

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIODIVERSIDADE
ANIMAL**

**CONTROLE EPIGENÉTICO DO ELEMENTO DE
TRANSPOSIÇÃO *mariner* EM POPULAÇÕES DE
*Drosophila melanogaster***

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Tailini Jordana Reinehr Stoffel

Santa Maria, RS, Brasil

2016

**CONTROLE EPIGENÉTICO DO ELEMENTO DE
TRANSPOSIÇÃO *mariner* EM POPULAÇÕES DE
*Drosophila melanogaster***

Tailini Jordana Reinehr Stoffel

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Animal, Área de Concentração em Sistemática e Biologia Evolutiva, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para a obtenção do grau de **Mestre em Biodiversidade Animal.**

Orientador: Élgion Lúcio da Silva Loreto

Santa Maria, RS, Brasil

2016

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Central da UFSM, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Reinehr Stoffel, Tailini Jordana
CONTROLE EPIGENÉTICO DO ELEMENTO DE TRANSPOSIÇÃO
mariner EM POPULAÇÕES DE *Drosophila melanogaster* /
Tailini Jordana Reinehr Stoffel.-2016.
40 p.; 30cm

Orientador: Élçion Lúcio da Silva Loreto
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Programa de
Pós-Graduação em Biodiversidade Animal, RS, 2016

1. Elemento transponível mariner 2. *Drosophila*
melanogaster white-peach 3. piRNA 4. Clusters de piRNAs
I. da Silva Loreto, Élçion Lúcio II. Título.

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências Naturais e Exatas
Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Animal**

**A Comissão Examinadora, abaixo assinada, aprova a Dissertação de
Mestrado.**

**CONTROLE EPIGENÉTICO DO ELEMENTO DE
TRANSPOSIÇÃO *mariner* EM POPULAÇÕES DE *Drosophila
melanogaster***

Elaborada por
Tailini Jordana Reinehr Stoffel

Como requisito parcial para a obtenção do grau de
Mestre em Biodiversidade Animal

COMISSÃO EXAMINADORA


Élton Lúcio da Silva Loreto, Dr.
(Presidente/Orientador)


Maríndia Deprá, Dr^a. (UFPeI)


Marícia Fantinel D'Ávila, Dr^a. (UFSM)

AGRADECIMENTOS

Agradeço, ao professor Élgion Lúcio da Silva Loreto pela oportunidade de poder entrar para esse grupo de pesquisa que é o LabDros e por me orientar.

Agradeço também, a tooda minha família, em especial a minha super mãe, Dulce, ao pai, Sidnei, a minha irmã, Thaís, a minha segunda mãe, a nona Olga, também a minha boadrasta, Cláudia e ao meu paidrasto, Jonis... Eu amo vocês infinitamente!!

Agradeço também a tooda família LabDros (muitos não estão mais por aqui mas está valendo!), a Val pelos primeiros contatos, a Lari, por dividir comigo seu ap (confesso que foram ótimos tempos), a Si, a Cami, a Fran, o Marcos, o Zé, o Mauro, o Ronaldo, o Geovani, a Raquel, o Nader, o Dani, a Mari, o Pedro, o Tiago, valeu mesmo por tudo, galera!! Se não fosse vocês eu não chegaria até aqui!! E também confesso que além da vontade de entrar para o LabDros, o que me deixou com mais vontade ainda de voltar para SM e ficar por aqui por um tempo foram vocês, me apaixonei de cara!!

Agradeço também a todos os meus amigos, irmãos, que sempre torceram por mim e estiveram do meu lado, alguns mais pertinho, em especial ao RRRafa, ao meu Hermano João Kanieski por tuudo, que de quebra ainda me trouxe dois pais maravilhosos Santamarienses, a Dona Cassilda e o Seu José, outros nem tão perto assim, Carila, Jana, Maira, Dani, Léo (que também me trouxe uma família Passofundense liinda, a mãe Elaine, o pai Valdir Laimer, além de uma irmã, a Ju)!

Enfim... Gratidão a todos aqueles que tornaram possível a realização deste trabalho!

De nada vale o brilho da inteligência, se o coração permanece às escuras!

- Bezerra de Menezes.

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Animal
Universidade Federal de Santa Maria

CONTROLE EPIGENÉTICO DO ELEMENTO DE TRANSPOSIÇÃO *mariner* EM POPULAÇÕES DE *Drosophila melanogaster*

AUTORA: TAILINI JORDANA REINEHR STOFFEL

ORIENTADOR: ÉLGION LÚCIO DA SILVA LORETO

Data e Local da Defesa: Santa Maria, 22 de janeiro de 2016.

Uma das famílias de transposons mais bem conhecidas é a família *mariner*. *mariner* não é encontrado em populações naturais de *Drosophila melanogaster*, entretanto, *mariner white-peach* e *Mos1* foram introduzidos nessa espécie por transformação genética. Na última década, avanços importantes foram feitos na compreensão sobre o controle epigenético dos elementos transponíveis. Os maiores reguladores de TEs em *Drosophila* são os piRNAs que são provenientes de clusters de piRNA. Esses podem reprimir os TEs tanto pelo silenciamento gênico pós transcricional, a partir da clivagem dos transcritos de um TE ativo, quanto pelo transcricional por meio do silenciamento dos genes por modificações na cromatina. Sendo assim, essa dissertação teve como objetivo verificar se ocorre a inativação epigenética do gene *white* em *D. melanogaster* mediado pela presença do elemento *mariner* na linhagem *white-peach*. Para avaliar a atividade do elemento *mariner* em populações naturais de *D. melanogaster* foram feitas isolinhagens. Para análise da inativação do gene *white* foram realizados testes fenotípicos por meio de cruzamentos experimentais. Também foi estabelecida uma linhagem de olho branco com gene *white* inativo mas com *mariner* ativo. A fim de verificar a expressão do gene *white* nas diferentes linhagens de *D. melanogaster* e para detectar a presença do elemento *mariner* no genoma das isolinhagens de *D. melanogaster*, foi realizada a quantificação por RT-qPCR. Buscas *in silico* por *mariner* em um banco de dados de piRNAs e na sequência do cluster de piRNA *flamenco* foram realizadas para verificar se existe um cluster de piRNA para *mariner* em *D. melanogaster*. *mariner* teve uma expressão muito alta nas populações de *D. melanogaster*. Além disso, os testes fenotípicos apontam para a inativação do gene *white* mediado pela presença de *mariner*, pela formação de heterocromatina, pois a F2 dos cruzamentos realizados apresentaram moscas com olho selvagem, *peach* até branco puro. Esses dados corroboram com os resultados encontrados por RT-qPCR. Não foi encontrada nenhuma sequência similar a *mariner* no banco de piRNA e nem na sequência de *flamenco*, entretanto, a existência de um cluster de piRNA ainda não pode ser excluída pois novos clusters podem ainda ser descobertos. O número de cópias de *mariner* foi bem variável entre os indivíduos da linhagem com *mariner* ativo e gene *white* inativo, variando de 3 a 15 cópias por indivíduo, o que já era esperado pelo fato de que essa linhagem foi estabelecida a pouco tempo.

Palavras chaves: Elemento transponível *mariner*. *Drosophila melanogaster white-peach*. piRNA. Clusters de piRNAs.

ABSTRACT

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Animal
Universidade Federal de Santa Maria

EPIGENETIC CONTROL OF THE TRANSPOSITION ELEMENT *mariner* IN *Drosophila melanogaster* POPULATIONS

AUTORA: TAILINI JORDANA REINEHR STOFFEL

ORIENTADOR: ÉLGION LÚCIO DA SILVA LORETO

Data e Local da Defesa: Santa Maria, 22 de janeiro de 2016.

One of transposons families most well-known is the *mariner* family. *mariner* is not found in natural populations of *Drosophila melanogaster*, however, *white-peach mariner* and *Mos1* were introduced in this species by genetic transformation. In the last decade, significant advances have been made in the understanding the epigenetic control of transposable elements. The major regulators in *Drosophila* TEs are piRNAs from piRNA clusters. These can suppress TEs either by post transcriptional gene silencing, from the cleavage of transcripts of an TE, as by transcriptional silencing of genes through changes in chromatin. Therefore, this dissertation aimed to investigate the existence of epigenetic *white* gene inactivation in *D. melanogaster* mediated by *mariner* element presence in the *white-peach* line. To assess the activity of the *mariner* element in natural populations of *D. melanogaster* were made isofemale strains. For analysis of gene inactivation of *white* phenotypic tests were performed by experimental crosses. One *white* eye strain with inactive *white* gene, but with active *mariner*, also been established. In order to verify the gene expression in different *white* lines of *D. melanogaster*, and to detect the presence of *mariner* element into the genome of *D. melanogaster*, isofemale strains were quantified by RT-qPCR. In silico searches for *mariner* in a piRNAs database and following the piRNA *flamenco* cluster were carried out to check if there is a cluster of piRNA for *mariner* in *D. melanogaster*. *mariner* had a very high expression in populations of *D. melanogaster* analyzed. Furthermore, phenotypic testing point to the *white*-mediated gene inactivation the presence of *mariner* through heterochromatin formation because the F2 breeding carried out showed flies with wild eye, *peach* until pure *white*. These data corroborate the results found by RT-qPCR. It found no similar sequence in the *mariner* piRNA database and *Flamenco* or in sequence, however, the existence of a cluster piRNA still can not be excluded as new clusters can still be discovered. The copy number *mariner* was very variable between the lineage of individuals with active and inactive *mariner white* gene, ranging from 3 to 15 copies per individual, which was expected by the fact that this line was established shortly.

