

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Expressão de elementos transponíveis em *Drosophila willistoni*

Monica Laner Blauth

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação
em Genética e Biologia Molecular da UFRGS
como requisito parcial para a obtenção do grau
de Doutor em Ciências

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Vera Lúcia da Silva Valente Gaiety

Porto Alegre
Abril de 2005

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Drosophila do Departamento de Genética da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), sendo financiado pela Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e pela Fundação de Amparo à Pesquisa de Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS).

Dedico este trabalho ao professor Dr. Élgion Loreto.
Pela paixão pelas drosófilas e pela Biologia
Molecular, que adquiri trabalhando com você. Do
seu incentivo nasceu este trabalho.

Ao Marco, por seu amor e companheirismo, que tornou tudo mais bonito, alegre e divertido.

Agradecimentos

- À Vera, pela confiança neste trabalho e por ter permitido que eu fizesse parte deste maravilhoso grupo de pesquisadores. A produtividade do laboratório está certamente relacionada à sua imensa capacidade de lidar com toda esta diversidade.

- Ao Élgion Loreto, por todas as sugestões de trabalho e incentivo.

- À prof. Dra Eliana Abdelhay e Rafaela Vieira Bruno, pelo estágio no Laboratório de Biologia Molecular Maury Miranda. Obrigada por terem feito eu perder o “medo do RNA”.

- Aos funcionários do Laboratório de *Drosophila*: Berê, Marcelo, Dani, Helena e D. Jane.

- Aos laboratórios de apoio I (obrigada Andrés pelas dicas e empréstimos) e II (obrigada Val pelo Halocarbon oil, centrífuga refrigerada, microscópio), sem vocês o trabalho seria inviável.

- Aos meus colegas de laboratório: Ana Cristina I e II, Adri, Adriana, André, Chirlei, Cláudia, Daniel, Fabiana, Fabiano, Grazia, Hermes, Jonas, July, Lizandra, Luis, Marco (que é o meu melhor colega de laboratório, também), Marícia, Maríndia, Marisa, Norma, Rodolfo, Ronaldo, Rosane, Sabrina e Tiago, pelo ótimo ambiente de trabalho.

- Ao Fabiano, meu “putative” padrinho de casamento (“putative” porque, como àquelas bandas, é necessária uma confirmação), companheiro de organização e faxina do laboratório. Simplesmente porque eu te gosto!

- À Cláudia, Marisa, Rosane e Fabiana pela inspiração pelo trabalho.

- À Adri, minha companheira de bom gosto; à Mary, por incrementar meu vocabulário de palavrões e ditados; ao André pela Björk, P-5, Jamiroquai e aulas de francês.

- À Liz e Maríndia, pela disponibilidade de ajudar. E principalmente pela paciência em me ouvir em uma hora difícil.

- Aos meus inquilinos temporários: Hermes, Jonas, Sabrina, Fabrício e July, pelos jogos, filmes, pizza e churrasco.

- À Jaqueline, pela sua torcida, desde a faculdade, pelo meu sucesso.

- Ao Rodrigo, por eu saber que ele está sempre bem próximo. Obrigada por permitir que transformasse “nossa” casa em “minha” casa. O orgulho que sentes por mim é o mesmo que sinto por ti.

- Especialmente aos meus pais Pedro e Luci. Apesar da dedicatória do trabalho não ter sido para vocês, há a dedicatória de uma vida inteira porque não apenas este trabalho é resultado do que vocês me proporcionaram. A vocês, eu devo todos os trabalhos realizados, a vontade de estudar, o gosto pelos livros, por música, filmes, perfumes e coisas antigas. O que sou é reflexo de vocês. Se tenho paz e tranqüilidade é devido à presença de vocês em tudo.

- Ao Marco, que não apenas decidiu estar do meu lado durante este trabalho, o qual ele sempre soube ser muito importante para mim, como também ter decidido estar presente em todos os outros trabalhos da minha vida. Obrigada por ter me mostrado que é possível viver com alguém (coisa que eu não sabia antes de te conhecer). Obrigada por me fazer falta e não desaparecer. Por me dar o seu dia-dia... Amo você.

Sumário

| | |
|---|-----------|
| Abreviaturas, Símbolos e Unidades | 10 |
| Lista de Figuras | 12 |
| Lista de Tabelas | 16 |
| Resumo | 17 |
| Abstract | 19 |
| 1 Introdução | 21 |
| 1.1 Elementos transponíveis | 21 |
| 1.2 Padrão tecido-espacial de expressão de TEs durante o desenvolvimento de <i>Drosophila</i> | 29 |
| 1.3 Mobilização de TEs | 33 |
| 1.4 Regulação dos TEs | 38 |
| 1.5 O elemento <i>P</i> | 42 |
| 1.6 Elementos transponíveis em <i>D. willistoni</i> | 52 |
| 2 Objetivos | 55 |
| 3 Material e Métodos | 56 |
| 3.1 Populações de <i>Drosophila</i> e condições de cultivo | 56 |
| 3.1.1 Meio de cultura para moscas | 57 |
| 3.1.2 Meio de ovoposição | 57 |
| 3.2 Obtenção de DNA genômico de <i>Drosophila</i> | 58 |
| 3.3 Obtenção de RNA de adultos e embriões de <i>Drosophila</i> | 59 |
| 3.4 Síntese de cDNA | 60 |
| 3.5 Reação de Polimerização em Cadeia (PCR) | 61 |
| 3.5.1 PCR de DNA genômico | 61 |
| 3.5.1.1 Controle da qualidade do DNA genômico | 61 |
| 3.5.1.2 Estudo da presença de <i>gypsy</i> em linhagens de <i>D. willistoni</i> | 64 |
| 3.5.1.3 Estudo da presença de <i>412</i> em linhagens de <i>D. willistoni</i> | 64 |
| 3.5.1.4 Número de cópias do elemento <i>P</i> no genoma | 65 |
| 3.5.2 PCR de cDNA | 65 |

| | | |
|----------|---|-----------|
| 3.5.2.1 | Expressão de <i>actina</i> em linhagens de <i>D. willistoni</i> | 65 |
| 3.5.2.2 | Expressão de <i>P</i> em linhagens de <i>D. willistoni</i> | 68 |
| 3.5.2.3 | Expressão de <i>hobo</i> em linhagens de <i>D. willistoni</i> | 70 |
| 3.5.2.4 | Expressão de <i>gypsy</i> em linhagens de <i>D. willistoni</i> | 71 |
| 3.5.2.5 | Expressão de <i>412</i> em linhagens de <i>D. willistoni</i> | 71 |
| 3.6 | <i>Southern blot</i> | 71 |
| 3.6.1 | Eletroforese e preparo da membrana | 71 |
| 3.6.2 | Preparação da sonda | 72 |
| 3.6.3 | Hibridação | 73 |
| 3.7 | Hibridação <i>in situ</i> de embriões inteiros | 73 |
| 3.7.1 | Preparação dos embriões | 73 |
| 3.7.2 | Hibridação <i>in situ</i> de embriões inteiros | 74 |
| 3.7.3 | Preparação das sondas | 76 |
| 3.7.3.1 | Sonda do elemento <i>P</i> | 76 |
| 3.7.3.2 | Sonda do elemento <i>412</i> | 79 |
| 3.7.3.3 | Sonda do elemento <i>hobo</i> | 81 |
| 3.8 | Transformação bacteriana | 83 |
| 3.9 | Extração de DNA plasmidial | 84 |
| 3.10 | Clivagem por endonuclease de restrição | 85 |
| 3.11 | Eletroforese horizontal | 85 |
| 3.12 | Purificação de DNA | 87 |
| 3.13 | Seqüenciamento | 87 |
| 3.14 | Análise das seqüências | 88 |
| 4 | Resultados | 90 |
| 4.1 | Expressão de TEs em linhagens de <i>D. willistoni</i> | 90 |
| 4.1.1 | Expressão do elemento <i>P</i> em linhagens de <i>D. willistoni</i> | 90 |
| 4.1.2 | Expressão do transposon <i>hobo</i> em linhagens de <i>D. willistoni</i> | 98 |
| 4.1.3 | Expressão do retroelemento <i>gypsy</i> em linhagens de <i>D. willistoni</i> | 100 |
| 4.1.4 | Expressão do retroelemento <i>412</i> em linhagens de <i>D. willistoni</i> | 102 |
| 4.2 | Expressão de <i>P</i> durante o desenvolvimento embrionário de <i>D. willistoni</i> | 104 |

| | |
|---|------------|
| 4.2.1 Padrão de expressão tecido-temporal de <i>P</i> durante o desenvolvimento embrionário de <i>D. willistoni</i> | 104 |
| 4.2.2 Detecção dos transcritos de <i>P</i> em <i>D. willistoni</i> e <i>D. melanogaster</i> | 116 |
| 4.3 Expressão dos elementos <i>412</i> e <i>hobo</i> durante o desenvolvimento embriogênico de <i>Drosophila</i> | 129 |
| 5 Discussão | 140 |
| 6 Conclusões | 153 |
| 7 Perspectivas | 154 |
| 8 Bibliografia | 156 |
| Anexos | 172 |
| Anexo 1: Alinhamentos de seqüências dos transcritos do elemento <i>P</i> obtidos no trabalho | |
| Anexo 2: Artigo a ser submetido para publicação na revista <i>Genetics</i> | |

Abreviaturas, Símbolos e Unidades

| | |
|---------|---|
| µg | micrograma |
| µL | microlitro |
| aa | aminoácido(s) |
| cDNA | DNA complementar |
| DEPC | dietilpirocarbonato |
| Dig-UTP | uridina trifosfato incorporada com digoxigenina |
| DNA | ácido desoxirribonucléico |
| DNase | desoxirribonuclease |
| dNTP | desoxirribonucleotídeo 5'-trifosfato |
| EDTA | ácido etilenodiaminotetracético |
| EGTA | ácido etilenoglicoltetracético |
| g | gramas |
| h | hora(s) |
| hnRNP | ribonucleoproteína |
| ITR | repetições terminais invertidas |
| kb | quilobase |
| kDa | quilodalton |
| LINE | <i>Long Interspersed Nuclear Elements</i> |
| LTR | Longas repetições terminais |
| M | molar |
| min | minuto(s) |
| mL | mililitro |
| mM | milimolar |
| mRNA | RNA mensageiro |
| MITES | <i>Miniature Inverted-repeat TE</i> |
| N | normal |
| ng | nanogramas |
| nt | nucleotídeo |
| O/N | durante a noite |
| ORF | módulo aberto de leitura |

| | |
|----------------|--|
| p/v | partes por volume |
| pb | pares de base |
| PCR | reação de polimerização em cadeia |
| RIP | mutação pontual induzida por repetição |
| RNA | ácido ribonucléico |
| RNase | ribonuclease |
| rpm | rotações por minuto |
| RT-PCR | PCR com transcriptase reversa |
| SDS | dodecilsulfato de sódio |
| seg | segundo(s) |
| SI | Seqüências de Inserção |
| SINE | <i>Short Interspersed Nuclear Elements</i> |
| snRNP | ribonucleoproteína nuclear pequena |
| TE(s) | Elemento(s) Transponível(s) |
| T _m | temperatura de anelamento |
| U | unidade |
| UTR | região não-traduzida |
| V/cm | Volts/centímetro |

Lista de Figuras

| | | |
|------------|--|-----------|
| Figura 1.1 | Representação do elemento <i>P</i> canônico e dos transcritos da transposase e repressor de 66 kDa_____ | 43 |
| Figura 3.1 | Meio de ovoposição_____ | 58 |
| Figura 3.2 | Representação dos transposons <i>hobo</i> (A), <i>gypsy</i> (B) e <i>412</i> (C) mostrando a posição do anelamento dos iniciadores usados nas PCRs e o tamanho da seqüência amplificada_____ | 67 |
| Figura 3.3 | Representação do elemento <i>P</i> de <i>D. melanogaster</i> (código de acesso ao GenBank X06779), mostrando a posição do anelamento dos iniciadores usados nas PCRs de cDNA e os possíveis fragmentos amplificados_____ | 69 |
| Figura 3.4 | Esquema de subclonagem de fragmento do elemento <i>P</i> _____ | 78 |
| Figura 3.5 | Esquema do plasmídeo pP18, após ser linearizado com as enzimas <i>HindIII</i> (A) e <i>EcoRI</i> (B), e a orientação e tamanho das sondas produzidas a partir dos promotores T7 (A) e SP6 (B)_____ | 78 |
| Figura 3.6 | Clonagem de fragmento amplificado do TE <i>412</i> _____ | 80 |
| Figura 3.7 | Esquema do plasmídeo p412TOPO, após ser linearizado com as enzimas <i>PstI</i> (A) e <i>NotI</i> (B), e a orientação e o tamanho das sondas produzidas a partir das seqüências promotoras T7 (A) e T3(B)_____ | 80 |
| Figura 3.8 | Esquema de subclonagem de fragmento do elemento <i>hobo</i> _____ | 82 |
| Figura 3.9 | Esquema do plasmídeo pH19, após ser linearizado com as enzimas <i>KpnI</i> (A) e <i>HindIII</i> (B), e a orientação e tamanho das sondas produzidas a partir das seqüências promotoras T7 (A) e SP6 (B)_____ | 82 |
| Figura 4.1 | Produtos de amplificação de cDNA de linhagens de <i>D. willistoni</i> a partir dos iniciadores meli2+ e meli3- _____ | 91 |
| Figura 4.2 | Produtos de amplificação de cDNA de linhagens de <i>D. willistoni</i> a partir dos iniciadores meli2+ e mele3-_____ | 92 |
| Figura 4.3 | Produtos de amplificação de cDNA de linhagens de <i>D. willistoni</i> a partir dos iniciadores meli1+ e meli3-_____ | 94 |

| | | |
|-------------|---|------------|
| Figura 4.4 | <i>Southern blot</i> de produto de PCR de cDNA com os iniciadores meli1+ e mele3-_____ | 95 |
| Figura 4.5 | Produtos de amplificação de DNA genômico de linhagens de <i>D. willistoni</i> a partir dos iniciadores das ITRs (anelamento à 55°C)___ | 96 |
| Figura 4.6 | Produtos de amplificação de DNA genômico de linhagens de <i>D. willistoni</i> a partir dos iniciadores das ITRs (anelamento à 58°C)___ | 97 |
| Figura 4.7 | <i>Southern blot</i> de produto de PCR de cDNA a partir dos iniciadores P651 e P1597 (externos)_____ | 99 |
| Figura 4.8 | <i>Southern blot</i> , usando seqüência de <i>hobo</i> de <i>D. paulistorum</i> , de produto de PCR de cDNA a partir dos iniciadores P651 e P1597 (externos)_____ | 99 |
| Figura 4.9 | Produto de amplificação de DNA genômico de linhagens de <i>D. willistoni</i> a partir dos iniciadores GYP3S2 e GYP3AS2_____ | 100 |
| Figura 4.10 | <i>Southern blot</i> de produto de PCR de cDNA realizado com os iniciadores GYP3S2 e GYP3AS2_____ | 101 |
| Figura 4.11 | Produto de amplificação de DNA genômico de linhagens de <i>D. willistoni</i> a partir dos iniciadores 412RTS e 412RTAS _____ | 103 |
| Figura 4.12 | <i>Southern blot</i> de produto de PCR de DNA genômico a partir dos iniciadores 412RTS e 412RTAS_____ | 103 |
| Figura 4.13 | Produtos de amplificação de cDNA de linhagens de <i>D. willistoni</i> a partir dos iniciadores 412RTS e 412RTAS_____ | 104 |
| Figura 4.14 | Expressão de <i>P</i> durante o desenvolvimento embrionário de <i>D. willistoni</i> e <i>D. melanogaster</i> _____ | 105 |
| Figura 4.15 | Expressão do elemento <i>P</i> em embriões de <i>D. melanogaster</i> e <i>D. willistoni</i> , durante estágio de Blastoderme Sincicial_____ | 107 |
| Figura 4.16 | Expressão do elemento <i>P</i> em embriões de <i>D. melanogaster</i> e <i>D. willistoni</i> durante estágio de Blastoderme Celular_____ | 107 |
| Figura 4.17 | Expressão do elemento <i>P</i> em embriões de <i>D. melanogaster</i> e <i>D. willistoni</i> durante estágio de Gástrula_____ | 108 |
| Figura 4.18 | Expressão do elemento <i>P</i> em embriões de <i>D. melanogaster</i> e <i>D. willistoni</i> durante estágio de Extensão da Banda Germinal_____ | 109 |

| | | |
|-------------|--|------------|
| Figura 4.19 | Expressão do elemento <i>P</i> em embriões de <i>Drosophila</i> durante estágio de Retração da Banda Germinal_____ | 109 |
| Figura 4.20 | Expressão do elemento <i>P</i> em embriões de <i>D. melanogaster</i> e <i>D. willistoni</i> durante estágio de Fechamento Dorsal (A) e Involução da Cabeça (B)_____ | 110 |
| Figura 4.21 | Seqüência 5' do elemento <i>P</i> mostrando os potenciais sítios de ligação a fatores de transcrição_____ | 113 |
| Figura 4.22 | Seqüência 3' invertida do elemento <i>P</i> mostrando os potenciais sítios de ligação a fatores de transcrição_____ | 114 |
| Figura 4.23 | Produtos de amplificação de cDNA de embriões de 1h das linhagens 17A2 e Ore_____ | 116 |
| Figura 4.24 | Expressão de <i>P</i> em embriões de <i>D. melanogaster</i> (Ore) e <i>D. willistoni</i> (17A2 e Wip)_____ | 117 |
| Figura 4.25 | Esquema de seqüenciamento dos fragmentos obtidos na amplificação de cDNA dos embriões das linhagens de <i>D. melanogaster</i> (Ore), e <i>D. willistoni</i> (17A2 e Wip) com os iniciadores meli2+ e meli3-_____ | 118 |
| Figura 4.26 | Esquema mostrando a posição de identidade da seqüência Mi2i33, 17i2i33 e Wi2i33 com a seqüência de <i>P</i> canônico_____ | 119 |
| Figura 4.27 | Esquema de seqüenciamento dos fragmentos obtidos na amplificação de cDNA dos embriões das linhagens de <i>D. melanogaster</i> (Ore), e <i>D. willistoni</i> (17A2 e Wip) com os iniciadores meli2+ e mele3-_____ | 122 |
| Figura 4.28 | Esquema de seqüenciamento dos fragmentos obtidos na amplificação de cDNA dos embriões das linhagens de <i>D. melanogaster</i> (Ore), e <i>D. willistoni</i> (17A2 e Wip) com os iniciadores meli1+ e meli3-_____ | 123 |
| Figura 4.29 | Esquema de seqüenciamento dos fragmentos obtidos na amplificação de cDNA dos embriões das linhagens de <i>D. melanogaster</i> (Ore), e <i>D. willistoni</i> (17A2 e Wip) com os iniciadores meli1+ e mele3-_____ | 124 |

| | | |
|-------------|--|------------|
| Figura 4.30 | <i>Southern blot</i> de produto de PCR de cDNA realizado com os iniciadores meli1+ e mele3-_____ | 127 |
| Figura 4.31 | <i>Southern blot</i> de produto de PCR de cDNA realizado com os iniciadores meli1+ e mele3-_____ | 129 |
| Figura 4.32 | Padrão de expressão do retroelemento <i>412</i> em embriões de <i>D. melanogaster</i> , linhagem Ore, nos estágios de Extensão (A e B) e Retração da Banda Germinal (C e D)_____ | 131 |
| Figura 4.33 | Seqüência da LTR 5' de <i>412</i> mostrando os potenciais sítios de ligação a fatores de transcrição_____ | 132 |
| Figura 4.34 | Seqüência LTR 3' invertida de <i>412</i> mostrando os potenciais sítios de ligação a fatores de transcrição_____ | 136 |
| Figura 4.35 | Padrão de expressão do retroelemento <i>412</i> em embriões de <i>D. willistoni</i> , linhagem 17A2, no estágio de Retração da Banda Germinal_____ | 137 |
| Figura 4.36 | Padrão de expressão do transposon <i>hobo</i> em embriões de <i>D. melanogaster</i> , linhagem Ore, no estágio de Retração da Banda Germinal_____ | 138 |

Lista de Tabelas

| | | |
|------------|---|----|
| Tabela 3.1 | Linhagens de <i>D. willistoni</i> usadas no estudo_____ | 56 |
| Tabela 3.2 | Oligonucleotídeos usados nas PCRs_____ | 62 |
| Tabela 3.3 | Programas de PCR usados_____ | 63 |
| Tabela 3.4 | Sondas usadas nos experimentos de <i>Southern blot</i> _____ | 73 |
| Tabela 3.5 | Linhagem bacteriana_____ | 83 |
| Tabela 3.6 | Vetores de clonagem utilizados_____ | 83 |
| Tabela 3.7 | Seqüências de produtos de PCR com iniciadores de <i>P</i> _____ | 88 |

Resumo

Estudos realizados no Laboratório de *Drosophila* da UFRGS tem caracterizado linhagens de *Drosophila willistoni* quanto à presença de Elementos Transponíveis (TEs) e à existência do fenômeno de Disgenesia Híbrida nesta espécie. Como consequência destes estudos, o presente trabalho se propôs a ampliar o conhecimento sobre o papel destes elementos na geração de variabilidade nesta espécie e abordou os TEs *P*, *hobo*, *gypsy* e *412*, anteriormente identificados no genoma de *D. willistoni*, quanto à sua atividade transcricional.

Em nosso trabalho, verificamos a presença de transcritos de *P*, *gypsy* e *412* em adultos, sugerindo uma regulação pós-transcricional destes elementos, como já sugerido para o elemento *P*, considerando que as linhagens utilizadas não se caracterizam pela hipermutabilidade.

Devido à descrição prévia da Síndrome da Disgenesia do Híbrido na prole do cruzamento entre as linhagens 17A2 e Wip de *D. willistoni*, foi estabelecido o padrão de expressão do elemento *P* durante o desenvolvimento embrionário das duas linhagens. O padrão de expressão embrionário em *D. melanogaster* também foi estabelecido, para fins comparativos, uma vez que se aceita a ocorrência de um evento de transferência horizontal de *P* de *D. willistoni* para *D. melanogaster*. A similaridade entre os padrões de expressão nas duas espécies, sugere que o elemento *P* é regulado pelo seu próprio promotor e que não é dependente de promotores de genes vizinhos aos seus sítios de inserção.

Foi estabelecida a presença de transcritos potenciais da transposase e de um repressor da transposição de *P* nos embriões analisados. Além do transcrito correspondente ao repressor, que é gerado por processamento alternativo do transcrito da transposase, obteve-se indícios da presença de transcritos anti-senso do próprio elemento nos embriões, sugerindo a regulação por interferência de RNA (RNAi) neste estágio do desenvolvimento de *Drosophila*.

Diferenças transcricionais do elemento *P* entre *D. willistoni* e *D. melanogaster*, estão relacionadas ao número de transcritos deletados de *P* que são expressos em maior número em *D. melanogaster* do que em *D. willistoni*, corroborando a idéia da invasão recente do genoma da primeira por este elemento.

A expressão dos TEs descrita neste trabalho relata a regulação complexa destes elementos, evidenciando a importância da continuidade deste estudo.

Abstract

Studies accomplished in the Laboratory of *Drosophila* of UFRGS have been characterizing strains of *Drosophila willistoni* in respect to the presence of Transposable Elements (TEs) and to the occurrence of the Hybrid Dysgenesis phenomenon in this species. As a consequence of these studies, the present work aimed to broaden the knowledge about the role of these elements in the genesis of variability in this species, by approaching the transcriptional expression of *P*, *hobo*, *gypsy* and *412* TEs, already described in the *D. willistoni* genome.

In our work, we verified the presence of *P*, *gypsy*, and *412* transcripts in adults, suggesting post-transcriptional regulation, like already described for *P* element in *D. melanogaster*, considering that the strains studied were not characterized by hypermutability.

Due to the previous description of the Hybrid Dysgenesis Syndrome in the offspring resulting of crosses between 17A2 and Wip *D. willistoni* strains, their *P* element expression pattern during the embryonic development was established. The embryonic *P* element expression pattern in *D. melanogaster* was also established, for comparative purpose, since the occurrence of a horizontal transfer event of this element from *D. willistoni* to *D. melanogaster* is accepted. The similarity among these expression patterns in both species suggests that *P* element is regulated by its own promoter and that it's not dependent of the insertion sites neighboring genes promoters.

The presence of putative *P* element transcripts of transposase and of the transposase repressor was established in the analyzed embryos. Besides the

transposase repressor transcript, that is result of an alternative splicing of the transposase transcript, it was obtained indication of the presence of antisense transcripts of *P* element in the embryos, suggesting the regulation by RNA interference (RNAi) in this stage of development of *Drosophila*.

Transcriptional differences of the *P* element between *D. willistoni* and *D. melanogaster*, are related to the number of deleted transcripts of *P* that are expressed in larger number in *D. melanogaster* than in *D. willistoni*, corroborating the idea of the recent invasion of the genome of the first species by this element.

The expression of TEs described in this work suggests a complex regulation of these elements, evidencing the importance of the continuity of this study.

1 Introdução

1.1 Elementos transponíveis

Elementos transponíveis (TEs) são seqüências de DNA que apresentam a habilidade de mudar de posição no genoma de procariotos e eucariotos (Hartl *et al.*, 1992; Kidwell e Lisch, 2000). Foram descobertos por Barbara McClintock nos anos 40 que os chamou de “elementos controladores” devido à sua capacidade de regular a expressão gênica (McClintock, 1956; McClintock, 1984).

Os TEs eucarióticos são divididos em três classes, elementos da classe I, elementos da classe II e elementos da classe III, correspondentes à sua organização e ao seu modo de transposição:

(1) Os **retroelementos**, ou elementos da classe I, se transpõem via molécula de RNA. O RNA codifica as enzimas responsáveis pela transposição ao mesmo tempo em que é usado como molde para a síntese da fita de DNA que é inserida no genoma. A síntese do DNA, a partir de um RNA molde, é feita pela transcriptase reversa, que é a enzima que caracteriza toda esta classe. São exemplos destes elementos em *Drosophila*: *gypsy*, *copia*, *I*, *F*, *G*, *412* e *Doc*. Bushman (2002) subdivide esta classe em nove categorias:

(1.1) **Retrovírus** são seqüências com capacidade de codificar os genes *gag*, *pol* e *env*, similares aos vírus. O gene *pol* codifica para uma poliproteína constituída da enzima transcriptase reversa, da RNase H e de uma integrase. Os genes *env* e *gag* codificam para uma proteína de envelope e para a principal proteína do capsídeo, respectivamente. O envelope viral é responsável pela infectividade.

(1.2) Os **pararetrovírus** são similares aos retrovírus, capazes de replicar via transcriptase reversa, mas perderam a capacidade de integração no genoma via integrase.

(1.3) Os **retrotransposons com LTRs** são similares aos retrovírus mas não codificam para as proteínas do capsídeo viral. Assim como os retrovírus, possuem seqüências *long terminal repeats* (LTRs), que selecionam o sítio alvo de inserção do retroelemento e contém regiões regulatória (promotores ou reforçadores) e sinal de

poliadenilação. São formados por duas grandes famílias: Ty1/ *copia* e Ty3/*gypsy*.

- (1.4) Pela ausência das LTRs, os **retrotransposons sem LTRs** possuem características de transposição diferentes dos retrotransposons com LTRs. Esses, perderam a capacidade de iniciar a transcrição reversa e por isso usam extremidades 3' geradas em quebras cromossômicas no hospedeiro como iniciadores. Os *long interspersed nuclear elements* (LINES) são um dos exemplos deste tipo de retrotransposon.
- (1.5) Os **retrotranscritos** não codificam a transcriptase reversa, usando para sua transposição, possivelmente, enzimas fornecidas *in trans* por outros elementos. Incluem os *short interspersed nuclear elements* (SINES) e as seqüências *Alu* de humanos.
- (1.6) Os **retrons** são moléculas híbridas de RNA e DNA encontradas em bactérias cuja funcionabilidade é ainda desconhecida.
- (1.7) Os **retroíntrons** são seqüências com capacidade de codificar a transcriptase reversa mas que, como um íntron, são eficientemente excisados dos genes. Até então, foram encontrados em bactérias, fungos e plantas.
- (1.8) Os **retroplasmídeos** são seqüências do DNA mitocondrial que codificam a transcriptase reversa e possivelmente se replicam por

um intermediário de RNA. Foram encontrados em eucariotos inferiores.

(1.9) As **telomerasas** são enzimas da maioria dos eucariotos que sintetizam seqüências de DNA, a partir de pequenos RNAs, nas extremidades dos cromossomos.

(2) Os **transposons**, ou elementos da classe II, se transpõem via molécula de DNA, sendo os elementos *P*, *hobo*, *FB* e *mariner* exemplos destes TEs em *Drosophila* (Kidwell e Lisch, 2000). Eles contêm em suas extremidades repetições terminais invertidas (ITRs). Li (1997), considera as Seqüências de Inserção (SIs), como uma classe separada. Estas são menores e mais simples do que os transposons, apresentando apenas a seqüência codificante necessária para a sua transposição. As Seqüências de Inserção são comuns em bactérias, bacteriófagos e plasmídeos. Os transposons, segundo Li (1997), apresentam seqüências adicionais às necessárias à transposição como, por exemplo, genes de resistência a antibióticos.

(3) Os MITEs, *Miniature Inverted-repeat TE*, são abundantes e pequenos (100-400 pb) (Wessler *et al.*, 1995). Possuem propriedades de elementos da classe I e classe II mas seu mecanismo de transposição, assim como sua capacidade codificadora, ainda não foram esclarecidas.

A filogenia dos TEs, conhecida até então, leva à proposição de dois mecanismos de transmissão (Montchamp-Moreau *et al.*, 1993). O primeiro é a **transferência vertical**, que ocorre de uma espécie ancestral para a sua derivada, que se separam por processos de especiação. O segundo é a **transferência horizontal**, sugerida pela incongruência entre a filogenia das espécies hospedeiras e a filogenia dos TEs. Ela ocorre entre espécies isoladas reprodutivamente através de um vetor exógeno (Houck *et al.*, 1991; Daniels *et al.*, 1990). Houck *et al.* (1991) sugeriram a espécie de ácaro *Proctolaelaps regalis* como um vetor potencial na transmissão de TEs entre espécies de *Drosophila* pois é um parasita comum nos estoques laboratoriais deste gênero. Recentemente, o trabalho de Sassi (2003) verificou a presença de seqüências homólogas a *gypsy* e *P* em espécies de ácaros e microhimenópteros. Estes últimos são parasitóides naturais de dípteros.

Um dos exemplos clássicos de transferência horizontal, o do elemento *P*, é particularmente importante para este trabalho. A ausência do TE *P* em outras espécies do subgrupo *melanogaster*, como *D. simulans* e *D. sechellia*, *D. mauritiana*, separadas de *D. melanogaster* por dois milhões de anos, sugere que o genoma de *D. melanogaster* tenha sido invadido por uma seqüência de *P* de *D. willistoni*, já que a cópia presente nas duas espécies difere por um único nucleotídeo na posição 32 nt (Daniels *et al.*, 1990; Kidwell, 1992). Tal conservação seria improvável em sessenta milhões de anos de divergência das espécies (Engels, 1989). O gene *Adh* (álcool desidrogenase) das duas espécies, por exemplo, que certamente está sob forte pressão seletiva, difere em 8,9% e 15,9%, referentes aos éxons 2 e 3, respectivamente (Anderson *et al.*, 1993).

A simpatria de *D. willistoni* e *D. melanogaster* foi estimada para o ano de 1800, quando se acredita ter ocorrido a chegada desta no Novo Mundo. A espécie de origem africana *D. melanogaster*, é atualmente cosmopolita, devido às migrações promovidas pelo comércio (Engels, 1989).

A transmissão horizontal certamente depende da relação ecológica entre as espécies hospedeiras (Kidwell, 1992; Lohe *et al.*,1995). Muitas das dúvidas referentes à filogenia dos TEs deve-se ao pouco conhecimento da distribuição e das relações ecológicas entre as espécies hospedeiras, assim como o pouco conhecimento sobre o polimorfismo das seqüências dos TEs.

Tem sido sugerido que a transmissão horizontal possa ser uma estratégia dos TEs para evitar a inativação mediada pelo hospedeiro através do tempo evolutivo (Mizrokhi e Mazo, 1990; Kidwell, 1994). Presumivelmente, um novo hospedeiro não possui capacidade de inativar o TE invasor imediatamente, permitindo que este se prolifere.

Nos últimos trinta anos, numerosas famílias de TEs têm sido descritas e caracterizadas em diversas espécies (Kidwell e Lisch, 2001). Os TEs constituem pelo menos 45% do genoma humano, 50% do genoma do milho e 15% do genoma de *Drosophila* (Kidwell e Lisch, 2000; International Human Genome Sequencing Consortium, 2001). Sua ampla distribuição nos genomas e sua ubiquidade geram questões sobre a natureza das relações entre TEs e seus hospedeiros e as conseqüências destes na evolução dos genomas.

A perda da adaptabilidade proporcionada pelos TEs no hospedeiro, devido à sua habilidade replicativa e ao efeito deletério da mobilização (Kidwell e Lisch,

2000) os tornaram bons exemplos para a teoria publicada por Dawkins (1976) no livro “O gene egoísta” que, resumidamente, fala de seqüências de DNA que utilizariam um genoma hospedeiro para se dispersarem independente da diminuição da adaptabilidade que causam.

Sem dúvida, os TEs são uma das principais fontes de mutações espontâneas (Berg e Howe, 1989) e de diversidade gênica (Kidwell e Lisch, 2000). As mutações produzidas no genoma hospedeiro ocorrem tanto no processo de inserção de seqüências, quanto no processo de excisão, sendo este freqüentemente impreciso e levando ao deslocamento de apenas parte da seqüência do TE, ou mobilizando também seqüências flanqueadoras. Além disso, estão envolvidos em eventos de recombinação ectópica que levam a deleções, inserções e formação de novos grupos de ligação; translocações e inversões; formação de pseudogenes; duplicação de partes do genoma; e o embaralhamento de éxons. Entretanto, todos estes eventos também colaboram para a reestruturação e flexibilidade do genoma.

A **duplicação do tamanho do genoma** dentro de poucos milhões de anos é atribuída aos TEs. A variação no tamanho do genoma de espécies de plantas, por exemplo, parece estar associada ao número e famílias de TEs. O genoma do milho é três a quatro vezes maior que o genoma do sorgo, ambas gramíneas cuja divergência é de 15-20 milhões de anos atrás (Tarchini *et al.*, 2000), possivelmente devido à presença de TEs em regiões intergênicas.

Também é atribuída aos TEs a manutenção dos **telômeros**, estruturas importantes em organismos multicelulares por permitirem a integridade cromossômica durante as divisões celulares. Trabalho de Eickbush (1997) sugere

que a telomerase, enzima responsável pela síntese dos telômeros, evoluiu de retroelementos. No caso de *Drosophila*, os telômeros não dependem das telomerases e sim dos próprios retrotransposons sem LTRs *Het-A* e *TART*, que se inserem nas terminações cromossômicas (Levis *et al.*, 1993; Sheen e Levis, 1994). É comum para os retroelementos desta subclasse usarem a extremidade 3' livre do DNA como iniciador da transcrição da enzima transcriptase reversa.

O componente fundamental do sistema imune de vertebrados, o **sistema V(D)J** de recombinação dos linfócitos, é produto de um TE domesticado (Spanopoulou *et al.*, 1996). Acredita-se que este sistema evoluiu da inserção de um transposon em um gene codificador de uma proteína da superfície celular. Até o presente momento, há poucas evidências que indiquem qual a família de TE envolvida no processo. Tem sido sugerido um elemento da família do elemento *P*, devido à similaridade do pareamento das extremidades 5' e 3' que ocorre durante a transposição e o pareamento de distintos tipos de sítios de recombinação do sistema V(D)J (Rio, 2002).

Segundo Dimitri e Junakovic (1999), os retroelementos também são capazes de **reestruturar a heterocromatina**, podendo afetar o pareamento cromossômico. Este evento pode levar à criação de uma barreira reprodutiva que promove divergência e especiação.

Tem sido sugerido, ainda, que o principal componente da regulação em mamíferos, que é a **metilação**, surgiu primeiramente da regulação da atividade de transposição (Yoder *et al.*, 1997; Simmen *et al.*, 1999).

Da mesma forma que o sistema SOS ou MRS, os TEs podem ser considerados como um **sistema de resposta celular ao estresse ambiental**

(Capy *et al.*, 2000). Em bactérias, a mobilidade das Seqüências de Inserção, em resposta ao estresse ambiental contribui com a adaptabilidade (Hall, 1998). A resposta de *412* à alta temperatura leva à seleção de linhagens de *D. simulans* com menor número de cópias deste elemento em regiões de baixa latitude (Vieira e Biemont, 1996).

Somado a isso, os TEs estão relacionados à **evolução regulatória** dos hospedeiros. Os MITEs são freqüentemente associados a regiões gênicas regulatórias, sugerindo seu envolvimento no controle da expressão (Wessler *et al.*, 1995). Neste contexto, a descoberta que TEs carregam seqüências controladoras tecido-específicas ativas durante o desenvolvimento embrionário também sugere que eles são capazes de atuar na regulação gênica (Cavarec e Heidmann, 1993; Ding e Lipshitz, 1994; Brönnner *et al.*; 1995, Miller *et al.*, 1997).

1.2 Padrão tecido-temporal de expressão de TEs durante o desenvolvimento de *Drosophila*.

A regulação transcricional tecido-temporal de quinze famílias de retrotransposons (*17.6*, *297*, *412*, *1731*, *3S18*, *blood*, *copia*, *gypsy*, *HMS Beagle*, *Kermit/flea*, *mdg1*, *mdg3*, *opus*, *roo/B104* e *springer*) foi relatada no trabalho de Ding e Lipshitz (1994). A alta conservação do padrão de expressão observada em quatro linhagens de *D. melanogaster*, polimórficas quanto aos sítios de inserção destes TEs, sugere a existência de seqüências regulatórias em *cis* que controlam sua expressão, independente do sítio de inserção destes no genoma. Dos quinze elementos estudados, apenas *opus* parece ter sofrido efeito de posição na

regulação. A expressão deste foi observada nos núcleos do vitelo, no início do desenvolvimento, e no Sistema Nervoso Central, a partir do estágio de Retração da Banda Germinal. Nas linhagens L-S e U-S esta expressão é expandida, e diferem uma da outra. Na primeira, são detectadas sete faixas durante a Blastoderme Celular e a Gastrula, que passa para quatorze faixas durante o estágio de Extensão da Banda Germinal, lembrando a expressão de genes de polaridade dos segmentos. Na segunda, *opus* é expresso nas glândulas salivares a partir do estágio de Retração de Banda Germinal.

Assim, não são os retroelementos apenas seqüências com capacidade de reorganizar os genomas, como também de reorganizar a expressão gênica por possuírem seqüências regulatórias que se mobilizam consigo, podendo servir de promotores para genes do hospedeiro próximos aos seus sítios de inserção (Charlesworth e Langley, 1989). Se a excisão do TE ocorrer de forma imprecisa, pode gerar, também, domínio de expressão que permanece fixado no genoma, caso não for deletério (Brönnner *et al.*, 1995). A resposta ao hormônio andrógeno do gene *Slp* (*sex limited*) de camundongo, gerado por duplicação do gene C4 do complemento do sistema imune, é devida a uma seqüência originada do pró-vírus IMP (Stavenhagen e Robins, 1988). Outro exemplo é a expressão da enzima amilase nas glândulas parótidas de humanos, que ocorre devido à inserção de dois retroelementos na região promotora de um dos genes codificadores da enzima (Samuelson *et al.*, 1990). As outras cópias do gene são expressas no pâncreas.

