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

Sinara Santos Jardim

DINÂMICA DO ELEMENTO DE TRANSPOSIÇÃO *mariner* SOB CONDIÇÕES DE ESTRESSE EM *Drosophila simulans*

Santa Maria, RS,
2016

Sinara Santos Jardim

DINÂMICA DO ELEMENTO DE TRANSPOSIÇÃO *mariner* SOB CONDIÇÕES DE ESTRESSE EM *Drosophila simulans*

Tese apresentada ao Curso de Doutorado 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 obtenção do grau de **Doutora em Biodiversidade Animal.**

Orientador: Dr. Élgion Lúcio Silva Loreto

Santa Maria, RS,
2016

Sinara Santos Jardim

DINÂMICA DO ELEMENTO DE TRANSPOSIÇÃO *mariner* SOB CONDIÇÕES DE ESTRESSE EM *Drosophila simulans*

Tese apresentada ao Curso de Doutorado 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 obtenção do grau de **Doutora em Biodiversidade Animal.**

Aprovada em 28 de março de 2016:

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

Fabiana de Oliveira Herédia, Drª (CEDOC)
(Examinadora)

Lizandra Jaqueline Robe, Drª (FURG)
(Examinadora)

Marícia Fantinel D'Ávila, Drª (UFSM)
(Examinadora)

Vera Lúcia da Silva Valente Gaiesky, Drª (UFRGS)
(Examinadora)

Santa Maria, RS 2016.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos que amo incondicionalmente,

minha família e amigos.

AGRADECIMENTOS

Quero agradecer a todas as pessoas que sempre estiveram ao meu lado durante essa etapa da minha vida. Obrigada mãe, obrigada Pai, obrigada Daia, Luciano e Francesco por sempre me apoiarem, incentivarem. Obrigada por segurarem minha mão nos momentos mais difíceis e pularem de alegria junto comigo nos momentos mais felizes e de conquistas. Obrigada Francesquinho por iluminar minha vida nesses últimos três anos. Amos todos vocês incondicionalmente e teria sido muito difícil chegar até aqui sem vocês!

Agradeço a UFSM e o programa de Pós-graduação em Biodiversidade Animal.

Também quero agradecer ao prof° Elgion por ter me dado um voto de confiança lá em 2008 e por ter me orientado por longos 7 anos e poucos. Durante esse tempo aprendi a gostar ainda mais de biologia molecular e saber que sempre posso exigir um pouco mais de mim. Obrigada pelos "puxões de orelha" e ensinamentos.

Outro agradecimento especial vai para o André Schuch, agora professor! Quero agradecer pela confiança e parceria que formamos durante o doutorado. Obrigada pela dedicação ao transmitir teu conhecimento e além de tudo contribuiu com meu crescimento profissional e pessoal. Obrigada pelo incentivo, sem essa força não teria chegado até o fim do trabalho!

Obrigada a todos meus queridíssimos colegas de LabDros atuais: Tailini, Mariane, Daniel, Tiago, Marcos, Gabriel Vieira, Nader, Raquel, Larissa, Francine, José, Camila e Ronaldo. Agradeço pelo apoio, companheirismo, ajuda nas coletas de larvas, cuidados com as moscas e ensinamentos sobre Real Time. Não posso esquecer-me das risadas, churrascos, bolos de aniversários e idas ao cinema! Mais que simples colegas, vocês foram meus grandes companheiros nessa jornada. Também quero agradecer aos colegas que já passaram pelo lab e foram superimportantes no meu crescimento profissional, como meu o amigo Mauro, o Gabriel Wallau, Daniel Graichen, Lizandra Robe e a Ana Christoff.

Capaz que eu ia esquecer os meus amigos cafofeiros! Amigos que o Lab me deu e vou levar pra vida toda né Larissa, Pedro, Valéria, Paloma, Michelli e Fran! Foram muitos litros de risadas, idas ao churrasquinho e trabalho até a madrugada. Sem amigos não somos ninguém e vocês marcaram esse tempo, deixaram esse tempo bom e mais fácil!

Não posso deixar de agradecer as minhas companheiras de apartamento, Gabrielli e a Camila Fleck que desde Março de 2007 me atura no Misteca! Entre faxinas, negas malucas e cervejinhas na salinha, aqui estamos nós, Amigas.

E aqui vai um agradecimento especial àquela que considero minha irmã, que já é da família, que segurou minha mão até aqui, que me acompanha desde a graduação!! Francine! Nem vou descrever aqui tudo o que já passamos de bom e ruim juntas, pois, isso a gente sempre vai lembrar nas nossas conversas que não acabarão por aqui!! Agradeço pela amizade e compreensão da minha família, das amigas Rafaeli, Franciele e Gabriela. Foram muitos aniversários perdidos, (inclusive o meu!), verões perdidos, convites recusados, mas sempre que pude estava por perto. Obrigada a todos!

RESUMO

DINÂMICA DO ELEMENTO DE TRANSPOSIÇÃO *mariner* SOB CONDIÇÕES DE ESTRESSE EM *Drosophila simulans*

AUTORA: Sinara Santos Jardim
ORIENTADOR: Élgion Lúcio da Silva Loreto

A capacidade de excisão e inserção dentro e entre genomas é característica essencial dos elementos transponíveis (TEs). A mobilização dá aos TEs o papel de contribuir com a mutagênese e a variabilidade genética. Contudo, os mecanismos que desencadeiam a ativação dos TEs em condições de estresse ainda não estão bem esclarecidos. Na linhagem *Drosophila simulans white-peach* o transposon *mariner-Mos1* pode se mobilizar tanto em células somáticas quanto em germinativas. Esta linhagem apresenta uma característica peculiar, pois permite o estudo da transposição do elemento através da formação de manchas nos olhos. Neste estudo, avaliamos se a expressão e transposição do elemento eram induzidas por agentes estressores como: radiação ultravioleta (UVC, 25J/m²), temperatura moderada (28°C) e dano químico (paraquat, 1mM e 2mM). Para medir a expressão gênica de *mariner-Mos1* e dos genes de controle positivo *Hsp70* e superóxido dismutase (*Sod*) foi usado RT-qPCR. A avaliação da transposição somática foi baseada no número de manchas vermelhas nos olhos da linhagem mutante submetida aos estresses (cada mancha representa um evento de transposição). Além disso, foi realizada uma análise do ciclo celular e do tempo de desenvolvimento após estresses (UVC e 28°C). Os tratamentos com UVC e paraquat não tiveram efeito no aumento da expressão e na transposição de *mariner-Mos1*. Ambos os estresses aumentaram a expressão do gene de *Hsp70*. Os resultados sugerem que a expressão de *mariner-Mos1* não é diretamente compartilhada em resposta este gene de choque térmico. Contudo, 28°C aumentou a expressão de *Hsp70*, *mariner-Mos1* e o número de manchas. Além disso, as moscas tratadas com o calor moderado mostraram reduzido tempo de desenvolvimento e rápida progressão no ciclo celular. Em contraste, após UVC, foi observado um longo tempo de desenvolvimento das moscas bem como um atraso na fase G1/S do ciclo celular. Assim, os resultados indicam que o calor moderado induz transcrição e transposição de *mariner-Mos1*, UVC e estresse químico não são capazes de induzir ambos os fatores, mas induzem a expressão de *Hsp70*, possivelmente com diferentes vias de ativação.

Palavras-chave: Estresse químico. Radiação UV. Temperatura. Mos1. Transposição somática. *white-peach.* Ciclo celular. HSP.

ABSTRACT

DYNAMICS OF TRANSPOSITION ELEMENT *mariner* UNDER STRESS CONDITIONS IN *Drosophila simulans*

AUTHOR: Sinara Santos Jardim
ADVISOR: Elgion Lucio da Silva Loreto

The capacity of excision and insertion within and among genomes is an essential feature of transposable elements (TEs). The mobilization gives to TEs the role of contributing to mutagenesis and genetic variability. However, the mechanisms that trigger the activation of TEs under stress conditions are still poorly understood. In the *Drosophila simulans white-peach* lineage, the *mariner-Mos1* transposon can be mobilized in both somatic and germline cells. This lineage has a peculiar feature because it allows the study of element transposition through the formation of eyes spots. In this study, we evaluated if the expression and transposition of *mariner-Mos1* were induced by stressing agents, such as: ultraviolet radiation (UVC, 25J/m²), mild heat (28°C) and chemical damage (paraquat, 1mM e 2mM). The RT-qPCR was used to elucidate the gene expression of *mariner-Mos1* and positive control genes *Hsp70* and superoxide dismutase (*Sod*). The evaluation of somatic transposition was based on the number of red spots in the eyes of the mutant strain submitted to stresses (each spot represent one transposition event). Furthermore, the cell cycle progression and the developmental time after stresses (UVC and 28°C) were also evaluated. The treatments with UVC and paraquat had no effect in the increase of *mariner-Mos1* expression and transposition. Both the stresses increased the expression of *Hsp70* gene. The results suggest that the expression of *mariner-Mos1* is not directly shaped in response to this heat shock gene. However, 28°C increased the expression of *Hsp70, mariner-Mos1* and the red spots number. Furthermore, the flies treated with mild heat showed reduced development time and fast cell cycle progression. In contrast, after UVC, it was observed a long development time of flyies as well an arrest in the G1/S phase of cell cycle. Therefore, the results indicate that de mild heat induce transcription and transposition of *mariner-Mos1*, UVC and chemical stress no are able to induce both processes despite it can induce the expression of *Hsp70*, probably through a different activation pathway.

Keywords: Chemical Stress. UV Radiation. Temperature. Mos1. somatic transposition. *white-peach.* Cell cycle. HSP.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

INTRODUÇÃO

Figura 1 - Mecanismo de transposição do *mariner-Mos1*.....16
Figura 2 - Olho mosaico de *Drosophila siumulans white-peach* representando a atividade de transposição de *mariner-Mos1*.....18
Figura 3 - Regulação da resposta ao choque térmico.....22

ARTIGO 1

Figure 1 -Survival rate of larvae after UVC treatments……...30
Figure 2-Relative expression of *mariner-Mos1* and *Hsp70* genes after heat and UVC treatments……..……30
Figure 3- Frequency of red spots in the eyes of adult flies after treatments…….31
Figure 4- Effect of mild heat and UVC radiation on cell cycle progression……31

ARTIGO 2

Figure 1- Frequency of mosaic eyes (with red spots) after treatments with different doses of paraquat……....44
Figure 2- Relative expression of *mariner-Mos1*, *Hsp70* and *Sod* genes after treatment with paraquat doses……...45

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....10
1.1 OS ELEMENTOS TRANSPONÍVEIS.....10
1.2 CLASSIFICAÇÕES DOS ELEMENTOS TRANSPONÍVEIS.....11
1.3 A HISTÓRIA EVOLUTIVA DO TRANSPOSON *mariner*.....13
1.4 MECANISMO DE TRANSPOSIÇÃO DO ELEMENTO *mariner*.....14
1.5 TRANSPOSIÇÕES SOMÁTICAS DO ELEMENTO *mariner*.....16
1.6 REGULAÇÃO DA TRANSPOSIÇÃO.....18
1.7 MODELO DE ESTUDO: *Drosophila simulans*.....19
1.8 AGENTES ESTRESSORES E A ATIVIDADE DOS ELEMENTOS TRANSPONÍVEIS.....20
1.8.1 Temperatura.....22
1.8.2 Radiação Ultravioleta.....23
1.8.3 Estresse químico.....24
2 OBJETIVOS.....25
3 ARTIGO 1 - EFFECTS OF HEAT AND UV RADIATION ON THE MOBILIZATION OF TRANSPOSON *mariner-mos1*.....26
4 ARTIGO 2- TRANSPOSABLE ELEMENT *mariner-mos1* IS NOT INDUCED BY CHEMICAL STRESS IN *Drosophila simulans*.....39
5 CONCLUSÕES 54
6 PERSPECTIVAS.....54
7 REFERÊNCIAS.....56

1 INTRODUÇÃO

1.1 OS ELEMENTOS TRANSPONÍVEIS

Os elementos transponíveis - TEs (do inglês *Transposable Elements*) são segmentos de DNA capazes de moverem-se e replicarem-se de uma região cromossômica para outra dentro de um genoma hospedeiro. Os TEs têm representantes na maioria das espécies estudadas e devido a sua movimentação e acumulação são uma grande força capazes de moldar genes e genomas (FESCHOTTE; PRITHAM, 2007).

Nos genomas de eucariotos há variação na diversidade de TEs que ocupam um mesmo genoma e/ou na quantidade de cópias de um mesmo elemento. Essa ampla distribuição se dá em parte pela grande diversidade de estrutura e mecanismos de transposição que os TEs apresentam. Uma das consequências é que uma grande parte dos genomas é constituída por elementos transponíveis, como por exemplo: 4% do genoma de *Saccharomyces cerevisiae*, 15 a 22% de *Drosophila melanogaster*, 45% de humanos e mais de 60% de algumas plantas e anfíbios (BIÉMONT; VIEIRA, 2006; FESCHOTTE; PRITHAM, 2007).

Quando os elementos genéticos móveis foram descobertos por Barbara McClintock na década de 40, não foram bem aceitos, pois a descoberta aconteceu em um tempo dominado pela ideia de estabilidade genômica. Esta visão surgiu a partir das leis de Mendel sobre a conservação de características e transmissão dos caracteres hereditários para descendentes (HUA-VAN et al., 2011). As ideias de McClintock foram reconhecidas após anos, com as descobertas de TEs em diversos organismos, com o início do entendimento do papel que apresentam nos genomas e o avanço das técnicas de biologia molecular. Por fim, como reconhecimento a premiaram com um prêmio Nobel em 1983.

Os elementos transponíveis têm um importante papel na dinâmica da organização dos genomas hospedeiros (VARANI et al., 2015). Uma vez que, ao promoverem a própria mobilização (*cis*) ou a de outro elemento (*trans*) presente no mesmo genoma e proximamente relacionado os TEs podem gerar mutações, por exemplo, ao inserirem-se em genes, gerar rearranjos estruturais como deleções, duplicações, inversões e fusões cromossômicas que podem ser prejudiciais para o organismo hospedeiro (VARANI et al., 2015).

Além disso, os TEs podem promover impacto na expressão gênica dos hospedeiros e também são considerados fonte de variabilidade genética (HANEY et al.; 2009; VARANI et al.; 2015). Um exemplo deste impacto é o elemento *jockey* que reduz os níveis de transcritos do gene *Hsp70Ba* em linhagens de *Drosophila melanogaster* quando inserido na região

promotora desse gene (LERMAN et al., 2003). E em relação à variabilidade genética, foram encontrados fragmentos de uma transposase de um elemento transponível fusionados a um gene humano ambos constituem atualmente, um novo gene (CORDAUX et al., 2006).

1.2 CLASSIFICAÇÕES DOS ELEMENTOS TRANSPONÍVEIS

Fez-se necessário um sistema de classificação hierárquico para facilitar os estudos comparativos e evolutivos de elementos transponíveis presentes em diferentes espécies hospedeiras. Este sistema foi sendo aperfeiçoado por diversos pesquisadores, incluindo novas características de classificação (FINNEGAN, 1989; JURKA et al., 2005; WICKER et al., 2007; PIÉGU et al., 2015). O sistema de classificação é hierárquico e, além das classes, inclui subclasses, ordens, superfamílias, famílias e subfamílias (WICKER et al., 2007). O primeiro nível de classificação foi baseado na existência dois mecanismos de transposição, que se distingue pelo intermediário que o TE utiliza para mobilização: DNA ou RNA. Os de Classe I são os elementos que se transpõe por um intermediário de RNA e os de Classe II se transpõem com um intermediário de DNA (FINNEGAN, 1989).

