

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA

CONTRIBUIÇÃO AO ESTUDO DOS ELEMENTOS
TRANSPONÍVEIS EM POPULAÇÕES DE *Drosophila willistoni*.

Adriana Koslovski Sassi

Relatório apresentado a Comissão de
Bacharelado do Departamento de Genética
para a obtenção do Grau de Bacharel em
Ciências Biológicas, ênfase Molecular,
Celular e Funcional -UFRGS.

Orientação: Prof^a Vera L. S. Valente Gaiesky
Co-orientação: Cláudia Rohde
Colaboração: Fabiana Herédia

Porto Alegre
2000

AGRADECIMENTOS

A Prof^a Vera Lúcia da Silva Valente Gaiesky pela orientação, confiança e incentivo durante toda minha Iniciação Científica, e por ser um exemplo de pesquisadora e profissional junto ao grupo de trabalho sob sua coordenação.

A Dra. Cláudia Rohde, pela oportunidade de trabalho e “parceria” em todos os momentos, que levaram a uma relação de amizade, confiança e respeito que ultrapassa os limites profissionais.

A doutoranda Fabiana Herédia por toda colaboração, essencial para a realização deste trabalho, e pela paciência, dedicação e amizade em todas as horas (todas mesmo!).

Aos queridos colegas do Laboratório de *Drosophila* que com sua alegria, companheirismo e disposição para ensinar tornam o ambiente de trabalho excelente e produtivo. Todos de alguma forma contribuíram, e agradeço com muito carinho a Ana Cristina L. Garcia, Daniela de Toni, Elgion Loreto, Fabiano Torres, Marisa Colares, Norma M. da Silva, Rosane Garcia, Shirlei Klein e Victor Hugo Valiati.

Ao colega Luciano Basso da Silva, pela sua prestimosa ajuda na análise dos resultados.

A Elmo Cardoso, sempre prestativo quanto ao “apoio técnico” em vários momentos da elaboração deste e outros trabalhos.

A minha família; meu pai, mãe e irmão, que com seu amor sempre me ajudaram a superar todas as dificuldades e apesar da distância estiveram sempre a meu lado, dando todo apoio e incentivo para que eu completasse a graduação. E obrigada por me ensinarem que o importante é caminhar sempre, com decisão e coragem.

SUMÁRIO

I INTRODUÇÃO	1
I.1 Elementos transponíveis.....	1
I.1.2 Elemento transponível <i>gypsy</i>	4
I.1.3 Elemento transponível <i>P</i>	5
I.1.4 Elemento transponível <i>hobo</i>	6
I.2 A espécie <i>Drosophila willistoni</i>	7
II OBJETIVOS.....	9
III MATERIAS E MÉTODOS	10
III. 1 Populações estudadas.....	10
III. 2 Extração de DNA e <i>Southern blot</i>	11
III. 3 Sondas Utilizadas	12
IV RESULTADOS E DISCUSSÃO	13
IV. 1 Elemento <i>P</i>	13
IV. 2 Elemento <i>hobo</i>	17
IV. 3 Elemento <i>gypsy</i>	20
V. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	24
VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	28

I - INTRODUÇÃO

I.1. ELEMENTOS TRANSPONÍVEIS

Elementos transponíveis (TEs) são encontrados em diversos organismos, de bactérias até eucariotos superiores, fazendo parte de aproximadamente 50% do genoma de milho, 35% do genoma humano e 15% do genoma de *Drosophila melanogaster*. Principal constituinte do DNA repetitivo, são seqüências muito antigas no genoma, que foram mantidas durante o processo evolutivo.

TEs são geralmente conceituados como segmentos de DNA capazes de movimentar-se ao longo do genoma. Apresentam-se em múltiplas cópias e possuem, pelo menos, algumas destas características: 1) seqüências nucleotídicas muito similares em ambas as extremidades que são chamadas de repetições terminais, sendo este o local de reconhecimento pela enzima que irá movimentá-los; 2) genes que codificam enzimas envolvidas em sua mobilidade; 3) duplicações resultantes de sua inserção em um sítio do genoma.

Podem ser classificados em dois grandes grupos de acordo com o tipo de intermediário envolvido no seu mecanismo de transposição:

Elementos de Classe I: são TEs com transposição replicativa, envolvendo um intermediário de RNA que é transcrito reversamente antes da inserção. São denominados retrotransposons e podem incluir elementos com LTRs (*long terminal repeats*), que são estruturalmente similares a retrovírus, e sem LTRs, muitas vezes chamados de retroposons. Estes elementos parecem restritos a eucariotos. Em *Drosophila*, alguns retrotransposons bem conhecidos são *copia*, *412* e *gypsy*.

Elementos de Classe II: utilizam somente DNA como intermediário de transposição, sendo conhecidos como transposons propriamente ditos. Movem-se principalmente pelo mecanismo conservativo, onde a excisão do elemento doador é seguida pela sua inserção em qualquer lugar do genoma. Têm sido encontrados tanto em procariotos como em eucariotos. Exemplos de TEs desta categoria em *Drosophila* são *mariner*, *hobo* e *P*.

Em relação a sua mobilidade, os TEs podem ser autônomos ou não-autônomos (ou defectivos). Os elementos transponíveis autônomos têm a capacidade de se transpor sozinhos por apresentarem a forma completa do elemento. Os elementos defectivos já se encontram na sua forma incompleta, dependendo, assim, da ação da enzima responsável pela transposição de um outro elemento presente no genoma do mesmo hospedeiro.

Elementos transponíveis são transmitidos verticalmente, de geração para geração, juntamente com o restante do genoma. Entretanto, a análise da distribuição destes elementos em diferentes espécies e a discrepância entre filogenias baseadas em seqüências de TEs e filogenias de acordo com caracteres clássicos sugerem a possível existência de transferência horizontal (entre espécies). Em *Drosophila*, um caso clássico é o da transferência do elemento *P* entre *D. willistoni* e *D. melanogaster*, onde o possível vetor seria um ácaro parasita das duas espécies. Vetores virais também são sugeridos como possíveis intermediários de tais transferências (Houck *et al.*, 1991; Kidwell, 1994).

A importância do estudo de TEs reside nas conseqüências de sua mobilidade. O mecanismo de transposição pode gerar um repertório de efeitos mutacionais, como interrupções de módulos de leitura ou

modificações na regulação de genes; quebras cromossômicas e, conseqüentemente, deleções, inversões, translocações e duplicações, bem como não-disjunções e distorções na segregação dos cromossomos na divisão celular. Além disso, a simples existência de múltiplas cópias destas seqüências favorece a incidência de recombinação entre estas cópias, produzindo perda ou inversão da porção de DNA entre elas.

Alguns elementos transponíveis como *P* e *hobo* estão envolvidos com o fenômeno de disgenesia híbrida, síndrome que aparece em células germinais da F1 de cruzamentos entre machos que contém o elemento *P* (linhagem P) com fêmeas que não o contém (linhagem M). Podem ocorrer mutações, reversões, esterilidade, recombinação em machos, rearranjos e não-disjunções cromossômicas causadas pela elevada taxa de transposição nas células germinais dos híbridos destes cruzamentos (Boussy & Daniels, 1991; Matsuura *et al.*, 1993).

O papel dos elementos transponíveis como uma grande fonte de variabilidade para o genoma é bem estabelecido. Além disso, a descoberta de seqüências que podem movimentar-se no genoma revolucionou a idéia de que o genoma era algo estático, mudando somente em uma escala evolucionária lenta (Arkipova & Ilvin, 1992).

Muitos fenômenos biológicos são relacionados com a presença e mobilidade dos TEs. Podemos destacar aqui estudos que envolvem a origem de íntrons, envelhecimento, câncer, mudanças de padrões de desenvolvimento, variabilidade no MHC, entre outros (Canaani *et al.*, 1983; Purugganan & Wessler, 1992; Driver & McKechnie, 1992; Ding & Lipshitz, 1994; Andersson *et al.*, 1998).

I.1.1 ELEMENTO TRANSPONÍVEL *GYPSY*

O elemento *gypsy* (também denominado *mdg4*) é classificado como um retrotransposon com LTRs, que se mobiliza através de um intermediário de RNA, e codifica a enzima transcriptase reversa. Este elemento foi isolado do genoma de *D. melanogaster* e possui um tamanho de 7,5 kb, sendo 482 nucleotídeos de LTRs. Estas seqüências (LTRS) são bem conservadas e parecem se inserir em seqüências específicas TACATA, gerando duplicação no DNA alvo da seqüência TACA (Freund & Meselson, 1984).