Além do trabalho de Ding e Lipshitz (1994), outros autores mostraram a expressão de TEs durante a embriogênese de *Drosophila*, e sugeriram que estes respondem a genes do desenvolvimento.

O retrotransposon *B104* se expressa no mesoderma em desenvolvimento (Brönner *et al.*, 1995). Em mutantes nulos dos genes *twist* e *snail*, fatores de transcrição essenciais para o desenvolvimento deste tecido, a expressão de *B104* fica restrita a um sítio da cabeça e aos tubos de Malpighi.

O retrotransposon *Blastopia* é dependente do fator de transcrição *bicoid*, um morfógeno de origem materna que sinaliza a região anterior do embrião (Frommer *et al.*, 1994). Em mutantes nulos de *bicoid*, não é observada a expressão deste TE, enquanto que em mutantes de superexpressão ocorre a expansão da expressão de *Blastopia* para a região posterior. Nem a presença de um sítio de ligação de *bicoid*, nem a proximidade de uma cópia de *Blastopia* a este gene foram observados.

No trabalho de Mozer e Benzer (1994) com *17.6*, entretanto, foi localizada a seqüência regulatória *cis* responsável pela especificidade de expressão deste na margem anterior da lâmina, apesar do fator de transcrição não ter sido definido. A lâmina é a região cerebral onde ocorre a ligação dos axônios originados do grupo de células foto-receptoras do disco imaginal do olho. O desenvolvimento deste tecido depende deste evento de inervação. Embora uma função para o produto codificado por *17.6* no desenvolvimento da lâmina ainda deva ser demonstrada, a seqüência regulatória presente no TE pode estar envolvida na expressão dependente de inervação de genes adjacentes ao seu sítio de inserção.

Um complexo padrão de expressão durante a embriogênese também foi descrito para o TE *412* (Brookman *et al.*, 1992, Ding e Lipshitz, 1994). Chama a atenção neste elemento sua indução e ligação à proteína homeótica Ultrabithorax (Ubx), mostradas em trabalhos independentes (Gould *et al.*, 1990; Brookman *et al.*, 1992; Feinstein *et al.*, 1995). Brookman *et al.* (1992) também sugere a utilização de *412* como marcador durante o desenvolvimento gonadal devido ao alto nível de expressão deste nos grupos de células do mesoderma visceral que são associados com as células germinativas.

É interessante notar que o padrão de expressão de *412* e *mdg1* é indistinguível, assim como são similares as seqüências das LTRs dos mesmos, sugerindo que o complexo padrão de expressão possa ser resultado de seqüências reguladoras presentes nas LTRs (Ding e Lipshitz, 1994).

Embora cada retrotransposon estudado apresente um modelo tecido-temporal dinâmico e característico, a expressão em alguns tecidos parece ser conservada entre diferentes retrotransposons: no mesoderma visceral (*412*, *297*, *gypsy*), mesoderma somático (*B104*, *17.6*), gônadas (*17.6*, *412*, *mdg1*, *297* e *gypsy*), sistema nervoso central (*297*, *1731*, *mdg3*, *copia*, *HMSBeagle* e *opus*), e nos núcleos do vitelo do início da embriogênese (*B104*, *blood*, *gypsy*, *297*, *opus*) (Ding e Lipshitz, 1994).

O retrotransposon *Fex* é um elemento tipo LINE transcrito durante a embriogênese de maneira tecido específica: no Sistema Nervoso Central, na amnioserosa, nas glândulas salivares, nos músculos, sistema traqueal e intestino anterior (Kerber *et al.*, 1996). Esse complexo padrão de expressão durante o desenvolvimento é regulado por uma região de 470 pb 5' do elemento, que

envolve a ORF1. Segundo os autores, a complexidade de expressão lembra a de genes de desenvolvimento, onde uma série de fatores de transcrição interage, só que, ao contrário destes, o TE *Fex* é admirável quanto sua capacidade de compactação (470 pb) quando comparado com a disposição de regiões controladoras de *Krüppel*, por exemplo, que abrange 18 kb. Durante o início da Blastoderme, o TE *Fex* apresenta um padrão que sobrepõe o dos genes de segmentação *knirps* e *giant*, mas o controle de sua transcrição por estas duas proteínas não foi estabelecido.

1.3 Mobilização de TEs

Devido aos efeitos deletérios por danos na informação genética, a mobilização dos TEs é um efeito raro nos genomas (Dominguez e Albornoz, 1996). Entretanto, *Drosophila* oferece vários exemplos de instabilidade gênica associada com mobilização de TEs: síndrome da disgenesia do híbrido causada pelos TEs *P*, *I* e *hobo* no genoma de *D. melanogaster* (Kidwell, 1977; Bregliano e Kidwell, 1983; Blackman *et al.*, 1987); a síndrome da disgenesia do híbrido em *D. virilis* (Petrov *et al.*, 1995); a instabilidade do retrotransposon *Stalker* em *D. melanogaster* (Georgiev *et al.*, 1990); e a mobilização simultânea de TEs em linhagens instáveis (Lim *et al.*, 1983; Yannopoulos *et al.*, 1987; Pasyukova e Nuzhdin, 1993).

O cruzamento de determinadas linhagens de *Drosophila* induz na prole um fenômeno interessante denominado disgenesia do híbrido, resultado da mobilização de TEs que geram um grande número de mutações e alterações na

estrutura dos cromossomos (rearranjos e não disjunções), alta frequência de esterilidade parcial ou completa, recombinação em machos (que em *Drosophila* é quase restrita às fêmeas), e distorção da razão sexual (Kidwell e Novy, 1979; Bregliano e Kidwell, 1983).

Três sistemas de disgenesia do híbrido foram descritos em *D. melanogaster*: (1) o sistema P-M, ocasionado pela mobilização do elemento *P* (Kidwell, 1977); (2) o sistema I-R, ocasionado pela mobilização do elemento *I* (Bregliano e Kidwell, 1983; Bucheton, 1990); (3) e o sistema H-E, ocasionado pela mobilização do elemento *hobo* (Blackman *et al.*, 1987).

A disgenesia P-M ocorre pela mobilização do elemento *P* induzida no cruzamento de machos “P” com fêmeas “M”. Definem-se como “P” moscas que possuem elementos *P* potencialmente ativos e citótipo P, que significa que o citoplasma do oócito apresenta condição que reprime a ação deste TE. Atribui-se a classificação “M” às moscas que não possuem o elemento *P* ativo mas que são suscetíveis à sua atividade. Ou seja, no cruzamento de fêmea com citótipo M permissivo, o elemento *P* do genoma dos machos torna-se ativo e sua mobilidade provoca a disgenesia do híbrido na prole deste cruzamento. Além destas duas classes, ainda há linhagens denominadas M', que apresentam o citótipo M e elementos *P* defectivos, não sendo capazes de induzir ou reprimir a mobilidade do elemento, e a linhagem Q, com citótipo P e elemento *P* não ativo, e assim pode apenas reprimir a mobilidade de *P*. As linhagens M' e Q podem regular a transposição em vários graus mas não induzir disgenesia do híbrido porque não possuem número suficiente de *P* completo necessários para produzir a transposase (Rio, 2002).

A disgenesia do híbrido é normalmente restrita às células germinativas devido às características dos próprios TEs (Laski *et al.*, 1986). Os elementos *P* e *I* são restritos às células germinativas devido ao processamento diferencial dos transcritos nestas células. O elemento *hobo*, por sua vez, é ativo tanto em células germinativas quanto somáticas (Lim, 1988).

A esterilidade do sistema P-M e H-E é chamada de esterilidade gonadal, e resulta da morte celular durante os primeiros estágios do desenvolvimento das células germinativas (Engels e Preston, 1979; Kidwell e Novy, 1979). Gônadas de machos têm mais células germinais do que as de fêmeas, o que pode explicar o porquê dos machos serem menos sensíveis à esterilidade gonadal do que as fêmeas. A esterilidade do sistema I-R é chamada de letalidade embrionária, e resulta de um bloqueio no desenvolvimento embrionário inicial da prole destas fêmeas (La Roche Saint Andre e Bregliano, 1998). A prole sobrevivente pode apresentar alta taxa de mutação, rearranjos cromossômicos e não disjunção cromossômica.

A disgenesia de *D. virilis* tem sido atribuída ao retroelemento *Penelope*, um retroelemento com ITRs remanescentes e uma transcriptase reversa não usual. Nas linhagens L160 e B9 de *D. virilis*, *Penelope* está distribuído heterogeneamente, em número e posição, nos cromossomos. A heterogeneidade de distribuição dos TEs tem sido um dos principais fatores de instabilidade gênica associada à sua mobilização. Entretanto, pelo menos outros cinco TEs são mobilizados neste evento: *Paris*, um transposon; *Helena*, um retrotransposon sem LTR; e *Ulysses*, *TV1* e *Telemac*, retrotransposons com LTR (Pyatkov *et al.*, 2002). *Paris* e *Helena* são ampla e assimetricamente distribuídos em ambas linhagens,

assim como *Penelope*, enquanto *Ulysses* é altamente conservado. Mobilização simultânea de TEs é esperada quando um elemento funcional for capaz de complementar a deficiência apresentada por outro (Petrov *et al.*, 1995). Devido à grande variedade de classes dos elementos mobilizados e, conseqüentemente, à grande diversidade de mecanismos de transposição, isso parece improvável. A mobilização pode estar relacionada a um estresse como quebras cromossômicas, levando à mobilização de grupos de TEs, ou a um rompimento de um sistema de silenciamento comum a todos eles, como o mecanismo de co-supressão.

Apesar de alguns autores serem cautelosos em afirmar que os TEs podem levar à especiação, a disgenesia do híbrido de *Drosophila* é um exemplo do envolvimento potencial dos TEs neste processo (Bregliano e Kidwell 1983; Kidwell e Lisch, 2000). A variabilidade gênica entre populações causada pela invasão de TEs pode criar uma barreira reprodutiva, incrementada pela esterilidade da síndrome da disgenesia do híbrido (Labrador *et al.*, 1999). Neste sentido, Labrador *et al.* (1999) testaram as espécies *D. buzzatii* e *D. koepferae*, quanto à mobilização de *Oswaldo*, um retrotransposon com LTR. Acredita-se que estas espécies teriam divergido por esse processo, mas retiveram a capacidade de formarem híbridos. A taxa de transposição de *Oswaldo* é elevada no híbrido para 10^{-2} transposição por elemento por geração, além de novos sítios de inserções cromossômicas terem sido identificados para este TE.

Alta mutabilidade (10^{-3} a 10^{-4} transposição por elemento por geração) foi observada no cruzamento das linhagens FM4 e w^{aG} de *D. melanogaster* causada pela mobilização do elemento *Stalker* (Georgiev *et al.*, 1990). Este fenômeno difere da síndrome da disgenesia do híbrido por ocorrer em cruzamentos

recíprocos, afetar não apenas células da linhagem germinativa e ser ativo por muitas gerações. A ativação da mobilização de *Stalker* é desconhecida, mas as linhagens são heterogêneas quanto à distribuição dos elementos no genoma, assim como observado para os sistemas disgênicos. Enquanto apenas cinco elementos eucromáticos são observados em w^{aG} , aproximadamente cinquenta estão presentes na eucromatina de FM4. O cruzamento de w^{aG} com outras linhagens com poucas cópias eucromáticas de *Stalker* não levou à ativação do mesmo, dando credibilidade à hipótese da assimetria entre as linhagens como ativadora da mobilidade.

A linhagem Rev1 de *D. melanogaster* se caracteriza pela instabilidade dos retrovírus *ZAM* e *Idefix* (Desset *et al.*, 1999; Conte *et al.*, 2000) observada pelas alterações na coloração dos olhos e do corpo nesta linhagem. Quinze cópias de *ZAM* e trinta de *Idefix* estão inseridas na eucromatina de Rev1, enquanto em outras linhagens estudadas são exclusivos das regiões heterocromáticas. A mobilização destes dois TEs, assim como na disgenesia de *D. virilis*, sugere uma regulação comum que é rompida na linhagem instável e, neste caso, os determinantes genéticos responsáveis pela ativação continuam presentes por gerações. Nenhum dos outros TEs observados na linhagem (*P*, *1731*, *gypsy*, *412* e *17.6*) são mobilizados. O cruzamento da linhagem Rev1 com linhagens com poucas cópias eucromáticas não induz a mobilização de *ZAM* e *Idefix*, sendo diferente do mecanismo observado para *P*, *I*, *hobo* e *Stalker*.

Outro exemplo é a linhagem Uc de *D. melanogaster*, que possui um cromossomo X instável que acumula mutações letais e apresenta alta taxa de rearranjo em um único loco (Lim *et al.*, 1983). A reversibilidade destas mutações

sugere a atuação de TEs que, segundo trabalho de Yannopoulos *et al.* (1987), são *gypsy* e *hobo*. Ainda a instabilidade de *Doc* e *copia* foi observado em outra linhagem de *D. melanogaster*, mas não de outros TEs presentes (*mdg1*, *mdg2*, *mdg3*, *mdg4*, *297*, *B104*, *H.M.S. Beagle*, *I*, *P*, *BS*, *FB*) (Pasyukova e Nuzhdin, 1993).

Uma das causas da instabilidade gênica é, aparentemente, a heterogeneidade na distribuição cromossômica dos TEs nas linhagens parentais. Se esta distribuição pode resultar no silenciamento de seqüências, em diferenças transcricionais, ou de diferentes controles de transposição ou, ainda, leva a quebras cromossômicas, não se sabe.

1.4 Regulação dos TEs

Devido ao seu efeito mutagênico e à quantidade de elementos existentes nos genomas, a regulação da transposição é tão importante quanto à transposição em si. McClintock (1955), nos seus trabalhos iniciais, sugeriu não apenas a existência de TEs como também a complexidade de sua regulação. A invasão de uma nova espécie por um TE, inicialmente induz alta taxa de mobilidade e mutações, até a seqüência ser perdida por seleção ou deriva genética (Lohe *et al.*, 1995). A manutenção dos TEs no genoma exige silenciamento, domesticação ou regulação dos mesmos.

Parte da manutenção das seqüências no genoma hospedeiro é intrínseca ao próprio TE. Alguns apresentam sítios preferenciais de inserção em regiões não codificantes ou em elementos pré-existentes, como sugerido pela análise da

região intragênica do milho (Kidwell e Lisch, 1997). Lansman *et al.* (1987), estudando *D. nebulosa*, sugeriram a existência de *hotspots* para *P*, dispostos preferencialmente na heterocromatina centromérica. Assim, as invasões e re-invasões de *P* resultariam em um período inicial de efeito disgênico, seguido da redução da síndrome por silenciamento causado por inserções de *P* ativos na heterocromatina. O mesmo é sugerido para o TE *mariner*, que tem preferência por seqüências ricas em AT, devendo, também, se inserir preferencialmente em regiões heterocromáticas.

A causa da distribuição dos TEs na heterocromatina é uma questão ainda não respondida (Kidwell e Lisch, 1997). Primeiramente deve-se considerar que o seu acúmulo nesta região pode ser resultado da neutralidade deste evento, ao contrário das inserções em regiões gênicas. Além disso, a inserção na heterocromatina reduz a probabilidade do TE ser eliminado do genoma por recombinação ectópica, um dos mecanismos de controle do número de cópias nos braços cromossômicos (Charlesworth e Langley, 1989). Ao mesmo tempo em que a mobilização de TEs para a heterocromatina parece ser um mecanismo de manutenção destes no genoma, é observado que as cópias presentes nestas regiões são altamente divergentes e geralmente inativas (Kidwell e Lisch, 1997). Se por um mecanismo para preservação da seqüência, ou como um mecanismo de silenciamento, é fato que a heterocromatina é composta principalmente de TEs, como mostrado pelo trabalho de análise computacional de Kapitonov e Jurka (2003), que reconstroem TEs ancestrais a partir de cópias incompletas.

Além dessas considerações sobre a heterocromatina, tem sido sugerido que as espécies respondem de forma diferente às invasões de TEs. Ao contrário

do observado para *P* em *D. nebulosa*, a preferência por sítio heterocromático não foi relatada para o elemento *P* em *D. melanogaster* (O'Hare e Rubin, 1983).

Têm sido descritos vários mecanismos celulares de reconhecimento e inativação de repetições gênicas, presumivelmente como uma defesa contra vírus e TEs.

Uma destas formas é por **metilação**. Este mecanismo foi sugerido pela análise do genoma do milho, onde foram encontrados blocos compostos de pelo menos 10 famílias de retroelementos, a maioria amplamente intactos, em regiões intergênicas hipermetiladas (Bushman, 2002). A metilação é difundida entre vertebrados e plantas, e se caracteriza por reduzir a expressão de forma reversível. No caso do TE *Mu*, é observada a especificidade por metilação de cópias intragênicas, e não cópias presentes em seqüências que flanqueiam os genes (Chandler e Walbot, 1986).

Outro modelo, descrito para o fungo filamentoso *Neurospora*, é o de **mutação pontual induzida por repetição (RIP)**, que promove a substituição de desoxicitosina por desoxitimidina em seqüências repetidas (Bushman, 2002). O processo inicia-se pela metilação de citosinas, seguido da substituição desta por desoxiuridina que, por fim, é trocada por uma desoxitimidina pelo sistema de reparo.

Em trabalho de McClintock (1951), um decréscimo de transposição foi verificado com o aumento das cópias do TE *Ac* no genoma do milho. Três modelos de silenciamento gênicos por aumento no número de cópias têm sido propostos atualmente: (1) modelo dependente do número de cópias no genoma

ou **co-supressão**, (2) **silenciamento *in trans* dependente da homologia** e (3) **RNA anti-senso**, RNA interferece ou RNAi.

O primeiro modelo ocorre pela reestruturação da cromatina por reconhecimento de seqüências homólogas em nível de DNA (Pal-Bhadra *et al.*, 1997, 1999). Ele é dependente de proteínas do grupo Polycomb, que estão envolvidas nas mudanças na acessibilidade da cromatina.

Os outros dois são dependentes do número de transcritos. O primeiro exemplo da regulação por silenciamento *in trans* dependente da homologia, não gerado por transgenia, foi do gene *Stellate* de *Drosophila*. Este gene é expresso exclusivamente nos testículos, sendo que sua superexpressão leva à esterilidade dos machos. O seu silenciamento é feito por transcritos, tanto senso quanto anti-senso, de um gene parálogo, repetido *in tandem*, chamado *Su(Ste)* (Aravin *et al.*, 2001). Esses transcritos formam fita dupla com seqüências transcritas com identidade mínima de 85%, desencadeando um mecanismo de clivagem de fita dupla em seqüências de 23-27 pb. DICER é uma das proteínas envolvidas na clivagem de RNA fita dupla e foi recentemente descrita em *Drosophila*. As proteínas *spn-E* e *aub* também estão envolvidas no silenciamento gênico pós-transcricional, dentre eles o silenciamento por RNA anti-senso, controlando a tradução e localização de mRNAs durante a oogênese. Mutações no gene *spn-E*, cuja expressão é restrita às células germinativas, leva ao aumento da expressão de retroelementos e de genes repetidos *in tandem*.

Estes três mecanismos de silenciamento pelo número de cópias foram sugeridos na regulação do retrotransposon sem LTR I (Chaboissier *et al.*, 1998; Jensen *et al.*, 1999a, 1999b; Malinsky *et al.*, 2000). Assim, como mostrado para

outros TEs, a invasão de um genoma novo pelo elemento *I* se caracteriza por alta taxa de mutação e disgenesia. Esta atividade é reduzida a um limiar após algumas gerações (aproximadamente dez) (Jensen *et al.*, 1999a). São características deste efeito repressor: a independência de tradução, o aumento do número de cópias do elemento, é mantido por gerações e é transmitido materno. O aumento do número de cópias da seqüência 5'UTR do elemento no genoma (Chaboissier *et al.*, 1998), assim como da ORF1 e parte da ORF2 (Jensen *et al.*, 1999a,b), possui esta capacidade repressora. Os dados foram confirmados por Malinsky *et al.* (2000), que estudou moscas transgênicas para a seqüência completa da ORF1, como também para a ORF1 fora da fase de leitura, sugerindo atividade repressora independente da síntese de um polipeptídeo específico. O efeito repressor de seqüências anti-senso foi verificado por Jensen *et al.* (1999b).

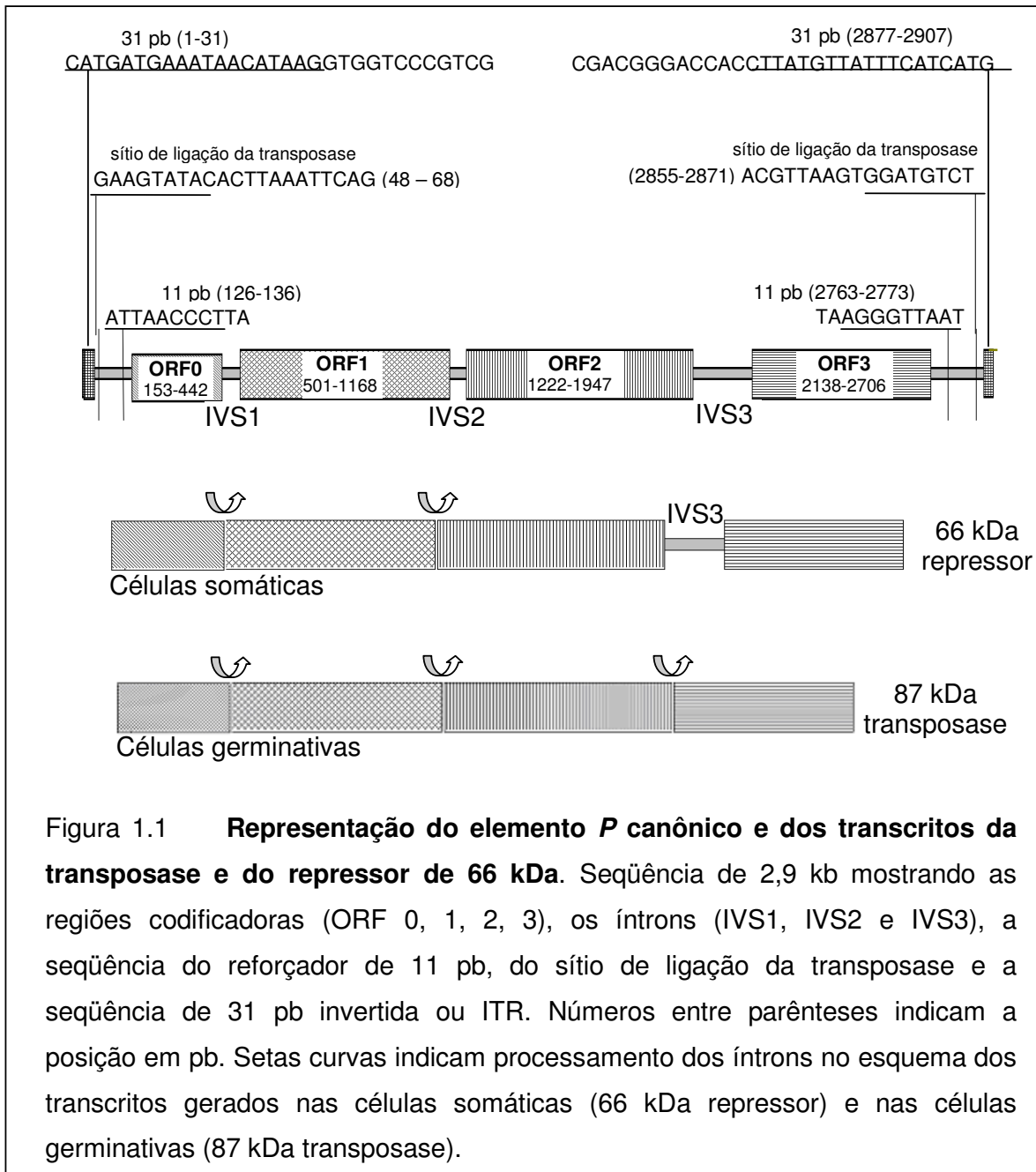
A regulação da atividade de transposição também pode ser feita por proteínas codificadas pelo próprio TE, ou por polipeptídeos sintetizados de seqüências truncadas, como estão exemplificados na próxima Seção.

1.5 O elemento *P*

A família do transposon *P* é a melhor caracterizada de *Drosophila* (Engels, 1989). Sua estrutura inclui repetições terminais invertida (ITRs) de 31 pb e uma de 11 pb distante da extremidade cerca de 100 pb (Figura 1.1). A primeira seqüência é importante para a transposição, enquanto a segunda age como um reforçador. Entre estas duas repetições há o sítio de ligação da transposase. No

processo de inserção, o elemento provoca a duplicação de 8 pb do DNA alvo, que flanqueiam a seqüência do elemento.

O elemento íntegro possui 2,9 kb de extensão e quatro ORFs com dois genes sobrepostos, um que codifica a transposase e outro que codifica o repressor da transposição (Craig, 1990) (Figura 1.1).



A capacidade de dispersão de *P*, que levou menos de 200 anos para invadir o genoma de *D. melanogaster*, é atribuída à sua habilidade de produzir um regulador negativo em sua própria mobilidade, dando melhores chances de sobrevivência à espécie hospedeira (Brookfield, 1991).

A mobilização de *P* é pouco freqüente, mas aumenta em determinados cruzamentos, levando à síndrome da disgenesia do híbrido, que afeta as células germinativas dos descendentes causando sua esterilidade. A restrição tecido-específica da mobilidade de *P* ocorre pelo processamento alternativo do terceiro íntron (IVS3). Este possui um códon de parada que, quando não processado, leva à transcrição de uma seqüência menor que traduz para o repressor de 66 kDa. Quando processado, o transcrito não apresenta este códon de parada, traduzindo para a transposase de 87 kDa (Figura 1.1). Siebel e Rio (1990) verificaram que o processamento do terceiro íntron é inibido, *in vitro*, pelo extrato de células somáticas de *Drosophila*. Mutações próximas a este íntron levam ao seu processamento, tanto em células germinativa quanto somáticas. Provavelmente, o processamento de IVS3 é bloqueado em tecidos somáticos pela interação com uma proteína que se liga ao RNA, prevenindo o início de seu processamento. Estudos bioquímicos identificaram uma proteína ligante de mRNA chamada PSI, ou inibidor somático de *P*, que é altamente expressa em células somáticas, mas não na linhagem germinativa (Siebel *et al.*, 1995). Esta proteína interage com a região do processamento impedindo a ligação de U1 snRNP, um dos componentes do spliceossomo. Outros fatores foram descritos como possíveis reguladores do processamento tecido-específico de *P*, entre eles a proteína hrp48

(hnRNP). A redução da quantidade desta alivia a inibição do processamento do íntron IVS3 em células somáticas.

Um segundo mecanismo de regulação por processamento alternativo foi sugerido por Chain *et al.* (1991), envolvendo o próprio íntron IVS3. Um sítio doador e um sítio acceptor variantes foram identificados na seqüência de IVS3, de forma que, se o processamento deste for ativado em células somáticas, um destes sítios variantes pode ser usado, evitando a formação do transcrito da transposase. O uso destes sítios foi observado em mutantes onde o processamento de IVS3 foi ativado em células somáticas. Em moscas não mutantes, o uso dos sítios variantes é restrito às células germinativas, assim como o processamento de IVS3.

Os mesmos sítios variantes de processamento do elemento *P* canônico estão conservados nas subfamílias tipo-M de *D. helvetica* e tipo-M e tipo-O de *D. bifasciata* e *Scaptomyza pallida* (Haring *et al.*, 1998). Estas duas subfamílias de *P* são flanqueadas por repetições diretas de 8 pb, contém ITRs e mantêm os quatro éxons (Hagemann *et al.*, 1998), mas diferem em até 30% do elemento *P* canônico. Assim como para o *P* canônico, os processamentos variantes são específicos das células da linhagem germinativa para as subfamílias tipo-M de *D. helvetica* e tipo-O, sugerindo a atividade destas seqüências (Haring *et al.*, 1998). Interessantemente, em *D. bifasciata* e *S. pallida*, os processamentos variantes da subfamília tipo-M ocorre em todos os tecidos, sugerindo a imobilidade deste elemento nestas espécies. Em *S. pallida*, o processamento de IVS3 sequer foi observado nas células germinativas, de forma que nesta espécie é codificado apenas o repressor da transposase de *P*.

Além do processamento tecido-específico, são sugeridos para o elemento *P* os mecanismos de regulação descritos a seguir, conforme revisão de Simmons *et al.* (1996), Kidwell e Lisch (1997, 2001), Rio (2002) e Castro e Carareto (2004b).

A proteína de 66 kDa (Laski *et al.*, 1986) não é apenas um subproduto transcricional do elemento *P* nas células somáticas, pois tem atividade repressora da transposição de *P* tanto em células somáticas quanto em germinativas. Assim como esta proteína, outros repressores derivados do elemento *P*, que são truncados na extremidade C-terminal, e que mantêm os três primeiros éxons e parte do íntron IVS3, são definidos como **repressores tipo I** (Gloor *et al.*, 1993).

Aparentemente, a atividade destes repressores aparentemente está relacionada às proteínas que eles codificam. Como a extremidade N-terminal possui identidade com a da transposase, os repressores compartilham com ela a capacidade de ligação ao DNA e, desta forma, podem impedir a excisão do elemento *P* bloqueando o sítio de clivagem, ou sobrepondo o sítio de início da transcrição do elemento.

Fazem parte dos **repressores tipo II**, as seqüências de *P* que mantêm os primeiros dois éxons (Gloor *et al.*, 1993). Entre estes está a proteína KP de 207 aa, onde 199 aa são idênticos aos da extremidade N-terminal da transposase mantendo o domínio de dimerização e ligação ao DNA característicos da transposase e do repressor de 66 kDa (Lee *et al.*, 1996). Estudos bioquímicos mostram que essa proteína tem afinidade pelos múltiplos sítios das extremidades 5' do elemento *P* incluindo o reforçador transposicional de 11 pb e, quando em alta concentração *in vitro*, a ITR de 31 pb. A repressão, por KP, da transcrição do

gene reporter lacZ, regulado pelo promotor de *P* sugere a sobreposição deste repressor pelo sítio do início da transcrição (Lemaitre e Coen, 1991; Lemaitre *et al.*, 1993). Porém, Simmons *et al.* (1996) não confirmou este dado em ensaio semelhante.

Outra hipótese, é de que esta proteína iniba a transposição de *P* pela ligação à transposase, formando heteromultímeros não funcionais. Este tipo de regulação é chamada de *multimer-poisoning* ou “**envenenamento do multímero**” (Rio, 1990, 2002). A atividade da transposase, que depende de um complexo de quatro unidades, é inibida se houver interação com proteínas do hospedeiro ou com proteínas codificadas por elementos truncados. Este modelo só é viável para proteínas cuja atividade é dependente da formação de complexos.

Apesar de KP ter, aparentemente, as mesmas propriedades do repressor de 66 kDa, ele é um repressor fraco (Rio, 2002). Entretanto, o fato de algumas linhagens M' de *D. melanogaster* possuírem mais de 30 cópias de KP, algumas em sítios cromossômicos altamente conservados, sugere uma seleção positiva para a manutenção desta seqüência no genoma hospedeiro. Além de KP, são encontrados no genoma de diferentes linhagens, outras seqüências classificadas como repressores tipo II.

Simmons *et al.* (1996) avaliaram a atividade repressora de dez destas seqüências, e outras duas da classe I, em ensaio de transformação de linhagens disgênicas e com letalidade pupal. A letalidade pupal afeta moscas que possuem apenas o elemento *P* sem IVS3 (Δ 2-3), ou seja, codificam apenas a transposase,

mesmo em células somáticas. As seqüências truncadas usadas na transformação eram reguladas por promotor de *hsp70*

As seqüências KP e DP (similar a KP) são os mais fortes repressores da letalidade pupal e da disgenesia do híbrido, possivelmente devido a sua capacidade de codificarem proteínas repressoras. As outras construções constituem repressores fracos, mesmo UP1, que é altamente similar a KP, e NP2 que codifica o motivo de zíper de leucina, crucial para a ligação ao DNA. Apenas DP é capaz de inibir a disgenesia sem a indução da expressão por choque térmico e por efeito materno, ou seja, quando transferido maternalmente para o oócito, constituindo o citótipo repressor.

De uma forma geral, todas as seqüências testadas no experimento de Simmons *et al.* (1996) reprimem a letalidade pupal, só que a baixa repressão observada quando não há indução da expressão por choque térmico, sugere uma regulação dose-dependente. No mesmo trabalho, o efeito da posição genômica foi observado: quatro, dentre cinco linhagens KP, e uma, de quatro linhagens DP reprimem a letalidade pupal. O efeito de posição das seqüências no genoma também pode ser o responsável pela incongruência de dados obtidos em ensaios de transformação.

As seqüências truncadas de *P*, pode também atuar na repressão por **titulação**. Este modelo é dependente do número de cópias dos elementos no genoma (Simmons e Bucholz, 1985). Sítios de *P* não autônomos, especialmente quando apresentam deleções ou mutações que impedem a sua excisão, acabam seqüestrando a enzima ativa, tornando-as não disponíveis para se ligarem em um *P* com capacidade de mobilização. Assim, as numerosas seqüências deletadas,

não necessariamente devem possuir capacidade codificadora para agirem como repressores. Outro exemplo disso é a regulação por RNA anti-senso.

A regulação da mobilidade de *P* por **RNA anti-senso** foi primeiramente abordada por Rasmusson *et al.* (1993), que verificou a habilidade regulatória das seqüências KP, DP e SP. A hipótese de repressão por transcrito anti-senso surgiu devido à restrita capacidade codificadora de SP (14 aa da extremidade N-terminal, sem zíper de leucina), sendo a repressão por polipeptídeo pouco plausível. Além disso, a capacidade de reprimir a transposição foi mapeada para uma única seqüência, que se supunha estar sendo transcrita a partir de um promotor hospedeiro na extremidade 3'. A capacidade de repressão da seqüência anti-senso de SP foi confirmada por Simmons *et al.* (1996), ratificada pela ausência de atividade repressora da mesma em orientação senso.

Outras seqüências anti-senso reprimem a letalidade pupal (Simmons *et al.*, 1996). Como todas as seqüências truncadas de *P* testadas compartilham a extremidade 5' do elemento, foi proposto que estas estariam bloqueando o início da tradução. Aparentemente esta repressão é dependente da quantidade de cópias transcritas, já que é observada nas linhagens induzidas por choque térmico. Entretanto, apenas três das linhagens disgênicas, transformadas por seqüências truncadas de *P* (seqüências NP2, UP2 e BP2), não desenvolveram a síndrome. Isso porque essa síndrome possui um componente zigótico e outro materno e, assim, a capacidade das seqüências anti-senso de serem transferidas maternalmente para o oócito deve ser avaliada.

A evidência da regulação de *P* por RNA anti-senso em linhagens não transformadas ainda não foi obtida, mas também tem sido sugerida para outros

TEs. Lankenau *et al.* (1994) verificou a síntese de seqüência anti-senso de *micropia* de *D. hydei*. Esta ocorre a partir de um promotor interno, cuja seqüência é consenso ao promotor de β -tubulina, um gene expresso exclusivamente durante a espermatogênese. Em *D. melanogaster*, os transcritos anti-senso testículo-específicos não são observados. Apesar da alta conservação da seqüência de *micropia* das duas espécies, as LTRs são diferentes, sugerindo que cada uma desenvolveu mecanismos diferentes de regulação.

O **citótipo P**, ou citótipo repressor, é definido como um ambiente celular capaz de reprimir a transposição do elemento *P*. Esta habilidade de repressão varia quantitativamente, permitindo a classificação das linhagens em P, M' e Q.

O citótipo possui um componente extracromossômico (materno) e um cromossômico (zigótico). A existência de um componente materno foi sugerida porque a disgenesia do híbrido afeta apenas cruzamentos direcionais. O componente repressor é transmitido para o oócito e está presente no momento da fecundação, inibindo o *P* ativo vindo do macho. O componente zigótico justifica a herdabilidade do citótipo repressor por gerações.

Três tipos de modelos para explicar a regulação na linhagem germinativa têm sido propostos: (1) polipeptídeo, (2) titulação e (3) RNA anti-senso (Simmons *et al.*, 1996). Eles reprimem a mobilidade de *P* pelos mecanismos anteriormente descritos. O que cabe discutir neste item é o efeito materno, ou seja, quais proteínas ou transcritos são maternalmente enviados para o oócito, e quais são capazes de inibir a disgenesia do híbrido.

A presença do elemento completo é necessária para estabelecer o citótipo P na linhagem, sendo que a transferência para o oócito ocorre na forma do

transcrito codificador para a proteína de 66 kDa (Simmons *et al.*, 2002). Segundo este autor, a região do íntron IVS3 possui uma seqüência consenso ao de genes de efeito materno (YTGTTYCTG), como os genes *bicoid* e *nanos* que determinam a polaridade inicial do embrião, sendo transmitida para o oócito como tal. Ao mesmo tempo, a presença deste consenso em IVS3 assegura a transferência para o oócito apenas de transcritos codificadores do repressor da transposição .

Segundo Misra *et al.* (1993), o nível do repressor de 66 kDa no oócito não está correlacionado com a repressão materna e apenas a expressão deste não é suficiente como componente materno do citótipo P. Poucos repressores se mostraram eficientes na inibição da disgenesia do híbrido, e apenas dois se comportam como um componente materno: DP e seqüência anti-senso UP2 (Simmons *et al.* 1996). A presença de uma seqüência sinal para a transmissão materna pode ser uma das restrições à maioria dos repressores de classe I e II. A seqüência DP difere da KP, que não é um dos componentes maternos da repressão, por uma inserção de 21 pb, que deve ser investigada quanto à presença de uma seqüência sinal similar à encontrada em IVS3. Interessantemente, a seqüência UP2 abrange IVS3, mas que também deve ser investigado quanto à presença de um sinal consenso na seqüência invertida.

Até então, nenhum estudo sobre a participação desta proteína ou transcrito no efeito materno foi conclusivo.

1.6 Elementos transponíveis em *D. willistoni*

Drosophila willistoni possui uma distribuição neotropical que se estende dos Estados Unidos à Argentina (TaxoDros- www.taxodros.unizh.ch), do Litoral Atlântico ao Pacífico, sendo a espécie de drosofilídeo mais comum das florestas da América do Sul (Ehrman e Powell, 1982).

Esta espécie possui um extenso polimorfismo cromossômico devido às inversões. Estudos têm associado os pontos de quebra de inversões aos TEs, como sugerido por autores como Engels (1983), Charlesworth (1989), Krimbas e Powell (1992). São exemplos disso, o trabalho de Engels e Preston (1984), que localizou cem rearranjos cromossômicos, envolvendo quebras simples ou múltiplas, induzidas pela mobilização de elementos *P*. O elemento *P* foi descrito também por Kusakabe *et al.* (1990) em ponto de quebra de uma inversão rara de *D. melanogaster*. Lyttle e Haymer (1992) reportaram o acúmulo de TEs, como *hobo*, em cromossomos altamente polimórficos de populações havaianas de *Drosophila melanogaster*.

Deve-se considerar ainda que recombinações ectópicas, muitas vezes promovidas por TEs, podem gerar inversões cromossômicas, como sugerido por Caceres *et al.* (2001) para o segundo cromossomo de *D. buzzatii*. Nos pontos de quebra das inversões desta espécie foi observada a inserção do TE *Galileo*, um retrotransposon sem LTR.