Os TEs de Classe I ou Retrotransposons são estruturalmente parecidos com retrovírus integrados. Apresentam em sua estrutura molecular sequências codificantes de um conjunto de enzimas que estão relacionadas ao mecanismo de transposição. Uma dessas enzimas é a transciptase reversa (TR), capaz de sintetizar uma fita de DNA a partir de um RNA, sendo o oposto do que ocorre na transcrição (HUA-VAN et al., 2011). Assim, após a fita de RNA mensageiro ser transcrita pela maquinaria da célula, é direcionada ao citoplasma onde é traduzida. O conjunto de enzimas do retrotransposon é então produzido e a TR sintetiza uma nova cópia de DNA a partir da fita de mRNA recém transcrita. Por fim, o retotransposon retorna ao núcleo, associado com as demais enzimas envolvidas no processo de mobilização e insere-se em uma nova região do genoma (VARANI et al., 2015).

A transposição dos retrotransposons é comumente chamada de “copia e cola” ou replicativa, pois, além de conservar a sequência do TE original, produz novas cópias (WICKER et al., 2007). Os retrotransposons foram caracterizados nos genomas de animais e de leveduras, porém, são abundantes na maioria dos genomas das plantas, podendo constituir grande parte deles (GRANDBASTIEN, 1998).

Dentro da Classe I, os elementos podem ou não apresentar em suas extremidades longas repetições terminais - LTR (do inglês, *Long Terminal Repeats*) que são essenciais para o processo de regulação do elemento.

A subclasse dos elementos sem LTR (do inglês *non-LTR*) são os *LINEs* (do inglês *Long Interspersed Nuclear Elements),* mais abundantes em mamíferos, e os *SINEs* (do inglês *Short Interspersed Nuclear Elements),* encontrados em humanos (como os elementos *SINEs-Alu*). Os elementos da subclasse com LTR são os *LTR* presentes em humanos, a maioria é inativo, mas proximamente relacionados a retrovírus, os *DIRS (*do inglês, *Dictyostelium)* que contém um gene de tirosina recombinase e não gera duplicação do sítio alvo. E os elementos *PLE (*do inglês, *Penelope-like)* que são mais abundantes em plantas do que em animais e apresentam um gene capaz de codificar uma proteína de domínio similar a um capsídeo viral (WICKER et al., 2007). As ordens de retrotransposons possuem classificações menos inclusivas como superfamília e família.

Os TEs da Classe II, ou transposons de DNA, codificam uma enzima chamada transposase, que de maneira geral, reconhece o transposon, catalisa a reação de transposição e promove a inserção em um novo sítio no genoma (VARANI et al., 2015). Como parte da sua estrutura molecular, os transposons de DNA podem apresentar repetições terminais invertidas, as TIRs (do inglês, *terminal inverted repeats*), que são sequências presentes em ambas às pontas do transposon. Estas sequências são reconhecidas e clivadas pela transposase durante o processo de transposição. Algumas superfamílias podem apresentar duplicação dos sítios alvos (TSD) (do inglês, *target site duplication*), que são repetições curtas e diretas geradas em ambas as regiões franqueadoras do TE após a integração (WICKER et al., 2007).

Os transposons ainda podem ser classificados em duas subclasses. A subclasse I compreende os transposons caracterizados por clivarem as duas fitas de DNA no momento da mobilização e se inserirem em outra região. E subclasse II que contém os TEs capazes de cortarem uma fita de cada vez para a inserção e usam o mecanismo de replicação da célula. O primeiro caso ocorre o mecanismo comumente chamado de “corta e cola” ou processo de transposição conservativo (FESCHOTTE; PRITHAM, 2007; WICKER et al., 2007). Já para os da subclasse II, o processo é chamado de replicativo e gera duas cópias do transposon (FESCHOTTE; PRITHAM, 2007; WICKER et al., 2007).

O aumento do número de cópias dos transposons de DNA da subclasse I se dá quando há ativação do sistema de reparo por recombinação homologa, devido a quebra dupla

(ENGELS et al., 1990) ou quando o transposon se mobiliza para uma região do cromossomo que ainda não foi duplicada (CHEN et al., 1992).

1.3 A HISTÓRIA EVOLUTIVA DO TRANSPOSON *mariner*

Os transposons da família *mariner* estão amplamente distribuídos na maioria dos organismos vivos e bem caracterizados na família Drosophilidae (WALLAU et al., 2011). A distribuição do elemento na espécie *D. simulans* foi estudada por Picot et al., (2008) e baseia-se na taxa de transposição somática. Os autores relacionaram dados da atividade de *mariner* com a distribuição geográfica e dados geoclimáticos das espécies hospedeiras. Juntos, os resultados revelaram que as populações das América do Sul e Austrália (consideradas recentes) têm uma taxa de atividade de *mariner* alta e variável entre as populações, ao contrário do que acontece com as populações ancestrais (Africanas). Como a seleção contra a transposição é maior em áreas mais quentes, as populações Africanas apresentaram uma menor atividade de *mariner-Mos1* do que as populações mais recentes. Assim, o padrão de atividade do elemento está mais relacionado com os aspectos geográficos do que diretamente com a temperatura do local de origem da espécie hospedeira (PICOT et al., 2008).

Em relação à classificação, o transposon *mariner* pertence à classe II, subclasse I, superfamília *Tc1-mariner-IS630*, família *mariner*, ordem TIR. O elemento autônomo *mariner* possui 1286 nucleotídeos de extensão sendo 28 pb pertencentes as TIRs que flanqueiam uma ORF (do inglês, *open reading frame*). A ORF codifica uma proteína de 346 aminoácidos, a transposase. Também há a duplicação de 2pb da sequência de do gene *white* gerada na inserção (JACOBSON et al., 1986). Além disso, há uma região entre a TIR 5’ e o início da ORF que possui sequências de potenciais regiões promotoras do elemento (JACOBSON et al., 1986; JARDIM et al., 2015).

O elemento de transposição *mariner* foi descoberto por causar uma mutação instável no gene *white* de *D. mauritiana* (JACOBSON; HARTL 1985). Este gene localiza-se no cromossomo X e codifica uma proteína envolvida na pigmentação do olho dos drosofilídeos que é predominantemente vermelha. Mutações nesse gene debilitam seu funcionamento e modificam o padrão de coloração natural dos drosofilídeos (MACKENZIE et al., 1999).

A mutação era causada por uma cópia não autônoma de *mariner* (alelo w^{pch}), ou seja, esta cópia era incapaz de codificar a transposase, pois, apresentava algumas deleções na ORF.

Como consequência a expressão do gene *white* era menor e fenótipo da cor dos olhos

passava de vermelho para pêssego com algumas facetas pigmentadas (mosaicismo). Este mosaicismo era resultado da excisão somática instável do elemento *mariner* por uma das suas mais 20 cópias autônomas também presentes no genoma, que promoviam a reversão da mutação em algumas células do olho durante o desenvolvimento. (JACOBSON; HARTL 1985; JACOBSON et al., 1986) Uma cópia autônoma foi isolada, caracterizada e chamada fator *Mos1* (Mosaico) (MEDHORAet al., 1988).

Posteriormente o alelo w^{pch} (cópia não autônoma) foi introduzido no genoma de *D. melanogaster*, que não contém o elemento, para gerar um potencial sistema de transformação usando *mariner* (GARZA et al., 1991). Este alelo também foi introduzido no genoma de *D. simulans*, em uma linhagem na qual faltavam cópias autônomas, por meio de uma série de cruzamentos interespecíficos (BRYAN; HARTL 1988; CAPY et al., 1990). As novas linhagens permaneceram completamente estáveis, sem evidências de excisão somática ou germinativa. James W. Jacobson foi convidado a nomear o transposon *mariner* e o fez em homenagem a sua filha recém-nascida na época, Marin (HARTL, 2001).

1.4 MECANISMO DE TRANSPOSIÇÃO DO ELEMENTO *mariner*

O elemento *mariner* é amplamente distribuído entre as espécies eucarióticas e isso se deve ao seu mecanismo de transposição. De maneira geral a transposição do *mariner* não depende de fatores do hospedeiro e sim de fatores do próprio elemento, como a transposase e a presença das TIRs (repetições terminais invertidas). De fato, *in vitro* a transposase e as TIRs são os únicos fatores requeridos para transposição do *mariner* (LAMPE et al., 1996). No entanto, *in vivo*, para que a célula sobreviva há a necessidade de reparo do local da excisão por fatores do hospedeiro (ENGELS et al., 1990).

As transposases da família *Tc1-mariner* são nucleases de sequências específicas e transferases de fita de DNA, ou seja, elas clivam o DNA nas TIRs, que marcam o final do transposon, e inserem o fragmento excisado em outra região (DORNAN et al., 2015).

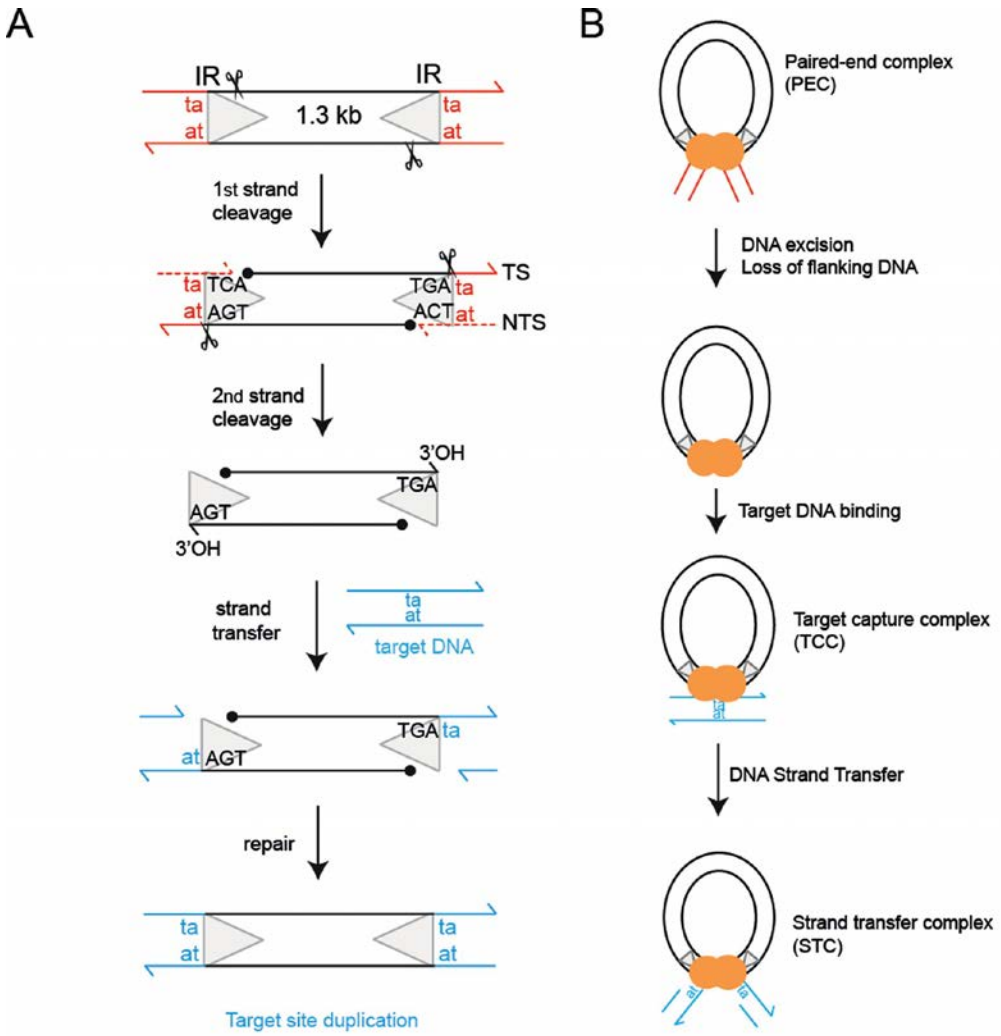
A porção C-terminal da transposase, contém um domínio catalítico conservado na família do TE, o domínio DDD/E, que juntamente com íons metálicos e moléculas de água participam da quebra da ligação fosfodiéster das TIRs (MAHILLON; CHANDLER, 1998; BENJAMIN et al., 2007).

As transposases de *mariner* eucarióticas funcionam em homodímeros, onde dois polipeptídeos se combinam nas regiões finais do transposon, nas TIRs, para excisão

formando um complexo pareado chamado *paired-end-complex* (PEC) (JAILLET et al., 2012) (Figura 1). O mecanismo de transposição requer duas clivagens sequenciais que ocorrem nessas regiões finais (DAWSON; FINNEGAN, 2003). Por fim, um complexo de pré-integração é gerado e este insere o transposon em um novo sítio onde ocorrem os nucleotídeos TA no genoma (JAILLET et al., 2012; RICHARDSON et al., 2009). Imediatamente após a excisão do transposon, há o reparo do DNA da sequência alvo da inserção (nucleotídeos TA) que é duplicada durante este processo. Esta duplicação de sítios TA é considerada uma assinatura da transposição da família *TC1*/*mariner* (DORNAN et al., 2015).

Quanto à regulação da transposição pelo próprio elemento foi relatado que a concentração de transposase quando em excesso impede a montagem do PEC, apesar de não impedir o processo de transposição em ensaios *in vitro* (JAILLET et al., 2012). No entanto, existem mecanismos de defesa do hospedeiro contra o aumento excessivo do número de cópias dos elementos transponíveis, o que será relatado mais adiante.

Figura 1- Mecanismo de transposição do *mariner-Mos1*.



Legenda: A) o elemento tem uma sequência de aproximadamente 1.3kb, duas regiões terminais invertidas de 28pb, as TIRs (triângulo), flanqueadas por sítios de duplicação TA (vermelho). Clivagens na primeira e na segunda fita (tesoura) geram um fosfato 5' na fita não transferida (NTS) (ponto preto) e 3'OH na fita transferida (TS) (seta). Integração do transposon clivado no sítio de DNA alvo e duplicação dos dinucleotídeos TA (azul). B) Complexo de nucleoproteínas formado durante a mobilização (DORNAN et al., 2015).

1.5 TRANSPOSIÇÕES SOMÁTICAS DO ELEMENTO *mariner*

Um fator importante sobre as transposições dos elementos transponíveis é que a maioria delas ocorre em células germinativas, que é onde os TE têm a possibilidade de se manter no genoma ao longo das gerações (aumentar o número de copias), o que não ocorre em células somáticas (KAZAZIAN, 2011). As transposições somáticas não trazem nenhum

benefício para o hospedeiro do elemento transponível, pois não são herdadas às subsequentes gerações (EICKBUSH; EICKBUSH, 2011). Além disso, as transposições em tecidos somáticos podem estar envolvidas em drásticas consequências para o organismo hospedeiro como o câncer (HELMAN et al., 2014). Além de alterar o cenário genético do cérebro humano (BAILLIE et al., 2011) e também estão envolvidas no declínio neuronal em *Drosophila* (LI et al., 2013). Em uma visão mais ampla, há acúmulo de evidências de que a desintegração de células somáticas é devido ao poder mutagênico e da perturbação dos TEs nas sequências gênicas regulatórias ou codificantes (STURM et al., 2015).

Em relação à transposição somática do elemento *mariner,* após a descoberta e a caracterização do elemento, os estudos sobre sua transposição se deram no contexto de entender as variações da atividade em populações naturais. Como seria o padrão de atividade do elemento nessas populações? Qual a relação entre a transposição somática e a clina latitudinal encontrada (breve revisão em Capy et al., 2000; Picot et al., 2008).

O modelo *Drosophila simulans white-peach* possibilitou estudos sobre a atividade somática do elemento *mariner* em populações naturais (CAPY et al., 1992; GIRAUD; CAPY, 1996; RUSSELL; WOODRUFF, 1999). A linhagem *white-peach* é usada em cruzamentos com linhagens naturais de *D. simulans* que fornecem a transposase à cópia inativa de *white-peach.* Durante o processo de desenvolvimento da prole (F1) pode ocorrer mobilização *in trans* da cópia inativa de *mariner*. O resultado é observado na F1 através da quantidade de manchas vermelhas nos olhos, em um contexto de coloração *white-peach*, pêssego. (CAPY et al., 1990) (Figura 2).