A Figura 1 representa esquematicamente a estrutura de um elemento *gypsy* de *D. melanogaster*.

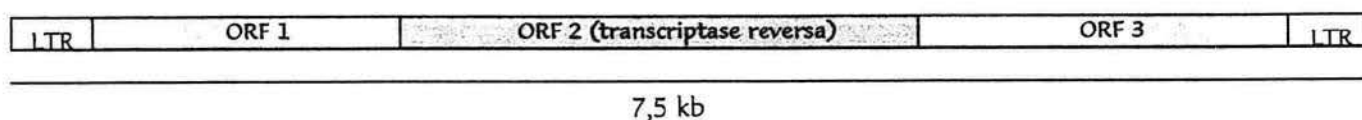


Figura 1. Estrutura do elemento *gypsy* de *Drosophila melanogaster*.

Stacey *et al.* (1986) constataram que *gypsy* se distribui amplamente nas espécies de *Drosophila* e no subgênero *Sophophora*, com algumas descontinuidades ocasionais. Tais resultados foram confirmados por nosso grupo (Loreto *et al.*, 1998) também para o outro subgênero deste grupo. *Gypsy* é estável e não se transpõe com freqüências detectáveis na maioria dos estoques de *Drosophila*. Além disso, tem sido apontado como a maior evidência das semelhanças entre os retrotransposons e os retrovírus de vertebrados. Possivelmente, tal

concordância não é apenas estrutural, mas, muito provavelmente, também funcional.

Vários estudos comprovaram que *gypsy* apresenta uma organização retroviral típica juntamente com propriedades infectivas. Desta forma, *gypsy* é o primeiro retrovírus descrito em invertebrados (Kim *et al.*, 1994; Soung *et al.*, 1994).

I.1.2 ELEMENTO TRANSPONÍVEL *P*

A família do elemento *P* é uma das mais bem caracterizadas nos organismos eucariotos. De acordo com uma boa quantidade de evidências, este elemento invadiu recentemente o genoma de *D. melanogaster*, muito provavelmente por transferência horizontal de uma espécie do grupo *willistoni*. Observações que estão de acordo com esta hipótese incluem: a) a alta similaridade entre as seqüências do elemento *P* de linhagens de *D. melanogaster* de origens diversas; b) a não existência de elemento *P* em outras espécies do subgrupo *melanogaster*; c) a seqüência de *P* de *D. willistoni* difere por apenas um único nucleotídeo em relação ao *P* de *D. melanogaster* (o que é inesperado se levarmos em conta a divergência das duas espécies, estimada em 50 milhões de anos); d) uma recente simpatria entre *D. melanogaster* e as espécies do grupo *willistoni* (revisões em Cummings, 1994; Capy *et al.*, 1994; Clark *et al.*, 1994).

Estudos da distribuição de seqüências homólogas a *P* no gênero *Drosophila* têm mostrado que ele é basicamente restrito ao subgênero *Sophophora*. Foram detectadas seqüências de *P* em todas as espécies do grupo *willistoni*, *obscura* e em algumas espécies do grupo *saltans*.

Entretanto, a descoberta de sequências *P* em uma espécie que não pertence ao gênero *Drosophila*, *Lucilia cuprina* (blowfly), sugere que este TE seja mais amplamente distribuído do que parecia ser (Perkins & Howells, 1992). A homologia encontrada entre o elemento *P* desta espécie com o de *D. melanogaster* é estimada em 50% ao nível dos nucleotídeos. O elemento *P* completo de *D. melanogaster* possui um tamanho de 2,9 kb com repetições terminais invertidas (ITRs) de 31 pb em suas extremidades. É classificado como um transposon propriamente dito, já que se desloca como sequência de DNA e codifica uma transposase para catalisar sua inserção em novos sítios. A Figura 2 representa esquematicamente a estrutura do elemento *P* de *D. melanogaster*.

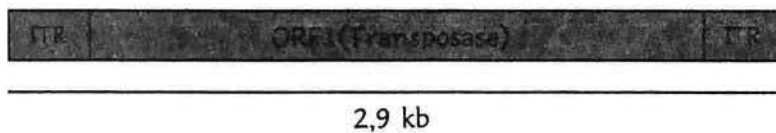


Figura 2. Estrutura do elemento *P* de *Drosophila melanogaster*.

I.1.3 ELEMENTO TRANSPONÍVEL *HOBO*

O elemento *hobo* completo de *D. melanogaster* possui um comprimento de 3,0 kb. Assim como o elemento *P*, também está relacionado ao fenômeno de disgenesia híbrida. A Figura 3 representa esquematicamente a estrutura do elemento *hobo* de *D. melanogaster*.

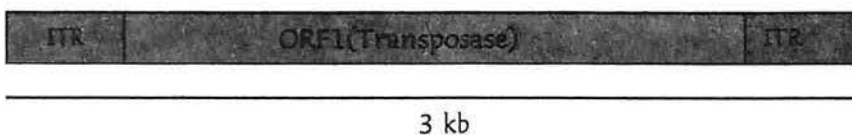


Figura 3. Representação esquemática do elemento *hobo* de *Drosophila melanogaster*.

Os resultados de hibridação por *Dot blot* obtidos por Loreto *et al.* (1998) em 33 espécies de *Drosophila* apresentaram sinais positivos deste elemento apenas em *D. melanogaster*, *D. simulans* e em certas linhagens de *D. willistoni*. Uma análise mais detalhada, por *Southern blot* após digestão de DNA genômico com a enzima *RsaI*, revelou que entre cinco diferentes linhagens de *D. willistoni*, quatro apresentaram sinais positivos de *hobo*, com fragmentos de tamanhos similares. Os autores sugerem que as seqüências de *hobo* são antigas (“reliquias”) e inativas em *D. willistoni*.

I. 2. A ESPÉCIE *Drosophila willistoni*

O grupo *willistoni* de *Drosophila* pertence ao subgênero *Sophophora*. Entre as espécies deste grupo, *Drosophila willistoni* é a espécie de drosofilídeo mais comum que habita as florestas da América Central e Sul (Dobzhansky & Powell, 1975). A Figura 4 representa um exemplar desta espécie.

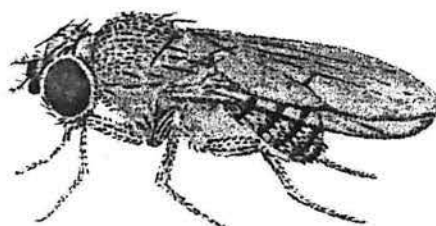


Figura 4. Aspecto de um exemplar macho de *Drosophila willistoni*.

Como outros membros do grupo *willistoni*, a distribuição geográfica de *D. willistoni* é essencialmente Neotropical. É a espécie de mais ampla distribuição do grupo (revisado por Ehrman & Powell, 1982), estendendo-se do México Central e Flórida (EUA), ao norte, até o Uruguai e Argentina, ao sul.

Populações naturais de *D. willistoni* são usualmente polimórficas com respeito a rearranjos gênicos, que ocorrem em todos os braços cromossômicos, conforme visualizado nos núcleos politênicos. Esta espécie apresenta um complexo polimorfismo cromossômico para inversões paracêntricas, o que pode estar relacionado com sua plasticidade genotípica e, conseqüentemente, com sua grande capacidade para explorar novos ambientes (revisão em Krimbas & Powell, 1992).

II - OBJETIVOS

Este trabalho tem como objetivo contribuir para o conhecimento da história evolutiva dos elementos transponíveis *P*, *gypsy* e *hobo* no que se refere a sua integridade e número de cópias, presentes no genoma de *Drosophila willistoni*. Para tal, foram investigadas e caracterizadas diversas linhagens de *D. willistoni*. É importante salientar a importância de se obter dados desta espécie Neotropical tão representativa em nossas coletas, uma vez que a maioria do conhecimento acumulado está restrito à espécie *D. melanogaster*.

O estudo da variação molecular destes TEs e a estimativa de sua representatividade, são imprescindíveis para melhor entender a dinâmica destas seqüências móveis e a sua possível relação com a plasticidade genômica de *D. willistoni*, caracterizada por suas inúmeras inversões e pela sua alta variabilidade, expressa em diferentes marcadores genéticos.

III - MATERIAL E MÉTODOS

III.1 Populações estudadas

Foram analisadas 17 linhagens de *Drosophila willistoni*, procedentes de diferentes locais geográficos (Figura 5 e Tabela 1). Os estoques vêm sendo mantidos por cruzamento massal em câmara de temperatura constante de 17°C em tubos contendo meio de cultura padrão (Marques *et al.*, 1966).