Keywords: Transposable element *mariner*. *Drosophila melanogaster white-peach*. piRNA. Clusters of piRNA.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	8
1.1 Os Elementos Transponíveis	8
1.2 O Elemento Transponível <i>mariner</i>	10
1.3 <i>Drosophila melanogaster</i>	12
1.4 <i>Drosophila melanogaster</i> e <i>mariner</i>	13
1.5 Mecanismos reguladores dos elementos transponíveis	14
1.6 Os piRNAs	15
2 MATERIAL E MÉTODOS	18
2.1 Cruzamentos experimentais e testes fenotípicos	18
2.1.1 Análise da atividade de <i>mariner</i>	18
2.1.2 Análise da inativação do gene <i>white</i>	18
2.1.3 Linhagem com gene <i>white</i> inativo e <i>mariner</i> ativo	19
2.2 Preparação do RNA	20
2.2.1 PCR Quantitativo em Tempo Real – RT-qPCR para o gene <i>white</i> e para <i>mariner</i>	20
2.3 Preparação do DNA	21
2.3.1 qPCR para <i>mariner</i>	21
2.3 Análises <i>in silico</i>	22
3 RESULTADO E DISCUSSÕES	23
4 CONSIDERAÇÕES FINAIS	31
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	32

1.1 Os Elementos Transponíveis

Os elementos transponíveis (TEs) compreendem parte do genoma de praticamente todos os organismos (KAZAZIAN, 2011), constituindo aproximadamente 15% do genoma de *Drosophila melanogaster*, 47% do genoma humano e 60% do genoma do milho (BIÉMONT, 2010; KIDWELL; LISCH, 2001). Os TEs inicialmente foram caracterizados como parasitas genômicos ou DNA lixo. Atualmente são reconhecidos como importantes agentes do processo evolutivo, sendo fonte de variabilidade genética para “alimentar” a evolução além de participarem da reestruturação cromossômica, fonte de novos genes, doando regiões regulatórias ou codificantes, permitindo a formação de novas redes regulatórias, alterações epigenéticas por metilação e RNA interferente (iRNA) e também são apontados como agentes de regulação e estruturação cromatínica (BROWN; BACHTRONG, 2014; HUA-VAN *et al.*, 2011; KUNG *et al.*, 2013).

Os TEs podem ser classificados como classe I ou classe II, dependendo das suas características moleculares ou seu intermediário de transposição, que pode ser uma molécula de RNA ou DNA, respectivamente (CASTERET *et al.*, 2009).

Elementos da Classe I, ou retrotransposons, possuem um mecanismo de transposição conhecido como “copia e cola”, onde um intermediário de RNA é transcrito a partir de uma cópia dos TEs pré-existentes no genoma hospedeiro. Após, esse RNA é usado como molde para síntese de DNA pela enzima transcriptase reversa e esta cópia de DNA é inserida em outra região genômica pela enzima integrase (CASTERET *et al.*, 2009).

Os retrotransposons são subdivididos em cinco ordens baseados na sua organização, características do mecanismo de inserção e filogenia da transcriptase reversa: retrotransposons com LTRs, elementos DIRS-like, elementos Penelope-like, LINEs e SINEs. Com exceção dos SINEs, que constituem elementos não autônomos, as demais ordens contêm grupos de elementos autônomos (WICKER *et al.*, 2007). Os elementos autônomos codificam a transcriptase reversa e endonucleases essenciais para a sua transposição. Já retrotransposons não autônomos, como os SINEs, não possuem

genes para a transcriptase reversa e endonucleases e eles podem se mover por ativação cruzada de um elemento autônomo (KAZAZIAN, 2011).

Os elementos da Classe II são chamados de transposons e o mecanismo de transposição é conhecido como “corta e cola”. Nesta classe o intermediário de DNA pode ser retirado do seu sítio original e inserido em outra região do genoma pela enzima transposase, geralmente codificada pelo próprio elemento (WICKER *et al.*, 2007).

Com a descrição de novos TEs, alguns elementos com novas características no processo de mobilização foram descobertos e um novo sistema de classificação foi proposto por Wicker *et al.* (2007). Este sistema manteve as duas classes já descritas, porém adicionou novas classificações que seguem uma ordem hierárquica taxonômica:

- Subclasse: subdivide os elementos da Classe II (transposons) em:

- Subclasse I: aqueles que durante a mobilização cortam os dois filamentos de DNA, deixando um sítio doador no local para inserirem-se em outra região;
- Subclasse II: aqueles que apenas cortam um filamento de DNA, gerando cópias de si mesmo.

- Ordem: distingue entre os mecanismos de inserção, organização geral e enzimologia dos TEs.

- Superfamília: além de compartilhar a mesma estratégia de transposição dentro de uma ordem, é distinguida por apresentar características uniformes como estrutura de proteínas, domínios não codificantes, presença e tamanho de repetições de nucleotídeos geradas nas extremidades dos TEs quando são inseridos em outros locais dos genomas. Este sítio é chamado de sítio alvo de duplicação (TSD – *Target Site Duplication*).

- Família: é baseada na conservação de aminoácidos. A similaridade entre TEs que pertencem à mesma família em suas sequências codificadoras, domínios internos ou em regiões repetidas terminais deve ser de 80% ou mais.

- Subfamília: são definidas através de análises filogenéticas podendo distinguir em alguns casos entre populações muito homogêneas de elementos autônomos e não autônomos.

1.2 O Elemento Transponível *mariner*

A família *mariner*, também chamada de elementos *mariner-like* (MLEs) ou *ItmD34D*, é uma das famílias de Classe II mais bem conhecidas. O TE *mariner* pertence à ordem TIR (*Terminal Inverted Repeat*) e a superfamília *Tc1-Mariner* e é um TE muito difundido entre os metazoa (AUGÉ-GOUILLOU *et al.*, 1995; GARCIA-FERNÁNDEZ *et al.*, 1995; SINZELLE *et al.*, 2006).

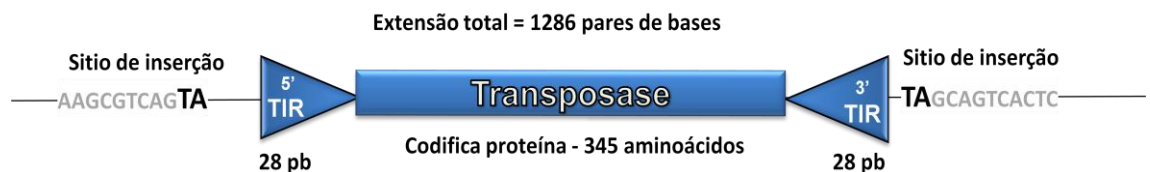


Figura 1. Estrutura molecular do elemento *mariner*

Os MLEs possuem aproximadamente 1,3 kb de comprimento e contêm repetições terminais invertidas (TIRs) de aproximadamente 28 pb (Figura 1). Eles possuem uma única ORF (*Open Reading Frame*) constituída por uma proteína com uma tríade de resíduos aspárticos DD34D. Devido a grande diversidade de MLEs, eles são classificados em muitas subfamílias. As maiores subfamílias incluem *mauritiana*, *cecropia*, *irritans*, *mellifera* e *capitata* (ROBERTSON; MacLEOD, 1993). Entretanto, outras subfamílias menores também existem com uma distribuição mais limitada (ROUAULT *et al.*, 2009). Algumas dessas subfamílias incluem elementos autônomos (por exemplo, a subfamília *mauritiana*, com o elemento *Mos1*) (MUNÕS-LOPES *et al.*, 2008).

Para verificar a distribuição dos MLEs e sua diversidade dentro do gênero *Drosophila*, Wallau *et al.* (2014), utilizaram 18 sequências de transposases, abrangendo oito das subfamílias de *mariner* mais conhecidas, em uma pesquisa TBLASTN contra os 20 genomas sequenciados de *Drosophila*. Foram identificadas 3685 cópias correspondentes a 36 diferentes linhagens de MLE que foram nomeadas como *Dromar1-Dromar36*. 26 dessas linhagens de MLE pertencem a quatro subfamílias conhecidas (*mauritiana*, *mellifera*, *irritans* e *vertumnana*). As outras dez linhagens restantes foram agrupadas em um clado que parece corresponder a uma nova subfamília, que foi chamada de *drosophila*. Além disso, os autores verificaram que o número de cópias foi bem elevado, com 1142 cópias independentes em 10 linhagens

diferentes. Sendo assim, a subfamília *drosophila* parece ser a subfamília mais bem sucedida em *Drosophila*, uma vez que a maioria das linhagens apresenta um baixo número de cópias para as demais subfamílias.

O primeiro elemento *mariner* e a primeira cópia ativa (*Mos1*) foram inicialmente descobertos no genoma de *Drosophila mauritiana* por causar uma mutação no gene *white* no cromossomo X, causando uma alteração fenotípica na cor dos olhos. Essa mutação é resultante da inserção de um elemento inativo de *mariner* (elemento *peach*) na região promotora do gene *white* gerando assim, indivíduos com olhos cor de pêssego no lugar da coloração selvagem normal, sendo denominados *white-peach* (JACOBSON *et al.*, 1986).

O elemento *mariner* que originou o mutante *white-peach*, pertence à subfamília *mauritiana* e produz uma transposase não funcional, ou seja, permanece estável no genoma (HARTL, 2001). Na presença de um elemento *mariner* autônomo, capaz de produzir uma transposase funcional, o elemento *mariner* não autônomo, causador da mutação *white-peach*, pode utilizar essa transposase e ser removido do gene *white*, causando uma reversão parcial da mutação à condição selvagem. Quando isto ocorre em células somáticas, ocorre um padrão mosaico de pigmentação nos olhos, ou seja, manchas de pigmentação vermelha em um contexto *white-peach* (LOHE; HARTL, 1996). Essa linhagem *white-peach* pode ser utilizada em cruzamentos com linhagens selvagens promovendo testes fenotípicos em que a atividade do elemento *mariner* pode ser avaliada (CAPY *et al.*, 1990).

Dentro do gênero *Drosophila*, os quatro grupos de espécies do subgênero *Sophophora* (*melanogaster*, *obscura*, *willistoni* e *saltans*) possuem elementos da subfamília *mauritiana* que estão relacionados aos elementos *Mos1*. Outras duas subfamílias de MLEs também foram encontradas no grupo *melanogaster*: *irritans* em *D. ananassae* (ROBERTSON; LAMPE, 1995) e *mellifera* em muitas espécies do subgrupo *melanogaster* (AUGÉ-GOUILLOU *et al.*, 1999). Dentro do subgênero *Drosophila*, somente os elementos *Mos1* da subfamília *mauritiana* foram examinados, e estes podem estar presentes em cinco espécies: duas do grupo *virilis*, uma do grupo *repleta* e duas do grupo *immigrans* (BIÉMONT; CIZERON, 1999). Algumas espécies de *Zaprionus* e *Scaptomyza* também apresentam elementos da subfamília *mauritiana* (BRUNET *et al.*, 1999; MARUYAMA; HARTL, 1991).

