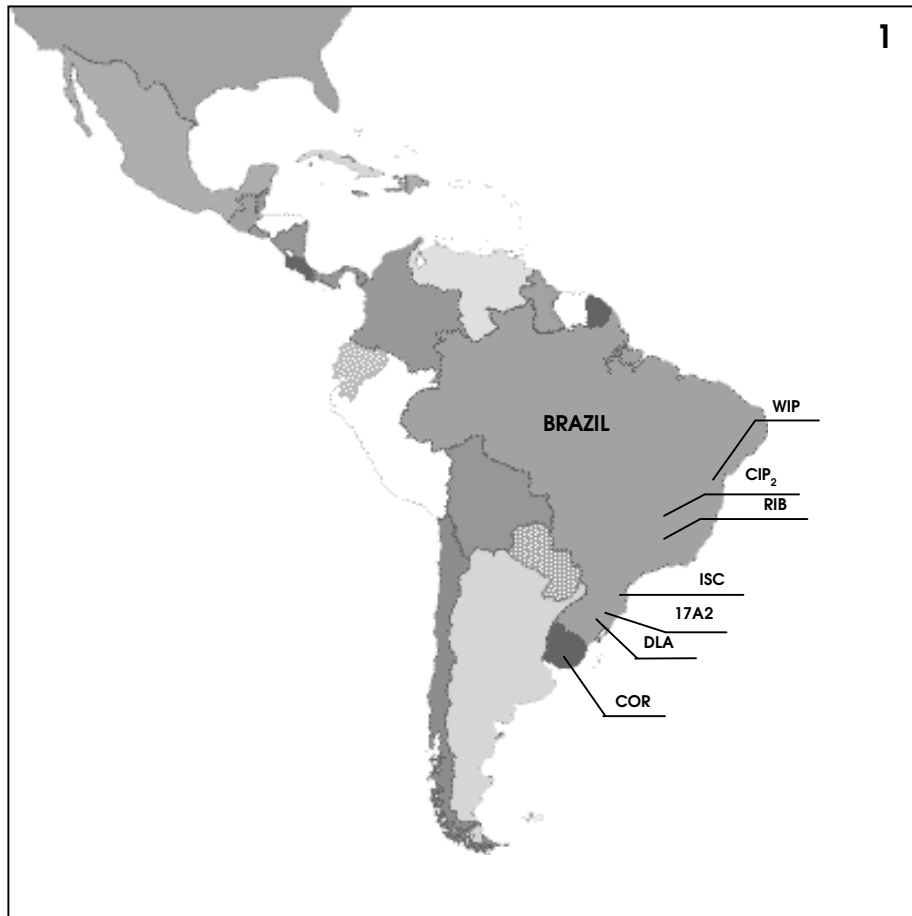
Clone	Número de sítios de clivagem para <i>A</i> <i>l</i> <i>u</i> <i>I</i> nos insertos	Posição dos nucleotídeos nos sítios de clivagem (5'-3')	Porcentagem (%) de AT que compõe os insertos
20F	1	469	55,5
23F	3	245, 253, 335	61,3
27F	1	209	52,5
28F	1	364	73,3
30F	0	0	60,6
32F	2	151, 271	61,8
37F	2	28, 115	61,5
38F	1	544	65,8
3F	3	176, 269, 342	57,3
41F	1	390	57,6
42F	0	0	83,6
46F	3	11, 186, 367	61,1
47F	1	265	51,1
49F	1	219	59,6
4F	0	0	57,1
50F	1	76	66,8
5F	2	29, 290	72,3
62F	0	0	53,0
9F	3	71, 135, 392	62,0

Tabela 3. Sítios de clivagem para a enzima *HaeIII* nos 600 paras de bases euqüenciados dos insertos obtidos a partir dos fragmentos de 5kb gerados pela clivagem do DNA genômico de machos da linhagem 17A2 e WIP-4 de *D. willistoni* (fragmentos 3 e 4) com *HaeIII* e porcentagem de bases AT que compõe as seqüências. Os insertos que apresentam seqüências similares são colocados na mesma linha.

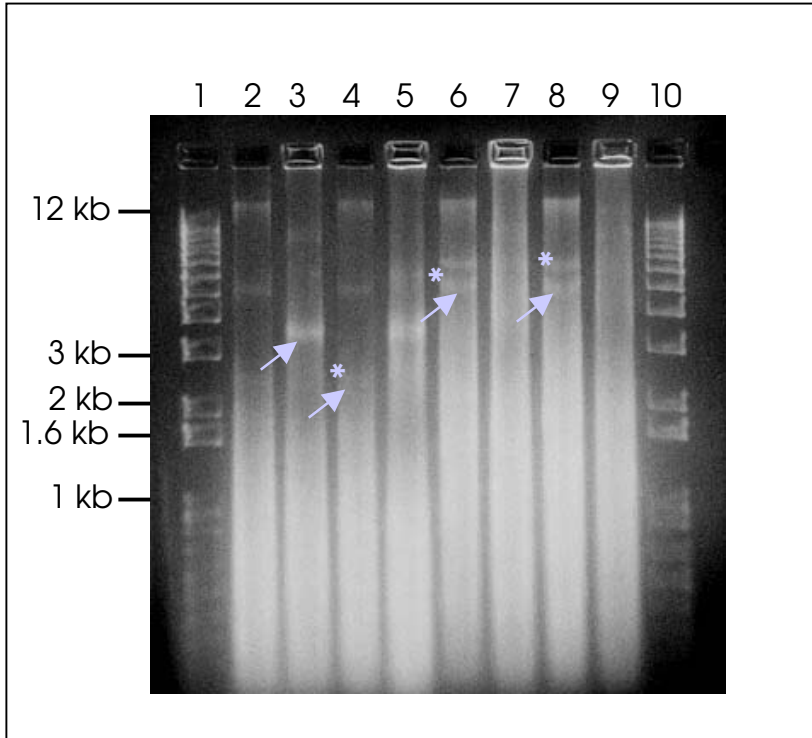
Clone	Número de sítios de clivagem para <i>HaeIII</i> nos insertos	Posição dos nucleotídeos nos sítios de clivagem (5'-3')	Porcentagem (%) de AT que compõe os insertos
73MWIP*	3	178, 360, 372	46,1
45M17A2*	4	207, 381, 392, 411	43,7
48M17A2	0	0	70,3
72MWIP, 82MWIP	0	0	53,0

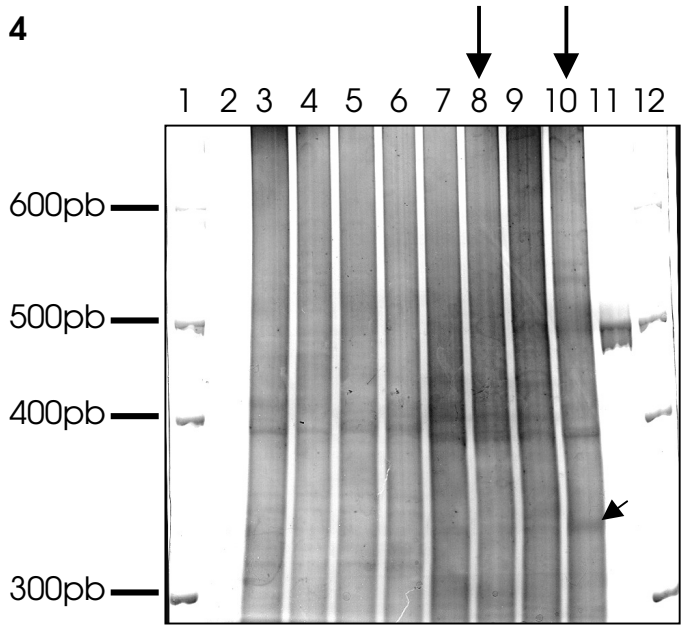
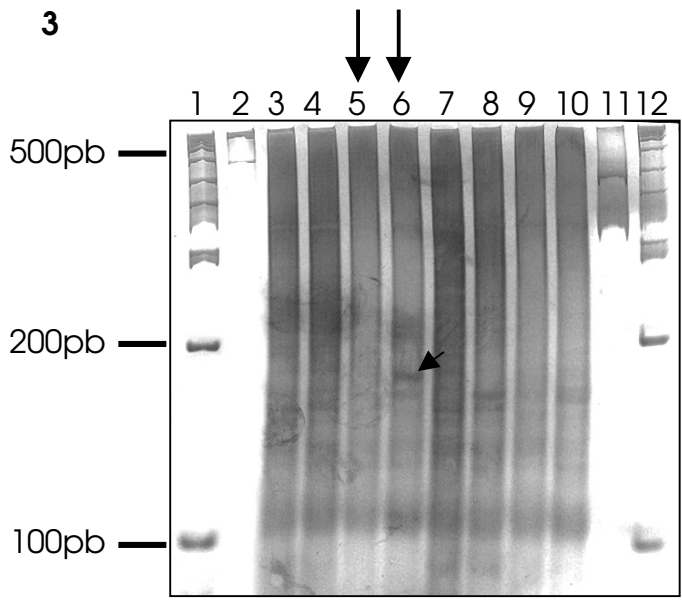
*seqüências similares, mas os sítios de clivagem não coincidem



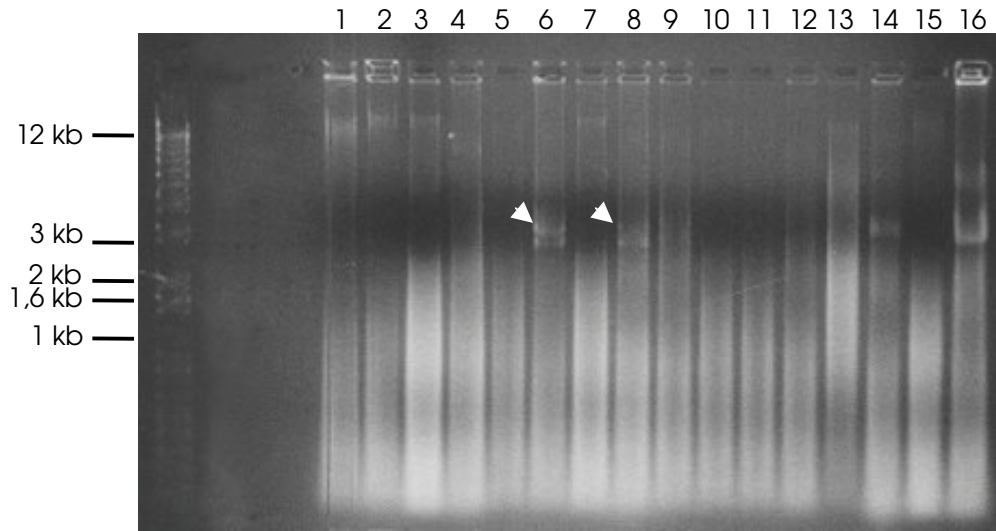


2

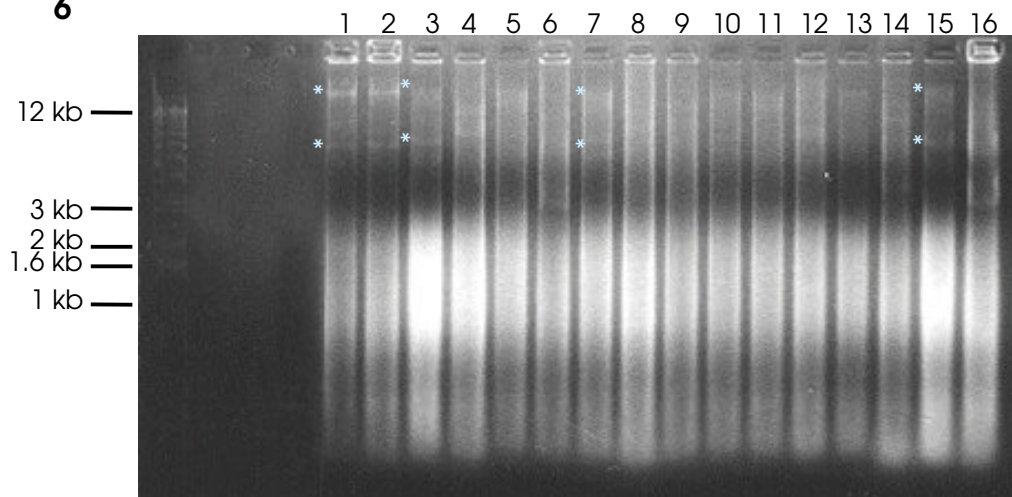




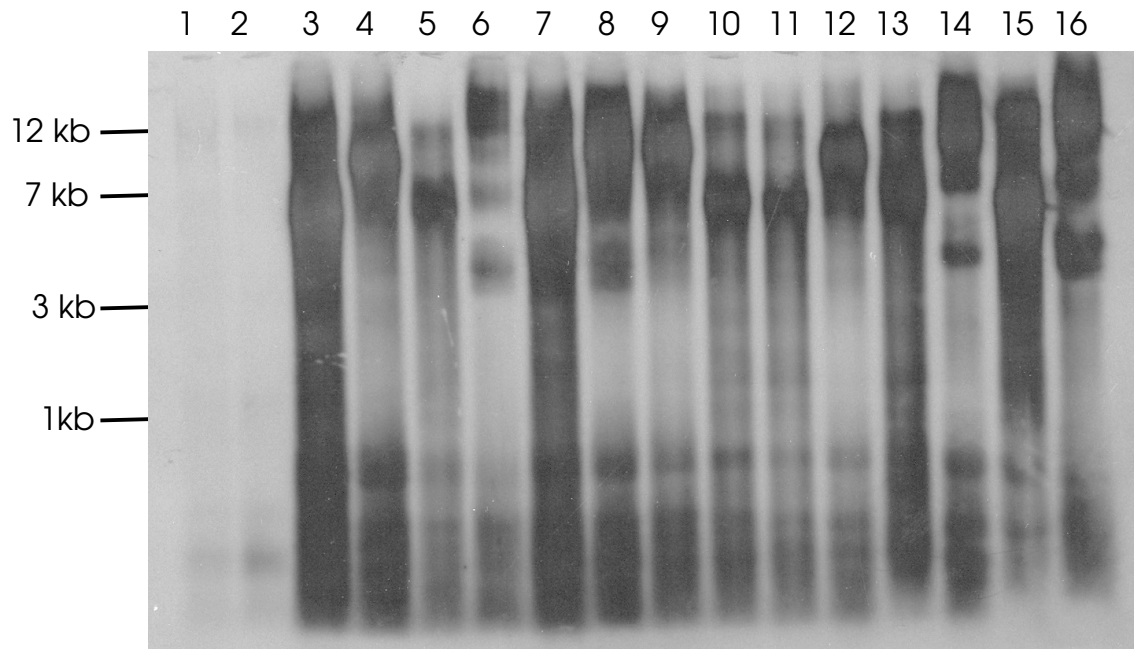
5



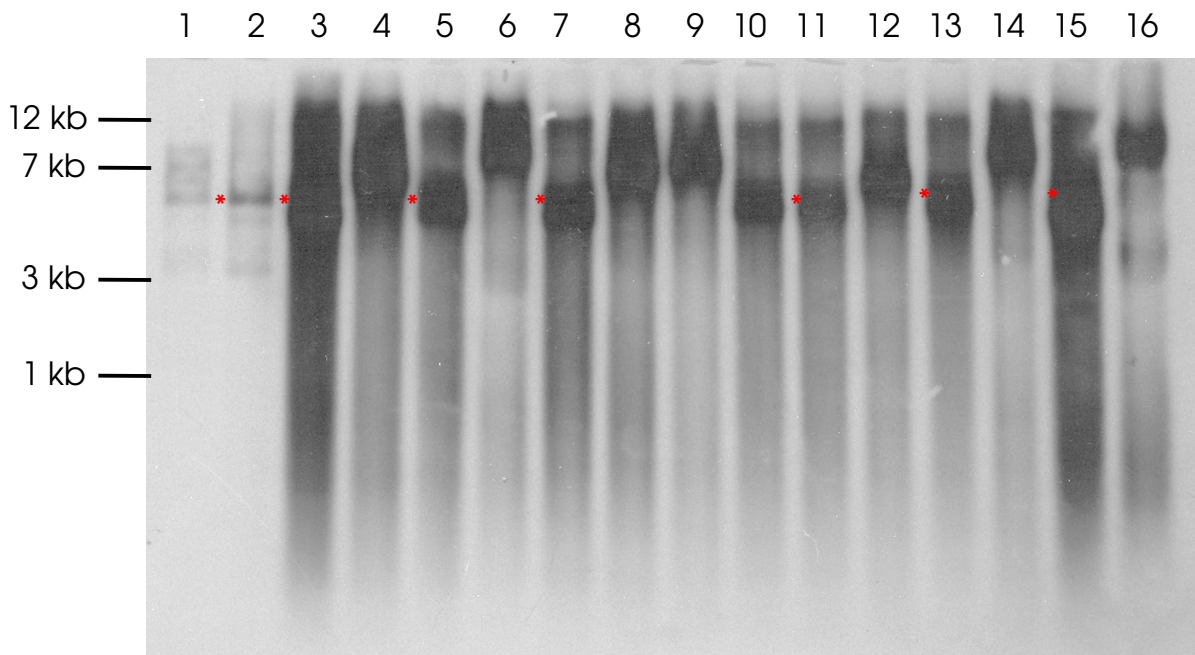
6



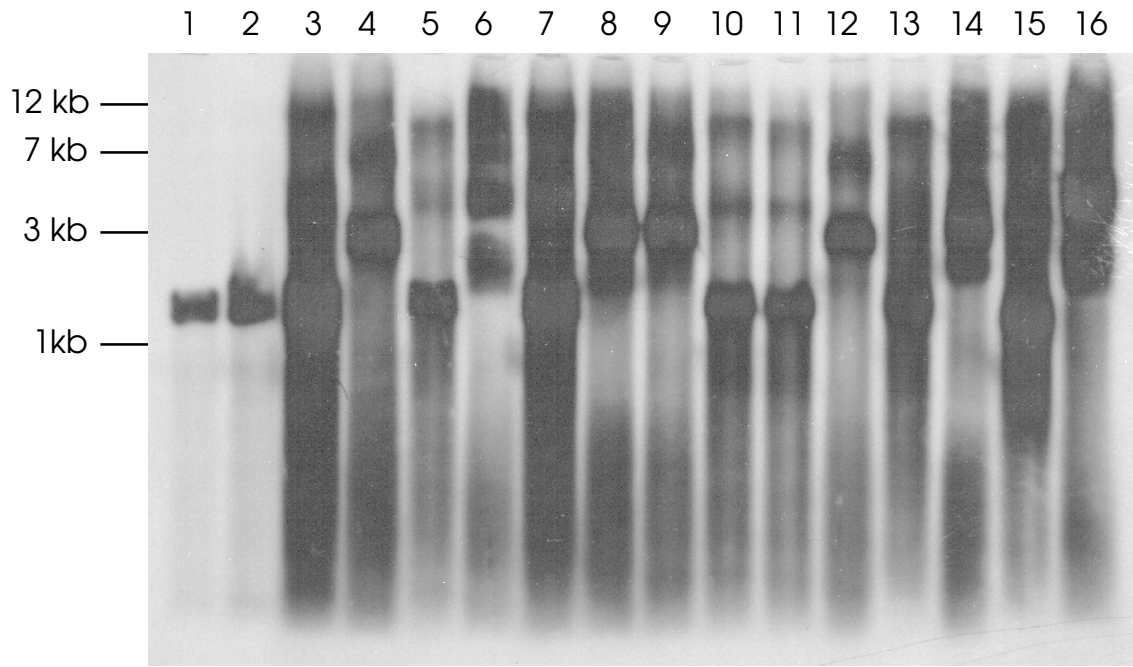
7



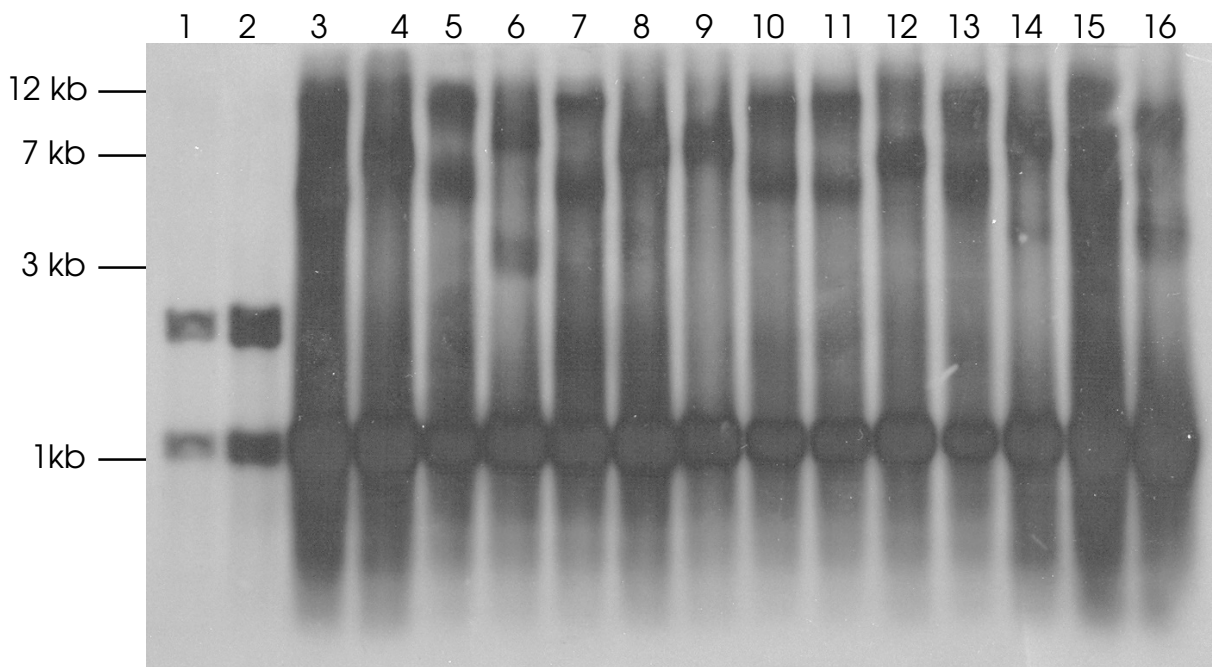
8



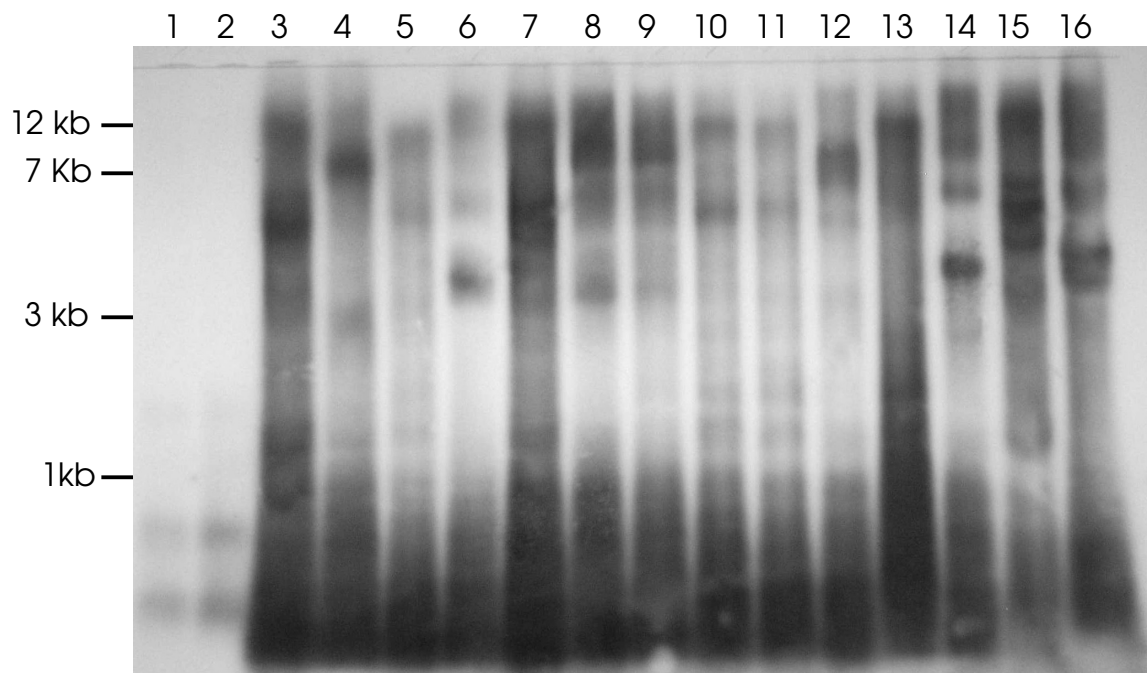
9



10



11



12

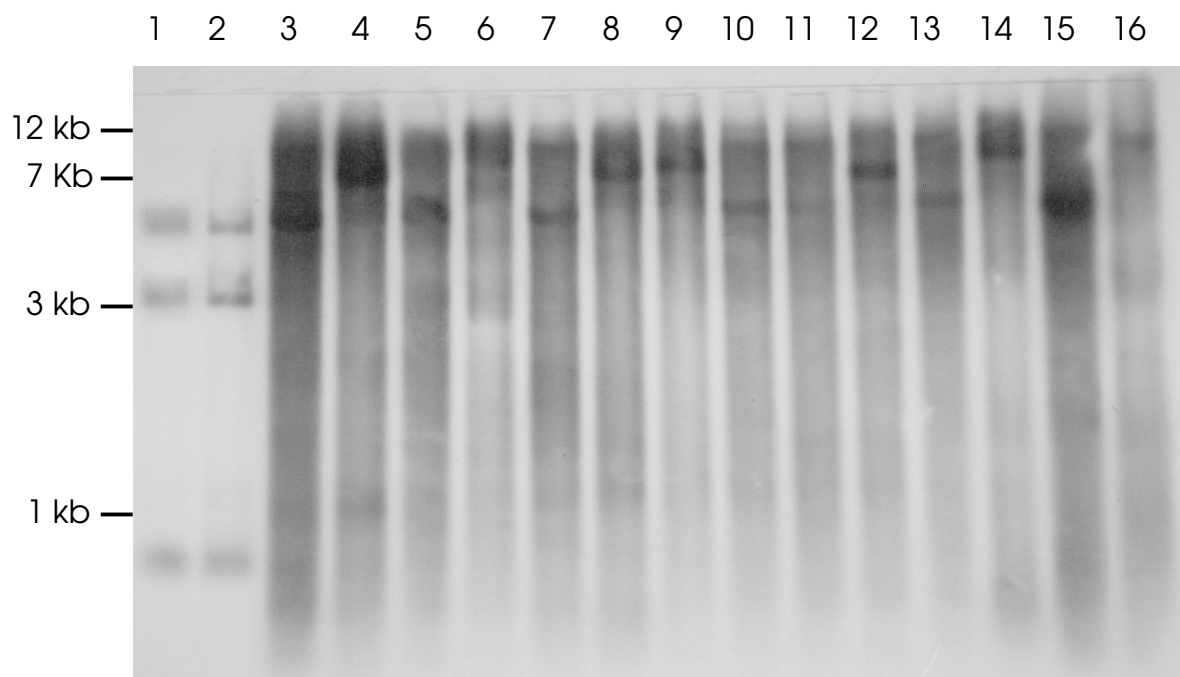


Fig 13

	
		5	15	25	35	45	55
me1		CTTCTTAAAT	GGACAAATTG	CGTCTAGCAA	TAATGAGATT	GAGCAATAAC	AGGTCTGTGA
22M		CTTCTTAAAT	GGACAAATTG	CGTCTAGCAA	TAATGAGATT	GAGCAATAAC	AGGTCTGTGA
35M		CTTCTTAAAT	GGACAAAT-G	CGTCTAGCAA	TAATGAGATT	GAGCAATAAC	AGGTCTGTGA
20M		CTTCTTAAAT	GGACAAAT-G	CGTCTAGCAA	TAATGAGATT	GAGCAATAAC	AGGTCTGTGA
138M		CTTCTTAAAT	GGACAAATTG	CGTCTAGCAA	TAATGAGATT	GAGCAATAAC	AGGTCTGTGA
135M		CTTCTTAAAT	GGACAAATTG	CGTCTAGCAA	TAATGAGATT	GAGCAATAAC	AGGTCTGTGA
120M		CTTCTTAAAT	GGACNAATTG	CGTCTAGCAA	TAATGAGATT	GAGCAATAAC	AGGTCTGTGA
132M		CTTCTTAAAT	GGACAAATTG	CGTCTAGCAA	TAATGAGATT	GAGCAATAAC	AGGTCTGTGA
147M		CTTCTTAAAT	GGACAAATTG	CGTCTAGCAA	TAATGAGATT	GAGCAATAAC	AGGTCTGTGA
	