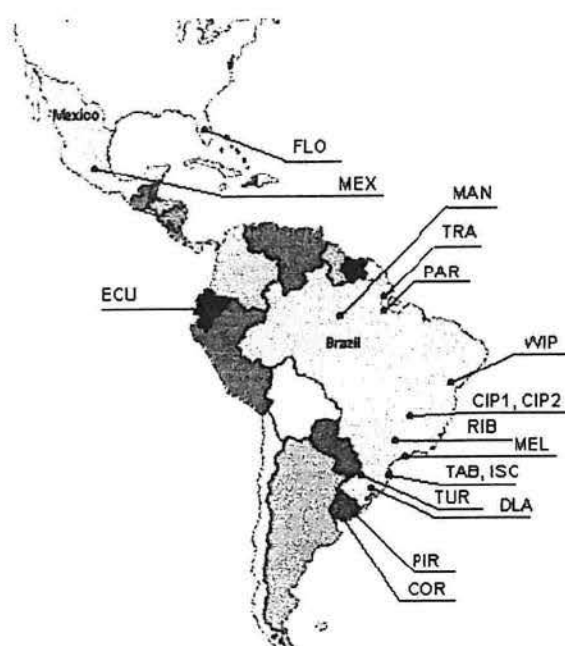


Figura 5. Procedência das amostras de populações naturais (1 a 17, conforme Tabela I) de *Drosophila willistoni* analisadas no presente trabalho.

Tabela 1. Populações analisadas neste trabalho.

	População	Procedência	Ano de Coleta
1	COR	Coronilla - Uruguai	1995
2	PIR	Piriápolis - Uruguai	1995
3	DLA	Dois Lajeados - RS	1995
4	TUR	Pq. Est. Turvo - RS	1994
5	ISC	Ilha S. Catarina - SC	1997
6	TAB	Serra do Tabuleiro - SC	1997
7	MEL	Ilha do Mel - PR	1994
8	RIB	Ribeirão Preto - SP	1995
9	CIP ₁	Serra do Cipó - MG	1995
10	CIP ₂	Serra do Cipó - MG	1996
11	WIP	Ipitanga - BA	1965
12	PAR	Ilha de Marajó - PA	1997
13	TRA	Traquatema - PA	1990
14	MAN	Manaus -AM	1986
15	ECU	Jaton Sacha- Equador	1997
16	MEX	Apazapan - México	1997
17	FLO	Flórida - EUA	-

III.2 Extração de DNA e *Southern blot*

Cerca de 10 μ g de DNA foram extraídos (Jowett, 1986) e submetidos à digestão com as enzimas de restrição *Xho*I, *Bam*HI e *Ava*II seguindo as instruções do fabricante. O padrão de fragmentos gerados com estas enzimas informa sobre o provável número de cópias e sobre a presença de elementos completos ou deletados bem como a ocorrência ou não de sítios de restrição no genoma das populações nos locais esperados tomando como referência o elemento de *D. melanogaster*. Os fragmentos gerados após clivagem foram separados em gel de agarose

1%, transferidos para membrana de nylon (segundo a técnica de *Southern blot*) e hibridados com a sonda correspondente. Para marcação, hibridação e detecção foi utilizado o sistema não radioativo do kit *Gene Images*® (Amersham Life Science) que utiliza um sistema quimioluminescente. Neste sistema, um sinal é produzido pela atividade da fosfatase alcalina que encontra-se conjugada a um anticorpo que se liga à fluoresceína incorporada na marcação da sonda. Os sinais de hibridação são visualizados num filme de raio X e as bandas obtidas foram plotadas para análise em papel milimetrado.

III.3 Sondas utilizadas

Como sonda para *gypsy*, foi utilizado o fragmento de 6,9 kb liberado pela enzima de restrição *XhoI* do retroelemento *gypsy* de *Drosophila melanogaster*, contido no plasmídeo pGGHS. Para o elemento *P*, foi utilizada a sonda do elemento *P* canônico (2,9kb) de *D. melanogaster*, contida no plasmídeo p π 25.1. Para o elemento *hobo*, foi utilizado o plasmídeo pHX4 que contém o inserto de 2,6kb do elemento *hobo* de *D. melanogaster*.

IV - RESULTADOS E DISCUSSÃO

IV.1 Elemento P

Os resultados obtidos após clivagem com a enzima de restrição *AvaII* indicam que todas as populações de *D. willistoni* estudadas apresentam seqüências completas com os sítios de restrição esperados (Figura 6 e 7). Além destes, observamos várias outras bandas que, provavelmente, são cópias deletadas ou fragmentos obtidos de elementos que apresentam sítios divergentes para esta enzima. Um ponto interessante é o fato de que muitos destes fragmentos observados em *D. willistoni* são coincidentes com os de *D. melanogaster*, o que nos leva a supor que mudanças ocorridas nas seqüências destas cópias foram transmitidas horizontalmente e, por algum motivo, ainda são conservadas. Estes resultados estão de acordo com os obtidos por outros autores, que encontraram *P* em diversas linhagens de *D. willistoni* (Daniels *et al.*, 1990; Regner *et al.*, 1998). Até o momento, nenhuma população de *D. willistoni* se mostrou livre de seqüências *P*.

A análise dos fragmentos gerados após a clivagem com a enzima de restrição *XhoI* aponta para uma variação do tamanho dos fragmentos entre as diferentes populações (Figura 8, 9 e 10). Tal padrão nos leva a propor algumas explicações: 1) pode estar ocorrendo uma variação entre as populações no sítio da enzima dentro do elemento (perda do sítio esperado e/ou ganho de outros); 2) esta variação pode sugerir que as cópias estejam em locais diferentes do genoma destas populações, o que implica numa ativação do elemento em algum ponto ao longo da

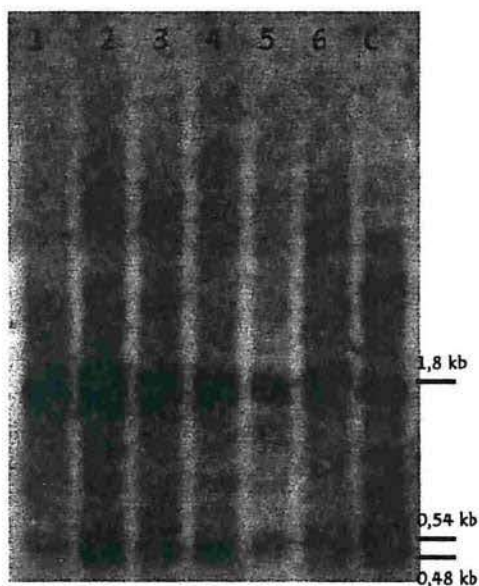


Figura 6. Southern blot do DNA de populações de *Drosophila willistoni*. As amostras foram digeridas com a enzima *AvaII* e hibridadas com elemento *P* de *D. melanogaster*. 1) TUR; 2) WIP; 3) TAB; 4) TRA; 5) CIP₁; 6) PAR; C) controle - *D. melanogaster* (linhagem Harwich).

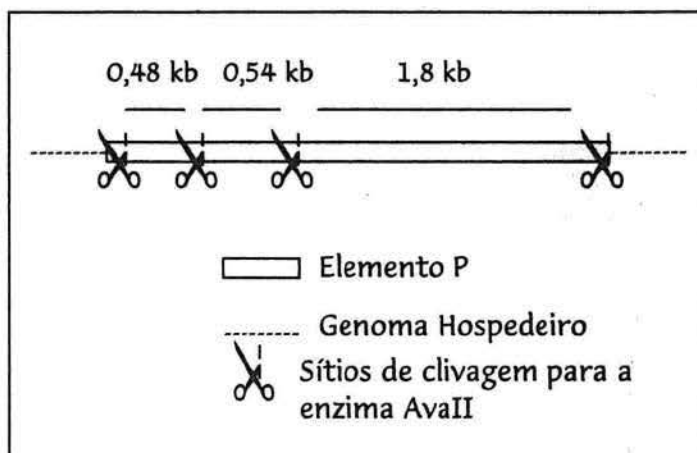


Figura 7. Desenho esquemático representando os sítios de clivagem da enzima *AvaII* no elemento *P* no genoma de *D. melanogaster*.