Wallau *et al.* (2011) investigaram a história evolutiva dos MLEs em 49 espécies de Drosophilidae Neotropicais e verificaram que vinte e três dessas espécies possuem MLEs em seus genomas, pertencentes a três diferentes subfamílias: dezoito espécies

possuem MLEs da subfamília *mellifera*; quinze espécies possuem MLEs da subfamília *mauritiana*; e três espécies possuem MLEs da subfamília *irritans*. Seus dados apontam também para uma co-existência de múltiplas subfamílias de *mariner* dentro do mesmo genoma e que este parece ser um padrão comum em Drosophilidae.

Esta ampla distribuição dos MLEs pode ser explicada, em parte, pela sua incrível habilidade de se mover entre os genomas, um fenômeno conhecido como Transferência Horizontal (HT) (LAHA *et al.*, 2007; MARUYAMA; HARTL, 1991; YOSHIYAMA *et al.*, 2001). Além disso, os elementos das subfamílias exibem distribuições desiguais e incongruência entre a filogenia dos TEs e a filogenia das suas espécies hospedeiras, reforçando que pode ter ocorrido o fenômeno de HT (WALLAU *et al.*, 2011).

1.3 *Drosophila melanogaster*

Drosophila melanogaster é uma espécie cosmopolita e amplamente distribuída nas regiões tropicais e temperada. Pertence a família Drosophilidae que possui mais de 4000 espécies divididas em 75 gêneros (BÄCHLI, 2008), sendo a família mais amplamente distribuída entre as mais de 150 que compõe a ordem Diptera (YEATES; WIEGMANN, 2005).

Dentro da família Drosophilidae, o gênero *Drosophila* contém 1.149 espécies, subdivididas em oito subgêneros. Destes, Sophophora se destaca pela diversidade e apresenta 332 espécies subdivididas em oito grupos (BÄCHLI, 2008). *D. melanogaster* faz parte do grupo e subgrupo *melanogaster* juntamente com mais nove espécies.

A espécie *D. melanogaster* foi descrita primeiramente por Johann Wihelm Meigen em 1830 e hoje é um dos organismos mais intensamente estudado na biologia, servindo como modelo para a investigação de muitos processos celulares e de desenvolvimento comum aos demais eucariotos, incluindo humanos (ADAMS *et al.*, 2000).

1.4 *Drosophila melanogaster* e *mariner*

Os elementos da família *mariner* ocorrem na maioria das espécies de *Drosophila* do subgrupo *melanogaster*, mas eles não foram encontrados em populações naturais de *Drosophila melanogaster* (JACOBSON *et al.*, 1986).

Comparações das sequências de *mariner* presentes em espécies mais estreitamente relacionadas com *D. melanogaster* (*D. simulans*, *D. mauritiana* e *D. sechellia*) e outros membros, de parentesco mais distante desse subgrupo (*D. yakuba* e *D. teissieri*) sugere que o *mariner* invadiu o genoma do ancestral antes da diversificação das espécies do subgrupo (MARUYAMA; HARTL, 1991). A invasão precoce implicaria na perda do elemento em linhagens principais de *D. melanogaster*, *D. erecta* e *D. orena*. Por outro lado, a ocorrência de sequências muito semelhantes à *mariner* em espécies muito distantes, do gênero *Zaprionus*, por exemplo, sugere transferência horizontal (GARZA *et al.*, 1991) de alguma espécie do grupo *melanogaster* para *Zaprionus*.

Os elementos *mariner white-peach* e *Mos1* foram introduzidos por transformação genética em *D. melanogaster* por Bryan *et al* (1990). Cruzamentos entre *D. melanogaster white-peach* e *Mos1* reconstituem o alto nível de mosaicismos somático observado em *D. mauritiana*, e estudos têm demonstrado que os mesmos são aproximadamente oito vezes mais ativos no genoma de *D. melanogaster* do que de *D. mauritiana* (GARZA *et al.*, 1991).

Vários fatores apontam fortes motivações para a introdução do elemento *mariner* no genoma de *D. melanogaster*. Primeiro, a presença do elemento em espécies estreitamente relacionadas sugere que ele pode ser ativo no genoma de *D. melanogaster*. Segundo, a capacidade de manipulação genética em *D. melanogaster* permite análises genéticas detalhadas do elemento *mariner* e os fatores dos hospedeiros que podem ser necessários para sua atividade. Terceiro, a ausência de *mariner* no genoma de populações naturais de *D. melanogaster* indica que os estudos genéticos podem ser realizados sem complicações devido a outros elementos *mariner* no genoma (GARZA *et al.*, 1991).

A partir do sistema *white-peach* a atividade do elemento *mariner* pode ser medida em diferentes linhagens de *D. melanogaster*, de acordo com a quantidade de indivíduos machos que apresentam olhos com fenótipo mosaico (Porcentagem de

Machos Mosaicos: PMM), isto é, com pontos de coloração selvagem em um contexto *white-peach* (CAPY *et al.*, 1990; JARDIM; LORETO, 2011).

1.5 Mecanismos reguladores dos Elementos Transponíveis

Mesmo considerados como importantes agentes do processo evolutivo, os TEs são uma das principais ameaças para a estabilidade do genoma, principalmente nas células da linhagem germinativa. Sua atividade descontrolada pode levar a quebras no DNA, causando uma parada no ciclo celular, recombinação ilegítima e rearranjos no genoma (KAZAZIAN, 2004). Além disso, podem também influenciar genes vizinhos por meio da alteração por *splicing* e padrões de poliadenilação, ou por funcionar como promotores ou *enhancers* (GIRARD; FREELING, 1999). Sendo assim, é fundamental a existência de mecanismos reguladores desses TEs.

Em populações naturais sua atividade bem como a quantidade de cópias pode variar de acordo com sua sequência e posição genômica (CAPY, 1992; MEDHORA *et al.*, 1991). Em espécies com TEs recém introduzidos em células germinativas, estes se transpõem sem impedimentos, extrapolando o número de cópias. Os danos causados nos cromossomos são tantos que os TEs são eliminados pela seleção natural. Eventualmente, um equilíbrio é alcançado onde o ganho de novos TEs é compensado por sua perda através da seleção natural (NAUMANN; REZNIKO, 2002).

Mecanismos de auto-regulação também já foram observados em *Mos1* e semelhantemente no elemento *Sleeping Beauty* da superfamília TC1-*mariner*, onde a produção da transposase ocorre em altos níveis e as interações pós traducionais entre as subunidades das transposases diminuem a atividade da enzima. Este fenômeno é conhecido como inibição da superprodução (HARTL *et al.*, 1997; IVICS *et al.*, 2004).

Na última década, avanços importantes foram feitos na compreensão sobre o controle epigenético dos elementos transponíveis, particularmente em relação aos pequenos RNAs (SAITO; SIOMI, 2010; SENTI; BRENNECKE, 2010; SIOMI *et al.*, 2011). Estes reduzem a transposição dos TEs, sem diminuir as cópias já existentes no genoma (OBBARD *et al.*, 2009).

Foram descritas três classes de pequenos RNAs capazes de causar silenciamento gênico em metazoários: os microRNAs (miRNAs), os pequenos RNAs interferentes (siRNAs) e os RNAs interagindo com as proteínas Piwi (piRNAs). Estes RNAs são

definidos pelo seu curto tamanho (~20 – 34 nucleotídeos) e por sua associação com membros da família de proteínas Argonautas (AGO), que guiam esses curtos RNAs aos seus alvos. As três classes diferem na sua biogênese, seus modos de regulação e nas vias biológicas envolvidas (GHILDIYAL; ZAMORE, 2009).

1.6 Os piRNAs

De acordo com estudos recentes, os maiores reguladores de TEs em *Drosophila* são os piRNAs (CHAMBEYRON *et al.*, 2008; PÉLISSON *et al.*, 2007; VAGIN *et al.*, 2006). Esses representam uma classe distinta de pequenos RNAs não codificantes que funcionam como repressores de TEs principalmente nas células germinativas, mas também em células somáticas.

A via piRNA possui uma “memória de invasões passadas” bem como uma capacidade de resposta aguda a transposons ativos (SIOMI *et al.*, 2011), reprimindo os TEs tanto pelo silenciamento gênico pós transcricional, por clivagem dos transcritos de um TE ativo, quanto transcricional por meio do silenciamento dos genes modificando a cromatina (KLENOV *et al.*, 2007). Os piRNAs são provenientes principalmente de discretos loci genômicos, chamados de clusters de piRNA (ROBINE *et al.* 2009).

Em células somáticas, o maior cluster de piRNA é o *flamenco*, capaz de controlar muitos TEs, como *Gypsy*, *Idefix* e *ZAM* (BRENNECKE *et al.*, 2007; MALONE *et al.*, 2009).

Diversos estudos sugerem que estes clusters de piRNA em *Drosophila* apresentam características de heterocromatina, com um enriquecimento de marcadores repressivos, como a histona 3 lisina 9 trimetilada (H3K9me3) e a proteína heterocromatina 1 (HP1). Esse ambiente heterocromático parece ser necessário para uma expressão adequada dos clusters e seu processamento em piRNAs (RANGAN *et al.*, 2011).

Rangan et al (2011) verificaram que a deficiência na histona metiltransferase *Eggless/SETDB1* leva a perda dos piRNAs. Além disso, um homólogo à HP1 de *Drosophila*, Rhino, também foi associado aos clusters de piRNA, e sua deficiência leva a perda de piRNAs específicos na linhagem germinativa (KLATTENHOFF *et al.*, 2009).

Esse homólogo de HP1, Rhino, é específico da linhagem germinativa e possivelmente é um leitor de H3K9me3 nos clusters de piRNA na cromatina, uma vez que abriga um cromodomínio conservado que reconhece resíduos de lisina metilados (KLATTENHOFF *et al.*, 2009). Para verificar a distribuição de Rhino na cromatina, Le Thomas et al (2014), realizaram uma Imunoprecipitação da Cromatina (ChIP) combinada com sequenciamento (ChIPseq) em ovários de *Drosophila* e verificaram que Rhino está presente em grandes quantidades em regiões com altos níveis de H3K9me3.