		65	75	85	95	105	115
me1		TGCCCTTAGA	TGTCCTGGGC	TGCACGCGCG	CTACAATGAA	AGTATCAACG	TGTATTTCCT
22M		TGCCCTTAGA	TGTCCTGGGC	TGCACGCGCG	CTACAATGAA	AGTATCAACG	TGTATTTCCT
35M		TGCCCTTAGA	TGTCCTGGGC	TGCACGCGCG	CTACAATGAA	AGTATCAACG	TGTATTTCCT
20M		TGCCCTTAGA	TGTCCTGGGC	TGCACGCGCG	CTACAATGAA	AGTATCAACG	TGTATTTCCT
138M		TGCCCTTAGA	TGTCCTGGGC	TGCACGTGCG	CTACAATGAA	AGTATCAACG	TGTATTTCCT
135M		TGCCCTTAGA	TGTCCTGGGC	TGCACNCGCG	CTACAATGAA	AGTATCAACG	TGTATTTCCT
120M		TGCCCTTAGA	TGTCCTGGGC	TGCACGCGCG	CTACAATGAA	AGTATCAACG	TGTATTTCCT
132M		TGCCCTTAGA	TGTCCTGGGC	TGCACGCGCG	CTACAATGAA	AGTATCAACG	TGTATTTCCT
147M		TGCCCTTAGA	TGTCCTGGGC	TGCACGTGCG	CTACAATGAA	AGTATCAACG	TGTATTTCCT
	
		125	135	145	155	165	175
me1		AGACCGAGAG	GTCCGGGTAA	ACCGCTGAAC	CACTTTCATG	CTTGGGATTG	TGAACTGAAA
22M		AGACCGAGAG	GTCCGGGTAA	ACCGCTGAAC	CACTTTCATG	CTTGGGATTG	TGAACTGAAA
35M		AGACCGAGAG	GTCCGGGTAA	ACCGCTGAAC	CACTTTCATG	CTTGGGATTG	TGAACTGAAA
20M		AGACCGAGAG	GTCCGGGTAA	ACCGCTGAAC	CACTTTCATG	CTTGGGATTG	TGAACTGAAA
138M		AGACCGAGAG	GTCCGGGTAA	ACCGCTGAAC	CACTTTCATG	CTTGGGATTG	TGAACTGAAA
135M		AGACCGAGAG	GTCCGGGTAA	ACCGCTGAAC	CACTTTCATG	CTTGGGATTG	TGAACTGAAA
120M		AGACCGAGAG	GTCCGGGTAA	ACCGCTGAAC	CACTTTCATG	CTTGGGATTG	TGAACTGAAA
132M		AGACCGAGAG	GTCCGGGTAA	ACCGCTGAAC	CACTTTCATG	CTTGGGATTG	TGAACTGAAA
147M		AGACCGAGAG	GTCCGGGTAA	ACCGCTGAAC	CACTTTCATG	CTTGGGATTG	TGAACTGAAA
	
		185	195	205	215	225	235
me1		CTGTTACGA	TGAACTTGA	ATTCCAG-T	AAGTGTGAGT	CATTAACTCG	CATTGATTAC
22M		CTGTTAC-A	TGAACTTGA	ATTCCAG-T	AAGTGTGAGT	CATTAACTCG	CATTGATTAC
35M		CTGTTAC-A	TGAACTTGA	ATTCCAG-T	AAGTGTGAGT	CATTAACTCG	CATTGATTAC
20M		CTGTTAC-A	TGAACTTGA	ATTCCAGAT	AAGTGTGAGT	CATTAACTCG	CATTGATTAC
138M		CTGTTAC-A	TGAACTTGA	ATTCCAG-T	AAGTGTGAGT	CATTAACTCG	CATTGATTAC
135M		CTGTTAC-A	TGAACTTGA	ATTCCAG-T	AAGTGTGAGT	CATTAACTCG	CATTGATTAC
120M		CTGTTAC-A	TGAACTTGA	ATTCCAG-T	AAGTGTGAGT	CATTAACTCG	CATTGATTAC
132M		CTGTTAC-A	TGAACTTGA	ATTCCAG-T	AAGTGTGAGT	CATTAACTCG	CATTGATTAC
147M		CTGTTAC-A	TGAACTTGA	ATTCCAG-T	AAGTGTGAGT	CATTAACTCG	CATTGATTAC
	
		245	255	265	275	285	295
me1		GTCCTGCC	TTTGTGCACA	CCGCCGTCG	CTACTACCGA	TTGAATTATT	TAGTGAGGTC
22M		GTCCTGCC	TTTGTGCACA	CCGCC-GTCG	CTACTACCGA	TTGAATTATT	TAGTGAGGTC
35M		GTCCTGCC	TTTGTGCACA	CCGCCGTCG	CTACTACCGA	TTGAATTATT	TAGTGAGGTC
20M		GTCCTGCC	TT-GTGCACA	CCGCCGTCG	CTACTACCGA	TTGAATTATT	TAGTGAGGTC
138M		GTCCTGCC	TTTGTGCACA	CCGCCGTCG	CTACTACCGA	TTGAATTATT	TAGTGAGGTC
135M		GTCCTGCC	TTTGTGCACA	CCGCCGTCG	CTACTACCGA	TTGAATTATT	TAGTGAGGTC
120M		GTCCTGCC	TTTGTGCACA	CCGCCGTCG	CTACTACCGA	TTGAATTATT	TAGTGAGGTC
132M		GTCCTGCC	TTTGTGCACA	CCGCCGTCG	CTACTACCGA	TTGAATTATT	TAGTGAGGTC
147M		GTCCTGCC	TTTGTGCACA	CCGCCGTCG	CTACTACCGA	TTGAATTATT	TAGTGAGGTC
	
		305	315	325	335	345	355
me1		TCCGGACGTG	ATCACTGTGA	CGCCTGCGT	GTTACGGTTG	TTTCGCAAAA	GTTGACCGAA
22M		TCCGGACGTG	ATCACTGTGA	CGCCTGCGT	GTTACGGTTG	TTTCGCAAAA	GTTGACCGAA
35M		TCCGGACGTG	ATCACTGTGA	CGCCTGCGT	GTTACGGTTG	TTTCGCAAAA	GTTGACCGAA
20M		TCCGGACGTG	ATCACTGTGA	CGCCTGCGT	GTTACGGTTG	TTTCGCAAAA	GTTGACCGAA
138M		TCCGGACGTG	ATCACTGTGA	CGCCTGCGT	GTTACGGTTG	TTTCGCAAAA	GTTGACCGAA
135M		TCCGGACGTG	ATCACTGTGA	CGCCTGCGT	GTTACGGTTG	TTTCGCAAAA	GTTGACCGAA
120M		TCCGGACGTG	ATCACTGTGA	CGCCTGCGT	GTTACGGNTG	TTTCGCNAAA	NTTGACCGAA
132M		TCCGGACGTG	ATCACTGTGA	CGCCTGCGT	GTTACGGTTG	TTTCGCAAAA	GTTGACCGAA
147M		TCCGGACGTG	ATCACTGTGA	CGCCTGCGT	GTTACGGTTG	TTTCGCAAAA	GTTGACCGAA

Fig 13 (continuação)

	365	375	385	395	405	415
me1	CTTGATTATT	TAGAGGAAGT	AAAAGTCGTA	ACAAGGTTTC	CGTAGGTGAA	CC-TGCGGAA
22M	CTTGATTATT	TAGAGGAAGT	AAAAGTCGTA	ACAAGGTTTC	CGTAGGTGAA	CC-TGCGGAA
35M	CTTGATTATT	TAGAGGAAGT	AAAAGTCGTA	ACAAGGTTTC	CGTAGGTGAA	CC-TGCGGAA
20M	CTTGATTATT	TAGAGGAAGT	AAAAGTCGTA	ACAAGGTTTC	CGTAGGTGAA	CC-TGCGGAA
138M	CTTGATTATT	TAGAGGAAGT	AAAAGTCGTA	ACAAGGTTTC	CGTAGGTGAA	CC-TGCGGAA
135M	CTTGATTATT	TAGAGGAAGT	AAAAGTCGTA	ACAAGGTTTC	CGTAGGTGAA	CC-TGCGGAA
120M	CTTGATNATT	TAGAGGAAGN	AAAAGTCNTA	ACAAGGTTTC	CGTAGGTGAA	NCCTGCGGAA
132M	CTTGATTATT	TAGAGGAAGT	AAAAGTCGTA	ACAAGGTTTC	CGTAGGTGAA	CC-TGCGGAA
147M	CTTGATTATT	TAGAGGAAGT	AAAAGTCGTA	ACAAGGTTTC	CGTAGGTGAA	CC-TGCGGAA

	425	435	445	455	465	475
me1	GGA-TCATTA	TTGTATAATA	TCCTTACCGT	TAATAAATAT	TTGTAATTAT	ACAAATAAAA
22M	GGA-TCATTA	TTG--TATTT	TCCAA-CCGT	TATTAATA-AT	AAATAAAA-TA	CCAAATTAAT
35M	GGA-TCATTA	TTG--TATTT	TCCAAACCGT	TATTAATA-AT	AAATAAAA-TA	CCAAATTAAT
20M	GGA-TCATTA	TTGG-TATTT	TCCAAACCGT	TATTAATA-AT	NAATAAAAATA	CCAAATTAAT
138M	GGA-TCATTA	TTG--TATTT	TCCAA-CCGT	TATTAATA-AT	AAATAAAA-TA	CCAAATTAAT
135M	GGA-TCATTA	TTG--TATTT	TCCAA-CCGT	TATTAATA-AT	AAATAAAA-TA	CCAAATTAAT
120M	GGNATCATT	TTGT-TATTT	TCCAN-CCGT	TATTNAA-AT	AAATAAAA-TN	CCNAATTNAN
132M	GGA-TCATTA	TTG--TATTT	TCCAA-CCGT	TATTAATA-AT	AAATAAAA-TA	CCAAATTAAT
147M	GGA-TCATTA	TTG--TATTT	TCCAA-CCGT	TATTAATA-AT	AAATAAAA-TA	CCAAATTAAT

	485	495	505	515	525	535
me1	ACAATTTACC	AAAATAAAAA	TATAACAAAA	TGATTCCATG	GAATCAAAAAG	TTAAAATCAA
22M	ATA-----AA	GATATATAAC	-AATGAAAA-	TGAAATTGAA	GATGAGAGC-	CTAAAATGAA
35M	ATA-----AA	GATATATAA-	-AATGAAAA-	TGAAATTGAA	GATGAGAGC-	ATAAAATGAA
20M	ATAT-----AA	GATATATAAA	CACTGAAAAA	TGAAATTGAA	GATGAGAGC-	ATNAAATGGA
138M	ATA-----AA	GATATATAA-	-AATGAAAA-	TGAAATTGAA	GATGAGAGC-	ATAAAATGAA
135M	ATA-----AA	GATATATAA-	-AATGAAAA-	TGAAATTGAA	GATGAGAGC-	ATAAAATGAA
120M	ATA-----AA	GANCTCNANA	-AATGAAAA-	TGAAATTNAA	NATNANAGCT	CTNAAATGGA
132M	ATA-----AA	GATATATAA-	-AATGAAAA-	TGAAATTGAA	GATGAGAGC-	ATAAAATGAA
147M	ATA-----AA	GATATATAA-	-AATGAAAA-	TGAAATTGAA	GATGAGAGC-	ATAAAATGAA

	545	555	565	575	585	595
me1	A-ATAAAACG	AAGATGGGTT	TTATTATAT	AGTTAG---T	GTGGGGCTTG	GCAACCTCAT
22M	A-ATGAAATT	GAGTTATTAT	T-ATTATTAA	A-TCTG-ATC	AGGGGG--AAG	TCGATTTAA-
35M	A-ATGAAATT	GA-TTATTAT	T-ATTATTAA	A-TCTG-ATC	AGGGGG--AAG	TCGATTTAAA
20M	A-ATGGAATT	GA-TTATTAT	--ATTATTAA	A-TCTGGATC	AGGGGGAAGG	TCGAATTTAC
138M	A-ATGAAATT	GA-TTATTAT	T-ATTATTAA	A-TCTG-ATC	AGGGGG--AAG	TCGATTTAAT
135M	A-ATGAAATT	GA-TTATTAT	T-ATTATTAA	A-TCTG-ATC	AGGGGG--AAG	TCGATTTAA-
120M	ACATGAAATT	NC-CCATTAT	TTTTTNTTAN	AATCNGAATC	ANGGGG--AAG	NCCATTCCNG
132M	A-ATGAAATT	GA-TTATTAT	T-ATTATTAA	A-TCTG-ATC	AGGGGG--AAG	TCGATTTAAA
147M	A-ATGAAATT	GA-TTATTAT	T-ATTATTAA	A-TCTG-ATC	AGGGGG--AAG	TCGATTTAAT
			
	605	615	625			
me1	AAAAAGATT-	-----	-----			
22M	ACAA-TATTT	GATTTGAAAA	ATTTA--			
35M	ACAA-TATTT	GATTTGAAAA	ATTAAT-			
20M	ACAAATAATT	GGNTNGG---	-----			
138M	ACAA-TATTT	GATTTGAAAA	ATTA--			
135M	ACAA-TATTT	GATTTGAAAA	NTAAAT			
120M	AANAATNTTT	GATT-----	-----			
132M	ACAA-TATTT	GATTTGAAAA	ATTA--			
147M	ACAA-TATTT	GATTTGAAAA	ATTAAT-			

Fig. 14

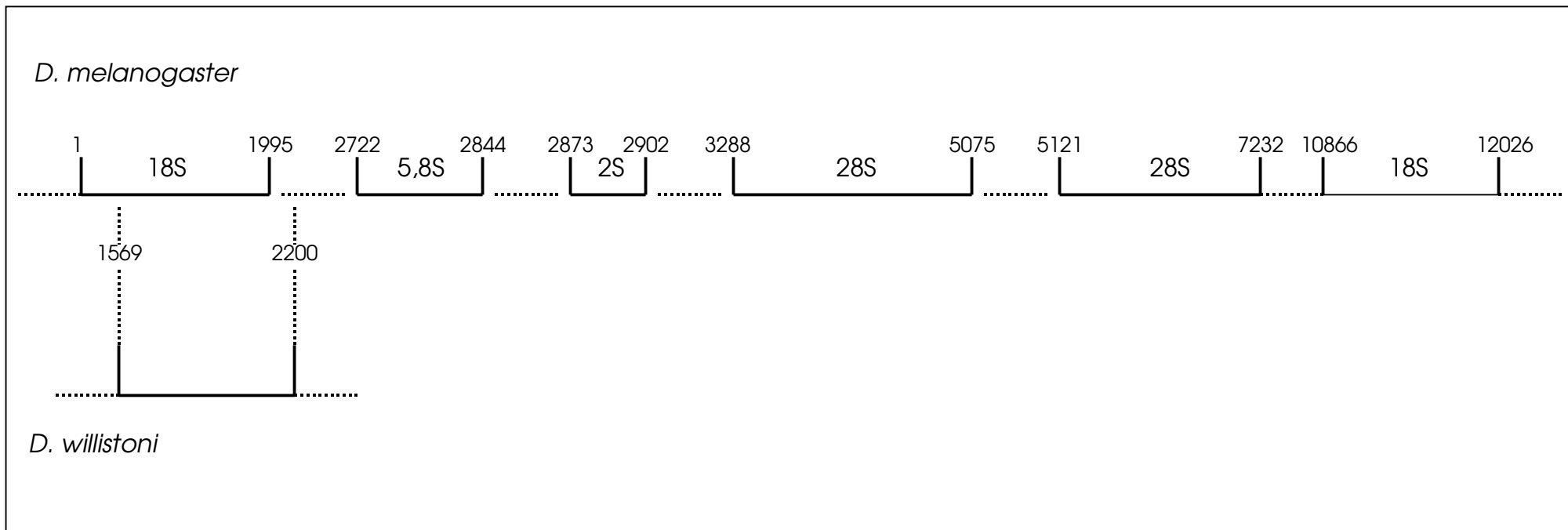


Fig. 15

	5	15	25	35	45	55
15M	CTTGACGCTA	TCCTGCTGGA	AGACTGGCAG	GCCGATGCCG	CCAATAAAAC	CCTGACCGTC
17M	CTTGACGCTA	TCCTGCTGGA	AGACTGGCAG	GCCGATGCCG	CCAATAAAAC	CCTGACCGTC
16M	CTTGACGCTA	TCCTGCTGGA	AGACTGGCAG	GCCGATGCCG	CCAATAAAAC	CCTGACCGTC

	65	75	85	95	105	115
15M	CGGATTAAG	AGAATGCAAA	ATTTGCCTCC	GGCAACCCGG	TACGCCCGGA	AGATATTATT
17M	CGGATTAAG	AGAATGCAAA	ATTTGCCTCC	GGCAACCCGG	TACGCCCGGA	AGATATTATT
16M	CGGATTAAG	AGAATGCAAA	ATTTGCCTCC	GGCAACCCGG	TACGCCCGGA	AGATATTATT

	125	135	145	155	165	175
15M	TTCTCTTACC	AGCGCGCTGT	GGTCATGAAT	AAATCGCCTG	CGTTTATTCT	CAATATTCTC
17M	TTCTCTTACC	AGCGCGCTGT	GGTCATGAAT	AAATCGCCTG	CGTTTATTCT	CAATATTCTC
16M	TTCTCTTACC	AGCGCGCTGT	GGTCATGAAT	AAATCGCCTG	CGTTTATTCT	CAATATTCTC

	185	195	205	215	225	235
15M	GGCTGGAATA	AAGAGAATAT	CGCGCAGCAG	TTTGAAAAAA	CCGGCGATCG	CACCCTGAAA
17M	GGCTGGAATA	AAGAGAATAT	CGCGCAGCAG	TTTGAAAAAA	CCGGCGATCG	CACCCNTGAAA
16M	GGCTGGAATA	AAGAGAATAT	CGCGCAGCAG	TTTGAAAAAA	CCGGCGATCG	CACCCTGAAA

	245	255	265	275	285	295
15M	ATAAAATGGA	GCGCANATAT	CAGCCCGGAT	GTGGCACTGA	ATCTGTCTAT	CTACCCCGAT
17M	ATAAAATGGA	GCGCAGATAT	CAGCCCGGAT	GTGGCACTGA	ATCTGT-TAT	CTACCCCGAT
16M	ATAAAATGGA	GCGCAGATAT	CAGCCCGGAT	GTGGCACTGA	ATCTGT-TAT	CTACCCCGAT

	305	315	325	335	345	355
15M	AGCCTCGGTG	GTGGATGAAA	AACTGGTGAC	ACCGNATATT	AAAAATAATG	NCTTCNGATA
17M	AGCCTCGGTG	GTGGATGAAA	AACTGGTGAC	ACCGAATATT	AAAAATAATG	ACTTCGG-TA
16M	AGCCTCGGTG	GTGGATGAAA	AACTGGTGAC	ACCGAATATT	AAAAATAATG	ACTTCGG-TA

	365	375	385	395	405	415
15M	ATGNCTGGNC	TGAAAATGCA	CTNTGNCGGC	CGCGGTGCTT	ATTCACTNAG	AGTCTATCAG
17M	ATGCCTGGC-	TGAAAATGCA	CTNTGCCGGC	AGCGGTGCTT	ATTCACTGAA	GGTCTATCAG
16M	ATGCCTGGC-	TGAAAATGCA	CTCTGCCGGC	AGCGGTGCTT	ATTCACTGAA	GGTCTATCAG

	425	435	445	455	465	475
15M	CCGAACCAGN	CNAATTNTGA	TNNGCNGCCA	ACCCACANGT	CTCANCCAGC	NAGGNAAAAA
17M	CCGAACCAGG	CGA-TTGTGA	TGG-CCGCCA	ACCCGCATGT	CTCCACCGGC	GAGGCAAAAA
16M	CCGAACCAGG	CGA-TAGTGA	TGG-CCGC-A	ACCCGCATGT	CTCCACCGGC	GAGGCAAAAA

	485	495	505	515	525	535
15M	TCNCCATCCN	ANNANTAATA	AA-AATGCAC	CGGNANCCNG	ATTNTCCCN	NNTCTGATTN
17M	-TCCCGTCCG	-TTATTATTA	AA-AATGTAC	CGGACCCGGC	TTCCCGCCGT	CTGCTGATTG
16M	ATCCCGTCCG	-TTATTATTA	AACAATGTAC	CGGACC-GGC	TTCC-GCCGT	CTGATGATTG

	545	555	565	575	585	595
15M	CNACAGAGGC	ANNGGANANN	GCN-CNAAAC	ACGGNNNTNN	ANAAANCACA	GAGTNNANAA
17M	AGCAGGGTGA	TGCGGATATT	GCCCGTGAAC	TCGGTANTGA	CCAGACAGCA	GCACTGAAAA
16M	AGCAGGGTGA	TGCGGATATT	GCC-GTGAAC	TCGGTGCTGA	C-AGACAGAG	--ACTGAAAA
					
	605					
15M	AA-----	---				
17M	ACAGCGCC-	---				
16M	CAGGCCGGTA	CGG				

Fig. 16

	5	15	25	35	45	55
11BM	CTCTTTTCATT	TTTACTTTGT	TTCGACAAGG	TGTGTTAGTG	AGTGTCAATT	AATTGGGATG
21M	CTCTTTTCATT	TTTACTTTGT	TTCGACAAGG	TGTGTTAGTG	AGTGTCAATT	AATTGGGATG

	65	75	85	95	105	115
11BM	TGTCATTGAT	GTTATTTTTG	AAATATTTTT	TCTGTTCAAC	ATTATTAAAA	TCATTGTTAA
21M	TGTCATTGAT	GTTATTTTTG	AAATATTTTT	TCTGTTCAAC	ATTATTAAAA	TCATTGTTAA

	125	135	145	155	165	175
11BM	CTATATTTTT	GGTTTTACTG	TCTAGGCGAT	TACGAAAAAA	ATCCGCAGAG	ACATAAATAC
21M	CTATATTTTT	GGTTTTACTG	TCTAGGCGAT	TACGAAAAAA	ATCCGCAGAG	ACATAAATAC

	185	195	205	215	225	235
11BM	ATGCACACAC	CAACGTAACG	GATTCATTCA	TATACTTCTG	TTAAAAATGT	AATGCCTAAA
21M	ATGCACACAC	CAACGTAACG	GATTCATTCA	TATACTTCTG	TTAAAAATGT	AATGCCTAAA