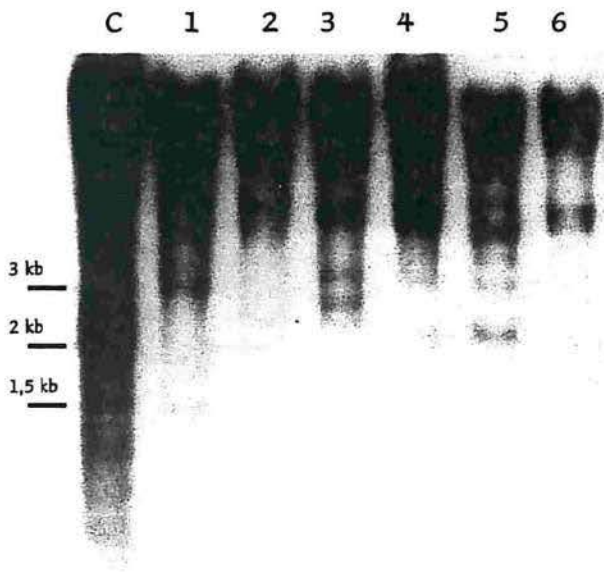


Figura 8. *Southern blot* do DNA de populações de *D. willistoni*. As amostras foram digeridas com a enzima *XhoI* e hibridizadas com o elemento *P* de *D. melanogaster*. C) controle - *D. melanogaster* (linhagem Harwich); 1) PAR; 2) CIP₁; 3) TRA; 4) TAB; 5) WIP; 6) TUR.

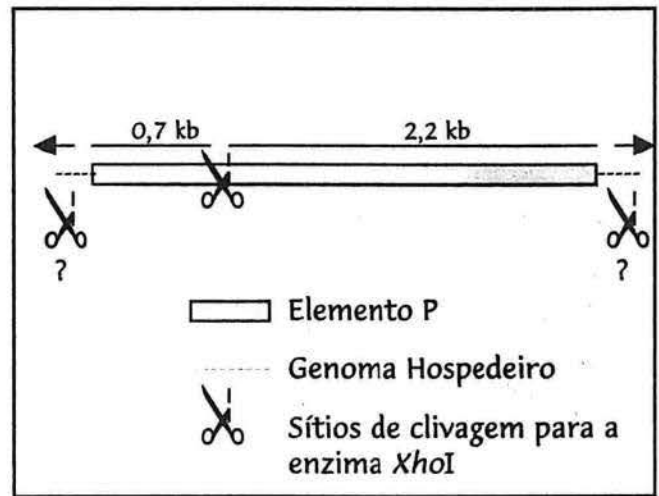


Figura 9. Desenho esquemático representando os sítios de clivagem da enzima *XhoI* no elemento *P* no genoma de *D. melanogaster*.

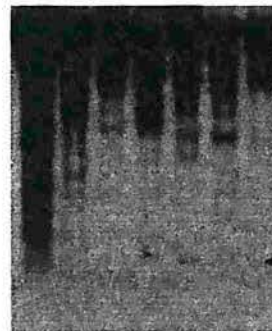


Figura 10. *Southern blot* do DNA de populações de *D. willistoni*. Idem a figura 8, porém obtido com taxas de exposição maiores.

500 pb

diversificação destas populações; 3) a variação observada pode ser explicada por alterações no DNA genômico do hospedeiro que circunda o elemento e que, assim, altera o tamanho do fragmento produzido. Embora tenha sido verificada variação dos padrões entre as populações, algumas bandas são compartilhadas por até 60% delas, como é o caso de um fragmento de 500 pb visível em exposições mais prolongadas (Figura 10) e que, inclusive, deve ser resultante de cópias deletadas, ou de um novo padrão de clivagem para esta enzima.

A estimativa do número de cópias foi feita considerando duas bandas como uma cópia, pois a enzima *XhoI* reconhece um sítio interno na seqüência *P* em *D. melanogaster* e sítios no genoma, antes e depois do elemento. A variação foi de 3 a 7 cópias entre as populações analisadas de *D. willistoni*.

Embora o fato das linhagens de *D. willistoni* apresentarem diferentes padrões de fragmentos gerados pela enzima *XhoI* possa ser explicado por uma recente ativação de *P*, um maior entendimento da distribuição e da atividade do elemento *P* em diferentes linhagens depende da comprovação de que existe (ou não) expressão deste elemento e que as seqüências completas detectadas por clivagem com a enzima *AvaII* são capazes (ou não) de mobilização.

IV.2 Elemento *hobo*

Em relação ao elemento *hobo*, parece haver baixa homologia entre a sonda de *D. melanogaster* e o DNA genômico das linhagens de *D. willistoni*, uma vez que a intensidade da hibridação foi bastante fraca. Obtivemos um sinal para um padrão de bandas heterogêneas e de alto peso molecular quando clivamos o DNA das populações com a enzima *XhoI* (Figura 11 e 12). Este mesmo padrão já havia sido descrito por Streck *et al.* (1986) para diferentes linhagens de *D. melanogaster* e *D. simulans*. Além disso, as linhagens de *D. willistoni* não apresentaram o fragmento esperado de 2,6 kb, correspondente ao elemento *hobo* completo em *D. melanogaster*.

No entanto, em outro ensaio clivamos os DNAs com a enzima *BamHI* onde utilizamos apenas 3 μ g de DNA para o controle de *D. melanogaster* e após 40 minutos de exposição, conseguimos um padrão de bandas analisável para *hobo*. Os dados obtidos para as 17 populações nos permite avaliar o número de cópias e a variabilidade existente entre populações (Figura 13 e 14). O número de bandas obtido variou entre 6 e 11, sendo a maioria delas de tamanho maior do que o comprimento de *hobo* (3 kb). Somente uma a 3 cópias apresentaram tamanhos menores, representando possíveis cópias deletadas ou fragmentos provenientes de novos sítios de restrição para esta enzima. Duas destas bandas menores (em torno de 1,8 e 2,9 kb) são compartilhadas pela maioria das populações. Outras bandas maiores, de tamanho entre 6 e 12 kb também são conservadas nestas populações.

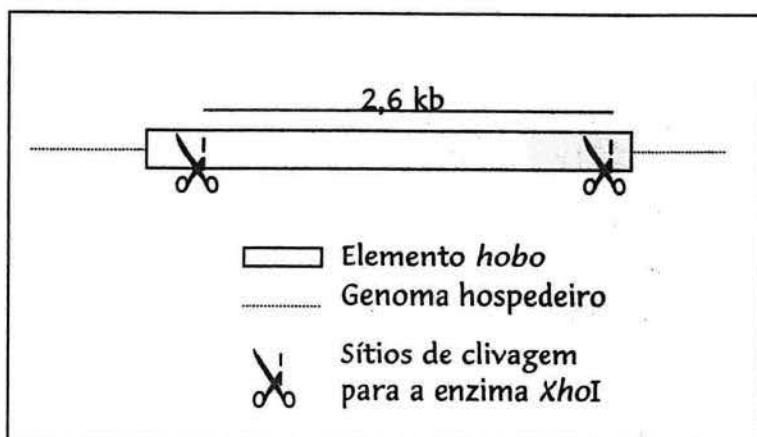


Figura 12. Desenho esquemático representando os sítios de clivagem da enzima *XhoI* no elemento *hobo* no genoma de *D. melanogaster*.

Figura 11. *Southern blot* do DNA de populações de *Drosophila willistoni*. As amostras foram digeridas com a enzima *XhoI* e hibridadas com elemento *hobo* de *D. melanogaster*. C) controle - *D. melanogaster* (linhagem Harwich); 1) COR; 2) DLA; 3)ISC; 4) RIB; 5)CIP₂.

