



Análise da distribuição e evolução do elemento *But2* em *Drosophila*

Rossato, DO¹; Ludwig, A²; Loreto, ELS^{2,3}; Valente, VLS^{2,4}

1 – Curso de Ciências Biológicas da UFRGS;

2 – PPGBM, UFRGS; 3- Departamento de Biologia da UFSM;

4 – Departamento de Genética da UFRGS

E-mail para contato: dirleane@terra.com.br

Introdução

Os elementos de Transposição (TEs - *transposable elements*) são segmentos de DNA que têm a capacidade de mover-se e replicar-se dentro do genoma. Estão presentes em praticamente todos os organismos, compreendendo a maior parte do DNA medianamente repetitivo (Capy *et al.*, 1998). Duas principais classes de TEs são amplamente reconhecidas, os retrotransposons (classe I) que se transpõem por um intermediário de RNA e os transposons (classe II) que se movem pelo uso de uma molécula de DNA como intermediário direto da transposição (Finnegan, 1989). Os TEs de ambas as classes podem ser elementos autônomos, quando produzem a enzima necessária para sua transposição ou podem ser elementos não autônomos, quando usam enzimas produzidas por elementos autônomos (Capy *et al.*, 1998).

Vários trabalhos têm mostrado que elementos curtos não autônomos, chamados MITEs (*Miniature inverted repeat transposable elements*) podem ser originados a partir da degeneração de elementos autônomos. Os MITEs apresentam um pequeno comprimento, que varia de 80 a 500 bp, repetições terminais invertidas (TIRs), alto número de cópias e uma região interna rica em AT (Feschotte *et al.*, 2002).

As implicações biológicas dos TEs concentram-se nas consequências da sua transposição. Eles são apontados como geradores de variabilidade, podendo causar um repertório de efeitos mutacionais e reestruturação dos genomas (Capy *et al.*, 1998). O gênero *Drosophila* representa um sistema modelo e o estudo de TEs nesse gênero tem proporcionado importantes contribuições para o entendimento dessas seqüências móveis e seu impacto na evolução genômica.

O elemento *But2* pertence a superfamília *hAT* da ordem TIR de transposons da classe II. Elementos dessa ordem usualmente possuem repetições terminais invertidas curtas e codificam uma proteína chamada transposase que catalisa a sua excisão do sítio original e promove sua reinserção em um novo lugar sítio no genoma, gerando duplicações no sítio alvo (TSDs). Este elemento possui 2775 pb, TIRs de 12 pb e gera TSDs de 8 pb. Nenhum estudo sobre a distribuição e evolução desse elemento foi realizado até o momento (Cáceres *et al.*, 2001). Dessa forma, pretendemos analisar a história evolutiva do elemento *But2* no gênero *Drosophila* com o objetivo de contribuir para o melhor entendimento do modo como esses elementos têm sido adquiridos e assimilados dentro dos genomas e das forças que moldam o processo co-evolutivo TE-hospedeiro.

Materiais e Métodos

Manutenção dos estoques de moscas e manipulação de ácidos nucléicos: As moscas estão sendo mantidas em meio de cultura a base de farinha de milho e a temperatura constante (20°C). DNA genômico total foi extraído de moscas adultas de acordo com Sassi *et al.* (2005). Um total de 61 espécies, pertencentes aos gêneros *Drosophila*, *Zaprionus* e *Scaptodrosophila*, foram analisadas.

Buscas *in silico*: Inicialmente, uma busca por seqüências homólogas ao elemento *But2* completo foi realizada nos genomas de *D. melanogaster*, *D. simulans*, *D. sechellia*, *D. yakuba*, *D. erecta*, *D. ananassae*, *D. willistoni*, *D. pseudoobscura*, *D. persimilis*, *D. virilis*, *D. mojavensis* e *D. grimshawi* utilizando a ferramenta BLAST. Posteriormente, utilizamos como *query* a seqüência dos *primers* para a realização de um PCR *in silico* nesses mesmos genomas.

Rastreamento da distribuição do elemento *But2* por PCR: Os *primers* foram desenhados com base na seqüência canônica de elemento *But2* de *D. buzzatii* e em uma seqüência de *D. willistoni*, projetados para



XVI Encontro de Geneticistas do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, de 27 à 29 de julho de 2008

amplificar o elemento completo. Os *primers* são: But2S - 5'CAGTGCTGCCAACAWTTYGT3' e But2AS - 5'CASTGCTGCCAATTTAGCYA3'. A reação foi: 50 ng de DNA genômico adicionado a uma solução de 2.5 mM de MgCl₂, 200 µM de cada desoxinucleotídeo, 20 picomoles de cada *primer* e 1 U de Taq polimerase em 50 µl de volume total. As condições de amplificação foram: desnaturação inicial a 94° C por 5 min, seguida por 30 ciclos de 45s a 94°C, 45s a 55° C e 3 min ou 1 min a 72° C.

