Transposon *But2* e seus MITEs em *Drosophila*

UFRGS UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

APOIO: CNPq

Dirleane Ottonelli Rossato[1 # *]; Adriana Ludwig[2,3]; Maríndia Deprá[2]; Élgion Lúcio da Silva Loreto[2,4]; Alfredo Ruiz[5]; Vera Lúcia da Silva Valente[2,6]

1 – Laboratório de *Drosophila* - Curso de Ciências Biológicas da UFRGS; # - Bolsista Pibic CNPq; 2 – PPGBM, UFRGS; 3- Instituto Carlos Chagas –Fiocruz- PR; 4- Departamento de Biologia da UFSM; 5 - Departament de Genètica i de Microbiologia, Universitat Autònoma de Barcelona; 6– Departamento de Genética da UFRGS.

*E-mail: dirleane@terra.com.br

But2

Elementos de transposição são segmentos dinâmicos de DNA, que podem mover-se no genoma. São geradores de variabilidade genética e são importantes agentes evolutivos.

O transposon ***But2*** pertence à superfamília *hAT* da ordem TIR (*terminal inverted repeat*) e foi descoberto em locais de pontos de quebra cromossômica em *Drosophila buzzatii*.

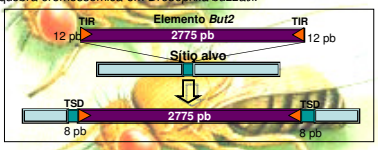

Fig.1. Esquema do elemento *But2* de *D. buzzatii* de 2775 pb, com repetições terminais invertidas (TIRs) de 12 pb. Esse elemento gera duplicações no sítio alvo (TSDs) de 8 pb.

Objetivo

Analisar a história evolutiva do elemento *But2* no gênero *Drosophila*.

1 - Buscas *in silico*

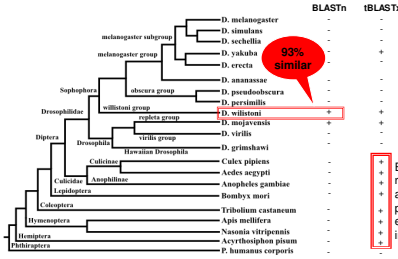

Fig. 2. Espécies analisadas pela ferramenta BLAST. A sequência de *But2* de *D. buzzatii* foi utilizada como *query*. Foram considerados significativos os *hits* com valor e < 10^{-20}. (-) ausência de *hit* significativo; (+) presença de *hit* significativo.

Espécies analisadas e resultados

Tabela 1. Espécies testadas pela reação de PCR com seus respectivos resultados quanto a amplificação de fragmentos e Dot Blot.