Figura 2- Olho mosaico de *Drosophila siumulans white-peach* representando a atividade de transposição de *mariner*.

Legenda: Cada mancha representa a reversão da mutação e um evento de transposição de *mariner* (JARDIM; LORETO, 2011; JARDIM et al., 2015).

Outro fator importante capaz potencializar a atividade de transposição somática do elemento *mariner* é a ação da temperatura. Em Chakrani et al., (1993), os autores já conheciam a capacidade da temperatura em aumentar a transposição do *mariner*, relatada primeiramente por Garza et al., (1991) em linhagens transformadas de *D. melanogaster*. Chakrani et al., (1993), mediram a taxa de transposição somática do elemento através da proporção de machos mosaicos (PMM) resultante dos cruzamentos entre população naturais de *D. simulans* e a linhagem *white-peach*. Uma vez que o padrão de herança do gene *white* é ligado ao cromossomo X e carrega o alelo mutante na linhagem *white-peach*, somente os machos da F1 apresentam o fenótipo mosaico. Os pesquisadores realizaram cruzamentos a 29°C e encontraram um efeito da temperatura na taxa de transposição somática de algumas linhagens naturais de *D. simulans*. A relação entre a taxa de transposição e temperatura usada no cruzamento (29°C) poderia estar relacionado com a similaridade de 57% encontrada entre a sequência da TIR de *mariner* com a região promotora consenso dos genes das HSPs (CHAKRANI et al., 1993).

1.6 REGULAÇÃO DA TRANSPOSIÇÃO

Existem ainda fatores de regulação da atividade de *mariner*, como o modelo inibição por superprodução de transposase (*transposase overproduction inhibition*) o qual ocorre em alguns modelos *in vivo*. Este tipo de inibição da transposição pode resultar da formação de

oligômeros de transposases ativos ou inativos que atuam como competidores tóxicos (BIRE et al., 2013; LOHE; HARTL, 1996). No entanto esta inibição da regulação (*downregulation*) é observada em promotores não naturais (LOHE; HARTL, 1996).

Outras estratégias moleculares que podem regular atividade dos elementos transponíveis em geral são o silenciamento transcricional por metilação do DNA, a modificação de histonas e o silenciamento pós transcricional por RNAs de interferência (GRANZOTTO; CRUZ, 2015). O silenciamento de TEs em célula somáticas ocorre principalmente pelos siRNAs (do inglês, *short interfering RNAs*). Neste modelo, o silenciamento é pós transcricional e os siRNAs agem em conjunto com as proteínas da família Argonoautas, clivando RNAs complementares (SLOTKIN; MARTIENSSEN, 2007). Em células germinativas o grupo de proteínas associados da família Argonauta é denominado Piwi e os piRNAs (do inglês, *piwi-interacting RNAs*) são os principais responsáveis pelo silenciamento. Os piRNAs podem atuar em clusters em *Drosophila* que contém fragmentos de TEs senso e antissenso, produzindo piRNAs em ambas orientações. Em *Drosophila simulans* há poucos estudos sobre os mecanismos de silenciamento. FABLET et al., (2014) relataram polimorfismo nas sequências de genes envolvidos na via de piRNA, além de mostrar variação transcricional nos mesmos genes em linhagens de *D. simulans.* Além disso, em uma espécie proximamente relacionada à *D. simulans*, *D. erecta*, há uma sequência de *mariner* plotada sobre um possível cluster piRNA chamado *flamenco* (MALONE et al., 2009).

Em relação ao estresse, o choque térmico é capaz de modular os piRNAs originados de clusters em células germinativas de *D. melanogaster* (FUNIKOV et al., 2015). O estudo da maquinaria de silenciamento em *D. simulans* é essencial para avaliar a ação dos RNA de interferência na transposição do elemento *mariner*.

1.7 MODELO DE ESTUDO: *Drosophila simulans*

As linhagens usadas nesse trabalho pertencem à espécie *Drosophila simulans.* Esta espécie pertence à família Drosophilidae que é a mais amplamente distribuída entre 150 famílias que compõe a ordem Diptera (YEATES et al., 2007). Fazem parte dessa família cerca de 4.200 espécies divididas em 77 gêneros (BÄCHLI, 2015). Dentro do gênero *Drosophila* dois subgêneros se destacam *Sophophora* e *Drosophila*. *D. simulans* pertence ao subgenero *Sophophora* do gênero *Drosophila*, que é proximamente relacionada à *D. mauritana* (LACHAISE; SILVAIN, 2004).

Drosophila simulans atualmente possui distribuição cosmopolita, e suas populações ancestrais se originaram na África central e ilhas do leste como Madagascar, Seychelles e Mascarenhas e sua invasão nas Américas acompanhou a invasão humana (LACHAISE, 1988).

1.8 AGENTES ESTRESSORES E A ATIVIDADE DOS ELEMENTOS TRANSPONÍVEIS

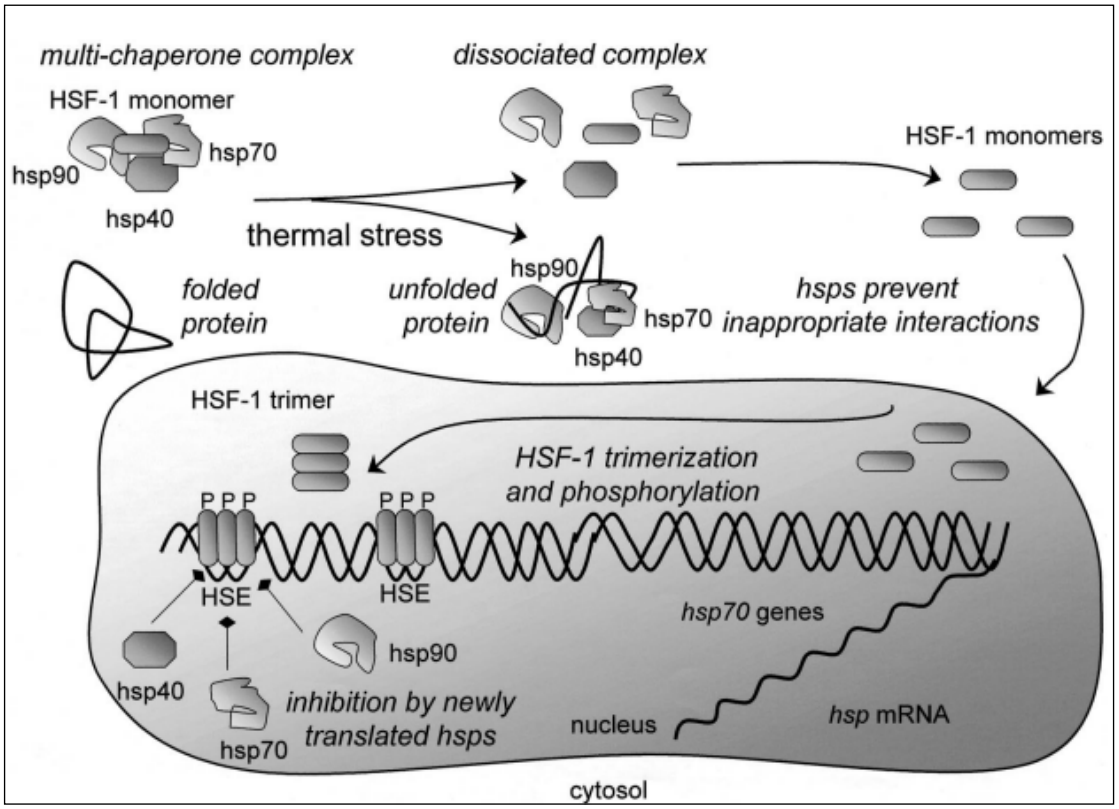
Evidências de que os elementos transponíveis são uma importante fonte de variação genética vem se acumulando ao longo dos anos. As mudanças causadas por eles vão desde alterar o tamanho dos genomas até influenciar na expressão gênica da espécie hospedeira (DIAS; CARARETO, 2015). Tem sido evidenciado que os elementos repetitivos mediam respostas ao estresse oxidativo ao se inserirem próximo de genes relacionados à viabilidade e ao desenvolvimento de *Drosophila* (GUIO et al., 2014). A hipótese de que as sequências repetitivas estão envolvidas na adaptação dos hospedeiros às mudanças ambientais é reforçada pelas evidências como a citada acima, juntamente com o fato de que elas podem ser ativadas por fatores externos (GRANDBASTIEN, 1998). Estes fatores ou estresses que ativam os elementos transponíveis são fatores bióticos como ataques de patógenos e infecções virais ou abióticos como variações de temperatura e irradiação (CAPY et al., 2000; GUERREIRO, 2012). No caso da temperatura, como revisado por Capy et al., (2000), alguns elementos repetitivos podem ter regiões de ativação da transcrição homólogas às de genes de defesa. Estas regiões podem assim, serem ativadas pelo mesmo fator de transcrição que é ativado pelo estresse em questão.

Os organismos expostos à temperatura elevada respondem a esse estresse, sintetizando um conjunto de proteínas, as proteínas de choque térmico (do inglês: *heat shock proteins - HSPs*) (LINDQUIST, 1986). As HSPs fazem parte de uma família gênica de proteínas e algumas como a HSP70 e a HSP90, funcionam como chaperonas moleculares. As chaperonas têm a capacidade de interagir com outras proteínas, reconhecendo e se ligando a aquelas com conformação alteradas (desnaturadas ou não nativas), provocada pela ação de agentes estressores ou ligando-de em peptídeos que ainda não foram totalmente sintetizados, dobrados, montados ou com uma localização incorreta dentro da célula (FEDER; HOFMANN, 1999). A resposta das HSPs é universal e conservada na maioria dos organismos já estudados (LINDQUIST, 1986). Além do papel em resposta aos danos às proteínas, as HSPs atuam em outros processos celulares como regulação do ciclo celular (HELMBRECHT

et al., 2000) e de vias de renovação de proteínas (*turnover*), senescência celular, câncer e apoptose (TOWER, 2011; VOS et al 2015; JEGO et al., 2013). Apesar das HSPs terem sido descobertas por hipertermia, elas também são capazes de responder a diferentes tipos de estresse, como radiação UV e estresse químico (WON et al., 2015; GUPTA et al., 2005).

A regulação da resposta ao choque térmico em eucariotos exige a ativação e translocação para o núcleo de uma proteína que age como fator de transcrição (do inglês, *Heat Shock Factor - HSF*), que se liga aos Elementos de Choque Térmico (do inglês, *Heat Shock Elements -HSE*), localizados nas regiões promotoras dos genes de HSPs (SANTORO, 2000) (Figura 3). Os HSF apresentam um sítio de ligação ao DNA e se ligam aos HSE, induzindo a expressão gênica dos genes das HSPs (ÅKERFELT et al., 2010). Invertebrados, como os drosofilídeos, apresentam apenas um tipo de HSF (WU, 1995). Os HSE estão presentes em múltiplas cópias e suas sequências com maior frequência em *Drosophila* podem ser: (CtgGAAtnTTCtAG) (STRAND and McDONALD (1985).

Figura 3- Regulação da resposta ao choque térmico.



Legenda: Em condições não estressoras, HSF1 é encontrado no citoplasma como um monômero inerte, associado com pelo menos HSP70, HSP90 e HSP40. Em condições de estresse as HSPs evitam a desnaturação de proteínas e, como consequência, há a dissociação do complexo (complexo multi-chaperonas) e a liberação de HSF1. Os HSF1 se translocam para o núcleo, formam estados triméricos ativos, os quais se ligam aos HSE. Após fosforilação, esses se tornam transcricionalmente ativos para aumentar os níveis de transcritos das HSPs. Quando a síntese das HSPs aumenta, as proteínas se translocam para o núcleo e se ligam a HSF1, inibindo sua atividade (SANTORO, 2000; TOMANEK, 2002).

1.8.1 Temperatura

Existem poucos trabalhos que sugerem que a ativação do elemento seja via genes de defesa (CHAKRANI et al., 1993; STRAND; McDONALD, 1985). Não há exemplos se realmente o fator de transcrição desses genes é capaz de ativar os TEs ou como o estresse estaria induzindo a atividade dos elementos (CHAKRANI et al., 1993; STRAND; McDONALD, 1985).

Os pesquisadores Strand e McDonald (1985) demonstraram que em resposta ao estresse térmico havia um rápido e significante aumento nos níveis de transcritos do retrotransposon *copia* e do gene de *Hsp70*. Além disso, também descreveram uma sequência homóloga entre a região LTR do elemento e a região promotora consenso de genes de HSPs.

Chakrani et al. (1993) relacionaram o aumento da taxa de transposição somática de *mariner* de linhagens submetidas a temperatura elevada à similaridade encontrada entre a região promotora de genes de choque térmico e a região terminal invertida (TIR) do elemento.

Outros elementos transponíveis também podem ser ativados por hipertermia, como os retrotransposons *copia*-like e o elemento *412* ambos em genomas de *Drosophila*. (JUNAKOVIC et al. 1986; VASILYEVA et al. 1999; RATNER et al., 1992). Em outros genomas como nos fungos *Magnaporthe grisea* e *M. oryzae* o retrotransposon MAGGY também teve sua mobilização ativada após estresse térmico (CHADHA; SHARMA 2014; IKEDA et al. 2001), assim como o transposon *Crawler* da superfamília *TC1/mariner* no genoma de *Aspergillus oryzae* (OGASAWARA et al., 2009).

1.8.2 Radiação Ultravioleta

A radiação ultravioleta é uma das muitas energias emitidas pelo sol, mas somente uma pequena fração chega à superfície da terra. A radiação ultravioleta é dividida em UVC (100–280 nm), UVB (280–315 nm) e UVA (315–400 nm). A radiação UVC é totalmente absorvida pelo oxigênio e pela camada de ozônio, diferentemente da UVA que chega totalmente a superfície da terra e da UVB a qual tem uma grande parte absorvida, cerca de 95% (HEGGLIN et al., 2014).

Os danos causados pelas radiações UV aos organismos são de grande importância biológica. Os danos diretos na molécula de DNA, causados pela luz UV, podem ser ligações cruzadas, como as vistas nas lesões de DNA dímero de pirimidina ciclobutano (CPD), e os fotoprodutos (6-4)-pirimidina-pirimidona (6-4PPs). Já os maiores comprimentos de onda da luz UVA também induzem danos indiretos causados principalmente pela oxidação de bases do DNA (como a lesão 8-oxoguanina) (SCHUCH et al., 2013).

Contudo, os organismos evoluíram e desenvolveram sistemas de reparo específicos para cada tipo de dano. As lesões que não são removidas podem interferir em processos vitais para célula, como transcrição e replicação, e consequentemente causar mutações e/ou morte celular (FRIEDBERG 2003; SCHUCH, et al., 2013).O estresse por radiação ultravioleta (UV) assim como o estresse térmico, também pode ser capaz de induzir o aumento da atividade dos elementos repetitivos. Em *Escherichia coli* ocorre indução da transposição na Sequencia de Inserção (IS*10*) do elemento Tn*10* durante o controle da resposta SOS em resposta aos danos causados ao DNA por radiação UV (EICHENBAUM; LIVNEH, 1998). A resposta SOS é um

sistema induzível de reparo de DNA em bactérias (MICHEL, 2005). Os transposons da família *Mutator* (*MuDR/Mu*) no genoma de milho também respondem a radiação UV-B, aumentando suas atividades (QÜESTA et al., 2010, 2013; WALBOT, 1999). Exemplos da ação de UV aumentando a transposição de retrotransposons também são encontrados nos elementos SINEs e LINEs em cultura de células de rato e humana, respectivamente (MYAKISHEV et al, 2008; MORALES et al, 2003).