Regner *et al.* (1996) estudaram duas linhagens de *D. willistoni*, na tentativa de verificar o envolvimento do elemento *P* nas inversões cromossômicas desta espécie. No estudo foram utilizadas uma linhagem de coleta recente (17A2),

proveniente da cidade de Guaíba, no Rio Grande do Sul, e uma mantida em laboratório (WIP4), proveniente de área de caatinga próxima a cidade de Salvador, na Bahia. Para a primeira, vários sítios de hibridação do elemento *P* foram mapeados em todos os principais braços cromossômicos, pela técnica de hibridação *in situ* de cromossomos politênicos. Dos vinte e quatro sítios de hibridação, dez coincidem com pontos de quebra de inversões cromossômicas e outros cinco são muito próximos aos sítios de quebra. Apenas 17% dos sinais de hibridação foi no cromocentro. A segunda linhagem quase não possui inversões, e os sítios de hibridação do elemento *P* são quase que restritos ao cromocentro, sendo apenas 15% em braços eucromáticos. A linhagem 17A2 é possivelmente um exemplo de população recentemente invadida pelo elemento *P*, enquanto WIP4 é uma linhagem com a atividade de *P* silenciada no cromocentro.

O cruzamento destas linhagens gera uma prole disgênica que, devido às características acima descritas, e do aumento fenotípico da atrofia gonadal com a elevação da temperatura, acredita-se ser resultado da mobilização do elemento *P* (Regner *et al.*, 1999). Comparativamente com a síndrome de *P* em *D. melanogaster*, porém, a síndrome de *D. willistoni* afeta a prole de cruzamento recíproco e possui taxa inferior de atrofia gonadal (26% a 29° C). Estas diferenças levam à proposição de um modelo alternativo à disgenesia causada pelo elemento *P*, como a mobilização de *hobo*, que afeta cruzamentos recíprocos, ou até mesmo o envolvimento de mais de um TE, como descrito por Petrov *et al.* (1995) para *D. virilis*. Em *D. sturtevantii* foi observado 8,57% de prole disgênica em um cruzamento entre uma linhagem proveniente do estado de Minas Gerais, Brasil, e outra da Colômbia. A similaridade da disgenesia do híbrido de *D.*

willistoni foi observada, mas a causa também não foi estabelecida (Almeida e Carareto, 2002).

A descrição da síndrome da disgenesia do híbrido por Regner *et al.* (1996), levou a uma ampla varredura de *P* em linhagens de *D. willistoni* provenientes de várias localidades (Regner *et al.*, 1999). Em todas as linhagens investigadas o elemento estava presente.

A correlação entre inversões cromossômicas e o posicionamento do elemento *P* no genoma de *D. willistoni* foi sugerido em dois trabalhos (Regner *et al.*, 1996; Rohde, 2000). No trabalho de Rohde (2000), outros três TEs foram estudados: *hobo*, *412* e *gypsy*. Estes foram localizados em todos os braços cromossômicos e as suas distribuições não são uniformes entre as populações.

hobo e *gypsy* foram descritos no genoma de *D. willistoni* por técnicas de hibridação nos trabalhos de Loreto *et al.* (1998), que investigaram o genoma de espécies neotropicais de *Drosophila*, e de Sassi (2000) que investigou linhagens de *D. willistoni*. No primeiro trabalho, não foi detectada a presença dos TEs I e mariner nessa espécie.

O estudo de *P* e *hobo* foi ampliado por Klein (2002), que investigou oito linhagens de *D. willistoni* quanto a presença destes elementos pela técnica de PCR. Ainda, a transcrição destes TEs foi observada, por RT-PCR, neste mesmo trabalho, nas linhagens 17A2 e Wip onde a disgenesia do híbrido foi descrita pela primeira vez em *D. willistoni* (Regner *et al.*, 1999).

Além destes, o trabalho de Arcà e Savakis (2000) detectou a presença de *Minos*, um TE de classe II, em *D. willistoni*.

2 Objetivos

O objetivo do presente trabalho foi estudar o comportamento de TEs já descritos no genoma de *D. willistoni*, dando ênfase ao elemento *P* e às linhagens 17A2 e Wip de *D. willistoni*. Os objetivos específicos foram:

- obter dados sobre a presença dos TEs *gypsy* e *412* em linhagens de *D. willistoni* provenientes de diferentes regiões da América;
- verificar a expressão dos TEs *P*, *hobo*, *gypsy* e *412* nestas linhagens, como indício de sua potencial atividade no genoma de *D. willistoni*;
- detectar a presença de potenciais transcritos da transposase e de repressores do elemento *P*;
- estabelecer o padrão tecido-temporal de expressão de *P* durante a embriogênese em *D. willistoni* e *D. melanogaster*;
- comparar o padrão de hibridação *in situ* dos TEs anteriormente mencionados, nos embriões de *D. willistoni* e de *D. melanogaster*, evidenciando se estes elementos apresentam regulação da expressão dependente, ou não, do sítio de inserção no genoma hospedeiro.

3 Material & Métodos

3.1 Populações de *Drosophila* e condições de cultivo

As populações de *Drosophila* são mantidas em cultivo massal a 17°C em meio de cultura como descrito por Marques *et al.* (1966). As linhagens de *D. willistoni* usadas no estudo e a procedência destas estão descritas na Tabela 3.1. A linhagem Oregon (Ore) de *D. melanogaster* é usada como controle.

Tabela 3.1 Linhagens de *D. willistoni* usadas no estudo

| Linhagem, abreviatura | Origem | Coordenadas |
|---------------------------------|-------------------------------|----------------------|
| Pará (Pa) | Pará (Brasil) | 01° 20´S, 48° 30´W |
| Wip (Wip) | Salvador, BA (Brasil) | 12° 54´S, 38° 19´W |
| Cip (Cip) | Serra do Cipó, MG (Brasil) | 19° 20´S, 43° 40´W |
| Rib (Rib) | Ribeirão Preto, SP (Brasil) | 21° 10´S, 47° 50´W |
| Ilha de Santa Catarina (ISC) | Florianópolis, SC (Brasil) | 27° 42´S, 48° 30´W |
| 17A2 (17A2) | Eldorado do Sul, RS (Brasil) | 30°05´S, 51° 39´W |
| São Pedro do Sul (SPS) | São Pedro do Sul, RS (Brasil) | 29°32´ S, 53° 42´ W |
| Lagoa Negra (Lag) | Lagoa Negra (Uruguai) | 37° 87´ S, 59° 82´ W |
| Coronilla (Cor) | Coronilla (Uruguai) | 33° 53´ S, 53° 30´ W |

3.1.1 Meio de cultura para moscas

O meio de cultura, adaptado de Marques *et al.* (1966), é feito com 147 g de farinha de milho, 82 g de açúcar, 55,5 g farinha de centeio, 9 g soja, 1,4 g sal e 3,6 g de nipagin (em álcool), diluídos em 1L de água. O meio é cozido por 10 min, após a fervura inicial, distribuídos em vidros de cultura e esterilizados a 120°C por 15 min em autoclave. Após o resfriamento, uma pequena quantidade de fermento biológico, diluído em água, é colocada sobre os meios.

3.1.2 Meio de ovoposição

O meio de ovoposição (Valente, 1975) é feito com ágar 1,5% p/v, mel puro 15% p/v e corante *Ponceau* diluído em água. Ao meio de ovoposição ainda morno (aproximadamente 60°C) são adicionados fermento biológico 10% p/v e ácido propiônico 0,3% v/v.

O corante é colocado no meio até atingir a coloração vermelha desejada. Este ajuda a localizar e isolar os embriões do meio de ovoposição (Figura 3.1).

O meio é distribuído em vidros de relógio e, após a solidificação, é mantido a 4°C. Alternativamente, uma pequena quantidade de fermento biológico pode ser adicionada ao meio no momento do uso, para estimular mais a ovoposição.

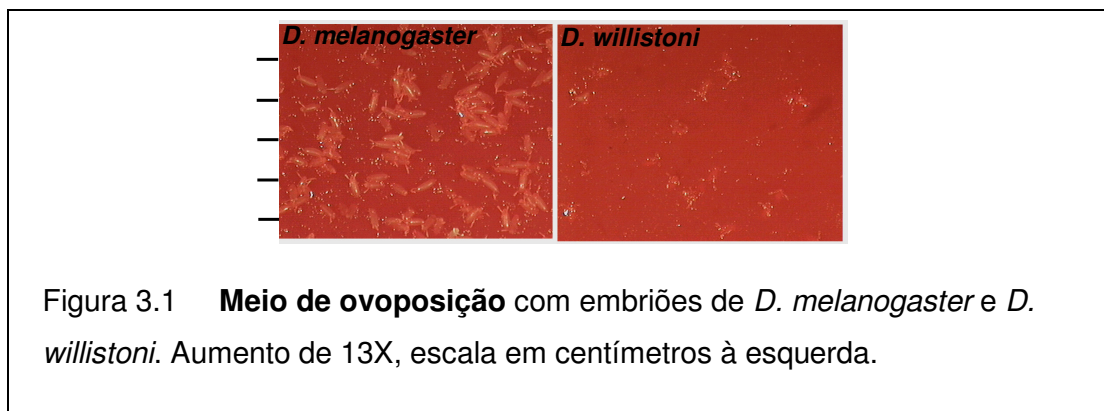


Figura 3.1 **Meio de ovoposição** com embriões de *D. melanogaster* e *D. willistoni*. Aumento de 13X, escala em centímetros à esquerda.

3.2 Obtenção de DNA genômico de *Drosophila*

DNA genômico das linhagens de *D. willistoni* e linhagem controle de *D. melanogaster* é extraído de aproximadamente 50 moscas (25 fêmeas e 25 machos) pela técnica de fenol-clorofórmio, baseado no método de Jowett (1986). As moscas são colocadas em jejum em vidros de cultura contendo apenas papel umedecido em água por O/N. Estas são observadas em microscópio esterioscópico para evitar contaminação da amostra por ácaros. As moscas selecionadas são congeladas em nitrogênio líquido dentro de tubos de microcentrífuga de 1,5 mL e maceradas com ponteiros fechadas e esterilizadas. Após maceração, as moscas são incubadas em 750 μ L de tampão de lise (NaCl 60 mM + EDTA 100 mM + Tris 100 mM + SDS 1% p/v), a 65°C por 1h para rompimento de tecidos e membranas.

A extração das proteínas é feito por um volume de fenol tamponado pH 8 (INVITROGEN) por inversão durante 10 min. A separação das fases é por centrifugação de 13000 rpm por 15 min. O passo de extração seguinte é feito por um volume de fenol-clorofórmio, seguido de inversão de 10 min, e separação de

fases por centrifugação a 13000 rpm por 15 min. Este passo é repetido por mais uma ou duas vezes conforme o aspecto do sobrenadante. O passo final de extração é feito com um volume de clorofórmio, seguido de inversão por 10 min e centrifugação a 13000 rpm por 15 min.

A precipitação é feita com adição de 0,2M de cloreto de sódio e dois volumes de etanol absoluto, por pelo menos 2h a -20°C. O DNA é centrifugado a 13000 rpm por 15 min. Este precipitado é lavado com etanol 70% para retirada de sal, secado em estufa 37°C e eluído em 30 µL de água milliQ autoclavada. O DNA é tratado com 15 µg/mL de RNase e quantificado em gel de agarose (Seção 3.11).

3.3 Obtenção de RNA de adultos e embriões de *Drosophila*

A extração de RNA de 20 moscas adultas (10 fêmeas e 10 machos), de embriões de 1h e embriões O/N (ou seja, de diferentes estágios de desenvolvimento), é realizada pelo método TRIZOL® (INVITROGEN).

As moscas adultas são selecionadas da mesma forma que para extração de DNA, como descrito na Seção 3.2. Os embriões foram separados do meio de ovoposição (Figura 3.1), com auxílio de pinça e agulha, e decorionados com hipoclorito de sódio 3% (água sanitária comercial) por 5 min.

Tanto adultos quanto embriões foram colocados em tubos de centrífuga de 1,5 mL e imediatamente congelados em nitrogênio líquido. A maceração foi feita em 50 µL de TRIZOL® (INVITROGEN), e não água como sugerido no protocolo do fabricante, com ponteiros fechadas e esterilizadas. Após maceração, o volume de

TRIZOL® é aumentado para 750 µL e é adicionado 250 µL de água tratada com DEPC (INVITROGEN). O procedimento a seguir segue o protocolo do fabricante.

O RNA das moscas adultas e dos embriões é eluído em 30 µL e 10 µL, respectivamente, de água tratada com DEPC (INVITROGEN).

A integridade do RNA extraído é analisada em gel de agarose (Seção 3.11).

3.4 Síntese de cDNA

A síntese de cDNA é precedida pelo tratamento do RNA com DNase (PROMEGA) para eliminar possível contaminação de DNA. Amostra de 6 µL de RNA total é tratada com 3U de DNase, em tampão apropriado, em volume final de 10 µL. A reação de lise, realizada por 30 min a 37°C, é parada por 1 µL de STOP SOLUTION (PROMEGA) e a enzima é inibida a 65°C por 10 min.

Amostras de 5 µL a 10 µL de RNA, tratado com DNase, são usadas na síntese de cDNA que segue o protocolo da enzima Transcritase Reversa M-MLV® (INVITROGEN).

A investigação da expressão dos TEs *hobo* e *gypsy* foi feita com cDNA sintetizado a partir de 250 ng de iniciadores randômicos (PROMEGA), enquanto a expressão dos TEs *P* e *412* foi feita com cDNA sintetizado a partir de 2 pmol de iniciadores específicos. O cDNA de *P* é sintetizado com o iniciador reverso mele3- (Figura 3.3A, seqüência na Tabela 3.2) e o de *412* com o iniciador reverso 412RTAS (Figura 3.2C, seqüência na Tabela 3.2) .

3.5 Reação de Polimerização em Cadeia (PCR)

Amostras de 30 ng de DNA genômico ou 2 µL de cDNA são submetidas à PCR em 1X de tampão de reação da Taq DNA polimerase (INVITROGEN ou PROMEGA), 2,5 mM de MgCl₂ (INVITROGEN ou PROMEGA), 10 mM de dNTPs (INVITROGEN ou PROMEGA), 100 pmol de cada iniciador e 1U de Taq DNA Polimerase (INVITROGEN ou PROMEGA). A maioria das PCRs é realizada em volume de 15 µL.

O modelo do termociclador usado é PTC-100 PROGRAMMABLE THERMAL CONTROLLER® (MJ RESEARCH, INC.), para tubos de reação de 500 µL ou 200 µL.

Os iniciadores e programas usados no trabalho estão listados nas Tabelas 3.2 e 3.3, respectivamente, e especificados nas Seções seguintes.

3.5.1 PCR de DNA genômico

3.5.1.1 Controle da qualidade do DNA genômico

Os DNAs genômicos usados nas PCRs são testados previamente com os iniciadores AS (5'-AATCACCATCGGCAACGAG-3') e AR (5'-AAGCACTTGCGGTGGACGAT-3') para o gene de *actina* (Klein, 2002). Estes iniciadores amplificam um fragmento de 733 pb da posição nucleotídica 1262 a 2005 do gene de *actina* de *D. melanogaster* (código de acesso ao GenBank M18829). Em *D. willistoni*, o fragmento amplificado é de 383 pb pela ausência do íntron no gene desta espécie (Klein, 2002).

O programa de amplificação (actina) está descrito na Tabela 3.3.

Tabela 3.2 Oligonucleotídeos usados nas PCRs

| Iniciadores | Seqüência (5' → 3') | Sentido | Tm* (°C) |
|---------------------------------|-------------------------|---------|----------|
| 412RTS | GCGATTGCCATTTGGCTT | S | 43 |
| 412RTA | TGGGGTTCACCATCGAGAA | AS | 46 |
| AS (Actina) | AATCACCATCGGCAACGAG | S | 46 |
| AR (Actina) | GAAGCACTTGCGGTGGACGAT | AS | 51 |
| GYP3S2 | AAAGGCGAYTTGGTTGACTCC | S | 51 |
| GYP3AS2 | CARGTGGCTRGGTTGRGTGTG | AS | 52 |
| M-IR | CATAAGGTGGTCCCGTCG | S e AS | 50 |
| mele3- | GTTTATCAACATCGACGTTTC | AS | 43 |
| meli1+ | TACACAAACAGAGT/CCTGTT | S | 43 |
| meli2+ | GTATATCAGAAT/CAAAAACCTG | S | 42 |
| meli3- | CATTTCTGTATTCCTGGCT/ATT | AS | 44 |
| P651 (hobo externo) | CACCTCCAATTTATCCCGCC | S | 49 |
| P1597 (hobo externo) | GGATGGCAATACGAAGC | AS | 42 |
| P991 (hobo interno) | ACCGTCGACATGTGGAC | S | 56 |
| P1407 (hobo interno) | GTAGTTGGAGTTCCATCTAGT | AS | 40 |

* Tm: temperatura de anelamento fornecida por Invitrogen *Custom Primers*, com exceção da Tm de M-IR, cuja Tm foi estabelecida pelo programa Vector. Os códigos **S** e **AS** são abreviações de senso e anti-senso, respectivamente.

Tabela 3.3 Programas de PCR usados

| Programas de PCR | actina | | gypsy | | 412 | | i1e3 | |
|------------------|-----------------------|-------|-----------------------|-------|-----------------------|-------|-----------------------|-------|
| | temperatura | tempo | temperatura | tempo | temperatura | tempo | temperatura | tempo |
| passo 1 | 94° C | 5' | 96° C | 3' | 94° C | 3' | 94° C | 5' |
| passo 2 | 94° C | 40" | 96° C | 40" | 94° C | 40" | 94° C | 40" |
| passo 3 | 58° C | 30" | 55° C | 30" | 43° C | 30" | 58° C | 30" |
| passo 4 | 72° C | 40" | 72° C | 1' | 72° C | 40" | 72° C | 1'30" |
| passo 5 | ir para o passo 2 39x | | ir para o passo 2 39x | | ir para o passo 2 39x | | ir para o passo 2 39x | |
| passo 6 | 72° C | 7' | 72° C | 10' | 72° C | 10' | 72° C | 10' |

Continuação

| Programas de PCR | Píntron | | hobointerno | | TD50-40 | |
|------------------|-----------------------|-------|-----------------------|-------|------------------------|-------|
| | temperatura | tempo | temperatura | tempo | temperatura | tempo |
| passo 1 | 94° C | 5' | 94° C | 5' | 94° C | 5' |
| passo 2 | 94° C | 40" | 94° C | 40" | 94° C | 1' |
| passo 3 | 56° C | 30" | 50° C | 30" | 50° C – 1° C por ciclo | 30" |
| passo 4 | 72° C | 1'30" | 72° C | 1' | 72° C | 1'30" |
| passo 5 | ir para o passo 2 39x | | ir para o passo 2 39x | | ir para o passo 2 10X | |
| passo 6 | 72° C | 10' | 72° C | 10' | 94° C | 1' |
| passo 7 | | | | | 40° C | 30" |
| passo 8 | | | | | 72° C | 1'30" |
| passo 9 | | | | | ir para o passo 6 25 X | |
| passo 10 | | | | | 72° C | 10' |

3.5.1.2 Estudo da presença de *gypsy* em linhagens de *D. willistoni*

Para o estudo da presença do TE *gypsy* em linhagens de *D. willistoni* foi utilizado o par de iniciadores GYP3S2 (5'-AAAGGCGAYTTGGTTGACACTCC-3') e GYP3AS2 (5'-CARGTGGCTRGGTTGRGTGTG-3') descrito por Herédia *et al.* (2004). Estes iniciadores amplificam um fragmento de 485 pb da região codificadora do envelope na posição nucleotídica 6026 a 6511 do elemento *gypsy* de *D. melanogaster* (código de acesso ao GenBank M12927). A posição dos iniciadores está esquematizada na Figura 3.2B. Dentre os três pares de iniciadores desenhados pelos autores para um estudo filogenético, este foi o único que gerava produto de amplificação em *D. willistoni*, sugerindo uma grande divergência da seqüência de *gypsy* desta espécie (Fabiana Herédia, comunicação pessoal). Mesmo esta seqüência, apresenta a mais baixa identidade quando comparada às seqüências de outras espécies de *Drosophila* (Herédia *et al.*, 2004).

O programa de amplificação (*gypsy*) está descrito na Tabela 3.3.

3.5.1.3 Estudo da presença de 412 em linhagens de *D. willistoni*

Para o estudo da presença do TE 412 foi utilizado o par de iniciadores 412RTS (5'-GCGATTGCCATTTGGCTT-3') e 412RTA (5'-TTCTCGATGGTGAACCCCA-3') desenhado para a realização deste trabalho. Estes iniciadores amplificam um fragmento de 780 pb dentro da ORF2 na posição nucleotídica 4195 a 4976 do elemento 412 de *D. melanogaster* (código de acesso

ao GenBank X04132). A região flanqueia o domínio da enzima transcriptase reversa, necessária para a síntese da fita de DNA que se insere no genoma. A posição dos iniciadores está esquematizada na Figura 3.2C.

O programa de amplificação (412) está descrito na Tabela 3.3.

3.5.1.4 Cópias do elemento *P* no genoma

A integridade das cópias do elemento *P* no genoma das linhagens foi estabelecida por PCR usando o iniciador M-IR (5'-CATAAGGTGGTCCCGTCG-3') desenhado por Haring *et al.* (1995). Este iniciador amplifica um fragmento de 2880 pb da posição nucleotídica 14 a 2894 nt do elemento *P* canônico (código de acesso ao GenBank M69216). Estes iniciadores amplificam seqüências de *P* que mantiveram as ITRs conservadas.

O programa de amplificação (i1e3) está descrito na Tabela 3.3. Além da temperatura de anelamento de 58°C foi testada a temperatura de 55°C.

3.5.2 PCR de cDNA

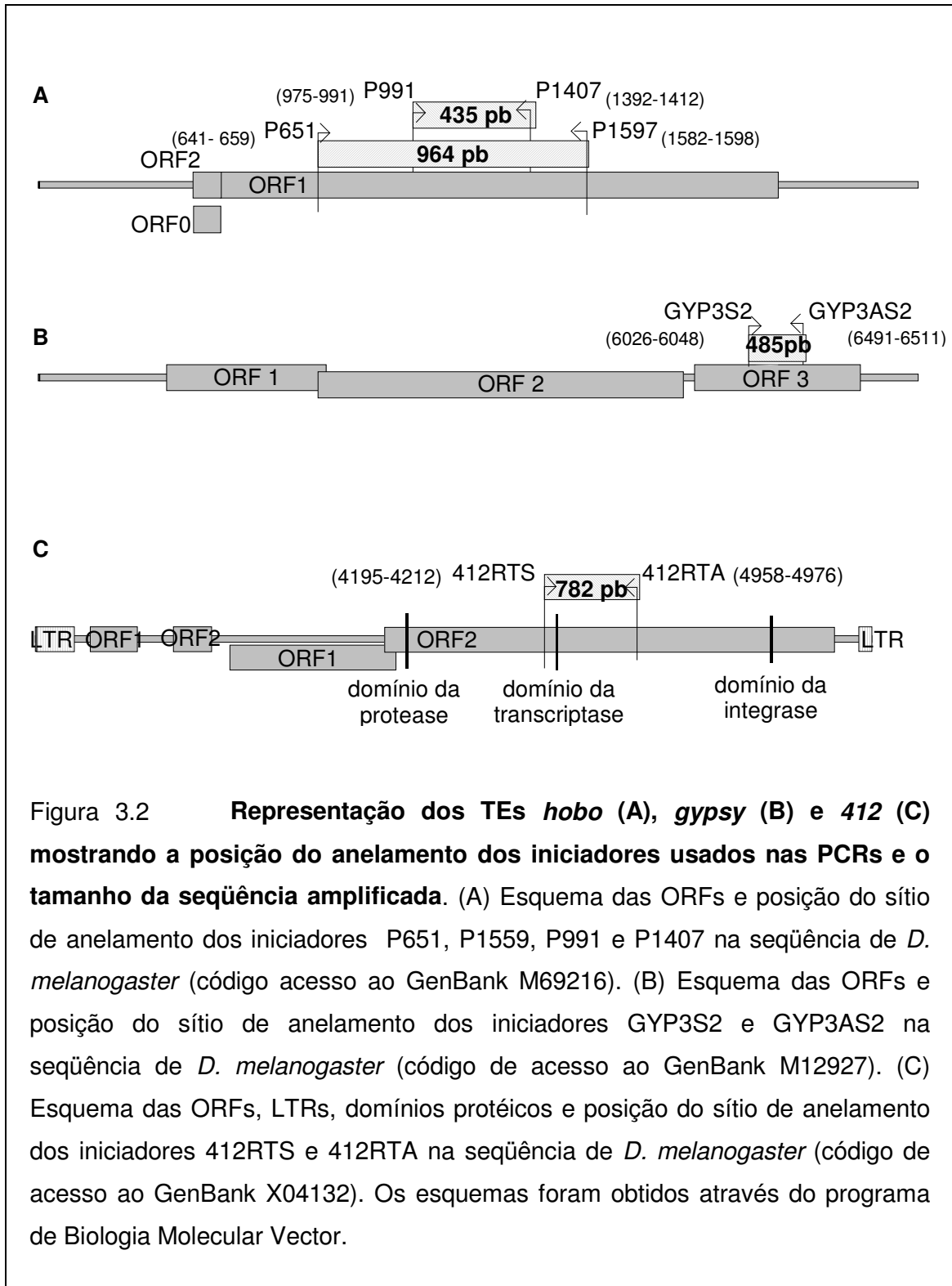
3.5.2.1 Expressão do gene de *actina* em linhagens de *D. willistoni*

Os iniciadores para o gene de *actina*, desenhados por Klein (2002), são usados em dois testes: (1) controle negativo da contaminação do RNA por DNA e, (2) controle positivo da eficiência da síntese de cDNA.

Antes da síntese de cDNA, 1 µL de RNA tratado com DNase é submetido a uma PCR com estes iniciadores. Assim, nos certificamos que os resultados positivos obtidos em outras PCRs revelam a expressão gênica e não são resultado de amplificação de DNA contaminante, já que a maioria dos iniciadores usados no estudo não flanqueiam regiões com íntrons.

Como são iniciadores para um gene de expressão constitutiva, é esperado que todas as amostras de *D. willistoni* amplifiquem um produto de 383 pb, e 733 pb em *D. melanogaster*, se a síntese de cDNA foi bem sucedida.

A seqüência dos iniciadores, posição de anelamento e condições de amplificação estão descritas na Seção 3.5.1.1.



3.5.2.2 Expressão de *P* em linhagens de *D. willistoni*

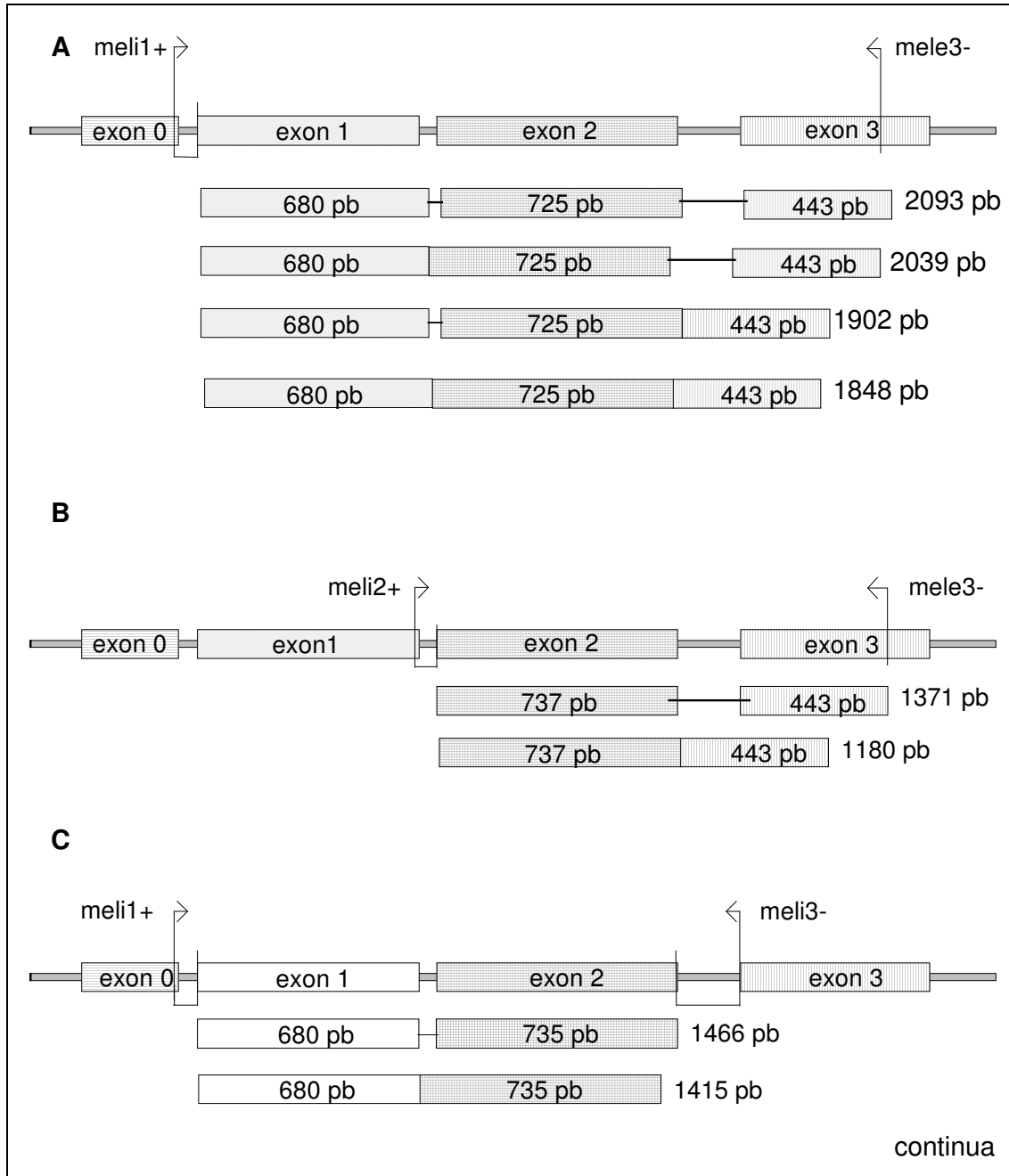
A análise da expressão de *P* é realizada por quatro combinações de iniciadores desenhados por Haring *et al.* (1998).

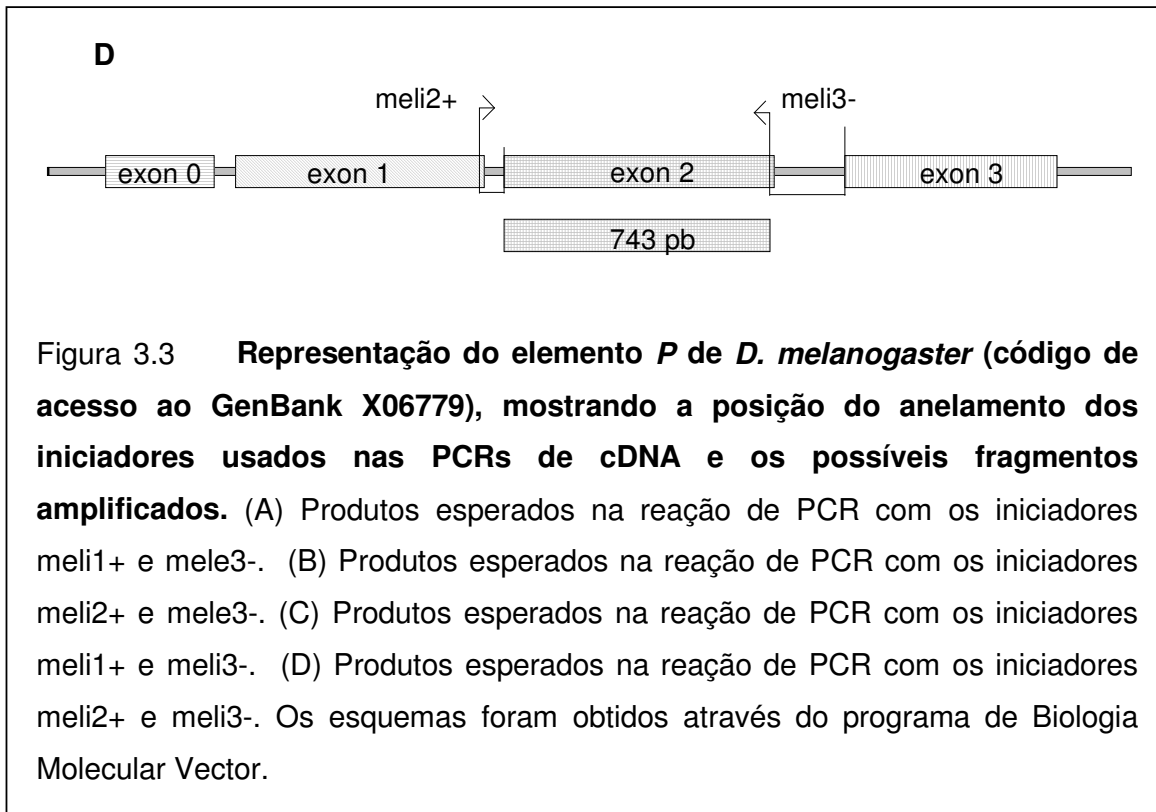
Duas reações de PCR são necessárias no estudo da expressão de *P*. A primeira é realizada com os iniciadores meli1+ (5'-TACACAAACAGAGT/CCTGTT-3'), e mele3- (5'-GTTTATCAACATCGACGTTTC-3'), cujos produtos de amplificação não são observados em gel de agarose corado com brometo de etídio porque não é realizada a síntese da fita complementar do cDNA e, conseqüentemente, não há crescimento exponencial dos fragmentos nesta primeira amplificação. O iniciador mele3- anela na posição 2581-2561 da seqüência canônica de *P* de *D. melanogaster* (código de acesso ao GenBank X06779). O iniciador meli1+ anela na posição 431- 442 do éxon 0 e 508-581 do éxon 1 após o processamento do íntron IVS1 da seqüência de *P* canônico.

Amostra de 1 µL desta primeira PCR é submetida a uma re-amplificação com os mesmos iniciadores e com a combinação de outros três: meli1+ e meli3-, meli2+ e mele3-, meli2+ e meli3-. O iniciador meli2+ (5'-GTATATCAGAAT/CAAAAACCTG-3') anela na posição nucleotídica 1157-1168 do éxon 1 e 1222-1231 do éxon 2 após processamento do íntron IVS2. O iniciador meli3- anela na posição nucleotídica 1947-1943 do éxon 2 e 2154-2138 do éxon 3 após processamento do íntron IVS3. Este iniciador possibilita detectar o processamento do íntron 3, que tem uma importante função regulatória da transposição do elemento *P*.

Esquema mostrando o sítio de anelamento dos iniciadores e os produtos de amplificação esperados para seqüência de *P* canônico estão na Figura 3.3.

O programa de amplificação (i1e3) e de re-amplificação (Pintron) estão descritos na Tabela 3.3.





3.5.2.3 Expressão de *hobo* em linhagens de *D. willistoni*

A análise da expressão de *hobo* é realizada com os pares de iniciadores P651 (5'-CACCTCCAATTTATCCCGCC-3') e P1597 (5'-GGATGGCAATACGAAGC-3'), desenhados por Rufo (1997); e P991 (5'-ACCGTCGACATGTGGAC-3') e P1407 (5'-GTAGTTGGAGTTCCATCTAGT-3'), desenhados por Klein (2002). O primeiro par de iniciadores amplifica um fragmento de 964 pb na posição nucleotídica de 641 a 1598 enquanto o segundo amplifica um fragmento de 438 pb na posição nucleotídica de 975 a 1412 da seqüência de *D. melanogaster* (código de acesso ao GenBank M69216). As posições de anelamento dos iniciadores estão esquematizadas na Figura 3.2A.

O programa de amplificação para os iniciadores mais externos (TD50-40) e mais internos (hobointerno) estão descritos na Tabela 3.3

3.5.2.4 Expressão de *gypsy* em linhagens de *D. willistoni*

Os mesmos iniciadores, e a mesma condição de amplificação, usados na PCR de DNA genômico (Seção 3.4.2.2) são usados no estudo da expressão de *gypsy*. Como nenhum íntron está presente na região amplificada, o fragmento esperado nesta PCR deve ter o mesmo tamanho que o fragmento amplificado de DNA genômico (Figura 3.2B).

3.5.2.5 Expressão de *412* em linhagens de *D. willistoni*

Os mesmos iniciadores, e a mesma condição de amplificação, usados na PCR de DNA genômico (Seção 3.4.2.3) foram usados no estudo da expressão de *412*. Como nenhum íntron está presente na região amplificada, o fragmento esperado nesta PCR deve ter o mesmo tamanho que o fragmento amplificado de DNA genômico (Figura 3.1C).

3.6 *Southern blot*

3.6.1 Eletroforese e preparo da membrana

As amostras de PCR são submetidas a uma corrida eletroforética em baixa voltagem (1V/cm) em gel de agarose 1% corado com 0,5 µg/mL de brometo de etídio.

O DNA é desnaturado pela imersão do gel em solução desnaturante (NaCl 1,5 M + NaOH 0,5 M) por 30 min com agitação leve seguido de tratamento, nas mesmas condições, por solução neutralizante (NaCl 1,5 M + Tris 0,5 M pH 7,5). O tratamento com ácido clorídrico, normalmente usado em *Southern blot* genômico, não é usado neste trabalho porque as amostras para transferência são produtos de PCR.

A transferência do DNA para a membrana de nylon HYBOND N+® (AMERSHAM) é feita por capilaridade usando solução de SSC 20X (citrato de sódio 0,3M + NaCl 3M pH 7,0), por um período de 12 a 16 h. A fixação do DNA à membrana é feita a 80°C por 2h.

3.6.2 Preparação da sonda

As sondas são feitas pela incorporação de nucleotídeo ligado à fluoresceína via utilização da subunidade Klenow da DNA polimerase e de iniciadores randômicos, seguindo o protocolo de marcação do *kit* GENE IMAGES RANDOM PRIMER LABELLING MODULE ® (AMERSHAM).

As sondas são sintetizadas a partir de seqüências de *D. melanogaster* já clonadas e descritas na literatura, com exceção de uma das sondas de *hobo*, cuja seqüência é de *D. paulistorum* (Fabiano Pimentel Torres, comunicação pessoal). Os fragmentos utilizados como sondas estão especificados na Tabela 3.4.

Tabela 3.4 Sondas usadas nos experimentos de *Southern blot*

| Sonda | Preparo da sonda | Referência |
|-----------------|--|--|
| <i>P</i> | Plasmídeo íntegro p π 25.1 | X06779 O'Hare e Rubin (1983) |
| <i>hobo</i> (1) | Produto de PCR de pHFL1 com os iniciadores P651 e P1597, purificado por coluna GFX® (AMERSHAM). | M69216 Calvi <i>et al.</i> (1991) |
| <i>hobo</i> (2) | Plasmídeo íntegro. Clone com a seqüência de <i>hobo</i> de <i>D. paulistorum</i> , obtida com os iniciadores P991 e P1407. | Fabiano Pimentel Torres (comunicação pessoal) |
| <i>gypsy</i> | Produto de PCR de pGGHS com os iniciadores GYP3S2 e GYP3AS2, purificado por coluna GFX® (AMERSHAM). | Dorsett <i>et al.</i> (1989) |
| 412 | Produto de PCR de cDM2042 com os iniciadores 412RTS e 412RTA, purificado por coluna GFX® (AMERSHAM). | X04132 Yuki <i>et al.</i> (1986) |

3.6.3 Hibridação

A hibridação, o bloqueamento da membrana, as lavagens e a detecção de sinal seguiram o protocolo do *kit* CPD-STAR DETECTION MODULE ® (AMERSHAM).