	245	255	265	275	285	295
11BM	AACACTTCAA	ATCATGGTGG	AAGTAACAAT	GACAAAAGTGA	AGAGTTGCCA	TTTATTATTC
21M	AACACTTCAA	ATCATGGTGG	AAGTAACAAT	GACAAAAGTGA	AGAGTTGCCA	TTTATTATTC

	305	315	325	335	345	355
11BM	TAACCTCAAA	TTTCGACATG	TATGAGATGA	ATTGGGCACC	AGTAACATTG	TATTATATGA
21M	TAACCTCAAA	TTTCGACATG	TATGAGATGA	ATTGGGCACC	AGTAACATTG	TATTATATGA

	365	375	385	395	405	415
11BM	ATAACGACAC	TGGAAAAATG	TGTTTCTATT	GTATTATTGC	ATATTTTTGT	CTTTACCGCC
21M	ATAACGACAC	TGGAAAAATG	TGTTTCTATT	GTATTATTGC	ATATTTTTGT	CTTTACCGCC

	425	435	445	455	465	475
11BM	AAGCATTGAA	TCGAATAAAG	TGTGGACACG	AATTGAGGTT	ATATCGAATT	TGGTGGCACT
21M	AAGCATTGAA	TCGAATAAAG	TGTGGACACG	AATTGAGGTT	ATATCGAATT	TGGTGGCACT

	485	495	505	515	525	535
11BM	GGGCACACAA	TTTACATACA	CAACGAGAAT	GTTTCGCGTAT	TTTACGTAGT	TTTACATATG
21M	GGGCACACAA	TTTACATACA	CAACGAGAAT	GTTTCGCGTAT	TTTACGTAGT	TTTACATATG

	545	555	565	575	585	595
11BM	AATGTGTGTA	CATAAATGTA	AATGTATGAT	TTTTTTTGCT	TTTACTAAT	GTCCCAGGTG
21M	AATGTGTGTA	CATAAATGTA	AATGTATGAT	TTTTTTTGCT	NTNACTAAT	GTCCCANGTG

Fig. 17

6M
CTAAGCATATGTTTACATGTATGGGTATTAACCTAGTCAGTCAGTCTAAATTTTGTGGCTTTAACGTGCACCCCGCTCCCGC
TGCCTCACCCCTTTCCGCTCATCCCTTTTTCCGTTATTTATATTCCTTGCTTTCTTCCCTCTGGTAGTTCCTTTTTATTT
ATTCTCCTTTTTTTTTTTCTCACCACGGCAACCACTTGTTTTCCCAAGCACAAACAGACTACATATATACATACATACATACA
TATAGAGGAGAGACCATAACATTACATTTTTATAGACTGCAAACGCCACTCGACGTGACATACTATAACATACATACATATA
TATGTACATATAACTATGTAGTCCACCCCTTCGAAAGGGGGTAGAGGCAGGGTATGTATGTATATATGTGCGTATAACTTT
CCATTGTGCGACTGCGTCGGCGTTAGCGCCACATTCGGTTGCGTTGCGCGTCTTGTGATTACTTTTTATTTTGTGAACCTCAAC
AGATGACAAAGTTTGTGCGCGCCTAGAAGAGAGCAGCATCGAATTGAGGAGGTTGAAAATCGTTTGCAGAAAGTTGATAATTATTA
AGAAA

109M
CTGTATACGTCGTATCTCTCCTGACGTAGGTCATAGAAAGTGTCCAGNCCGGATGGGANCCAGATAGAGAACGGGCTGAGCCGTG
CCGGATTTAGAACCGGAGGAACACTTGTGGCCTAAAGTATTTCCGACCTTCCCGGGTCTAATCTCGAGTGCCATCGGACTCCCAGA
GGAAAAGTAATAATTTAATATCTTTCCCTTGCCTTTGTGAAGGGGATTCGGGACCGGACCTNCGCTGTNCTCCTATTNNGTAGAG
TTCCTTGGGTTTANCCACTTTGTGCCNGTTTC

110M
CTGCAGAAGTTTTGGCAGAGTGTAAAAAGTTGGCATAAATCATATAGTTGGCATAAACTTGTGGTGTGATTGTGGTGAAGG
GATAGCGGAGGGTTATAAGACCTTCTATCAGTCTCGTTTTCCAAGATACCCAGCGTACGATGGAAAGAAAGAGATTACCGCT
ACCGTGATCTGTGGTGTGCTGCGGTTANAACAGCAGATTCCACACGCCCTCCTCTGTAGGGAGCTACATACCTATGAGTGGCTTA
CTACATAGCAGCAAGATGTCTAGCAAGAATGTGTGTAAGAAATTTGGGTGTGTGCACACGTGATGCTCATAGAAGCTGNGCGCAG
ACTTCTNTGANGAAATCTGCCTCTCTTTAAAAACGGGGAGCCGTTAATATCTGGNGTACGNGGACTCTGAGATTCCGTGTAGA
TAAAAATCCTCCGGTGTCCCGGAGCAGTATCCCAAAAACTGGGGGAGAGTATTTCCATTTACATCGTGACCCANAGTGT
TTGTGTACATCTTCCNGNCAACAAGGGCCAAAAATTTAAAAACAGCCGGTGGGAAAAGNGCANGGCCAAAGAAAGTTATCCTTT
CATT

114M
CTGTTGTTGACGTAGGTAAGGTCGATTATTGATCCTCTGCTGCGCTGTTAAACGTGTGTATTTAAAAAGATATAAATTTGAATAT
AAACAAACAATTAATTGAAAATTTCAATATCACTGGAAGACAAAACCCAGGTAACGGCTGAAGAAGAAACGGATCAAGAAGAACC
ATCAGTGAGTTCAGATCAAAACAAAAATAACTCTTAATAAACTAGCCATTTCCGCAAGAAACGCAAAAATGAGTCAAACAGTTACT
GATTTTTTAAAGATGCCCTCAAACCTTTTTCCACAGTTTGTGGTGTGCTGTTTTAAATCTAGTATCGATTTCGAAGTCAAGTCTAT
CTTTATTTAAATAGTTTATTTTCATGTATTTGTGGTTGGGTATTATAGTCGGGTGATCCTGCATAGATAAAATGTCGGCTTGTGTT
CGGTTAGTGTTTATGTATCGTCTTATGGTTGTATATGTAGAAATTTTTCAATTTAAGTAATTTATATTCGATGTCATTTTC
ACTATTTATAAATTCGGAGTTTTTTCACTTTACTGGTTTATGGAATCTTTTTACGTCAGAAATGCCGTTTTACTTTGTGTAATTT
TCTAA

11M
CTCAATCGATGTGATTTTCGATTCATTTGCATGAGTTTGCCAATTTAATTTCTTTTACTCTTAATGAGAAAAAGCAGAAA
AAAGAGAATGAAAGAGAGAAAAGAGATGACATGGAGTCTTGTTCGCTTTTGGGCATTAGATCGAAAACATCATTAGTGGGTGCCTT
TCTCCCTCTCTCTTTTTGCTTCTCTTAATTTGTATGTTAAGCAGGTTAGAAGAACAGTTGTGGTTAACTATATCCGGTAATG
ATTTTTAATAATATACTTTCAACACAATGTTGCTTGTGTTGATTTTTCGTTGTTGTGTAACATTCGACCGTTATCTCTTGGCAAA
TAAAGAGAAAAGAGAAAAAAAAGTTTGTGAGTTCATAAAAAGTAAAAACCGTTTTGAGCAATTAGTGCTCAATTTCTGACT
GGACATGCCCTGAATGTGATGCTGCTCATTTTCACAATGCCTTGGATTGTTTTATTTCAAGTATTTCAAGAACATTTTCATTTT
CAAGTTTTAGTTTATTTCTTTAATTTTTCAATTTAGATTTCTCTCTCTCTCCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCT
CTCTC

5M
CTTTTTCTTGAGGTTTCGAGTGACCCAGAAAAGAAGATTTACCTAATTTATATATACATACACTCTTCTTTCCCATAGACGTAT
TATAAATAGTGGCTAATCAGTGTGCCAGACTTGCCTTATTTACCACCCAACAATATACTACAATGATGTAAGTATATGAACATA
GAACTTAAACAAAATTAATTCATCTTAATTTGTTATATTTACAGAGATCTCGATAACAATCAAATAACTCGAATTGATAGTAAAT
CCATAAATATAAAGACTGGACAATGTAAGTACAATATATCATTTATACAGTAATTCAAAATTCAAAAGAAAATCAACACGATTAT
AGAAAATATTAATATAAAAAGAATGAAAACTTTTACACAATATATATCATGAAATAGGGAACTATATAAGATATATTTGTGCTAT
TCTGTGGCGAATCTAGATATAGATTTGGAGTGATTGATCCTGGTTTGGGGAATTTGAGCAGTTTTACAGAACTTTCCCTCATT
ATCCTCCACGAGAATTCGCAATTTTACACAAGTAGACCGTTAAGGGGAATAGTTTTTTATCATTATCAATATCACTTTTTTATC
TAGAT

10BM
CTCTTATAGTCTCCGAGATCTAGGTGTTTACATACGGACGGACAGACGGACGGACGGACGGACAGACGGACATGGCTAGATCG
ACTCGGTTTTTGATCCGTGATCAAGAATATATATACTTTGTGGGGTCCGAGATGCTTCTTCTGCCTGTTACATACATTTTGGCGA
CTTTAATATAACATTTACCCTATGGGTGTATGGTATAAAAAATAGAAGAATCGAAAATGAAAATAAATCAGAGAACAAAATTTAT
TTAATTTAAATAAGATAAAACCAAAGTAATGTAACACCTATTTATTAAGTAAAAGGGTAAAGATTAGTTTGTATGGTCCG
ATTTAATCTTTGGGTTTTGCGCAGATGCAACTTGCTGTTGCATCGCCGGAAGAGAAGAGAAGCCGCTCTCAACCTATCGAGGA
CTTATCGCTAACCATCGATACTTATTACTGACAATCGATACTTATTACTAACAAATCGATATATGCATGAGTATTTAACAGACTTT
AAATAATTGGAATCNTACAACCTCGGCCGCTCTGACGAGGAATCGACCTCGATTCCAATTTGGTAACAACGGAGGGGTTAATAAGA
ATCNT

Fig. 18 (continuação)

9F

CTCAGAAAATAACGACAAAAAATATTGAGACAAGTCCCTGATCGTGACTTTGTCGTTTGTATGGGAGCTATATGATATAGTAGTCCGATCCGGC
TGAATCCGAGATATACAACCCCTGCAGTATATACAAGCTTACATTCAAATTTCTCTGTAACCTTACGGAGGAGGAGTTTGCCTGATCCAGACG
GACGGGACAGCGGACGACGACTATTGAACTCGTCTCGTCTGCTGATCAAGAATATATATACTTTATATGGCCGAGATGCTTCTCTATG
CGTTGCACACTTCTGACCAAAATTAATACACCCATTTGCAAGGGTATAAGAACGGGATCGAAGAGTACCAAGAAAAGAGGATTTGCAGGATTTATT
TAAAAGCTATTCATTTTATATCGTATGGCTTTTGCAGTATTTCTCCCTGCCGAATATTCGGAATCATTACTTTACGTTACGGGCTTATTTACG
CCTTTAACCGTAAAAATAGAATTACCATTTGTATTTTATTACAATTTCCAAATTTGCTTGGAAATCTTAAAGTCAAATAAAAATTTGGCGACTTGT
TTTGAACGTATACTGAATGTTTT

32F

CTCCCCAGCCCGACACCAAAAAGAAAAACAAAATATTCATATGGAATTACATATTTTGTCTGTTTCTGGGAAGGTATGAAAAATTTACTTAAAGAC
CTACCCAAACATATGTATGTACATATGTGCATACACACATATGTACATACATAGCTAACTTTTAGGTTGCCGATCCATGATTTTGTATTCTCTTG
TGACTATGGCAACTCTATCAAATTTATAGTGTGACCAGTCTTTCTAAATGCACCGAAAGTTTAAACACGTGTTGCAGCTTCATATTTGTTTTCTA
TCTTTGCAAATATAGTAAAAAGTCGGACAAAACATGGAACAGGTCAATCATATAAAACAACAATCACACGGAACATCCTTGGTAGAAACTT
GGTAAGACACTCGATGAACATCGCATCAATTCCTGAGGTCTGGAGAGGGTGGAGTACGTACATACGCGCACATTGNNTAGAAATCTCCAAG
AATATCTAAATTCGAAATCTTTTCCCCTGGTCCCATTGANCAAGATAGAGTATACATCAAAGGNNNATCCAATNNGCCTTATGCACCCT
GAAAAGATAAGGAAATGGAACG

20F

CTCGGCACCAGTAGCCATAAATGCCATTGCCTCCACTAATCGCCCCAATCCTCCGCCACCTGAGCCAGTAGTGCCAGCCTCACACCAACATC
ACAATTTACCTATTAAGAGCGCTAAAGGCTATAATTCATAGTAACAACAATAAGCGTACCTTTGTGCCGACCAAAAACCGTAAAAACCAACCC
CATCGGATGAGGATTTGATGGAAGGCGTGGGGCGCGCCACAGATATCGCAACAAGATGCGTAATGAGCACAAGGAATTCGCGGTCGAGAAT
GCGCAACTTCAGCAAGAGAATCAGGAATTCGCGCACAGGGTTGCCAGACTAGAGAGAGAAGTGCAGCAGCAGGACAAGAACAACATCTGGCAGGT
AGGAAAAAGATAGCAGACTTAACTCTATAAAAAACAACCTTATTTTTCAGTGCCTCTAATCCATACAAATTCCTGGCTCAGCTATACACCTGG
TCTTTAATGTTCCCAAAATGATAGTTCCACATCTACAGGTAGTTCAGCACGGATAAAAAGTGATTTAATTGATAGTATATAACCATAGAGGT
TCTAATTTTAAAGTTCAAATGA

47F

CTACTACCTGATTCATTTGGGTAAGGCTTCGGAAGGGCTCGGGCTATTACTTGATCTATGCTTGCTTGATAACGGCAAGTCGGATGCCTCTG
GCGTGTGGCTGTGGTTCCATTTCTGGGTAGCCTCAGTTGATCTGCACGGTACGTGATGATCTTAAAGATCGGCATGTCTCCGCCGCTGCTA
ACAGTAACCTCGTCCGCAAAATAGTAACGTTGGATTGAACGAAAGTACGACAACTGGACACACTGATTTAGCTCCTTCGCGAAGCGAAAAGCAAC
TAATGTGAAATTAATGATTGCAGGGGGTGGTTATCCACTCTCGTTGAAGTCCAACCTCCCGCAC

50F

CTCAAATCATGGCCACCAGAGGCCAGATGCGATTACGCAAACTGGAAGCCCAATAAAAAGAGGGAGAAGCTACAGTAGAGGATTACTGGC
GAGAAATGAATAGAAAATTTCTTAAACTTCTTACTATTAATTTAAGTGTATATCTATTTTCCAAATTTAAATTTGAAATTTGAATCAAACCA
AATCAATTTGGTTTATAAAAATTTGATTTCCATTAAAAAGCCGTTGGACATGTGCCTAATTTCAATTTGGGCTGTTTCAATTTCTCTTAATAA
ATATATCGAGGAATGTTCTAGGCTTTGGTTTCTGTGTTAATAAAAAGATTTAAAAATAAACTAATAACCAATAAATTAACGATAATGATATATTC
CATATTTATGTACTTATCTGTGATAAATTTGTCAATCTAGCAGACATCTGATTTAATGCGATTAACTTAACTAGGGCTATAACTTAAAAAG
ATTATTACATATGATGAACCTTGTATCCGCAAGTTTGCCTGGAGAACCAGAGCGCAATTNCCAACGTCAGTCTGACAAAACGGGACTTGTAG
GGTACCTATATATCTTGGCGCA

49F

CTATACATAGACACATATAGATATATAAGTATATTTATATTTGTTTCTCTCTACTTTCTATCTGTCTCTGTTTACTGCGGGAGCACTAACCTCCG
ACAACCTGACTGTAATTTGCGTTGGTCAAGTATTTTTCTCTTTCTCTCTGATTTGAATAATTCAAAATTTGTCTTTTACTTTATATAATTTTGGTT
CTGTTTGGTTTTTGGTCTGCAGCAGCTGCTTTTCTATGTACCGCTTGTAGGAAATATCCTGCACGAATGAGAAACGGATGCGAACCAAAATAG
CAAACGAGTCCGAAATATTAATAAAAACAAGTGGGTTGCCACATTTGGTGGGCACATCAATGTGGTTCGTAAGAGACAGAGAGAGTCCGAGAGA
GTGAGAGAAAAGCATTACGAGAGACAAGACACATCTATGTGGCTGCTGTGTCTGTGGTAGTTAAGCGGGGTGAGTTTTTTTATGGGGGTAGGG
GGGGTGGGTACGTGTTTGTGTCTGTCAATGA

27F

CTCTTTCCGGTATCGCTTGACGGGCTGCAAGTTGTGCGGCGCTGGTATTGCTGTGTTTAGGTCTATGTCCATTGCACTTTACTTTCTGGATAGTA
TGATGCAGCCCTGTTTGGATTTTGTGAAATCCAGGGAGCCATCGGCGTACACTTAGTGCAGTTGTCGGTGTGCTAGCACGGCGTGTGTTTAG
AGGTTAGGAACGGCAGCTGCGGTGCCTCGTTGAATACGGTAANTGCCACAGGTGTCACGCACAAGACTGACGATGTGTGACCATACNGCTATATAC
ATAGGTATAGGCAAGAAGATAAAAACACTAGGAACAGACACCGTACCTACNACATGTGNACCGNNAANTAAATACACACNNGGCCAGGGCANAG
TANAGTNCCAAAANAAGAACCCCGNAANNNTCNGGAATCGATATNCCCGAATGGAACACAACAAGATTGTGACCGCAATTTCTGCGAATAGAC
GACAACCAAGGATTCCTTCCATAACATANACANAAGTGATTAATGTAACACCAATACAGANAANANCAACAACAATTTGAATTACCAANAG
CAAACAACACACAACATCNNANA

62F

CTGAGTTCTAAATTTTAAATTTTACTCTAGCCGCTGGCCCTTTATTTTTCTCTCTTTCTCTCTCTCTGTGTGTGTGTGTGCGTGTCTTCTGGCT
TGTTTTCAAAGTCGGTCAAGATTTAAAAAGAAAAACAACAACAGCAACCGCAACCGCCAAAAAGAAAAAGCCAAAGCAAGAGGCATGCA
ACAAAAAGTGGCGCAATATCAGCCGACGCCGAGCCGTATCCGTAGCAGCAGCAGCAGCAGCCGCTGGACTACGACTACAAAAACGAGATAAAC
ACGCAAAACAAAGCGAACTGGGTCAAAGTGCAGGCAAGACGAGAAACGCCAAAGCGGCAAGGCGGTGGAGGTGGTTGGTGGCGGGCTGATGGCG
GCATCTCTGCAGGTGACGCTACACATCCTTAGCATGTGAGCACAAATATGTAGCATACTTAAATGGCGCAAAAACAACGAACGACAAAAAAGGG
TAAGTCACATGAAAGGGTTTTTTTTTGAACAGAAAACAGAAGATTGCTATTACAGAGGCTATTTAGGGGTGGTCGCCAGTGGGGTGGGCAGGAT
ACGCATATTTGTCCTTGAAAACT

Fig. 18 (continuação)

28F

CTATTAAGTCATAAAAAACAAAACCTAAAAGGGGACGTTAGACTACTAGTAACAAATGAAAACACTATAAATGGTATAATCCAACATTAAAAAAT
GAAATTAAGGGTGAACACAGTTCAGGTAGCAGAGGCAAGATTAATGAATTTAAAACAAAATGGTAAGAACGCAAGTCTATTTAAGTTAGAAATAGA
AAATCTCACTAAATCATTTAAACGCGCGTTTCATAACAGACAACGTAAATCCTGAAACAGCAAAAAAATATGCAACTCAGATAGCACTGAAATTA
TTATAAAGAAGTGCAGAAAATGAAAAGGTGAGAACAATAATAGAAGCAGGCAATTTACTGAAAAGAATGATGTTGTAGCTAAATTTGTAAATACA
TCTACAAATATTGAACAGGATCACAGCGTGTTTTATACTAAAAGAACAATTACACAAATATGAACTCGTACAATAATAATAGAAATTATAATA
TAATTACCAAAATAAAACCCAAATGATAATACTAATACTATAACAATACTAGGAATTACAATAACTATAGTAATAATTATAATCGAAGAAATTATA
CAATAGAAATACAAAAAATTTATTATCCTC

46F

CTTAGTAAAGCTATGAATGTTCTTGGGTTGTGAAACGATGGTCAAAGAGTTTGACGACCGGTACACAACCAAAATTTCTGTATACTTCTTTAATC
CGTCCTCTCTTAGAGTACGGATCTTGCATATGGTCACTCAATATGAGACGCACCAAAAGTAAATTTGAATCTGTTCAAAGCAATTTGAGCTTTT
GTTCTTCGCGGTCTAAATGGGATCGCAATGCAATTTGCCATCATACTCCAGTAGGCTTCTTTAATCAATCTTCCTTCTTTAATTAATCGTAGA
GTAATGCTTGGTGTATCTTTATTCATAAACTTTTAATAGGTGAAATAGACAGCGCTCTGCTTGGGCTCGCGCAAAACAAGCTATGACCTGGTGT
CGTATGGGCCACTTGAACGTACTTCGCATTGTACGCGTCAACGTCCAGACAATATATACTGCACAGTTTGTGGAAAAAATTTGAAAGGGTATA
CAACTTTGACGCGGTGCAAGTTAGCCCAAGACCTTGGTTTTTACATTAATTTGGCAGAGGGCACTCGAAGAAATATATTTAATGTATTGATA
CGTATTTGAAATCGTATATATGGTGGAGTT

37F

CTCAATCCCAAGTTTCATCCCAATAGCTTTTAAGATGGCTGAGTAAAACGCATATGCACAGACGCACAGACGGACGGACAGAATGTCAGACGAT
CATGGCTATATCAACTCAGCTTCTCATGCTAATCAAGAATATATATACTTTATAGAATCTGAAACGTCTCCTTCTGTGGGTTACAAACATCTGGC
CAATTTTAGTTATGGTTTCGATATATGGAATAATCGAACCCACAATCGCTAGATTTTGTATCCGCGTAAGTTGCCGTTCCGATACTAAAAAAG
TAATCTTAAAAGAAAACCTAACTAAAGGATGAGATGGGAAAACCTAACCATCTGCAAGGTTAATATTGTAGTAGGCCAGTGTCCAAAGCATAAGA
AACAGTGGTATGCAACCACTGTTAAGCATCGTTATAACTATTGATATTGATTCTCCTACTCTCTGATTTCATAAAGCGTCTCTCGCTCTGCCTT
GCAAGCGAAGATGCTCTCTTTATTGTTGAATATCTAACTCTAATACTCTGTCTGCGAGCAGAGAGTCAGTTTCGTAAGCATAATCCAAAGCGA
TCAGATCAATAAAATAAAGCAACGAACAA

Fig. 19

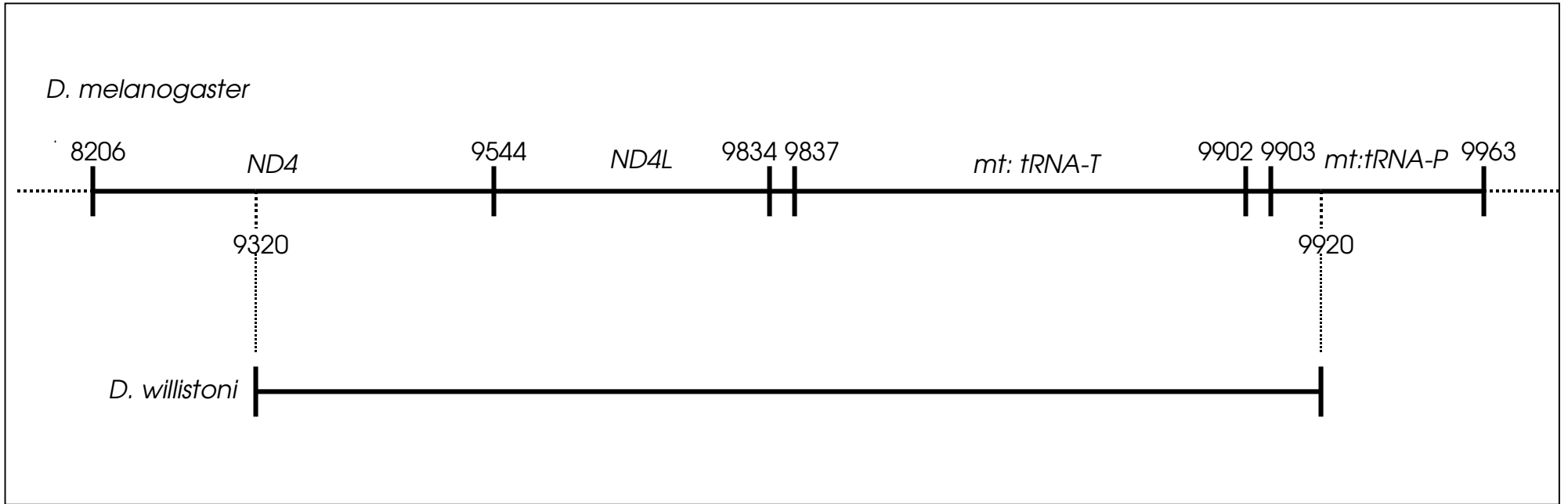


Fig. 20

	5	15	25	35	45	55
72M WIP	CCATCACTGG	ATACTGACCG	TGAAAATGGT	TGCATCCGTA	ATCTTGAACA	CGCTTATAGC
82M WIP	CCATCACTGG	ATACTGACCG	TGAAAATGGT	TGCATCCGTA	ATCTTGAACA	CGCTTATAGC