1.8.3 Estresse químico

O dano oxidativo é causado pelo desequilíbrio entre a quantidade de espécies reativas do oxigênio (ERO), as espécies reativas do nitrogênio (ERNs) e a capacidade do organismo de combater suas ações pelo sistema de proteção antioxidante (PISOSCHI; POP, 2015). As espécies reativas do oxigênio são geradas continuamente como subproduto da respiração celular, exposição a infecções, ativação da fagocitose ou pela ação de poluentes como álcool, radiações UV, pesticidas e ozônio (PISOSCHI; POP, 2015). Os efeitos das EROs podem ser danosos para os processos celulares, pois provocam alterações em enzimas, proteínas estruturais, bem como desencadeiam reações de peroxidação lipídica, considerado um grave distúrbio na integridade das membranas, levando a morte celular (HEMNANI; PARIHAR, 1998).

No entanto, além das características danosas, as EROs, podem assumir outras funções mais específicas, como no papel de mensageiros secundários para a expressão de vários fatores de transcrição e moléculas de transdução de sinal (SCHRECK; BAEUERLE, 1991). O controle das EROs em resposta ao dano químico pode ocorrer em nível transcricional. Após detectar o aumento de EROs, há a ligação do fator de transcrição à sequência dos Elementos de Resposta Antioxidante (AREs), e a hiperregulação da transcrição de enzimas antioxidantes que irão neutralizar as EROs (SYKIOTIS; BOHMANN, 2008; GUIO et al., 2014). Em relação à ativação dos elementos transponíveis, há poucas evidências mostrando ativação por estresse químico: são os casos do transposon *Crawler* da superfamília *Tc1/mariner*, em fungo (OGASAWARA et al., 2009), o retrotransposon MAGGY no fungo *Magnaporthe grisea* e *M. oryzae* (IKEDA et al., 2001; CHADHA; SHARMA, 2014) e do elemento *P* em *Drosophila melanogaster* (BLOUNT et al., 1985).

2 OBJETIVOS

O objetivo principal desse estudo é avaliar se o mecanismo de transposição do elemento *mariner-Mos1* é ativado por diferentes condições de estresse no genoma de *Drosophila simulans white-peach,* além de entender fatores celulares que desencadeiam a transposição induzida. Os objetivos específicos são listados abaixo:

- Avaliar a possível coativação do elemento *mariner-Mos1* e dos genes das proteínas de choque térmico quando submetidos ao estresse por calor.
- Avaliar o efeito dos danos da radiação ultravioleta (UVC) sobre o mecanismo de transposição do elemento *mariner-Mos1*;
- Avaliar o efeito dos danos do estresse químico sobre o mecanismo de transposição do elemento *mariner-Mos1*;
- Descrever o mecanismo que desencadeia ativação o elemento *mariner-Mos1* em condições de estresse.

3 ARTIGO 1

Cell Stress and Chaperones
DOI 10.1007/s12192-015-0611-2

ORIGINAL PAPER

Effects of heat and UV radiation on the mobilization of transposon *mariner-Mos1*

Sinara Santos Jardim[1] · **André Passaglia Schuch**[1] · **Camila Moura Pereira**[1] · **Elgion Lucio Silva Loreto**[1,2]

Received: 14 March 2015 / Revised: 3 June 2015 / Accepted: 9 June 2015
© Cell Stress Society International 2015

Abstract There are many complex interactions between transposable elements (TEs) and host genomes. Environmental changes that induce stressful conditions help to contribute for increasing complexity of these interactions. The transposon *mariner-Mos1* increases its mobilization under mild heat stress. It has putative heat shock elements (HSEs), which are probably activated by heat shock factors (HSFs). Ultraviolet radiation (UVC) is a stressor that has been suggested as able to activate heat shock protein genes (*Hsp*). In this study, we test the hypothesis that if UVC induces *Hsp* expression, as heat does, it could also promote *mariner-Mos1* transposition and mobilization. The *Drosophila simulans white-peach* is a mutant lineage that indicates the *mariner-Mos1* transposition phenotypically through the formation of mosaic eyes. This lineage was exposed to UVC or mild heat stress (28 °C) in order to evaluate the induction of *mariner-Mos1* expression by RT-qPCR, as well as the *mariner-Mos1* mobilization activity based on the count number of red spots in the eyes. The effects of both treatments on the developmental time of flies and cell cycle progression were also investigated. Both the analysis of eyes and *mariner-Mos1* gene expression indicate that UVC radiation has no effect in *mariner-Mos1* transposition, although heat increases the expression and mobilization of this TE soon after the treatment. However, the expression of *Hsp70* gene increased after 24 h of UVC exposure, suggesting different pathway of activation. These results showed that heat promotes *mariner-Mos1* mobilization, although UVC does not induce the expression or mobilization of this TE.

Keywords Transposable elements · Mechanisms of transposition · *Drosophila simulans white-peach* · Temperature · UV radiation

Introduction

Transposable elements (TEs) are DNA sequences with the ability to move from one chromosomal location to another in the genome. They are widely distributed among the majority of studied organisms and can correspond to a greater portion of their genomes, as much as 45 % in humans or 50 to 90 % in certain grass genomes (Feschotte and Pritham 2007; Pritham 2009). TEs show huge sequence diversity and are classified in a taxonomic system based on their transposition mechanism (Wicker et al. 2007).

The biological consequence of TE mobilization is their mutagenic effect, ranging from small nucleotide changes to chromosome rearrangements and epigenetic modifications. In general, TE mobilization is detrimental, but from an evolutionary perspective, they are a formidable resource of genetic variability to feed evolution (Hua-Van et al. 2011). To minimize the unfavorable effects of TEs, their "host" genomes developed mechanisms such as RNAi and epigenetic silencing through DNA methylation or heterochromatinization (Yamanaka et al. 2013; Creasey et al. 2014). Many TEs mobilize only in germ cells, and for a long time, this was the main

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s12192-015-0611-2) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Elgion Lucio Silva Loreto
elgion@base.ufsm.br

[1] Postgraduate Program in Animal Biodiversity, University of Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil

[2] Department of Biochemistry and Molecular Biology, University of Santa Maria, Ave. Roraima, 1000, Building 16-A, 3210, Santa Maria, RS 97105-900, Brazil

Published online: 20 June 2015

focus of TE research. However, evidence on the importance of somatic mobilization is now accumulating (Kazazian 2011), indicating its involvement in genomic instability related to cancer (Helman et al. 2014), aging (De Cecco et al. 2013), and neurodegenerative diseases (Li et al. 2013).

Stressors act as activators of transposition of many TEs (Capy et al. 2000; Guerreiro 2011). The *mariner-Mos1* transposon is a good genetic tool to investigate how a transposition mechanism is induced under stressful conditions (Guerreiro 2011). Chakrani et al. (1993) have shown the effect of increased temperature upon *mariner-Mos1* mobilization experimentally. This study also compared the 5′ terminal inverted repeats (TIR) sequence of *mariner-Mos1* with the promoter sequences of four heat shock protein (*Hsp*) genes, finding homology among them. A homology of 57 % was found between a 14-bp stretch of *mariner-Mos1* and the *Hsp70* gene. These observations suggest that *mariner-Mos1* TIR contains functional heat shock elements (HSEs) activated by heat shock factors (HSFs). The heat shock proteins (HSPs) are the best characterized and conserved set of polypeptides that respond to thermal stress (Lindquist and Craig 1988). The HSPs are also implicated in the cell cycle regulation, in resistance to stress-induced apoptosis or necrotic cell death, and in antioxidative defense (Helmbrecht et al. 2000; Takayama et al. 2003; Mosser et al. 1997; Buzzard et al. 1998).

UV radiation is a stressor able to increase *Hsp* gene expression in human skin cells and fish tissues during embryonic stages (Trautinger 2001; Vehniäinen et al. 2012). Furthermore, UVC promoted transposition and excision of the *Tc1/mariner* superfamily of fungus *Aspergillus oryzae* (Ogasawara et al. 2009). UVC radiation damages DNA molecules, which is the major cellular chromophore of UVC light. This absorption generates lesions known as DNA photoproducts, in which the most common are cyclobutane pyrimidine dimers (CPDs) and (6–4) pyrimidine-pyrimidone photoproducts (6–4PPs) (Ravanat et al. 2001; Schuch et al. 2013). The presence of these lesions drastically alters the metabolic processes in DNA, since they represent a physical block to both the replication and transcription machinery (De Santis et al. 2002; Costa et al. 2003). As a result, a cell cycle arrest in the G1 phase is observed because the cells are unable to progress through S phase, thus triggering cell death (Ortolan and Menck 2013).

Considering that *mariner-Mos1* element (i) is activated by heat and (ii) has putative HSE and that the UVC radiation can induce cell stress, in this study, we tested the hypotheses that heat and UVC would increase *mariner-Mos1* expression and that UVC could induce *mariner-Mos1* transposition, as heat does. For testing these hypotheses, we used *Drosophila simulans* strains containing a specific mutation called *white-peach*.

The *D. simulans white-peach* strain is an interesting model for investigating the transposition mechanism because it is an excellent system allowing to quantify the somatic mobilization and is easily manipulated in vivo (Medhora et al. 1991). The *white-peach* strain has a defective copy of *mariner-Mos1* inserted in the promoter region of the *white* gene. The *white* gene encodes an enzyme involved in the production of red pigmentation in the eyes of wild flies. This insertion results in the eye color becoming *white-peach* instead of red (Jacobson and Hartl 1985; Jacobson et al. 1986). Furthermore, this defective copy of *mariner-Mos1* (nonautonomous) can be mobilized *in trans* by the transposase enzyme synthesized from an autonomous copy of *mariner-Mos1*. This transposition occurs during the eyes' development, and the *mariner-Mos1* mobilization generates a new phenotype: *white-peach* eyes with red spots (mosaic) (Capy et al. 1992).

Therefore, we investigated whether UVC and the mild heat stress would induce *Hsp* gene expression in the lineage *D. simulans white-peach*. Moreover, if UVC can induce *Hsp* genes, it is possible that it could also promote *mariner-Mos1* activation, transcription, and mobilization, since this element has a putative promoter sequence homologous to the *Hsp* promoter.

Materials and methods

Drosophila strains

In this study, we used a *D. simulans white-peach* isoline called *Dswp test*, which has active copies of the *mariner-Mos1* element. This isoline was produced by crossing a *D. simulans white-peach* female (which has no active *mariner-Mos1*) (Bryan et al. 1990) with wild-type *D. simulans* males collected in Brasília, Brazil (which has active *mariner-Mos1* elements). Furthermore, in the F2 generation, an isoline was established expressing the mosaic eye phenotype. This isoline presents a basal rate of *mariner-Mos1* activity, which was confirmed by the presence of red spots in the eyes and one active copy of *mariner-Mos1* in the genome, as estimated by qPCR. For the experimental procedures performed in this work, we chose the second larvae instar since the first is very sensitive to manipulation (influencing larval survival) and the third is too late to evaluate the transposition activity with reliable fidelity.

Estimation of transposition rate

To estimate the *mariner-Mos1* transposition rate under variable stress conditions, we quantified the red spots in the mosaic eyes of adult flies that were submitted to stress during the second larval stage. Each spot is interpreted as one transposition event of *mariner-Mos1*, and the individuals were classified in different levels related to the number of observed spots: level 0=without spots, level 1=one to four spots, level 2=five to ten spots, and level 3=more than ten spots (Chakrani et al.

1993; Jardim and Loreto 2011). Twenty-five larvae were submitted to each stress treatment, in three replicates, for three independent experiments. The same number of control larvae was maintained at 20 °C, and the adults were quantified for spots in their eyes.

Exposure to UVC radiation

In order to estimate a sub-lethal dose and perform the other procedures with UVC, first, a larvae group was submitted to different UVC doses one under in which the survival rate was similar to control. The larvae were irradiated with 10, 25, 50, 75, and 100 J/m^2 generated by a UVC germicide lamp (Sanyo G-light, 15 W). The UVC measurements were performed with a portable radiometer (EKO UV Monitor MS-211-1, Japan). For this procedure, groups of 25 second-instar larvae were collected manually and exposed to UVC light in Petri dishes containing 200 μl of phosphate-buffered saline (1× PBS).

With the purpose of evaluating if UVC is able to activate *mariner-Mos1* transposase transcription or induce *mariner-Mos1* mobilization, groups of larvae were irradiated with the chosen UVC sub-lethal dose and were submitted to different manipulations and analyses (three independent experiments): (i) a larvae group was maintained in culture medium until becoming adult flies in order to analyze the developmental time and carry out the phenotypic analysis; (ii) the total messenger RNA (mRNA) was extracted from other larvae groups, 6 and 24 h after stress, to analyze the expression of *mariner-Mos1*, *Hsp*70, and reference genes, by RT-qPCR; and (iii) the third group had the cells dissociated out of larvae tissues and submitted to flow cytometry, 48 h after the UVC irradiation. The control group samples to all procedures were manipulated in the same manner, but the UV lamps were not turned on. These results were statistically discriminated by one-way ANOVA followed by Dunnett's test.

Mild heat stress

The temperature of 28 °C was used as a mild heat stress. This temperature was used as a stressor agent in a previous work (Jardim and Loreto 2011). A group of 25 second-instar larvae was maintained in culture medium while another group was kept at 28 °C, until becoming adult flies in the sense of analyzing the developmental time and carrying out phenotypic analysis. For gene expression analyses, other larvae groups were submitted at 28 °C for different periods of time: 6 or 24 h. The molecular procedures, mRNA extraction, were performed soon after treatment. Twenty-five larvae were collected for both treatments (three independent experiments). For flow cytometry, other larvae groups were maintained at 28 °C for 48 h and the cells dissociated out of larvae tissues. The control group samples to all procedures were manipulated in the same manner, but the temperature was maintained at 20 °C. These results were statistically discriminated by one-way ANOVA followed by Dunnett's test.

Estimation of *mariner-Mos1* copy number

For the estimation of *mariner-Mos1* copy number in the *Dswp-test* strain, qPCR of a unique copy reference gene (Ribosomal protein L17-RPL17) was performed and compared with the *mariner-Mos1* amplification. DNA from 20 flies was extracted individually using the protocol described in Oliveira et al. (2009), quantified in a NanoDrop 2000 spectrophotometer (Thermo Scientific, USA), and diluted to a concentration of 3 ng/μl. Each qPCR reaction was performed in a 20-μl volume containing 20 pmol of each *primer*, 5 mM of dNTPs, 1× PCR buffer, 2.5 mM $MgCl_2$, 1× SYBR Green (Molecular Probes, USA), 0.5 U of Platinum Taq DNA polymerase (Invitrogen, USA), and 15 ng of DNA. The primers used are described in Supplementary Table 1. The *mariner-Mos1* copy number was estimated by the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method (Livak and Schmittgen 2001) using the Ct values obtained in the ECO™ Real-Time PCR System (Illumina, USA). The estimated *mariner-Mos1* copy number in the *Dswp-test* strain was 1.84 (±0.83) copies. As all individuals have a copy of the inactive *peach mariner-Mos1* in the *white* gene, we can conclude that in this strain, the majority of individuals have one copy of an active element and a few have either none or two copies.

RNA extraction and cDNA synthesis

Total RNA was extracted from larvae with TRIzol® reagent (Invitrogen, CA, USA). The quality of the RNA samples was assessed by 1 % agarose gel electrophoresis and quantified using a NanoDrop 2000 spectrophotometer (Thermo Scientific, USA). Afterward, the samples were treated with DNaseI (Promega, USA) to eliminate possible DNA contamination. The complementary DNA (cDNA) synthesis was performed with M-MLV reverse transcriptase enzyme (Invitrogen, CA, USA) and oligo-dT primers.

mariner-Mos1 gene expression

To evaluate the putative activation of transcriptions of *mariner-Mos1* transposase gene by stress, the *Hsp70* gene was used as a positive marker, since this gene is expressed under different stressful conditions (Sørensen et al. 2005; Trautinger 2001). We used the RT-qPCR method, performed on a StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems, USA). The reaction was carried out in a final volume of 20 μl containing 10 μl of diluted cDNA (1:100), 0.25 U Platinum Taq DNA Polymerase (Invitrogen, CA, USA), 1× PCR reaction buffer, 3 mM $MgCl_2$, 25 μM dNTPs,

0.2 μM of each reverse and forward primer, and 1× SYBR Green (Molecular Probes, USA).