3.7 Hibridação *in situ* de embriões inteiros

3.7.1 Preparação dos embriões

As moscas são colocadas em meio de ovoposição (Seção 3.1.2) por um período de 12 a 16 h, em câmara de 17°C, permitindo que embriões de praticamente todos os estágios de desenvolvimento (que leva 20-24 h) estejam

representados na amostra. Quando a análise de algum estágio de desenvolvimento específico é necessária, as moscas são colocadas para ovopositar por apenas 1h. Após este período, os meios de ovoposição são separados e mantidos a 17°C até o tempo correspondente ao estágio de desenvolvimento desejado. Neste caso, antes da coleta dos embriões, o procedimento de colocar as moscas em meios de ovoposição por 1h é repetido duas vezes, e estes meios são descartados. Isso é feito para estimular a ovoposição dos ovos que estão sendo retidos pelas fêmeas e cujo desenvolvimento já está avançado.

Os embriões são isolados do meio de cultura com auxílio de pinça e agulha (Figura 3.1) e colocados em suportes com malha fina. Estes são decorionados por hipoclorito de sódio 3% (água sanitária comercial) por 5 min. Logo após, os embriões são fixados em solução salina de formaldeído (formaldeído 5,3% + EGTA 19 mM + 0,37X PBS + 57% heptano) por 15 min, sob agitação, lavados e guardados em metanol à -20°C, até o momento da hibridação.

3.7.2 Hibridação *in situ* de embriões inteiros

O protocolo de hibridação segue Tautz e Pfeifle (1989) com modificações. Os passos críticos estão descritos, resumidamente, a seguir.

Os embriões, após serem decorionados e fixados, são tratados por Xilol durante 30 min. Este reagente abre os poros dos embriões, preparando-os para os tratamentos seguintes. Após lavagem com etanol e metanol, é feita uma

segunda fixação por solução de formaldeído (6:1 PBT/Formaldeído) por 25 min. O tratamento com 4 µg/mL de proteinase K (INVITROGEN) é feito por 5 min, seguido de lavagens por PBT (10% Tween + PBS 1X) e mais uma fixação por solução de formaldeído por 25 min. Os embriões passam por uma série de lavagens com PBT, seguido a hibridação em solução de hibridação (formamida 50% + SSC 5X + DNA de esperma de salmão 100 µg/mL + Heparina 50 µg/mL + Tween 20 1%) a 55°C por O/N em banho-maria. A concentração estimada de ribossonda usada é de 10 ng/µL. Após lavagens, os embriões são incubados com 1:2000 de anticorpo anti-digoxigenina (ROCHE) durante 2 h a temperatura de 4°C. A coloração é feita por 50 mg/mL de BCIP e 100 mg/mL de NBT em Solução de Coloração (NaCl 100 mM + MgCl₂ 50 mM + Tris 100 mM pH 9,5 + Tween 20 0,1%). A reação é parada por lavagens com PBT, etanol e metanol. Os embriões passam por mais um passo de fixação por solução formaldeído (6:1 PBT/Formaldeído). Para remover *background*, uma série de lavagens por metanol e etanol é realizada antes dos embriões serem guardados em glicerol.

As imagens foram obtidas por capturador de imagem GKB CCD color câmara CC-8703 acoplado a microscópio estereoscópico Zeiss Stemi 2000-C, usando programa de computador Microsoft (R) Videocap 1981-1998, Vídeo Capture tool. Ou, por capturador de imagem CDC Samsung SAC 410 ND acoplado a microscópio Leica DMLS, usando programa de computador Videokit SE100.

3.7.3 Preparação das sondas

As sondas de RNA utilizadas na detecção da expressão dos TEs são marcada por digoxigenina pela incorporação de dig-UTP na fita de RNA sintetizada pelas RNAs polimerases T7 e SP6, seguindo o protocolo DIG RNA LABELLING KIT (SP6/T7)[®] (ROCHE), ou o protocolo da PROMEGA quando a RNA polimerase T3 é usada.

As seqüências molde para a síntese das sondas estão clonadas em vetores contento os promotores T3, T7, SP6, necessários na síntese. O limite mínimo de tamanho das seqüências clonadas é de 300 pb, para manter a especificidade da hibridação, e máximo de 1000 pb, devido à permeabilidade do embrião. Neste trabalho, optou-se por não tratar as sondas de RNA com tampão carbonato, que quebra a sonda em pedaços menores, como sugerido em alguns protocolos, mantendo-as íntegras.

3.7.3.1 Sonda do elemento *P*

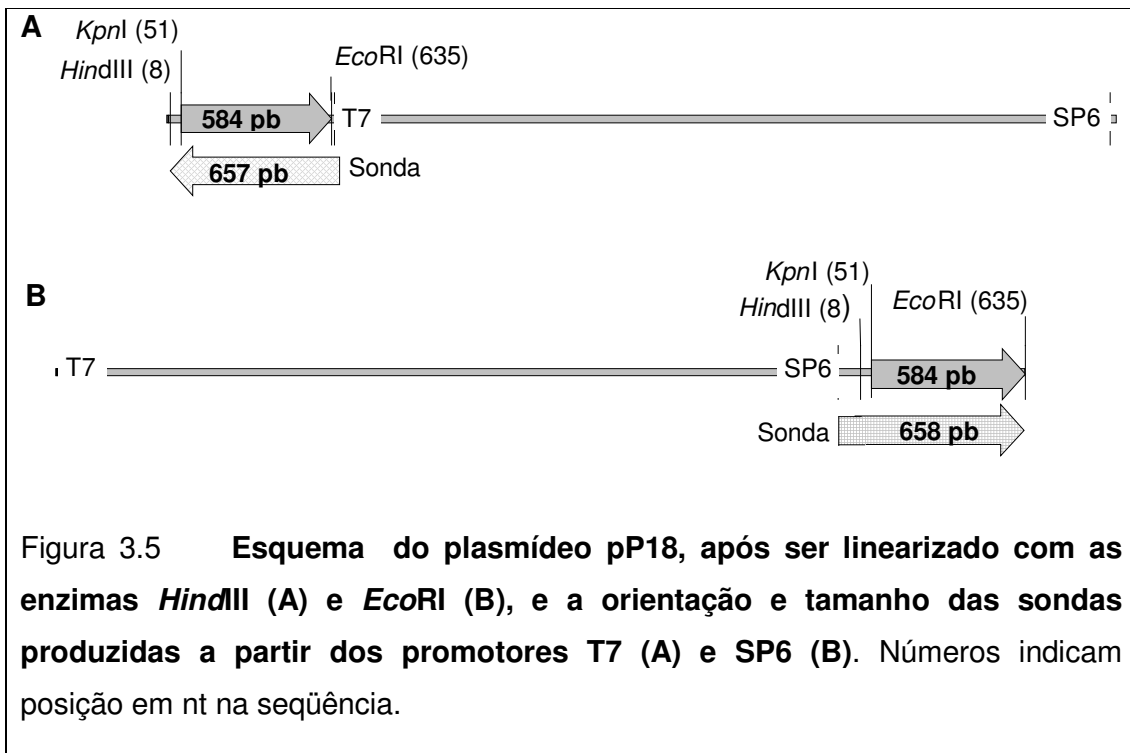
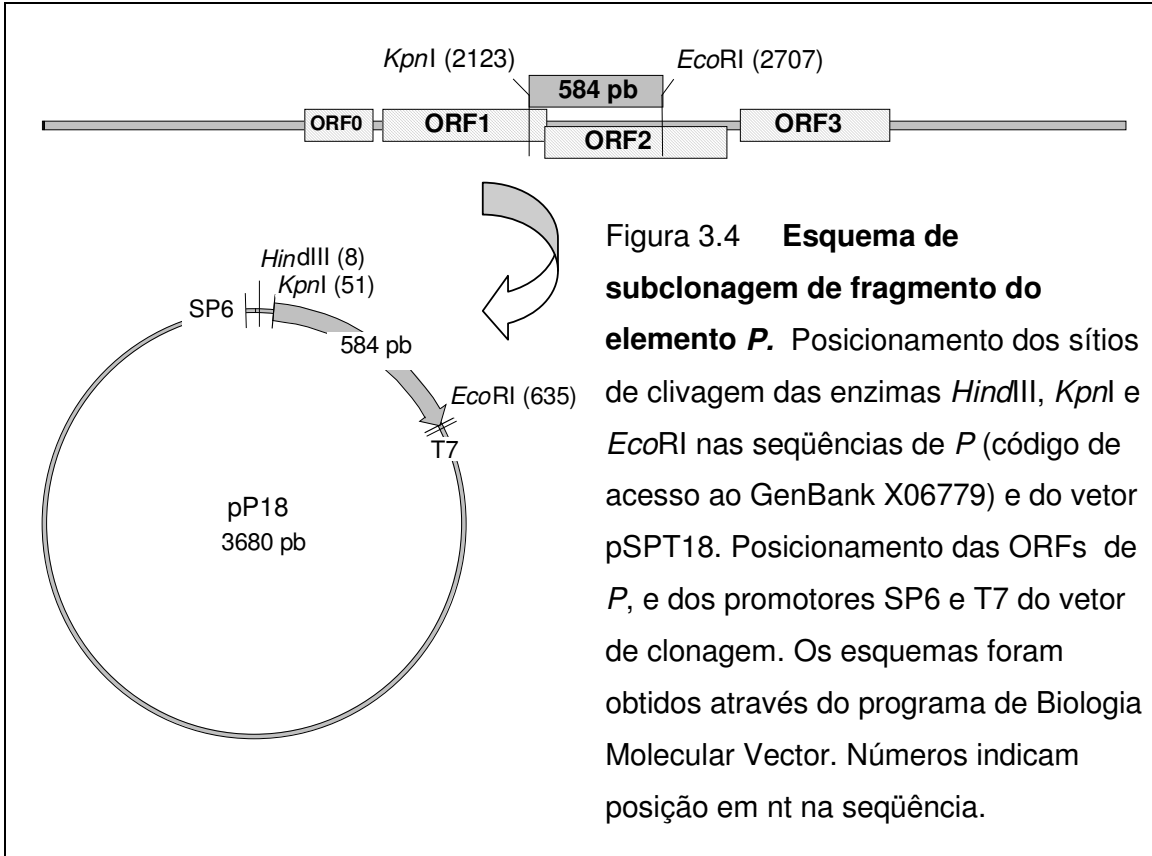
Uma seqüência de 584 pb entre os sítios de clivagem *KpnI* e *EcoRI*, envolvendo a ORF1 e ORF2 do elemento *P*, foi sub-clonada em vetor pSPT18[®] (ROCHE). Esta nova construção foi chamada de pP18 e está esquematizada na Figura 3.4.

A ligação vetor-inserto é realizada pela enzima T4 DNA ligase (INVITROGEN) seguindo protocolo sugerido para ligação de segmentos com pontas coesivas da própria enzima, com exceção das condições de reação. A temperatura utilizada

foi de 4°C, e não a temperatura ambiente, e o tempo de ligação foi O/N, e não 5 min como sugerido. O protocolo de transformação bacteriana está na Seção 3.8.

Para a síntese da sonda de tamanho específico, o plasmídeo pP18 foi clivado em duas posições conforme a RNA polimerase utilizada para a síntese. A enzima *HindIII* é escolhida para linearizar o plasmídeo para a síntese a partir do promotor T7, gerando um fragmento de 657 pb. A sonda produzida é senso e hibrida com o RNA mensageiro produzido pelos embriões. A sonda produzida a partir do promotor SP6 é de 658 pb, devido a linearização do plasmídeo com enzima *EcoRI*. Esta sonda, por possuir a mesma seqüência do RNA mensageiro, é utilizada como controle negativo das hibridações. A Figura 3.5 mostra o posicionamento dos principais sítios de clivagem e seqüências promotoras SP6 e T7 do plasmídeo pP18 após ser linearizado.

Pelo menos 3 µg de plasmídeo é usado para produzir moldes lineares. A reação de clivagem é realizada em volume de 30 µL, em tampão apropriado e 15U (5% do volume de reação) de enzima de restrição. O excesso de enzima é para assegurar a clivagem total dos plasmídeos em 4h de incubação a 37°C. O plasmídeo linear é purificado por fenol-clorofórmio, conforme sugerido pelo kit de marcação da sonda (ROCHE), precipitado com etanol absoluto, centrifugado e eluído em água tratada com DEPC. A quantificação é realizada em gel de agarose corado com brometo de etídio (Seção 3.11).



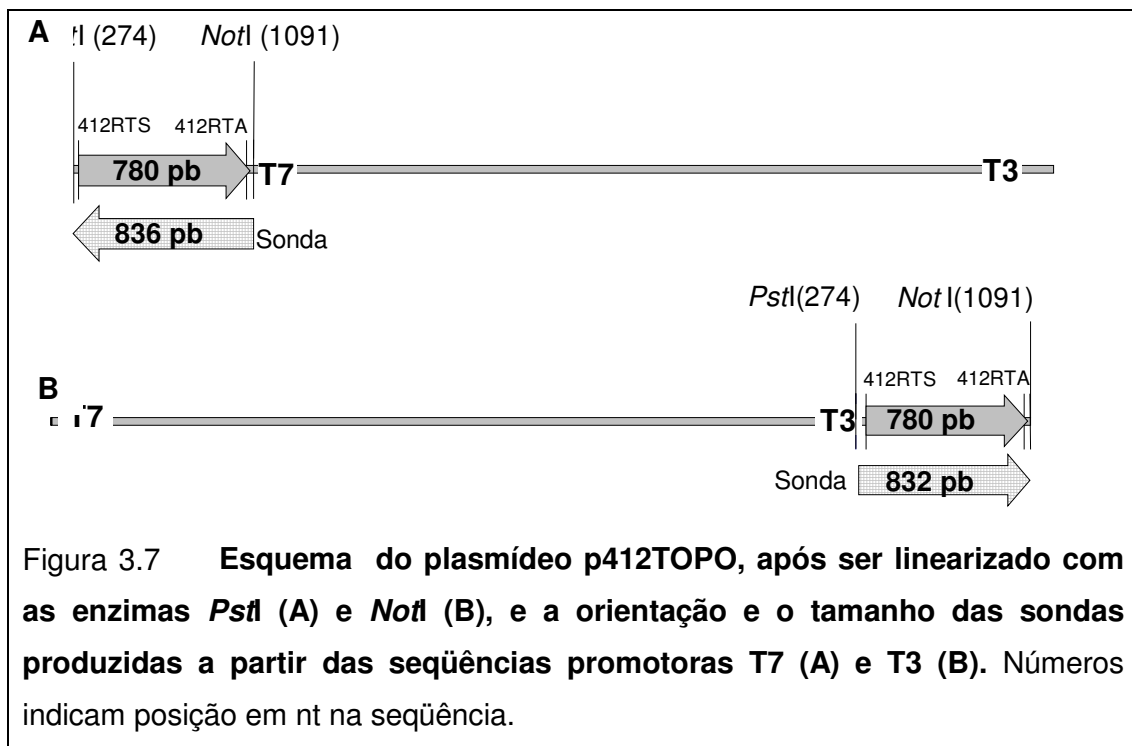
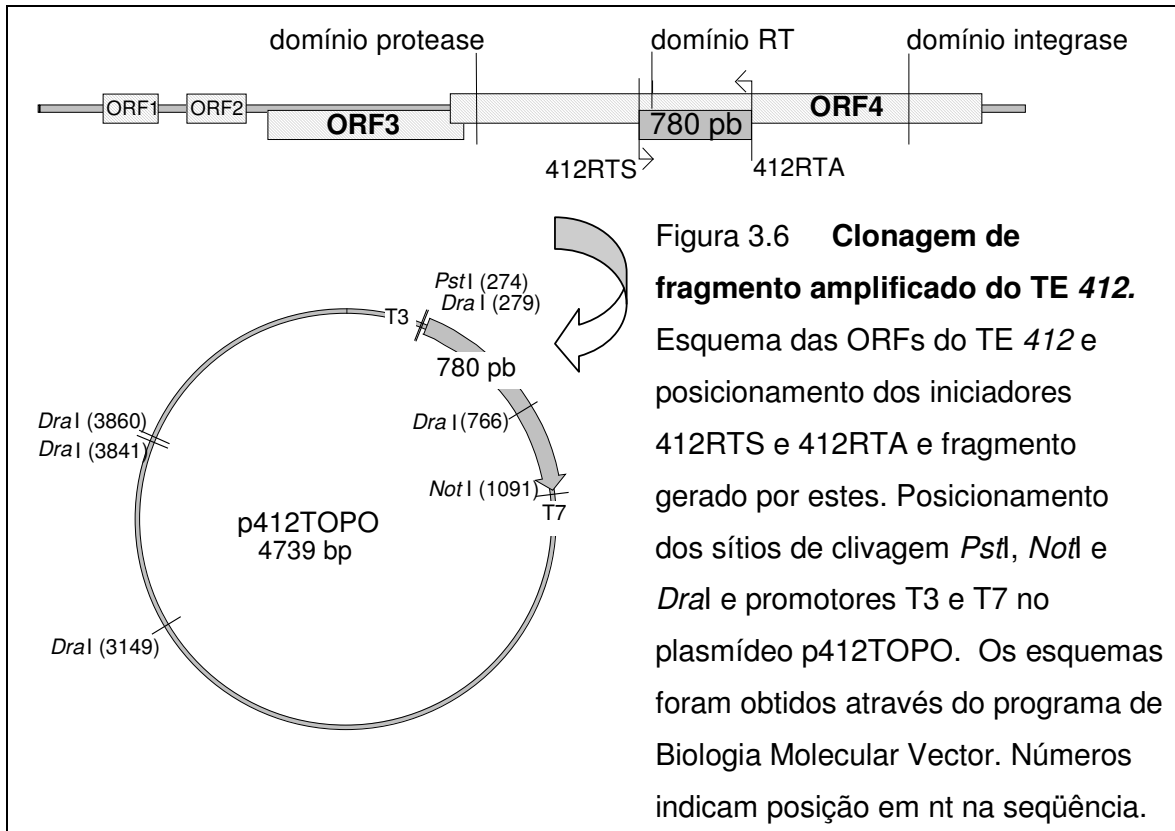
3.7.3.2 Sonda do elemento 412

Uma seqüência de 780 pb, gerada pela amplificação de seqüência do plasmídeo cDM2042 com os iniciadores 412RTS e 412 RTA (Seção 3.5.1.3), é subclonada em vetor pCR4-TOPO TA (INVITROGEN), seguindo protocolo de ligação sugerido pelo fabricante. A orientação do inserto é estabelecida pelo padrão de clivagem gerado pela enzima de restrição *DraI*. Esta nova construção é chamada de p412TOPO. A subclonagem está esquematizada na Figura 3.6.

Para a síntese da sonda de tamanho específico, o plasmídeo p412TOPO é clivado em duas posições conforme a RNA polimerase utilizada. A enzima *PstI* foi escolhida para linearizar o plasmídeo para a síntese a partir do promotor T7, gerando um fragmento de 836 pb. A sonda produzida é senso e hibrida com o RNA mensageiro dos embriões. A sonda produzida a partir do promotor T3 é de 832 pb, devido a linearização do plasmídeo com enzima *NotI*. A sonda, por possuir a mesma seqüência do RNA mensageiro, é utilizada como controle negativo das hibridações. A Figura 3.7 mostra o posicionamento dos principais sítios de clivagem e as seqüências promotoras T7 e T3 do plasmídeo p412TOPO após ser linearizado.

A síntese da sonda com a RNA polimerase T3 segue o protocolo sugerido pelo seu fornecedor (PROMEGA), usando os dig-UTP marcados da ROCHE.

A clivagem para linearizar o plasmídeo é feita como descrito na Seção 3.7.3.1, com o plasmídeo pP18.



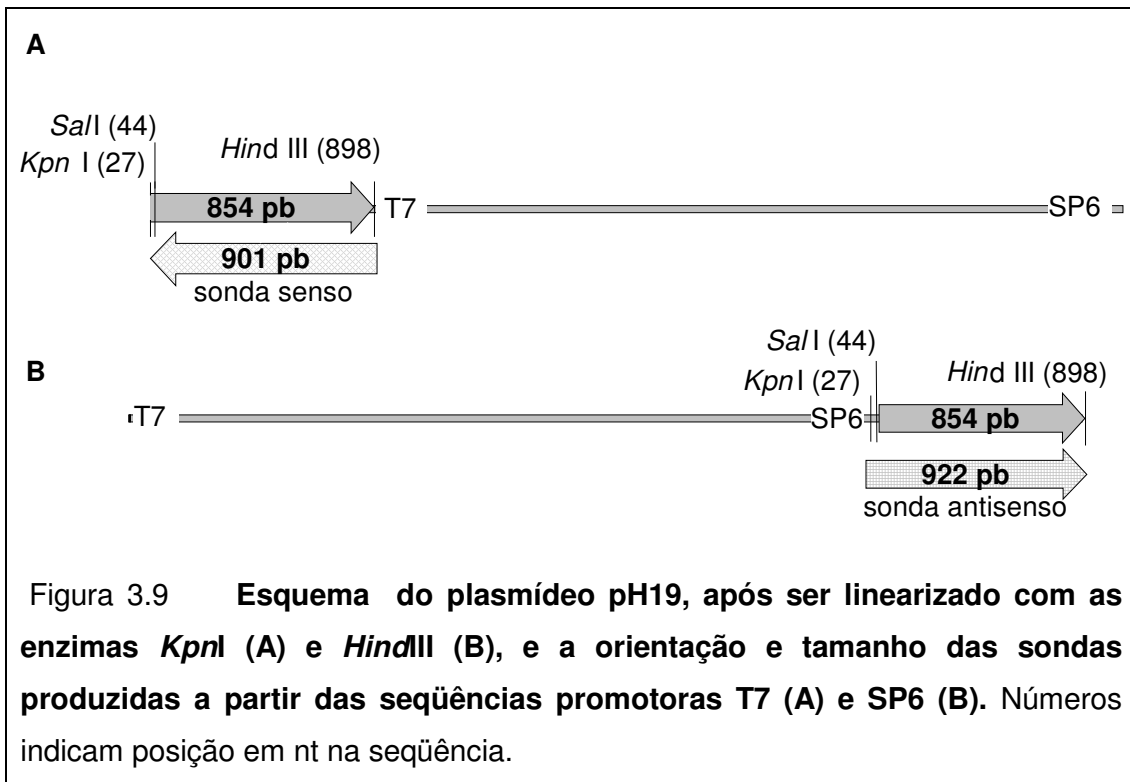
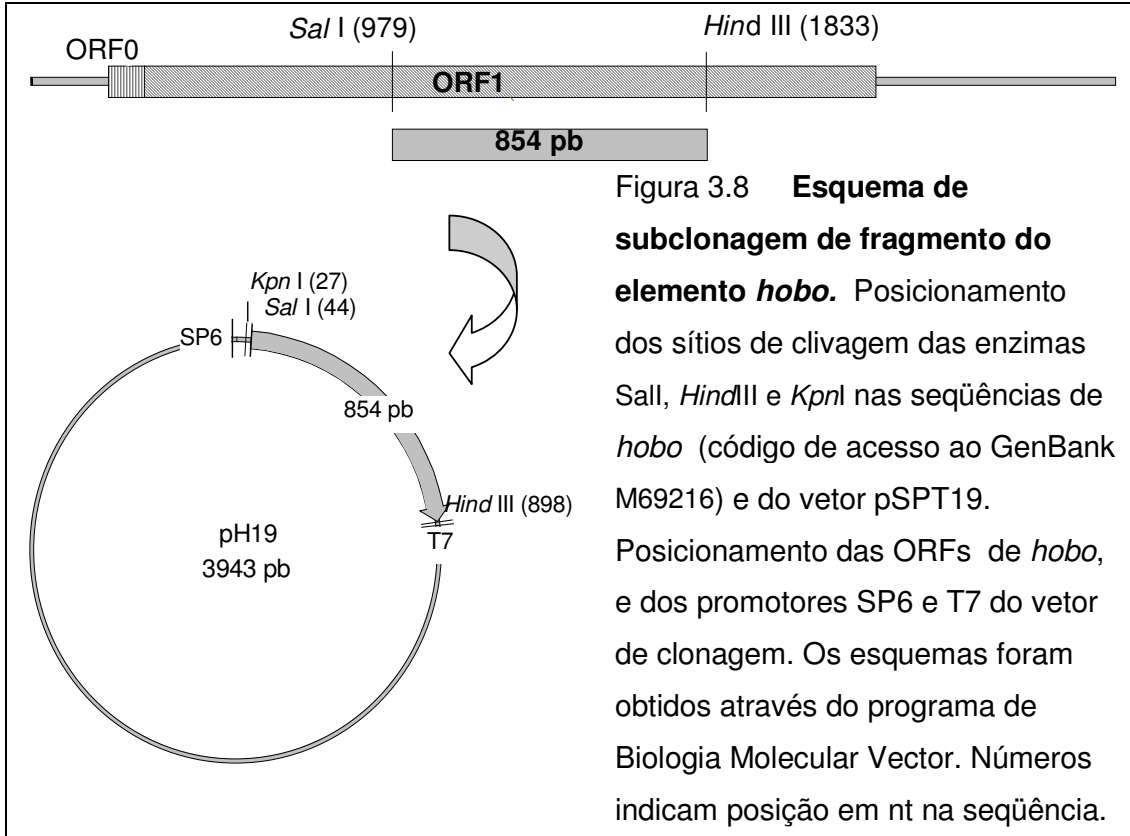
3.7.3.3 Sonda do elemento *hobo*

Uma seqüência de 854 pb entre os sítios de clivagem *SalI* e *HindIII* da ORF1 do elemento *hobo* é subclonada em vetor de expressão pSPT19 ® (ROCHE). Esta nova construção foi chamada de pH19 e está esquematizada na Figura 3.8.

A ligação vetor-inserto é feita conforme descrito na Seção 3.7.3.1.

Para a síntese da sonda de tamanho específico, o plasmídeo pH19 é clivado em duas posições conforme a RNA polimerase utilizada para a síntese. A enzima *KpnI* é escolhida para linearizar o plasmídeo para a síntese a partir do promotor T7, gerando um fragmento de 901 pb. A sonda produzida é senso e hibrida com o RNA mensageiro produzido pelos embriões. A sonda produzida a partir do promotor SP6 é de 922 pb, devido a linearização do plasmídeo com enzima *HindIII*. Esta sonda, por possuir a mesma seqüência do RNA mensageiro, foi utilizada como controle negativo das hibridações. A Figura 3.9 mostra o posicionamento dos principais sítios de clivagem e seqüências promotoras SP6 e T7 do plasmídeo pH19 após ser linearizado.

A clivagem para linearizar o plasmídeo é feita como descrito em 3.7.3.1, com o plasmídeo pP18.



3.8 Transformação bacteriana

A transformação das células XL1-*Blue*, cujo genótipo está apresentado na Tabela 3.5, é feita por choque térmico, seguindo protocolo de Sambrook *et al.* (1989). Os vetores de clonagem utilizados estão listados na Tabela 3.6.

Tabela 3.5 Linhagem bacteriana

| Linhagem | Genótipo | Referência |
|------------------|---|------------------------------|
| XL1- <i>Blue</i> | <i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac</i> [F' <i>proAB lacI^qZΔM15 Tn10(Tet^r)</i>] ^c | Bullock <i>et al.</i> , 1987 |

Tabela 3.6 Vetores de clonagem utilizados

| Vetor de clonagem | Genótipo | Resistência | Fornecedor |
|------------------------|--|------------------------------|------------|
| pCR4-TOPO (3957 pb) | F' <i>mcrAΔ(mrr-hsdRMS-mcrBC)</i> Φ80/ <i>lacZΔM15 ΔlacX74recA1deoR</i> <i>ara D139 Δ(ara-leu)7697 galU galK</i> <i>rpsL (Str^R) end A1 nupG</i> amp^R kamamicina^R | Ampicilina e Kamamicina | INVITROGEN |
| pSPT18 (3104 pb) | amp^R, Tc^R | Ampicilina e tetraciclina | ROCHE |

O preparo das células competentes é por solução de CaCl₂ 1M. A quantidade de vetor usado na transformação é de 150 ng de plasmídeo já extraído, ou toda a reação de ligação. As células juntamente com os insertos

foram submetidos a choque térmico de 42°C a 0°C e logo são recuperados em meio LB líquido (AMERSHAM), a 37°C por 1h.

A seleção das células transformadas é feita em meio LB sólido (LB líquido + 1,5% de ágar) com 60 µg/mL de ampicilina, para selecionar as células transformadas e 12 µg/mL tetraciclina, para reduzir contaminação por outras bactérias.

3.9 Extração de DNA plasmidial

Colônias selecionadas são crescidas em 3 mL de meio LB líquido (AMERSHAM) com 30 µg/mL de ampicilina, e 12 µg/mL de tetraciclina a 37°C, com agitação por 12 a 16 h.

O DNA plasmidial é extraído conforme protocolo de lise alcalina de Sambrook *et al.* (1989). Após serem centrifugadas em tubos de microcentrífuga, as células são precipitadas com 250 µL de solução de ressuspensão (EDTA 10 mM + Tris 25 mM) e lisadas com 250 µL de solução de lise (NaOH 0,2 N + SDS 0,1 % p/v). A lise foi realizada à temperatura de 0°C por 5 min. A precipitação protéica é feita com 350 µL de acetato de potássio 3 M pH 4,8 (AcK 3 M + ácido acético 5 M) à temperatura de 0°C por 15 min. A separação das proteínas precipitadas da solução contendo DNA é feita por centrifugação de 13000 rpm por 15 min. O DNA é precipitado com 2,5 volumes de isopropanol, centrifugado a 13000 rpm por 15 min, lavado com etanol 70%, secado em estufa à 37°C e eluído

em água milliQ esterilizada. A amostra de DNA é incubada a 37°C com 15 µg/mL de RNase pelo período de 30 min.

A identidade dos clones é testada pelo padrão de clivagem obtido com determinadas enzimas de restrição. Após o teste de clivagem, um dos clones é escolhido para extração plasmidial em volume 10X maior (med-prep). O DNA foi purificado por coluna GFX PCR DNA AND GEL BAND PURIFICATION KIT ® (AMERSHAM) (Seção 3.12).

Devido ao baixo rendimento do plasmídeo pP18 (Seção 3.7.3.1) é realizada uma maxi-prep (500 mL de cultura de bactéria) segundo protocolo do QIAGEN PLASMID MAXI KIT ® (QUIAGEN).

3.10 Clivagem por endonuclease de restrição

As clivagens teste são realizadas com 300 a 400 ng de DNA plasmidial (suficiente para observação em gel de agarose corado com brometo de etídio) em volume de 15 µL com 1X de tampão e 5U de enzima. A reação ocorre a 37°C por pelo menos 2h.

3.11 Eletroforese horizontal

Amostras de DNA são analisadas por eletroforese horizontal em géis de agarose 0,8% corados com 0,5 µg/mL de brometo de etídio. Estas são preparadas em tampão de amostra 1X (Azul de bromofenol 0.5% p/v + Xileno

cianol 0,5% p/v + Glicerol 5% + EDTA 0,5M) . As corridas são feitas em tampão TAE 1X (Ácido bórico 89 mM + EDTA 2,5 mM + Tris-Base 89 mM) com voltagem variando de 1V/cm a 6V/cm de acordo com o experimento realizado.

A quantificação do DNA é feita por comparação com padrão de 50, 100 e 200 ng de DNA de fago lambda comercial (INVITROGEN).

O tamanho, em pb, dos fragmentos visualizados em gel de agarose é estimado de acordo com a mobilidade dos mesmos em relação à mobilidade dos padrões de peso molecular, 1 kb DNA *ladder* (PROMEGA), ou 1 kb DNA *ladder plus* (INVITROGEN), ou 100 pb (Ludwig Biotec), utilizando o programa SEQAID VERSÃO 3.81 (Rhoads e Roufa, 1989).

A visualização do DNA corado com brometo de etídio é feita sob luz ultravioleta de comprimento de onda curto. Os géis de agarose são fotografados sob iluminação ultravioleta por câmera POLAROID.

Géis de agarose feitos para observação da integridade do RNA seguiram alguns cuidados específicos para diminuir a degradação deste (Sambrook *et al.* 1989). As cubas são lavadas e enxaguadas com água milliQ autoclavada, as formas e pentes para gel são lavados e tratados com peróxido de hidrogênio 3% por pelo menos 10 min, a vidraria é esterilizada a 150°C por pelo menos 4h, e o tampão de corrida e o tampão de amostra são diluídos em água tratada com DEPC.

3.12 Purificação de DNA

A purificação de DNA plasmidial, de produto de PCR e de banda de gel de agarose são realizadas por colunas GFX PCR DNA AND GEL BAND PURIFICATION KIT® (AMERSHAM), seguindo o protocolo específico para cada caso, como sugerido pelo fabricante.

O DNA foi eluído da matriz em 30 µL de água milliQ autoclavada. A quantificação do DNA é feita em gel de agarose, como descrito na Seção 3.11.

3.13 Seqüenciamento

Os fragmentos seqüenciados neste trabalho são produtos de RT-PCR purificados de gel de agarose (Seção 3.12). O seqüenciamento foi realizado em MEGABACE 500 AUTOMATIC SEQUENCER e a reação de terminação de cadeia por dideoxi é feita pelo *kit* DYENAMIC ET® (AMERSHAM). Os iniciadores usados na PCR foram usados na reação de seqüenciamento. As seqüências foram nomeadas com a inicial que indica a linhagem ou a espécie, seguido da especificação dos iniciadores usados na PCR e um número que corresponde a posição da banda, de maior à menor, no gel de agarose. A Tabela 3.7 mostra o número de seqüências obtidas para cada banda de gel purificada.

Tabela 3.7 Seqüências de produtos de PCR com iniciadores de P

| Seqüência | Seqüência senso | Seqüência anti-senso |
|-----------|---------------------|--------------------------|
| MI1E31 | - | A01 |
| MI1E32 | - | B01 |
| MI1I34 | - | B04 |
| 17I1I32 | A05 (sem homologia) | E01, G06 (sem homologia) |
| 17I1I31 | - | F01 |
| MI2E31 | C04 | C01 |
| MI2E33 | D04 | E04 (sem homologia) |
| 17I2E31 | B05 e F01 | G01 e H01 |
| 17I2E33 | D05 e G01 | E05 |
| WI2E31 | H05 e G03 | A06 |
| MI2I32 | F04 (sem homologia) | D01 |
| MI2I33 | G04 | H04 |
| 17I2I32 | F05 | H01 |
| 17I2I33 | G05 | F01 |
| WI2I32 | E01 | D06 |
| WI2I33 | C06 | B06 |

3.14 Análise das seqüências

As seqüências obtidas foram analisadas, primeiramente, pelo programa BLASTN - BASIC LOCAL ALIGNMENT SEARCH TOOL .

Após, as seqüências de uma mesma banda eram submetidas a uma análise de confiança no programa STADEN PACKAGE GAP 4 (Staden, 1996) para obtermos uma seqüência consenso.

O alinhamento das seqüências era feito no programa online MULTALIN (Corpet, 1998), sem alterar os parâmetros do programa. A edição final dos alinhamentos que está apresentada no trabalho, foi obtida pelo programa GENEDOC (Nicholas e Nicholas, 1997). Quando necessário, a seqüência complementar invertida foi obtida pelo programa Clone3 versão 3.11.

Além dos programas usados na análise das seqüências obtidas neste trabalho, foram usados o programa VECTOR NTI VERSÃO 4 e programa online ALIBABA2 (Grabe,2002), para análise de seqüências já descritas. O primeiro foi usado no desenho dos mapas apresentados no trabalho, para localizar sítios específicos, e fornecer o mapa de restrição das seqüências. O segundo, localiza possíveis sítios de ligação a fatores de transcrição sendo usado na análise da seqüência de *P*, *412* e *hobo* em busca de prováveis promotores responsáveis pela expressão tecido-específica dos embriões. A investigação dos sítios de transcrição também foi realizada pelo programa online TRANSFAC 6.0 - Public disponível no BioBase - Biological Databases.

4 Resultados

4.1 Expressão de TEs em linhagens de *D. willistoni*

4.1.1 Expressão de *P* em linhagens de *D. willistoni*

A expressão de *P* nas linhagens de *D. willistoni* foi investigada por RT-PCR usando quatro combinações de iniciadores que permitem não apenas detectar transcritos de *P* como detectar os processamentos dos íntrons (Haring *et al.* 1998).

A presença do transcrito codificador da transposase, ou seja, que passa pelo processamento do íntron IVS3, foi investigada com os iniciadores meli2+ e meli3-. Todas as linhagens amplificam o fragmento esperado (743 pb) como mostrado na Figura 4.1. A linhagem SPS, não representada neste gel, amplifica fragmento do mesmo tamanho.

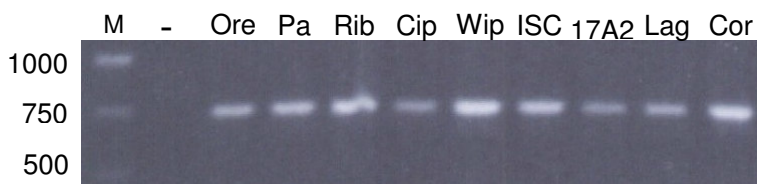


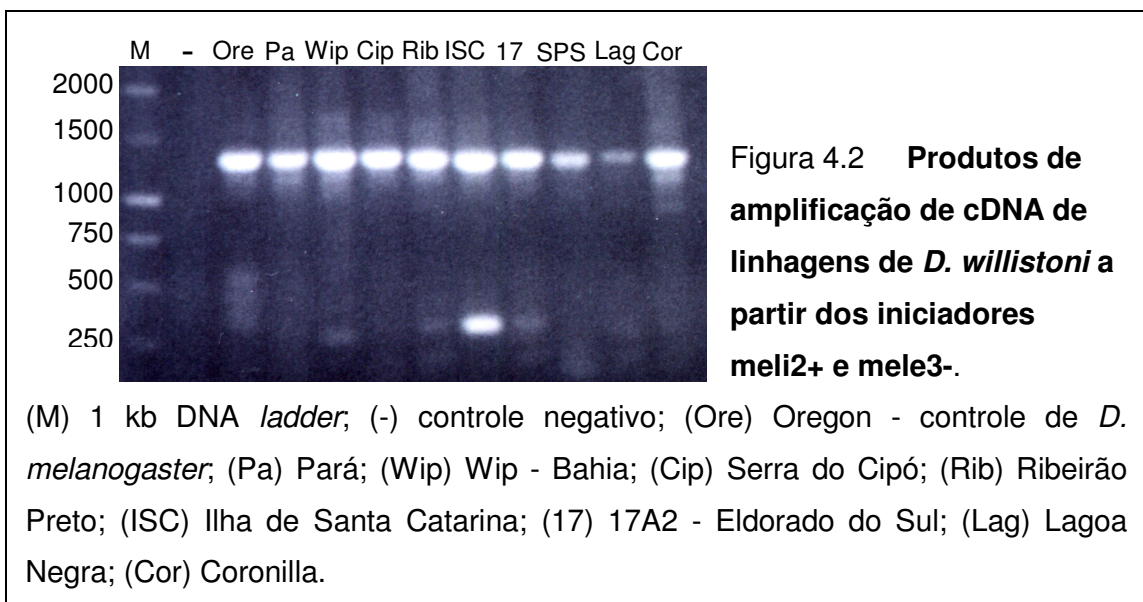
Figura 4.1 **Produtos de amplificação de cDNA de linhagens de *D. willistoni* a partir dos iniciadores meli2+ e meli3-**. (M) Marcador de peso molecular 1 kb DNA ladder; (-) controle negativo; (Ore) Oregon, controle de *D. melanogaster*; (Pa) Pará; (Rib) Ribeirão Preto; (Cip) Serra do Cipó; (Wip) Wip-Bahia; (ISC) Ilha de Santa Catarina; (17A2) 17A2 - Eldorado do Sul; (Lag) Lagoa Negra; (Cor) Coronilla.