	65	75	85	95	105	115
72M WIP	TTGGATGGTG	GTTTGGCAGT	TCTTGCCGGC	AACATCGCCG	AGGATGGCTG	CATTGTAAAA
82M WIP	TTGGATGGTG	GTTTGGCAGT	TCTTGCCGGC	AACATCGCCG	AGGATGGCTG	CATTGTAAAA

	125	135	145	155	165	175
72M WIP	ACCGCAGGTG	TTGATGAAGG	TAGCTTAATT	TTCCGTGGAC	CTGCAAAAAGT	GTATGAAAGC
82M WIP	ACCGCAGGTG	TTGATGAAGG	TAGCTTAATT	TTCCGTGGAC	CTGCAAAAAGT	GTATGAAAGC

	185	195	205	215	225	235
72M WIP	CAAGATGATG	CAGTAGACGC	AATTTTAGGC	GGAAGAGTTG	TTGCTGGTGA	CGTTGTTGTG
82M WIP	CAAGATGATG	CAGTAGACGC	AATTTTAGGC	GGAAGAGTTG	TTGCTGGTGA	CGTTGTTGTG

	245	255	265	275	285	295
72M WIP	ATCCGTTATG	AAGGTCCTAA	AGGTGGACCT	GGCATGCAAG	AGATGTTGTA	TCCAACATCA
82M WIP	ATCCGTTATG	AAGGTCCTAA	AGGTGGACCT	GGCATGCAAG	AGATGTTGTA	TCCAACATCA

	305	315	325	335	345	355
72M WIP	TATTTGAAAT	CGATGGGACT	AGGAAAAGCC	TGTGCGTTGA	TCACTGATGG	GCGTTTTTCT
82M WIP	TATTTGAAAT	CGATGGGACT	AGGAAAAGCC	TGTGCGTTGA	TCACTGATGG	GCGTTTTTCT

	365	375	385	395	405	415
72M WIP	GGTGAAGCT	CCGTTTGTG	AATCGGACAT	ATTTGCCAG	AAGCAGCAAG	CGGTGGGTTA
82M WIP	GGTGAAGCT	CCGTTTGTG	AATCGGACAT	ATTTGCCAG	AAGCAGCAAG	CGGTGGGTTA

	425	435	445	455	465	475
72M WIP	CTGGCTTTAG	TGCAGGATGG	AGATATTATC	GACATCAATA	TTCCAAACCG	TACTATTGAG
82M WIP	CTGGCTTTAG	TGCAGGATGG	AGATATTATC	GACATCNATA	TTCCNAACCG	TACTATTGAG

	485	495	505	515	525	535
72M WIP	TTGGATGTGG	ACGAAAGCGA	GCTGACCAAA	CGCCATGAAG	CAGAATTAGC	TCGTGGAGAT
82M WIP	TTGGATGTGG	ACGAAAGCGA	GCTGACCAAA	CGCCATGAAG	CAGAATTAGC	TCGTGGAGAT

	545	555	565	575	585	595
72M WIP	AAAGCCTATA	CGCCACGTGA	CCGTCAGCGT	GAGGTTTCTT	TCGCTTT-AC	GTGCTTATGC
82M WIP	AAAGCCTATA	CGCCACGTGA	CCGTCAGCGT	GAGGTTTCTT	TCGCTTTTAC	GTGCTTATGC

Fig. 21

	5	15	25	35	45	55
73M WIP	-----	-----	CTGTTTCCTG	TGTGAAATTG	TTATCCGCTC	ACAATTCCAC
45M 17A2	AAAGGGATGT	ATACGACTCA	CTGTTAGGCG	AATTGGAGCT	CCACCNGCCG	GTGGCTTAGC

	65	75	85	95	105	115
73M WIP	-----ACAA	CATACGAG--	--CCGGAAGC	ATAAAGTGTA	AAGCCTGGGG	TGCCTAATGA
45M 17A2	CGCTCTAGAA	CTAGTGGATC	CCCCGGAAGC	ATAAAGTGTA	AAGCCTGGGG	TGCCTAATGA

	125	135	145	155	165	175
73M WIP	GTGAGCTAAC	TCACATTAAT	TGCGTTGCGC	TCACATGCCC	GCTTTCAGT	CGGAAAACCT
45M 17A2	GTGAGCTAAC	TCACATTAAT	TGCGTTGCGC	TCAC-TGCCC	GCTTTCAGT	CGGAAAACCT

	185	195	205	215	225	235
73M WIP	GTCGTGCCAG	CTGCATTAAT	GAATCGGCCA	ACGCGCGGGG	AGAGGCGGTT	TGCGTATTGG
45M 17A2	GTCGTGCCAG	CTGCATTAAT	GAATCGGCCA	ACGCGCGGGG	AGAGGCGGTT	TGCGTATTGG

	245	255	265	275	285	295
73M WIP	GCGCTCTTCC	GCTTCCTCGC	TCACTGACTC	GCTGAGCTCG	GTCGTTCGGC	TGCGGCGAGC
45M 17A2	GCGCTCTTCC	GCTTCCTCGC	TCACTGACTC	GCTGCGCTCG	GTCGTTCGGC	TGCGGCGAGC

	305	315	325	335	345	355
73M WIP	GGTATCAGCT	CAACTCAAAG	GCGGTAATAC	GGGTATATCCA	CAGAAATCAG	GGGATAACGC
45M 17A2	GGTATCAGCT	CA-CTCAAAG	GCGGTAATAC	GG-TTATCCA	CAGAA-TCAG	GGGATAACGC

	365	375	385	395	405	415
73M WIP	ACGGGAAAGA	ACCCATGTGA	GGCAAAAGGC	CACGCAAAAG	GCCAGGAA--	ACCAGA----
45M 17A2	A--GGAAAGA	AC--ATGTGA	G-CAAAAGGC	CA-GCAAAAG	GCCAGGAACC	GCTAAAAAGG

	425	435	445	455	465	475
73M WIP	-----	-----	-----	-----	-----	-----
45M 17A2	CCGCGTTGCT	GGCGTTTTTC	CATAGGCTCC	GCCCCCTGA	CGAGCATCAC	AAAAATCGAC

	485	495	505	515	525	535
73M WIP	-----	-----	-----	-----	-----	-----
45M 17A2	GCTCAAGTCA	GAGGTGGCGA	AACCCGACAG	GACCTATAAA	GATACCAGGC	GTTTCCCCTT

	545	555	565	575	585	595
73M WIP	-----	-----	-----	-----	-----	-----
45M 17A2	GGAAGCTCCC	TCGTGCGCTC	TCCTGTTCCG	ACCCTGCCGC	TTACCGGATA	CCTGTCCGCC

	605					
73M WIP	-----					
45M 17A2	TTTCTCCCTT					

Fig. 22

```
48M 17A2
CCTGAGAAAATTTCACTGCATTTTGTGGCATTTTGAATCCATTCAATTA
ATAAATATATTAATGTTTTTGTGTCAATACCTATTTAAATAATTTATAT
AAGGTATGTACTACGTAATATTGTATGTGTGTGACCTGAAATGTAGTTTT
TGAGGTTATACCAATTTGTATGGTCTATAACAAACGCGATTCAAACGGAT
TCAGTATAATTTTGATATTTATATATAGTGCAAGTCCTTGTGGTAAAAAT
ATTTTTTAAAATGAGAACCATATACGACCATATATTTAAACTGTAAATTG
TCGGTCATCAAGCGCTCACAGTATTGCATATGGCGTGACGAACGAGTCTC
CAGCAGAAAAGTTTTAGTTGTTGAGGAATTCTTATTTGGCAATGTTTTCA
AGAATATTAATATCCTACACAAACGGCAAATGGGTCGGAAATGGGTGCG
AAAATTATGTGCTTATTATGTTACTTATAATCTATCCCTAAAAGTATGTG
GCTTAATCCTATCCCTAAAAGTATACTACACCTCCTTTTTTCAAAAAGA
AAAATATAAATATTTTTACCTTTCTTATATTATTTTTATTCTATCCAAA
```

Fig. 23

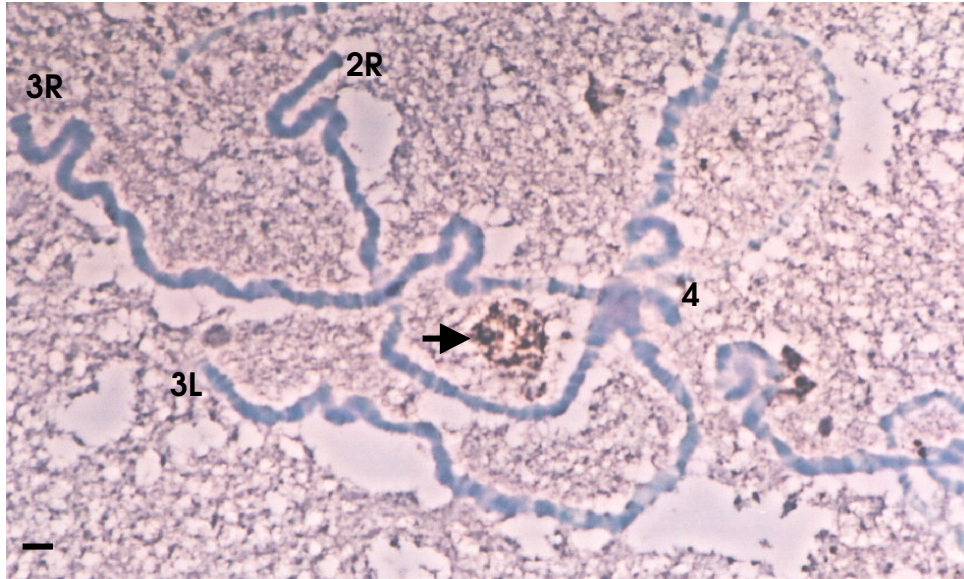


Fig. 24

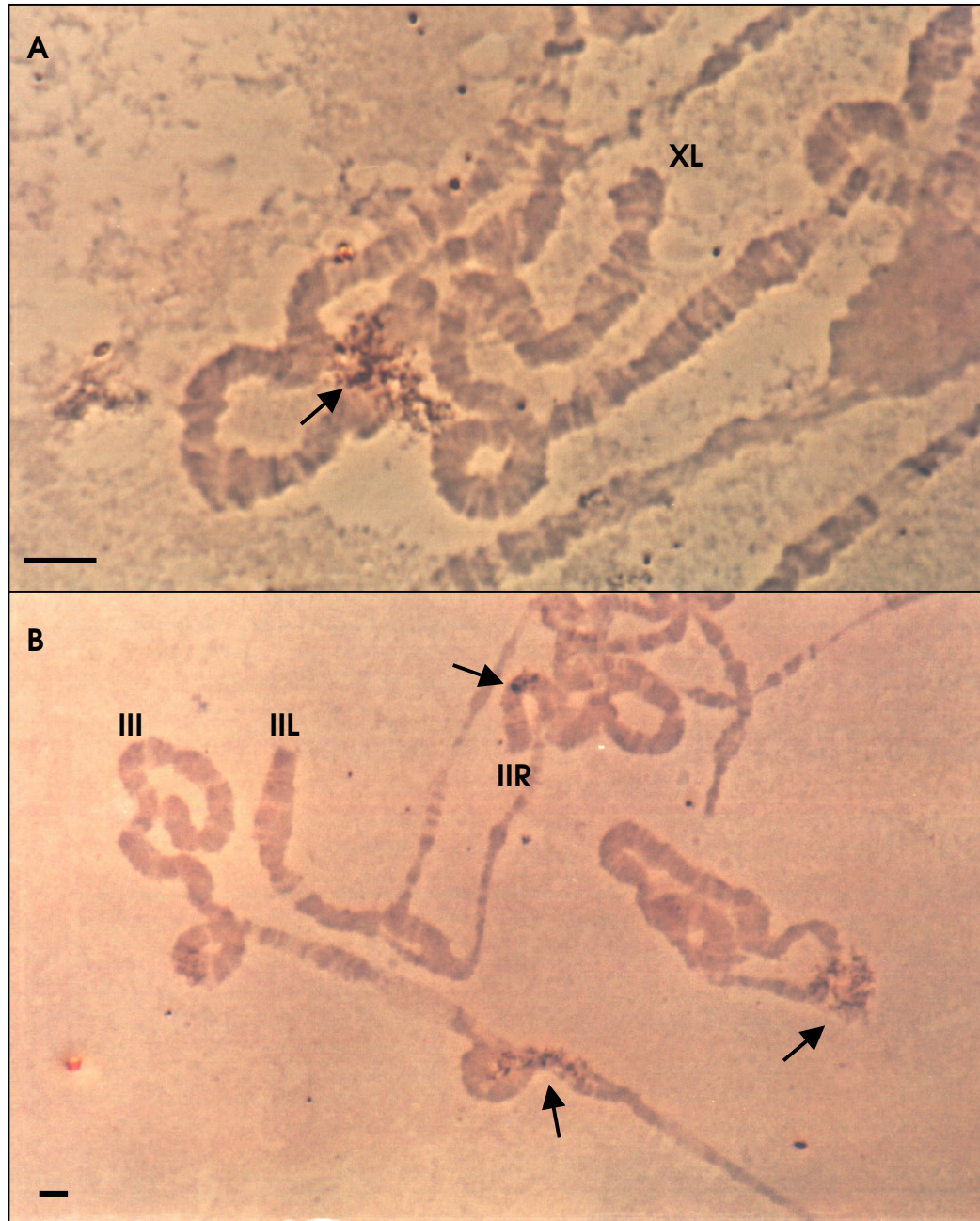


Fig. 25

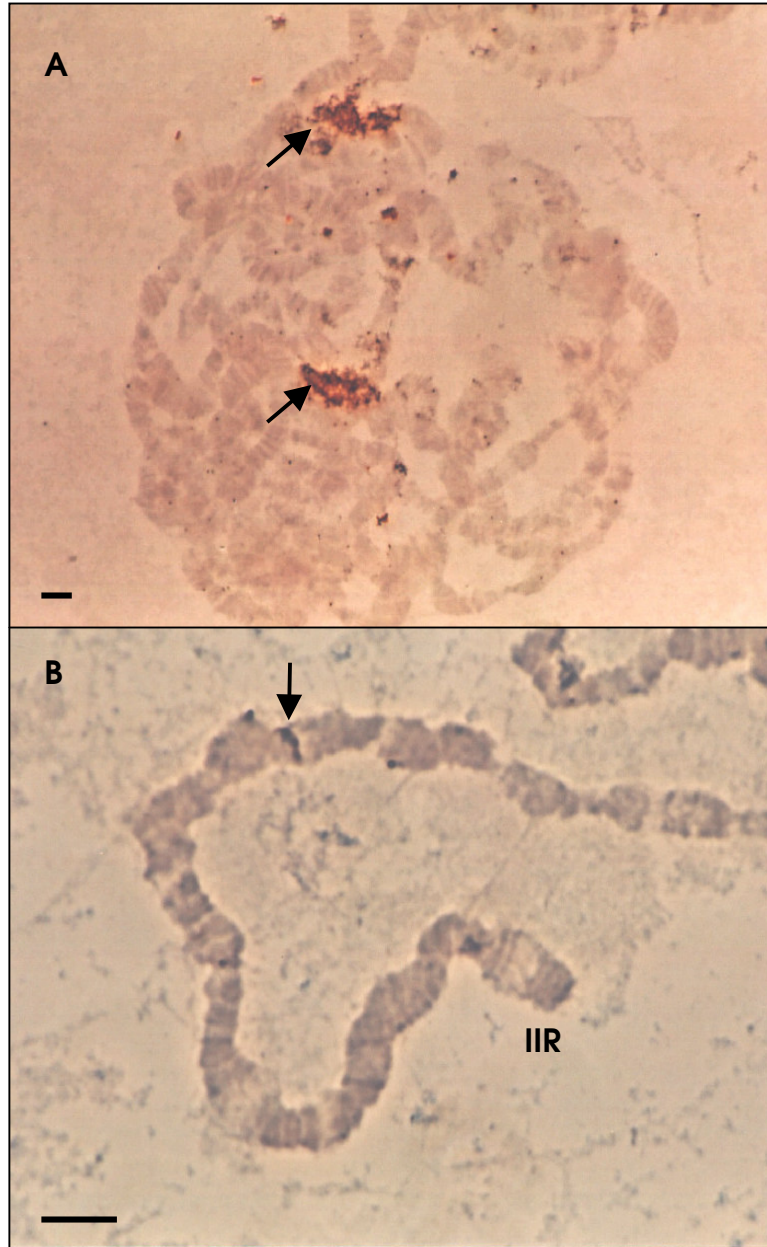
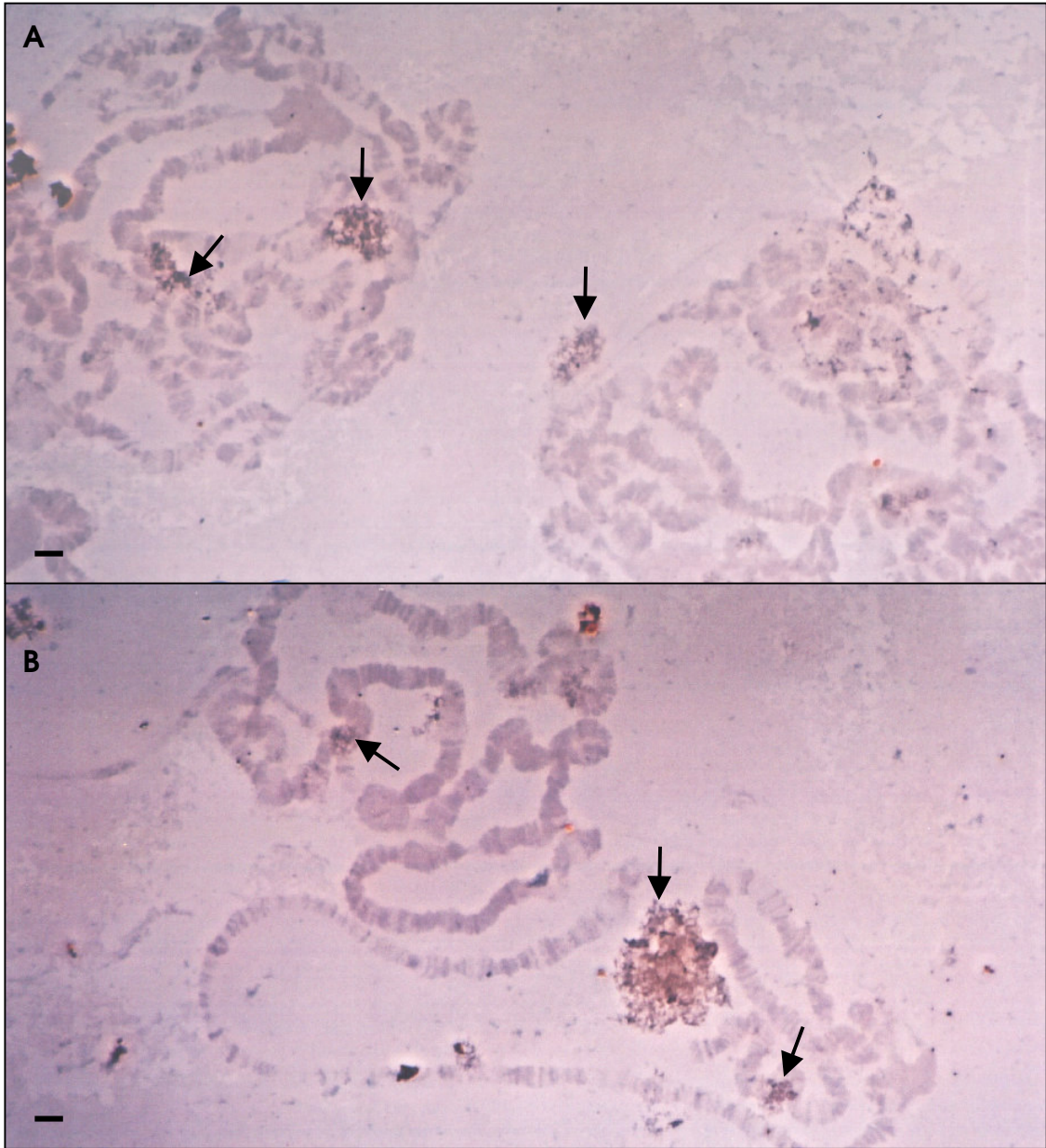


Fig.26



CAPÍTULO 3

Algumas evidências de metilação no genoma de *Drosophila willistoni*.

(trabalho a ser submetido ao periódico Genetica)

Algumas evidências de metilação no genoma de *Drosophila willistoni*

Rosane Nunes Garcia¹, Marícia Fantinel D'Ávila⁴, Elgion Lúcio da Silva Loreto², Yanina Panzera³, Vera Lúcia da Silva Valente⁴.

1. Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal.
2. Departamento de Biologia, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Universidade Federal de Santa Maria.
3. Seccion Genetica Evolutiva, Facultad de Ciências, Universidad de la Republica, Uruguay.
4. Departamento de Genética, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Caixa Postal 15053. CEP 91501-970 porto alegre, RS, Brasil. Fone: 55++51 33166729; Fax: 55++51 33167311; E-mail: vera.gaiiesky@ufrgs.br

Key words: *D. willistoni*, gene 18S, metilação.

Resumo

O padrão de metilação diferencial no DNA é essencial para o desenvolvimento normal de mamíferos, bem como para outros processos biológicos importantes, tais como inativação do cromossomo X, *imprinting* genômico, e carcinogênese. Por outro lado, DNA de *Drosophila*, baseado no modelo de *D. melanogaster*, sempre foi considerado livre de metilação. Estudos recentes, no entanto, tem modificado esta idéia. Fazendo uma investigação no DNA genômico da espécie *D. willistoni*, identificamos indícios de metilação diferencial ao longo do desenvolvimento e entre sexos. Apoiado nos resultados obtidos, estamos propondo que no genoma de *D. willistoni* existe metilação em adultos e que, portanto, esta espécie estaria fazendo parte do grupo de organismos que tem o seu DNA fracionalmente metilado.

Introdução

O padrão de metilação diferencial no DNA ocorre em vários organismos tais como bactérias (Hendrich & Tweedie, 2003), leveduras (Bryk et al., 2002), alguns insetos (Nayak et al., 1991), Cnidários, Moluscos, Equinodermas (Tweedie et al., 1997) e em vertebrados, sendo essencial para o desenvolvimento normal, principalmente em mamíferos (Li et al., 1992). Além disso, estas modificações epigenéticas estão envolvidas em outros processos biológicos importantes, tais como inativação do cromossomo X (Norris et al., 1994), *imprinting* genômico (Lloyd, 2000), e carcinogênese (Jones & Baylin, 2002). A primeira evidência de que a metilação do DNA interfere na expressão gênica veio de estudos em mamíferos que mostraram correlação entre a atividade gênica e níveis totais de citosinas metiladas, especialmente nos promotores ou *enhancers* (Buslinger et al., 1983).

Drosophila melanogaster era considerado um organismo cujo genoma era desprovido do processo de metilação do DNA (Urieli-Shoval et al., 1982). Porém, estudos recentes evidenciaram baixos níveis de DNA metilado no seu genoma (0,4% em embriões, em contraste com mamíferos, que apresentam 5% de citosinas metiladas), mostrando ainda que este organismo possui mecanismos mais simples de metilação do que mamíferos, com um menor número de enzimas envolvidas neste processo (Hung et al., 1999; Tweedie et al., 1999). A atividade da metiltransferase Dnmt2 em *D. melanogaster* ocorre preferencialmente sobre dinucleotídeos CpT ou CpA, ao contrário do que ocorre em mamíferos, onde a preferência é por dinucleotídeos CpG (Kunert et al., 2003). A função da metilação em *Drosophila melanogaster*, no entanto, ainda permanece indeterminada.

Resultados anteriores obtidos por nosso grupo apontaram a existência de fragmentos sexo-específicos no genoma de *D. willistoni* (linhagens WIP-4 e 17A2), observados a partir da clivagem do DNA de machos e fêmeas com as endonucleases *AluI* e *HaeIII* (Garcia et al., em preparação) o que não parece ocorrer em *D. melanogaster*. Várias seqüências, a maioria delas ricas em AT e um gene ribossomal (18S), estavam envolvidos neste processo. Isto nos levou a sugerir que existe metilação diferencial no genoma de *D. willistoni* e que este fenômeno é próprio da espécie, embora não se conheça ainda a sua função.

No presente trabalho demonstramos mais evidências de que a metilação é realmente o mecanismo responsável pela presença de bandas de restrição sexo-específicas e que este é um fenômeno robusto no genoma de *D. willistoni*.

Material e métodos

Manutenção dos estoques de *Drosophila*

Foram utilizadas neste trabalho as linhagens WIP-4 e 17A2 de *Drosophila willistoni*, a fim de verificar possíveis diferenças intra-específicas para os padrões de metilação. Os estoques foram mantidos em meio de cultura de farinha (Marques et al., 1966) dentro de câmaras de temperatura e umidade constantes (a $17^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ e 60% de umidade relativa).