No núcleo, Rhino está presente juntamente com outra proteína, *Cutoff*, que também possui um papel importante, porém não bem definido na biogênese de piRNAs (PANE *et al.*, 2011).

Cutoff é homóloga às proteínas que participam no controle de qualidade do RNA e da terminação transcricional em leveduras e mamíferos (JIAO *et al.*, 2013; XUE *et al.*, 2000). Sua localização em um loci nuclear específico foi reportada como sendo dependente da proteína Rhino, sugerindo que ela pode ser recrutada à cromatina através de Rhino (PANE *et al.*, 2011). Le Thomas et al (2014), realizaram uma imunoprecipitação das proteínas Rhino e *Cutoff* nos ovários de *Drosophila* e confirmaram que elas formam um complexo.

Para identificar as características que discriminam as regiões geradoras de piRNA de outros loci genômicos, Le Thomas et al (2014), buscaram exemplos em que o mesmo locus atua na geração de piRNA em uma linhagem de *Drosophila* mas está inativo em outra. Duas linhagens de *Drosophila melanogaster*, T1 e BX2, contém um número idêntico de repetições em tandem do transgene *P-lacZ* inseridos no mesmo locus e em uma posição genômica que não dá origem a piRNAs em outras linhagens (DORER; HENIKOFF, 1997). Na linhagem T1, vários piRNAs foram gerados, e estes eram capazes de silenciar a expressão de um outro transgene *lacZ*. Ao contrário, nenhum piRNA foi gerado na linhagem BX2. Então, Le Thomas et al (2014) atribuíram essas capacidades diferenciais em produzir piRNAs ao estado da cromatina dos transgenes. Para testar isso, buscaram por marcadores H3K9me3 nas sequências dos transgenes nos ovários das moscas analisando ambas as linhagens por imunoprecipitação da cromatina e PCR quantitativo (ChIP-qPCR). Os marcadores H3K9me3 foram quatro vezes mais enriquecidos no transgene da linhagem T1 “ativa” quando comparada com a linhagem BX2 “inativa”. Esse resultado indica que a capacidade de um locus genômico para gerar piRNAs está correlacionado com a estrutura da cromatina do locus e, em particular, com níveis elevados de marcadores H3K9me3.

Entretanto, Le Thomas et al (2014) encontraram também, que o locus BX2, pode ser convertido em um locus ativo (BX2*) se exposto ao citoplasma herdado maternamente carregando os piRNAs homólogos do transgene *lacZ*. Essa conversão de BX2 para BX2* é acompanhada por um aumento nos marcadores de H3K9me3. Essa capacidade de T1 e de BX2* para gerar piRNAs é estável por muitas gerações se o locus foi herdado da mãe mas perde sua capacidade de gerar piRNAs após transmissão paterna, uma vez que essa reduz o nível de H3K9me3 aproximadamente duas vezes.

Juntos, os dados encontrados por Le Thomas et al (2014) demonstram que a capacidade de um locus transgênico para gerar piRNAs está correlacionado com um alto nível de H3K9me3. Reciprocamente, o alto nível de H3K9me3 no locus requer a presença de piRNAs herdados. Dois requisitos necessários são encontrados em ordem para que os piRNAs herdados regulem a produção de novos piRNAs na progênie por um mecanismo mediado pela cromatina. Os clusters de piRNA devem possuir um estado da cromatina que leva a produção de piRNAs, e os piRNAs precisam ser capazes de induzir o estabelecimento de tal estado da cromatina (STUWE *et al.*, 2014).

Observações iniciais em nosso laboratório apontam para um possível fenômeno de inativação epigenética do gene *white*, possivelmente por heterocromatização desse gene nas regiões contendo *mariner*. Sendo assim, essa dissertação teve como objetivo geral verificar se ocorre a inativação epigenética do gene *white* em *D. melanogaster* mediado pela presença do elemento *mariner* na linhagem *white-peach*. Além disso, buscamos verificar se existe um polimorfismo nas populações naturais de *Drosophila melanogaster* com relação à capacidade de inativar o gene *white*; verificar se o processo de inativação do gene *white* interfere na expressão do elemento *mariner*; verificar a expressão do gene *white* nas diferentes linhagens de *D. melanogaster* com o uso da técnica de PCR quantitativo em tempo real (RT-qPCR).

2.1 Cruzamentos experimentais e testes fenotípicos

2.1.1 Análise da atividade de *mariner*

Para avaliar a atividade do elemento *mariner* em *D. melanogaster* foram feitas isolinhagens. Estas isolinhagens foram estabelecidas a partir de cruzamentos com fêmeas *white-peach* Paris e machos das linhagens M13 ou M19 que possuem *mariner* ativo.

2.1.2 Análise da inativação do gene *white*

A análise da inativação do gene *white* foi quantificada através de testes fenotípicos onde foram realizados cruzamentos experimentais entre fêmeas da linhagem *D. melanogaster white-peach* Paris e machos de duas linhagens de populações naturais: Harwich e POA. A F2 desses cruzamentos foi analisada quanto à coloração do olho, que pode ser *peach* até chegar a branco puro (Figura 2). Para captar estas diferenças, foram criados padrões de classificação visual (de 1 – 4).

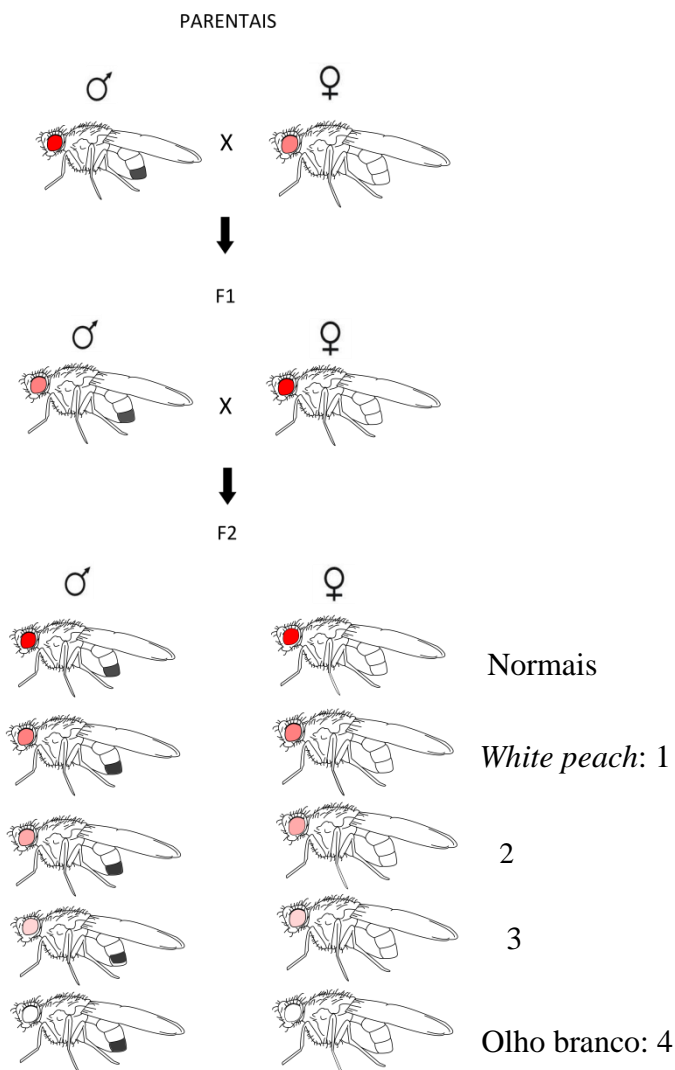


Figura 2. Diferentes padrões de coloração de olho obtidos na F2 com os padrões de classificação (1 – 4).

2.1.3 Linhagem com gene *white* inativo e *mariner* ativo

A partir do cruzamento de machos da linhagem M13 com fêmeas da linhagem *white peach* Paris foi-se estabelecida uma linhagem de olho branco (com gene *white* inativo) mas com *mariner* ativo.

2.2 Preparação do RNA

A extração do RNA foi realizada somente com machos das isolinhagens investigadas para excluir possíveis desvios nas réplicas biológicas.

Esta foi realizada com o emprego de TRIzol® (Invitrogen™ Life Technologies). As amostras foram tratadas com DNaseI (Promega) e a síntese de cDNA ocorreu utilizando-se a enzima M-MLV (Invitrogen).

Após, essas amostras foram quantificadas através do NanoDrop 3300 Spectrophotometer e foram analisadas em um gel de agarose 0,8% para verificar a qualidade da extração.

2.2.1 PCR Quantitativo em Tempo Real – RT-qPCR para o gene *white* e para *mariner*

Para verificar a expressão do gene *white* nas diferentes linhagens de *D. melanogaster*, foi realizada a quantificação por RT-qPCR. Os *primers* utilizados foram os seguintes: F_Primerwhite: 5' CAA ACG TTC TTG AGC AAA TG 3' e R_Primerwhite: 5' CCT GGC ACA ATA TGG ACA TC 3'. Estes foram desenhados na junção éxon-éxon do gene *white* e os fragmentos amplificados são de aproximadamente 139 pares de bases.

Para detectar a presença e para verificar a expressão de *mariner* no genoma das moscas com olho branco também foi realizada a quantificação por RT-qPCR. Os *primers* utilizados foram: Mos308F: 5' GTG AAC GGT GGT TTC AAC G 3' e Mos490 R: 5'AGC GAT TGG AAA CTG CTT GT 3', amplificando um fragmento de aproximadamente 180 pares de base.

As amplificações foram realizadas em um sistema *StepOnePlus* da *Applied Biosystems*, usando SYBR Green como corante fluorescente específico que detecta DNA dupla fita.

Para amplificação dos genes normalizadores foram usados os *primers* para o gene RPL: RPL17q2-1: 5' CCC TCC TTT TCG TTT TCG TT 3' e RPL17q2-2: 5' GTG TTG TCG GCA CAG TTC AT 3', com 345 pares de bases; e para o gene Actina: Act_F: 5' ATG CAG AAG GAG ATC ACC GC 3' e Act_R: 5' CTC GTC GTA CTC CTG CTT GG 3', com 156 pares de base.