Outro par de iniciadores, meli2+ e meli3-, foi usado para detectar transcritos que não passaram pelo processamento de IVS3. Os tamanhos dos fragmentos esperados na PCR com estes iniciadores são de 1180 pb, quando ocorre o processamento deste íntron, ou 1371 pb quando não ocorre. Em todas as linhagens de *D. willistoni* foi amplificado um fragmento de tamanho estimado de 1300 pb (Figura 4.2). Apenas nas linhagens Pa, Wip e Cor foi possível observar um fragmento muito próximo a este, com tamanho estimado de 1160 pb, que pode corresponder ao transcrito sem o íntron IVS3. A diferença entre a intensidade das bandas do transcrito codificador da transposase e do repressor, e até mesmo a impossibilidade de visualizar o transcrito da transposase em todas as linhagens, era esperada considerando que este deve estar presente apenas nas células germinativas.

Fragmentos menores, possivelmente provenientes da expressão de elementos *P* deletados, foram observados nas linhagens Cor (aproximadamente 950 pb); Wip (aproximadamente 250 pb); Rib, ISC e 17A2 (aproximadamente 320

pb) e um “arraste” entre 600 e 400 pb em Ore. Apenas na linhagem ISC o fragmento amplificado foi intenso (Figura 4.2).

Além dos transcritos de 1180 ou 1371 pb, outros dois transcritos poderiam ser gerados com os iniciadores meli2+ e meli3+: 1249 e 1269 pb. No trabalho de Haring *et al.* (1998) foram descritos dois sítios alternativos de processamento, internos ao íntron IVS3, que são conservados na seqüência de *P* de *D. melanogaster*, e conseqüentemente, devem ser conservados na seqüência de *D. willistoni*. Devido à proximidade dos tamanhos dos fragmentos amplificados, a existência deste processamento variante só será resolvida por clonagem e seqüenciamento dos fragmentos. Ao mesmo tempo, estes processamentos variantes ocorrem, assim como o de IVS3, especificamente nas gônadas, de forma que o melhor forma de estudar a presença destes é isolando tecidos germinativos de somáticos.

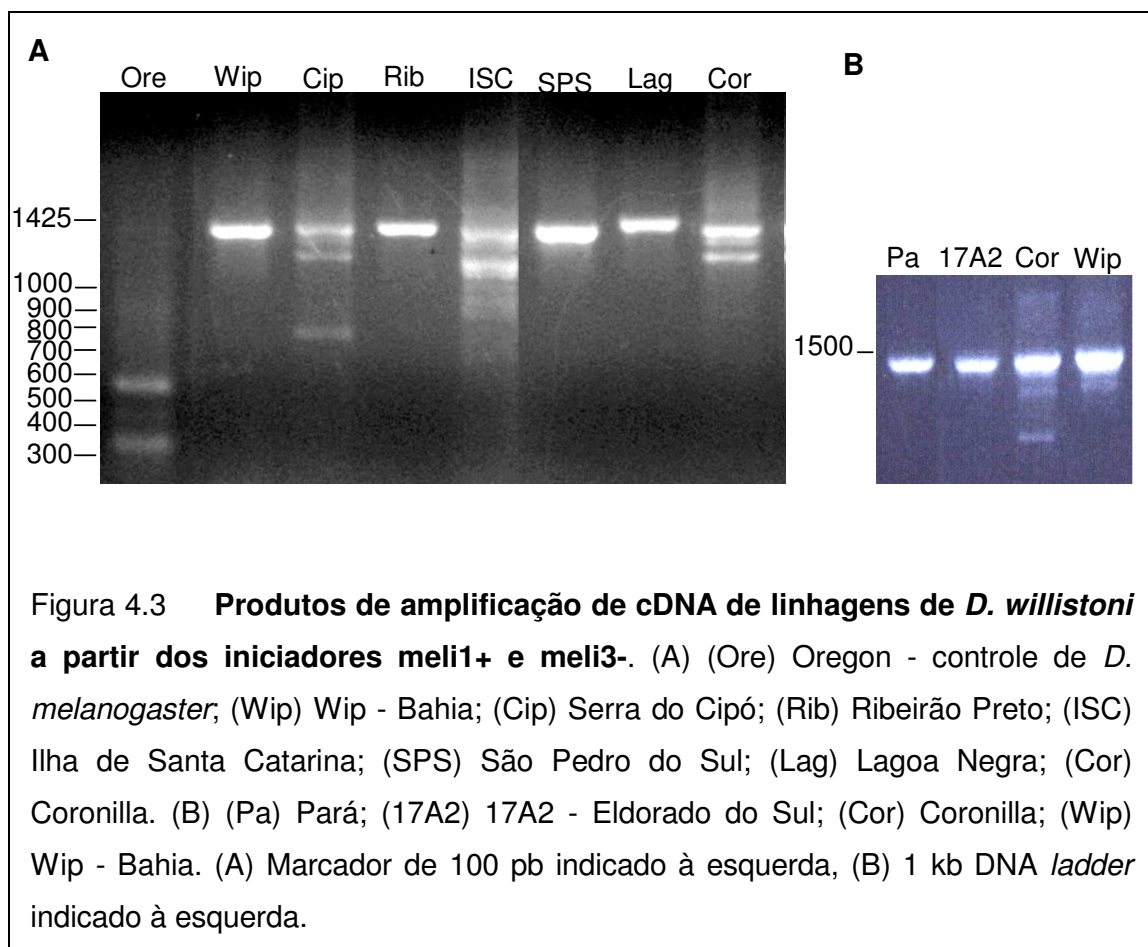


A PCR realizada com o par de iniciadores meli1+ e meli3- amplificam os transcritos que passam pela excisão do íntron IVS1 e IVS3 (Figura 4.3). Devido à

pequena diferença de tamanho dos transcritos que passam pelo processamento do íntron IVS2 (1466 ou 1415 pb), a excisão deste é difícil de ser observada nas condições eletroforéticas usadas. Mas, pelas PCRs mostradas anteriormente, que usam o iniciador meli2+, já é sabido que o processamento de IVS2 ocorre em todas as linhagens. Além disso, o tamanho estimado para as bandas amplificadas (1400 pb) é compatível com este processamento.

Outros fragmentos são observados nas linhagens Cip (1370, 1200 e 740 pb), ISC (1170 e 1140 pb) e Cor (1370 e 1200 pb). O padrão de Cip e Cor é similar, com exceção do fragmento de 740 pb que está presente apenas na primeira linhagem. Na figura 4.3B é mostrado que o padrão de bandas da linhagem Wip é similar ao da linhagem Cor. A não visualização deste padrão em todas as PCRs realizadas sugere que o aparecimento de algumas bandas é sensível a pequenas alterações na reação de amplificação.

Através da análise deste gel, descartamos a possibilidade dos fragmentos observados no gel 4.2 nas linhagens Wip, Cor e Cip, serem produtos de processamento alternativo similar ao descrito por Haring *et al.* (1998). Primeiramente, porque o iniciador meli3- anela apenas em transcritos sem o íntron IVS3, onde os sítios variantes de processamento foram descritos. Segundo, apenas um dos transcritos variantes descritos por Haring *et al.* (1998) gera seqüência que permite o anelamento do iniciador meli3-, mas é esperada a amplificação de um transcrito maior que os observados.

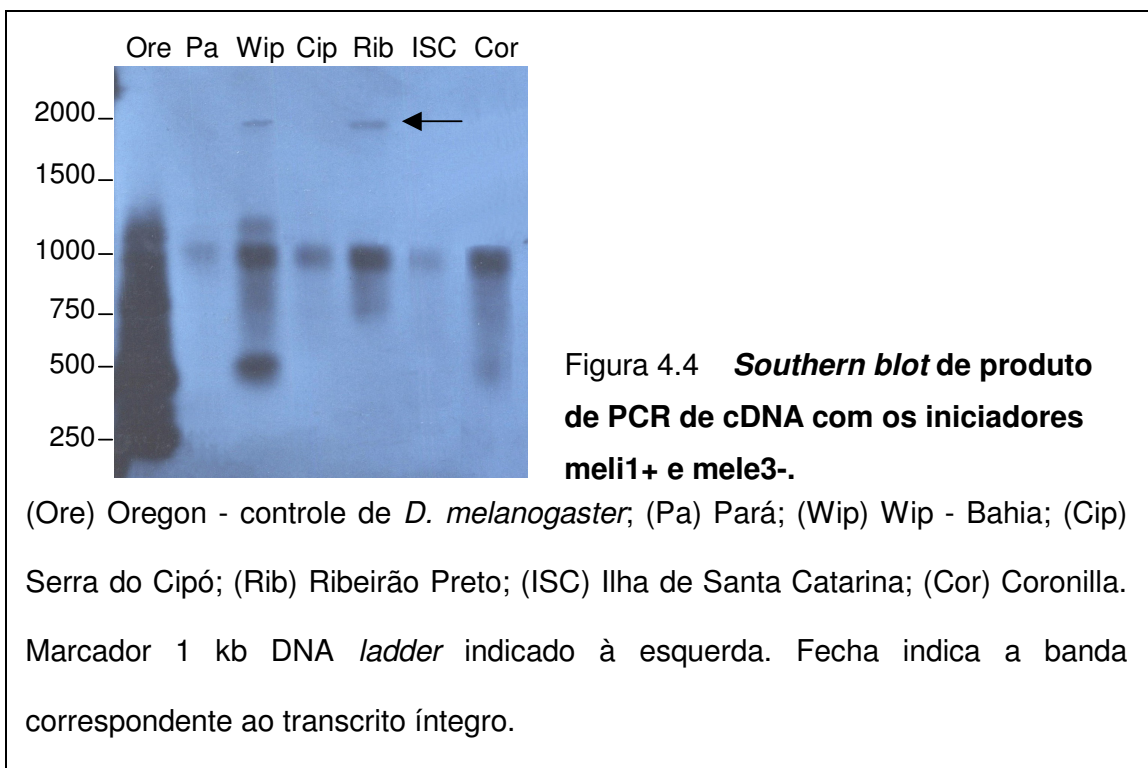


Expressão diferencial entre *D. melanogaster* e as linhagens de *D. willistoni* foi detectada por PCR com estes iniciadores. Em *D. melanogaster*, o produto de aproximadamente 1400 pb, observado em *D. willistoni*, não foi detectado. São observados, entretanto, outros dois fragmentos de tamanhos aproximados a 570 pb e 330 pb (Figura 4.3).

Na PCR realizada com os iniciadores meli1+ e meli3-, seguido de *Southern blot*, a expressão diferencial entre as espécies foi confirmada (Figura 4.4). Com estes iniciadores, é esperado um transcrito de 1848 pb, ou maior, caso o processamento dos íntrons IVS2 e IVS3 não ocorra.

Interessantemente, nas linhagens de *D. willistoni* representadas, um fragmento de tamanho estimado de 1130 pb hibridou com mais intensidade que o fragmento íntegro. Apenas em duas linhagens (Wip e Rib) foi observada a expressão do fragmento íntegro, possivelmente devido à maior quantidade de amostra. O DNA das linhagens 17A2, SPS e Lag não hibridaram por algum problema da amplificação e não pela ausência de transcritos pois estes já foram observados por PCR com o uso de outros iniciadores (Figura 4.1, 4.2 e 4.3).

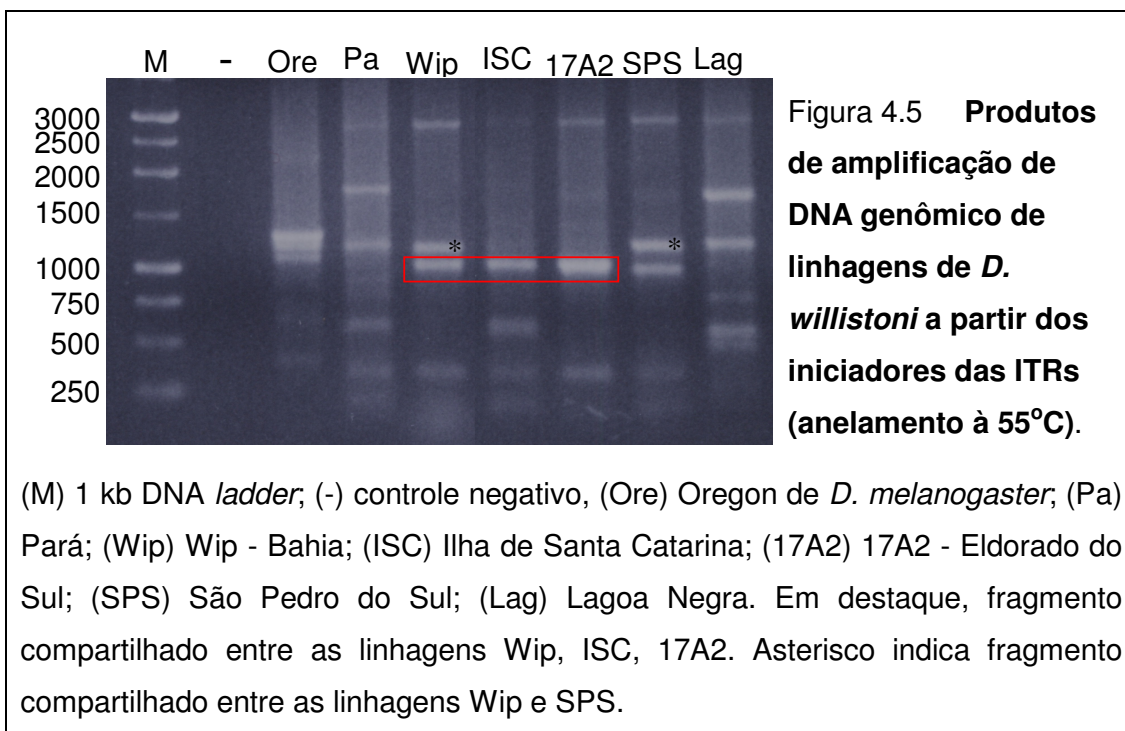
É notável a grande quantidade de fragmentos menores de 1300 pb que se expressam em *D. melanogaster*.

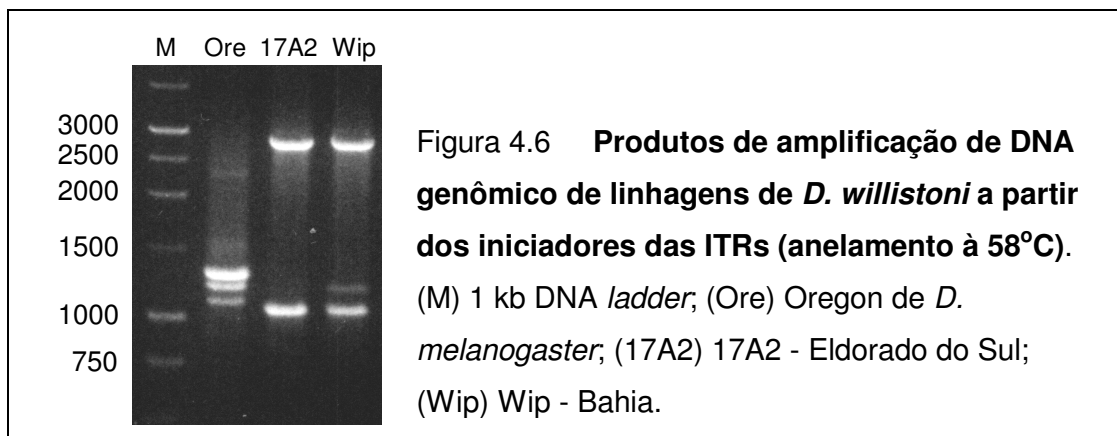


Uma PCR de DNA genômico de algumas linhagens, usando iniciadores que anelam na seqüência da ITR de *P*, foi realizada para identificar se a expressão diferencial entre *D. melanogaster* e *D. willistoni* é reflexo da regulação

gênica ou da presença de um maior número de *P* deletados no genoma da primeira espécie (Figura 4.5).

O elemento *P* íntegro (2900 pb) só foi observado nas linhagens de *D. willistoni*, com menor intensidade em Pa e ISC, mas não na linhagem de *D. melanogaster*. A ausência da banda correspondente ao *P* completo na linhagem Ore deve ser resultado de uma competição pelos iniciadores na reação de PCR. Mesmo em uma PCR realizada em condição mais estridente (anelamento à 58°C), o elemento completo não é visualizado (Figura 4.6).





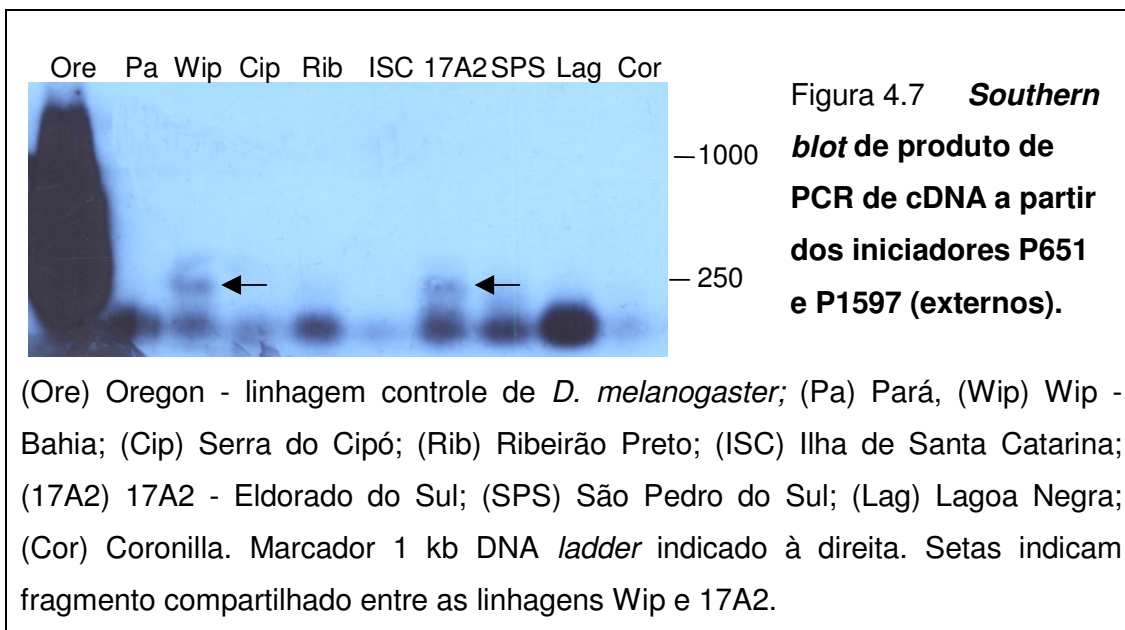
As bandas marcadas na Figura 4.5, de aproximadamente 1100 pb, devem corresponder ao fragmento de expressão observado em todas de *D. willistoni* testadas (Figura 4.4), e pode ser um importante repressor da transposição de *P* nas linhagens de *D. willistoni*. As linhagens Wip e SPS compartilham um fragmento de aproximadamente 1200 pb que, pelo menos na linhagem Wip, é expresso (Figura 4.4). A tentativa de determinar a seqüência destes fragmentos não foi bem sucedida provavelmente pela presença de mais de um fragmento na amostra purificada do gel. Mesmo assim, uma região com similaridade ao elemento *Vege*, um MITE, foi identificada na seqüência de aproximadamente 1200 pb de Wip. A existência do elemento *Vege* interno a uma seqüência de *P* foi descrita por Holyoake e Kidwell (2003).

No gel da Figura 4.5, não é possível observar banda de aproximadamente 1100 pb que corresponderia ao transcrito observado na linhagem Pa (Figura 4.4).

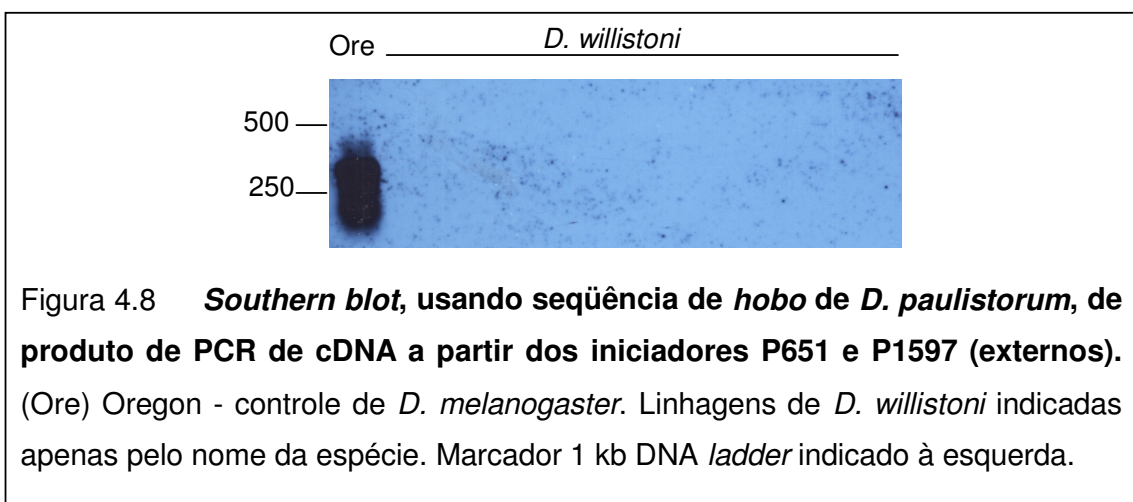
4.1.2 Expressão do transposon *hobo* em linhagens de *D. willistoni*

Nenhum transcrito de *hobo* foi detectado em *D. willistoni* pela técnica de RT-PCR usando os iniciadores P651 e P1597 (externos) ou os iniciadores P991 e P1407 (internos). Na tentativa de visualizar os produtos de amplificação em gel de agarose, estes passaram por uma re-amplificação com os mesmos iniciadores e também, no caso da PCR realizada com os iniciadores externos (P651 e P1597), por uma re-amplificação com os iniciadores internos (P991 e P1407).

Assim, um *Southern Blot* dos produtos da primeira amplificação com os iniciadores P651 e P1597 foi realizado, utilizando como sonda a seqüência de *D. melanogaster* obtida na PCR com estes mesmos iniciadores. A Figura 4.7 mostra a forte hibridação do cDNA de *D. melanogaster* (Ore) e a hibridação de bandas de tamanho inferior a 250 pb nas linhagens *D. willistoni*. As linhagens Wip e 17A2 produzem um transcrito diferencial em relação às outras linhagens desta espécie, indicado por flecha na Figura 4.7. Este fraco sinal sugere uma baixa similaridade entre as seqüências de *hobo* das duas espécies como já proposto nos trabalhos de Loreto *et al.* (1998), Sassi *et al.* (2000) e Klein (2002).



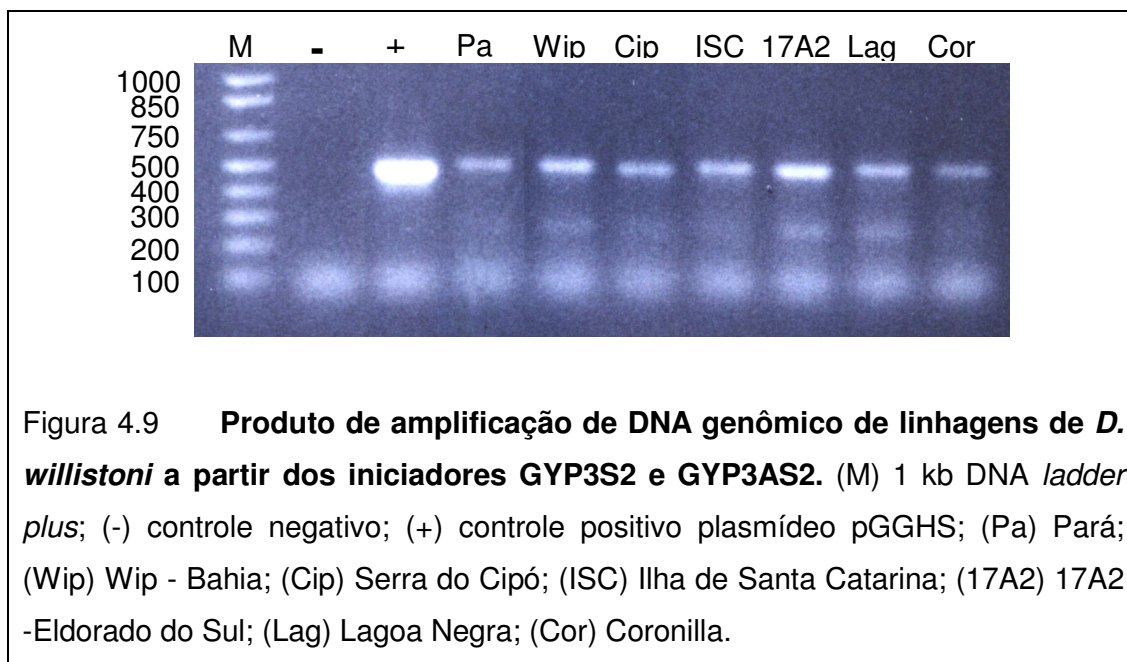
Estes mesmos fragmentos foram submetidos à outra hibridação usando seqüência de *D. paulistorum* como sonda (Fabiano Pimentel Torres, comunicação pessoal). Esta seqüência possui 90% de identidade com a seqüência de *hobo* de *D. willistoni* descrita por Klein (2002). Apesar da similaridade com a seqüência de *D. willistoni*, apenas a linhagem de *D. melanogaster* testada hibridou com esta sonda (Figura 4.8), sugerindo que os iniciadores externos não são apropriados para a detecção da expressão de *hobo*.



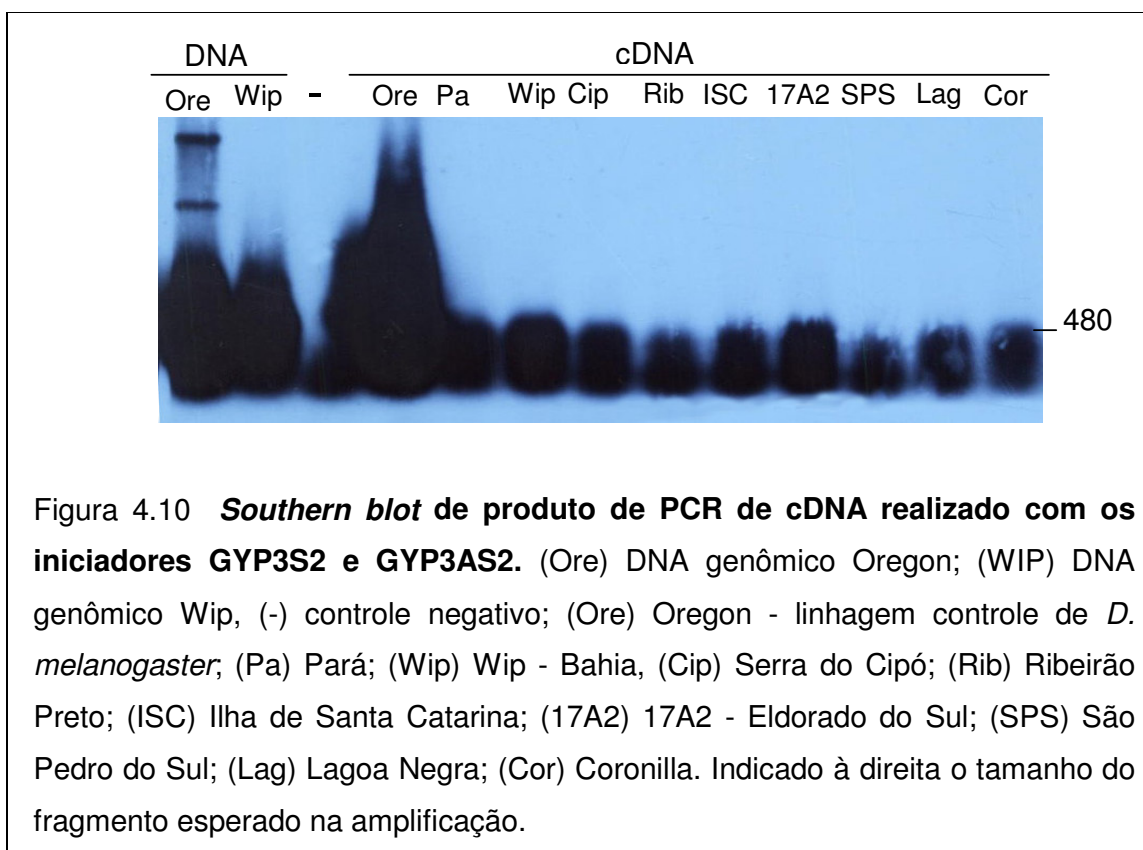
Os resultados anteriores foram obtidos com cDNA sintetizado a partir de iniciadores randômicos. cDNA sintetizado a partir de iniciadores anti-senso P1407 de *hobo* foi testado por PCR. Apenas a linhagem 17A2 gerou um produto de amplificação de tamanho esperado.

4.1.3 Expressão do retroelemento *gypsy* em linhagens de *D. willistoni*

Todas as linhagens de *D. willistoni* amplificam um fragmento de tamanho similar ao de *D. melanogaster* (480 pb) na PCR realizada com os iniciadores GYP3S2 e GYP3AS2 (Figura 4.9). As linhagens de *D. willistoni* amplificam, também, um fragmento de aproximadamente 250 pb, possivelmente proveniente de uma cópia truncada do elemento no genoma desta espécie.



Com estes mesmos iniciadores, a expressão de *gypsy* foi observada por reação de PCR seguido por *Southern Blot*. A sonda usada nesta técnica é o fragmento gerado pela amplificação do plasmídeo pGGSH com os iniciadores GYP3S2 e GYP3AS2. Uma forte hibridação foi detectada em todas as linhagens (Figura 4.10). Aparentemente, além do fragmento de 480 pb, fragmentos menores estão sendo expressos. Como descrito no trabalho de Herédia *et al.* (2004), a seqüência de *D. willistoni* amplificada com estes iniciadores apresenta muitos códons de parada e uma maior divergência em relação à seqüência amplificada em outras espécies de *Drosophila*. O “arraste” observado pode ser resultado da transcrição de seqüências deletadas ou de seqüências com estes códons de parada.

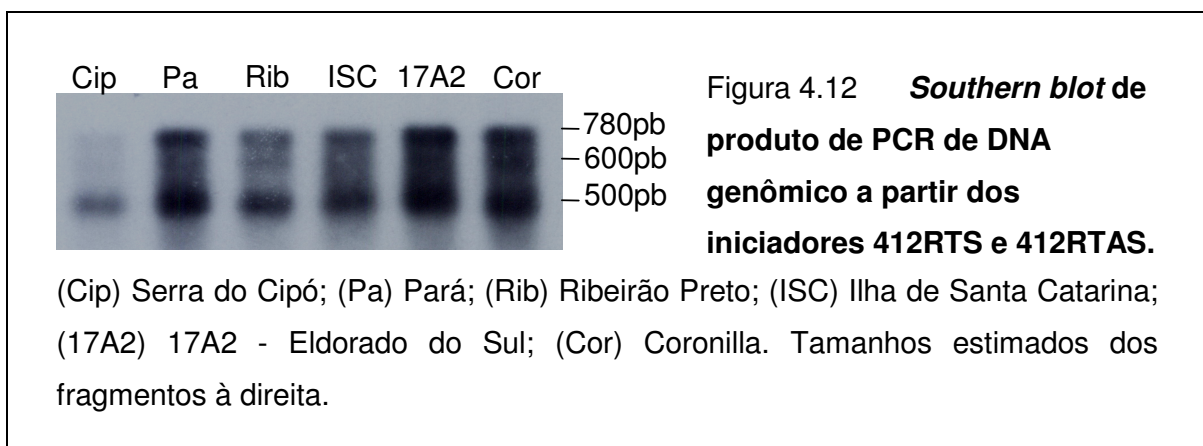
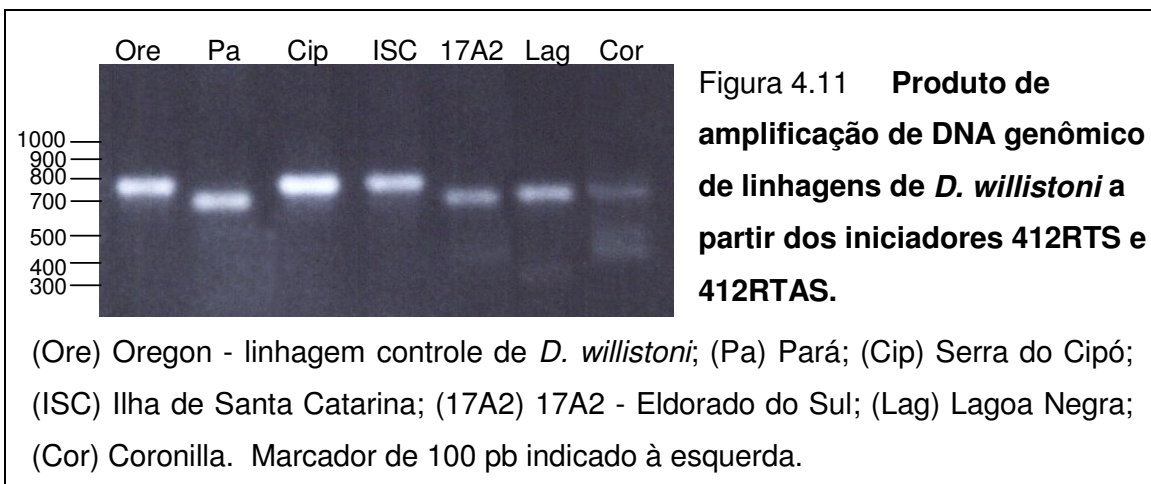


A expressão tecido-específica de *gypsy* deve ser investigada, considerando que alto nível de expressão protéica deste elemento foi observado nas células foliculares (Bucheton, 1995).

4.1.4 Expressão do retroelemento 412 em linhagens de *D. willistoni*

Um fragmento de aproximadamente 780 pb, similar ao fragmento amplificado na linhagem Oregon de *D. melanogaster*, foi gerado na PCR de DNA genômico das linhagens Cip e ISC de *D. willistoni* (Figura 4.11). As linhagens Pa, 17A2, Lag e Cor amplificam um fragmento um pouco menor que o esperado (aproximadamente 700 pb). Os produtos amplificados nas linhagens Wip, Rib e SPS são similares a estas últimas (dados não mostrados).

Devido à baixa temperatura de anelamento (43°C) usada na amplificação destes produtos, a especificidade dos fragmentos foi confirmada por *Southern blot* usando como sonda o fragmento amplificado do plasmídeo cDM2104 (Figura 4.12). A diferença de tamanho dos fragmentos observados na Figura 4.11, não foi detectada no *Southern blot*, mas, nas linhagens usadas, foi detectada a presença de fragmentos de tamanho aproximado a 600 e 550 pb. Interessantemente, o fragmento que híbrida com mais intensidade é o de 550 pb, mesmo este não sendo visualizado em gel de agarose.



A existência de transcritos de *412* foi detectada por PCR de cDNA, usando os mesmos iniciadores (Figura 4.13). Entretanto, o fragmento esperado, entre 780 e 700 pb, foi observado apenas nas linhagens Pa, Cip e 17A2. Nenhuma diferença de tamanho de fragmentos pode ser distinguida neste gel. Era esperado que a linhagem Cip expressasse um fragmento pouco maior que as outras duas linhagens, mas esta diferença pode não estar sendo observada como resultado de uma corrida eletroforética curta.

Todas as linhagens amplificaram três transcritos de tamanhos estimados de 600, 530 e 450 pb, que diferem do observado em *D. melanogaster*, onde a

expressão do fragmento de 780 pb também não foi observada. Nesta, detectamos somente a presença de dois transcritos, de tamanhos aproximados de 570 e 500 pb.

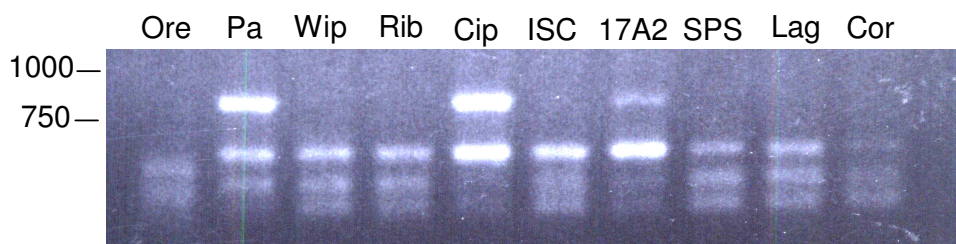


Figura 4.13 **Produtos de amplificação de cDNA de linhagens de *D. willistoni* a partir dos iniciadores 412RTS e 412RTAS.** (Ore) Oregon - controle de *D. melanogaster*; (Pa) Para, (Wip) Wip - Bahia, (Cip) Serra do Cipó; (Rib) Ribeirão Preto; (ISC) Ilha de Santa Catarina; (17A2) 17A2 - Eldorado do Sul; (SPS) São Pedro do Sul; (Lag) Lagoa Negra; (Cor) Coronilla.

4.2 Expressão de *P* durante o desenvolvimento embrionário de *D.*

willistoni

4.2.1 Padrão de expressão tecido-temporal de *P* durante o desenvolvimento embrionário de *D. willistoni*

O elemento *P* se expressa de forma tecido-específica durante o desenvolvimento embrionário de *D. willistoni* e *D. melanogaster*. Este padrão de expressão é o mesmo nas duas espécies, como mostra a Figura 4.14.











| Estágios do Desenvolvimento | <i>D. melanogaster</i> | <i>D. willistoni</i> |
|---|--|--|
| Blastoderme Sincicial | Não fotografado |  |
| Blastoderme Celular |  |  |
| Gastrulação (Formação da Fenda Ventral) |  |  |
| Extensão da Banda Germinal |  |  |
| Retração da Banda Germinal |  |  |
| Fechamento Dorsal | Não fotografado |  |

Figura 4.14 **Expressão de *P* durante o desenvolvimento embrionário de *D. willistoni* e *D. melanogaster*.** Vista lateral dos embriões. Região anterior à esquerda e dorsal para cima.

A marcação da sonda, durante o estágio de Blastoderme Sincicial, é difusa em todo embrião (Figura 4.15). No estágio de Blastoderme Celular, quando os núcleos migram para a periferia, o sinal contorna o embrião aparentemente se concentrando nas células em formação (Figura 4.16).

No estágio de Gástrula, a região da formação da fenda ventral apresenta sinal de hibridação positiva com a sonda de *P* (Figura 4.17). Este sinal

acompanha a migração do mesoderma, que circunda o embrião posterior e dorsalmente, durante o estágio de Extensão da Banda Germinal. Assim, a expressão de *P* é visível no primórdio do intestino médio, região para onde as células polares migram (Figura 4.18).

Durante a Retração da Banda Germinal, a expressão de *P* é observada espalhada por uma faixa de tecidos, envolvendo mesoderma somático, mesoderma da cabeça, mesoderma visceral, região do intestino e gônadas. Envolve também o Sistema Nervoso Central e lóbulos do cérebro (Figura 4.19).

Durante o Fechamento Dorsal (Figura 4.20) a região ventral, posterior e anterior permanecem fortemente marcadas, sugerindo que o padrão descrito durante a Retração da Banda Germinal é mantido durante esse estágio. Durante o Fechamento Dorsal e da Involução da Cabeça, uma leve segmentação é observada na marcação, mas não é possível precisar o número e quais segmentos representam.