Extração de DNA, enzimas e sondas utilizadas neste trabalho

DNAs genômicos de larvas de terceiro estágio, macho e fêmea, assim como de machos e fêmeas adultos das linhagens WIP-4 e 17A2 foram extraídos de acordo com o método de Jowett (1986). DNA de testículos, ovários de fêmeas virgens, embriões com 1 hora (blástula sincicial) e com 3 horas de desenvolvimento foram extraídos utilizando o kit DNeasy® Tissue kit (Quiagen), seguindo recomendações do fabricante. De 300 a 500ng de DNA de cada amostra foram clivadas com as enzimas de restrição *AluI* (Invitrogen), *HaeIII* (Invitrogen) ou *RsaI* (Invitrogen) e fracionados em gel de agarose 1%. A enzima *AluI* não cliva o DNA quando no seu sítio de reconhecimento (5'AG↓CT3') A ou C estão metilados. Da mesma forma *HaeIII* não cliva quando no seu sítio de reconhecimento (5'GG↓CC3') C estiver metilado. A enzima *RsaI* não é sensível à metilação.

Três grupos de sondas diferentes foram utilizadas.

1) Três bandas isoladas do DNA genômico de *D. willistoni*: fragmento 1, com tamanho entre 2 e 3 kb obtido a partir da digestão do DNA de machos da linhagem 17A2 com *AluI*; fragmento 2, com tamanho entre 3 e 4 kb obtido a partir da digestão do DNA genômico de fêmeas da linhagem WIP-4 com *AluI*; fragmento 3, com 5 kb obtido a partir da digestão do DNA genômico de machos

da linhagem WIP-4 com *Hae*III. As bandas foram isoladas usando o kit Concert™ Matrix Gel Extraction Systems (Invitrogen).

2) Três clones obtidos a partir de cada fragmento citado anteriormente (estes clones foram isolados e caracterizados em trabalho anterior - Garcia et al., em preparação): clone 35M (gene ribossomal 18S de *D. willistoni*, obtido a partir do fragmento 1); clone 62F (obtido a partir do fragmento 2); clone 72M (obtido a partir do fragmento 3). Os clones 62F e 72M não apresentam similaridade com nenhuma seqüência conhecida, mas são seqüências ricas em AT e relacionadas à Região Organizadora de Nucléolo de *D. willistoni* (Garcia et al., em preparação).

3) Plasmídeo pDm 238 (Tautz et al., 1988) gentilmente cedido pelo Dr. Carlos Polanco de la Puente (Department of Genetics, University of Leicester) que contém uma unidade completa (12Kb) clonada do DNA ribossomal de *D. melanogaster*, onde estão incluídos os genes 28S, 18S, 5,8S e 2S, bem como as regiões espaçadoras ITS, IGS, ETS (GenBank M21017 e M29800).

As sondas foram marcadas pelo método *random prime* utilizando o kit Gene Images® (Amersham Biosciences) para análise por *Southern blot*.

Southern blot

O DNA das amostras, clivado com as enzimas acima descritas, foi fracionado em gel de agarose 1%, transferido para uma membrana Hybond N+ (Amersham Biosciences) e hibridado com as sondas marcadas a 60°C em uma solução contendo 0,1% SDS, 5% dextran sulfato e líquido bloqueador diluído 20 vezes em 5xSSC. A membrana foi lavada duas vezes a 60°C, primeiramente com 1xSSC e 0,1% SDS e após com 0,5xSSC e 1% SDS, em ambos os casos com agitação durante 15 minutos. Para detecção, foi usado o método do kit CPD-Star® (Amersham Biosciences). O tamanho molecular (em kb) dos fragmentos detectados foi determinado usando os fragmentos dos marcadores de peso molecular 1 kb Plus DNA ladder (Invitrogen), λ /*Hind*III (Invitrogen) ou 1kb DNA ladder (Promega) como controle. As lavagens para retirada da sonda, antes da re-hibridização, foi feita em três banhos de 15 minutos cada com SDS 0,1% na temperatura de 80°C.

Resultados

O primeiro fragmento que analisamos foi o de 5 kb (fragmento 3). Ao hibridarmos este fragmento em DNA genômico clivado com *HaeIII* de gônadas e de diferentes fases de desenvolvimento, foi possível identificar diferenças apenas em machos e fêmeas adultos da linhagem WIP-4 (Figs. 1 e 2). Todas as bandas hibridaram no tamanho esperado de 5kb, tanto para o fragmento como para o clone, com exceção de fêmeas da linhagem WIP-4, que apresentaram uma banda de 6,5 kb.

Quando a membrana foi rehibridada com o clone 72M do fragmento, o padrão de bandas se manteve semelhante ao descrito anteriormente, porém as bandas apresentavam-se mais finas. Em trabalho anterior (Garcia et al., em preparação), verificamos que cada fragmento isolado do genoma de *D. willistoni* pelas enzimas *AluI* e *HaeIII*, apresenta uma população de seqüências com tamanho semelhante. A hibridação do clone com aspecto mais fino, demonstra que apenas uma seqüência desta população está representada neste fragmento clonado.

Como os resultados com fragmento e clone de 5kb não indicaram diferenças entre as fases de desenvolvimento, partimos para a investigação do fragmento seguinte.

O segundo fragmento de tamanho entre 3 e 4 kb de fêmea (WIP-4) (fragmento 2) hibridado em DNA genômico clivado com *AluI* de ambas as linhagens apresentou um resultado mais interessante. Foram observadas diferenças de padrão marcantes não só entre sexos, como também entre as diferentes fases de desenvolvimento (Figs. 3 e 4). Porém, tanto o fragmento como o clone, apresentaram para o tamanho esperado de 3kb e abaixo deste, um aspecto de arraste. Foram observadas bandas somente acima de 6 kb em ambas as linhagens.

Na linhagem WIP-4 (Fig. 3), o padrão de hibridação do fragmento foi similar nas gônadas; diferente entre os embriões de 1 e 3 horas; similar entre larvas de ambos os sexos e macho adulto. O padrão de fêmea adulta, tem apenas uma

banda de aproximadamente 7 kb que coincide com embriões de 1 hora, sendo as demais diferentes de todos os estágios de desenvolvimento.

O padrão de hibridação do clone 62M, demonstrou que este tem homologia na seqüência somente com o fragmento coincidente de embriões de 1 hora e fêmeas (o de ~7 kb). Abaixo de 4 kb, ocorrem hibridações em forma de arraste em todos os estágios de desenvolvimento, com exceção de embriões de 1 hora.

Ao rehibridarmos a mesma membrana com os plasmídeo que contém os genes ribossomais, verificamos que ocorrem diferenças entre os estágios de desenvolvimento. Algumas bandas foram coincidentes em tamanho com os do fragmento e do clone e outras não. A banda com homologia correspondente ao clone 62F, co-localiza o sinal de hibridação, quando utilizamos como sonda o DNA ribossomal. O tamanho das bandas acima de 1 kb observados para a hibridação com rDNA, foi surpreendente, tendo em vista que o mapa de clivagem para o inserto do plasmídeo pDm 238, demonstra que existem 39 sítios para a enzima *A1u1* e a clivagem geraria fragmentos com tamanhos menores que 1 kb.

Na linhagem 17A2, poucas diferenças foram observadas para os três grupos de sondas, quando comparadas com os padrões de WIP-4. As únicas diferenças ocorreram na hibridação com o fragmento em DNA de embriões de 1 hora (apresentaram padrões de arraste), na hibridação do clone 62F sobre o DNA de fêmeas adultas (também com padrão de arraste) e na hibridação com rDNA, que em embriões de 1 hora não apresentam sinal.

Para ambas as linhagens, o plasmídeo pDm 238 não difere no padrão de bandas hibridadas no DNA de diferentes estágios de desenvolvimento. Quase todas as bandas são semelhantes com as bandas de macho adulto, sendo que foram as fêmeas que apresentaram diferenças maiores.

O fragmento 1 (de tamanho entre 2 e 3 kb) foi o último a ser analisado, bem como o seu clone (35M) que corresponde ao gene ribossomal 18S. A análise limitou-se somente ao DNA de adultos da linhagem 17A2, já que diferenças entre linhagens não foram detectadas em trabalho anterior (Garcia et al., em preparação). O padrão de hibridação em DNA de machos clivado com *A1u1*

para as três diferentes sondas não apresentou similaridade, com exceção da banda com tamanho aproximado de 2,3 kb, que corresponde ao gene 18S (Fig. 5).

Em DNA de fêmeas (também clivado com *AluI*) ocorreu o mesmo, porém o tamanho do fragmento correspondente ao gene 18S é maior do que em machos, ficando em torno de 4,3 kb. Ao compararmos o resultado obtido da hibridação com o plasmídeo pDm 238 com o resultado na membrana do fragmento 2, verificamos que o padrão é igual, demonstrando que este resultado é constante e não é fruto de clivagem parcial, já que as amostras foram clivadas em reações diferentes.

A fim de confirmar a possibilidade de que algum evento do tipo metilação está realmente influenciando os padrões de clivagem no DNA genômico de *D. willistoni*, escolhemos uma enzima que cliva independente de metilação em seu sítio, *RsaI* (GT↓AC), para clivar o DNA genômico de larvas e adultos. Sobre esta membrana foi hibridado o plasmídeo pDm 238, sendo que esta enzima possui 28 sítios para o inserto de rDNA. O resultado obtido foi o esperado para o padrão da enzima, independente do sexo e do estágio de desenvolvimento (Fig. 6).

Discussão

Nossos resultados indicam que *D. willistoni* difere bastante de *D. melanogaster*, não só porque não está de acordo com a regra de que DNA de *Drosophila* não é metilado, como também vai contra o fato de que genes que devem estar expressando não poderiam estar metilados, tal como 18S. A Figura 6 dá um suporte importante para comprovar a veracidade destas exceções.

Os organismos podem ser classificados em três grupos distintos, segundo padrões de metilação no seu genoma: o grupo livre de metilação (Nematoda e Arthropoda, no qual estaria incluída *Drosophila*), um grupo que teria o seu DNA fracionalmente metilado (Mollusca, Annelida, Cnidaria entre outros) e um grupo com o DNA globalmente metilado (Vertebrados). Algumas exceções, no entanto, podem ocorrer (Tweedie et al., 1997).

O grupo que tem o DNA fracionalmente metilado apresenta este fenômeno em compartimentos do genoma, tal como ocorre em fungos, por

exemplo, onde a metilação está confinada às seqüências repetitivas e associadas com função de defesa do genoma mediante invasão de DNA forasteiro (Hendrich & Tweedie, 2003). Também uma parte de genes funcionais importantes é encontrada nestes compartimentos metilados do genoma deste grupo, que tem o DNA fracionalmente metilado, tais como os genes ribossomais, por exemplo. No entanto, apenas uma parte dos genes (que ocorrem em múltiplas cópias) está metilada, permanecendo uma fração livre desta modificação. A explicação para isto seria dada pelo tempo de replicação do DNA genômico de eucariotos e o processo de metilação *de novo*. Frações metiladas e não metiladas podem representar seqüências de replicação tardia e seqüências de replicação precoce, respectivamente. De acordo com esta hipótese, a DNA metiltransferase pode estar presente no complexo de replicação somente na fase S tardia, metilando o DNA que replicou posteriormente (Tweedie, 1997).

Esta hipótese parece atraente para explicar a metilação dos genes ribossomais em *D. willistoni*. É sabido que estes genes são heterocromáticos e heterocromatina tem como uma das suas características, a replicação no final da fase S (Lima-de-Faria & Jaworska, 1968). Esta replicação tardia ocorre devido à barreira formada pelas repetições satélite presentes em abundância na heterocromatina, gerando uma forte curvatura intrínseca que pode causar paradas nas DNA polimerases (Leach et. al., 2000).

Uma fração dos genes ribossomais de *D. willistoni* que pode ter replicado tardiamente, estaria metilada e outra fração não. Isto se confirma nas Figuras 3, 4 e 5, onde a hibridação com os genes ribossomais demonstrou que uma parte deles foi clivada pela enzima *AluI* e que, portanto, não estavam metilados e outra parte não clivou como esperado. Esta fração estaria representada pelas bandas acima de 3 kb. O padrão de hibridação obtido para os fragmentos 1 e 2 com bandas de tamanho acima do esperado, inclusive para os clones, indicam que estes estariam na porção metilada do DNA ribossomal. Existem várias cópias para o gene 18S e a cópia clonada, em função do método empregado para isolar o fragmento, foi a que estava com as citosinas modificadas. Também a comparação do padrão de hibridação destes dois fragmentos e de seus clones

com as bandas de rDNA, confirmou a relação destas seqüências com Região Organizadora de Nucléolo.

Considerando então a hipótese de que uma parte do DNA ribossomal está metilado, é importante chamar a atenção para que o padrão de hibridação para rDNA observado nas figuras 3 e 4, sugere que em fêmeas adultas, quando comparado com os demais estágios de desenvolvimento, sempre uma fração maior do DNA ribossomal, representada pelas bandas de maior tamanho, está metilada. Não temos uma explicação imediata para este fenômeno, mas é importante salientar que os genes ribossomais em *D. willstoni* estão localizados no centrômero do cromossomo X e no braço curto do cromossomo Y (Garcia et al., em preparação). O mecanismo de compensação de dose em *Drosophila* é diferente do que ocorre em mamíferos. Ao invés de inativar completamente um cromossomo X da fêmea, o que ocorre é que ambos os cromossomos X são ativos na fêmea e a transcrição é aumentada no cromossomo X do macho pela ligação neste de inúmeros fatores de transcrição particulares (Lucchesi & Manning, 1987; Kuroda et al., 1991). Fica, portanto, uma questão em aberto para futuras buscas, relacionada a uma possível função para esta metilação diferencial no genoma de *D. willstoni*, envolvendo os genes ribossomais e sua possível ligação com processo de compensação de dose.

Importante ainda chamar a atenção para o fato de que, quando o DNA genômico de diferentes fases do desenvolvimento é clivado com *HaeIII*, o padrão de hibridação, tanto para o fragmento como para o clone, não mostram praticamente nenhuma variação, com exceção no padrão das fêmeas da linhagem WIP-4 (Fig 1). Isto poderia ser explicado pelo fato já comprovado de que em *melanogaster* a metilação ocorre preferencialmente em sítios CpT e CpA (Kunert et al., 2003). A enzima *AluI* não cliva quando no seu sítio de reconhecimento (5'AG↓CT3') se A ou C estão metilados. Da mesma forma *HaeIII* não cliva quando no seu sítio de reconhecimento (5'GG↓CC3') se C estiver metilado. Se no genoma de *D. willstoni* ocorre o mesmo que em *D. melanogaster*, os sítios CpG são pouco metilados, explicando, então, o padrão de bandas obtido a partir do DNA genômico clivado com *HaeIII*, mais homogêneo em todas as fases do desenvolvimento.

A grande maioria dos trabalhos que analisam metilação em DNA por padrões de clivagem sempre utilizam as enzimas *MspI* e *HpaII* que clivam nos mesmos sítios (5'CC↓GG3'), sendo que a primeira não corta se C estiver metilado (Mandrioli & Volpi, 2003; Tweedie et al., 1997 e 1999, por exemplo). Nossos resultados indicam que enzimas que são sensíveis à metilação envolvendo outros sítios que não CpG (tal como *AluI*), parecem ser mais eficientes para detecção de metilação, particularmente no genoma de *D. willistoni*.

Finalmente, os dados mostrados neste trabalho representam, de uma maneira geral, uma mudança num conceito estabelecido sobre metilação em *Drosophila*. Nós estamos, então, propondo que no genoma de *D. willistoni* existe metilação em adultos e que, portanto, ela estaria fazendo parte do grupo de organismos que tem o seu DNA fracionalmente metilado.

Referências

- Bryk, M., S.D. Briggs, B.D. Strahl, M.J. Curcio, C.D. Allis & F. Winston, 2002. Evidence that Set1, a factor required for methylation of histone H3, regulates rDNA silencing in *S. cerevisiae* by a Sir2-independent mechanism. *Curr. Biol.* 12: 165-170.
- Busslinger, M., J. Hurst & R.A. Flavell, 1983. DNA methylation and the regulation of globin gene expression. *Cell* 34: 197-206.
- Hendrich, B. & S. Tweedie. The methyl-CpG binding domain and the evolving role of DNA methylation in animals. *TRENDS Genet.* 19: 269-277.
- Hendrich, B., S. Tweedie, 2003. The methyl-CpG binding domain and the evolving role of DNA methylation in animals. *TRENDS Genet.* 19: 269-277.
- Hung, M.S., N. Karthikeyan, B. Huang, H.C. Koo, J. Kinger & J. Shen, 1999. *Drosophila* proteins related to vertebrate DNA (5-cytosine) methyltransferases. *PNAS* 96(21): 11940-11945.
- Jones, P.A. & S.B. Baylin, 2002. The fundamental role of epigenetics events in cancer. *Nat. Rev. Genet.* 3:415-428.
- Jowett, T., 1986. Preparation of nucleic acids, in Roberts, D.B. (Ed.). *Drosophila: a practical approach*. Oxford : IRL Press.
- Kunert, N., J. Marhold, D. Stach & F. Lyko, 2003. A Dnmt2-like protein mediates DNA methylation in *Drosophila*. *Development* 130: 5083-5090.
- Kuroda, M.I., M.J. Kernan, R. Kreber, B. Ganetzky & B.S. Baker, 1991. The maleless protein associates with the chromosome X to regulate dosage compensation in *Drosophila*. *Cell* 66: 935-947.
- Leach, T.J., L.C. Heather, M.G. Wotring, R.L. Dilwith & R.L. Gloster, 2000. Replication of heterochromatin and structure of polytene chromosomes. *Mol. Cell. Biol.* 20(17): 6308-6316.
- Li, E., T.H. Bestor & R. Jaenisch, 1992. Targeted mutation of the DNA methyltransferase gene results in embryonic lethality. *Cell* 69: 915-926.
- Lima-de-Faria, A & H. Jaworska, 1968. Late DNA synthesis in heterochromatin. *Nature (London)* 217: 138-142.

- Lloyd, V., 2000. Parental imprinting in *Drosophila*. *Genetica* 109: 35-44.
- Lucchesi, J.C. & J.E. Manning, 1987. Gene dosage and compensation in *Drosophila melanogaster*. *Adv. Genet.* 24: 371-429.
- Mandrioli, M. & N. Volpi, 2003. The genome of the lepidopteran *Mamestra brassicae* has a vertebrate-like content of methyl-cytosine. *Genetica* 119: 187-191.
- Marques, E.K., M. Napp, H. Winge, A.R. Cordeiro, 1966. A corn meal, soybean flour, wheat germ medium for *Drosophila*. *D.I.S.* 41: 187.
- Nayak, A.R., J.S. Nair, M.V. Hagde, P.K. Ranjekar & U. Pant, 1991. Genome analysis of two mosquito species. *Insect Biochem.* 21: 803-808.
- Norris, D.P., D. Patel, G.F. Kay, G.D. Penny, N. Brockdorff, S.A. Sheardown, S. Rastan, 1994. Evidence that random and imprinted *Xist* expression is controlled by preemptive methylation. *Cell* 77: 41-51.
- Tautz, D., J. Hancock, D. Webb, C. Tautz, G. Dover, 1988. Complete sequences of the rRNA genes of *Drosophila melanogaster*. *Mol. Biol. Evol.*, 5: 366-376.
- Tweedie, S., H.H. Ng, A.L. Barlow, B.M. Turner, B. Hendrich, A. Bird, 1999. Vestiges of a methylation system in *Drosophila melanogaster*? *Nat. Genet.* 23: 389-390.
- Tweedie, S., J. Charlton, V. Clarck & A. Bird, 1997. Methylation of genomes and genes at the invertebrate-vertebrate boundary. *Mol. Cell. Biol.* 17: 1469-1475.
- Urieli-Shoval, S., Y. Gruenbaum, J. Sedat & A. Razin, 1982. The absence of detectable methylated bases in *Drosophila melanogaster* DNA. *Febs Lett.* 6(146)(1): 148-152.

Legenda das figuras

Fig. 1. DNA genômico de diferentes fases do desenvolvimento de *D. willistoni* (linhagem WIP-4) clivado com a enzima *HaeIII* e hibridado com: A) o fragmento de 5Kb obtido a partir da clivagem do DNA genômico de WIP-4 com *HaeIII* e B) a mesma membrana re-hibridada com um dos clones (72M) obtido a partir deste fragmento. O marcador de peso molecular é λ /*HindIII* (Invitrogen) e vale para as figuras A e B.

Fig. 2. DNA genômico de diferentes fases do desenvolvimento de *D. willistoni* (linhagem 17A2) clivado com a enzima *HaeIII* e hibridado com: A) o fragmento de 5Kb obtido a partir da clivagem do DNA genômico de WIP-4 com *HaeIII* e B) a mesma membrana re-hibridada com um dos clones (72M) obtido a partir deste fragmento. O marcador de peso molecular é λ /*HindIII* (Invitrogen) e vale para as figuras A e B.

Fig. 3. DNA genômico de diferentes fases do desenvolvimento de *D. willistoni* (linhagem WIP-4) clivado com a enzima *AluI* e hibridado com: A) o fragmento de tamanho entre 3 e 4 Kb obtido a partir da clivagem do DNA genômico de WIP-4 com *AluI*; B) a mesma membrana re-hibridada com um dos clones (62M) obtido a partir deste fragmento; C) a mesma membrana re-hibridada com o plasmídeo pDm 238 contendo rDNA de *D. melanogaster*. O marcador de peso molecular é 1 kb DNA ladder (Promega) e vale para as figuras A, B e C. O * representa a porção do rDNA não metilado que clivou no padrão esperado para a enzima. Observar que algumas bandas co-localizam em A, B e C.

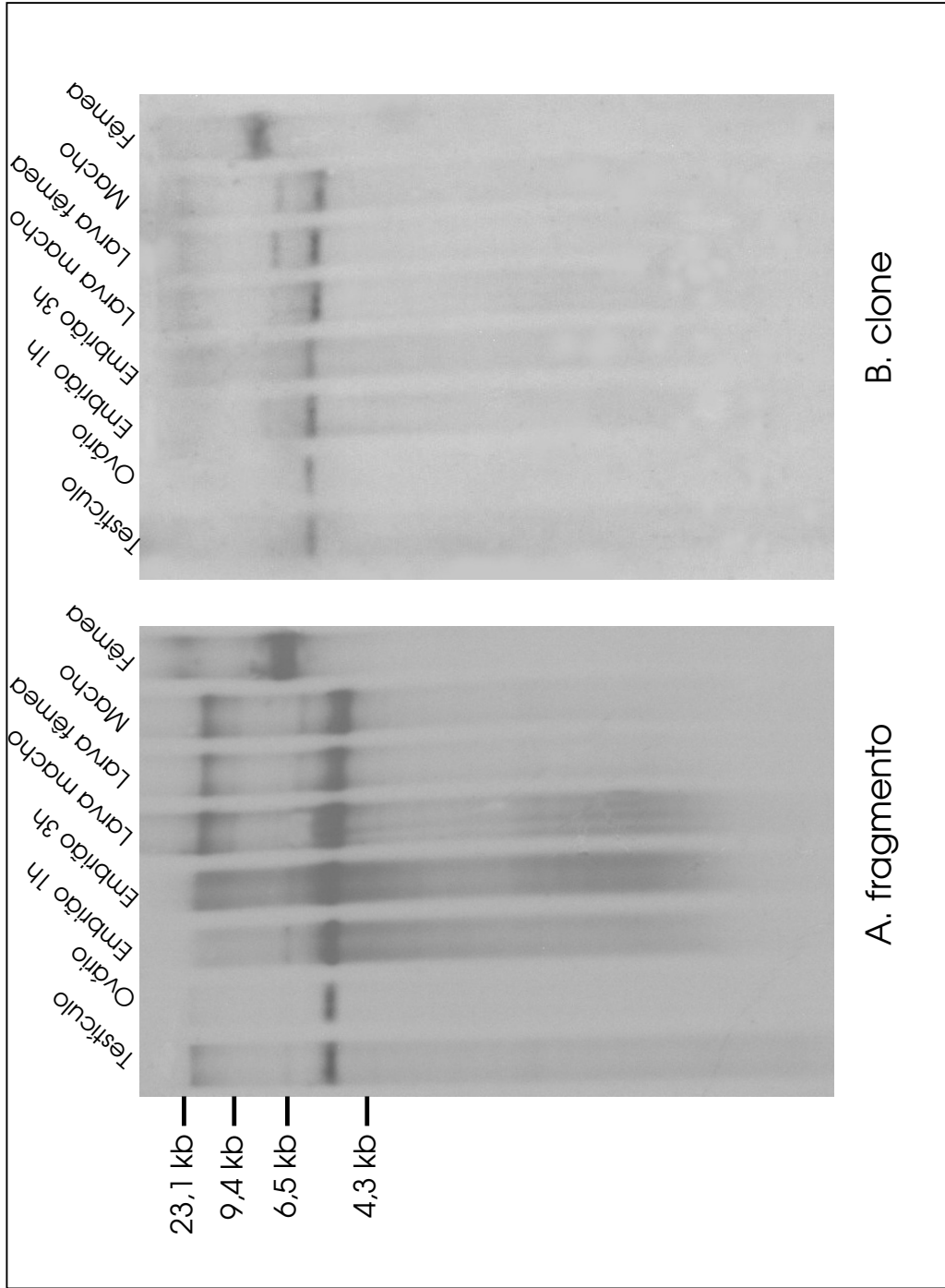
Fig. 4. DNA genômico de diferentes fases do desenvolvimento de *D. willistoni* (linhagem 17A2) clivado com a enzima *AluI* e hibridado com: A) o fragmento de tamanho entre 3 e 4 Kb obtido a partir da clivagem do DNA genômico de WIP-4 com *AluI*; B) a mesma membrana re-hibridada com um dos clones (62M) obtido a partir deste fragmento; C) a mesma membrana re-hibridada

com o plasmídeo pDm 238 contendo rDNA de *D. melanogaster*. O marcador de peso molecular é 1 kb DNA ladder (Promega) e vale para as figuras A, B e C. O * representa a porção do rDNA não metilado que clivou de acordo com o padrão esperado para a enzima. Observar que algumas bandas co-localizam em A, B e C.