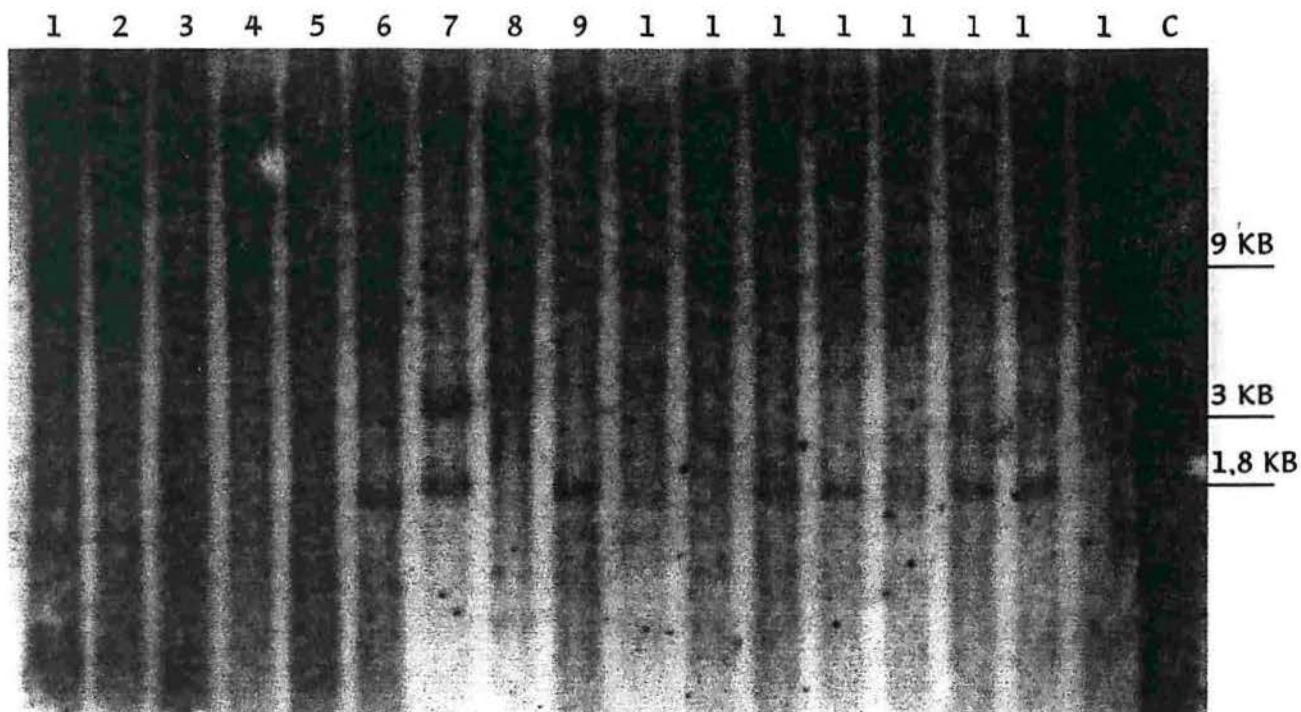


Figura 13. *Southern blot* do DNA de populações de *Drosophila willistoni*. As amostras foram digeridas com a enzima *Bam*HI e hibridadas com elemento *hobo* de *D. melanogaster*. 1) PIR; 2) MEL; 3) MAN; 4) ECU; 5) MEX; 6) FLO; 7) CIP₂; 8) RIB; 9) ISC; 10) DLA; 11) COR; 12) TUR; 13) WIP; 14) TAB; 15) TRA; 16) CIP₁; 17) PAR; C) controle - *D. melanogaster* (linhagem Harwich).

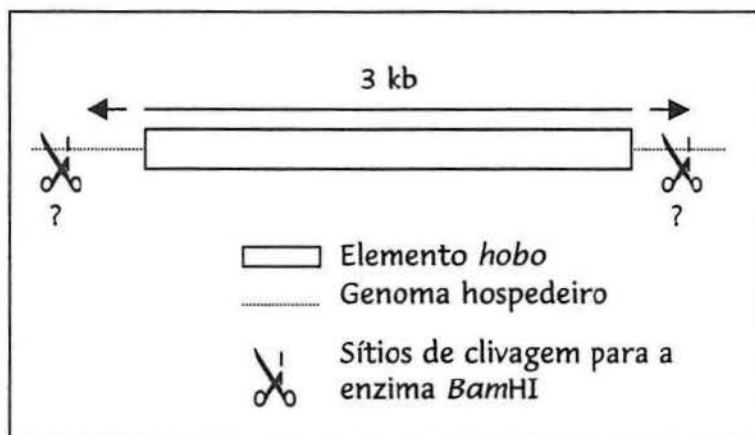


Figura 14. Desenho esquemático representando os sítios de clivagem da enzima *Bam*HI no elemento *hobo* no genoma de *D. melanogaster*.

IV.3 Elemento *gypsy*

A clivagem do elemento *gypsy* com as três enzimas utilizadas neste trabalho (*XhoI*, *AvaII* e *BamHI*), resultou em um padrão de fragmentos bastante conservado entre as diferentes linhagens de *D. willistoni*. Embora os sinais de hibridação indiquem pouca homologia entre a sonda do elemento *gypsy* de *D. melanogaster* com as seqüências de *D. willistoni*, observamos o fragmento esperado de 6,9 kb para a enzima *XhoI* em todas as populações (Figuras 15 e 16), indicando não só a conservação dos sítios de restrição, mas a existência de cópias completas no genoma. Além destas, observamos cópias compartilhadas com tamanhos moleculares menores: uma banda de aproximadamente 5,5 kb e outras duas de cerca de 3kb. Novamente atribuímos estes fragmentos à presença de elementos deletados ou de novos sítios internos de restrição para a enzima utilizada. Quando analisamos os resultados obtidos para a enzima *AvaII* (Figuras 17 e 18) a conservação do padrão entre as populações deve ser ressaltado. Possivelmente, uma das bandas esperadas (de 1,07 kb) encontra-se presente em todas as populações de *D. willistoni*. No entanto, os demais fragmentos que observamos no controle de *D. melanogaster* não aparecem nas demais amostras.

Para *gypsy*, a estimativa do número de cópias é feita utilizando a enzima *BamHI* (Figura 19 e 20). A partir desta análise, estimamos entre 9 e 16 o número de seqüências homólogas à sonda utilizada. No entanto, somente de 10 a 30% destas bandas possuem tamanho para representar cópias completas deste elemento. A grande maioria poderiam ser consideradas como representantes de seqüências incompletas ou de padrões de clivagem alternativos. É importante ressaltar novamente a conservação dos padrões obtidos entre as populações. Tal conservação

sugere pouca ou nenhuma mobilização deste elemento durante a dispersão e diversificação das populações.

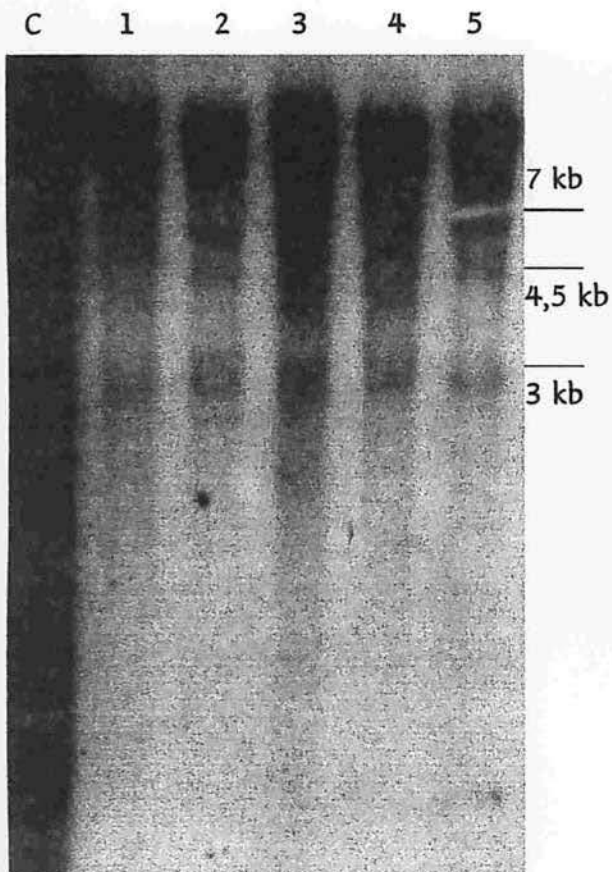


Figura 15. *Southern blot* do DNA de populações de *Drosophila willistoni*. As amostras foram digeridas com a enzima *Xho*I e hibridadas com elemento *gypsy* de *D. melanogaster*. C) controle - *D. melanogaster*

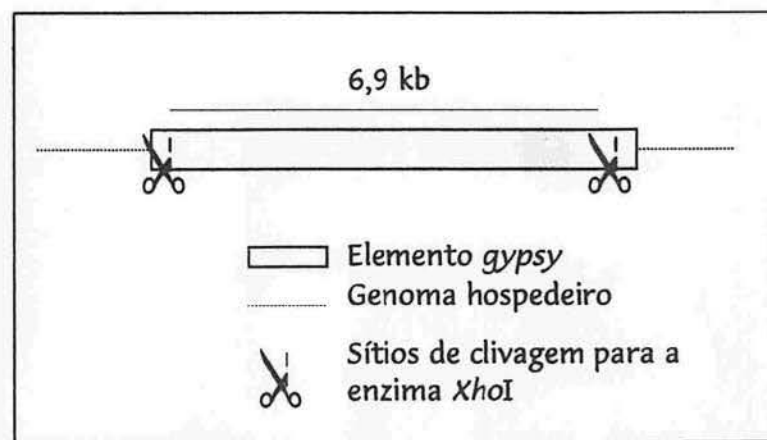


Figura 16. Desenho esquemático representando os sítios de clivagem da enzima *Xho*I no elemento *gypsy* no genoma de *D. melanogaster*