Resultados

Através da busca *in silico* encontramos 2 cópias do *But2* em *D. willistoni* e 2 cópias em *D. mojavensis*. Nas outras espécies nenhuma seqüência foi encontrada. A primeira cópia de *D. willistoni* apresenta 3156 pb, mas possui uma inserção de um fragmento com 420 pb. Então, originalmente o elemento deve ter aproximadamente 2735 pb. Quando excluímos os 420 pb não homólogos e alinhamos com o *But2* de *D. buzzatii* observa-se uma divergência de apenas 7% na seqüência de nucleotídeos (similaridade de 93%). Essa alta similaridade é inesperada tratando-se de espécies tão distantes filogeneticamente, uma vez que *D. willistoni* pertence ao subgênero *Sophophora* e *D. buzzatii* pertence ao subgênero *Drosophila*. Essa cópia em *D. willistoni* possui ITRs 100% idênticas, diferem em 1 nucleotídeo nas TSDs e não possui capacidade codificadora. Já a segunda cópia é incompleta e com grandes inserções de diferentes elementos de transposição. Em *D. mojavensis* uma das cópias possui uma grande deleção e apresenta 8,8% de divergência com a seqüência de *D. buzzatii*. Enquanto a outra cópia apresenta uma inserção de aproximadamente 2700 pb e apresenta divergência de 9,2% com a seqüência de *D. buzzatii*.

Das reações de PCR realizados nas 61 espécies obtivemos os seguintes resultados: (i) dentro do subgênero *Sophophora* houve amplificação em todas as espécies analisadas dos grupos *saltans* (4 espécies) e *willistoni* (6 espécies). Porém não houve amplificação nas espécies analisadas dos grupos *melanogaster* (11 espécies) e *obscura* (1 espécie); (ii) dentro do subgênero *Drosophila* houve amplificação em todas as espécies analisadas dos grupos *guarani* (3 espécies), *guaramuru* (2 espécies), *pallidipennis* (1 espécie) e *calloptera* (1 espécie). Já das 5 espécies do grupo *cardini* apenas 3 amplificaram e das 7 espécies do grupo *tripunctata* apenas 6 amplificaram. Não houve amplificação nas únicas espécies analisadas dos grupos *immigrans*, *funebri*, *canalinae*, *flavopilosa*, *virilis* e *robusta* além das 4 espécies testadas do grupo *mesophragmatica* e das 2 espécies do grupo *repleta*; (iii) houve amplificação em *D. busckii* do subgênero *Dorsilpha*; (iv) no gênero *Zaprionus* (3 espécies) e *Scaptodrosophila* (2 espécies) não foram amplificados nenhum fragmento.

Contudo, os fragmentos amplificados em todas as espécies são menores que o esperado, até mesmo em *D. buzzatii*, além de apresentarem tamanhos distintos entre si, mesmo num mesmo subgênero. A presença de seqüências menores (400-800 pb) relacionadas ao *But2* foi confirmada através de PCR *in silico* no genoma de *D. willistoni*. Encontramos um grande número dessas seqüências (mais de 20 cópias) com similaridade em média de 85% com o elemento *But2* completo encontrado em *D. willistoni*.

Discussão

Nesse trabalho, obtivemos os primeiros resultados sobre a distribuição e a evolução do elemento *But2*. A presença de uma seqüência 93% similar entre 2 espécies tão distantes evolutivamente, como ocorre em *D. willistoni* e em *D. buzzatii* sugere a ocorrência de transferência horizontal. Numerosos casos de transmissão horizontal de TEs entre espécies de *Drosophila* têm sido reportados envolvendo tanto elementos de classe II como elementos da classe I (Loreto *et al.*, 2008).

O surgimento de fragmentos menores que o esperado indicam que seqüências curtas relacionadas ao *But2* estão presentes nas espécies possivelmente por degeneração, podendo serem consideradas elementos do tipo MITEs, pois estariam sendo amplificados devido a grande conservação das suas TIRs, que são iguais as do *But2*, através das quais foram construídos os *primers*. A origem dos MITEs não é totalmente compreendida, entretanto, Feschotte *et al.* (2002) propôs um modelo no qual transposons autônomos sofrem deleções internas e se tornam não autônomos, e muitas cópias de transposons não autônomos sofrem uma rápida amplificação do número de cópias.



XVI Encontro de Geneticistas do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, de 27 à 29 de julho de 2008

Os fragmentos amplificados de todas as espécies serão clonados e seqüenciados para confirmar a identidade dessas seqüências e fazer análises evolutivas, pois a análise filogenética das diferentes variantes dessas seqüências nas diferentes espécies deve permitir o melhor entendimento da evolução do elemento *But2* nos genomas de *Drosophila*.

Referências

- Cáceres M, Puig M e Ruiz A (2001) Molecular characterization of two natural hotspots in the *Drosophila buzzatii* genome induced by transposon insertions. *Genome Res* 11:1353-1364.
- Capy P, Bazin C, Higuete D e Langin T (1998) Dynamics and evolution of transposable elements. Landes Bioscience, Austin, Texas, 197 pp.
- Feschotte, C., Zhang, X. & Wessler, S. R. (2002). Miniature inverted-repeat transposable elements and their relationship to established DNA transposons. In *Mobile DNA II* (ed. N.L. Craig, R. Craigie, M. Gellert & A.M. Lambowitz), pp. 1147-1158. Washington, DC: ASM Press.
- Finnegan DJ (1989) Eukaryotic transposable elements and genome evolution. *Trends Genet* 5:103-107.
- Loreto ELS e Ortiz MF (2008) The *hobo*-related elements in the *melanogaster* species group. *Genet Res* 90:1-10.
- Sassi AK, Herédia F, Loreto ELS, Valente VLS e Rohde C (2005) Transposable elements *P* and *gypsy* in natural populations of *Drosophila willistoni*. *Genet Mol Biol* 28: 734-739.