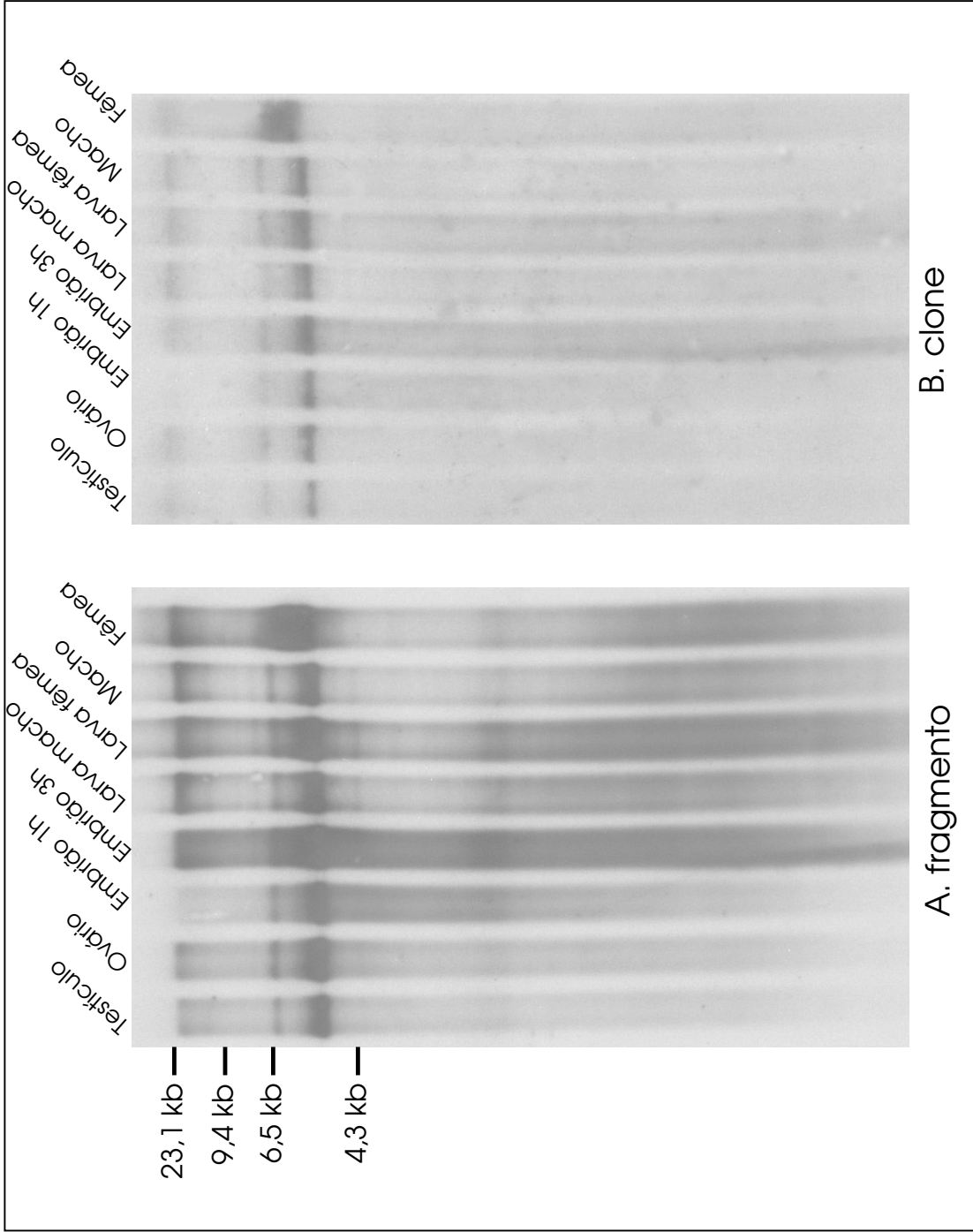
Fig. 5. DNA genômico de machos e fêmeas de *D. willistoni* (linhagem 17A2) clivado com a enzima *AluI* e hibridado com: A) o fragmento de tamanho entre 2 e 3 kb obtido a partir da clivagem do DNA genômico de 17A2 com *AluI*; B) a mesma membrana re-hibridada com um dos clones (35M), obtido a partir deste fragmento correspondente ao gene 18S de *D. willistoni*; C) a mesma membrana re-hibridada com o plasmídeo pDm 238 contendo rDNA de *D. melanogaster*. O marcador de peso molecular é λ /*HindIII* (Invitrogen) e vale para as figuras A, B e C. O * representa a porção do rDNA não metilado que clivou no padrão esperado para a enzima. Observar que algumas bandas co-localizam em A, B e C.

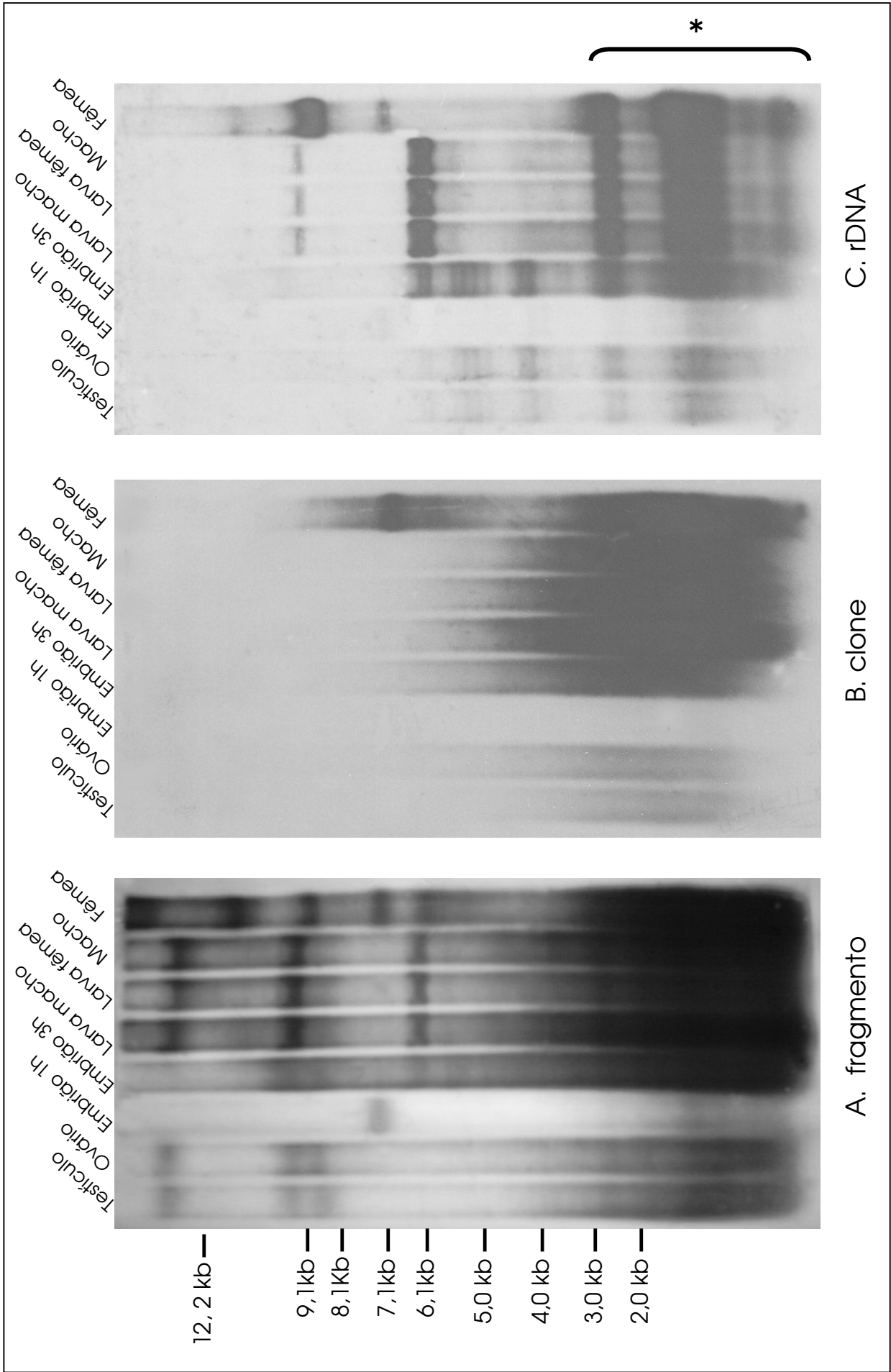
Fig. 6. DNA genômico de diferentes fases de desenvolvimento e linhagens (indicados na figura) de *D. willistoni* clivado com a enzima *RsaI* e hibridado com o plasmídeo pDm238 contendo rDNA de *D. melanogaster*. O marcador de peso molecular é 1 kb DNA ladder (Promega).

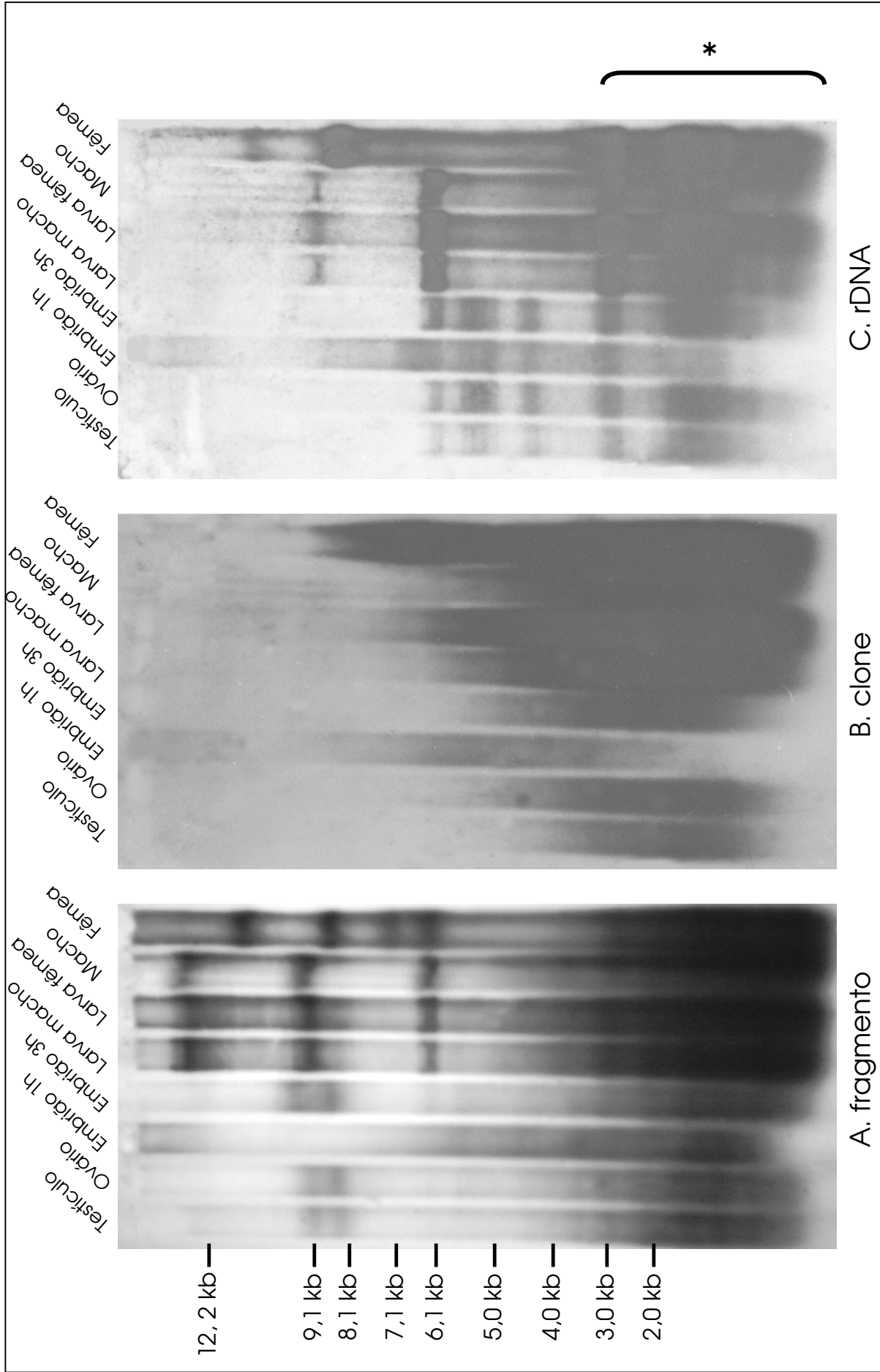
1



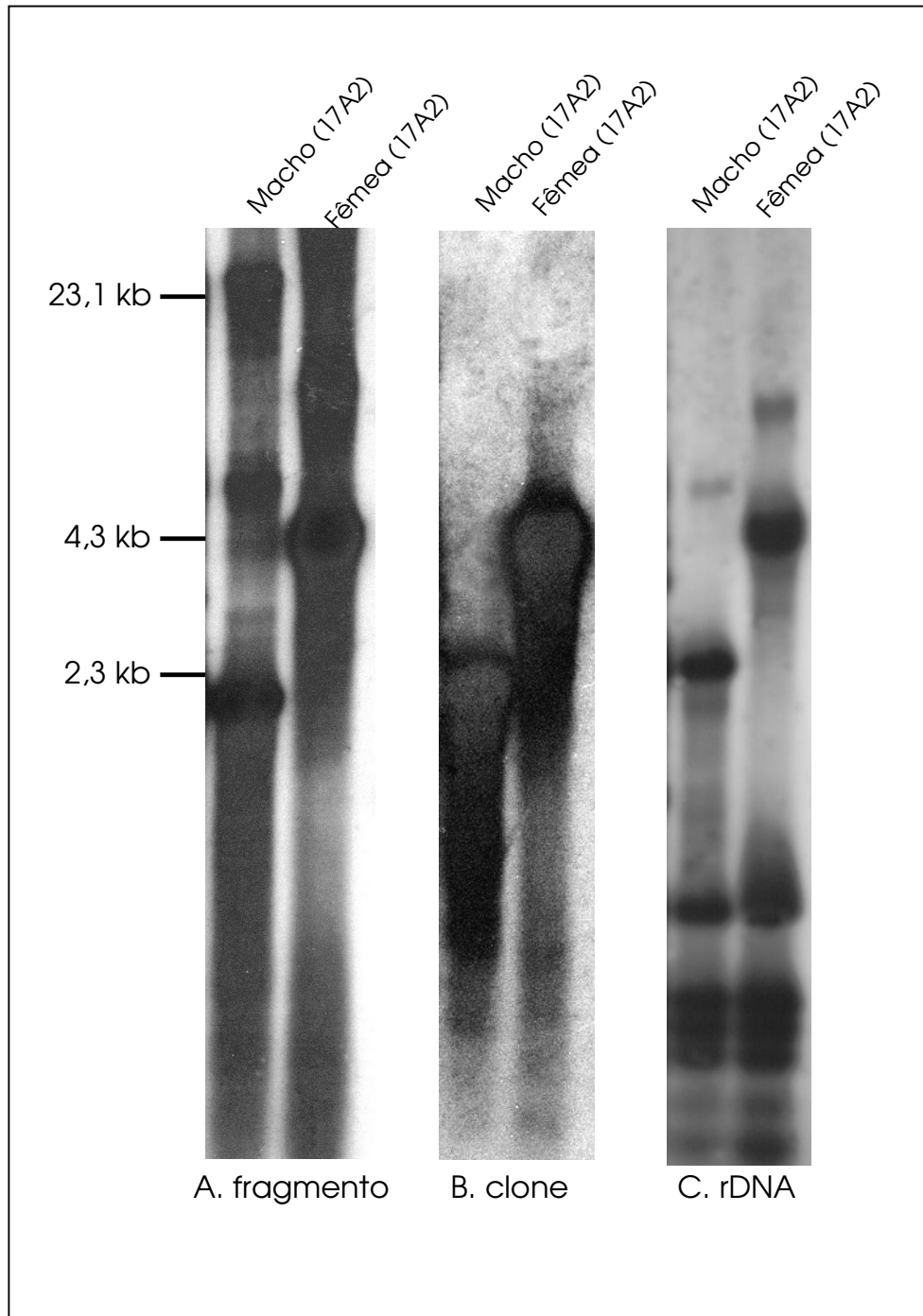
2



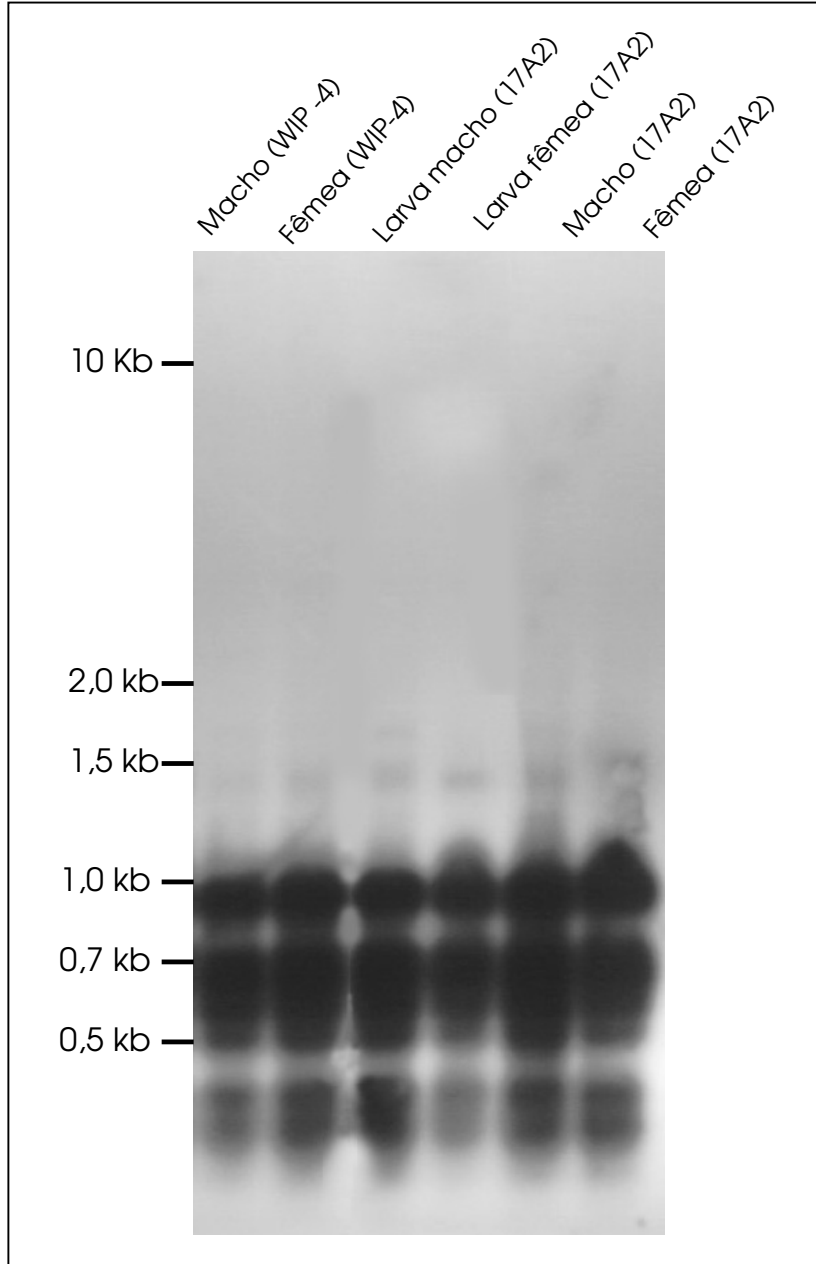




5



6



CAPÍTULO 4

**Investigation of the presence of *TART* retroelement in some *Drosophila* species by
Southern blot.**

(trabalho a ser submetido à *Drosophila* Information Service)

Garcia^{1,2,*}, Rosane N., Elgion L. S. Loreto³, and Vera L. S. Valente². Investigation of the presence of *TART* retroelement in some *Drosophila* species by Southern blot. ¹Programa de Pós Graduação em Biologia Animal, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brazil; ²Departamento de Genética, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brazil. Caixa Postal 15053. CEP 91501-970. Porto Alegre, RS, Brazil. ³Departamento de Biologia, Universidade Federal de Santa Maria, CEP 97105-900. Santa Maria, RS, Brazil. *e-mail: mshenz@terra.com.br

Telomeres are structures composed by nucleoproteins, present in the extremities of eukaryotic chromosomes that perform an important role in the maintenance of the functional integrity of the chromosomal set during the cell cycle (Biessman and Mason, 1997). In organisms, telomeres are formed by short repetitions arranged in sequences maintained by the action of a reverse transcriptase, named telomerase. In *Drosophila melanogaster*, however, the mechanism of elongation of telomeres is different from the remaining eukaryotes studied: in this fly, the ends of the chromosomes are maintained by multiple insertions of two members of Class I transposable elements, *Het-A* and *TART* that belongs to the LINEs group (Capy *et al.*, 1998). These retrotransposons form chains of repetitions larger (75 to 100 Kb) and more complex than those formed by telomerase in the ends of other eukaryotic chromosomes. Besides this, *Het-A* and *TART* differ from other retroelements, because they transpose exclusively at telomeric heterochromatin (Pardue and DeBaryshe, 2002). Extremities of chromosomes, in general, differ with respect to the quantity of telomeric sequences. Assays with *in situ* hybridization using *Het-A* as probe in polytene chromosomes, showed that these differences are a heritable characteristic of the strains of *D. melanogaster* studied, and that abrupt changes in the length of telomeres seems to be common (Pardue and DeBaryshe, 2002). The elongation of telomeres in *D. melanogaster* can occur by transposition of new elements, by recombination, and by gene conversion during minor events of DNA repair (Kahn *et al.*, 2000). However, considering that subfamilies of *TART* with different patterns of evolution were recently found by Casacuberta and Pardue, (2002) in *D. yakuba*, it was assumed that transposition

events can be the main factor responsible for this elongation. *HeT-A* has 6Kb in length and presents a 5' (5'-UTR) non-codifying region; one ORF containing the *gag* gene, codifying a protein similar to those of retroviruses; one 3' (3'-UTR) non-codifying region, and a tail of poly A. *TART* is more than 10Kb long and has one in completely defined 5'-UTR, an ORF1 with the gene *gag*, an ORF2 with the gene *pol* codifying a reverse transcriptase, one 3'-UTR region and a poly (A) tail. *TART* also has two PNTRs (Perfect Non-Terminal Repeat), both identical in their sequences (Pardue and DeBaryshe, 2003). *HeT-A* can not codify reverse transcriptase as *TART* do, and depends on cellular genes of the host genome to produce this enzyme in order to perform the transposition (Pardue *et al.*, 1996). *TART* is less abundant in the genome of *D. melanogaster* than *HeT-A*. The difference in the amount of retroelements in the telomeres can be due to the occurrence of far processes of "erosion" of chromosomes, which could delete certain repetitions raised before the occurrence of new transposition events. The deletion of retroelements in the telomeres of *Drosophila* promoted progressive shortening of the chromosome extremities by incomplete replication of DNA. So, these elements can not avoid the loss of terminal nucleotides, but they can counterbalance this occurrence through the transposition for the extremities (Walter *et al.*, 1995). Such difference in the amount of the two retroelements, however, does not affect their main functions for the chromosomal telomeres. Besides this, for being essential, they assume the role of "sacrificial" DNA, instead of "selfish" DNA (Pardue *et al.*, 1996). The retroelements *HeT-A* and *TART*, as do other repetitive DNAs, also evolved in concert. For this reason, it is difficult to analyze the presence of *HeT-A* in species more distantly related to *D. melanogaster*, because these sequences can be so divergent, that they yet are considered as members of other family of retrotransposons (Pardue and DeBaryshe, 2002). These authors, when analyzed several sequences of *HeT-A* isolated from *D. melanogaster*, observed that complete and potentially functional retroelements can differ both in codifying and in non-codifying regions. Sequences isolated from the genome of *D. simulans*, a sibling species of *D. melanogaster*, suggest that the divergence between them is not high, but that it increases proportionally to the evolutionary distance of the species (Pardue and DeBaryshe, 2002). The present study aimed to verify in other

species of *Drosophila*, specially in Neotropical, if sequences homologous with the retroelement *TART*, are present or not, through screening by Southern blot. The stocks of *Drosophila* species used in this work (Table 1) were reared in culture medium as in Marques *et al.* (1966), in $17^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ chambers, with 60% R. H. The cultures were well-nourished daily with two drops of a Baker's yeast solution. As a *TART* probe, we used sequences of ORF1 and ORF2. The ORF1 was inserted in to p23-ORF1+2 plasmid and ORF2 was inserted in to pOR-i5-5d tp10 plasmid, both isolated from the genome of *D. melanogaster*, kindly provided by Dr. Olga Danilevskaya (Department of Biology, Massachusetts Institute of Technology, Cambridge, Massachusetts 02139, USA). They were labeled with a random prime method using the kit Gene Images® (Amersham Biosciences) for Southern blot analysis. Genomic DNA from adult flies of each species indicated in Table 1, was extracted according to Jowett (1986) and 10µg of DNA of each sample were digested with *Hind*III restriction enzyme (Invitrogen) for ORF1+2 *TART* analysis. The DNA of each sample was digested with *Eco*RI and *Dra*I (Invitrogen) for analysis of the ORF2 of *TART*, fractionated in 0.8% agarose gel, transferred to a Hybond N+ (Amersham Biosciences) membrane and hybridized according to the protocol of manufacturers. The membranes were hybridized to the random prime labeled probe at 60° C in a mixture containing 0.1% SDS, 5% dextran sulfate and a 20-fold dilution of liquid block in 5xSSC. The filter was washed twice at 60°C, firstly with 1xSSC and 0.1% SDS and then with 0.5xSSC and 1% SDS, in both cases under agitation for 15 minutes. For detection, we used the CPD-Star® kit (Amersham Biosciences). The molecular length (in Kb) of the fragments was determined using the marker 1 Kb Plus DNA ladder (Invitrogen), as control. As other authors before us we verified signals of conservation of both ORF2 and ORF1+2 of *TART* only in *D. melanogaster* strains (Oregon-R and Harwich) whereas in the remaining species, the pattern of expected fragments was lost (Figures 1, 2, and 3). In the sibling species *D. simulans*, whose time of divergence from *D. melanogaster* was estimated in 2.5 myr (Throckmorton,1975), we observed certain variation in the band pattern. Recently, an analysis of telomere sequences of *D. yakuba* (separated of *D. melanogaster* by around 5-15 million of years), according to Casacuberta and Pardue (2002), revealed *TART*-like sequences in the genome of

this species, also with the same function, but showing considerable difference with respect to sequences, and to transcription pattern, when compared with those of *D. melanogaster*. They also detected some indication of horizontal transference of *TART* from *D. melanogaster* to *D. yakuba*, since one sequence presented more than 95% of similarity with the sequences of *D. melanogaster*. Due to the low similarity of the sequences of *TART* it was only possible to see few bands after super-exposure of the film during its development. Two or three bands hybridized with ORFs sequences of *TART* of *D. melanogaster*, appear to be present in genomes of the species of the *willistoni* group and in those of the *repleta* group (*D. mercatorum*), in this case, the most distant of *D. melanogaster*. Similarly, was impossible to detect, difference in the patterns of ORF1+2 or ORF2 by *Southern blot*. The expected was that ORF2 was more conserved, but the divergence is so high, that we could not evaluate this possibility through our findings. Interestingly, *D. kikkawai* (*melanogaster* group, *montium* subgroup) and *D. ananassae* (*melanogaster* group, *ananassae* subgroup) presents the same banding patterns of members of more distant species groups. This finding suggest that the conservation of *TART* appear to be restricted to the subgroup *melanogaster*, although the study of Casacuberta and Pardue (2003) detected the presence of sequences homologous to the *TART* reverse transcriptase of in *D. virilis*, considered as the species more evolutionary distant from *D. melanogaster* (with separation estimated in 62 million years). The hypothesis of those authors is that retroelements specific to telomeres could yet have been present in the *Drosophila* ancestral genome, before the separation of the different groups and subgenus, that occurred after a fast divergence of sequences and of species, as happened with other retroelements (Pardue and DeBaryshe, 2003).