O padrão compartilhado entre as duas espécies sugere que a expressão tecido-temporal ocorre devido a regiões regulatórias da própria seqüência de *P* e não de regiões regulatórias próximas ao sítio de inserção do elemento no genoma hospedeiro. Corroborando esta idéia, observamos a similaridade de expressão entre as linhagens Wip e 17A2, duas linhagens de *D. willistoni* com sítios de inserção de *P* conhecidamente diferentes (Regner *et al.*, 1996).

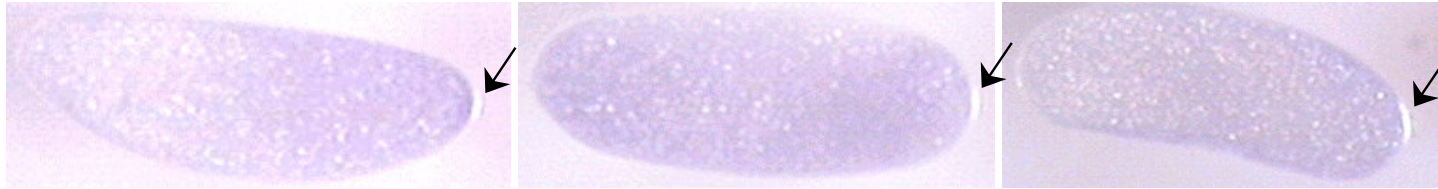


Figura 4.15 **Expressão do elemento *P* em embriões de *D. melanogaster* e *D. willistoni*, durante estágio de Blastoderme Sincicial.** (→) células polares. Vista lateral. Região anterior à esquerda e dorsal para cima.

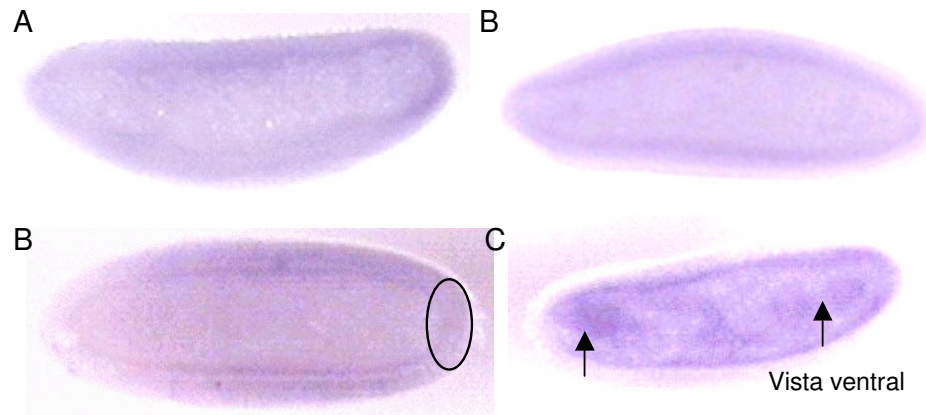


Figura 4.16. **Expressão do elemento *P* em embriões de *D. melanogaster* e *D. willistoni* durante estágio de Blastoderme Celular.**

(A) Migração dos núcleos para periferia do embrião. (B) Formação das células. As células polares estão circuladas. (C) Vista ventral do embrião mostrando o início da formação da Fenda Ventral, indicado por setas. Quando não indicado na figura, os embriões estão em vista lateral. Região anterior à direita e dorsal para cima.

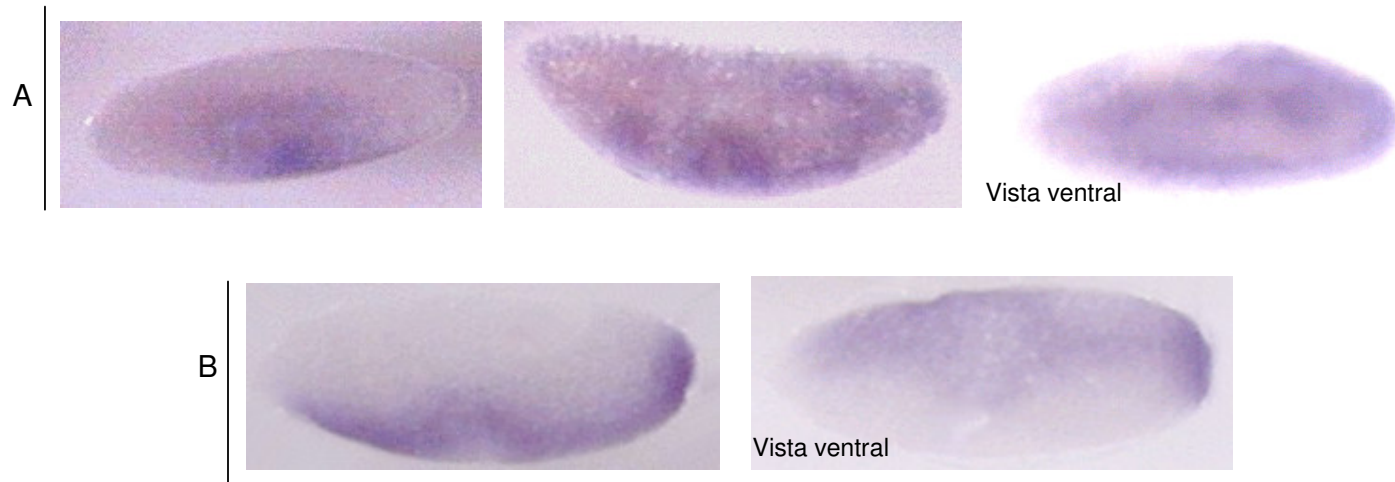


Figura 4.17 **Expressão do elemento *P* em embriões de *D. melanogaster* e *D. willistoni* durante estágio de Gástrula.** (A) Formação da Fenda Ventral pela involução das células que originarão o mesoderma. (B) Início da Extensão da Banda Germinal. Quando não indicado na figura, os embriões estão em vista lateral. Região anterior à esquerda e dorsal para cima.

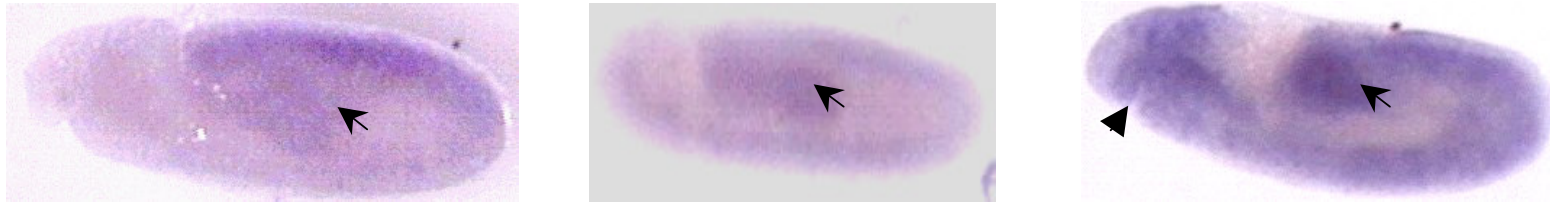


Figura 4.18 **Expressão do elemento *P* em embriões de *D. melanogaster* e *D. willistoni* durante estágio de Extensão da Banda Germinal.** (→) região de formação do intestino médio, (▶) região de formação do intestino anterior. Vista lateral. Região anterior à direita e dorsal para cima.

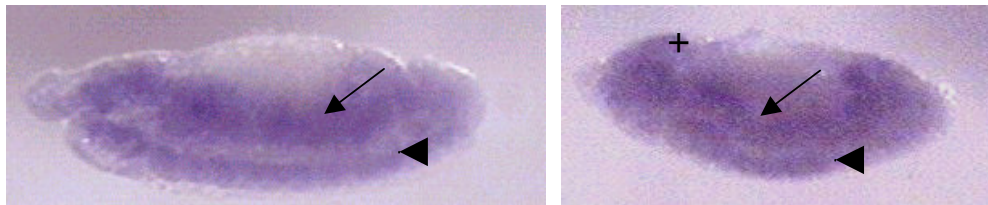


Figura 4.19 **Expressão do elemento *P* em embriões de *Drosophila melanogaster* e *D. willistoni* durante estágio de Retração da Banda Germinal.** (+) lóbulos do cérebro, (→) mesoderma, e (▶) Sistema Nervoso Central. Vista lateral. Região anterior à direita e dorsal para cima.

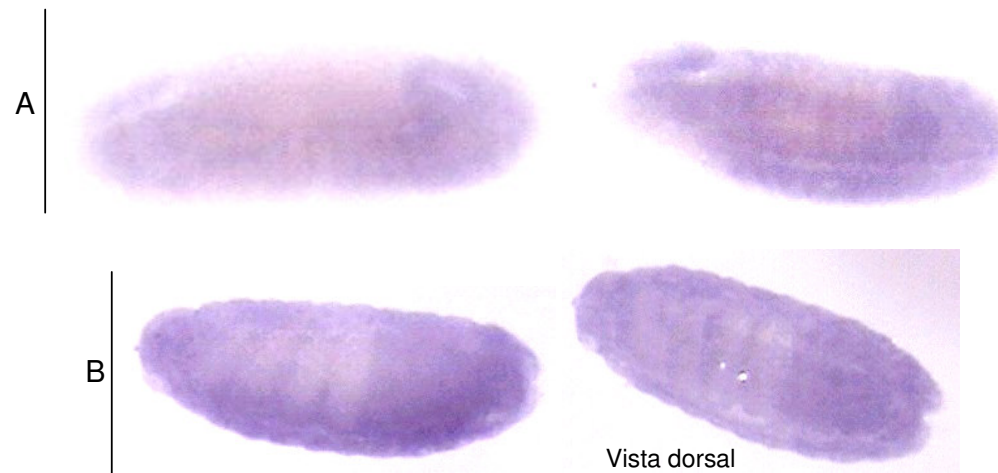


Figura 4.20. **Expressão do elemento *P* em embriões de *D. melanogaster* e *D. willistoni* durante estágio de Fechamento Dorsal (A) e Involução da Cabeça (B).** Quando não indicado na figura, os embriões estão na vista lateral. Região anterior à esquerda e dorsal para cima.

A hibridação de embriões com a sonda anti-senso, que constitui um dos controles negativos da técnica, gerou o mesmo padrão de expressão da sonda senso. Isso nos levou a investigar as ITRs, por serem uma mesma seqüência disposta nas extremidades do elemento *P* de forma invertida.

O programa AliBaba 2.1 identificou apenas um possível sítio de ligação ao fator de transcrição Sp1 (Figura 4.21). A família das Sps é composta de domínios *cis*-reguladores comuns, mas que são importantes mediadores de ativação de genes seletivos durante o desenvolvimento e diferenciação celular (Thomas *et al.*, 2004). Em *D. melanogaster*, a expressão de Sp1, no final do estágio de Retração da Banda Germinal, ocorre em grupos celulares pró-neurais e em células precursoras do órgão cordotonais que desempenha função na formação do segmento da cabeça e órgãos mecano-sensoriais (flybase@flybase.net). Nos adultos, Sp1 é expresso nas células nutridoras, que são de origem germinativa e responsáveis pelos primeiros sinais de orientação posicional do embrião e pela transferência de transcritos para o oócito. A transferência materna do elemento *P* já é conhecida e é responsável pelo estabelecimento do citótipo repressor do oócito.

Apesar destas poucas descrições do envolvimento de Sp1 como regulador em *Drosophila*, este sítio de ligação, assim como a proteína Sp1, é comum e encontrado em muitos genes de muitos organismos (Latchman, 1995). Dessa forma, Sp1 deve interagir com outros fatores de transcrição para desempenhar uma função tecido-específica.

Assim, a seqüência de 158 pb *upstream* a ORF0 foi submetida ao mesmo programa e quatorze potenciais sítios de ligação de fatores de transcrição foram

identificados (Figura 4.21). Destes, apenas dois descritos em *Drosophila*: Odd e Oct-1. O primeiro é um gene da categoria *pair-rule* (TRANSFACT- 6.0-PUBLIC), que é ativo no estágio de Blastoderme Celular, não correspondendo às hibridações observadas para o elemento *P*. O segundo é da família *POU domain factors*, da subfamília II de humanos. Em *Drosophila*, foi descrito um fator da mesma subfamília chamado dOct-2. Durante a embriogênese de *D. melanogaster*, este fator de transcrição é expresso, na fase de Extensão da Banda Germinal, como uma faixa que circunda o embrião e, em estágio mais avançado, no desenvolvimento do cérebro e grupos neuronais do Sistema Nervoso Central (TRANSFACT- 6.0-PUBLIC). Este fator de transcrição também foi observado na seqüência não codificadora da extremidade 3' da seqüência de *P* (Figura 4.22) e pode ser o responsável pela expressão de *P* no Sistema Nervoso observada neste trabalho.

Entretanto, a expressão de *P* durante a formação do mesoderma ainda precisa ser investigada mais intensivamente. Certamente os sítios de ligação encontrados não devem ser os únicos e possivelmente há complexas interações de fatores de transcrição que não serão resolvidos pelo programa de computador.


```

=====
seq( 0.. 59)   catgatgaaataacataaggtggtcccgctcgaaagccgaagcttaccgaagtatacactt
Segments:
2.3.1.0    18   27           ====Sp1====
4.5.1.0    55   64                                     =====T
=====
seq( 60.. 119) aaattcagtgacacgtttgcttgttgaggaggaaagggttggtg'gcggacgaatttttttttg
Segments:
4.5.1.0    55   64   BP===
1.1.3.0    74   83           =C/EBPalp=
3.1.2.2    74   83           ====Oct-1====
1.1.3.0    94  103           =C/EBPalp=
2.3.2.2   108  117                                     =====Hb=====
=====
seq( 120.. 179) aaaacattaacccttacgttggaataaaaaaa
Segments:
3.1.1.12   121  130   ==HNF-1C=
4.1.3.0   121  130   ==NF-ATc3=
9.9.379   122  131   =HP1_site=
1.1.1.6   129  138   ==CRE-BP1=
2.3.3.0   130  139   =CPE_bind=
2.3.2.2   138  147   ====Odd====
4.3.1.1   143  152   ==MEB-1==
4.3.1.2   143  152   =====GLO=====

```

Figura 4.21 **Seqüência 5' do elemento P mostrando os potenciais sítios de ligação a fatores de transcrição.** Seqüência sublinhada indica a ITR, a em negrito, o início de transcrição e as destacadas, os fatores de transcrição descritos em *D. melanogaster*.

```

=====
seq( 0.. 59)      catgatgaaataacataaggtaggtcccgtccggcaagagacatccacttaacgtatgcttg
Segments:
2.3.1.0      18  27      ====Sp1====
1.1.3.0      55  64      =C/EB
=====
seq( 60.. 119)   caataagtgcgagtgaaaggaatagtattctgagtgtcgtattgagtgctgagtgagacag
Segments:
1.1.3.0      55  64      Palp=
9.9.29      105 114      =====AP-1==
=====
seq( 120.. 179)  cgatatgattgttgattaacccttagcatgtccgtgggggttgaattaactcataatatt
Segments:
3.1.2.2      122 131      ====Oct-1==
1.1.3.0      129 138      =C/EBPalp=
3.1.1.12     163 172      ===HNF-1==
3.1.1.12     175 184      ===HN
=====
seq( 180.. 200)  aattagacgaaattattttta
Segments:
3.1.1.12     175 184      F-1==
1.1.3.0      186 197      ==C/EBPbeta=
3.1.1.2      191 200      ====Antp==
4.3.1.1      192 201      ===MEB-1==
=====

```

Figura 4.22 **Seqüência 3' invertida do elemento P mostrando os potenciais sítios de ligação a fatores de transcrição.** Seqüência sublinhada indica a ITR e as destacadas, fatores de transcrição descritos em *D. melanogaster*.

O difuso sinal de hibridação observado nos estágios iniciais do desenvolvimento sugere a transferência materna de transcritos para o embrião. Isso foi confirmado por uma RT-PCR de embriões de 1h, que ainda estão no estágio de clivagem. O genoma do zigoto só inicia sua expressão no estágio de Blastoderme, ou seja, 2 h após a fertilização. Com todas as combinações de iniciadores usados é amplificado um fragmento de aproximadamente 500 e outro de 300 pb na linhagem Ore (Figura 4.23). Estas duas bandas são características desta linhagem, não sendo observadas na linhagem 17A2 de *D. willistoni*. Apenas com os iniciadores meli1+ e meli3+ foi observado o fragmento de aproximadamente 1400 pb nas linhagens Ore e 17A2, como esperado. Com estes iniciadores, a linhagem 17A2 gera um fragmento de aproximadamente 400 e outro menor de 250 pb, que diferem dos fragmentos amplificados em Ore.

Era esperada a amplificação de um produto de 2039pb com o par de iniciadores meli1+ e mele3-, e um de 1371 pb com o par de iniciadores meli2+ e mele3-, mas nenhum produto de amplificação era esperado com o iniciador meli3- já que, segundo Simmons *et al.* (2002), o sinal consenso de transferência materna está localizado no íntron IVS3. Entretanto, em Ore, foi detectado transcritos com este iniciador (Figura 4.23B). A não visualização do produto de 2039 pb na linhagem Ore (Figura 4.23A), era esperada pois este mesmo resultado foi observado em adultos e embriões. Nestes casos, a não visualização deste transcrito foi atribuída à competição dos iniciadores pelos transcritos menores.

O seqüenciamento dos fragmentos amplificados na linhagem Ore se faz necessário ainda para entendermos sua amplificação com todas combinações de iniciadores usados.

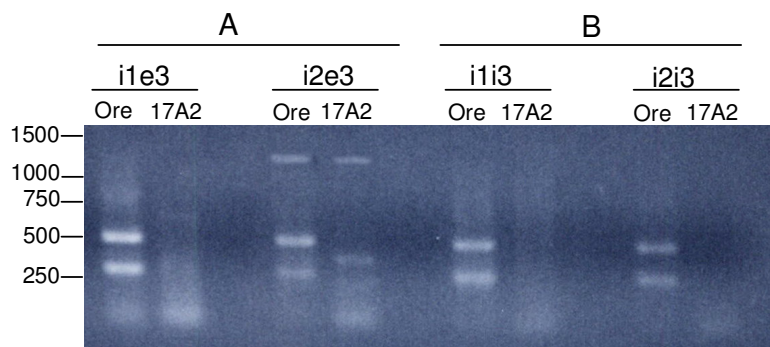


Figura 4.23 **Produtos de amplificação de cDNA de embriões de 1h das linhagens 17A2 e Ore.** (A) Produtos amplificados com a combinação do iniciador *mele3-* com *meli1+* (*i1e3*) e *meli2+* (*i2e3*). (B) Produtos amplificados com a combinação do iniciador *meli3-* com *meli1+* (*i1i3*) e *meli2+* (*i2i3*). Marcador de peso molecular 1kb DNA *ladder* à esquerda.

4.2.2 Detecção dos transcritos de *P* em *D. willistoni* e *D. melanogaster*

Em vista da forte expressão do TE *P* durante o desenvolvimento embrionário de ambas espécies, uma RT-PCR foi realizada, usando os iniciadores que detectam o processamento do íntron IVS1, IVS2 e IVS3 (Haring *et al.*, 1998) (Figura 4.24).

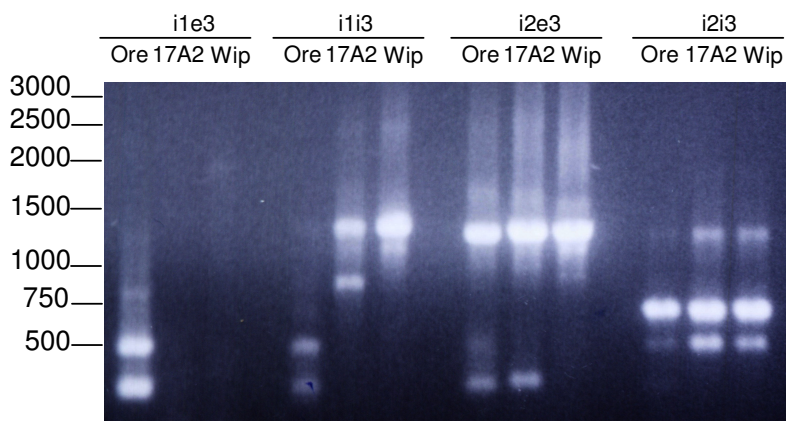
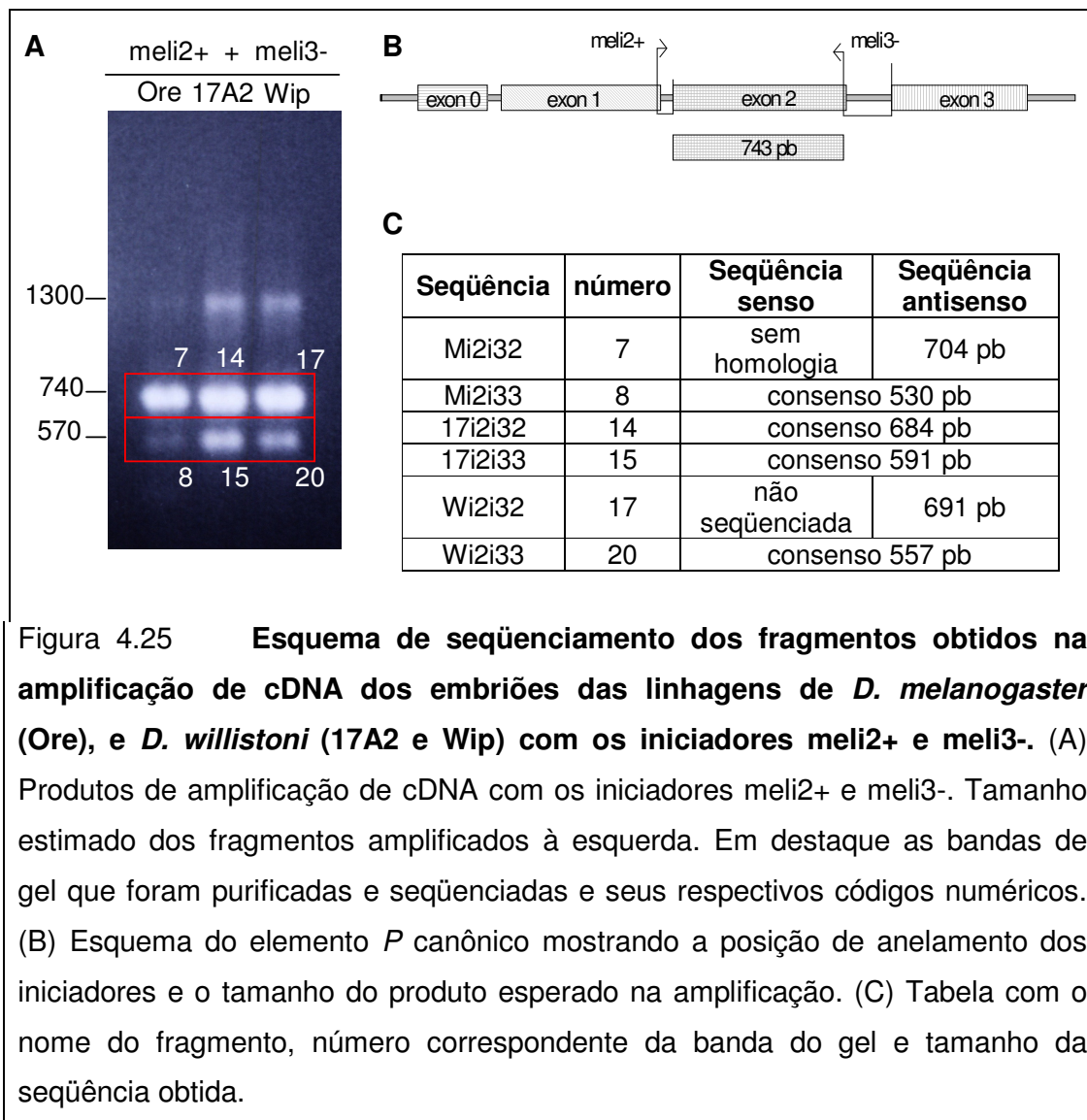


Figura 4.24 **Expressão de *P* em embriões de *D. melanogaster* (Ore) e *D. willistoni* (17A2 e Wip).** (i1e3) Produtos de amplificação de cDNA com os iniciadores meli1+ e mele3-. (i1i3) Produtos de amplificação de cDNA com os iniciadores meli1+ e meli3-. (i2e3) Produtos de amplificação de cDNA com os iniciadores meli2+ e mele3-. (i2i3) Produtos de amplificação de cDNA com os iniciadores meli2+ e meli3-. Marcador de peso molecular 1kb DNA *ladder* indicado à esquerda.

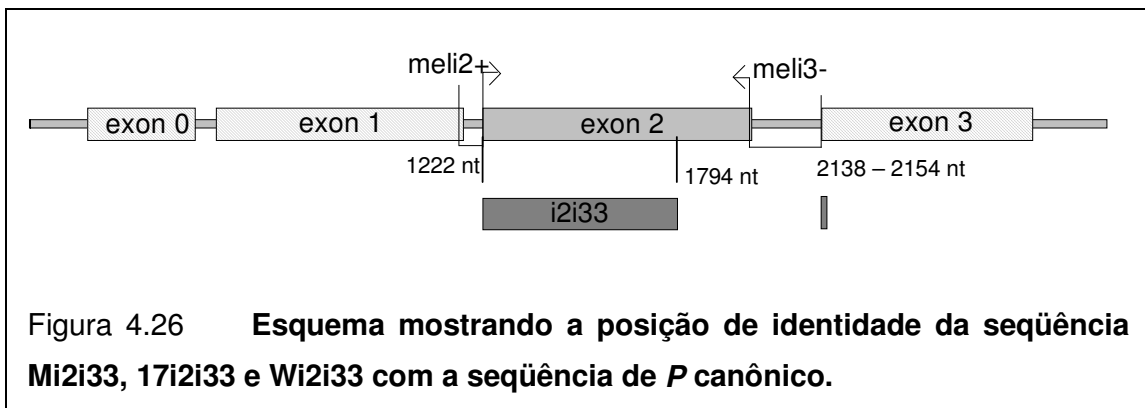
Detectar o processamento do íntron IVS3 de *P* é particularmente importante, já que este evento define se há transcrito codificador da transposase ou do repressor no organismo. Com os iniciadores meli2+ e meli3- foi possível verificar que os embriões de *D. willistoni* e *D. melanogaster* possuem um potencial transcrito codificador da transposase. Com estes mesmos iniciadores, além do fragmento esperado (743 pb), outras duas bandas, de aproximadamente 1300 e 550 pb são compartilhadas entre as linhagens (Figura 4.25).



O fragmento de aproximadamente 740 pb, presente nas três linhagens, foi seqüenciado e alinhado com a seqüência do *P* canônico (A1 - toda seção precedida da letra "A" refere-se ao Anexo). Assim, um potencial transcrito codificador da transposase está presente durante o desenvolvimento embrionário de *D. melanogaster* e *D. willistoni*. Se este processamento é tecido-específico, assim como o descrito para os adultos, ainda deve ser investigado. As células germinativas, ou células polares, não são hibridadas no início do

desenvolvimento, quando são visíveis no pólo posterior do embrião (Figura 4.15, 4.16). Entretanto, no estágio de Extensão da Banda Germinal, a região de formação do intestino médio, para onde as células polares migraram, é fortemente marcada (Figura 4.17). O mesoderma também expressa *P* (Figura 4.19) no estágio em que as células polares migram para grupos celulares precursores das gônadas que estão dispostos bilateralmente no mesoderma dos segmentos abdominais 5, 6 e 7. Porém, não é possível precisar se há expressão específica nas células germinativas porque estão envoltas por células somáticas.

O fragmento menor, presente nas três linhagens (Mi2i33, 17i2i33 e Wi2i33) (Figura 4.25), também foi seqüenciado e alinhado com seqüência de *P* canônico (A.2). Este transcrito de 572pb, difere do transcrito da transposase pela deleção da região de 198 nt 3' do éxon 2. A região do alinhamento está no esquema da Figura 4.26.



A existência de uma seqüência de *P* que tenha sofrido a mesma deleção em *D. willistoni* e *D. melanogaster* é improvável. O genoma de *D. melanogaster* foi invadido recentemente pela seqüência de *P* e, desta forma, ou esta seqüência sofreu uma transferência horizontal, assim como a seqüência de *P* íntegro, ou ela

é produto de um processamento alternativo. Este evento foi descrito em *D. melanogaster* (Chain *et al.*, 1991), *D. bifasciata* e *D. helvetica* (Haring *et al.*, 1998), mas todos os sítios alternativos de processamento estão localizados no íntron3.

Também é observado, nas três linhagens, um fragmento de aproximadamente 1300 pb e o seqüenciamento desta banda é necessário para esclarecermos a natureza deste fragmento.

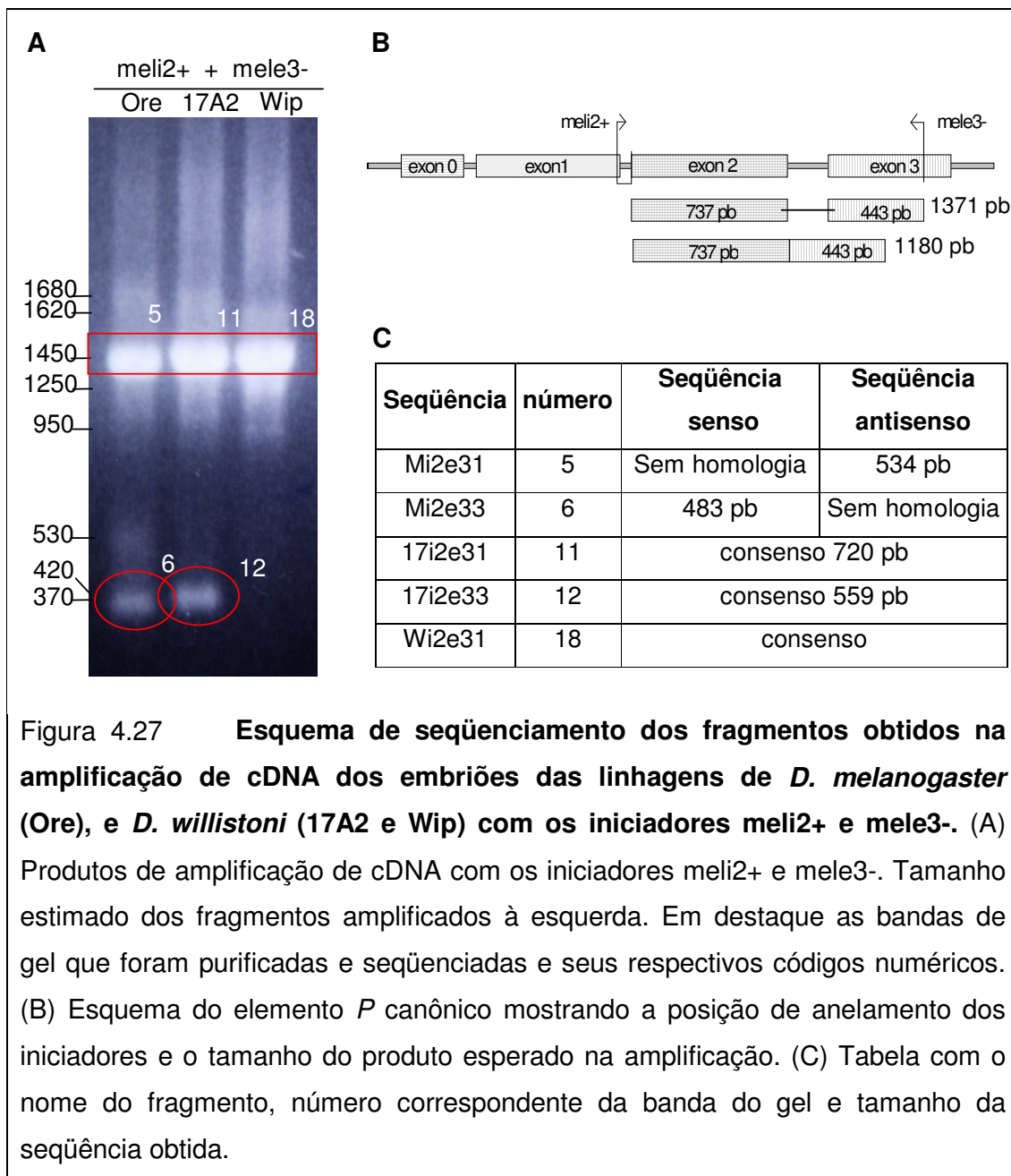
Uma forte banda de amplificação, comum nas três linhagens, é produzida na PCR com os iniciadores meli2+ e mele3-. Com este par de iniciadores era esperada a amplificação de dois transcritos: um de 1466 pb e outro de 1415 pb (Figura 4.27). O primeiro corresponde ao transcrito codificador do repressor e o segundo, ao da transposase. O fragmento mais intenso tem tamanho estimado de 1450 pb e corresponde ao repressor da transposição confirmado pelo seqüenciamento de Mi2e31 (A.3). Pelo alinhamento da seqüência de Wi2e31 (A.4) com a seqüência de *P* canônico é possível verificar que o processamento do íntron IVS3 não ocorreu. Entretanto, a seqüência da região do íntron é bastante divergente. Isso foi considerado como artefato do seqüenciamento. A seqüência obtida para 17i2e31 (A.5) não foi suficiente para se determinar a presença do íntron IVS33, porém, como a banda é similar à banda de Mi2e31 e Wi2e31, essa foi considerada como sendo correspondente ao do transcrito do repressor.

Desta forma, o transcrito da transposase, detectado pelos iniciadores meli2+ e meli3-, e o transcrito do repressor, detectado pelos iniciadores meli2+ e mele3-, estão presentes durante o desenvolvimento embrionário das espécies de

Drosophila estudadas, mostrando que a transposição de *P* durante a embriogênese também é regulada pós-transcricionalmente.

As três linhagens também apresentam um fragmento maior que o do repressor com tamanho estimado de 1650 pb para Ore e 17A2 e de 1600 pb para Wip. O seqüenciamento destas é necessário para estabelecermos, ou não, relação com a banda de aproximadamente 1300 pb observada na amplificação com meli2+ e meli3- (Figura 4.25).

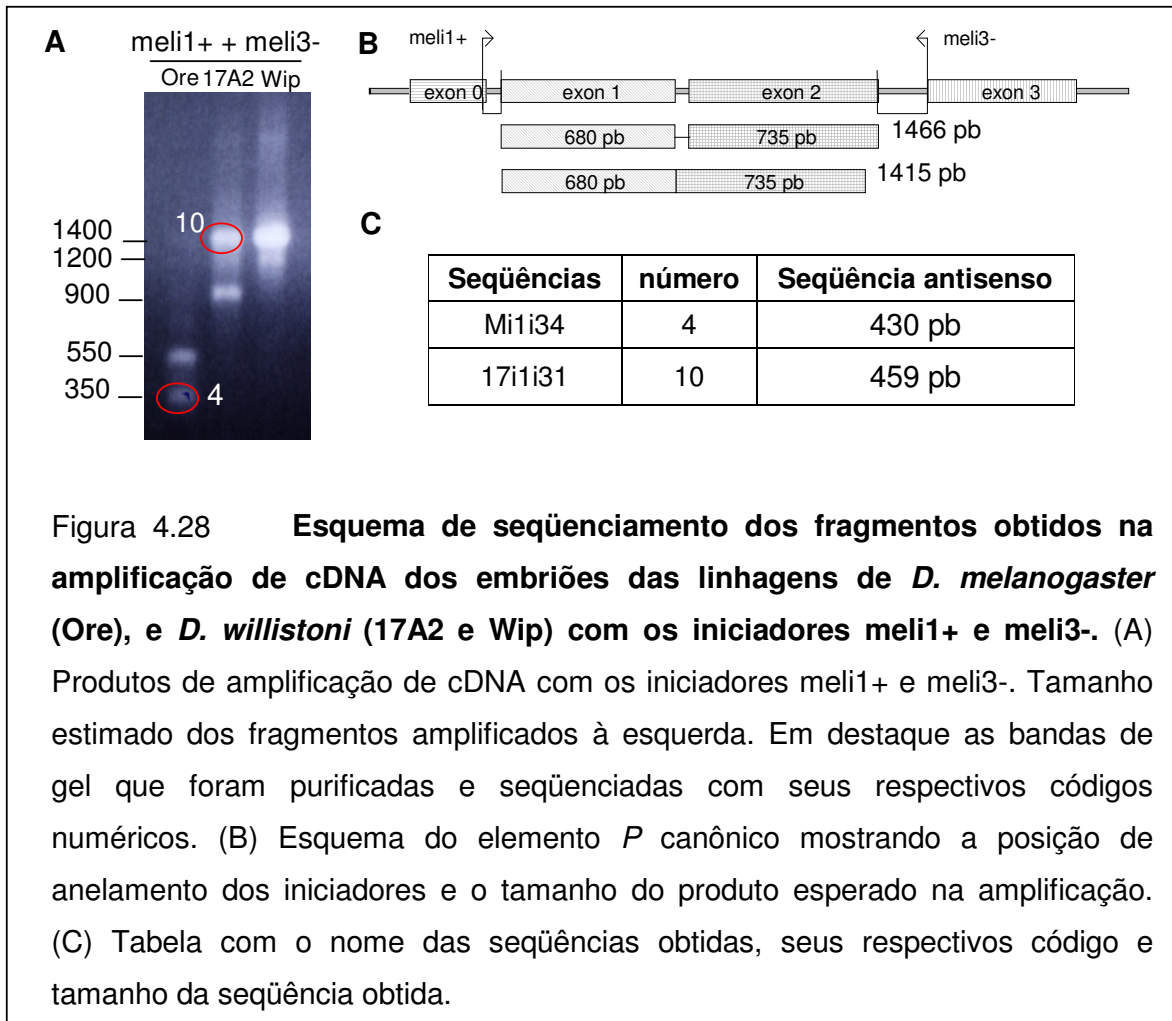
As linhagens diferem quanto à presença de transcritos menores, onde a linhagem Ore gera fragmentos de tamanhos estimados de 530 e 370 pb, 17A2 um fragmento de aproximadamente 420 pb e Wip fragmentos de tamanhos estimados de 1250 e 950 pb. Foram seqüenciados 483 pb da seqüência Mi2e33 (Figura 4.28) e 538 pb da seqüência 17i2e33. A primeira possui alta identidade com a seqüência do éxon 2 (A6). A segunda tem identidade com a seqüência do éxon 3 (A7). A região de 205 pb 5' da seqüência é uma duplicação do próprio éxon 3, e possui identidade com a região de 2385 a 2565 nt do *P* canônico. A região 3' é mais conservada e seus 332 pb possuem identidade com a região de 2248 a 2580 nt do *P* canônico.



Produtos amplificados com o iniciador meli1+ são transcritos que passaram pelo processamento do íntron IVS1. Este iniciador foi combinado com o iniciador meli3- gerando os produtos mostrados na Figura 4.28 e com o iniciador mele3- gerando os produtos mostrados na Figura 4.29. Na primeira PCR, é visível a diferença de expressão observada em *D. melanogaster* e *D. willistoni*. Enquanto

D. willistoni expressa o transcrito esperado, correspondente à transposase, *D. melanogaster* amplifica dois fragmentos de tamanhos estimados de 550 e 350 pb. Como o potencial transcrito da transposase já foi observado para esta espécie (Figuras 4.26), é provável que este não esteja sendo observado no gel por uma diferença quantitativa da expressão.

Na figura 4.29 é confirmada a existência destes transcritos truncados em *D. melanogaster*. Três deles foram seqüenciados, como indicado nas Figuras 4.28 e 4.29.