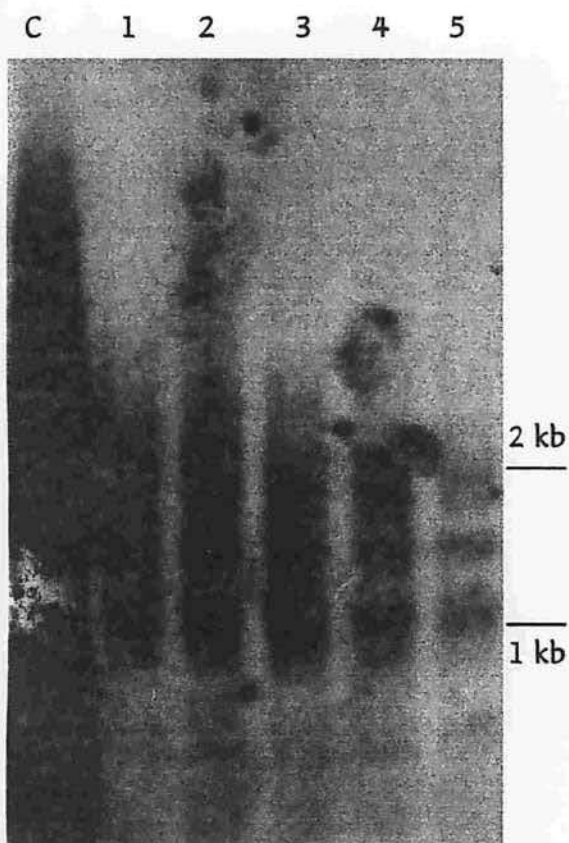


Figura 17. *Southern blot* do DNA de populações de *Drosophila willistoni*. As amostras foram digeridas com a enzima *AvaII* e hibridadas com elemento *gypsy* de *D. melanogaster*. C) controle - *D. melanogaster* (linhagem Harwich); 1) COR; 2) DLA; 3)ISC; 4) RIB; 5)CIP₂.

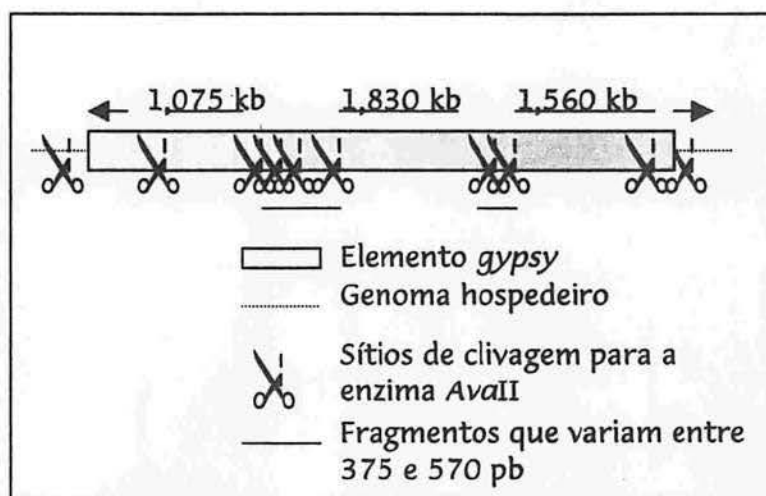


Figura 18. Desenho esquemático representando os sítios de clivagem da enzima *AvaII* no elemento *gypsy* no genoma de *D. melanogaster*.

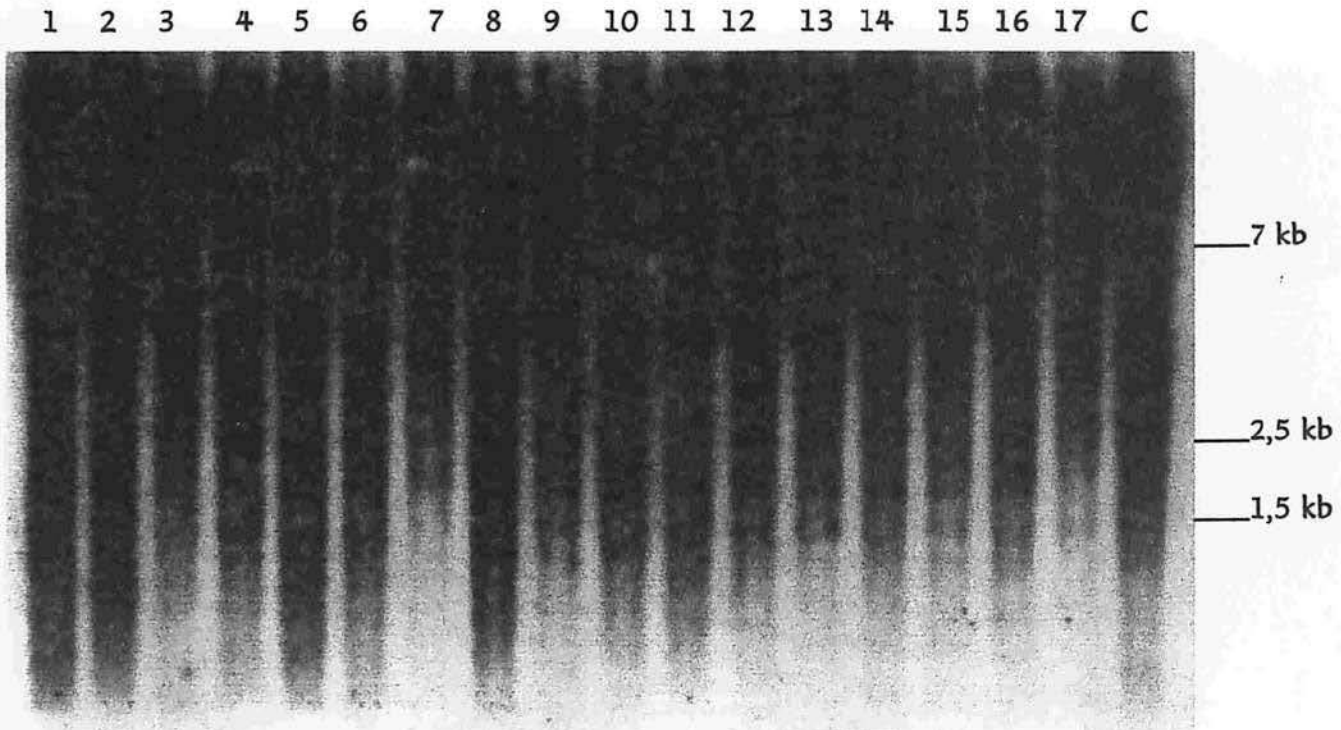


Figura 19. *Southern blot* do DNA de populações de *Drosophila willistoni*. As amostras foram digeridas com a enzima *Bam*HI e hibridadas com elemento *gypsy* de *D. melanogaster*. 1) PIR; 2) MEL; 3) MAN; 4) ECU; 5) MEX; 6) FLO; 7) CIP₂; 8) RIB; 9) ISC; 10) DLA; 11) COR; 12) TUR; 13) WIP; 14) TAB; 15) TRA; 16) CIP₁; 17) PAR; C) controle - *D. melanogaster* (linhagem Harwich).

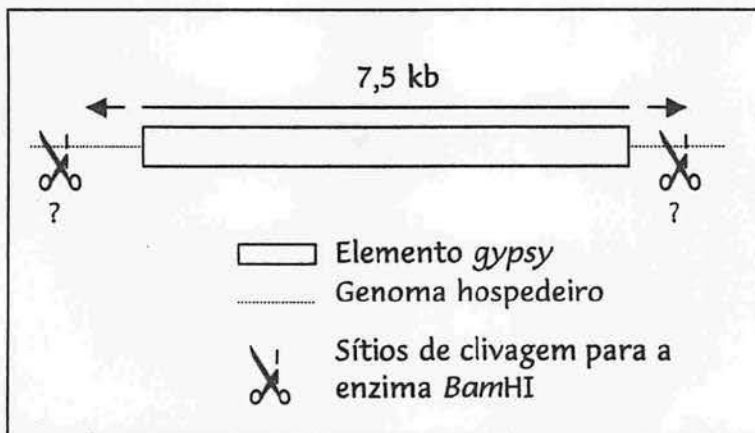


Figura 20. Desenho esquemático representando os sítios de clivagem da enzima *Bam*HI no elemento *gypsy* no genoma de *D. melanogaster*.