References: Biessman, H. and J. M. Mason, 1997: 63 – 69; Casacuberta, E. and M.L. Pardue, 2002, *Genetics* 161: 1113-1124; Casacuberta, E. and M.L. Pardue, 2003, *PNAS* 100 (6): 3363-3368; Jowett, T., 1986, *In*: Robert, D. B. (Ed.). *Drosophila: a practical approach*. Oxford: IRL Press; Kahn, T., M. Savitsky, and P. Georgiev, 2000, *Mol. Cell. Biol.*, 20: 7634-7642; Malik, H. S., W.D. Burke, and T.H. Eickbush, 1999, *Mol. Biol. Evol.*, 16: 793-805; Marques, E. K, M. Napp, H. Winge, A R. Cordeiro, 1966, D. I.

S., 41: 187; Pardue, M. L., O. N. Danilevskaya, K. Lowenhaupt, F. Slot and K. Traverse, 1996, TIG, 12, (2): 48 – 51; Pardue, M. L., P. G. Debaryshe, 2000, Mobile DNA II, Craig, N. L., R. Craige, M. Gellert, and A. M. Lambowitz (Eds.) ASM Press, Washington, D.C.: 446pp; Pardue, M. L. and P. G. De Baryshe, 2003, Ann. Rev. Genet., 37: 485-511; Throckmorton. L. H., 1975. In: Robert C. King (Ed.). Handbook of Genetics. Plenum Publ. Corp. N. York, 421-469; Walter, M. F., C. Jang, B. Kasravi, J. Donath, B. M. Mechler, J.M. Mason and H. Biessmann, 1995, Chromosoma, 104: 229-241.

Acknowledgements

This study was performed with fellowships and grants from Brazilian agencies CNPq, FAPERGS, FINEP and PROPESQ-UFRGS.

Figure legends

Figure 1. Southern blot analysis of ORF1+2 of the *TART* retroelement in: *Drosophila willistoni* (WIP-4 strain)-W, *D. willistoni* (17A2 strain)-17, *D. paulistorum*-P, *D. melanogaster* - Oregon-R strain (positive control)-MO, *D. simulans*-S, *D. kikkawai*-K, *D. mercatorum*-Me, *D. immigrans*-I, *D. melanogaster* - Harwich strain (positive control)-MH. Genomic DNA (10 µg) was digested with *Hind*III restriction enzyme. The molecular length (Kb) of the fragments detected was determined by comparison with 1Kb Plus DNA ladder (Invitrogen).

Figure 2. Southern blot analysis of ORF2 of the *TART* retroelement in: *D. willistoni* (WIP-4 strain)-W, *D. willistoni* (17A2 strain)-17, *D. paulistorum*-P, *D. melanogaster* - Harwich strain (positive control)-MH, *D. melanogaster* - Oregon-R strain (positive control)-MO, *D. simulans*-S, *D. kikkawai*-K, *D. mercatorum*-M. Genomic DNA (10µg) was digested with *Eco*RI and *Dra*I restriction enzymes. The molecular length (kb) of the fragments detected was determined by comparison with 1Kb Plus DNA ladder (Invitrogen).

Figure 3. Southern blot analysis of ORF2 of the *TART* retroelement in: *D. melanogaster*- Oregon-R strain (positive control)-MO, *D. simulans*-S, *D. ananassae*-A, *D. mercatorum*-M, *D. immigrans*-I, *D. galloi*-G, *D. willistoni* (WIP-4 strain)-W, *D. willistoni* (17A2 strain)-17, *D. kikkawai*-K. Genomic DNA (10 µg) was digested with

EcoRI restriction enzyme. The molecular length (kb) of the fragments detected was determined by comparison with 1Kb Plus DNA ladder (Invitrogen).

Table 1. Species used in this study (taxonomic classification by Throckmorton, 1975).

Genus	Sub-genus	Group	Sub-group	Species
<i>Drosophila</i>	<i>Sophophora</i>	<i>willistoni</i>	<i>willistoni</i>	<i>D. willistoni</i> (strain WIP-4)
				<i>D. willistoni</i> (strain 17A2)
		<i>willistoni</i>	<i>willistoni</i>	<i>D. paulistorum</i>
		<i>melanogaster</i>	<i>melanogaster</i>	<i>D. melanogaster</i> (strain Harwich)*
				<i>D. melanogaster</i> (strain Oregon-R)*
		<i>melanogaster</i>	<i>melanogaster</i>	<i>D. simulans</i> *
		<i>melanogaster</i>	<i>montium</i>	<i>D. kikkawai</i>
		<i>melanogaster</i>	<i>ananassae</i>	<i>D. ananassae</i>
	<i>Drosophila</i>	<i>immigrans</i>	<i>immigrans</i>	<i>D. immigrans</i>
		<i>repleta</i>	<i>mercatorum</i>	<i>D. mercatorum</i>
	<i>Scaptodrosophila</i>			<i>D. galloi</i>

* Species that were used as control in this study.

Figure 1

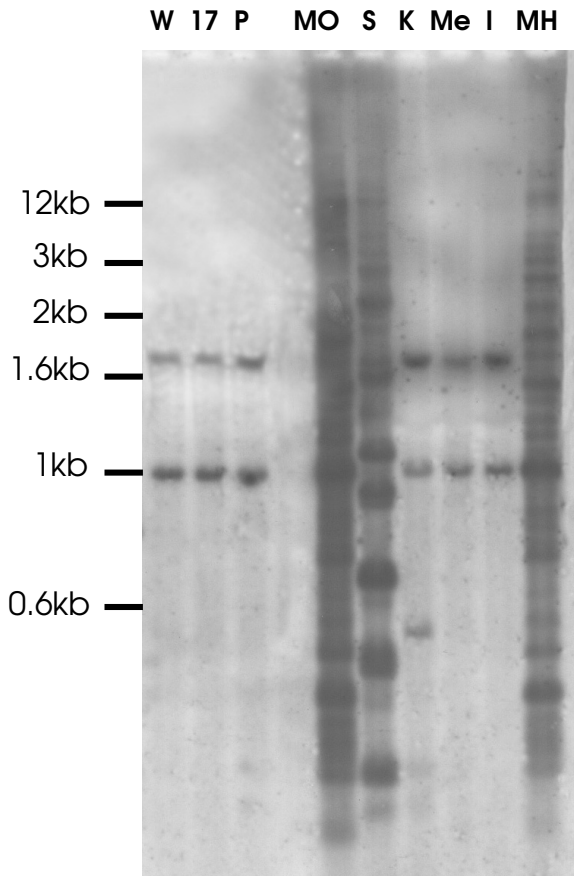


Figure 2

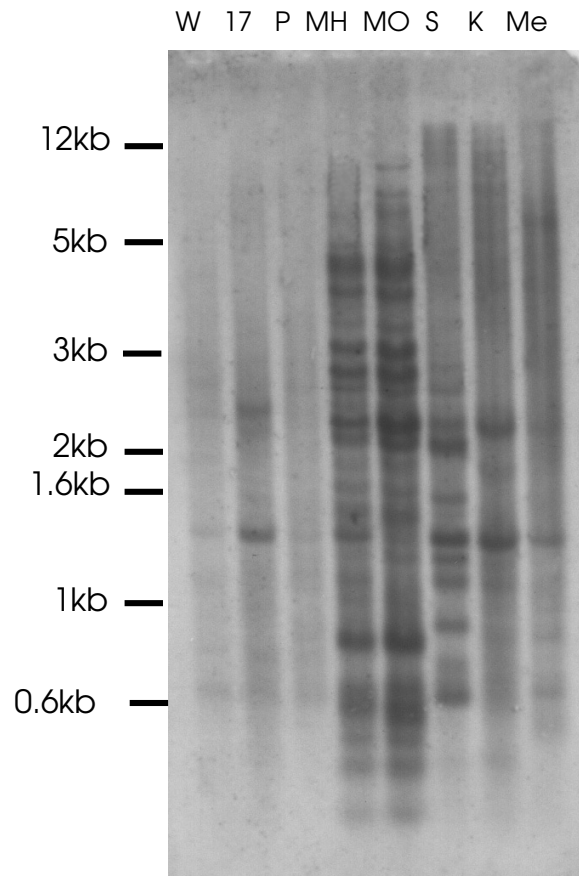
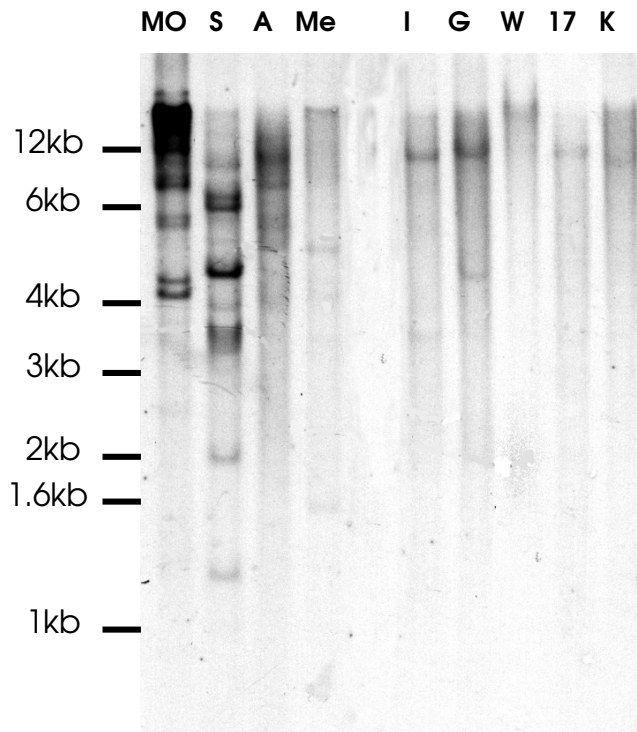


Figure 3



CAPÍTULO 5
DISCUSSÃO GERAL, CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

5. 1. Discussão geral, conclusões e perspectivas

Uma grande pergunta inicial motivou nossa pesquisa: Qual ou quais fatores existem no genoma de *D. willistoni* que a tornam tão diferente das demais espécies de *Drosophila*, no sentido de que apresenta uma maior variabilidade genética e um excepcional sucesso ecológico? Quando iniciamos o nosso projeto, partimos do pressuposto de que no DNA genômico de *D. willistoni*, existiriam regiões de DNAs peculiares, inicialmente chamadas de regiões de DNA repetitivo, e que estas corresponderiam às regiões previamente localizados *in situ* por Garcia (1997), através de diferentes técnicas de bandamento, incluindo a que usa as enzimas de restrição *AluI* e *HaeIII*, como já foi feito em outras espécies de *Drosophila* (Ellison & Barr, 1972; Mezzanotte, 1978; Mezzanotte, 1986; Mezzanotte et al., 1987).

Julgamos, então, que caracterizar o DNA repetitivo da heterocromatina constitutiva ou intercalar em *Drosophila* seria importante neste contexto, porque estas frações do genoma estão envolvidas em diversos processos regulatórios tais como silenciamento gênico (Grewal & Elgin, 2002, Wallrath, 1998), por exemplo, ou ainda a formação de compartimentos genômicos heterocromáticos críticos para o comportamento adequado dos cromossomos na mitose e meiose (Csink & Henikoff, 1998).

A busca dos DNAs repetitivos começou com a tentativa de verificar se os telômeros de *D. willistoni*, bem como de outras espécies neotropicais, eram formados pela inserção múltipla de dois retroelementos, *HeT-A* e *TART*, como ocorre em *D. melanogaster* (Pardue & DeBaryshe, 2002). Porém os resultados mostrados no capítulo 4 indicaram que as repetições que formam os telômeros de *D. willistoni* são seqüências muito diferentes e com baixa homologia com o retroelemento *TART* de *D. melanogaster*. A partir desses achados, sua localização cromossômica tornou-se improvável e resolvemos que a hibridação *in situ*, que estava inicialmente prevista em nosso projeto, fosse cancelada. Um pré-requisito básico para que estas seqüências fossem localizadas e caracterizadas nos cromossomos de *D. willistoni*, seria a homologia. Mesmo uma metodologia baseada em Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) seria de difícil realização,

em função desta falta de similaridade entre as seqüências de *D. willistoni* e *D. melanogaster*. Logo, a fração do DNA repetitivo de *D. willistoni* correspondente às pontas dos cromossomos, já é bastante diferente da espécie modelo *D. melanogaster*, apesar de ambas fazerem parte do mesmo sub gênero *Sophophora*.

Partimos, então, para a execução da outra parte do projeto, que seria isolar e seqüenciar DNAs repetitivos do genoma de *D. willistoni*. Inicialmente adotamos a metodologia mais indicada para isolar seqüências repetitivas, que seria a clivagem do DNA genômico com enzimas de restrição e a clonagem de bandas de DNA repetitivo que se formam após esta clivagem. No Díptero *Rhynchosciara americana*, por exemplo, quando o DNA genômico de adulto é submetido à digestão com as enzimas *EcoR1* ou *BamH1*, inúmeras bandas são visualizadas em gel de agarose. A clonagem e seqüenciamento de uma banda de 1kb gerada por *EcoR1* demonstrou uma família altamente polimórfica de seqüências repetitivas (duas seqüências são ricas em AT intercaladas com GC e outra tem baixa porcentagem de AT), sendo que, por hibridação *in situ* em cromossomos politênicos, estas seqüências estavam presentes nos telômeros e em algumas junções banda - interbanda (Yussa et al., 1994).

Esta técnica de isolamento de DNAs repetitivos, através da clivagem com enzimas de restrição, também é usada em vertebrados. Em peixes, por exemplo, a clivagem do DNA genômico com diferentes enzimas de restrição, isola DNAs repetitivos que, quando analisados *in situ*, caracterizam-se como seqüências de DNA satélite heterocromático (Cau et al., 1992).

O capítulo 2, então, mostra o esforço que foi empreendido na busca deste DNA repetitivo no genoma de *D. willistoni*. Ao final, verificamos que a fração isolada pelas enzimas de restrição *AluI* e *HaeIII* não pode ser, na sua grande maioria, caracterizada como DNA repetitivo *sensu strictu*, mas sim, como seqüências ricas em AT. A fração de DNA repetitivo que isolamos, corresponde à uma parte dos genes ribossomais. Inicialmente não conseguimos explicar o diferente padrão de bandas que observamos entre machos e fêmeas que se repetia em todas as análises que realizávamos. Por um período cogitamos a hipótese de metilação diferencial, mas toda a literatura apontava para ausência

deste fenômeno através de estudos realizados exclusivamente com *Drosophila melanogaster* (Urieli-Shoval et al., 1982). Para ilustrar o quanto esta idéia estava estabelecida, transcrevemos um trecho do capítulo 5 do livro Mobile DNA II, página 79, escrito por Kidwell & Lisch: "Methylation is not universally required for eukaryotic development. Some eukaryotes, such as *Drosophila*, do without it altogether." (Kidwell & Lisch, 2002).

O discurso, no entanto, graças à trabalhos mais recentes, está mudando. Várias evidências apontam para a existência de níveis baixos de metilação (quando comparados a mamíferos) no genoma de *D. melanogaster*. Embriões em fase inicial de desenvolvimento apresentam mais metilação no seu DNA do que adultos e a preferência dos sítios de metilação é por dinucleotídeos CpT e CpA (Hung et al., 1999; Tweedie et al., 1999; Lyko et al., 2000; Kunert et al., 2003).

Acreditamos que os dados mostrados no capítulo 2 representam, além de uma resposta para explicar o sucesso biológico da espécie *D. willistoni*, quando comparada com demais drosofilídeos, uma mudança num conceito estabelecido sobre metilação em *Drosophila*. O grande problema neste ponto é que estudos realizados em organismos modelos, muitas vezes fecham questões em torno de mecanismos que podem ser diferentes dentro de um mesmo gênero. Se em *D. melanogaster*, as pesquisas estão apontando que o potencial para metilar o DNA existe, o fato de que em *D. willistoni* existem aplicações diferentes da cosmopolita *D. melanogaster* para este potencial, pode ser simplesmente uma demonstração de que, por terem evoluído em ambientes diferentes, a seleção manteve um padrão pré-existente em funcionamento no genoma de *D. willistoni*.

Os organismos, podem ser classificados em três grupos distintos, segundo o grau de metilação do seu genoma: o grupo livre de metilação (Nematoda e Arthropoda, no qual estaria incluída *Drosophila*); um grupo que teria o seu DNA fracionalmente metilado (Mollusca, Annelida, Cnidaria, entre outros) e um grupo que teria o seu DNA globalmente metilado (Vertebrados). Algumas exceções, no entanto, podem ocorrer (Tweedie et al., 1997).

O grupo que tem o DNA fracionalmente metilado apresenta este fenômeno em compartimentos do genoma, tal como ocorre em fungos, por exemplo, onde a metilação está confinada à seqüências repetitivas e associadas

com função de defesa do genoma mediante invasão de DNA forasteiro (Hendrich & Tweedie, 2003). Também uma fração de genes funcionais importantes são encontrados nestes compartimentos metilados do genoma destes organismos, tais como os genes ribossomais, por exemplo. No entanto, apenas uma parte dos genes (que ocorrem em múltiplas cópias) está metilada, permanecendo uma fração livre desta modificação (Tweedie et al., 1997).

Nós estamos, então, propondo que no genoma de *D. willistoni* existe muito mais metilação do que no de *D. melanogaster* e que, portanto, *D. willistoni* faz parte do grupo de organismos que tem o seu DNA fracionalmente metilado como Molusca, Annelida, Cnidaria entre outros. Dado o maior potencial de metilação do DNA e suas maiores possibilidades de controle da expressão gênica através deste mecanismo, apresentamos uma evidência molecular importante da maior "versatilidade" funcional do genoma de *D. willistoni*. O capítulo 3 mostra provas consistentes para apoiar esta idéia.

Os resultados mostrados no capítulo 3 abrem uma série de perspectivas para investigações futuras. Uma delas seria fazer uma investigação em diferentes espécies de *Drosophila*, a fim de verificar se a metilação é restrita à *D. willistoni* e suas crípticas, ou ainda, se está presente em outros grupos de espécies neotropicais ou não. Também é interessante investigar qual, efetivamente, é a função da metilação no genoma de *D. willistoni*. Em *D. melanogaster* isto já foi iniciado. Experimentos utilizando RNA de interferência (RNAi- RNA dupla fita que é capaz de silenciar a expressão do gene que codifica este RNA), Kunert et al. (2003), demonstraram que o silenciamento da expressão de dDnmt2 (enzima responsável pela metilação em *Drosophila melanogaster*) parece não ter nenhuma consequência detectável para o desenvolvimento embrionário, bem como os adultos não apresentam nenhum fenótipo detectável para a supressão da expressão desta enzima. Como nós sugerimos no capítulo 3 que a metilação poderia estar envolvida no processo de compensação de dose em *D. willistoni*, um experimento que detectasse o quanto é importante este fenômeno para esta espécie seria importante.

Algumas questões ainda referentes ao capítulo 2, porém, ficaram em aberto e podem ser alvos de estudos futuros. A primeira delas é referente aos 44

clones que obtivemos a partir da clivagem do DNA genômico de *D. willistoni* com as enzimas de restrição *AluI* e *HaeIII*. Destes, analisamos somente um clone de cada seqüência através de *Southern blot* e por hibridação *in situ*. Como as seqüências são bastante heterogêneas, acreditamos que cada uma delas pode ter um padrão de hibridação diferente para ambas as técnicas. Por exemplo, os clones 72M e 62F que não os identificamos através do BLAST com quaisquer outras seqüências conhecidas, co-localizam com rDNA tanto *in situ* como por *Southern*, mostrando a relação destas seqüências com DNA heterocromático. Não podemos precisar onde exatamente estão estas seqüências no genoma de *D. willistoni*, mas os dados indicam que podem ser um tipo de DNA espaçador que poderia estar localizado adjacente aos genes ribossomais. O clone 62F também marcou em uma seção eucromática do cromossomo IIR, indicando que esta pode ser outra região rica em AT semelhante à que ocorre junto ao rDNA. Esta região co-localiza com ponto de quebra de inversão em *D. willistoni* (WIP-4), segundo indicado no mapa de Dobzhansky (1950). Os demais clones não necessariamente precisam ter esta mesma relação com heterocromatina ou rDNA.

Seqüências ricas em AT estão presentes em várias regiões do genoma de *D. melanogaster* (Dowsett & Young, 1982), bem como DNAs satélites ricos em AT, que estão localizados em regiões heterocromáticas (Gatti & Pimpinelli, 1992). Nas regiões organizadoras de nucléolo também ocorrem regiões ricas em AT nos espaçadores intergênicos (IGS) (Tautz et al., 1988) bem como no DNA mitocondrial de *D. melanogaster*, que apresenta regiões ricas em AT, sendo algumas destas altamente conservadas em várias espécies de *Drosophila* (Lewis et al., 1994). Em *D. willistoni*, as técnicas de bandamento que nós realizamos em cromossomos politênicos utilizando o fluorocromo DAPI, revelaram a presença de regiões ricas em AT nos cromossomos X, XL, IIR e cromocentro (Garcia, 1997).

A dificuldade em determinar a identidade dos clones 62F e 72M, mas a possibilidade que sejam espaçadores ou seqüências relacionadas à NOR, pode ser explicada pelo tipo de evolução que estas seqüências apresentam. Seqüências repetitivas (como por exemplo rDNA) apresentam um padrão de evolução em concerto (Dover, 1994). A análise das regiões espaçadoras dos

genes ribossomais, no entanto, em diferentes populações de *D. melanogaster*, revelou heterogeneidade intra-específica no tamanho destes espaçadores (Polanco et al., 2000). Os genes e os espaçadores em rDNA, podem pois, evoluir diferentemente, apesar de serem seqüências adjacentes, sendo que a variação maior fica reservada para os últimos. Como *D. willistoni* e *D. melanogaster* são espécies que pertencem a grupos do mesmo sub gênero, mas que divergiram há aproximadamente 36-53 milhões de anos (Powell & DeSalle, 1995; Russo et al., 1995), é possível que as seqüências dos clones que julgamos serem de regiões espaçadoras heterocromáticas, sejam tão divergentes com as de *D. melanogaster*, que não foi possível identificá-las através do BLAST.

Esta capacidade das repetições que flanqueiam os genes da heterocromatina de mudar rapidamente durante a evolução é discutida por Lohe & Roberts (2000). Estes autores propõe que análises para avaliar mudanças nos genomas de espécies crípticas em períodos curtos durante a evolução, são melhor demonstradas pelas mudanças rápidas que ocorrem no DNA heterocromático. Um exemplo destas mudanças rápidas envolvendo seqüências heterocromáticas é o que acontece com as NOR de três espécies crípticas de *D. melanogaster*. As NOR ficam restritas aos cromossomos sexuais, mas mudam de posição nestes cromossomos em cada espécie. Evidências sugerem que o DNA heterocromático pode apresentar altas taxas de rearranjos cromossômicos (Inversões, transposição e possivelmente translocações) durante a evolução. Se tais rearranjos podem ocorrer em alta freqüência, os locos de rDNA e DNAs que flanqueiam estas seqüências podem ser deslocados para diferentes sítios nos cromossomos em períodos evolutivos curtos. No entanto, não se sabe como a fluidez das seqüências repetidas na heterocromatina influenciam os genes que os rodeiam (Lohe & Roberts, 2000).