The RT-qPCR amplification parameters were as follows: 95 °C for 7 min, followed by 40 cycles of 94 °C for 15 s, 60 °C for 15 s, and 72 °C for 20 s. Normalization input was performed with reference genes (GPDH, RPL17q2, and EF1). The primer sequences are described in Supplementary Table 1. The *Hsp70* primers amplify only the *Hsp70* genes Aa and Ba and do not anneal in their cognates. The relative gene expression was based on $2^{-\Delta\Delta cq}$ (Livak and Schmittgen 2001) using the Cq values. Furthermore, the efficiency of the PCR reactions was calculated using LinRegPCR (Ruijter et al. 2009) software and varied between 1.85 and 1.91 (±0.03). The relative expression indices were compared at each treatment time (6 and 24 h) with the respective control using one-way ANOVA followed by Dunnett's test.

Cell cycle analyses

To carry out the cell cycle analysis, the larvae of second instar were treated with UVC light (25 J/m^2) and maintained for 48 h at 20 °C or heat-shocked (28 °C for 48 h). As control, other larvae were maintained for the whole time at 20 °C. After each treatment, the samples were washed with 10 % bleach for 1 min and rinsed three times with 1× PBS. Then, 30 larvae were stretched out using tweezers and their internal contents were removed and maintained in 1× PBS solution supplemented with 10 % fetal bovine serum (FBS). Next, the tissue was broken up as much as possible by pipetting it up and down for 5 min. Afterward, the samples were centrifuged for 10 min at 1500 rpm. The supernatant was discarded, and 100 μl of trypsin/EDTA solution 250 mg/l was added for 5 min. Subsequently, 1 ml of 1× PBS (10 % FBS) solution was added to inactivate the trypsin and the suspension was centrifuged again. The cell pellet was fixed with 70 % ethanol and maintained at −20 °C. The dissociated cells were resuspended in 500 μl of 1× PBS solution, and after 5 min of decantation, the supernatant was transferred to a new tube (this step is required to clean the sample in order to avoid obstruction of the cytometer). Then, 200 μl of a solution containing 200 μg/ml of RNase A (Macherey-Nagel, Germany), 20 μg/ml of propidium iodide, 0.1 % Triton X-100, and 1× PBS was added in the supernatant. The samples were submitted to flow cytometry analysis in a BD Accuri C6 cytometer (BD Biosciences USA). Statistical analysis was performed by one-way ANOVA followed by Dunnett's test.

Results

Determination of sub-lethal UVC dose to be applied

To evaluate if the damage caused by UVC promotes transposition of the *mariner-Mos1* element, we firstly determined a sub-lethal dose to be applied in all other procedures performed in this work. As can be seen in Fig. 1, a UVC dose of 25 J/m^2 showed a mean survival rate similar to that observed in control and with a dose of 10 J/m^2. However, exposure to higher UVC doses (50, 75, and 100 J/m^2) decreased the survival rate considerably, as expected.

mariner-Mos1 gene expression under mild heat and UVC stress

Here, we tested if UVC and mild heat stress could increase the transcriptions of *mariner-Mos1*. A significant increase in the expression of *Hsp70* occurred when the larvae were exposed to 28 °C for 6 and 24 h (Fig. 2). This corresponded to about an eightfold increase in comparison to the control larvae ($p<0.05$). Curiously, for the UV treatment, the increased expression of *Hsp70* only occurred 24 h after irradiation ($p<0.05$). With regard to the *mariner-Mos1* transposase gene, this result suggests that 28 °C induces a rapid increase in *mariner-Mos1* expression, since its expression level after 6 h of incubation at 28 °C was higher in comparison with control and remains high for the next 24 h. The relative expression of *mariner-Mos1* at 28 °C was still about threefold higher than that observed in the control samples (20 °C) ($p<0.05$). On the other hand, after the UV treatment, the *mariner-Mos1* expression was basal and similar to that observed in the control, regardless of the time of analysis. This result clearly shows that UVC did not induce transcription of the *mariner-Mos1* transposase gene, although it can activate expression of the *Hsp70* gene as a late response.

mariner-Mos1 transposition rate under mild heat and UVC stress

Phenotypic analysis of the adult flies' eyes was performed after the larvae treatment with UV dose of 25 J/m^2 and maintained at 20 °C or by keeping the larvae at 28 °C, until becoming adult flies. The estimation of *mariner-Mos1* transposition frequency was achieved by quantifying the red spots in the eyes (Fig. 3). UVC-treated flies showed similar numbers of red spots as observed in nonirradiated control samples (0 and 1–4, respectively), suggesting that UVC does not induce *mariner-Mos1* transposition, because the mosaic phenotype could not be observed. However, when the larvae were submitted to the mild heat treatment at 28 °C, the result was the opposite. Most of the individuals were distributed between 5–10 (32 %) and +10 (60 %) spot levels. These data showed that heat was able to increase the *mariner-Mos1* mobilization

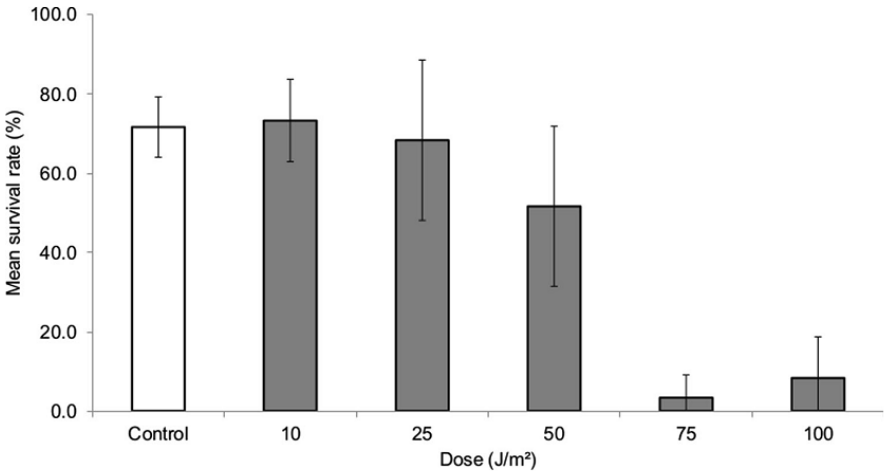


Fig. 1 Survival rate of larvae after UVC treatments. Average survival rate (percentage) and standard deviation from three independent experiments. The larvae of second instar were treated with different doses of UVC. The dose of 25 J/m^2 presented a survival superior to 50 % and was chosen to perform the other procedures with UVC

frequency in the *Dswp-test* strain, despite UVC failed to activate it.

Developmental time and cell cycle progression after stress conditions

During the phenotypic analysis, it was observed that the developmental time of treated samples was different in relation to the control ones. Then, we registered the days that second-instar larvae took to become adult flies. The larvae that were maintained at 20 °C required 10–14 days to complete their development, whereas those kept at 28 °C completed it in only 8 days. In contrast, UVC treatment resulted in delayed development, since UV-exposed larvae took 15 to 17 days to become adult flies.

Flow cytometry analyses were then performed to investigate if the effects caused by these stressors on the developmental time could be related to cell cycle progression. For this purpose, larvae that were previously treated with UVC or mild heat stress for 48 h had their cells separated to be submitted to flow cytometry. The proportion of cells in each phase of cell cycle is shown in Fig. 4. The cell proportion in the UV+20 °C was bigger in the phases G1/S than control sample, indicating an arrest as consequence of UV-induced DNA damage. On the other hand, the mild heat stress (28 °C) resulted in an accumulation of cells in the G2/M.

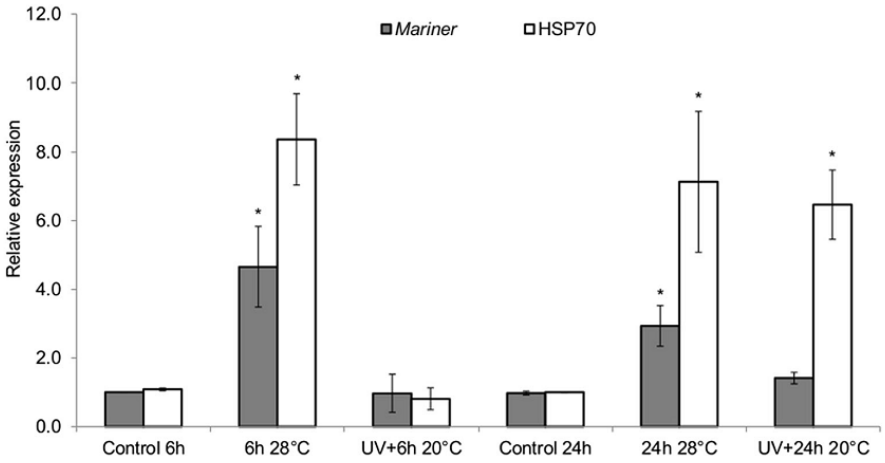


Fig. 2 Relative expression of *mariner-Mos1* and *Hsp70* genes after heat and UVC treatments. Average and standard deviation from three independent experiments. The input normalization was performed with the reference genes GPDH, RPL17q2, and EF1 genes. The larvae (second instar) were maintained at 28 °C or irradiated (25 J/m^2) and maintained at 20 °C for 6 or 24 h. After RNA extraction, cDNA and expression protocols were performed. One-way ANOVA followed by Dunnett's test, which compare the treatments with the respective control ($p<0.05$)

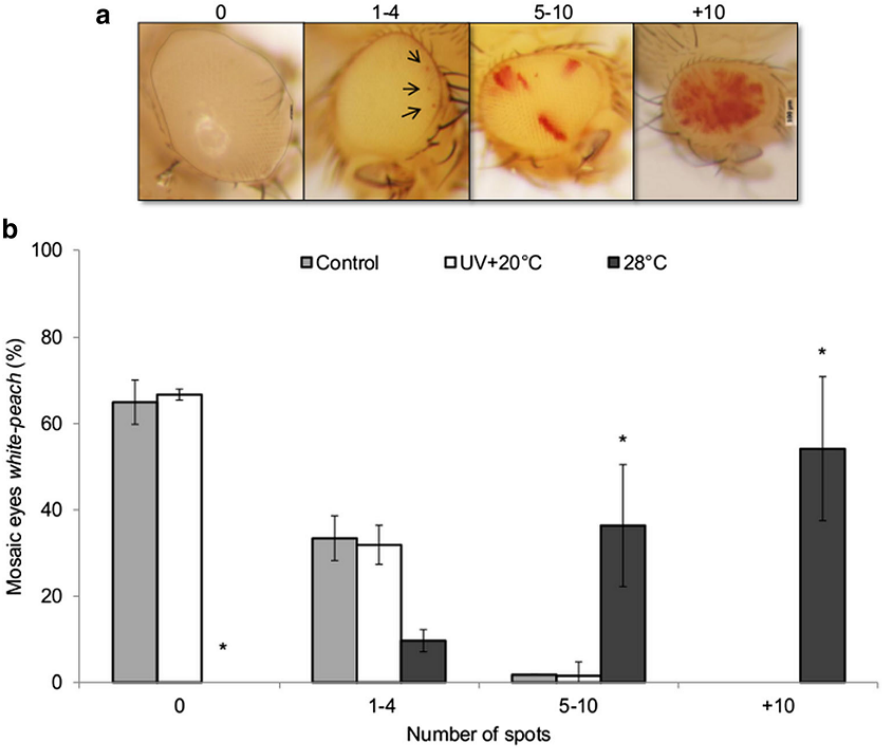


Fig. 3 Frequency of red spots in the eyes of adult flies after treatments. **a** Eyes with and without spots were classified into levels related to the number of red spots: level 0=without spots, level 1=one to four spots, level 2=five to ten spots, and level 3= more than ten spots. **b** Average percentage of each level of mosaic eyes and standard deviation from three independent experiments. The larvae (second instar) were maintained at 28 °C or irradiated (25 J/m^2) and maintained at 20 °C until becoming adult flies. One-way ANOVA followed by Dunnett's test, which compare the treatments with the respective control ($p<0.05$)

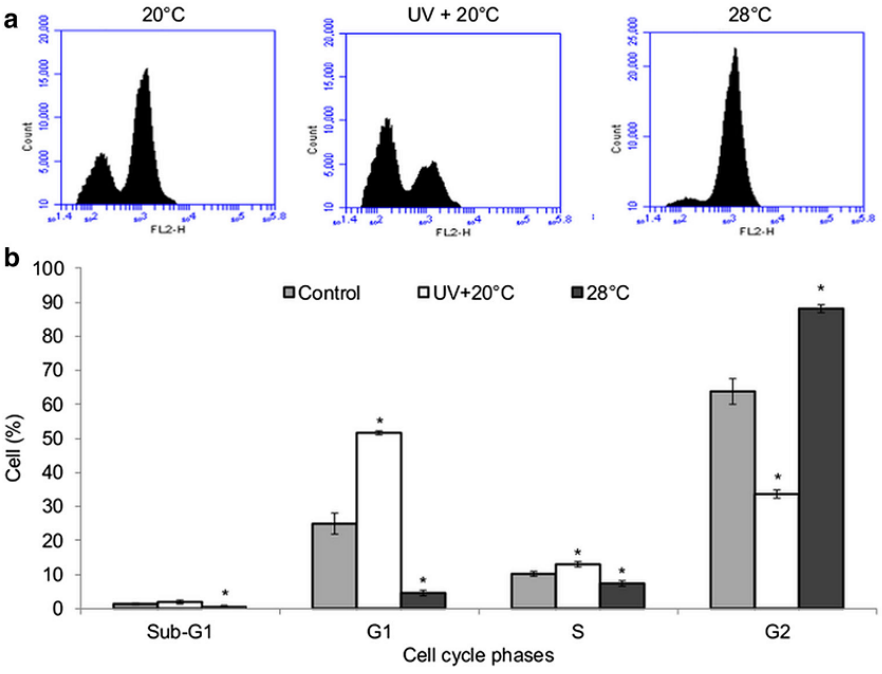


Fig. 4 Effect of mild heat and UVC radiation on cell cycle progression. **a** Histogram generated by a BD Accuri C6 cytometer. **b** Average percentage and standard deviation from three independent experiments showing the proportion of cells in the sub-G1, G1, S, and G2 phases after each treatment. One-way ANOVA followed by Dunnett's test, which compare the treatments with the respective control ($p<0.05$). The larvae (second instar) were maintained at 28 °C or irradiated (25 J/m^2) and maintained at 20 °C for 48 h; after, the cell dissociation protocol was performed and the cells were analyzed

Discussion

As TEs represent a substantial portion of many genomes, with many having potentially active elements, an open question that remains unanswered in functional genomics is how the mechanisms of silencing and activation of TEs work (Hua-Van et al. 2011). Activation by stress factors possesses a special relevance, mainly in somatic mobilization of TEs, since it can be source of deleterious mutations related to cancer, aging, and neurodegenerative diseases (Kazazian 2011). However, not only detrimental effects have been suggested for somatic mobilization of TEs. Some evidence suggests that this process could be involved in phenotypic plasticity (Micale et al. 2012; Iyengar et al. 2014). In the present study, our main focus was to investigate the action of two different stressors on the activation mechanism for somatic mobilization of the *mariner-Mos1* element.

In vivo testing using strains with autonomous TEs is sometimes problematic due to the mobile nature of these sequences, which can increase or decrease the copy number during the experimental period, thus interfering with the interpretation of the results. Therefore, we constructed a strain containing only one copy of the active element. As suggested by our qPCR copy number estimation, our strain presents many individuals with a single active copy of *mariner-Mos1*, but some polymorphism is still maintained. However, this polymorphism did not interfere with the results since the variations observed between replicates were small.