V - CONSIDERAÇÕES FINAIS

Muitas questões sobre o papel dos elementos transponíveis bem como sua evolução no genoma de suas espécies hospedeiras ainda permanecem sem resposta. Este trabalho é uma tentativa de entender a dinâmica de três destas seqüências (*P*, *hobo* e *gypsy*) num genoma hospedeiro bastante complexo, caracterizado por um grande repertório de rearranjos cromossômicos e por uma alta variabilidade genética e plasticidade ecológica, como é o genoma de *Drosophila willistoni*.

É certo que a presença e, principalmente, a movimentação destas seqüências tem inúmeras implicações. Contudo, muito pouco sabemos sobre o que está por trás de tamanha abundância e ubiquidade desses elementos móveis no genoma de espécies já investigadas para esse objetivo.

Quando nos propusemos a estudar este tema nos deparamos com várias questões interessantes. Seriam os elementos transponíveis selecionados para representarem um reservatório que poderia proporcionar grande variabilidade quando o genoma, eventualmente, necessitasse? Estariam eles presentes no genoma por serem seletivamente neutros num estado inativo, se acumulando e fazendo parte do "lixo" genético? Seriam eles apenas parasitas do genoma, ou "DNAs egoístas", cujo objetivo seria apenas sua própria duplicação? Ou, ainda, tais seqüências e o resto do genoma poderiam ser mutuamente dependentes, numa relação necessária para a perpetuação de ambos e, neste contexto, os elementos móveis representariam uma parcela de grande importância evolutiva para todas as espécies?

Na tentativa de melhor compreender as questões acima, traçamos ainda algumas considerações finais. Um dos pontos a ressaltar diz respeito à utilização de sondas heterólogas em ensaios de hibridação. No caso deste trabalho, todas as sondas utilizadas foram obtidas de *Drosophila melanogaster*, que é a espécie referência para os estudos dentro deste gênero. Para o elemento *P*, observamos que os sítios de restrição existentes na sonda são também encontrados nas cópias de *P* no genoma de *D. willistoni*. Isto se deve à grande homologia, já bem estabelecida entre sonda e o DNA alvo. Além disso, o sinal de hibridação é forte, o que torna mais fácil a análise. Estes fatores possibilitam inferências mais bem fundamentadas sobre este elemento.

Quando trabalhamos com a sonda de *gypsy*, nos deparamos com uma homologia menor, que se reflete num sinal de hibridação mais fraco. Apesar de termos obtido a banda esperada clivando o genoma de *D. willistoni* com a enzima *XhoI*, isto não ocorre com outras enzimas já estudadas em nosso laboratório. Esta divergência já foi detectada em seqüenciamentos preliminares de uma região de aproximadamente 500 pb que indicaram 50% de mudanças nucleotídicas entre *gypsy* de *D. melanogaster* e de *D. willistoni* (dados obtidos pelo nosso grupo). Esta divergência dificulta conclusões precisas sobre os resultados obtidos e estas se restringem às análises comparativas entre as populações estudadas.

Hobo já foi identificado por outros autores como seqüências relíquias no genoma de *D. willistoni* por apresentarem sinais fracos de hibridação. Tais resultados refletem uma divergência de seqüência entre sonda e os elementos no genoma investigado, também observados em nossos experimentos. Para este elemento, tempos de exposição devem ser

mais prolongados para que se obtenham resultados mais satisfatórios. Além disso, algumas enzimas não mostraram-se eficazes na obtenção de resultados. Diante destas considerações, o que gostaríamos de ressaltar é o cuidado que se deve ter ao se concluir sobre antigüidade ou invasão recente destas seqüências móveis no genoma, baseando-se apenas em dados obtidos pelo uso de sondas muito divergentes. Nesses casos, as conclusões refletem muito a qualidade do sinal obtido nos experimentos.

A análise comparativa dos padrões de fragmentos dos três elementos (*P*, *hobo*, *gypsy*) nos possibilitou ter uma idéia da dinâmica evolutiva destas seqüências no genoma de várias populações da espécie *D. willistoni*. Levando em consideração a homologia entre *P* de *D. melanogaster* e *P* de *D. willistoni*, pudemos concluir sobre o compartilhamento do mapa de restrição entre estes elementos. A hipótese de mobilidade e ativação recente de *P* nos parece mais plausível, o que explicaria o padrão variável encontrado entre as populações. Já para *gypsy*, todos os dados analisados apontam para a estabilidade deste retrotransposon nos genomas hospedeiros estudados. Embora a sonda tenha se mostrado bastante divergente quando analisamos *hobo*, o que certamente dificulta a análise, verificamos uma certa conservação dos fragmentos entre as populações, embora fragmentos variáveis possam indicar também alguma movimentação.

Estes estudos certamente auxiliarão no entendimento do papel destas seqüências móveis no surgimento e manutenção de variabilidade genética na forma, principalmente, de rearranjos cromossômicos, como é o caso de *D. willistoni* (como investigado por Rohde, 2000; submetido a publicação). Estes resultados podem servir como guia para a escolha de qual ou quais elementos transponíveis devem ser investigados mais

detalhadamente, quando da tentativa de resolver esta questão. Muito provavelmente, um elemento tão estável quanto *gypsy* esteja pouco envolvido com processos que envolvem movimentação de TEs. Já *P e*, em última análise, *hobo* seriam bons candidatos para futuras e mais refinadas análises de expressão e envolvimento com a produção de variabilidade.

VI - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDERSSON, G.; SVENSSON, A. C.; SETTERBLAD, N.; RASK, L. Retroelements in the human MHC class II region. *Trends. Genet.*, v. 14, n. 3, p. 109-114, 1998.
- ARKHIPOVA, I. R.; ILYIN, Y. V. Control of transcription of *Drosophila* retrotransposons. *BioEssays*, v. 14, p.161-168, 1992.
- BOUSSY, I. A.; DANIELS, S. B. *Hobo* transposable elements in *Drosophila melanogaster* and *Drosophila simulans*. *Genet. Res.*, v. 58, p. 27-34, 1991.
- CANAANI, E.; DREAZEN, O.; KLAR, A.; REHAV, I. G.; RAM, D.; COHEN, J. B.; GIVOL, D. Activation of the *c-mos* oncogene by insertion of an endogenous intra-cisternal A-particle genome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, v.80, p.7118-7122, 1983.
- CAPY, P.; ANXOLABÉHÈRE, D.; LANGIN, T. The strange phylogenies of transposable elements: are horizontal transfers the only explanation? *Trends. Genet.*, v.10, n. 1, p. 7-12, 1994.
- CLARK, J. B.; MADDISON, W. P.; KIDWELL, M. G. Phylogenetic analysis supports horizontal transfer of *P* transposable elements. *Mol. Biol. Evol.*, v. 11, p. 40-50, 1994.
- CUMMINGS, M. P. Transmission patterns of eukaryotic transposable elements: arguments for and against horizontal transfer. *TREE*, v. 9, p. 141-145, 1994.
- DANIELS, S. B.; PETERSON, K. R.; STRAUSBAUGH, L. D.; KIDWELL, M. G.; CHOVNICK, A. Evidence for horizontal transmission of the *P* element between *Drosophila* species. *Genetics*, v. 124, p. 339-355, 1990.
- DING, D.; LIPSHITZ, H. D. Spatially regulated expression of retrovirus-like transposons during *Drosophila melanogaster* embryogenesis. *Genet. Res.*, v.64, n.3, p.167-181, 1994.
- DOBZHANSKY, T. H.; POWELL, JR. The *willistoni* group of *Drosophila*. In: *Handbook of Genetics*. King RC (ed), vol.3, Plenum, New York, p. 587-622, 1975.
- DRIVER, C. J. I.; McKECHNIE, S. W. Transposable elements as a factor in the aging of *Drosophila melanogaster*. *Annals New York Academy of Sciences*, v. 673, p. 83-91, 1992.