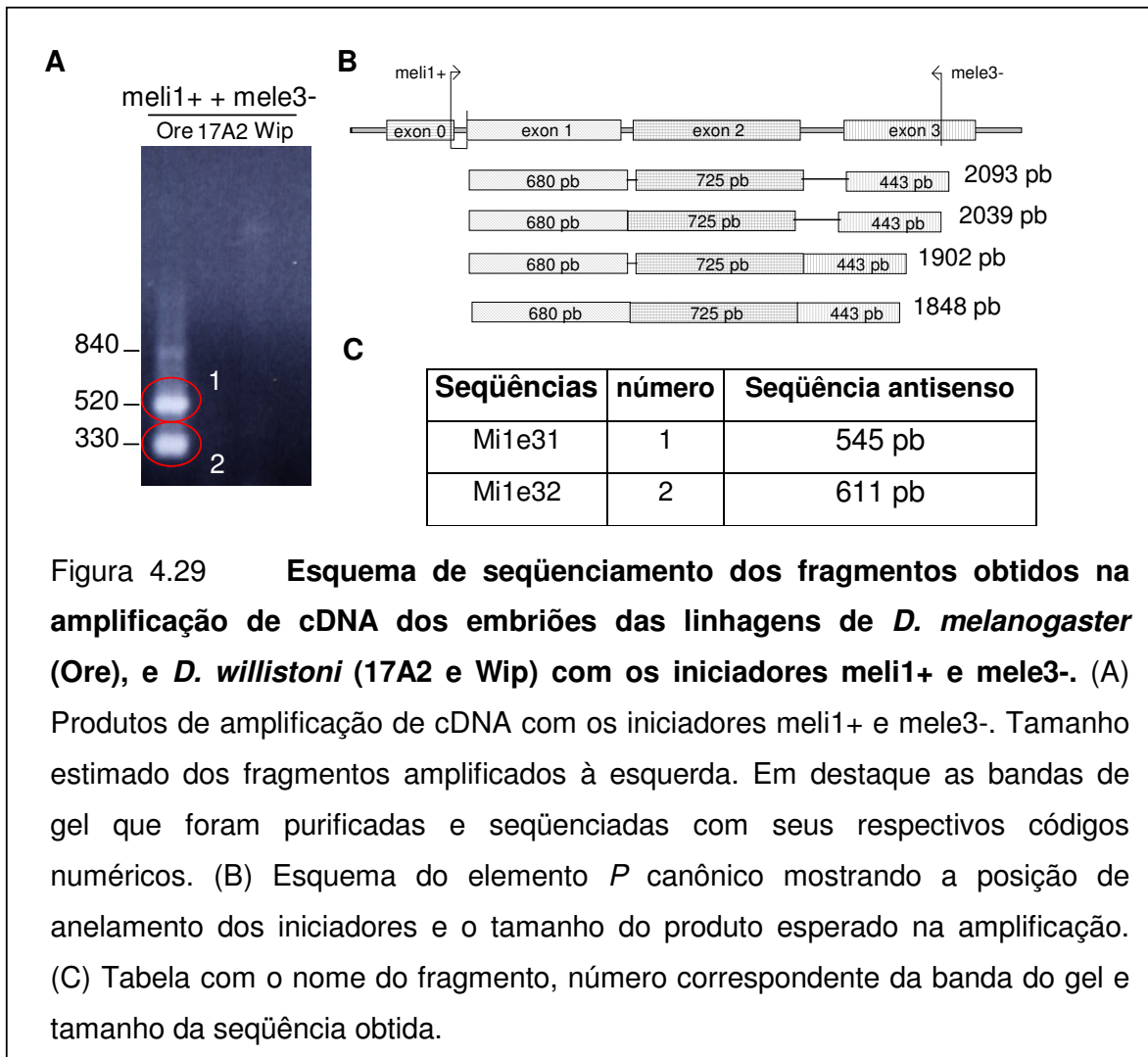


Figura 4.29 **Esquema de seqüenciamento dos fragmentos obtidos na amplificação de cDNA dos embriões das linhagens de *D. melanogaster* (Ore), e *D. willistoni* (17A2 e Wip) com os iniciadores meli1+ e mele3-. (A) Produtos de amplificação de cDNA com os iniciadores meli1+ e mele3-. Tamanho estimado dos fragmentos amplificados à esquerda. Em destaque as bandas de gel que foram purificadas e seqüenciadas com seus respectivos códigos numéricos. (B) Esquema do elemento *P* canônico mostrando a posição de anelamento dos iniciadores e o tamanho do produto esperado na amplificação. (C) Tabela com o nome do fragmento, número correspondente da banda do gel e tamanho da seqüência obtida.**

As seqüências Mi1i34, Mi1e31 e Mi1e32 alinham com o éxon 1 do *P* canônico (A9, A10, A11). Da primeira, 284 nt foram determinados. Da segunda, 545 pb onde, 364 pb possuem identidade com a região 503 a 812 nt do éxon 1, e 184 pb com a região 2371 a 2581 nt do éxon 3, como mostra o alinhamento (A10). A seqüência Mi1e32, de 567 nt, é formada pela duplicação da região 5' do éxon1, como observado no alinhamento (A11). Para identificar esta duplicação, a seqüência de 273 pb 3' foi separada da seqüência de 294 pb 5' antes do alinhamento com a seqüência do *P* canônico.

Apesar de Mi1i34 e Mi1e32 parecerem seqüências homólogas, a

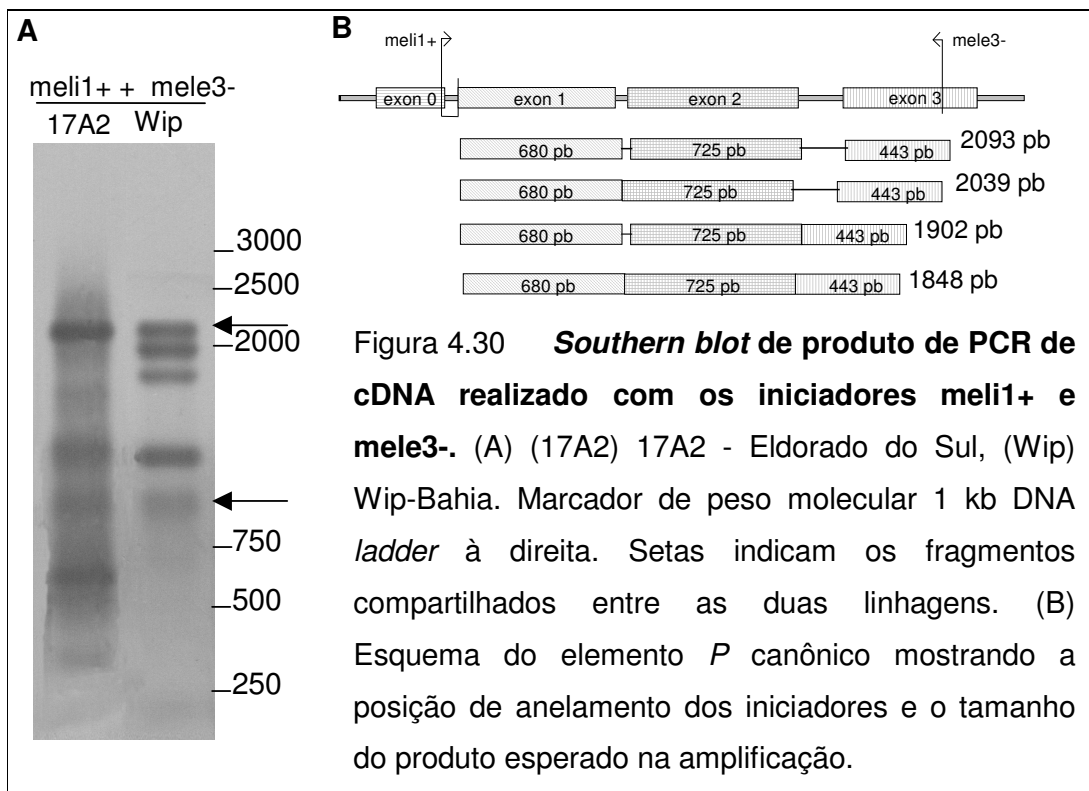
duplicação de seqüência não foi observada na primeira. O seqüenciamento de Mi1i34, por sua vez, apresentou alguns problemas, que podem até ser resultado destas duplicações de seqüências. O sítio do iniciador meli3-, usado na amplificação do fragmento e no seqüenciamento não foi localizado, apenas a seqüência de mele3-, que é mais *downstream* que o outro iniciador. Além disso, a seqüência obtida com o este iniciador, que é um iniciador anti-senso, alinha com a seqüência p π 25.1 senso, e duas seqüências obtidas com iniciadores senso não eram homólogas a *P*.

As três seqüências obtidas de *D. melanogaster*, e até mesmo a região duplicada da seqüência Mi1e32, são conservadas na extremidade 5' do éxon 1 (A12). Esta mesma região se mantém conservada na seqüência do repressor KP. Apesar de não podermos afirmar que estas seqüências transcrevam repressores de transposição, sugerimos a investigação destas como tal devido sua alta expressividade e identidade com KP.

A presença de produtos de amplificação de aproximadamente 1400 pb nas duas linhagens de *D. willistoni*, gerado com o iniciador meli3-, confirma a presença de um potencial transcrito da transposase nas duas linhagens (Figura 4.28, A8). Apenas 495 pb da seqüência 17i1i31 foram determinados, não possibilitando a confirmação do processamento do íntron IVS2. Houve particular interesse no seqüenciamento da banda de 900 pb, presente apenas em uma das linhagens de *D. willistoni* (Figura 4.28), mas nenhuma similaridade com seqüência de *P* foi observada. A ausência de identidade com seqüência de *P* pode ter sido resultado de seqüências com duplicações, e conseqüentemente dois sítios para o iniciador usado no seqüenciamento ou, pela presença de mais de produtos de

amplificação muito próximos. Por este motivo, nenhuma tentativa de seqüenciar os fragmentos de Wip amplificados com meli1+ e meli3- e meli2+ e mele3-. Esta linhagem é caracterizada por um padrão de três bandas de corrida lenta próximas que dificulta a purificação de cada uma isoladamente do gel de agarose. Estas mesmas bandas são claramente observadas no *Southern blot* de produtos de PCR realizados com os iniciadores meli1+ e mele3- (Figura 4.30). Há evidências que este padrão observado em Wip é compartilhado por mais outras duas linhagens de *D. willistoni*: Cip e Cor.

A ausência de bandas nas linhagens de *D. willistoni*, quando os iniciadores meli1+ e mele3- são usados na PCR, não nos surpreende porque estes são produtos de apenas um ciclo de PCR, não sendo produtos de reamplificação. Na realidade, é surpreendente a existência de bandas em *D. melanogaster*, mostrando uma grande expressão destes fragmentos truncados. A reamplificação com os mesmos iniciadores não foi realizada por favorecer a reamplificação dos fragmentos menores (dados não mostrados). Assim, a técnica de *Southern blot* foi utilizada para observação dos produtos amplificados com estes iniciadores (Figura 4.30).

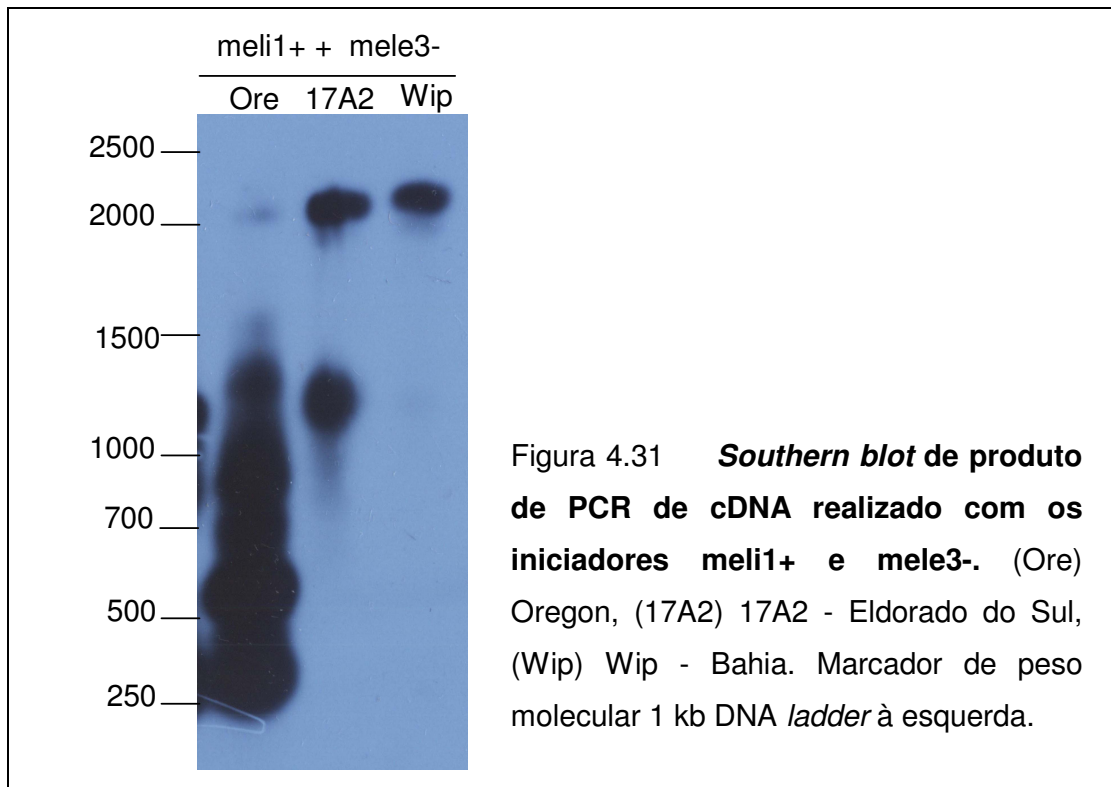


As duas linhagens de *D. willistoni* compartilham a banda maior que corresponde a um potencial transcrito do repressor de 66 kDa. A outra banda compartilhada tem tamanho aproximado de 900 pb e possivelmente é um transcrito proveniente de um fragmento de aproximadamente 1000 pb, presente entre várias linhagens de *D. willistoni* (Figura 4.5). O tamanho dos outros fragmentos de 17A2 foram estimados como 1540, 1140, 570, 310 pb, e os da linhagem Wip como 1870, 1660, 1110, 900 pb. Apenas a linhagem Wip apresenta uma banda que pode corresponder ao transcrito da transposase, com tamanho aproximado à 1800 pb. O seqüenciamento deste fragmento se faz necessário para confirmarmos esta diferença de expressão entre as linhagens.

Apesar dos embriões das linhagens estudadas apresentarem potenciais transcritos codificantes da transposase e do repressor da transposase, eles

diferem, como esperado, em relação aos transcritos truncados que estão sendo expressos. E *D. melanogaster* difere muito quanto à expressão de *P* quando comparado à *D. willistoni* (Figura 4.32). Neste segundo *Southern blot*, as numerosas bandas de *D. willistoni* observadas na Figura 4.31 não são visíveis possivelmente por uma competição pela sonda com os fragmentos amplificados de *D. melanogaster*. Esta amplifica pelo menos quatro fragmentos de tamanhos estimados de 890, 790, 600, 360 pb. O correspondente ao transcrito da transposase ou do repressor de 66 KDa só é visível com maior tempo de exposição do filme à membrana.

Como observado na PCR realizada com os iniciadores que anelam nas ITRs (Figura 4.5), o genoma de *D. melanogaster* possui um maior número de seqüências de elemento *P* truncadas que *D. willistoni*, possivelmente por ainda estar em processo de estabilização, e a diferença de expressão deste transposon entre as espécies é decorrência disso.



4.3 Expressão dos elementos *412* e *hobo* durante o desenvolvimento embriogênico de *Drosophila*

A expressão do elemento *412* foi usada como controle da técnica de hibridação *in situ* de embriões. O padrão tecido-temporal de expressão deste TE da classe I já foi estabelecido em *D. melanogaster* (Brookman *et al.* 1992, Ding e Lipshitz, 1994). No trabalho de Brookman *et al.* (1992), *412* foi isolado por sua ligação à proteína homeótica Ultrabithorax (*Ubx*). Em um trabalho independente, realizado por Feinstein *et al.* (1995), *412* foi isolado em um *screening* por transcritos induzidos pelo mesmo homeodomínio.

Durante a embriogênese de *D. melanogaster*, a expressão de *412* tem início no estágio de Extensão da Banda Germinal, como 13 pares de grupos celulares do mesoderma, segmentalmente dispostos em cada lado da linha média ventral, além de um par de grupos celulares na região da cabeça (Brookman *et al.* 1992, Ding e Lipshitz, 1994). Ainda neste estágio, o nível de transcrição aumenta formando faixas. As Figuras 4.32 A e B mostram este padrão na linhagem Ore de *D. melanogaster*, que foi usada como controle.

No estágio de Retração da Banda Germinal, a hibridação é observada no mesoderma visceral. Um decréscimo na intensidade do sinal é descrito, mas que se mantém intenso nos parassegmentos 10,11 e 12 (Brookman *et al.* 1992, Ding e Lipshitz, 1994). No final da embriogênese, o acúmulo de transcritos no mesoderma decresce enquanto aumenta a expressão nas gônadas em formação. Em adição, é detectada a expressão em grupos segmentares do Sistema Nervoso Central. As Figuras 4.32 C e D mostram a hibridação de embriões da linhagem Ore neste estágio do desenvolvimento.

Além da sua interessante indução por Ubx, a expressão de *412* provê um útil marcador para mesoderma gonadal, permitindo a descrição da sua formação e de sua associação com as células polares (Brookman *et al.*, 1992).

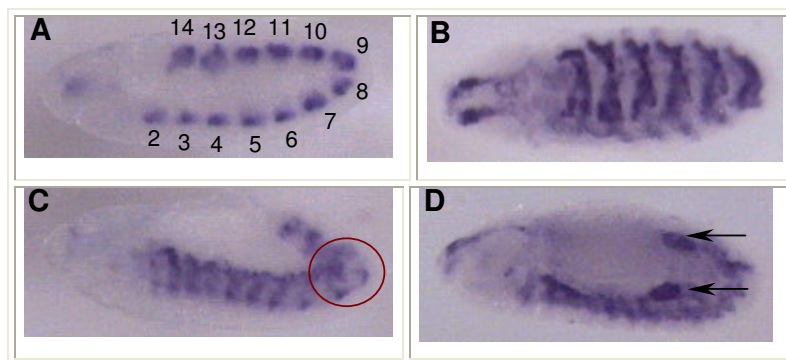


Figura 4.32 **Padrão de expressão do retroelemento 412 em embriões de *D. melanogaster*, linhagem Ore, nos estágios de Extensão (A e B) e Retração da Banda Germinal (C e D).** Números indicam os parassegmentos em A; Círculo indica os parassegmentos 10, 11 e 12 em C e as flechas indicam as gônadas em D. Vista lateral em A e C, vista dorsal em B e D. Região anterior à esquerda.

Na investigação da seqüência LTR 5' do elemento 412 pelo programa AliBaba 2.1, vinte e seis potenciais sítios de ligação a fatores de transcrição foram observados (Figura 4.33). Dentre eles, três sítios de Oct-1 e um de SP1, também descritos para o elemento *P*. Além do potencial sítio TATA *box* descrito por Yuki *et al.* (1986), outros cinco potenciais sítios TBP foram identificados. Foi localizado também um potencial sítio de ligação de fushi-tarazu (Ftz), da classe de genes regra dos pares de desenvolvimento. A proteína Ftz atua no estágio de Blastoderme Sincicial caracterizando os parassegmentos pares. A transcrição de 412 nos parassegmentos foi observada, mas sem distinção entre eles e em estágio mais avançado no desenvolvimento.

```

=====
seq( 0.. 59)      cattcacacgccgaccaaaatacatattacatatacgtacatacatatctcgctctcccgata
Segments:
1.1.3.0      16  25              =C/EBPalp=
3.1.2.2      16  27              =====Oct-1====
4.5.1.0      35  44              =====TBP====
4.3.2.0      51  60              =====SRF====
=====
seq( 60.. 119)   agcctagatatataagatatacataagaacgccgctccgctgctggcggtaccgcggcacgc
Segments:
4.3.2.0      51  60      =
4.5.1.0      64  76      =====TBP====
3.1.2.2      75  84      =====Oct-1==
1.1.3.0      78  87      =C/EBPalp=
2.3.1.0      89  99      =====Sp1====
=====
seq( 120.. 179)  agctacgcggattagcctaagtccaaatatataaaaactgtaaaatcagagagactctg
Segments:
1.1.3.0      139 148      =C/EBPalp=
3.1.2.2      145 155      =====Oct-1A==
4.5.1.0      146 155      =====TBP====
3.1.2.2      160 169      =====Oct-1==
=====
seq( 180.. 239)  tagacgttgagctgacagaaccatttctgcctactctaaaatcaaaagaagaattgaaat
Segments:
2.1.1.4      186 195      =====ER====
1.2.8.0      206 215      =====Id1====
1.1.3.0      219 228      =C/EBPalp=
3.1.2.1      235 244      ====Pi
3.3.2.0      235 244      ====HN
1.1.3.0      238 247      =C
3.1.2.2      239 248      =
=====

```

continua

```

seq( 240.. 299)  aaatatatgctcagccccgacgggtccttcaacttaaaacggacttgtagtcttctaattgaggtt
Segments:
3.1.2.1      235  244  t-1a=
3.3.2.0      235  244  F-3==
1.1.3.0      238  247  /EBPalp=
3.1.2.2      239  248  ==Oct-1A=
4.3.2.0      240  249  ====SRF====
4.5.1.0      240  249  ====TBP====
2.3.1.0      249  258  =====Sp1=====
2.1.1.1      281  290  =====GR====
2.1.1.2      282  291  =====PR====
3.1.2.2      285  294  ===Oct-1==
3.1.1.2      286  295  =====Ftz=====
=====
seq( 300.. 359)  catcattaca
Segments:

```

Figura 4.33 **Seqüência da LTR 5' de 412 mostrando os potenciais sítios de ligação a fatores de transcrição.** Seqüências em destaque são fatores de transcrição já descritos para *D. melanogaster*. Sublinhado, TATA box descrito por Yuki *et al.* (1986)

O padrão segmentar observado deve ser induzido por Ubx, cujo domínio de expressão é do parassegmento 5 a 13. Um potencial sítio de ligação a este homodomínio foi identificado dentro da seqüência da LTR de 412 (Feinstein *et al.*, 1995). Pelo programa aqui utilizado, o único sítio de ligação a Ubx foi localizado na posição 5812 a 5820 nt, dentro da ORF4 do TE. Também não foram encontrados sítios de ligação para as proteínas *abd-a* e *abd-b*, que abrangem os parassegmentos de 7 a 14, sugeridos por Brookman *et al.* (1992).

Na seqüência total do elemento, foram detectados outros potenciais sítios de ligação a fatores de transcrição envolvidos no desenvolvimento embrionário de *Drosophila*. Além dos sítios de Ftz descritos, outros oito foram encontrados; quatro sítios de antenapedia (*Antp*), proteína homeótica que é expressa nos parassegmento 4 a 13; dois sítios de *ttx*, que ativa o gene homeótico *Ubx*; e dois *MyoD*, ou *nau* em *Drosophila*, que é expresso segmentalmente nas células precursoras dos músculos.

Ação combinatória destas regiões regulatórias descritas para 412 pode ser responsável pelo complexo padrão de expressão durante o desenvolvimento do embrião.

Assim como descrito para *P*, a sonda antissenso de 412, que é o controle negativo da técnica, hibrida nos mesmos tecidos que a sonda senso, sugerimos que este retroelemento também possa ter uma regulação por RNA antissenso durante a embriogênese de *D. melanogaster*. O mesmo procedimento experimental de análise por sítios de ligação a fatores de transcrição da região 3' invertida, realizada para o elemento *P*, foi feito para a seqüência 3' invertida da LTR de 412 (Figura 4.34). Foram localizados três potenciais sítios de ligação da

família de fatores *POU domain factor* (oct-1, oct-5, oct-2.1), o qual pertence o fator d-oct de *D. melanogaster*, também localizados no elemento *P* e na LTR 5' de 412. Como este, potenciais sítios de ligação de TBP e Ftz são também encontrados na LTR 3'invertida e na LTR 5' de 412.

Assim, uma combinação de TBP, Ftz e oct-1, pode estar sendo responsável pela expressão tecido-específica senso e antissenso de 412.

```

=====
seq( 0.. 59)      ggcctaactgcgtgcataaacataaacataaacatagcaacaaagtgcgccataagtta
Segments:
4.5.1.0      17  26              =====TBP=====
9.9.539     43  52                                =====NF-1=====
3.1.2.3     58  67                                                                ==
3.1.2.2     59  68                                                                ==
=====
seq( 60.. 110)   atatgctatuuatatttaattgtttcttaaatattgcataggcacataactaca
Segments:
3.1.2.3     58  67      ==Oct-5==
3.1.2.2     59  68      ==Oct-1==
4.3.1.1     63  72      ===MEB-1===
3.1.2.2     66  79      =====Oct-2.1=====
3.1.1.12    69  78      ===HNF-1===
2.3.2.2     71  80      =====Hb=====
3.1.1.2     71  80      =====Ftz=====
3.1.1.7     71  80      =embryo_D=
1.1.3.0     87  97
2.3.1.0    112 121      =C/EBPalpha

```

Figura 4.34 **Seqüência LTR 3' invertida de 412 mostrando os potenciais sítios de ligação a fatores de transcrição.** Seqüências emolduradas são os fatores de transcrição descritos em *D. melanogaster*.

Embriões O/N, isto é, de praticamente todos os estágios de desenvolvimento, de 17A2 de *D. willistoni* foram hibridados com a mesma sonda usada na hibridação de *D. melanogaster*. A expressão é observada no Sistema Nervoso Central, durante o estágio de Extensão da Banda Germinal, como visto na Figura 4.35. Os padrões de expressão descritos em *D. melanogaster* não foram observados.



Figura 4.35 **Padrão de expressão do retroelemento 412 em embriões de *D. willistoni*, linhagem 17A2, no estágio de Retração da Banda Germinal. Vista lateral, região anterior à esquerda.**

O fraco sinal de hibridação observado pode ser atribuído a uma baixa identidade entre as seqüências de 412 presentes nas duas espécies. Se confirmada a expressão diferencial entre as duas espécies, uma análise de suas seqüências poderá colaborar com o estudo das regiões regulatórias responsáveis pela expressão deste TE durante o desenvolvimento de ambas as espécies.

Como, até então, nenhum padrão foi estabelecido para *hobo*, em nenhuma espécie de *Drosophila*, a linhagem Ore de *D. melanogaster* foi usada nos ensaios prévios de hibridação. Da mesma forma que 412, um *pool* de embriões de todos os estágios do desenvolvimento foram hibridados com a sonda de *hobo*. Um forte sinal de hibridação é observado no estágio de Retração da Banda Germinal

(Figura 4. 36). Os transcritos são detectados no Sistema Nervoso Central e mesoderma como um todo, similar ao observado na hibridação de *P* neste mesmo estágio. Nenhum sinal de hibridação em outros estágios foi observado, mas a hibridação de cada estágio isolado é necessária para afirmarmos que *hobo* se expressa apenas durante a Extensão da Banda Germinal.



Figura 4.36 **Padrão de expressão do transposon *hobo* em embriões de *D. melanogaster*, linhagem Ore, no estágio de Retração da Banda Germinal. Vista lateral. Região anterior à esquerda.**

A análise da seqüência de 359 pb 5' do elemento pelo programa AliBaba 2.1 identificou sítios para o fator de transcrição Sp1. Além destes, apenas c-Fos, da classe dos fatores zíper de leucina, foi descrito para *D. melanogaster*. Na realidade, o fator de transcrição de *D. melanogaster* é chamado dFRA e faz parte da mesma subfamília dos fatores de transcrição de c-Fos de camundongo. Esse é amplamente expresso durante o desenvolvimento embriogênico de *D. melanogaster* a partir da Retração da Banda Germinal, mas não correspondem as regiões hibridizadas observadas para *hobo*.

Devido à baixa identidade entre a seqüência de *hobo* de *D. melanogaster* e *D. willistoni* (Seção 4.2), esta mesma sonda não foi usada na investigação da expressão de *hobo* em *D. willistoni*. Para isso, sugere-se a utilização de uma sonda de *hobo* descrita para esta espécie.

O padrão de *gypsy* em *D. melanogaster* já foi definido por Ding e Lipshitz (1994). A hibridação de embriões de *D. willistoni* com sonda para este TE não foi realizada, entretanto, por RT-PCR verificamos a expressão deste em embriões da linhagem 17A2 de *D. willistoni*, similar ao observado em adultos (dados não mostrados).

5 Discussão

O estudo da disgenesia do híbrido é uma boa oportunidade para o entendimento da regulação de TEs. Em *D. melanogaster*, três TEs foram descritos como causadores da síndrome: *P*, *hobo* ou *I* (Blackmann *et al.*, 1987; Bregliano e Kidwell *et al.*, 1983). A possibilidade do elemento *P* estar envolvido na disgenesia de *D. willistoni* (Regner *et al.*, 1999) está relacionada aos sítios de inserções cromossômicos desiguais de *P* nas duas linhagens (Regner *et al.*, 1996). Porém, há a possibilidade da disgenesia estar sendo provocada pela mobilização de outro, ou outros TEs. A disgenesia do híbrido de *D. virilis*, por exemplo, é resultado da mobilização de pelo menos seis TEs de diferentes classes, apesar da instabilidade

genômica ter sido atribuída a apenas ao retroelemento *Penelope* que também possui uma distribuição cromossômica assimétrica entre as duas linhagens parentais (Petrov *et al.*, 1995; Evgen'ev *et al.*, 1997, Pyatkov *et al.*, 2002). O objetivo deste trabalho foi investigar o comportamento de quatro TEs já descritos no genoma de *D. willistoni*: *P*, *hobo*, *412* e *gypsy*. Maior atenção foi dada ao comportamento de *P* durante a embriogênese de 17A2 e Wip, linhagens onde a disgenesia do híbrido foi descrita pela primeira vez nesta espécie (Regner *et al.* 1999; Klein 2000).

A disgenesia causada pelo retroelemento *I* afeta a progênie de fêmeas sem o elemento, denominadas reativas, com machos com *I* ativo, denominados indutores (Lachaume *et al.*, 1992). Ao contrário da disgenesia causada por *hobo* e *P*, onde a esterilidade é resultado da atrofia das gônadas (esterilidade gonadal), na disgenesia de *I* a esterilidade ocorre porque os embriões param o desenvolvimento no estágio de clivagem (letalidade embrionária). Isso é resultado de uma expressão tecido-específica de *I* nas células germinativas da prole fêmea (SF) do cruzamento disgênico. A expressão de *I* está correlacionada com sua transposição (Seleme *et al.*, 1999), ou seja, a regulação da transposição é transcricional. O mesmo ocorre com o retroelemento *Penelope* de *D. virilis*, onde foi observado o aumento de transcritos nas gônadas da prole disgênica, mas não em tecidos somáticos (Evgen'ev *et al.* 1997).

Transcritos de *412* e *gypsy*, que também são retroelementos, foram detectados em todas as linhagens de *D. willistoni*. Ao contrário de *P*, não sabemos se as seqüências desses TEs possuem capacidade de codificar as enzimas responsáveis pela transposição. Há indícios de que *gypsy* está inativo no genoma de

D. willistoni. Além da baixa homologia com a seqüência de outras espécies e a existência de vários códons de parada na ORF3 (Herédia *et al.*, 2004), pouca mobilidade foi inferida em experimentos de *Southern blot* (Sassi, 2000), apesar da presença da cópia completa ter sido sugerida neste mesmo trabalho. Corroborando a hipótese de imobilidade de *gypsy*, o trabalho de Rohde (2000) mostra que pouca variação entre os sítios cromossômicos deste elemento é observada em diferentes populações geográficas de *D. willistoni*. Existência de cópia completa de 412 no genoma de *D. willistoni* também foi inferida por *Southern blot* genômico (dados não mostrados).

Mesmo usando iniciadores que amplificam uma pequena seqüência de 412 e *gypsy*, aproximadamente 10% e 6% do tamanho do TE respectivamente, foi detectada a transcrição de seqüências truncadas e possivelmente não funcionais. De uma forma geral a presença de transcritos não obrigatoriamente refletem transposição ou funcionalidade das seqüências. Estas podem até ser potenciais repressores, como sugerido para as seqüências truncadas de *P*, ou agirem como reguladores por um processo de silenciamento *in trans* dependente da homologia (Jensen *et al.* 1999b; Aravin *et al.* 2001).

Similar ao processo de co-supressão, onde o número de cópias no genoma leva ao silenciamento dos homólogos, o mecanismo de silenciamento dependente da homologia, também parece ter evoluído como um mecanismo para silenciar elementos transponíveis ou inibir propagação viral (Birchler *et al.*, 1999). Exemplo de ambos mecanismos foi sugerido para o elemento *I* onde foi relatado que o aumento de cópias deste retroelemento por transgenia leva ao silenciamento da atividade da

cópia endógena (Chaboissier *et al.*, 1998; Jensen *et al.*, 1999a; Jensen *et al.*, 1999b; Malinsky *et al.* 2000). Corrobora a idéia, a observação que linhagens com baixo número de cópias requerem mais gerações para a repressão, que em linhagens com maior número de cópias. Como um aumento protéico não acompanha o aumento das cópias introduzidas, atribui-se a regulação pós-transcricional a presença de transcritos homólogos. Assim, podemos supor que os transcritos de *412* e *gypsy*, detectados nas linhagens de *D. willistoni*, possam estar funcionando como repressores em um sistema de silenciamento dependente da homologia de seqüências. Supõe-se que no momento que a homologia das seqüências diminui, o efeito repressor também diminua (Birchler *et al.*, 1999), permitindo uma re-infestação.

Antes de ser proposto um modelo pós-transcricional de regulação de *412* e *gypsy*, deve-se avaliar a ativação gônada-específica e se ocorre um aumento significativo da expressão destes TEs na prole disgênica comparativamente com as linhagens paternas.

A divergência da seqüência de *hobo* de *D. willistoni* e de *D. melanogaster* tem sido sugerida por uma série de trabalhos do nosso grupo (Sassi, 2000; Loreto *et al.*, 1998; Klein, 2002). Mesmo assim, Klein (2002), conseguiu detectar transcritos de *hobo* nas linhagens 17A2 e Wip. Em nosso trabalho, mesmo usando condições similares às descritas por Klein (2002), apenas seqüências menores de 200 pb foram detectadas por RT-PCR seguido de *Southern blot*, o que nos faz questionar sobre a especificidade destes fragmentos e sugerir maiores investigações sobre a expressão deste elemento nesta espécie. Variações da técnica de RT-PCR e *Southern blot* foram realizadas neste trabalho e em um único teste, a linhagem 17A2 apresentou

uma banda de amplificação correspondente ao tamanho do transcrito esperado (dados não mostrados), o que seria uma evidenciaria o possível envolvimento de *hobo* na síndrome da disgenesia do híbrido.

A regulação de *P* em *D. willistoni* deve ocorrer pelo processamento tecido-específico do íntron IVS3, assim como descrito para *D. melanogaster* (Misra e Rio, 1990). Além do potencial transcrito do repressor de 66 kDa, específico de células somáticas, em todas as linhagens estudadas, não apenas em 17A2 e Wip, foi detectado também o potencial transcrito da transposase. A transcrição de seqüências truncadas também foi detectada, sugerindo uma regulação similar à do repressor KP, ou mesmo por silenciamento dependente da homologia.

Birchler *et al.* (1999) afirmaram não se surpreenderem que, com a abundância de elementos transponíveis, o genoma de vertebrados tenha preservado “todo e qualquer” mecanismo que diminua o impacto da invasão. Isso pode ser válido para outros organismos com grande abundância de TEs.

O comportamento de *P* durante a embriogênese foi estudado neste trabalho, estabelecendo comparações entre uma espécie recentemente invadida, *D. melanogaster*, e uma espécie antiga portadora deste elemento, *D. willistoni*, quanto a expressão tecido-espacial do elemento. Até então, o padrão tecido-temporal durante o desenvolvimento embrionário de TEs da classe II não tinha sido descrito, ao contrário de TEs da classe I (Brönner *et al.*, 1995; Ding e Lipshitz, 1994; Frommer *et al.*, 1994; Mozer e Benzer, 1994; Charlesworth e Langley 1989).

Drosophila melanogaster e *D. willistoni* possuem o mesmo padrão tecido-espacial de expressão de *P*, o que nos leva a sugerir que a regulação da transcrição

ocorre por seqüências *cis* presentes no elemento, e não por seqüências reguladoras vizinhas ao seu sítio de inserção. Isso contradiz o trabalho de O'Kane e Gehring (1987) que descrevem o promotor de *P* como sendo muito dependente de seqüências adjacentes ao sítio de integração sugerido pelo número de padrões de expressão de *lacZ* observados em embriões transformados por este gene *reporter* controlado por promotor de *P*. O efeito de inserção também tem sido observado em trabalhos de transformação gênica com construções repressoras da transposição de *P* (Misra e Rio, 1990; Gloor *et al.*, 1993; Misra *et al.*, 1993; Andrews e Gloor, 1995). Um dos exemplos é a repressão da disgenesia gonadal em apenas duas de quatro linhagens transformadas com uma mesma construção repressora guiada por promotor de *P* (Simmons *et al.*, 1996).

Ao mesmo tempo, o trabalho de Ding e Lipshitz (1994), investigando quinze retroelementos em quatro linhagens de *D. melanogaster*, pela técnica de hibridação *in situ* de embriões inteiros, identificou apenas um evento de efeito de posição. Aparentemente, esta técnica de hibridação mostra a expressão dos elementos indiscriminadamente. A expressão observada na linhagem Wip, por exemplo, deve ser decorrente de uma ou outra cópia do elemento que está presente na região da eucromatina, enquanto a maioria das cópias deve estar silenciada pela sua posição cromossômica.

Outro fator que deve ser levado em consideração é a sonda usada na hibridação *in situ* de embriões. Neste trabalho, a sonda usada abrange 40 nt 3' do éxon 1 e 490 nt 5' do éxon 2. Esta sonda não detectaria a expressão da proteína KP, por exemplo, ou de outros transcritos truncados como os que foram descritos para *D.*

melanogaster neste trabalho. Aparentemente o acompanhamento pontual de uma única seqüência pode mostrar melhor o efeito de posição na expressão gênica.

Devemos considerar, porém, que os próprios O'Kane e Gehring (1987) chamam a atenção para o número de padrões de expressão de *lacZ*, regulado pelo promotor de *P*, no Sistema Nervoso. O presente trabalho sugere que a região regulatória de *P* deve responder a pelo menos dois tipos de fatores de transcrição, um envolvido no desenvolvimento do mesoderma e outro do Sistema Nervoso Central. A hibridação na fenda ventral, durante a Gástrula, lembra o padrão de expressão de genes como *snail* e *twist* (Casal e Leptin, 1996) responsáveis pela formação do mesoderma. Nenhum potencial sítio de ligação para estes fatores de transcrição foi detectado pelo programa de análise de seqüência usado. Contudo, uma seqüência de ligação para o fator de transcrição Oct-1, envolvido no desenvolvimento do Sistema Nervoso, foi encontrado.