It is already known that heat shock activates the transposition of *copia*-like retrotransposons and *412* in *Drosophila* genomes (Junakovic et al. 1986; Strand and McDonald 1985; Ratner et al. 1992; Vasilyeva et al. 1999). More recently, it was reported that the retrotransposon MAGGY was induced by heat shock in *Magnaporthe grisea* and *Magnaporthe oryzae* (Chadha and Sharma 2014; Ikeda et al. 2001). For the *mariner-Mos1* element, Giraud and Capy (1996) have shown that temperature is involved in the regulation of somatic transposition in natural populations of *D. simulans*, and Chakrani et al. (1993) showed similar results in a controlled laboratory experiment. In addition, it was demonstrated that *mariner-Mos1* has a sequence homologous to the *hsp* promoters, thus suggesting a possible co-activation of both *mariner-Mos1 and hsp* genes possibly by HSF.

Some studies have indicated that UV radiation can mobilize TEs (Kuan et al. 1991; Eichenbaum and Livneh 1998; Qüesta et al. 2010, 2013; Myakishev et al. 2008; Morales et al 2003). The only reported mobilization in the *Tc1/mariner* superfamily is that of Ogasawara et al. (2009) for the fungus *A. oryzae.* In addition, it has already been demonstrated that UV is able to increase *Hsp* expression in human skin cells (Trautinger 2001), in fish (Vehniäinen et al. 2012), and in sea urchin (Bonaventura et al. 2006), thereby suggesting a possible activation of *mariner-Mos1* mobilization as well.

In this work, we tested the hypothesis that *mariner-Mos1* could be co-activated with *Hsp70* genes as a result of the stress caused by mild heat and UVC radiation. Corroborating the previous studies, the results presented in this work reinforce the activation of *mariner-Mos1* by mild heat, showing that the transposase is upregulated at 28 °C (Fig. 2). In addition, the *Hsp70* gene is also upregulated at 28 °C (Fig. 2) and the frequency of *mariner-Mos1* mobilization is high under this condition (Fig. 3). *Hsp* genes have conserved *cis* sequences called heat shock elements (HSEs). We have reanalyzed the 5′UTR region of *mariner-Mos1* element and found a new HSE in addition to that previously described by Chakrani et al. (1993) (Supplementary Figs. 1S and 2S). Together, these results suggest that *mariner* can be co-activated with *Hsp* genes, possibly due to the action of heat shock factor (HSFs).

On the other hand, although UVC activated the *Hsp70* gene, it did not induce activation of the *mariner-Mos1* transposase (Fig. 2). Furthermore, flies subjected to UVC treatment showed similar numbers of red spots in the eyes of adult flies as observed in the nonirradiated control (Fig. 3), confirming that it indeed did not induce *mariner-Mos1* transposition. One aspect that should be highlighted is that the pattern of *Hsp70* activation was different between the mild heat stress and UVC exposure. With mild heat stress, the activation was rapid (6 h) after the treatment, whereas it occurred much later (24 h) after UVC exposition. It is possible that UV-treated cells need to arrive at this time point before activation of the *Hsp70* gene can occur, using a different pathway of activation from the one that is used by *mariner-Mos1*. Although mammals and plants have four different genes for heat shock factors (HSFs), invertebrates have only one (Åkerfelt et al. 2010). However, even having only one HSF, in invertebrates, this factor can interact with wide range of other biotic and abiotic factors. So, heat and UV could induce differently HSF to activate *hsp70* and *mariner-Mos1*.

Additionally, it is already known that mild heat accelerates cell cycle progression, thus facilitating cell growth and differentiation (Park et al. 2005). In contrast, UVC induces a blockage of the DNA replication fork and causes an arrest in cell cycle progression (Song 2005). As shown by the cell cycle and developmental time analyses, UV promotes an arrest in the cell cycle in the G1 phase (Fig. 4), possibly due to the generation of DNA lesions that need to be repaired and the developmental time that is delayed. On the other hand, 28 °C resulted in an accumulation of cells in the G2 phase and it accelerated the developmental time of the treated flies.

We can conclude that mild heat promotes somatic mobilization of the *mariner-Mos1* transposon, increasing transcription of the transposase gene, while UV radiation promotes neither this transcription nor this mobilization. Both stressors activate the *Hsp70* gene, but with different patterns.

Acknowledgments The authors would like to thank the members of the LabDros laboratory group at the Universidade Federal de Santa Maria for comments and discussion relevant to the current study, Daniela Bitencourt Rosa Leal, PhD., and Marcela Zart Arend, MSc., for assistance with the flow cytometry equipment, and Ana Paula Christoff, MSc., for valuable knowledge about RT-qPCR and CNPq and CAPES for financial support.

References

Åkerfelt M, Morimoto RI, Sistonen L (2010) Heat shock factors: integrators of cell stress, development and lifespan. Nat Rev Mol Cell Biol 11:545–555

Bonaventura R, Poma V, Russo R et al (2006) Effects of UV-B radiation on development and hsp70 expression in sea urchin cleavage embryos. Mar Biol 149(1):79–86. doi:10.1007/s00227-005-0213-0

Bryan G, Garza D, Hartl D (1990) Insertion and excision of the transposable element *mariner* in Drosophila. Genetics 125:103–114

Buzzard KA, Giaccia AJ, Killender M et al (1998) Heat shock protein 72 modulates pathways of stress-induced apoptosis. J Biol Chem 273(27):17147–17153. doi:10.1074/jbc.273.27.17147

Capy P, Koga A, David JR et al (1992) Sequence analysis of active *mariner* elements in natural populations of *Drosophila simulans*. Genetics 130:499–506

Capy P, Gasperi G, Biémont C et al (2000) Stress and transposable elements: co-evolution or useful parasites? Heredity 85:101–106

Chadha S, Sharma M (2014) Transposable elements as stress adaptive capacitors induce genomic instability in fungal pathogen *Magnaporthe oryzae*. PLoS ONE 9(4):e94415. doi:10.1371/journal.pone.0094415

Chakrani F, Capy P, David JR (1993) Developmental temperature and somatic excision rate of *mariner* transposable element in three natural populations of *Drosophila simulans*. Genet Sel Evol 25:121–132

Costa RMA, Chiganças V, Galhardo RS et al (2003) The eukaryotic nucleotide excision repair pathway. Biochimie 85:1083–1099. doi:10.1016/j.biochi.2003.10.017

Creasey KM, Zhai J, Borges F et al (2014) miRNAs trigger widespread epigenetically activated siRNAs from transposons in Arabidopsis. Nature 508:411–415. doi:10.1038/nature13069

De Cecco M, Criscione SW, Peterson AL et al (2013) Transposable elements become active and mobile in the genomes of aging mammalian somatic tissues. Aging 5(12):867–883

De Santis LP, Garcia CL, Balajeeb AS et al (2002) Transcription coupled repair efficiency determines the cell cycle progression and apoptosis after UV exposure in hamster cells. DNA Repair 1:209–223

Eichenbaum Z, Livneh Z (1998) UV light induces IS*10* transposition in *Escherichia coli*. Genetics 149:1173–1181

Feschotte C, Pritham EJ (2007) DNA transposons and the evolution of eukaryotic genomes. Annu Rev Genet 41:331–368

Giraud T, Capy P (1996) Somatic activity of *mariner* transposable element in natural populations of *Drosophila simulans*. Proc R Soc Lond B Biol Sci 263:1481–1486

Guerreiro MP (2011) What makes transposable elements move in the *Drosophila* genome? Heredity 108:461–468. doi:10.1038/hdy.2011.89

Helman E, Lawrence MS, Stewart C et al (2014) Somatic retrotransposition in human cancer revealed by whole-genome and exome sequencing. Genome Res 24:1053–1063

Helmbrecht K, Zeise E, Rensing L (2000) Chaperones in cell cycle regulation and mitogenic signal transduction: a review. Cell Prolif 33:341–365

Hua-Van A, Le Rouzic A, Boutin TS et al (2011) The struggle for life of the genome's selfish architects. Biol Direct 6:19. doi:10.1186/1745-6150-6-19

Ikeda K, Nakayashiki H, Takagi M et al (2001) Heat shock, copper sulphate and oxidative stress activate the retrotransposon MAGGY resident in the plant pathogenic fungus *Magnaporthe grisea*. Mol Genet Genomics 266:318–325. doi:10.1007/s004380100560

Iyengar BR, Choudhary A, Sarangdhar MA et al (2014) Non-coding RNA interact to regulate neuronal development and function. Front Cell Neurosci 8:47. doi:10.3389/fncel.2014.00047

Jacobson JW, Hartl DL (1985) Coupled instability of two linked genes in *Drosophila mauritiana*: germinal e somatic mutability. Genetics 111:57–65

Jacobson JW, Medhora MM, Hartl DL (1986) Molecular structure of a somatically unstable transposable element in *Drosophila*. Proc Natl Acad Sci U S A 83:8684–8688

Jardim SS, Loreto ELS (2011) Comparative methodologies for estimating mariner activity using white-peach assay in Drosophila simulans. Drosoph Inf Serv 94:129–132

Junakovic N, Di Franco C, Barsanti P, Palumbo G (1986) Transposition of copia-like nomadic elements can be induced by heat- shock. J Mol Evol 24:89–92

Kazazian HH Jr (2011) Mobile DNA transposition in somatic cells. BMC Biol 9:62. doi:10.1186/1741-7007-9-62

Kuan C-T, Liu S-K, Tessman I (1991) Excision and transposition of Tn*5* as an SOS activity in *Escherichia coli*. Genetics 28:45–57

Li W, Prazak L, Chatterjee N et al (2013) Activation of transposable elements during aging and neuronal decline in Drosophila. Nat Neurosci. doi:10.1038/nn.3368

Lindquist S, Craig EA (1988) The heat-shock proteins. Annu Rev Genet 22:631–677

Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. Methods 25:402–408. doi:10.1006/meth.2001.1262

Medhora M, Maruyama K, Hart DL (1991) Molecular and functional analysis of the *mariner* mutator element *Mos1* in Drosophila. Genetics 128:311–318

Micale L, Loviglio MN, Manzoni M et al (2012) A fish-specific transposable element shapes the repertoire of p53 target genes in zebrafish. PLoS ONE 7(10), e46642. doi:10.1371/journal.pone.0046642

Morales JF, Snow ET, Murnane JP (2003) Environmental factors affecting transcription of the human L1 retrotransposon. II Stressors. Mutagenesis 18(2):151–158. doi:10.1093/mutage/18.2.151

Mosser DD, Caron AW, Bourget L et al (1997) Role of the human heat shock protein hsp70 in protection against stress-induced apoptosis. Mol Cell Biol 17:5317–5327

Myakishev M, Polesskaya O, Kulichkova V et al (2008) PCR-based detection of Pol III-transcribed transposons and its application to the rodent model of ultraviolet response. Cell Stress Chaperones 13:111–116. doi:10.1007/s12192-008-0010-z

Ogasawara H, Obata H, Hata Y et al (2009) *Crawler*, a novel *Tc1*/*mariner*-type transposable element in *Aspergillus oryzae* transposes under stress conditions. Fungal Genet Biol 46:441–449. doi:10.1016/j.fgb.2009.02.007

Oliveira LFV, Wallau GL, Loreto ELS (2009) Isolation of high quality DNA: a protocol combining "rennet" and glass milk. Electron J Biotechnol 12:1–6. doi:10.2225/vol12-issue2-fulltext-4

Ortolan TG, Menck CFM (2013) UVB-induced cell death signaling is associated with G1-S progression and transcription inhibition in primary human fibroblasts. PLoS ONE 8(10), e76936. doi:10.1371/journal.pone.0076936

Park HG, Han SI, Oh SY et al (2005) Cellular responses to mild heat stress. Cell Mol Life Sci 62:10–23. doi:10.1007/s00018-004-4208-7

Pritham EJ (2009) Transposable elements and factors influencing their success in eukaryotes. J Hered 100(5):648–655. doi:10.1093/jhered/esp065

Qüesta JI, Walbot V, Casati P (2010) Mutator transposon activation after UV-B involves chromatin remodeling. Epigenetics 5:352–363

Qüesta JI, Walbot V, Casati P (2013) UV-B radiation induces Mu element somatic transposition in maize. Mol Plant 6:2004–2007. doi:10.1093/mp/sst112

Ratner VA, Zabanov SA, Kolesnikova OV et al (1992) Induction of the mobile element *Dm-412* transpositions in the *Drosophila* genome by heat shock treatment. Proc Natl Acad Sci U S A 89:5650–5654

Ravanat J-L, Douki T, Cadet J (2001) Direct and indirect effects of UV radiation on DNA and its components. J Photochem Photobiol B 63:88–102

Ruijter JM, Ramakers C, Hoogaars WMH et al (2009) Amplification efficiency: linking baseline and bias in the analysis of quantitative PCR data. Nucleic Acids Res. doi:10.1093/nar/gkp045

Schuch AP, Garcia CCM, Makita K, Menck CFM (2013) DNA damage as a biological sensor for environmental sunlight. Photochem Photobiol Sci. doi:10.1039/c3pp00004d

Song Y-H (2005) *Drosophila melanogaster*: a model for the study of DNA damage checkpoint response. Mol Cells 19(2):167–179

Sørensen JG, Nielsen MM, Kruhøffer M et al (2005) Full genome gene expression analysis of the heat stress response in *Drosophila melanogaster*. Cell Stress Chaperones 10(4):312–328

Strand DJ, McDonald JF (1985) *Copia* is a transcriptionally responsive to environmental stress. Nucleic Acids Res 13:4401–4410

Takayama S, Reed JC, Homma S (2003) Heat-shock proteins as regulators of apoptosis. Oncogene 322:9041–9047. doi:10.1038/sj.onc.1207114

Trautinger F (2001) Heat shock proteins in the photobiology of human skin. J. Photochem Photobiol 63:70–77

Vasilyeva LA, Bubenshchikova EV, Ratner VA (1999) Heavy heat shock induced retrotransposon transposition in *Drosophila*. Genet Res 74:111–119

Vehniäinen E-R, Vähäkangas K, Oikari A (2012) UV-B exposure causes DNA damage and changes in protein expression in northern pike (*Esox lucius*) posthatched embryos. Photochem Photobiol 88:363–370. doi:10.1111/j.1751-1097.2011.01058.x

Wicker T, Sabot F, Hua-Van A et al (2007) A unified classification system for eukaryotic transposable elements. Nat Rev Genet 8:973–982. doi:10.1038/nrg2165

Yamanaka S, Mehta S, Reyes-Turcu FE, Zhuang F et al (2013) RNAi triggered by specialized machinery silences developmental genes and retrotransposons. Nature 493:557–560. doi:10.1038/nature11716

Effects of heat and UV radiation in the mobilization of transposon *mariner-Mos1*

Cell Stress and Chaperones

Sinara Santos Jardim[1], André Passaglia Schuch[1], Camila de Moura Pereira[1], Elgion Lucio Silva Loreto[1,2*]

[1]Postgraduate Program in Animal Biodiversity, Federal University of Santa Maria, Center of Natural and Exact Sciences, University of Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil.

[2] Department of Biochemistry and Molecular Biology, University of Santa Maria, Ave. Roraima, 1000, building 16-A, 3210, Santa Maria, 97105-900, RS, Brazil.

* Corresponding author

E-mail: elgion@base.ufsm.br

Table S1. Primer sequences used for gene amplification in RT-qPCR analyses.

MAR 308_F	5' GTGAACGGTGGTTTCAACG 3'
MAR 490_R	5' AGCGATTGGAAACTGCTTGT 3'
HSP70_F	5' GCTGACGTTCAGGATTCCAT 3'
HSP70_R	5' CGGAGTCTCCATTCAGGTGT 3'
EF1_F*	5' CAAGCCAGGCATGGTCGTC 3'
EF1_R*	5' ACGGACACGTTCTTCACGTT 3'
RPL17_F*	5' CCCTCCTTTTCGTTTTCGTT 3'
RPL17_R*	5' GTGTTGTCGGCACAGTTCAT 3'
GPDH_F*	5' GAGGTGGCTGAGGGCAACTT 3'
GPDH_R*	5' AACCTCCACGGCATCAGCAT 3'

F: forward primer, R: reverse primer

*Genes used for mRNA normalization input

Re-analysis of promoter region of *mariner-Mos1* element.