Outra questão, ainda em relação ao capítulo 2, que fica em aberto é o fato de *D. willistoni* apresentar mais de uma marcação para NOR, observada a partir das hibridações *in situ*. Nucléolos menores aparecem marcados em outras regiões, semelhante ao que já foi observado para *D. melanogaster* por Ananiev et al. (1981). Estes autores, utilizando técnica de hibridação *in situ* descrevem, além de um nucléolo que se liga por um filamento de cromatina à seção 20

(base) do cromossomo X, outras estruturas marcadas, do tipo nucléolo, com diferentes tamanhos, que são encontradas em outros sítios dos cromossomos politênicos. A explicação para isto seria o fato de que as regiões heterocromáticas adjacentes aos genes ribossomais permanecem sub replicadas, ficando mais suscetíveis a quebras. Isto pode gerar fragmentos de rDNA livres que acabam formando nucléolos secundários, geralmente pequenos, por apresentarem um número menor de genes ribossomais (Ananiev et al., 1981).

Quando anteriormente realizamos bandamento NOR (técnica à base de Nitrato de Prata que cora proteínas nucleolares) em cromossomos politênicos de *D. willistoni* (Garcia, 1997), observamos que o nucléolo não só se ligava à base do cromossomo XL, mas que de vários pontos de outros cromossomos partiam filamentos que se coravam pela prata e se ligavam ao nucléolo. Em cromossomos metafásicos, a NOR marcou no centrômero do cromossomo X e no braço curto do cromossomo Y. Estas marcações múltiplas de NOR, obtidas com os clones isolados de *D. willistoni*, poderão, portanto, futuramente ser investigadas para responder à questão de se elas são ou não, correspondentes a outras cópias de genes ribossomais espalhadas em outros sítios eucromáticos, principalmente porque nós identificamos que os genes ribossomais estão envolvidos no processo de metilação.

Um outro ponto importante vale ainda ser lembrado. Já foi caracterizado no genoma *D. willistoni* (linhagem 17A2) a presença de alguns elementos transponíveis (TEs), tais como *P* e *hobo* que apresentam evidências de estarem se mobilizando (Regner et al., 1996; Klein, 2002). É sabido também, que existe uma estreita associação entre elementos transponíveis e heterocromatina, como foi demonstrado pela caracterização molecular da heterocromatina cêntrica do minicromossomo Dp 1187 de *D. melanogaster*, onde o DNA satélite intercala-se com "ilhas" de DNA complexo, e nestas estão presentes elementos transponíveis. (Le et al., 1995). Recentemente, Dimitri et al. (2003), analisaram um total de 79Kb de 48 íntrons de 5 genes heterocromáticos e codificantes de *D. melanogaster* quanto à natureza de suas seqüências. Cerca de 50% do DNA testado era constituído de seqüências de diferentes famílias deTEs.

Poderíamos, então, levantar a hipótese de que como o rDNA está em região heterocromática, é possível que cópias extras de DNA ribossomal existam em regiões fora de heterocromatina no genoma de *D. willistoni*, originados pela mobilização de elementos transponíveis que acidentalmente poderiam transportar estes segmentos de DNA para outros locais nos cromossomos. Evidentemente, esta é uma idéia que necessita ser comprovada.

Outra maneira de cópias extras de DNA ribossomal terem sido espalhadas no genoma de *D. willistoni* poderia ser explicada através do mecanismo de duplicação por círculos rolantes que ocorre em seqüências repetitivas. Arranjos em "tandem" são pré-requisitos para a formação de DNA extracromossômico circular, sendo que em *D. melanogaster*, já foi encontrado este tipo de DNA contendo cópia de genes ribossomais (Cohen et al., 2003). Como em *D. willistoni* eventos de quebra de inversão são comuns e bem demonstrados pelo amplo polimorfismo cromossômico que caracteriza esta espécie, os eventos das quebras poderiam significar uma oportunidade para cópias extra-cromossômicas de DNA ribossomal serem reintegradas ao genoma.

Concluindo, a resposta para nossa grande pergunta inicial foi parcialmente dada. Ela não está inteiramente relacionada com o que inicialmente pensamos que fosse importante para o genoma de *D. willistoni* (os DNAs repetitivos). Porém, um cenário muito mais interessante se abriu, tendo em vista que, se a metilação está relacionada com inativação parcial de genes ribossomais, poderia também, estar relacionada a outros eventos regulatórios importantes, tais como silenciamento de elementos transponíveis "domesticando" esta fonte endógena de variabilidade. Este tipo de mecanismo está bem descrito em vários organismos. Em fungos (*Neurospora crassa*), por exemplo, evoluiu um mecanismo molecular que reconhece seqüências repetitivas como sinalizadoras de regiões que devem ser modificadas por metilação e conseqüentemente, silenciadas. Neste caso, este mecanismo pode funcionar como defesa para silenciar DNAs invasores (tais como Elementos Transponíveis) ou silenciar duplicações de genes essenciais que seriam letais na fase sexual destes organismos (Bender, 1998).

Vale a pena investigar se um caminho semelhante não foi seguido por *D. willistoni*, de forma a poder lidar e tirar proveito de elementos transponíveis e usá-

los para garantir a sua plasticidade genômica, que se reflete na sua ampla capacidade de exploração do meio ambiente.

5. 2 Referências Bibliográficas

- Ananiev, E.V., V.E. Barsky, Y.V. Elyin & N.A. Churikov, 1981. Localization of nucleoli in *Drosophila melanogaster* polytene chromosome. *Chromosoma* 81: 619-628.
- Bender, J., 1998. Cytosine methylation of repeated sequences in eukaryotes: the role of DNA pairing. *TIBS* 23: 252-256.
- Cau, A., E. Coluccia, A.M. Deiana, G. Pichiri, R. Rossino, S. Salvadori, & R. Mezzanotte, 1992. Chromosomes and DNA of *Anguilla anguilla*: a study with restriction endonucleases. *Genome* 35: 838-843.
- Cohen, S., K. Yacobi & D. Segal, 2003. Extrachromosomal circular DNA of tandemly repeated genomic sequences in *Drosophila*. *Gen. Res.* 13: 1133-1145.
- Csink, A.K. & S. Henikoff, 1998. Something from nothing: the evolution and utility of satellite repeats. *Trends Genet.* 14: 200-204.
- Dimitri, P., J. Nikolaj & B. Arcà, 2003. Colonization of heterocromatic genes by transposable elements in *Drosophila*. *Mol. Biol. Evol.* 20: 503-512.
- Dobzhansky, Th., 1950. The chromosomes of *Drosophila willistoni*. *J. Hered.* 41: 156-158.
- Dover, G.A., 1994. Concerted evolution, molecular drive and natural selection. *Curr. Biol.* 4: 1165-1166.
- Dowsett, A. & M. Young, 1982. Differing levels of dispersed repetitive DNA among closely related species of *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79: 4570-4574.
- Ellison, J.R. & H.J. Barr, 1972. Quinacrine fluorescence of specific chromosome regions. *Chromosoma* 36: 375-390.
- Ellison, J.R. & H.J. Barr, 1972. Quinacrine fluorescence of specific chromosome regions. *Chromosoma* 36: 375-390.
- Garcia, R.N., 1997. Estudo da organização estrutural dos cromossomos politênicos de *Drosophila willistoni* através de métodos de bandamento. Dissertação de Mestrado. Curso de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular. UFRGS. Porto Alegre, 116 pp.
- Gatti, M. & S. Pimpinelli, 1992. Functional elements in *Drosophila melanogaster* heterochromatin. *Annu. Rev. Genet.* 26: 239-275.

- Grewal, S.I.S. & S.C.R. Elgin, 2002. Heterochromatin: new possibilities for the inheritance of structure. *Curr. Opin Genet. Dev.* 12: 178-187.
- Hendrich, B. & S. Tweedie, 2003. The methyl-CpG binding domain and the evolving role of DNA methylation in animals. *TRENDS Genet.* 19: 269-277.
- Hung, M.S., N. Karthikeyan, B. Huang, H.C. Koo, J. Kinger & J. Shen, 1999. Drosophila proteins related to vertebrate DNA (5-cytosine) methyltransferases. *PNAS* 96(21): 11940-11945.
- Kidwell, M.G. & D. Lisch, 2002. Transposable elements as sources of variation in animals and plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 11428-11433.
- Klein, C.C., 2002. Estudo de fenômenos possivelmente relacionados com a mobilização de elementos transponíveis e à presença de endoparasitas em populações de *Drosophila willistoni*. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, UFRGS, Porto Alegre-RS.
- Kunert, N., J. Marhold, , D. Stach & F. Lyko, 2003. A Dnmt2-like protein mediates DNA methylation in *Drosophila*. *Development* 130: 5083-5090.
- Le, M.H., D. Duricka & G.H. Karpen, 1995. Islands of complex DNA are widespread in *Drosophila* centric heterochromatin. *Genetics* 141: 283-303.
- Lewis, D.L., C.L. Farr, A.L. Farquhar & L.S. Kaguni, 1994. Sequence, organization, and evolution of the A+T region of *Drosophila melanogaster* mitochondrial DNA. *Mol. Biol. Evol.* 11: 523-538.
- Lohe, A.R. & P. A. Roberts, 2000. Evolution of DNA in heterochromatin: the *Drosophila melanogaster* sibling species subgroups as a resource. *Genetica* 109: 125-130.
- Lyko, F., B.H. Ramsahoye & R. Jaenisch, 2000. DNA methylation in *Drosophila melanogaster*. *Nature* 408(30): 538-540.
- Mezzanotte, R., 1978. Differential banding induced in polytene chromosomes of *Drosophila melanogaster* stained with acridine orange. *Experientia* 34: 322-323.
- Mezzanotte, R., 1986. The selective digestion of polytene and mitotic chromosome of *Drosophila melanogaster* by Alul and HaeIII restriction endonucleases. *Chromosoma* 93: 249-255.

- Mezzanotte, R., U. Bianchi & A. Marchi, 1987. In situ digestion of *Drosophila virilis* polytene chromosomes by Alu I and Hae III restriction endonucleases. *Genome* 29: 630-634.
- Pardue, M.L. & P.G. De Baryshe, 2002. Telomeres and Transposable Elements. Chapter 36. In: *Mobile DNA II*, Craig, N.L., R. Craigie, M. Gellert & A.M. Lambowitz, eds. ASM Press, Washington, D.C., 447pp.
- Polanco, C., A. González & G.A. Dover, 2000. Patterns of variation in the intergenic spacers of ribosomal DNA in *Drosophila melanogaster* support a model for genetic exchanges during X-Y pairing. *Genetics* 155: 1221-1229.
- Powell, J.R., R. DeSalle, 1995. *Drosophila* molecular phylogenies and their uses. *Evol. Biol.* 28: 87-138.
- Regner, L.P., M.S.O. Pereira, C.E.V. Alonso, E. Abdelhay, & V.L.S. Valente, 1996. Genomic distribution of P elements in *Drosophila willistoni* and search for their relationship with chromosomal inversions. *J. Hered.* 87(2): 190-211.
- Russo, C.A.M., N. Takezaki & M. Nei, 1995. Molecular phylogeny and divergence times of *Drosophilid* species. *Mol. Biol. Evol.* 12: 391-404.
- Tautz, D., J. Hancock, D. Webb, C. Tautz & G. Dover, 1988. Complete sequences of the rRNA genes of *Drosophila melanogaster*. *Mol. Biol. Evol.* 5: 366-376.
- Tweedie, S., H.H. Ng, A.L. Barlow, B.M. Turner, B. Hendrich & A. Bird, 1999. Vestiges of a methylation system in *Drosophila melanogaster*? *Nat. Genet.* 23: 389-390.
- Tweedie, S., J. Charlton, V. Clarck & A. Bird, 1997. Methylation of genomes and genes at the invertebrate-vertebrate boundary. *Mol. Cell. Biol.* 17: 1469-1475.
- Urieli-Shoval, S., Y. Gruenbaum, J. Sedat & A. Razin, 1982. The absence of detectable methylated bases in *Drosophila melanogaster* DNA. *Febs Lett.* 6(146)(1): 148-152.
- Wallrath, L.L., 1998. Unfolding the mysteries of heterochromatin. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 8: 147-153.
- Yussa, M., C.E.V. Alonso & E. Abdelhay, 1994. Highly polymorphic repetitive sequences in *Rhynchosciara americana* genome. *Insect. Biochem. Molec. Biol.* 25(8): 909 - 914.

APÊNDICES
Normas das Revistas

Guide to Authors

Drosophila Information Service prints short research, technique, and teaching articles, descriptions of new mutations, stock lists, directory information, and other material of general interest to *Drosophila* researchers. The current publication schedule for regular issues is annually, with the official publication date being December. The annual issue will include material submitted during the calendar year. To help us meet this target date, we request that submissions be sent by 15 December, but articles are accepted at any time. A receipt deadline of 31 December is a firm deadline, due to printer submission schedules. Electronic submissions are encouraged, and may be required for lengthy or complex articles.

Manuscripts, orders, and inquiries concerning the regular annual DIS issue should be sent to James Thompson, Department of Zoology, University of Oklahoma, Norman, OK 73019. Telephone (405)-325-4821; email jthompson@ou.edu; FAX (405)-325-7560.

Submission: Articles should be submitted electronically, if possible. Alternatively, we ask that a diskette be included with an article mailed to us. MS Word or Rich Text Formats are preferred. To help minimize editorial costs, proofs will not be sent to authors unless there is some question that needs to be clarified or they are specifically requested by the authors at the time of submission. The editor reserves the right to make minor grammatical and stylistic changes if necessary to conform to DIS format. If the article contains tables, line figures, or black and white half tones, we ask that a printed copy be mailed to us, even if the article is submitted electronically. Sometimes differences in printer format or software releases causes misalignment errors, and a printed copy allows us to recognize these.

Citation of References: Citation should be by name and date in the text of an article (Smith, 1989; Jin and Brown, 1990; Waters *et al.*, 1990). At the end of the article, references should be listed alphabetically by senior author, listing all authors with initials, date, journal, volume and page numbers. Titles will not be included except for books, unpublished theses, and articles in press. An example format is:

Waters, R.L., J.T. Smith, and R.R. Brown 1990, *J. Genet.* 47: 123-134.
Green, R.L., 1998, *Heredity* 121: 430-442.

Stock Lists, Specialized Bibliographies, and Long Technical Articles: Long or complex material can generally not be accepted unless it is submitted electronically or on diskette, with a printed copy for editorial guidance. There is no technical staff for this journal, so all set up is done in person by the editors. We encourage submission of lists and other documentary material to complement presentations in other journals that might have more restrictive space limits or costs. That is, some have published the equivalent of an appendix in DIS, referencing the principal article in another journal. Special justification will, however, be needed for material like bibliographic lists that are now often readily available by other means. Inquiries about formats for this kind of submission are welcomed.

Figures and Tables: Both line drawings and black and white half-tone illustrations will be accepted, but half-tones should be provided in high contrast black and white. We are currently unable to publish figures in color, and color originals seldom make attractive black and white half-tones. Tonal figures can also be submitted electronically, but resolution is often not as clear as when we are able to make professional half-tones from high contrast black and white photographs. All tables are retyped by us to fit a uniform style, and it is critical that all numbers and symbols be clearly arranged and legible.

Journals > Genetica > Author Instructions
Genetica
An International Journal of Genetics and Evolution

Kluwer Academic Publishers request the submission of manuscripts and figures in electronic form in addition to a hard-copy printout. The preferred storage medium for your electronic manuscript is a 3 1/2 inch diskette. Please label your diskette properly, giving the manuscript number, exact details on the name(s) of the file(s), the operating system and software used. Always save your electronic manuscript in the word processor format that you use; conversions to other formats and versions tend to be imperfect. In general, use as few formatting codes as possible. For safety's sake, you should always retain a backup copy of your file(s). After acceptance, please make absolutely sure that you send the latest (i.e., revised) version of your manuscript, both as hard-copy printout and on diskette (submission in electronic form of the final version of your article is compulsory).

Kluwer Academic Publishers prefer articles submitted in word processing packages such as MS Word, WordPerfect, etc. running under operating systems MS DOS, Windows and Apple Macintosh, or in the file format LaTeX. Articles submitted in other software programs can also be accepted.

For submission in LaTeX, Kluwer Academic Publishers have developed a Kluwer LaTeX class file, which can be downloaded from:
<http://www.wkap.nl/authors/jrnstylefiles/>

use of this class file is highly recommended. Do not use versions downloaded from other sites. Technical support is available at: texhelp@wkap.nl. If you are not familiar with TeX/LaTeX, the class file will be of little use to you. In that case, submit your article in a common word processor format.

For the purpose of reviewing, articles for publication should be submitted as hard-copy printout (3-fold) and on diskette to:

Genetica Editorial Office
P.O. Box 990
3300 AZ Dordrecht
The Netherlands

Authors in North and South America should submit manuscripts to:

Editor-in-Chief, R.C. Woodruff
Departments of Biological Sciences
Life Science Building
Bowling Green
State University
Bowling Green, OH 43403
U.S.A.

Manuscript Presentation

The journal's language is English. British English or American English spelling and terminology may be used, but either one should be followed consistently throughout the article. British English (American English) spelling and terminology should be used consistently throughout the article. Manuscripts should be printed or typewritten on A4 or US Letter bond paper, one side only, leaving adequate margins on all sides to allow reviewers' remarks. Please double-space all material, including notes and references. Quotations of more than 40 words should be set off clearly, either by indenting the left-hand margin or by using a smaller typeface. Use double quotation marks for direct quotations and single quotation marks for quotations within quotations and for words or phrases used in a special sense.

Number the pages consecutively with the first page containing:

Title page

The title page should list in order: the title of the manuscript; the authors names and their institutional affiliations with concise addresses; the name, address, telephone and fax numbers, and E-mail address.

Abstract

The abstract should consist of a single paragraph of approximately 200 words which summarizes the subject. References should not be cited in the abstract.

Key words

Please provide 5 to 10 key words or short phrases in alphabetical order.

Abbreviations

Abbreviations and their explanations should be collected in a list.

Text

Four levels of headings should be used in the text. The first level should be bold-faced, freestanding and positioned flush to the left margin. This heading level should be reserved for blocks or text that constitute a major fraction of the article (e.g. Materials and methods). The second level of headings should be italics, freestanding, flush left. This heading level is used to group two or more closely related third-level heads in long-papers. The third level headings is the most frequently used subhead. It is italics, flush left with no white line underneath and is used to initiate the first paragraph of a sub-topic. The fourth level heading is paragraph-initiating italic followed by a colon. Desired location of tables and figures should be indicated in the margins.

Text citations with three or fewer authors should include all names while those with four or more authors should cite the first author and et al. Only articles that are published or in press should be cited. Citations of personal communications or unpublished results should list all names and initials. Numbers of ten or less should be written in full unless part of a date, a fraction or decimal, a percent or a unit of measurement.

Taxonomic names

Taxonomic names of genera and lower taxa should be italicized. Authors are requested to mention the authorities of any taxa named in the articles.

Figures and Tables

Submission of electronic figures

In addition to hard-copy printouts of figures, authors are requested to supply the electronic versions of figures in either Encapsulated PostScript (EPS) or TIFF format. Many other formats, e.g., Microsoft Postscript, PiCT (Macintosh) and WMF (Windows), cannot be used and the hard copy will be scanned instead.

Figures should be saved in separate files without their captions, which should be included with the text of the article. Files should be named according to DOS conventions, e.g., 'figure1.eps'. For vector graphics, EPS is the preferred format. Lines should not be thinner than 0.25pts and in-fill patterns and screens should have a density of at least 10%. Font-related problems can be avoided by using standard fonts such as Times Roman and Helvetica. For bitmapped graphics, TIFF is the preferred format but EPS is also acceptable. The following resolutions are optimal: black-and-white line figures - 600 - 1200 dpi; line figures with some grey or coloured lines - 600 dpi; photographs - 300 dpi; screen dumps - leave as is. Higher resolutions will not improve output quality but will only increase file size, which may cause problems with printing; lower resolutions may compromise output quality. Please try to provide artwork that approximately fits within the typeset area of the journal. Especially screened originals, i.e., originals with grey areas, may suffer badly from reduction by more than 10-15%.

Avoiding problems with EPS graphics

Please always check whether the figures print correctly to a PostScript printer. If they do not, simplify your figures or use a different graphics program.

If EPS export does not produce acceptable output, try to create an EPS file with the printer driver (see below). This option is unavailable with the Microsoft driver for Windows NT, so if you run Windows NT, get the Adobe driver from the Adobe site (www.adobe.com).

If EPS export is not an option, e.g., because you rely on OLE and cannot create separate files for your graphics, it may help us if you simply provide a PostScript dump of the entire document.

How to set up for EPS and PostScript dumps under Windows

Create a printer entry specifically for this purpose: install the printer 'Apple Laserwriter Plus' and specify 'FILE': as printer port. Each time you send something to the 'printer' you will be asked for a filename. This file will be the EPS file or PostScript dump that we can use.

The EPS export option can be found under the PostScript tab. EPS export should be used only for single-page documents. For printing a document of several pages, select 'Optimise for portability' instead. The option 'Download header with each job' should be checked.

Submission of hard-copy figures

If no electronic versions of figures are available, submit only high-quality artwork that can be reproduced as is, i.e., without any part having to be redrawn or re-typeset. The letter size of any text in the figures must be large enough to allow for reduction. Photographs should be in black-and-white on glossy paper. If a figure contains colour, make absolutely clear whether it should be printed in black-and-white or in colour. Figures that are to be printed in black-and-white should not be submitted in colour. Authors will be charged for reproducing figures in colour.

Each figure and table should be numbered and mentioned in the text. The approximate position of figures and tables should be indicated in the margin of the manuscript. On the reverse side of each figure, the name of the (first) author and the figure number should be written in pencil; the top of the figure should be clearly indicated. Figures and tables should be placed at the end of the manuscript following the Reference section. Each figure and table should be accompanied by an explanatory legend. The figure legends should be grouped and placed on a separate page. Figures are not returned to the author unless specifically requested.

In tables, footnotes are preferable to long explanatory material in either the heading or body of the table. Such explanatory footnotes, identified by superscript letters, should be placed immediately below the table.

Appendices

This section should be reserved for large bodies of data or mathematical derivations that would disrupt the main text.

Cross-Referencing

In the text, a reference identified by means of an author's name should be followed by the date of the reference in parentheses and page number(s) where appropriate. When there are more than two authors, only the first author's name should be mentioned, followed by 'et al.'. In the event that an author cited has had two or more works published during the same year, the reference, both in the text and in the reference list, should be identified by a lower case letter like 'a' and 'b' after the date to distinguish the works.

Examples:

Winograd (1986, p. 204)

(Winograd, 1986a, b)

(Winograd, 1986; Flores et al., 1988)

(Bullen, Beauchamp & Bennett, 1990)

Acknowledgements

Acknowledgements of people, grants, funds, etc. should be placed in a separate section before the References.

References

References to books, journal articles, articles in collections and conference or workshop proceedings, and technical reports should be listed at the end of the article in alphabetical order (see examples below). Articles in preparation or articles submitted for publication, unpublished observations, personal communications, etc. should not be included in the reference list but should only be mentioned in the article text (e.g., T. Moore, personal communication).

References to books should include the author's name; year of publication; title; page numbers where appropriate; publisher; place of publication, in the order given in the example below.

Green, M.M., 1988. Mobile DNA elements and spontaneous gene mutation, pp. 41-50 in *Eukaryotic Transposable Elements as Mutagenic Agents*, edited by M.E. Lambert, J.F. McDonald and I.B. Weinstein. Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N.Y.

References to articles in periodicals should include the author's name; year of publication; abbreviated title of periodical; volume number (issue number where appropriate); first and last page numbers, in the order given in the example below. All abbreviations of titles of journals should be in accordance with the World List of Scientific Periodicals.

Zhou, J.H., A. Myers & A. Atherly, 1991. Functional analysis of terminal sequences of the maize controlling element (Ac) by internal replacement and deletion mutagenesis. *Genetica* 80: 1-17.

Proofs

Proofs will be sent to the corresponding author by e-mail (if no e-mail address is available or appears to be out of order, proofs will be sent by regular mail).

Your response, with or without corrections, should be sent within 72 hours. Please do not make any changes to the PDF file. Minor corrections (+/- 10) should be sent as an e-mail attachment to: proofscorrection@wkap.nl. Always quote the four-letter journal code and article number and the PIPS No. from your proof in the subject field of your e-mail. Extensive corrections must be clearly marked on a printout of the PDF file and should be sent by first-class mail (airmail overseas).

Offprints

50 offprints of each article will be provided free of charge. Additional offprints (both hard copies and PDF files) can be ordered by means of an offprint order form supplied with the proofs.

Page Charges and Colour Figures

No page charges are levied on authors or their institutions. Colour plates will be inserted only at the author's expense.

Copyright

Authors will be asked, upon acceptance of an article, to transfer copyright of the article to the Publisher. This will ensure the widest possible dissemination of information under copyright laws.

Permissions

It is the responsibility of the author to obtain written permission for a quotation from unpublished material, or for all quotations in excess of 250 words in one extract or 500 words in total from any work still in copyright, and for the reprinting of figures, tables or poems from unpublished or copyrighted material.

Copyright © 2001, Kluwer Academic Publishers. All rights reserved.

[Subscription Info](#) [Customer Service](#) [Sales Kit](#) [Kluwer Alert](#) [Feedback](#) [Help](#)
[Copyright](#) [Terms and Conditions](#) [Privacy Policy](#)

©2004 Kluwer. All rights reserved.