- EHRMAN, L.; J.R. POWELL. The *Drosophila willistoni* species group. In: *The Genetics and Biology of Drosophila*. Ashburner M, Carson HL, Thompson Jr. JN (eds). Academic Press, New York. vol 3b. p. 193-225, 1982.
- FREUND, R.; MESELSON, M. Long terminal repeat nucleotide sequence and specific insertion of the gypsy transposon. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v.81, p.4462-4464, 1984.
- HOUCK, M. A.; CLARK, J. B.; PETERSON, K. R.; KIDWELL, M. G. Possible horizontal transfer of *Drosophila* genes by the mite *Proctolaelaps regalis*. *Science*, v. 253, p. 1125-1128, 1991.
- JOWETT, T. Preparation of nucleic acids. In: ROBERTS, D.B. (Ed.). *Drosophila: a practical approach*. Oxford: IRL Press, 1986.
- KIDWELL, M. G. Invitational Lecture. The evolutionary history of the *P* family of transposable elements. *J. Hered.*, v. 85, p. 339-346, 1994.
- KIM, A.; TERZIAN, C.; SANTAMARIA, P.; PÉLISSON, A.; PRUD'HOME, N.; BUCHETON A. Retroviruses in invertebrates: The gypsy retrotransposon is apparently an infectious retrovirus of *Drosophila melanogaster*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v.91, n. 4, p.1285-1289, 1994.
- KRIMBAS, C.B.; POWELL, JR. *Drosophila* Inversion Polymorphism. Krimbas CB, Powell JR (eds), CRC Press, Boca Raton, Florida, 1992.
- LORETO, E. L.; SILVA, L. B.; ZAHA, A.; VALENTE, V. L. S. Distribution of transposable elements in neotropical species of *Drosophila*. *Genetica*, v. 1, p. 1-13, 1998.
- MARQUES, E. K., M. NAPP.; H. WINGE.; A. R. CORDEIRO. A corn meal, soybean flour, wheat germ medium for *Drosophila*. *Drosophila Information Service*, v. 41, p. 187, 1966.
- MATSUURA, E.T.; TAKADA, S.; KATO, H.; NIIZEKI, S.; CHIGUSA SI. Hybrid dysgenesis in natural populations of *Drosophila melanogaster* in Japan. *Genetica*, v. 90, p. 9-16, 1993.
- PERKINS, H.D.; HOWELLS, A.J. Genomic sequences with homology to the *P* element of *Drosophila melanogaster* occur in the blowfly *Lucilia cuprina*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 89, p. 10753-10757, 1992.
- PURUGGANAN, M.; WESSLER, S. The splicing of transposable elements and its role in intron evolution. *Genetica*, v. 86, p.295-303, 1992.

- REGNER, L. P.; ZAHA, A.; ABDELHAY, E.; VALENTE, V. L. S. *P* element in natural populations of *Drosophila willistoni* from different geographical origins. *Dros. Inf. Serv.*, v. 81, p. 156-160, 1998.
- SOUNG, S. U.; GERASIMOVA, T.; KURKULOS, M.; BOEKE, J. D.; CORCES, V. G. An Env-like protein encoded by a *Drosophila* retroelement: evidence that *gypsy* is an infectious retrovirus. *Gen. Dev.*, v. 8, p. 2046-2057, 1994.
- STACEY, S. N.; LANSMAN, R. A.; BROCK, H. W.; GRIGLIATTI, T. A. Distribution and conservation of mobile elements in the genus *Drosophila*. *Mol, Biol, Evol.*, v.3, P.522-534, 1986.
- STRECK, R. D.; MACGAFFEY, J. E.; BECKENDORF, S.K. The structure of *hobo* transposable elements and their insertion sites. *EMBO Journal* v. 5, p. 3615-3623, 1986.



UFRGS

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA
Dra. Karen Luisa Haag

Porto Alegre, 07 de dezembro de 2000.

Ilma. Sra.
Profa. Vera L. S. Valente Gaiesky
Departamento de Genética
Nesta Universidade

Prezada Professora:

Meu parecer quanto ao relatório de atividades do Bacharelado da aluna Adriana K. Sassi é favorável a sua aprovação, com conceito final A. O relatório está muito bem redigido, tem pouquíssimas incorreções gramaticais e a sua apresentação está excelente. No texto a Adriana demonstra que tem condições de interpretar e discutir seus resultados frente às informações colhidas na literatura, num nível adequado ao esperado para um aluno de graduação.

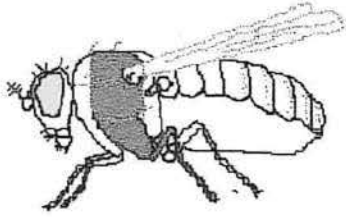
Eu teria algumas pequenas críticas a tecer, as quais poderão ser úteis para o delineamento de futuros trabalhos, e dizem respeito à metodologia utilizada.

- Eu fiquei com dúvidas em relação aos critérios utilizados para a escolha das enzimas de restrição. Por que foram usadas BamHI, Ava II e Xho I para todas as sondas? Se os objetivos do trabalho eram verificar a integridade e o número de cópias dos elementos de transposição em linhagens de *D. willistoni*, então seria necessário primeiro olhar o mapa de restrição de cada uma das sondas (aliás, acho que teria sido bem adequado apresentar ao leitor uma figura contendo esses mapas). Tendo o mapa em mãos, seria correto verificar quais as enzimas que não apresentam sítio na porção interna do elemento, para estimar o número de cópias, e quais as que tem um número pequeno de sítios no interior do elemento, para avaliar sua integridade no genoma das diversas linhagens.
- Os Southern da Adriana não estão muito conclusivos. Creio que para fazer uma análise com sondas heterólogas é preciso tomar muito cuidado com os controles. O controle de *D. melanogaster* não serve apenas para dizer se o experimento funcionou (se a hibridação ocorreu), mas para fazer toda uma série de avaliações quanto aos padrões encontrados nos insetos testados (número de bandas e seu peso molecular). Por isso, o controle deve ter bandas claras e bem definidas, o que não ocorreu nas figuras apresentadas no relatório.
- Além disso, fiquei com a impressão de que as clivagens utilizadas nos Southern estão parciais. Prova disso é o controle de *D. melanogaster*, que deveria apresentar no máximo quatro bandas para a clivagem com Ava II do elemento P, mas está apresentando na verdade cinco bandas bem definidas. Problemas de clivagem parcial são comuns em Southern genômicos e vão influenciar drasticamente todo o resto da análise.

Agradecendo pela minha indicação para apreciar esse belo trabalho, aproveito para cumprimentar a Adriana pelo capricho com que executou sua obra. Sucesso para o grupo dos pesquisadores de ecologia evolutiva de drosófilas!

Atenciosamente,

Karen Luisa Haag



**Laboratório de Biologia Molecular de
Drosophila - LabDros**

Prof. Élgion Loreto C.P 5050
Dep. Biologia Univ. Fed. de Santa Maria
97111-970 - Santa Maria RS
eMail: elgion@base.ufsm.br
www.ufsm.br/labdros

Santa Maria, 9 de dezembro de 2000.

**À Comissão de Bacharelado
Curso de Ciências Biológicas
Universidade Federal do Rio Grande do Sul**

**PARECER AVALIATIVO
DE BACHARELADO**

Se necessário fosse usar apenas uma palavra para qualificar o relatório de conclusão de curso apresentada por ADRIANA KOSLOVSKI SASSE, intitulado "Contribuição ao estudo dos Elementos Transponíveis em populações de *Drosophila willistoni*", essa palavra, no meu entender, deveria ser MARAVILHOSO.

O volume e a qualidade de resultados obtidos, os significados desses resultados e a apresentação muito cuidadosa, faz desse trabalho merecedor do conceito máximo para aprovação.

Atenciosamente,

Élgion L. S Loreto
Professor Adjunto
Dep de Biologia, CCNE
Universidade Federal de Santa Maria



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA

À COMISSÃO DE BACHARELADO
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
UFRGS


Porto Alegre, 11 de dezembro de 2000.

PARECER

Na qualidade de Orientadora (com Co-orientação da Dra Cláudia Rohde e colaboração da Doutoranda Fabiana de Oliveira Herédia) e de Examinadora do Relatório de Bacharelado de **ADRIANA KOSLOVSKI SASSI**, intitulado: “**Contribuição ao estudo dos elementos transponíveis em populações de *Drosophila willistoni***”, tenho a declarar o que segue. Trata-se de um trabalho muito bem executado, que contribui bastante para o conhecimento dos elementos de transposição no genoma de populações da espécie neotropical *D. willistoni*, considerada modelo para estudos evolutivos. Dado o pouco tempo que teve para aprender as técnicas e os métodos de análise, para executar e para estudar o assunto, a Bacharelada conseguiu excelentes resultados. Com certeza, a Adriana tem maturidade e todas as condições pessoais e intelectuais para seguir seus estudos em nível de Mestrado. Embora a continuidade do trabalho mereça novos ajustes técnicos e novas abordagens, seus resultados são publicáveis na sua maior extensão.

Assim sendo, atribuo ao Relatório e à candidata o conceito máximo: A= Excelente.

Atenciosamente


Vera Lúcia S. Valente Gaiesky
N/Departamento de Genética, I. Biociências
UFRGS

Dra. Vera Lúcia S. Valente Gaiesky

Endereço: Rua... 15

Caixa Postal 10005 - 91501-970

PORTO ALEGRE - RS