Nowadays more sequences and new bioinformatics tools are available for gene sequences analysis. For these reasons we have re-analyzed the promoter regions of *mariner-Mos1* element. The core promoter elements were described by Jacobson et al. (1986) and the putative heat-shock element (HSE) by Chakrani et al. (1993) These authors performed a search for the consensus sequence of HSE (CTgGAAtnTTCtAG) in sequences of *Hsp* genes (*Hsp22*, *Hsp23, Hsp26, Hsp27, Hsp27, Hsp68, Hsp68, Hsp83* and *Hsp70*) of *Drosophila* and compared with element *copia*. Chakrani et al. (1993) found 57% of homology among the sequence consensus and *mariner-Mos1*.

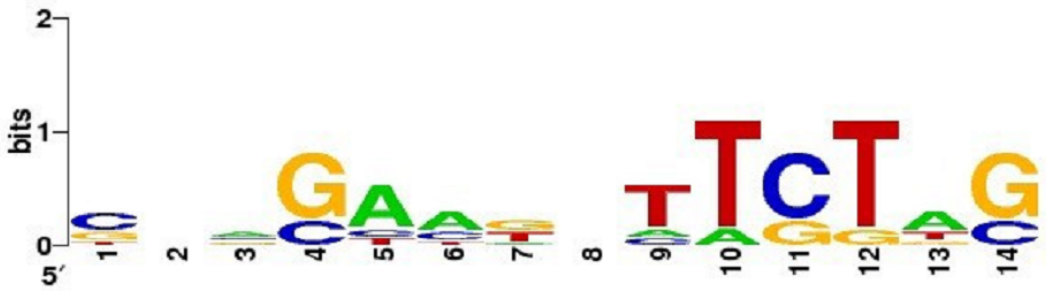
We performed this analysis again. First, the sequences of all *Hsp* genes above were downloaded from database (Flybase) and confirmed by BLAST in the database *D. simulans* genome (GenBank), consisting our sequence dataset. After, using the UGENE software (Okonechnikov et al. 2012) we searched for the sequence of HSE described by Strand and McDonald (1985)(CtgGAAtnTTCtAG) and the canonical HSE sequence nTTCnnGAAnnTTCn (Åkerfelt et al. 2010) in our dataset. We identified the HSE in each gene, and the frequency of each acid nucleic was calculated with the applicative WebLogo (Crooks et al. 2004).

As can be seen in the Figure 1S, we found a HSE for *Drosophila Hsp* genes similar as previously described by Strand and McDonald (1985) CtgGAAtnTTCtAG. The Drosophila HSE maintains partial similarities with the canonical HSE (nTTCnnGAAnnTTCn).

The analyzes in the *mariner-Mos1* 5' UTR region allow us find the region previously described by Chakrani et al (1993), with 57% of homology with HSE consensus or 86% if considering variations observed in conserved sites. A new putative HSE was found in 63 bp downstream of the first one (Fig2S). Although there are differences to the former, the homology of this new HSE with the HSE consensus is also 57%.

The putative promoter core elements of *mariner-Mos1* are also indicated in Fig 2S. Judging by our *in silico* analysis, the *mariner-MOS1* element has a promoter region that can be activated by heat-shock factor (HSF), as previously suggested by Chakrani et al (1993).

A



B

Figure 1S- A) LOGO sequence of *Drosophila* Heat-shock Elements (HSE) obtained in our analysis; B) Canonical HSE (Åkerfelt et al 2010) .

*5'**ccaggtgtacaagtaggGAATgTcGGTt**cgaacatatagatgtctcgcaaacgtaaatatttaccgattgtcataaaa*
ctttgaccttgtGAAGtgTCaACcttgactgtcgaaccaccatagtttggcgcaaattgagcgtcataattgttttctctcagtg
cagtcaacatgtcga…3'

Fig 2S. **Heat-shock elements (HSE) in the 5' UTR *mariner-Mos1* sequence**. Terminal Inverted Repeated (TIR), bold letters; HSE described by Chakrani et al (1993), highlighted in blue; new HSE, yellow; The core promoter elements are underlined (in order: TFIIB recognition element, TATA box, initiator and start codon.

References

Åkerfelt M, Morimoto R I, Sistonen L (2010) Heat shock factors: integrators of cell stress, development and lifespan. Nature Reviews. Molecular cell Biology 11: 545-555

Chakrani F, Capy P, David JR (1993) Developmental temperature and somatic excision rate of *mariner* transposable element in three natural populations of *Drosophila simulans*. Genet Sel Evol 25: 121-132

Crooks GE, Hon G, Chandonia JM, Brenner SE (2004) WebLogo: a sequence logo generator. Genome Res 14:1188–1190

Jacobson JW, Medhora MM, Hartl DL (1986) Molecular structure of a somatically unstable transposable element in *Drosophila.* Proc Natl Acad Sci USA 83: 8684-8688

Okonechnikov K, Golosova O, Fursov M, the UGENE team (2012) Unipro UGENE: a unified bioinformatics toolkit. bioinformatics 28: 1166-1167. doi:10.1093/bioinformatics/bts091

Strand DJ, McDonald JF (1985) *Copia* is a transcriptionally responsive to environmental stress. Nucleic Acids Res 13: 4401-4410

4 ARTIGO 2 - TRANSPOSABLE ELEMENT *mariner-mos1* IS NOT INDUCED BY CHEMICAL STRESS IN *Drosophila simulans*

Sinara Santos Jardim[1], André Passaglia Schuch[1,2], Elgion Lucio Silva Loreto[1,2*]

[1]Postgraduate Program in Animal Biodiversity, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil.

[2] Department of Biochemistry and Molecular Biology, Federal University of Santa Maria, Ave. Roraima, 1000, building 16-A, 3210, Santa Maria, 97105-900, RS, Brazil.

* Corresponding author

E-mail: elgion@base.ufsm.br

Abstract

In the *Drosophila simulans* genome the DNA transposon *mariner-Mos1* is able to transpose both in germ and somatic cells. Despite growing evidence of somatic transposition, little is known about the effect of stress in this phenomenon and the mechanisms that triggers the activation of transposition when the individual transposable element is submitted to stressful conditions. Here, we evaluated if the *mariner-Mos1* can be transposed in the *Drosophila simulans white-peach* lineage after stress chemical. This mutant lineage allows the phenotypic study of *mariner-Mos1* transposition activity through the formation of mosaic eyes. Firstly, the lineage diet was supplemented with different doses of paraquat (0.25-2.0mM) and the embryos were maintained until become adult flies in order to perform the phenotype analysis. These data were complemented by analysis of RT-qPCR to quantify the relative expression of the element, *Hsp70* and *Sod* genes in different times after treatment (6 and 24h). The results showed that even the higher dose (2mM) did not induced transposition. The mRNA analysis corroborates the phenotype, since *mariner-Mos1* transcription levels did not increased after this stress, indicating that paraquat doses did not induce the activation of *mariner-Mos1* transcription. In contrast, *Sod* mRNA levels (the positive control for generation of reactive oxygen species) increased in the higher dose. In addition, *Hsp70* expression was very high in all paraquat doses. Thus, we suggest that different pathways could be modulating the activation of *Hsp70* and *mariner-Mos1* under oxidative stress. Furthermore, we suggest that

the damages caused by oxidative stress can activate the *mariner-Mos1* silencing machinery in somatic cells.

Keywords: Sod. HSP. Paraquat. Transposition. *white-peach.*

Introduction

Proper adaptation to stress is essential for the survival of any organisms in face to environmental changes. At cellular level, there are sensing and signal transduction mechanisms responsible for appropriate adaptive responses (NADAL et al., 2011). Specific Transposable Elements (TEs) are also able to respond to adverse environmental conditions, which can induce changes in TEs' gene expression and transposition activity (GUERREIRO, 2012). Furthermore some TEs may play a role in environmental adaptation, inserting themselves next to genes involved in responses to oxidative stress and up regulating those (GUIO et al., 2014).

The TE integration may occur in different genome regions, and as consequence it can cause rearrangements, deletions and mutations that are harmful to the organism (FESCHOTTE and PRITHAM, 2007). In somatic tissues (EICKBUSH; EICKBUSH, 2011), transposition has the potential to be evolved in diseases in human brain (BAILLIE et al., 2011), neuronal decline in *Drosophila* (LI et al., 2013) and cancer (HELMAN et al., 2014). Furthermore, genomic instability in somatic cells increases with aging of the organism follow by evidences of accumulation of mutations generated by TEs (STURM et al., 2015). However, the hosts have defense mechanisms against the establishment of multiply TEs copies, such as the heterochromatinization or epigenetic silencing through RNAi (YAMANAKA et al., 2013; CREASEY et al., 2014).

The mobility is the principal feature of TEs, and the *mariner-Mos1* element has a transposition mechanism well described to be investigated. It is a Class II DNA transposon that excises itself from a site to be integrated into another one in the genome (WICKER et al., 2007). In addition, *mariner-Mos1* has terminal inverted repeats (TIRs) sequences present in the end of each extremity that act as recognition sites for the enzyme transposase that is essential to transposition (WICKER et al., 2007). The *mariner-Mos1* TIR sequences have a homology of 57% with the *Hsp70* gene (CHAKRANI et al., 1993). This region in the *Hsp70*

gene belongs to conserved sequences called heat shock elements (HSEs) which are recognized by the heat shock factors (HSFs). Therefore, it is suggested that *mariner-Mos1* can be co-activated with *Hsp* genes, due to the action of HSFs (CHAKRANI et al., 1993; JARDIM et al., 2015).

For the study of *mariner-Mos1* transposition the *Drosophila simulans white-peach* mutant strain is a peculiar tool because it displays the somatic mobilization of the element through the eyes phenotype, which is affect by mobilization (MEDHORA et al., 1991). The mutation is characterized by an insertion of a *mariner-Mos1* inactive copy (no autonomous) in the promoter region of the gene *white*. This copy is unable to produce the enzyme for its mobilization but it conserves the regions recognized by transposase (the TIRs). However, the presence of other active copy (autonomous) may provide the transposase and promote the excision of the no autonomous copy. Thus, when these processes occur in somatic cells the gene *white* return to the wild phenotype (red pigment) and spots appear in the eyes in the context called *white-peach* (CAPY et al., 1990).

In this study we used paraquat (1,1-dimethyl-4,4-bipyridinium dichloride) a common generator of radical oxidative species (ROS) in recent studies with *Drosophila melanogaster* (KRŮČEK et al., 2014; HOSAMANI; MURALIDHARA, 2013).Paraquat reacts with molecular oxygen generating superoxide anion (O_2^-), which in the presence of iron ions may participate in Fenton's reaction (SANTOS et al., 2011; RZEZNICZAK et al., 2011; SMITH, 1987). This reaction produces hydroxyl radical ($OH^{\cdot}$) leading to lipid peroxidation, DNA and protein damage, which can result in mutations or cell death (SMITH, 1987). Furthermore, as a consequence of paraquat exposure there is an increase of the antioxidant enzymes activity, such as manganese-superoxide dismutase (Mn-SOD) that catalyzes the O_2^- detoxification in *D. melanogaster* (HOSAMANI; MURALIDHARA, 2013). In this context, there is only limited evidence showing patterns of TEs activation under chemical stress, such as the transposon *Crawler* of the *TC1/mariner* superfamily in fungus, (OGASAWARA et al., 2009), retrotransposons in the fungus *Magnaporthe grisea* and *Magnaporthe oryzae* (IKEDA et al, 2001; CHADHA; SHARMA, 2014), and *P* element in *Drosophila melanogaster* (BLOUNT et al., 1985).

Therefore, here we evaluated the paraquat action in the induction of chemical stress in *D. simulans white-peach* and its action on the activation of *mariner-Mos1* transposition, and expression of *Hsp70* and *Sod* to observe a possible co-activation to both sequences under chemical stress.

Material and Methods

Drosophila culture and manipulation

Isolines of flies *Drosophila simulans white-peach test* (*Dswp-test*) were used to evaluate the *mariner-Mos1* activity after chemical stress thought molecular and phenotypic analysis. This isoline contains two kinds of *mariner-Mos1* copies (inactive and active) and was created in our lab from the *Drosophila simulans white-peach* stock lineage: Females of stock lineage, which has only the *mariner-Mos1* inactive copy, were crossing with wild type males of *D. simulans* (lineage collected in the city of Brasília, Brazil, that contend active copies). In the F2 generation, it was established an isoline carrying both type of copies that has 1.84 (±0.83) *mariner-Mos1* copies (JARDIM et al., 2015). For the treatments with paraquat, it was used the second larvae instar because it is less sensitive to manipulation than the first instar, and also not so advanced in the development as the third instar. *Dswp-test* stock was reared at 20°C on cornmeal medium with dry yeast.

Evaluation of somatic transposition

To evaluate if the chemical stress can induce *mariner-Mos1* transposition it was quantified the red spots on the mosaic eyes of adult flies. For this analysis, it was observed the number of red spot in both eyes, and the flies were classified in different levels related to the number of spots: level 0, without spots; level 1, 1 to 4 spots; level 2, 5 to 10 spots; level 3, more than 10 spots. Furthermore, which spot represent one transposition event of *mariner-Mos1* (JARDIM and LORETO, 2011).

Exposure to chemical stress

To evaluate if chemical stress is able to activate *mariner-Mos1* transposase transcription and to induce *mariner-Mos1* mobilization, groups of embryos were maintained in culture medium supplemented with different doses of paraquat (three independent experiments). Initially, a set of stock flies *Dswp-test* was maintained for 4 hours in the culture medium for oviposition with paraquat to evaluate the mobilization though the phenotype of

flies. The embryos were maintained at 20°C for development until adult flies. The paraquat doses used in this work were: 0.0mM (control); 0.25mM, 0.50mM, 1.0mM, 2.0mM and 3.0mM. The paraquat used was [dichloride (1,1-dimethyl-4,4-bipyridinium)], (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA).

The other set of flies produced embryos in culture medium without paraquat and when its respective larvae becoming the 2° instar (+- 5 days) were transferred to culture medium with 1mM or 2mM paraquat. This procedure was performed to evaluate the transposase transcriptions after the stress. These larvae were kept under these conditions for 6 and 24 hours before performing gene expression analysis of *mariner-Mos1, Hsp70, Sod* and reference genes by RT-qPCR.

RNA extraction and cDNA synthesis

The mRNA was extracted from a set of 50 larvae with TRIzol® Reagent (Invitrogen, CA, USA) after feeding them for 6 and 24 hours with a medium supplemented with paraquat (0,0mM/control, 1mM e 2mM). The RNA quality was checked in 1% agarose gel electrophoresis and quantified using a NanoDrop 2000 Spectrophotometer (Thermo Scientific, USA). Furthermore, the RNA samples were treated with DNaseI (Promega, USA). The cDNA synthesis was performed with M-MLV reverse transcriptase enzyme (Invitrogen, CA, USA) and oligo-dT primers. Were performed three independent experiments.

Gene expression analysis

The expression of *mariner-Mos1* transposase, superoxide dismutase (*Sod*), and Hsp70 genes was assed using RT-qPCR method performed on a StepOnePlus^{TM} Real-Time PCR System (Applied Biosystems, USA). The reaction was carried out in a final volume of 20 µl containing 0.25 U Platinum Taq DNA Polymerase (Invitrogen, CA, USA), 1X PCR reaction buffer, 3 mM $MgCl_2$, 25 µM dNTPs, 0.2 µM of each reverse and forward primer, 1X SYBR Green (Molecular Probes, USA) and 10 µl of diluted cDNA (1:100). The parameters of RT-qPCR amplification were: 95°C for 7 minutes, followed by 40 cycles of 94°C for 15 seconds, 60°C for 15 seconds and 72°C for 20 seconds. Normalization input was performed with reference genes RPL17q2, EF1 and GPDH. All primers sequences are described in

supplementary material (Table S1). The relative gene expression was based on $2^{\wedge-\Delta\Delta cq}$ (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001) using the Cq values.