As condições do RT-qPCR foram as seguintes: 95°C por 10 minutos, seguido por 40 ciclos nas temperaturas de 95°C por 30 segundos para desnaturação das fitas de DNA, 59°C por 15 segundos para anelamento dos *primers* e 72°C por 20 segundos para extensão das novas fitas de DNA, seguido da curva de desnaturação (95°C, 15 segundos; 60°C 1 minuto e 95°C, 15 segundos). A medida da fluorescência foi feita em cada ciclo a 72°C.

No mix de 10ul de reagentes foram adicionados, 10ul de RNA de cada isolinhagem a uma concentração de 0.3 ng. As concentrações finais dos demais reagentes são: *primers* 0.2 uM, 25mM de nucleotídeos, tampão PCR 1x, MgCl₂ 3 mM, SYBER Green 0.1x e Taq DNA *Platinum Polimerase* 0.25U.

Para a análise da expressão do gene *white* e de *mariner* foi realizado o método 2- $\Delta\Delta$ Ct (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001) usando os valores de Ct obtidos com o software *StepOne* v2.0.

2.3 Preparação do DNA

O DNA de dez moscas de olho branco com *mariner* ativo, mas com o gene *white* inativo, foi preparado de acordo com o protocolo de Oliveira et al (2009). O mesmo foi quantificado para verificar sua concentração no equipamento *NanoDrop 3300 Spectrophotometer*.

2.3.1 qPCR para *mariner*

Uma vez detectada a presença de *mariner* e verificada sua alta expressão nas moscas de olho branco com *mariner* ativo e gene *white* inativo, foi realizado um qPCR para fazer uma quantificação relativa do número de cópias do elemento *mariner* no genoma dessas linhagens com olho branco.

Os *primers* utilizados foram: Mos308F: 5' GTG AAC GGT GGT TTC AAC G 3' e Mos490 R: 5'AGC GAT TGG AAA CTG CTT GT 3', amplificando um fragmento de aproximadamente 180 pares de base.

As ampliações foram realizadas em um sistema *StepOnePlus* da *Applied Biosystems*, usando SYBR Green como corante fluorescente.

Como genes normalizadores foram usados os *primers* para o gene RPL: RPL17q2-1: 5' CCC TCC TTT TCG TTT TCG TT 3' e RPL17q2-2: 5' GTG TTG TCG GCA CAG TTC AT 3', que amplifica um fragmento de 345 pares de bases; além do gene para Actina: Act_F: 5' ATG CAG AAG GAG ATC ACC GC 3' e Act_R: 5' CTC GTC GTA CTC CTG CTT GG 3', amplificando um fragmento de 156 pares de base.

As condições do qPCR foram as seguintes: 95°C por 10 minutos, seguido por 40 ciclos nas temperaturas de 95°C por 30 segundos para desnaturação das fitas de DNA, 59°C por 15 segundos para anelamento dos *primers* e 72°C por 20 segundos para extensão das novas fitas de DNA, seguido da curva de desnaturação (95°C, 15 segundos; 60°C 1 minuto e 95°C, 15 segundos). A medida da fluorescência foi feita em cada ciclo a 72°C.

No mix de 10ul de reagentes foram adicionados, 10ul de DNA de cada mosca a uma concentração de 0.3 ng. As concentrações finais dos demais reagentes são: *primers* 0.2 uM, 25mM de nucleotídeos, tampão PCR 1x, MgCl₂ 3 mM, SYBER Green 0.1x e Taq DNA *Platinum Polimerase* 0.25U.

Para a quantificação relativa do número de cópias de *mariner* foi realizado o método 2- $\Delta\Delta C_t$ (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001) usando os valores de Ct obtidos com o software *StepOne* v2.0.

2.4 Análises *in silico*

Para verificar se existe um cluster de piRNA para *mariner*, em *D. melanogaster*, foi realizada uma busca por *mariner* em um banco de dados de piRNAs (<http://pirnabank.ibab.ac.in/map.html>). Além disso, fez-se uma busca pela sequência do transposon *mariner* na sequência do cluster de piRNA *flamenco* encontrada no FlyBase sob registro: FBgn0267704.

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

A atividade de *mariner* foi avaliada a partir de cruzamentos com fêmeas *white-peach* Paris e machos das linhagens M13 ou M19 que possuem *mariner* ativo. Sua expressão foi muito alta nessas populações (Figura 3), com um número de spots muito grande dificultando sua contagem. Devido a isso, não foi possível a realização dos métodos de quantificação de transposição usados para a linhagem de *D. simulans* de análise e classificação quanto à presença de manchas pigmentadas nos olhos (JARDIM; LORETO, 2011). Além disso, também não foi possível calcular a taxa de excisão somática do elemento *mariner* que é dada pela razão entre a quantidade de machos mosaicos obtidos e o total de machos da F1 que indicaria a taxa global de atividade de *mariner* para cada linhagem (RUSSELL; WOODRUFF, 1999).

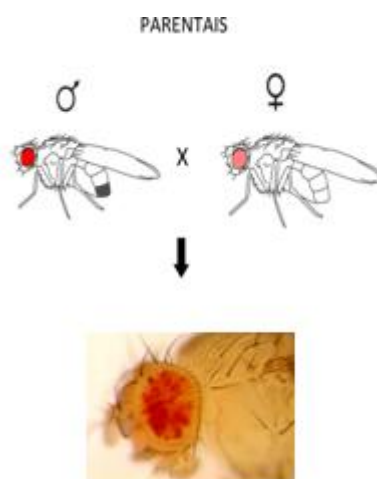


Figura 3. *Drosophila melanogaster* apresentando uma alta atividade de *mariner*.

Sabe-se que em espécies com TEs recém introduzidos os mesmos se transpõem sem impedimentos, extrapolando o número de cópias (NAUMANN; REZNIKO, 2002) podendo causar danos no genoma do hospedeiro, como quebras no DNA, rearranjos, (KAZAZIAN, 2004), além de poder causar danos aos genes vizinhos (GIRARD; FREELING, 1999).

Para combater estes efeitos prejudiciais dos TEs ativos, o genoma desenvolveu mecanismos de defesa epigenéticos para suprimir sua atividade (SLOTKIN; MARTIENSSSEN, 2007). Sendo assim, para verificar se ocorre a inativação do gene *white* possivelmente por algum mecanismo de defesa epigenético e para verificar se

existe um polimorfismo nas populações naturais de *Drosophila melanogaster* com relação à capacidade de inativar esse gene, foram realizados testes fenotípicos a partir de cruzamentos entre fêmeas da linhagem *D. melanogaster white-peach* Paris e machos de duas linhagens selvagens: HARWICH e POA (Tabelas 1 e 2).

Aparentemente, não houve uma diferença quanto a capacidade de inativação do gene *white* entre as duas linhagens HARWICH e POA. A F2 de ambos os cruzamentos foram analisadas quanto à coloração do olho, e em ambas foram encontradas moscas com olho selvagem, *peach*, até branco puro (figura 4). Para captar estas diferenças, foram criados padrões de classificação visual (de 1 – 4). Uma possível explicação para o que está ocorrendo com as moscas estudadas talvez seja a formação de heterocromatina no gene *white* desencadeada por um controle epigenético do transposon *mariner*.

Machos HARWICH x Fêmeas *Wpch* Paris:

A.

HARWICH x <i>Wpch</i> Paris			
F1	MACHOS (%)	FÊMEAS (%)	
NORMAIS	0	62	
<i>Wpch</i>	38	0	
TOTAL	38	62	100

Tabela 1. A. F1 dos cruzamentos experimentais entre a linhagem *D. melanogaster white-peach* Paris e a linhagem de população natural HARWICH.

B.

HARWICH x <i>Wpch</i> Paris			
F2	MACHOS (%)	FÊMEAS (%)	
NORMAIS	35	48	
<i>Wpch</i> (1)	4	7	
(2)	0,3	2	
(3)	0,3	1	
(4)	2	0,3	
TOTAL	41,6	58,3	100

Tabela 1. B. F2 dos cruzamentos experimentais entre a linhagem *D. melanogaster white-peach* Paris e a linhagem de população natural HARWICH.

Machos POA x Fêmeas *Wpch* Paris:

A.

POA x <i>Wpch</i> Paris:			
F1	MACHOS (%)	FÊMEAS (%)	
NORMAIS	0	74	
<i>Wpch</i>	26	0	
TOTAL	26	74	100

Tabela 2. A. F1 dos cruzamentos experimentais entre a linhagem *D. melanogaster white-peach* Paris e a linhagem de população natural POA.

B.

POA x <i>Wpch</i> Paris:		
F2	MACHOS (%)	FÊMEAS (%)
NORMAIS	41	39
<i>Wpch</i> (1)	4	2
(2)	4	3
(3)	0	4
(4)	3	0
TOTAL	52	48
		100

Tabela 2. B. F2 dos cruzamentos experimentais entre a linhagem *D. melanogaster white-peach* Paris e a linhagem de população natural POA.

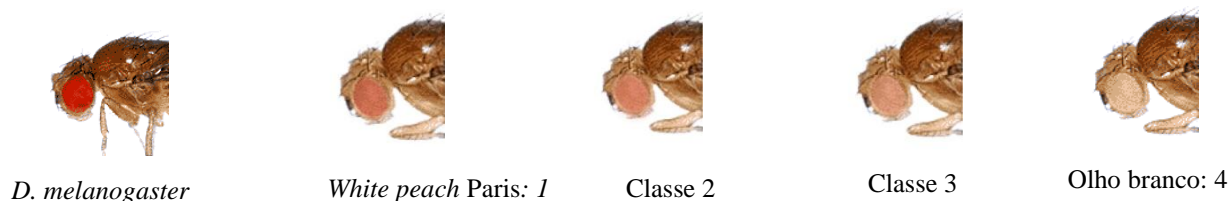


Figura 4. Diferentes padrões de coloração de olho obtidos na F2 com os respectivos padrões de classificação (1 – 4).