Interessantemente, o controle negativo da técnica, que é a ribosonda senso, apresenta o mesmo padrão de hibridação que a sonda antisenso. A regulação por RNA anti-senso tem sido descrita para TEs (Kleckner *et al.*, 1996; Joanin *et al.*, 1997). Transcritos anti-senso do TE *Fex*, um elemento do tipo LINE, foram descritos por Kerber *et al.* (1996) que sugeriu o envolvimento destes como reguladores negativos durante a embriogênese e células germinativas, onde seus transcritos foram detectados. Em *D. melanogaster*, e espécies do grupo *repleta*, dois transcritos anti-senso de *micropia*, um retrotransposon, são codificados apenas nos testículos durante a espermatogênese a partir de promotores internos (Lankenau *et al.* 1994; Almeida e Carareto, 2004). Ao contrário de *micropia*, os transcritos anti-senso de *P*

parecem estar sendo regulados pelo mesmo promotor dos transcritos senso, já que apresentam o mesmo padrão tecido-espacial durante a embriogênese. O fato do sítio de ligação de Sp1 e oct-1 estarem presentes em ambas extremidades da seqüência de *P*, dá maior confiabilidade no seu envolvimento com o padrão tecido-temporal observado. Neste trabalho também detectamos a expressão, durante a embriogênese, de seqüências anti-senso de *412* em *D. melanogaster*. Como o padrão de expressão corresponde ao padrão estabelecido pela sonda senso, o mesmo procedimento de análise das extremidades 5' e 3', realizado para *P*, foi feito para *412* e, apesar de terem sido encontrados sítios de ligação a fatores de transcrição comuns em ambas extremidades, ficou claro que apenas a análise da seqüência não é suficiente para esclarecer os padrões observados. Isso porque a indução da transcrição de *412* pela proteína homeótica Ubx já foi estabelecida (Feinstein *et al.*, 1995) e, pelo programa de análise de seqüência usado, apenas um sítio localizado na região codificadora foi encontrado. Ao mesmo tempo, Brookman *et al.* (1992) encontraram sítios de ligação às proteínas homeóticas *abd-a* e *abd-b* que também não foram encontradas pela análise feita neste trabalho.

A existência de transcrito senso e anti-senso pode significar uma maneira importante de regulação destes elementos durante a embriogênese. Mutantes de *P*, que codificam apenas a transposase, morrem apenas no estágio de pupa (Engels *et al.*, 1987) de forma que uma regulação diferencial, que não depende do processamento alternativo, deve ocorrer durante a embriogênese. Por RT-PCR, potenciais transcritos da transposase e do repressor de 66 kDa foram detectados mas, não é observada hibridação de *P* nas células polares, durante os estágios em

que são claramente visíveis no pólo posterior do embrião. Após a migração destas para o interior do embrião, em direção ao primórdio do intestino médio, a visualização das células polares é impossibilitada por estarem envoltas por tecidos somáticos. Estes tecidos são, durante o estágio de Extensão da Banda Germinal, o primórdio do intestino médio e, durante o estágio de Retração da Banda Germinal, o mesoderma dos segmentos abdominais 5, 6 e 7, e ambos expressam *P*. A pergunta que permanece é em que células do embrião o processamento do íntron IVS3, ou seja, o transcrito da transposase, está ocorrendo. Para responder a isso sugerimos o uso de anticorpo anti-transposase em técnica de imuno-histoquímica com embriões inteiros.

O RNA anti-senso, assim como polipeptídeos codificados por *P* truncado, são hipóteses alternativas de regulação. Simmons *et al.* (1996), identificaram seqüências pequenas com capacidade de regulação de transposição, tanto em mutante $\Delta 2-3$ com em prole disgênica, quando transcritas no sentido 3´-5.

Uma série de transcritos truncados foi amplificada com iniciadores de *P*, principalmente na linhagem de *D. melanogaster*. Fica evidente que o genoma de *D. melanogaster*, comparativamente com o de *D. willistoni*, ainda está em processo de estabilização, pelo maior número de seqüências truncadas que estão sendo expressas, a ponto do transcrito originado da seqüência do *P* íntegro dificilmente ser observado nas condições de PCR utilizadas. Esta foi a única diferença marcante na expressão observada entre *D. willistoni* e *D. melanogaster*.

Três transcritos truncados de *P* que são altamente expressos tanto em adultos quanto em embriões, foram seqüenciados. As duas seqüências de *D. melanogaster*

e a de *D. willistoni* alinham com o éxon 1, na mesma região que está presente na seqüência codificadora do repressor KP. Apesar da identidade de seqüências e do alto nível de expressão, a atividade destes fragmentos como repressores, similar à KP, não pode ser inferida. Primeiramente porque a atividade de ligação ao DNA e de dimerização da proteína KP é codificada pela ORF0 (Lee *et al.*, 1996; Lee *et al.*, 1998) enquanto as seqüências obtidas neste trabalho são restritas à ORF1. Contrapondo esta idéia, em ensaios de mutações do zíper de leucina 5´da proteína KP, que é considerada crucial para a ligação ao sítio de reconhecimento da transposase, foi mostrado que esta mantém sua atividade de dimerização sugerindo a existência de outros sítios importantes que não estão sendo codificados pela ORF0. Segundo, seqüências UP1 e NP2, com identidade de 212 e 159 aa por KP respectivamente, não apresentaram atividade de repressão (Simmons *et al.*, 1996), possivelmente porque a adição ou deleção existente em uma e outra seqüência são incompatíveis com a função de repressor. Mas pode-se considerar que as cópias truncadas originalmente funcionam como uma fonte estável de proteínas possivelmente repressoras que inibem a atividade de transposição de um *P* completo (Pinsker *et al.*, 2001), por um tipo ou outro de mecanismo regulador.

Um dos transcritos gerados na amplificação com os iniciadores meli2+ e meli3- possui uma deleção de 198 pb da região 3´ do éxon 2. A presença de uma mesma seqüência de DNA em duas espécies diferentes pressupõe o surgimento desta em um ancestral comum às duas. Mas esta explicação não é compatível com os estudos evolutivos de *P* nestas duas espécies, que sugere que o genoma de *D. melanogaster* foi invadido nos últimos 200 anos por uma seqüência de *P* de *D.*

willistoni (Engels, 1989). Assim, imagina-se ou a transferência horizontal da seqüência truncada, assim como ocorreu com o *P* íntegro, ou este transcrito é resultado de um processamento alternativo. Até então, os processamentos alternativos de *P* são restritos ao íntron IVS3, como descritos em *D. melanogaster* (Chain *et al.*, 1991), *D. bifasciata* e *D. helvetica* (Haring *et al.*, 1998). Em *D. helvetica* e *D. melanogaster* o processamento duplo é específico da linhagem germinativa, como o processamento do íntron IVS3 completo. Em *D. bifasciata* o processamento alternativo só é restrito às células da linhagem germinativa em linhagens tipo O. Apesar da conservação da seqüência de *D. willistoni* em relação à *D. melanogaster*, o processamento deve ser investigado considerando que no grupo *saltans* de *Drosophila*, apesar da conservação dos pontos de quebra, o processamento alternativo não foi observado (Castro e Carareto, 2004).

A transferência materna de transcritos de *P* foi observada por RT-PCR de embriões de 1h, que não iniciaram a expressão zigótica. Enquanto a linhagem 17A2 de *D. willistoni* está de acordo com o estabelecido por Simmons *et al.* (2002), na linhagem de *D. melanogaster* são observados transcritos com todas combinações de iniciadores usados. Segundo Simmons *et al.* (2002) o sinal consenso para o envio de transcritos maternalmente para o oócito está presente no íntron IVS3, de forma que nenhuma amplificação era esperada com o iniciador meli3-. Não apenas foi amplificado transcritos com este iniciador em *D. melanogaster*, como também são amplificadas duas bandas, com o mesmo padrão de corrida eletroforética, com todas as combinações de iniciadores usadas. Apesar do padrão de corrida destes

transcritos ser similar ao observado na amplificação com os iniciadores meli1+ e mele3- de embriões e adultos, a confirmação só será feita por seqüenciamento.

Por hibridação *in situ* de embriões, a presença de transcritos de *P* no início do desenvolvimento foi sugerida por um sinal difuso em todas as linhagens, e confirmada para duas destas por RT-PCR de embriões de 1h. Aparentemente, o transcrito herdado maternalmente em 17A2 é proveniente de uma seqüência completa e corresponderia a um citótipo *P*. Como afirmado anteriormente, a disgenesia do híbrido de *D. willistoni* é recíproca, porém maior número de gônadas afetadas são observadas na prole do cruzamento direcional de fêmeas Wip com machos 17A2 (Regner *et al.*, 1999). O cruzamento de machos de 17A2 com outras linhagens também leva a um maior número de prole com alterações fenotípicas nos ovários, mas não em cruzamentos contrários (Klein, 2002), sugerindo a atividade de um repressor materno. O mesmo procedimento experimental deverá ser realizado em busca dos componentes de *P* maternos na linhagem Wip.

Diferença entre transcritos das duas linhagens de 17A2 e Wip é claramente observada em uma amplificação com os iniciadores meli1+ e mele3- seguido de *Southern blot*. Ambas transcrevem o potencial repressor de 66 kDa e um fragmento truncado de 900 pb aproximadamente, mas 17A2 possui um maior número de transcritos que a linhagem Wip. Como já sugerido por Regner *et al.* (1996), a linhagem 17A2 parece ter sofrido uma invasão recente por *P*. O padrão de três bandas de corrida lenta de Wip, e ausente em 17A2, é visualizado com outras duas combinações de iniciadores na mesma linhagem e em pelo menos outras duas: Cip e Cor. A distância geográfica de Cor (Uruguai) para as outras linhagens (Wip - Ba e

Cip - MG) discorda com a idéia de que este padrão de bandas é resultado de seqüências compartilhadas por uma única população. Se estes transcritos colaboram de forma diferencial para o citótipo das linhagens ainda deve ser investigado.

O maior argumento para *P* ser o responsável pela disgenesia é sua distribuição desigual no genoma das duas linhagens. Mesmo assim, mostramos neste trabalho que, apesar da maioria das cópias de *P* da linhagem Wip estar distribuída na heterocromatina, ela não está completamente silenciada e, durante a embriogênese, se expressa da mesma maneira que na linhagem 17A2.

6 Conclusões

- Os TEs *P*, *gypsy* e *412* são expressos no genoma de *D. willistoni*, incluindo seqüências truncadas. Comportamento similar foi observado em *D. melanogaster*.

- Transcritos da transposase e do repressor de 66 kDa foram observados em todas as linhagens de *D. willistoni* e na linhagem de *D. melanogaster* estudadas, tanto em adultos quanto embriões.

- O elemento *P* possui um padrão de expressão tecido-temporal compartilhado entre *D. willistoni* e *D. melanogaster*, sugerindo que a expressão de *P* durante o desenvolvimento embrionário é regulado por seqüências *cis* do próprio elemento.

- A regulação de *P* durante a embriogênese pode estar sendo realizada por RNA anti-senso. O mesmo mecanismo de regulação é sugerido para o TE *412* em *D. melanogaster*.

-Diferença significativa de expressão *P* entre de *D. willistoni* e *D. melanogaster* possivelmente ocorre pela presença de um maior número de seqüências truncadas na segunda espécie.

7 Perspectivas

Baseadas nos resultados obtidos neste estudo tem-se como perspectivas de trabalho o que se segue:

- Realizar RT-PCR quantitativo para verificar se ocorre aumento da transcrição quando comparadas a geração parental e prole disgênica de *D. willistoni*. tomando *D. melanogaster* como controle.

- Realizar RT-PCR de tecidos somáticos e germinativos de *D. willistoni* para verificar se a os padrões de transcrição detectados são tecido-específicos.

- Clonar e seqüenciar transcritos de *P* de *D. willistoni* cuja natureza não foi estabelecida neste trabalho.

- Usar a técnica de *transposon display* no intuito de descobrir quais TEs estão se mobilizando na disgenesia do híbrido de *D. willistoni*.

- Utilizar seqüências de *hobo*, *412* e *gypsy* de *D. willistoni* como sonda na hibidação de seus embriões, assegurando sinais de hibridação mais fortes.

- Realizar transformação de embriões de *D. willistoni* com construções de seqüências de *P* e genes *reporter* no intuito de localizar as regiões responsáveis pelos padrões tecido-específicos observados.

- Realizar ensaio de imuno-histoquímica com anticorpo anti-transposase para estabelecer se há tradução dos transcritos da transposase detectados, ou se estão sendo silenciados, e sua localização durante o desenvolvimento do embrião.

- Confirmar a regulação por RNA anti-senso de *P* em embriões pelo uso da enzima RNase One, com atividade de lise de fitas simples de RNA, e posterior RT-PCR.

- Verificar se há transferência materna de transcritos de *P*, para a linhagem Wip, estabelecendo nesta linhagem um citótipo repressor.

- Verificar se há transferência materna de transcritos de outros TEs, que possam estabelecer um citótipo repressor como o elemento *P*.

8 Referência Bibliográfica

Almeida LMA and Carareto CMA (2002) Gonadal Hybrid Dysgenesis in *Drosophila sturtevantii* (Diptera, Drosophilidae). *Iheringia* 92: p.71-79.

Almeida LMA and Carareto CMA (2004) Identification of two subfamilies of *micropia* transposable element in species of the *repleta* group of *Drosophila*. *Genetica* 121: 155-164.

Anderson CL, Carew EA and Powell JR (1993) Evolution of the *Adh* locus in the *Drosophila willistoni* group: the loss of an intron, and shift in codon usage. *Mol Biol Evol* 10: 605-618.

Andrews JD and Gloor GB (1995) A role for the KP leucine zipper in regulating *P* element transposition in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 141: 587-594.

Aravin AA, Naumova NM, Tulin AV, Vagin VV, Rozovsky YM and Gvozdev VA (2001) Double-stranded RNA-mediated silencing of genomic tandem repeats and transposable elements in the *D. melanogaster* germline. *Curr Biol* 11: 1017-1027.

Arcà B and Savakis C (2000) Distribution of the transposable element *Minos* in the genus *Drosophila*. *Genetica* 108:263-267.

Berg DE and Howe MM (1989). *Mobile DNA*, American Society for Microbiology, Washington.

- Birchler JA, Pal-Bhadra M and Bhadra U (1999) Less from more: cosuppression of transposable elements. *Nat Genet* 21:148-149.
- Blackman RK, Grimaila R, Koehler MM and Gelbart WM (1987) Mobilization of *hobo* elements residing within the *decapentaplegic* gene complex: suggestion of a new hybrid dysgenesis system in *Drosophila melanogaster*. *Cell* 49: 497-505.
- BlastN - Basic Local Alignment Search Tool, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>
- Bregliano J and Kidwell M (1983) Hybrid dysgenesis determinants. *In*: Shapiro JA (ed) *Mobile Genetic Elements*. Academic Press, Inc, London, pp 363-410.
- Brönner G, Taubert H and Jackle H (1995) Mesoderm-specific *B104* expression in the *Drosophila* embryo is mediated by internal *cis*-acting elements of the transposon. *Chromosoma* 103: 669-675.
- Brookfield JF (1991) Models of repression of transposition in P-M hybrid dysgenesis by *P* cytotype and by zygotically encoded repressor proteins. *Genetics* 128: 471-486.
- Brookman JJ, Toosy AT, Shashidhara LS and White RA (1992) The *412* retrotransposon and the development of gonadal mesoderm in *Drosophila*. *Development* 116: 1185-1192.
- Bucheton A (1990) *I* transposable elements and I-R hybrid dysgenesis in *Drosophila*. *Trends Genet* 6: 16-21.
- Bucheton A (1995) The relationship between the *flamenco* gene and *gypsy* in *Drosophila*: how to tame a retrovirus. *Trends Genet* 11: 349-353.
- Bullock WO, Fernandez JM and Short JM (1987) XL1-Blue: a high efficient plasmid transforming *recA Escherichia coli* strain with beta-galactosidase selection. *Bio Techniques* 5: 376.
- Bushman F (2002) *Lateral DNA transfer: mechanisms and consequences*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 448 pp.
- Caceres M, Puig M and Ruiz A (2001) Molecular characterization of two natural hotspots in the *Drosophila buzzatii* genome induced by transposon insertions. *Genome Res* 11: 1353-1364.
- Calvi BR, Hong TJ, Findley SD and Gelbart WM (1991) Evidence for a common evolutionary origin of inverted repeat transposons in *Drosophila* and plants: *hobo*, *Activator*, and *Tam3*. *Cell* 66: 465-471.
- Capy P, Gasperi G, Biemont C and Bazin C (2000) Stress and transposable elements: co-evolution or useful parasites? *Heredity* 85: 101-106.

- Casal J and M Leptin (1996) Identification of novel genes in *Drosophila* reveals the complex regulation of early gene activity in the mesoderm. Proc Natl Acad Sci USA 93: 10327-10332.
- Castro JP and Carareto CM (2004a) Canonical *P* elements are transcriptionally active in the *saltans* group of *Drosophila*. J Mol Evol 59: 31-40.
- Castro JP and Carareto CM (2004b) *Drosophila melanogaster P* transposable elements: mechanisms of transposition and regulation. Genetica 121: 107-118.
- Cavarec L and Heidmann T (1993) The *Drosophila copia* retrotransposon contains binding sites for transcriptional regulation by homeoproteins. Nucleic Acids Res 21: 5041-5049.
- Chaboissier MC, Bucheton A and Finnegan DJ (1998) Copy number control of a transposable element, the *I* factor, a LINE-like element in *Drosophila*. Proc Natl Acad Sci USA 95: 11781-11785.
- Chain AC, Zollman S, Tseng JC and Laski FA (1991) Identification of a *cis*-acting sequence required for germ line-specific splicing of the *P* element ORF2-ORF3 intron. Mol Cell Biol 11: 1538-1546.
- Chandler VL and Walbot V (1986) DNA modification of a maize transposable element correlates with loss of activity. Proc Natl Acad Sci USA 83: 1767-1771.
- Charlesworth B (1989) Transposable elements in natural populations of *Drosophila*. Prog Nucleic Acid Res Mol Biol 36: 25-36.
- Charlesworth B and Langley CH (1989) The population genetics of *Drosophila* transposable elements. Annu Rev Genet 23: 251-287.
- Clone Manager version 3.11 (1998 – 1990) Scientific & Educational Software
- Conte C, Calco V, Desset S, Leblanc P, Dastugue B and Vaury C (2000) Impact of multiple insertions of two retroelements, *ZAM* and *Idefix* at an euchromatic locus. Genetica 109: 53-59.
- Corpet F (1988) Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. Nucleic Acids Res 16: 10881-10890.
<http://prodes.toulouse.inra.fr/multalin/multalin.html>.
- Craig NL (1990) *P* element transposition. Cell 62: 399-402.

- Daniels SB, Peterson KR, Strausbaugh LD, Kidwell MG and Chovnick A (1990) Evidence for horizontal transmission of the *P* transposable element between *Drosophila* species. *Genetics* 124: 339-355.
- Dawkins (1974) *The Selfish Gene*. Oxford University Press, Inglaterra, 352 pp.
- Desset S, Conte C, Dimitri P, Calco V, Dastugue B and Vaury C (1999) Mobilization of two retroelements, *ZAM* and *Idefix*, in a novel unstable line of *Drosophila melanogaster*. *Mol Biol Evol* 16: 54-66.
- Dimitri P and Junakovic N (1999) Revising the selfish DNA hypothesis: new evidence on accumulation of transposable elements in heterochromatin. *Trends Genet* 15: 123-124.
- Ding D and Lipshitz HD (1994) Spatially regulated expression of retrovirus-like transposons during *Drosophila melanogaster* embryogenesis. *Genet Res.* 64: 167-181.
- Dominguez A and Albornoz J (1996) Rates of movement of transposable elements in *Drosophila melanogaster*. *Mol Gen Genet* 251: 130-138.
- Dorsett D, Viglianti GA, Rutledge BJ and Meselson M (1989) Alteration of *hsp82* gene expression by the *gypsy* transposon and suppressor genes in *Drosophila melanogaster*. *Genes Dev* 3: 454-468.
- Ehrman L and Powell JR (1982) The *Drosophila willistoni* species group. In: Ashburner M, Carson HL and Thompson JN (eds) *The genetics and biology of Drosophila*. Academic Press, New York, pp 193-225.
- Eickbush TH (1997) Telomerase and retrotransposons: which came first? *Science* 277: 911-912.
- Engels WR (1983) The *P* family of transposable elements in *Drosophila*. *Annu Rev Genet* 17: 315-344.
- Engels WR (1989) *P* elements in *Drosophila*. In: Berg DE and Howe MM (eds) *Mobilie DNA*. Amer Soc For Microb, Washington, pp 363 - 410.
- Engels WR, Benz WK, Preston CR, Graham PL, Phillis RW and Robertson HM (1987) Somatic effects of *P* element activity in *Drosophila melanogaster*: pupal lethality. *Genetics* 117: 745-757.
- Engels WR and Preston CR (1979) Hybrid dysgenesis in *Drosophila melanogaster*: the biology of female and male sterility. *Genetics* 92: 161-174.
- Engels WR and Preston CR (1984) Formation of chromosome rearrangements by *P* factors in *Drosophila*. *Genetics* 107: 657-678.

- Evgen'ev MB, Zelentsova H, Shostak N, Kozitsina M, Barskyi V, Lanckenau DH and Corces VG (1997) *Penelope*, a new family of transposable elements and its possible role in hybrid dysgenesis in *Drosophila virilis*. Proc Natl Acad Sci USA 94: 196-201.
- Feinstein PG, Kornfeld K, Hogness DS and Mann RS (1995) Identification of homeotic target genes in *Drosophila melanogaster* including *nervy*, a proto-oncogene homologue. Genetics 140: 573-586.
- Flybase (flybase@flybase.net).
- Frommer G, Schuh R and Jackle H (1994) Localized expression of a novel *microopia*-like element in the blastoderm of *Drosophila melanogaster* is dependent on the anterior morphogen *bicoid*. Chromosoma 103: 82-89.
- Georgiev PG, Kiselev SL, Simonova OB and Gerasimova TI (1990) A novel transposition system in *Drosophila melanogaster* depending on the *Stalker* mobile genetic element. EMBO J 9: 2037-2044.
- Gloor GB, Preston CR, Johnson-Schlitz DM, Nassif NA, Phillis RW, Benz WK, Robertson HM and Engels WR (1993) Type I repressors of *P* element mobility. Genetics 135: 81-95.
- Gould AP, Brookman JJ, Strutt DI and White RA (1990) Targets of homeotic gene control in *Drosophila*. Nature 348: 308-312.
- Grabe N (2002) AliBaba2.1: context specific identification of transcription factor binding sites. In Silico Biol 2: S1-15.
http://darwin.nmsu.edu/~molb470/fall2003/Projects/solorz/aliBaba_2_1.htm
- Hagemann S, Miller WJ, Haring E and Pinsker W (1998) Nested insertions of short mobile sequences in *Drosophila P* elements. Chromosoma 107: 6-16.
- Hall BG (1998) Activation of the *bgl* operon by adaptive mutation. Mol Biol Evol 15: 1-5.
- Haring E, Hagemann S and Pinsker W (1995) Different evolutionary behavior of *P* element subfamilies: M-type and O-type elements in *Drosophila bifasciata* and *D. imaii*. Gene: 163: 197-202.
- Haring E, Hagemann S and Pinsker W (1998) Transcription e splicing patterns of M e O-type *P* element in *Drosophila bifasciata*, *D. helvetica* and *Scaptomyza pallida*. J Mol Evol 46: 542-551.
- Hartl DL, Lozovskaya ER and Lawrence JG (1992) Nonautonomous transposable elements in prokaryotes and eukaryotes. Genetica 86: 47-53.

- Herédia F, Loreto EL and Valente VLS (2004) Complex evolution of *gypsy* in *Drosophilid* species. *Mol Biol Evol* 21: 1831-1842.
- Holyoake AJ and Kidwell MG (2003) *Vege* and *Mar*: two novel hAT MITE families from *Drosophila willistoni*. *Mol. Biol. Evol.* 20:163-167.
- Houck MA, Clark JB, Peterson KR and Kidwell MG (1991) Possible horizontal transfer of *Drosophila* genes by the mite *Proctolaelaps regalis*. *Science* 253: 1125-1128.
- International Human Genome Sequencing Consortium (2001) Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 409:860-921.
- Jensen S, Gassama MP and Heidmann T (1999a) Taming of transposable elements by homology-dependent gene silencing. *Nat Genet* 21: 209-212.
- Jensen S, Gassama MP and Heidmann T (1999b) Cosuppression of *I* transposon activity in *Drosophila* by *I*-containing sense and antisense transgenes. *Genetics* 153: 1767-1774.
- Joanin P, Hershberger RJ, Benito MI and Walbot V (1997) Sense and antisense transcripts of the maize MuDR regulatory transposon localized by *in situ* hybridization. *Plant Mol Biol* 33: 23-36.
- Jowett T (1986) Preparation of nucleic acids. *In: Roberts DB (ed) Drosophila: a practical approach*. IRL Press, Washington, pp 275-286.
- Kapitonov VV and Jurka J (2003) Molecular paleontology of transposable elements in the *Drosophila melanogaster* genome. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 6569-6574.
- Kerber B, Fellert S, Taubert H and Hoch M (1996) Germ line and embryonic expression of *Fex*, a member of the *Drosophila* F-element retrotransposon family, is mediated by an internal *cis*-regulatory control region. *Mol Cell Biol* 16: 2998-3007.
- Kidwell MG (1977) Reciprocal differences in female recombination associated with hybrid dysgenesis in *Drosophila melanogaster*. *Genet Res* 30: 77-88.
- Kidwell MG (1992) Horizontal transfer of *P* elements and other short inverted repeat transposons. *Genetica* 86: 275-86.
- Kidwell MG (1994) Lateral transfer in natural populations of eukaryotes. *Annu Rev Genet* 27:235-56.
- Kidwell MG and Lisch D (1997) Transposable elements as sources of variation in animals and plants. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 7704-7711.

- Kidwell MG and Lisch D (2000) Transposable elements and host genome evolution. *Trends Ecol Evol* 15: 95-99.
- Kidwell MG and Lisch D (2001) Perspective: transposable elements, parasitic DNA, and genome evolution. *Evolution Int J Org Evolution* 55: 1-24.
- Kidwell MG and Novy JB (1979) Hybrid dysgenesis in *Drosophila melanogaster*: sterility resulting from gonadal dysgenesis in the P-M system. *Genetics* 92, 1127-1140.
- Kleckner N, Chalmers RM, Kwon D, Sakai J and Bolland S (1996) Tn10 and IS10 transposition and chromosome rearrangements: mechanism and regulation in vivo and in vitro. *Curr Top Microbiol Immunol* 204: 49-82.
- Klein CC (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, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.
- Krimbas CB and Powell JR (1992) *Drosophila* inversion polymorphism. CRC Press, Florida, 560 pp.
- Kusakabe S, Harada K and Mukai T (1990) The rare inversion with a *P* element at the breakpoint maintained in a natural population of *Drosophila melanogaster*. *Genetica* 82: 111-115.
- La Roche Saint Andre C and Bregliano JC (1998) Evidence for a multistep control in transposition of *I* factor in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 148: 1875-1884.
- Labrador M, Farre M, Utzet F and Fontdevila A (1999) Interspecific hybridization increases transposition rates of *Oswaldo*. *Mol Biol Evol* 16: 931-937.
- Lachaume P, Bouhidel K, Mesure M and Pinon H (1992) Spatial and temporal expression of the *I* factor during oogenesis in *Drosophila melanogaster*. *Development* 115: 729-735.
- Lankenau S, Corces VG and Lankenau DH (1994) The *Drosophila micropia* retrotransposon encodes a testis-specific antisense RNA complementary to reverse transcriptase. *Mol Cell Biol* 14: 1764-1775.
- Lansman RA, Shade RO, Grigliatti TA and Brock HW (1987) Evolution of *P* transposable elements: sequences of *Drosophila nebulosa* *P* elements. *Proc Natl Acad Sci USA* 84: 6491-6495.
- Laski FA, Rio DC and Rubin GM (1986) Tissue specificity of *Drosophila P* element transposition is regulated at the level of mRNA splicing. *Cell* 44: 7-19.

- Latchman DS (1995) Eukaryotic transcription factors. Academic Press INC, San Diego, 325 pp.
- Lee CC, Beall EL and Rio DC (1998) DNA binding by the KP repressor protein inhibits *P*-element transposase activity *in vitro*. EMBO J 17: 4166-4174.
- Lee CC, Mul YM and Rio DC (1996) The *Drosophila P*-element KP repressor protein dimerizes and interacts with multiple sites on *P*-element DNA. Mol Cell Biol 16: 5616-5622.
- Lemaitre B and Coen D (1991) *P* regulatory products repress in vivo the *P* promoter activity in *P-lacZ* fusion genes. Proc Natl Acad Sci USA 88: 4419-4423.
- Lemaitre B, Ronsseray S and Coen D (1993) Maternal repression of the *P* element promoter in the germline of *Drosophila melanogaster*: a model for the *P* cytotype. Genetics 135: 149-160.
- Levis RW, Ganesan R, Houtchens K, Tolar LA and Sheen FM (1993) Transposons in place of telomeric repeats at a *Drosophila* telomere. Cell 75: 1083-1093.
- Li WF (1997) Evolution by transposition and horizontal transfer. In: Li WF (ed) Molecular evolution. Sinauer, pp 335-377.
- Lim JK (1988) Intrachromosomal rearrangements mediated by *hobo* transposons in *Drosophila melanogaster*. Proc Natl Acad Sci USA. 85: 9153-9157.
- Lim JK, Simmons MJ, Raymond JD, Cox NM, Doll RF and Culbert TP (1983) Homologue destabilization by a putative transposable element in *Drosophila melanogaster*. Proc Natl Acad Sci USA 80: 6624-6627.
- Lohe AR, Moriyama EN, Lidholm DA and Hartl DL (1995) Horizontal transmission, vertical inactivation, and stochastic loss of *mariner*-like transposable elements. Mol Biol Evol 12: 62-72.
- Loreto EL, da Silva LB, Zaha A and Valente VL (1998) Distribution of transposable elements in neotropical species of *Drosophila*. Genetica. 101: 153-165.
- Lyttle TW and Haymer DS (1992) The role of the transposable element *hobo* in the origin of endemic inversions in wild populations of *Drosophila melanogaster*. Genetica 86: 113-126.
- Malinsky S, Bucheton A and Busseau I (2000) New insights on homology-dependent silencing of *I* factor activity by transgenes containing ORF1 in *Drosophila melanogaster*. Genetics 156: 1147-1155.

- Marques EK, Napp M, Winge H and Cordeiro AR (1966) A corn meal, sorbean flour, wheat germ medium for *Drosophila*. DIS 41: 187.
- McClintok B (1951) Chromosome organization and genic expression. Cold Spring Harbor Symp Quant Biol 16: 13-47.
- McClintock B (1955) Intranuclear systems controlling gene action and mutation. Brookhaven Symp Biol 8: 58-74
- McClintock B (1956) Controlling elements and the gene. Cold Spring Harbor Symp Quant Biol 21: 197-216.
- McClintock B (1984) The significance of responses of the genome to challenge. Science 226: 792-801.
- Miller WJ, McDonald JF and Pinsker W (1997) Molecular domestication of mobile elements. Genetica 100: 261-270.
- Misra S and Rio DC (1990) Cytotype control of *Drosophila P* element transposition: the 66 kd protein is a repressor of transposase activity. Cell 62: 269-284.
- Misra S, Buratowski RM, Ohkawa T and Rio DC (1993) Cytotype control of *Drosophila melanogaster P* element transposition: genomic position determines maternal repression. Genetics 135: 785-800.
- Mizrokhi LJ and Mazo AM (1990) Evidence for horizontal transmission of the mobile element *jockey* between distant *Drosophila* species. Proc Natl Acad Sci USA 87: 9216-9220.
- Montchamp-Moreau C, Ronsseray S, Jacques M, Lehmann M and Anxolabehere D (1993). Distribution and conservation of sequences homologous to the 1731 retrotransposon in *Drosophila*. Mol Biol Evol 10: 791-803.
- Mozer BA and Benzer S (1994) Ingrowth by photoreceptor axons induces transcription of a retrotransposon in the developing *Drosophila* brain. Development 120: 1049-1058.
- Nicholas KB and Nicholas HBJ (1997) GeneDoc: a tool for editing e annotating multiple sequence alignments.
- O'Hare K and Rubin GM (1983) Structures of *P* transposable elements and their sites of insertion and excision in the *Drosophila melanogaster* genome. Cell 34:25-35.
- O'Kane CJ and Gehring WJ (1987) Detection *in situ* of genomic regulatory elements in *Drosophila*. Proc Natl Acad Sci USA 84: 9123-9127.

- Pal-Bhadra M, Bhadra U and Birchler JA (1997) Cosuppression in *Drosophila*: gene silencing of Alcohol dehydrogenase by *white-Adh* transgenes is Polycomb dependent. *Cell* 90: 479-490.
- Pal-Bhadra M, Bhadra U and Birchler JA (1999) Cosuppression of nonhomologous transgenes in *Drosophila* involves mutually related endogenous sequences. *Cell* 99: 35-46.
- Pasyukova EG and Nuzhdin SV (1993) *Doc* and *copia* instability in an isogenic *Drosophila melanogaster* stock. *Mol Gen Genet* 240: 302-306.
- Petrov DA, Schutzman JL, Hartl DL and Lozovskaya ER (1995) Diverse transposable elements are mobilized in hybrid dysgenesis in *Drosophila virilis*. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 8050-8054.
- Pinsker W, Haring E, Hagemann S and Miller WJ (2001) The evolutionary life history of *P* transposons: from horizontal invaders to domesticated neogenes. *Chromosoma* 110: 148-158.
- Pyatkov KI, Shostak NG, Zelentsova ES, Lyozin GT, Melekhin MI, Finnegan DJ, Kidwell MG and Evgen'ev MB (2002) *Penelope* retroelements from *Drosophila virilis* are active after transformation of *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 16150-16155.
- Rasmusson KE, Raymond JD and Simmons MJ (1993) Repression of hybrid dysgenesis in *Drosophila melanogaster* by individual naturally occurring *P* elements. *Genetics* 133: 605-622.
- Regner LP, Pereira MS, Alonso CE, Abdelhay E and Valente VL (1996) Genomic distribution of *P* elements in *Drosophila willistoni* and a search for their relationship with chromosomal inversions. *J Hered* 87: 191-198.
- Regner LP, Abdelhay E, Rodhe C, Rodrigues JS and Valente VL (1999) Temperature-dependent gonadal hybrid dysgenesis in *Drosophila willistoni*. *Genet Mol Biol* 22: 205-211.
- Rhoads DD and Roufa DJ (1989) Sequaid II, version 3.81. Molecular genetics laboratory center for basic cancer research Kansas State University Manhattan KS USA 66506.
- Rio DC (1990) Molecular mechanisms regulating *Drosophila P* element transposition. *Annu Rev Genet* 24: 543-578.
- Rio DC (2002) *P* transposable elements in *Drosophila melanogaster*. In: Craig NL, Craigie R, Gellert M and Lambowitz AM (eds) *Mobile DNA II*. ASM Press Washington, pp 484-518.

- Rohde C (2000) Polimorfismo cromossômico e elementos transponíveis em *Drosophila willistoni*. Tese de Doutorado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.
- Rufo VC (1997) Disgenesia híbrida induzida pelos elementos transponíveis *P* e *hobo* em linhagens de *Drosophila melanogaster* de diferentes regiões brasileiras. Dissertação de mestrado, Universidade do Estado de São Paulo, São Jose do Rio Preto.
- Sambrook JF, Fritsh EF and Maniatis T (1989) Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor, New York, 3v.
- Samuelson LC, Wiebauer K, Snow CM and Meisler MH (1990) Retroviral and pseudogene insertion sites reveal the lineage of human salivary and pancreatic amylase genes from a single gene during primate evolution. Mol Cell Biol 10: 2513-2520.
- Sassi AK (2000) Contribuição ao estudo dos elementos transponíveis em populações de *Drosophila willistoni*. Dissertação de Bacharelado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.
- Sassi AK (2003) Avaliação da presença dos elementos transponíveis *P* e *gypsy* em ácaros parasitas e microhimenópteros parasitóides de *Drosophila*. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.
- Sheen FM and Levis RW (1994) Transposition of the LINE-like retrotransposon *TART* to *Drosophila* chromosome termini. Proc Natl Acad Sci USA 91: 12510-12514
- Siebel CW and Rio DC (1990) Regulated splicing of the *Drosophila P* transposable element third intron in vitro: somatic repression. Science 248: 1200-1208.
- Siebel CW, Admon A and Rio DC (1995) Soma-specific expression and cloning of PSI, a negative regulator of *P* element pre-mRNA splicing. Genes Dev 9: 269-283.
- Simmen MW, Leitgeb S, Charlton J, Jones SJ, Harris BR, Clark VH and Bird A (1999) Nonmethylated transposable elements and methylated genes in a chordate genome. Science 283: 1164-1167.
- Simmons MJ and Bucholz LM (1985) Transposase titration in *Drosophila melanogaster*: a model of cytotype in the P-M system of hybrid dysgenesis. Proc Natl Acad Sci USA 82: 8119-8123.

- Simmons MJ, Raymond JD, Grimes CD, Belinco C, Haake BC, Jordan M, Lund C, Ojala TA and Papermaster D (1996) Repression of hybrid dysgenesis in *Drosophila melanogaster* by heat-shock-inducible sense and antisense P-element constructs. *Genetics* 144: 1529-1544.
- Simmons MJ, Haley KJ and Thompson SJ (2002) Maternal transmission of P element transposase activity in *Drosophila melanogaster* depends on the last P intron. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 9306-9309.
- Spanopoulou E, Zaitseva F, Wang FH, Santagata S, Baltimore D and Panayotou G (1996) The homeodomain region of *Rag-1* reveals the parallel mechanisms of bacterial and V(D)J recombination. *Cell* 87: 263-276.
- Staden R (1996) The Staden Sequence Analysis Package. *Mol Biotechnol* 5: 233-241.
- Stavenhagen JB and Robins DM (1988) An ancient provirus has imposed androgen regulation on the adjacent mouse sex-limited protein gene. *Cell* 55: 247-254.
- Tarchini R, Biddle P, Wineland R, Tingey S and Rafalski A (2000) The complete sequence of 340 kb of DNA around the rice *Adh1-adh2* region reveals interrupted colinearity with maize chromosome 4. *Plant Cell* 12: 381-391.
- Tautz D and Pfeifle C (1989) A non-radioactive *in situ* hybridization method for the localization of specific RNAs in *Drosophila* embryos reveals translational control of the segmentation gene hunchback. *Chromosoma* 98: 81-85.
- TaxoDros-www.taxodros.unizh.ch
- Thomas K, Sung DY, Yang J, Johnson K, Thompson W, Millette C, McCarrey J, Breitberg A, Gibbs R and Walker W (2004) Identification, Characterization, and Functional Analysis of Sp1 Transcript Variants Expressed in Germ Cells During Mouse Spermatogenesis. *Biol Reprod*. In press.
- Transfact 6.0 Public, <http://www.gene-regulation.com/pub/databases.html#trasfac>.
- Valente VLS (1975) Padrões de atividade gênica em espécies do grupo críptico da *Drosophila willistoni*. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.
- Vector NTI (1996) Advance Software for Gateway Cloning, Invitrogen.
- Vieira C and Biemont C (1996) Selection against transposable elements in *D. simulans* and *D. melanogaster*. *Genet Res* 68: 9-15

- Wessler SR, Bureau TE and White SE (1995) LTR-retrotransposons and MITEs: important players in the evolution of plant genomes. *Curr Opin Genet Dev* 5: 814-821.
- Yannopoulos G, Stamatis N, Monastirioti M, Hatzopoulos P and Louis C. (1987) *hobo* is responsible for the induction of hybrid dysgenesis by strains of *Drosophila melanogaster* bearing the male recombination factor 23.5MRF. *Cell* 49: 487-495.
- Yoder JA, Walsh CP and Bestor TH (1997) Cytosine methylation and the ecology of intragenomic parasites. *Trends Genet* 13: 335-340.
- Yuki S, Inouye S, Ishimaru S and Saigo K (1986) Nucleotide sequence characterization of a *Drosophila* retrotransposon, 412. *Eur J Biochem* 158: 403-410.