Gênero	Subgênero	Grupo	Espécie	PCR 1	PCR 2	PCR 3	PCR 4	Dot blot Resultado	Dot blot Número
Drosophila	*Drosophila*	*guarani*	*D. ornatifrons*	+	+	+	-	w	1
			D. subbadia	+	+	+	-	w	2
			D. guaro	+	+	+	-	w	3
		guararuru	*D. griseolineata*	+	+	+	-	-	4
			D. maculifrons	+	+	+	-	-	5
		tripunctata	*D. neppae*	+	+	+	-	w	6
			D. paraguayensis	+	+	+	-	?	
			D. prosina	+	+	+	-	-	55
			D. paramediostriata	+	+	+	-	-	7
			D. tripunctata	+	+	+	-	-	8
			D. mediosiflavus	+	+	+	+	-	9
			D. mediopictoides	+	+	+	+	-	10
		cardini	*D. cardini*	+	+	+	-	?	
			D. cardinoides	+	+	+	+	-	11
			D. neocardini	+	+	+	-	-	12
			D. polymorpha	-	+	+	-	-	13
			D. procardinoides	-	-	-	-	-	14
			D. araiwahana	+	+	+	-	-	15
		pallidipennis	*D. pallidipennis*	+	+	+	-	+	56
		calloptera	*D. ornatipennis*	+	+	+	-	w	16
		immigrans	*D. immigrans*	-	-	-	-	-	17
		funebris	*D. funebris*	-	-	-	-	-	18
		mesophragmatica	*D. gasicii*	-	+	+	-	-	19
			D. bocucii	-	-	-	-	-	20
			D. gaucha	-	+	+	-	-	21
			D. pavani	-	-	+	-	-	57
		repleta	*D. hydei*	-	-	+	+	-	58
			D. mojavensis	-	+	+	-	+	59
			D. buzzati	-	+	+	+	+	22
			D. mercatorum	-	-	-	-	+	23
		canalinea	*D. repleta*	+	-	-	-	?	
			D. canalinea	-	+	-	-	?	
		flavopilosa	*D. cretei*	+	+	+	-	?	
			D. incompta	-	+	+	-	+	24
		virilis	*D. virilis*	-	+	+	-	-	25
		robusta	*D. robusta*	-	+	+	-	-	26
	Sophophora	*melanogaster*	*D. melanogaster*	-	+	+	+	-	27
			D. simulans	-	+	+	+	-	60
			D. sechellia	-	+	+	+	?	
			D. mauritiana	-	+	+	+	-	28
			D. teissieri	-	+	+	+	-	29
			D. santomea	-	+	+	+	-	30
			D. erecta	-	+	+	+	-	31
			D. yakuba	-	+	+	+	-	32
			D. kikkawai	-	+	+	+	w	33
			D. ananassae	-	+	+	+	-	34
			D. malerkotliana	-	+	+	-	w	35
			D. orena	-	+	-	-	-	36
		obscura	*D. pseudoobscura*	-	+	+	+	-	37
		saltans	*D. prosaltans*	-	+	+	+	-	38
			D. saltans	+	+	+	+	+	39
			D. neosaltans	+	+	+	+	w	40
			D. sturtevanti	+	+	+	+	w	41
		willistoni	*D. aczekae*	+	+	+	+	-	42
			D. nebulosa	+	+	+	+	+	43
			D. paulistorum	+	+	+	+	+	44
			D. willistoni	+	+	+	+	+	45
			D. equinoxialis	+	-	+	+	+	46
			D. insularis	+	-	+	+	+	47
			D. tropicalis	+	-	+	+	+	48
			D. capricorni	+	-	+	+	+	49
	Dorsilopha		*D. busckii*	+	+	+	+	-	50
Zaprionus			*Z. indianus*	-	-	-	+	-	51
			Z. tuberculatus	-	+	-	-	-	52
			Z. sepsoides	-	-	-	-	?	
Scaptodrosophila			*S. latifasciaeformis*	-	-	-	-	-	53
			S. lebanonensis	-	-	-	+	-	54

(-) ausência de amplificação ou sinal de hibridização; (+) amplificação ou hibridização positiva; (w) sinal de hibridização fraco; (?) não testado. Os números indicam a posição da referida espécie no Dot blot mostrado na figura ao lado.

2 - Buscas por PCR, clonagem e sequenciamento

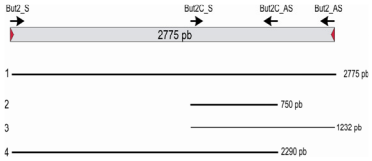

Fig .3. Desenho esquemático do elemento *But2* com a posição dos *primers* (setas) e os 4 fragmentos diferentes que podem ser amplificados.

***But2* gera MITEs**
(*Miniature inverted repeat transposable elements*)
Fragmentos muito menores que o esperado foram amplificados com os *primers* desenhados a partir das TIRs, sugerindo a presença de elementos derivados de *But2* nos genomas.