Além de testes fenotípicos foi realizada a quantificação por RT-qPCR para verificar a diferença de expressão do gene *white* nas linhagens de *D. melanogaster* selvagem HARWICH e na linhagem com olho branco (classe 4). Somente machos foram utilizados para a quantificação para se evitar os desvios que ocorriam nas réplicas biológicas.

Como pode ser observado na figura 5, a expressão do gene *white* variou entre as duas linhagens, com a linhagem de olho branco apresentando uma menor expressão em relação a linhagem selvagem HARWICH. Essas diferenças de expressão podem ser devido a inativação do gene *white* pela formação de heterocromatina em um possível controle epigenético do transposon *mariner*.

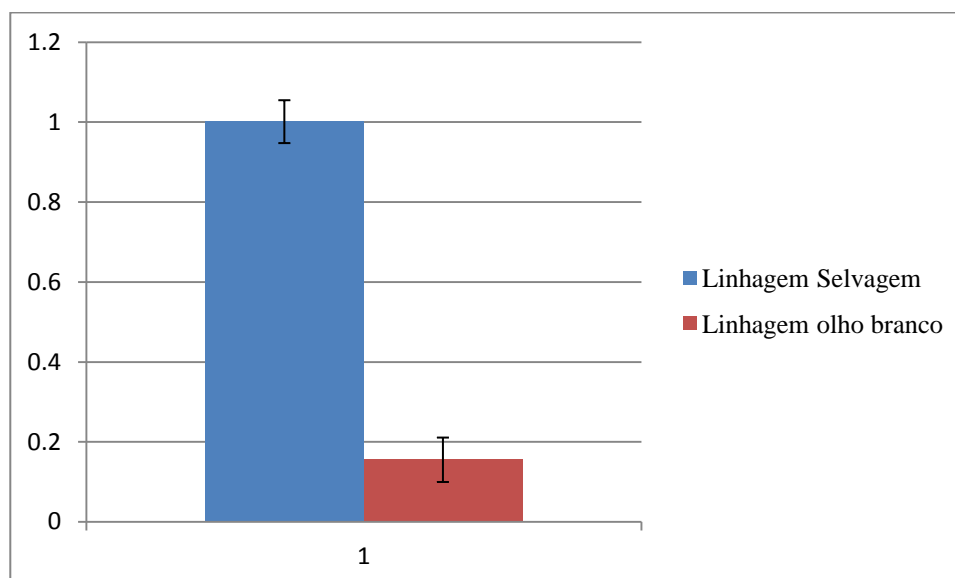


Figura 5. Análise de expressão do gene *white* por RT – qPCR mostrando uma menor expressão do gene na linhagem de olho branco (Média: 0,15523; Desvio padrão: 0,05556) em relação a linhagem selvagem HARWICH (Média: 1,00094; Desvio padrão: 0,05358).

Segundo Vagin *et al.* (2006), os maiores reguladores de TEs em *Drosophila* são os piRNAs. Estes são expressos exclusivamente nas gônadas dos animais e são muito diversos, sendo encontrados centenas de milhares de piRNAs únicos não mostrando qualquer estrutura ou sequências similares (BRENNECKE *et al.*, 2007).

Em *Drosophila melanogaster*, três proteínas Argonautas, proteínas Piwi, são ativas na via piRNA. Duas delas, a Aubergina (AUB) e a Argonauta 3 (AGO), são conhecidas por usar sua atividade endonucleolítica para destruir transcritos de transposons no citoplasma (BRENNECKE *et al.*, 2008; GUNAWARDANE *et al.*, 2007). Já a terceira, PIWI, é nuclear, mas os mecanismos moleculares da sua função no núcleo permanecem desconhecidos. Essas proteínas são transmitidas matematicamente e possuem uma função fundamental na via piRNA (Le THOMAS, 2015).

Para a biogênese destes piRNAs foram propostas duas vias distintas: a via de processamento primário e a via de processamento secundário, ou também conhecido como ciclo de amplificação ping-pong. Na via primária, longos precursores fita simples são clivados por uma endonuclease para gerar a extremidade 5' dos piRNAs maduros (HAASE *et al.*, 2010). Recentemente, uma combinação de dados genéticos, bioquímicos e estruturais, identificaram Zucchini como uma nuclease candidata (IPSARO *et al.*, 2012; NISHIMASU *et al.*, 2012). Após a clivagem, que gera a extremidade 5' dos piRNAs, esses são carregados em proteínas Piwi antes da sua extremidade 3' ser aparada por um fator ainda desconhecido que foi nomeado como

aparador (*trimmer*) (KAWAOKA *et al.*, 2011). Após os piRNAs serem aparados no seu tamanho final, a extremidade 3' do RNA é modificado em 2'-O- metil por Hen1, resultando em um piRNA maduro (SAITO *et al.*, 2007).

Já na via secundária, análises computacionais de piRNAs revelaram que as próprias proteínas Piwi podem servir como nucleases que geram a extremidade 5' de novos piRNAs, em um processo que foi nomeado como ciclo de amplificação Ping-pong (ARAVIN *et al.*, 2007; BRENNECKE *et al.*, 2007). Nesse, a AUB que carrega os piRNAs reconhecem transcritos complementares (derivados de TEs ativos ou da fita oposta do cluster de piRNA) e cliva a extremidade 5' do piRNA original, dando origem a extremidade 5' de um novo piRNA, que é então incorporado em AGO3. AGO3 associado com piRNAs podem reconhecer transcritos complementares e clivar eles, resultando na geração de novos piRNAs idênticos a sequência de piRNAs que iniciaram o ciclo (ARAVIN *et al.*, 2007; BRENNECKE *et al.*, 2007).

Quando um TE já invadiu o genoma de uma espécie, os piRNAs homólogos ao TE interagem com seus transcritos e induzem sua degradação. Por outro lado, quando um TE foi introduzido em uma espécie que normalmente é desprovido dele, a falta de piRNAs específicos, necessários para a repressão dos TEs, causam a incapacidade de inibi-los. Por exemplo, quando o elemento Penelope de *D. virilis* é introduzido no genoma da espécie distante *D. melanogaster*, os piRNAs gerados são incapazes de reprimir sua transposição (ROZHKOV *et al.*, 2010). Em muitos casos de disgenesia híbrida, a ativação da transposição tem sido atribuída a falta de piRNAs maternos contra os TEs, levando a falta de silenciamento em TEs específicos nas células germinativas da progênie (BRENNECKE *et al.*, 2007, 2008; CHAMBEYRON *et al.*, 2008).

Cada TE tem um cluster de piRNA próprio capaz de silenciar o mesmo, por exemplo, o sítio subtelomérico 1A, localizado no cromossomo X (lócus X-TAS) contém muitas inserções do elemento P e correspondem a um cluster de piRNA que leva ao silenciamento do elemento P na linhagem germinativa. O sítio 42AB representa a maior fonte de piRNAs direcionado a uma variedade de TEs (BRENNECKE *et al.*, 2008), incluindo o elemento I envolvido nos processos de disgenesia híbrida associado com a mobilização de I nas células germinativas. Todos esses loci heterocromáticos geram diferentes piRNAs que correspondem a repetições de transposons alvo dispersos ao longo do genoma de *Drosophila*.

Análises realizadas em *D. melanogaster* revelam que mutações nos genes envolvidos com a via piRNA causam anomalias no desenvolvimento da linhagem germinativa devido ao aumento de TEs (GONZÁLEZ-REYES *et al.*, 1997; LI *et al.*,

2009). Sendo assim, a maquinaria piRNA pode ser considerada como guardiã da estabilidade genômica (SENTI; BRENNECKE, 2010). Além disso, seus efetores mostram estar envolvidos em muitos outros processos biológicos, tais como *splicing* e reparo do DNA (MEISTER, 2013).

Para verificar se existe um cluster de piRNA para *mariner*, uma vez que pode haver um controle epigenético do mesmo em *D. melanogaster*, realizou-se uma busca por *mariner* em um banco de dados de piRNAs de *D. melanogaster* (<http://pirnabank.ibab.ac.in/map.html>), entretanto a mesma não foi encontrada. Além disso, fez-se uma busca *in silico* pela sequência do transposon *mariner* na sequência de *flamenco* encontrada no FlyBase (FBgn0267704), onde também não foi encontrada. Desta forma, não fomos capazes de identificar sequências relacionadas ao elemento *mariner* nos clusters de piRNA já descritos no genoma de *D. melanogaster*. Entretanto, a existência de um cluster de piRNA não pode ser excluída pelo fato de que novos clusters podem ainda serem descobertos.

A partir do cruzamento de machos da linhagem M13, que possui *mariner* ativo com fêmeas da linhagem *white peach* Paris foi-se estabelecida uma linhagem de olho branco (com gene *white* inativo) mas com *mariner* ativo.

Para detectar a presença e para verificar a expressão do elemento *mariner* no genoma dessas linhagens de olho branco com *mariner* ativo também foi realizada uma quantificação por RT-qPCR.

Após detectada a presença de *mariner* e confirmada sua alta expressão, realizou-se uma quantificação relativa do número de cópias do elemento *mariner* no genoma dessas linhagens por qPCR. O número de cópias de *mariner* variou entre os indivíduos da linhagem, com indivíduos apresentando de 3 até 15 cópias (figura 6), o que já era esperado, uma vez que essa linhagem foi estabelecida há pouco tempo.

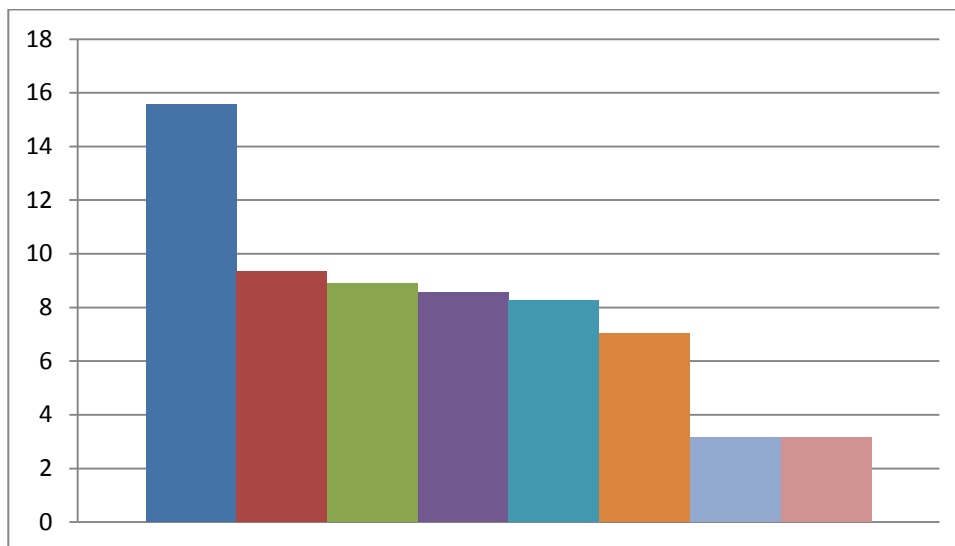


Figura 6. Quantificação relativa do número de cópias de *mariner* na linhagem olho branco com *mariner* ativo. Número de cópias variando entre os indivíduos, de 3 – 15 cópias por indivíduo. Foram analisados dez indivíduos para fazer essa quantificação.

A capacidade de invasão de um TE, depende de vários fatores. A taxa de transposição inicial, logo após a invasão de um TE no genoma, é alta e então diminui. Essa invasão inicial pode representar um desafio para o TE, que deve desenvolver capacidades específicas, tais como uma taxa de transposição muito alta no seu novo ambiente genômico (ROUZIC; CAPY, 2005).

Se a taxa de transposição é baixa, uma invasão bem sucedida é rara e, quando acontece, o número de cópias por indivíduo aumenta muito lentamente. Quando a taxa de transposição é muito alta, alguns indivíduos rapidamente adquirem várias dezenas de elementos, mas são estéreis devido à instabilidade genômica e como eles não se reproduzem, os TEs tendem a desaparecer. Conseqüentemente, uma taxa de transposição ótima deve existir, onde a taxa de transposição deve ser alta o suficiente para permitir que um indivíduo heterozigoto transmita esse elemento para a maioria dos seus descendentes, mas não muito alta que possa causar esterilidade em seus hospedeiros. Além disso, a capacidade de invasão pode ser menos efetiva quando sua inserção é deletéria para o genoma hospedeiro, não importando qual seja sua taxa de transposição (ROUZIC; CAPY, 2005).

Entretanto, sabe-se que alguns fatores bióticos e abióticos induzem altas taxas de mobilização (HUA-VAN *et al.*, 2011). Entre os fatores bióticos, estão alguns genes do desenvolvimento (DING; LIPSHITZ, 1994). Já entre os fatores abióticos capazes de ativar a mobilização de TEs, estão principalmente aqueles fatores capazes de promover

o estresse celular (CAPY *et al.*, 2000), como o calor (COATES, 2000; LOHE; HARTL, 1996), o estresse oxidativo (GUIO *et al.*, 2014) e radiação (LEE *et al.*, 2012).

Com relação ao elemento *mariner*, nosso grupo recentemente demonstrou que a transposição somática em *D. simulans* é ativada pelo calor, através do aumento da transcrição do gene da transposase do elemento, enquanto que a radiação UV não ativa este TE (JARDIM *et al.*, 2015).

Talvez a chave para explicar muitos destes casos de transposição espontânea e mobilização de TEs ligados ao estresse esteja nas alterações nos mecanismos pelos quais a via piRNA atua, uma vez que esses piRNAs estão envolvidos em um poderoso mecanismo de controle de TEs em *Drosophila* (GUERREIRO, 2012).

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Dados fenotípicos apontam para um controle epigenético do TE *mariner* pela inativação do gene *white* na linhagem *white-peach* Paris através da formação de heterocromatina devido ao padrão de coloração de olho encontrado na F2 dos cruzamentos realizados. Ainda, os dados de RT-qPCR corroboram com isso, uma vez que a expressão do gene *white* variou entre as duas linhagens analisadas, onde a linhagem de *D. melanogaster* de olho branco apresentou uma menor expressão em relação a linhagem selvagem HARWICH. Entretanto, para se confirmar se a cromatina realmente está em um ambiente reprimido, pode ser realizada a técnica de ChIP-qPCR ou ChIP-seq.

Além disso, para se confirmar que o que está controlando o TE *mariner* são realmente os piRNA, uma vez que sua sequência não foi encontrada nos clusters de piRNA e nem em *flamenco*, podem ser feitos cruzamentos experimentais com mutantes Piwi além de uma análise molecular buscando por piRNAs no genoma.

REFERÊNCIAS

- ADAMS, M. D. et al. The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. **Science**, v. 287, p. 2185 – 2195. 2000.
- ARAVIN, A.; HANNON, G.; BRENNECKE, J. The Piwi-piRNA pathway provides an adaptive defense in the transposon arms race. **Science**, v. 318, p. 761-764. 2007.
- AUGÉ-GOUILLOU, et al. Human and other mammalian genomes contain transposons of the *mariner* family. **FEBS Letters**, v. 368, p. 541–546. 1995.
- AUGÉ-GOUILLOU, C. et al. *Mariner-like* sequences are present in the genome of the fruitfly, *Drosophila melanogaster*. **J Evol Biol**, v. 12, p. 742–745. 1999.
- BÄCHLI, G. (2008) Taxodros: The database on taxonomy of Drosophilidae, v1, 03. Database 2008/01. Disponível em < <http://www.taxodros.uzh.ch/>>. Acesso em: 08 junho 2014.
- BIÉMONT, C.; CIZERON, G. Distribution of transposable elements in *Drosophila* species. **Genetica**, v. 105, p. 43–62. 1999.
- BIÉMONT, C. A Brief History of the Status of Transposable Elements: From Junk DNA to Major Players in Evolution. **Genetics**, v. 186, p. 1085–1093. 2010.
- BRENNECKE, J. et al. Discrete small RNA-generating loci as master regulators of transposon activity in *Drosophila*. **Cell**, v. 128, p. 1089-1103. 2007.
- BRENNECKE J., et al. A epigenetic role for maternally inherited piRNAs in transposon silencing. **Science**, v. 322, p. 1387–1392. 2008.
- BROWN, E.J.; BACHTROG D. The chromatin landscape of *Drosophila*: comparisons between species, sexes, and chromosomes. **Genome Res**. v. 24, p. 1125-1137. 2014.
- BRUNET, F. et al. Phylogenetic analysis of *Mos1-like* transposable elements in the Drosophilidae. **J Mol Evol**, v. 49, p. 760–768. 1999.
- BRYAN, G. J.; GARZA, D.; HARTL, D. L. Insertion and excision of the transposable element *mariner* in *Drosophila*. **Genetics**, v. 125, p. 103-114. 1990.

CAPY, P. Sequence analysis of active *mariner* elements in natural populations of *Drosophila simulans*. **Genetics**, v. 150, p. 499-506. 1992.

CAPY, P. et al. Active *mariner* transposable elements are widespread in natural populations of *Drosophila simulans*. **Proc. R. Soc. Lond. B.**, v. 242, p. 57-60. 1990.

CAPY, P. et al. Stress and transposable elements: coevolution or useful parasites? **Heredity**, v. 85, p. 101-106. 2000.

CASTERET S. et al. Physical properties of DNA components affecting the transposition efficiency of the *mariner Mos1* element. **Molecular Genetics Genomics**, v. 282, p. 531–546. 2009.

CHAMBEYRON, S., et al. piRNA-mediated nuclear accumulation of retrotransposons transcripts in the *Drosophila* female germline. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.** v. 105, p. 14964–14969. 2008.

COATES, C. J. Purified *mariner* (*Mos1*) transposase catalyzes the integration of marked elements into the germ-line of the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 30, p. 1003–1008. 2000.

DING, D.; LIPSHITZ, H.D. Spatially regulated expression of retrovirus-like transposons during *Drosophila melanogaster* embryogenesis. **Genet. Res.**, v. 64, p. 167–181. 1994.

DORER, D.R.; HENIKOFF, S. Transgene repeat arrays interact with distant heterochromatin and cause silencing *in cis* and *trans*. **Genetics**, v. 147, p. 1181–1190. 1997.

GARCIA-FERNÁNDEZ J., et al. High copy number of highly similar *mariner*-like transposons in planarian (Platyhelminthe): evidence for a trans-phylo horizontal transfer. **Mol Biol Evol**, v. 12, p. 421–431. 1995.

GARZA et al. Introduction of the Transposable Element *mariner* into the Germline of *Drosophila melanogaster*. **Genetics**, v. 128, p. 303-310. 1991.

GHILDIYAL, M.; ZAMORE, P. Small silencing RNAs: an expanding universe. **Genetics**, v. 10, p. 94-108. 2009.

GIRARD, L.; FREELING, M. Regulatory changes as a consequence of transposon insertion. **Dev. Genet.** v. 25, p. 291–296. 1999.

GONZÁLEZ-REYES, A.; ELLIOTT, H.; JOHNSTON, D. Oocyte determination and the origin of polarity in *Drosophila*: the role of the spindle genes. **Development**. v. 124, p. 4927–4937. 1997.

GUERREIRO, M. P. What makes transposable elements move in the *Drosophila* genome? **Heredity**, v. 108, p. 461–468. 2012.

GUIO, L.; et al. The transposable element *Bari-Jeh* mediates oxidative stress response in *Drosophila*. **Mol Ecol**, v. 23, p. 2020-30. 2014.

GUNAWARDANE, L. et al. A slicer-mediated mechanism for repeat-associated siRNA 5' end formation in *Drosophila*. **Science**, v. 315, p. 1587-1590. 2007.

HAASE, A. et al. Probing the initiation and effector phases of the somatic piRNA pathway in *Drosophila*. **Genes & development**, v. 24, p. 2499-2504. 2010.

HARTL, D. L. Discovery of the Transposable Element Mariner. **Genetics**. v.157, p. 471–476. 2001.

HARTL, D. L., et al. Modern Thoughts on an Ancyent *Mariner*: Function, Evolution, Regulation. **Annu. Rev. Genet.** v. 31, p. 337–58. 1997.

HUA-VAN, et al.. The struggle for life of the 12 genome's selfish architects. **Biol Direct**. v. 6, p. 19. 2011.