3 - Análise das sequências

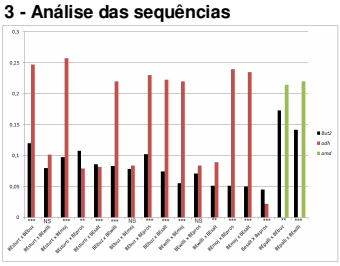

Fig. 4. Análise comparativa da divergência encontrada entre as sequências de *But2* e dos genes nucleares *adh* e *amd*. Teste de qui-quadrado foi utilizado para verificar se a divergência de *But2* observada é significativamente diferente da esperada de acordo com os genes *adh* ou *amd*. *** valor p < 0,001; ** valor p < 0,01; NS não significativo.

But2 está envolvido em casos de Transferência Horizontal

4 – Dot blot

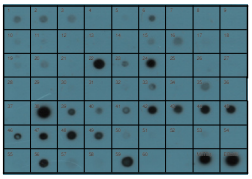

Fig. 5. Rastreamento da presença de *But2* por Dot blot em espécies de *Drosophila*. A sonda utilizada foi o *amplicon* de um clone de *But2* de *D. willistoni*. Os números no blot correspondem as respectivas espécies listadas na tabela abaixo.

But2 deve estar presente em todas as espécies investigadas dos grupos irmãos *willistoni* e *saltans*, além de *D. buzzatii* e *D. mojavensis*.
But2 também deve estar presente em *D. pallidipennis* e *D. incompta*.

5 - Análise da região codificadora de *But2*

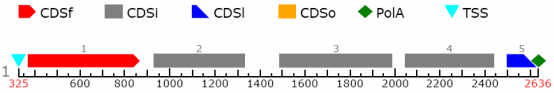

Fig. 6. Organização da região codificadora da transposase de *But2* de *D. buzzatii* predita pelo programa FGENESH 2.6. TSS – início da transcrição; CDSf – primeiro éxon; CDSi – éxons internos; CDSl – éxon final; PolA –sinal de poliadenilação.

***But2* potencialmente codifica um transposase funcional**

Cenário evolutivo do *But2 em Drosophila*

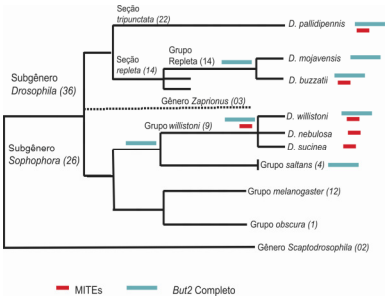

Fig. 7. Esquema das relações filogenéticas dos grupos de espécies de *Drosophila* empregados nesse estudo - entre parênteses o número de espécies analisadas. A distribuição de cópias de *But2* do tipo MITEs e completo pode ser observada pela presença das barras vermelha e azul, respectivamente, ao lado do nome da espécie. A barras nos ramos internos indicam possível presença desse tipo de cópia na espécie ancestral.

Cópias completas e autônomas de *But2* estavam presentes no ancestral dos grupos *willistoni e saltans* passando verticalmente para as espécies desses grupos. Provavelmente ocorreu um evento de transmissão horizontal do *But2* do ancestral do grupo *willistoni* ou *saltans* para o ancestral das espécies *D. buzzatii* e *D. mojavensis* e foi transmitido verticalmente para as espécies do subgrupo *mulleri*. Possivelmente também ocorreu transferência horizontal de *But2* para *D. pallidipennis*. Sequências do tipo MITEs derivadas de *But2* devem ter sido geradas independentemente em várias espécies.

Qual a relação de *But2* com os outros transposons *hAT*? Observamos, por análise filogenética de aminoácidos, que *But2* pode ter invadido o genoma do ancestral dos grupos *willistoni* e *saltans* por transferência horizontal a partir de outro inseto, uma vez que *But2* possui uma distribuição muito restrita em *Drosophila* e está mais proximamente relacionado a elementos de outras espécies do que dos elementos *hAT* conhecidos de *Drosophila*.

Perspectivas

Terminar as clonagens e sequenciamento, realizar análises evolutivas e análises de expressão para confirmar a região codificadora da transposase.