IPSARO, J., et al. The structural biochemistry of Zucchini implicates it as a nuclease in piRNA biogenesis. **Nature**, v. 491, p. 279-283. 2012.

IVICS, Z., et al. The Sleeping Beauty Transposable Element: Evolution, Regulation and Genetic Applications. **Curr. Issues Mol. Biol.** v. 6, p. 43-56. 2004.

JACOBSON, J.W., et al. Molecular structure of a somatically unstable transposable element in *Drosophila*. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.** v. 83, p. 8684-8688. 1986.

JARDIM, S.S.; LORETO, E.L.S. Comparative methodologies for estimating *mariner* activity using *white-peach* assay in *Drosophila simulans*. **Dros. Inf. Serv.** v. 94, p. 129-132. 2011.

JARDIM, S. S. et al. Effects of heat and UV radiation on the mobilization of transposon *mariner-Mos1*. **Cell Stress and Chaperones**, v. 20, p. 843–851. 2015.

JIAO, X. et al. A mammalian pre-mRNA 5' end capping quality control mechanism and an unexpected link of capping to pre-mRNA processing. **Mol Cell**, v. 50, p. 104–115. 2013.

KAZAZIAN, H. H. Mobile Elements: Drivers of Genome Evolution. **Science**. v. 303, p. 1626-1632. 2004.

KAZAZIAN H. H. Mobile DNA transposition in somatic cells. **Journal of Biology**, v. 9, p. 62. 2011.

KAWAOKA, S., et al. 3' end formation of PIWI-interacting RNAs in vitro. **Mol Cell**, v. 43, p. 1015-1022. 2011.

KIDWELL M. G.; LISCH D. R. Perspective: transposable elements, parasitic DNA and genome evolution. **Evolution**, v. 55, p. 1–24. 2001.

KLATTENHOFF, C. et al. The *Drosophila* HP1 homolog Rhino is required for transposon silencing and piRNA production by dual-strand clusters. **Cell**, v. 138, p. 1137–1149. 2009.

KLENOV M. S., et al. Repeat-associated siRNAs cause chromatin silencing of retrotransposons in the *Drosophila melanogaster* germline. **Nucleic Acids Res**, v. 35, p. 5430–5438. 2007.

KUNG, et al. Long Noncoding RNAs: Past, Present, and Future. **Genetics**, v. 193, p. 651–669. 2013.

LAHA, T. et al. The bandit, a new DNA Transposon from a hookworm—possible horizontal genetic transfer between host and parasite. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 1, p. 35. 2007.

LEE, J. R. et al. Radiation-induced human endogenous retrovirus (HERV)-R env gene expression by epigenetic control. **Radiat Res**, v. 178, p. 379-84. 2012.

Le THOMAS, A. L. **Piwi function and piRNA cluster regulation: *Drosophila melanogaster***. 2015. 104 f. Tese (Doutorado em Biologia) - Université Pierre et Marie Curie California Institute of Technology, 2015.

Le THOMAS et al. Transgenerationally inherited piRNAs trigger piRNA biogenesis by changing the chromatin of piRNA clusters and inducing precursor processing. **Genes & Development**, v. 28, p. 1667–1680. 2014.

LI, C.; et al. Collapse of germline piRNAs in the absence of Argonaute3 reveals somatic piRNAs in flies. **Cell**. v. 137, p. 509–521. 2009. 36

LIVAK, K.J.; SCHMITTGEN, T.D. Analysis of relative gene expression data using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. **Methods**. v. 25 p. 402–408. 2001.

LOHE, A. R.; HARTL., D. L. Autoregulation of mariner transposase activity by overproduction and dominant-negative complementation. **Mol. Biol. Evol.**, v. 13, p. 549-555. 1996.

MALONE, C. D., et al. Specialized piRNA pathways act in germline and somatic tissues of the *Drosophila* ovary. **Cell**, v. 137, p. 522 – 535. 2009.

MARUYAMA, K.; HARTL, D. L. Evolution of the transposable element *mariner* in *Drosophila* species. **Genetics**, v. 128, p. 319-329. 1991.

MARUYAMA, K.; HARTL, D. L. Evidence for inter-specific transfer of the transposable element *mariner* between *Drosophila* and *Zaprionus*. **J Mol Evol**, v. 33, p. 514–524. 1991.

MEDHORA, M., et al. Molecular and Functional Analysis of the *mariner* Mutator Element *Mosl* in *Drosophila*. **Gen. Soci. Am.**. v. 128, p. 311-318. 1991.

MEISTER, G. Argonaute proteins: functional insights and emerging roles. **Nat. Rev. Genet.** v. 14, p. 447–459. 2013.

MUNÕS-LOPES, M. et al. Transposition of *Mboumar-9*: identification of a new naturally active *mariner*-family transposon. **J Mol Biol**, v. 382, p. 567–572. 2008.

NAUMANN, T. A.; REZNIKO, V. W. S. *Tn5* Transposase with an altered specificity for transposon ends. **J Bact.** v. 184, p. 233–240. 2002.

NISHIMASU, H. et al. Structure and function of Zucchini endoribonuclease in piRNA biogenesis. **Nature**, v. 491, p. 284-287. 2012.

OBBARD, D. J., et al. The evolution of RNAi as a defence against viruses and transposable elements. **Phil. Trans. R. Soc. B.** v. 364, p. 99–115. 2009.

OLIVEIRA, L.F.V.; WALLAU, G.L.; LORETO, E.L.S. Isolation of high quality DNA: 37 a protocol combining “rennet” and glass milk. **Electronic Journal of Biotechnology**. v. 12, p. 1 – 6. 2009.

PANE, A. et al The *Cutoff* protein regulates piRNA cluster expression and piRNA production in the *Drosophila* germline. **EMBO J**, v. 30, p. 4601–4615. 2011.

PÉLISSON, A., et al. A novel repeat-associated small interfering RNA-mediated silencing pathway downregulates complementary sense gypsy transcripts in somatic cells of the *Drosophila* ovary. **J. Virol.** v. 81, p. 1951–1960. 2007.

RANGAN, P. et al. piRNA production requires heterochromatin formation in *Drosophila*. **Curr Biol**, v. 21, p. 1373–1379. 2011.

ROBERTSON, H. M.; LAMPE, D. J. Recent horizontal transfer of a *mariner* transposable element among and between Diptera and Neuroptera. **Mol Biol Evol**, v. 12, p. 850–862. 1995.

ROBERTSON, H. M.; MacLEOD, E. G. Five major subfamilies of *mariner* transposable elements in insects, including the Mediterranean fruit fly, and related arthropods. **Insect Mol Biol**, v. 2, p. 125–139. 1993.

ROBINE, N. et al. A broadly conserved pathway generates 3'UTR-directed primary piRNAs. **Current biology**, v. 19, p. 2066-2076. 2009.

ROUAULT, J. et al. Automatic classification within families of transposable elements: application to the *mariner* family. **Gene**, v. 448, p. 227–232. 2009.

ROUZIC; CAPY. The First Steps of Transposable Elements Invasion: Parasitic Strategy vs. Genetic Drift. **Genetics**, v. 169, p. 1033–1043. 2005.

ROZHKOV, N. V. et al. The RNA interference system differently responds to the same mobile element in distant *Drosophila* species. **Dokl Biochem Biophys**, v. 431, p.79–81. 2010.

RUSSELL, A. L.; WOODRUFF, R. C. The genetics and evolution of the *mariner* transposable element in *Drosophila simulans*: worldwide distribution and experimental population dynamics. **Genetics**, v. 105, p. 149-164. 1999.

SAITO, K.; SIOMI, M. C.. Small RNA-mediated quiescence of transposable elements in animals. **Dev. Cell**. v. 19, p. 687–697. 2010.

SAITO, K. et al. Pimet, the *Drosophila* homolog of HEN1, mediates 2'-O-methylation of Piwi-interacting RNAs at their 3' ends. **Genes & development**, v. 21, p. 1603-1608. 2007.

SENTI, K. A.; BRENNECKE, J. The piRNA pathway: a fly's perspective on the guardian of the genome. **Trends Genet.** v. 26, p. 499–509. 2010.

SINZELLE, L. et al. The *mariner* transposons belonging to the irritans subfamily were maintained in chordate genomes by vertical transmission. **J Mol Evol**, v. 62, p. 53–65. 2006.

SIOMI, M. C., et al. PIWI-interacting small RNAs: the vanguard of genome defence. **Nat. Rev. Mol. Cell Biol.** v. 12, p. 246–258. 2011.

SLOTKIN, R. K.; MARTIENSSEN R. Transposable elements and the epigenetic regulation of the genome. **Nature**, v. 8, p. 272 – 285. 2007.

STUWE et al. Small but sturdy: small RNAs in cellular memory and epigenetics. **Genes & Development**, v. 28, p. 423–431. 2014.

VAGIN, V.V., et al. A distinct small RNA pathway silences selfish genetic elements in the germline. **Science**. v. 313, p. 320–324. 2006.

XUE, Y. et al. *Saccharomyces cerevisiae* RAI1 (YGL246c) is homologous to human DOM3Z and encodes a protein that binds the nuclear exoribonuclease Rat1p. **Mol Cell Biol**, v. 20, p. 4006–4015. 2000.

WALLAU et al. The evolutionary history of mariner-like elements in Neotropical drosophilids. **Genetica**, v. 139, p. 327–338. 2011

WALLAU et al. Genomic landscape and evolutionary dynamics of *mariner* transposable elements within the *Drosophila* genus. **BMC Genomics**, v. 15, p. 727. 2014

WICKER, T., et al. A unified classification system for eukaryotic transposable elements. **Nat. Rev. Gen.** v. 8, p. 973-982. 2007.

YEATES, D. K.; WIEGMANN, B. M. Phylogeny and Evolution of Diptera: Recent insights and new perspectives. In: Yeates, D.K.; Wiegmann, B. M. (eds) The evolutionary biology of flies. Columbia University Press, New York. pp. 14-44. 2005.

YOSHIYAMA, M. et al. Possible horizontal transfer of a transposable element from host to parasitoid. **Mol Biol Evol**, v. 18, p. 1952–1958. 2001.