Results

Effect of different doses of paraquat on somatic transposition

After exposure to chemical stress, it was performed phenotypic analysis of the spots number in the eyes of flies to evaluate the *mariner-Mos1* transposition levels. This result is presented in Figure 1. All paraquat doses did not induce high levels of somatic activity of *mariner-Mos1* (5-10 and +10). The level 1-4 is the basal rate of *mariner-Mos1* somatic transposition (JARDIM et al., 2015).

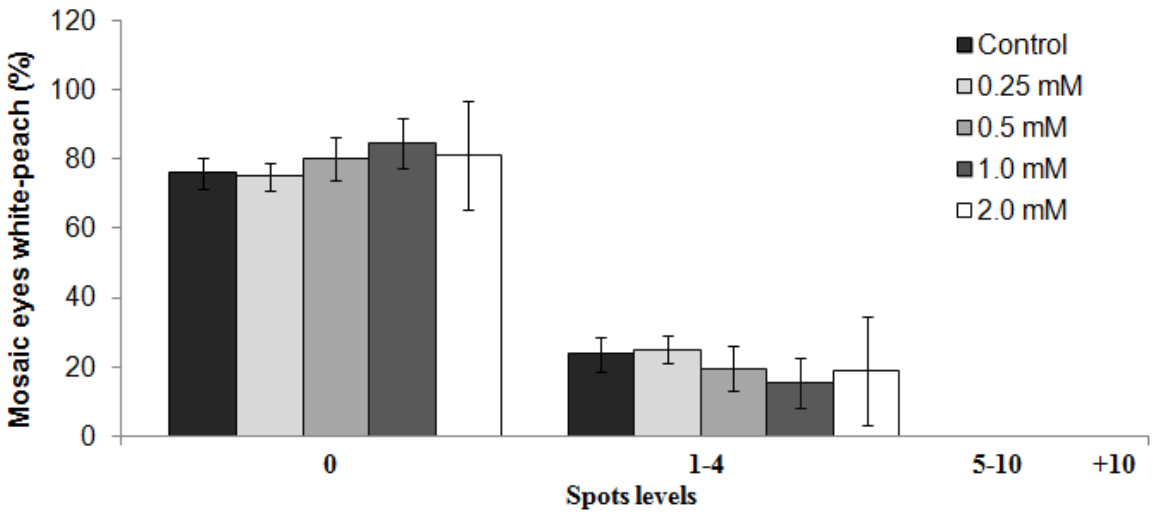


Figure 1: Frequency of mosaic eyes (with red spots) after treatments with different doses of paraquat. Average percentage of each level of mosaic eyes and its standard deviation (three independent experiments). The embryos *Dswp-test* were maintained until adult flies at medium culture supplemented with doses of paraquat (0.25-2.0mM/5g).

In addition, the higher paraquat dose (3mM) was considered lethal because very few flies survived. Thus, we could not perform this analysis properly and the dose did not

included in the analysis. The total flies that hatched in each level after treatments is shown in supplementary material (table S2).

Gene expression

The relative expression of *mariner-Mos1* transposase, *Hsp70* and *Sod* genes after exposure to chemical stress is shown in figure 2.

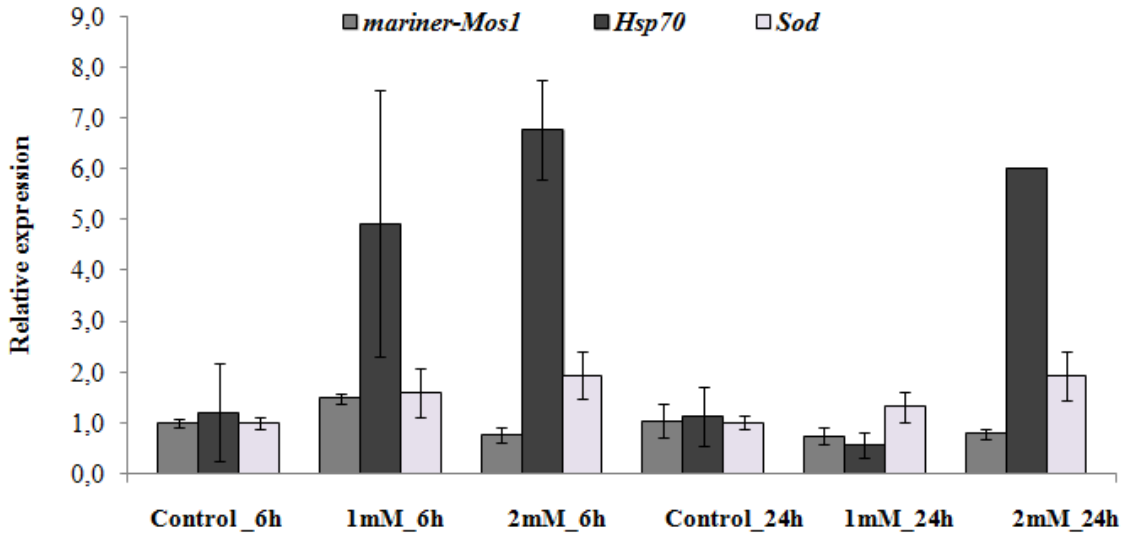


Figure 2: Relative expression of *mariner-Mos1*, *Hsp70* and *Sod* genes after treatment with paraquat doses. Average and standard deviation from three independent experiments. The input normalization was performed with the reference, RPL17q2 gene. The larvae were maintained at medium culture supplemented with doses of paraquat (1mM or 2mM) and maintained for 6 or 24 h. After RNA extraction, cDNA and expression protocols were performed.

The expression of *Sod* gene increased after the exposure to both paraquat doses and in both tested periods. However, a significant increase only occurred under the higher dose. In relation to *Hsp70*, curiously, in 1mM_6h occurred an increase in the expression, but it returned to the control level in the 1mM_24h. In addition, a significant increased occurred in after the exposure to the higher dose at 6h and 24h. This increase was about seven-fold higher

than control sample. For the *mariner-Mos1* relative expression, an increase only occurred in dose of 1mM_6h, but it was only 0.5-fold higher than control. The other doses were similar to the control levels. The relative expression was calculated with all control genes and it is shown in supplementary material (table S3).

Discussion

Recently, our group has evaluated the effects of mild heat and UV radiation stress on the mobilization of transposon *mariner-Mos1* in *Drosophila simulans white-peach* (JARDIM et al., 2015). In the present study, we decided to evaluate if the somatic transposition of *mariner-Mos1* is induced by chemical stress, by exposition of flies to paraquat. However, our phenotypic analysis (Fig. 1) clearly shows that there is no evidence of transposition under this condition. On the other hand, when of the *Drosophila simulans white-peach* (*Dswp-test*) strain is exposed to mild heat the *mariner-Mos1* somatic transposition is activated; but not when it is exposed to UVC radiation. Curiously, both mild heat and UVC activate the transcription of *Hsp70* gene. Probably, the pattern of co-activation of *mariner-Mos1* and *Hsp70* could be different under both stress conditions (JARDIM et al., 2015).

Despite our results do not indicate cell damage induction by the paraquat doses, the elevated levels of *Sod* expression represents a good positive control of the cellular defense against paraquat exposure (Fig 2). In relation to paraquat doses, it is commonly used higher doses to induce chemical stress in adult flies of *D. melanogaster* (10-30mM) (HOSAMANI; MURALIDHARA 2013; RZEZNICZAK et al., 2011). Nevertheless, *Dswp-test* showed to be very sensitive to higher doses since the survival was extremely low in 3.0mM (table S2). The paraquat exposure may also generate DNA strand breaks, which can be detected by comet essay (MEHDI; QAMAR, 2013). Chromosome breaks could be a candidate to promote transposition of TEs, since transposition was previously associated with chromosomal breaks (ARNAULT et al., 1991).

Then, we tested if the damage caused by chemical stress could induce the expression of *Hsp70* gene and co-activate the transcription of *mariner-Mos1*. The element has indeed its somatic transposition positively regulated by temperature (JARDIM et al., 2015). Furthermore, the transcriptional regulation of *mariner-Mos1* may be dependent on the recognition of its own homologous sequences to the *hsp* genes promoters by the heat shock factors (CHAKRANI et al., 1993; JARDIM et al., 2015). However, our results show that

mariner-Mos1 cannot be co-activated with *Hsp70* under chemical stress, since only *Hsp70* have its expression positively regulated after the stress (Fig 2).

An important point is that the facto of not have increased transcription of *mariner-Mos1* under chemical stress can be related to the suppression of TEs transcripts by small RNA interference (Fig S1). The activity of transposable elements in stressful conditions may be modulated by mRNA silencing mechanisms. In *Drosophila*, the siRNA can silences TEs in somatic tissues (XIE et al., 2013), and the piRNA silence TEs in germline and somatic ovary tissues (MALONE et al., 2009). In the closely related species to *D. simulans*, *D. erecta*, there are piRNAs plotted over the putative flamenco cluster, which includes the *mariner-Mos1* sequence (MALONE et al., 2009). In addition, heat shock can modulate piRNA originated from clusters in germ cells of *Drosophila melanogaster* (FUNIKOV et al., 2015). Therefore, it opens new perspectives to evaluate the activation of small RNA interference under different damaging condition, such as chemical stress and UV exposure, as well as its action on *mariner-Mos1* silencing.

Acknowledgments: We thank all the members from the LabDros laboratory at the Federal University of Santa Maria for the support during the realization of the current study and CNPq and CAPES for financial support.

References

ARNAULT, C. Environmental stresses and mobilization of transposable elements in inbred lines of *Drosophila melanogaster*. **Mutat Res**. v. 248, p. 51-60. 1991.

BAILLIE, J.K. et al. Somatic retrotransposition alters the genetic landscape of the human brain. **Nature**. v. 479, p.24. 2011.

BLOUNT, J.L. Interaction between mobile DNA-element-induced lethal mutations and chemical mutagens in the hybrid dysgenic system of *Drosophila melanogaster*. **Mutat Res**. v.149, p.33-40. 1985.

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

CHADHA, S.; SHARMA, M. Transposable elements as stress adaptive capacitors induce genomic instability in fungal pathogen *Magnaporthe oryzae*. **PLoS ONE** v. 9(4):e94415. doi:10.1371/ journal.pone.0094415. 2014.

CHAKRANI, F.; CAPY, P.; DAVID, J.R. Developmental temperature and somatic excision rate of *mariner* transposable element in three natural populations of *Drosophila simulans*. **Genet Sel Evol**. v.25,p.121-132. 1993.

CREASEY, K.M. et al miRNAs trigger widespread epigenetically activated siRNAs from transposons in *Arabidopsis*. **Nature** . v. 508, p.411–415. doi:10.1038/nature13069. 2014.
Drosophila. Arch Insect Biochem Physiol. v.0, p. 1-14. 2014.

EICKBUSH, M.T.; EICKBUSH, T. H.: Retrotransposition of R2 elements in somatic nuclei during the early development of *Drosophila*. **Mobile DNA**. v.2, p.1-5. 2011.

FESCHOTTE, C.; PRITHAM, E.J. DNA Transposons and the evolution of eukaryotic genomes. **Annual Review of Genetics**, v. 41, p. 331-368. 2007.

FUKUSHIMA, T et al. Mechanism of cytotoxicity of paraquat. **Environ Health Prev Med**. v.7, p.89–94. 2002.

FUNIKOV, S.Y. et al. The peculiarities of piRNA expression upon heat shock exposure in *Drosophila melanogaster*. **Mob Genet Elements**. doi: 10.1080/2159256X.2015.1086502. 2015.

GIRAUD, T.; CAPY, P. Somatic activity of *mariner* transposable element in natural populations of *Drosophila simulans*. **Proc. R. Soc. Lond. B**. v. 263, p.1481-1486. 1996.

GUERREIRO, M.P. What makes transposable elements move in the *Drosophila* genome? **Heredity**. v.108,p. 461-468. doi:10.1038/hdy.2011.89. 2012.

GUIO, L.; BARRÓN, M.G.; GONZÁLEZ, J. The transposable element *Bari-Jheh* mediates oxidative stress response in *Drosophila*. **Mol Ecol**.v.23, p. 2020–2030. 2014.

HELMAN, E. et al. Somatic retrotransposition in human cancer revealed by whole-genome and exome sequencing. **Genome Res** v. 24, p. 1053–1063. 2014.

HOSAMANI, R.; MURALIDHARA. Acute exposure of *Drosophila melanogaster* to paraquat causes oxidative stress and mitochondrial dysfunction. **Arch Insect Biochem Physiol**. doi: 10.1002/arch.21094. v.83, p. 25–40. 2013.

IKEDA, K. et al. Heat shock, copper sulphate and oxidative stress activate the retrotransposon MAGGY resident in the plant pathogenic fungus *Magnaporthe grisea*. **Mol Genet Genomics**. v. 266, p.318–325. doi:10.1007/s004380100560. 2001.

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

JARDIM, S. S.; Schuch, A. P.; Pereira, C. M.; LORETO, E.L.S. Effects of heat and UV radiation on the mobilization of transposon *mariner-Mos1*. **Cell Stress Chaperones.** Published online. 2015.

KRŮČEK, T.; et al. Effect of low doses of herbicide paraquat on antioxidant defense in

LESSER, M. P. oxidative stress in marine environments: biochemistry and physiological ecology. **Annu. Rev. Physiol**. v.68, p. 253–278. 2014.

LI, W. et al Activation of transposable elements during aging and neuronal decline in *Drosophila*. **Nat Neurosci**. doi:10.1038/nn.3368. 2013.

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. doi:10.1006/meth.2001.1262. 2001.

MALONE, C.D. et al Specialized piRNA Pathways ActinGermlineand SomaticTissues of the Drosophila Ovary. **Cell**. v. 137, p. 522–535. 2009.

MEDHORA, M.; MARUYAMA, K.; HART, D.L. Molecular and Functional Analysis of the *mariner* Mutator Element *Mos1* in Drosophila. **Genetics**. v.128, p. 311-318. 1991.

MEHDI, S.H.; QAMAR, A. Paraquat-induced ultrastructural changes and DNA damage in the nervous system is mediated via oxidative-stress-induced cytotoxicity in *Drosophila melanogaster*. **Toxicol Sci**. v. 134, p. 355–365. 2013.

NADAL, E.; Ammerer, G.; Posas, F. Controlling gene expression in response to stress. **Nat Rev Genet**. v.12, p.833-845. 2011.

OGASAWARA, H. et al. *Crawler*, a novel *Tc1/mariner*-type transposable element in *Aspergillus oryzae* transposes under stress conditions. **Fungal Genet Biol**. v.46, p. 441–449. doi:10.1016/j.fgb.2009.02.007. 2009.

PISOSCHI, A.M.; POP, A. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. **Eur J Med Chem**. v. 97, p. 55-74. 2015.

RZEZNICZAK,T.Z. et al. Paraquat administration in *Drosophila* for use in metabolic studies of oxidative stress. **Anal Biochem**. v.419, p. 345–347. 2011.

SANTOS, M. S.F.; ALVEZ, A.; MADEIRA, L.M. Paraquat removal from water by oxidation with Fenton's reagent. **Chem Eng J**. v.175, p. 279– 290. 2011.

SMITH, L.L. Mechanism of paraquat toxicity in lung and its relevance to treatment. **Human Toxicol**. v. 6, p. 31-36. 1987.

STURM, A.; IVICS, Z.; VELLAI, T. The mechanism of ageing: primary role of transposable elements in genome disintegration. **Cell. Mol. Life Sci**. v. 72, p. 1839–1847 doi 10.1007/s00018-015-1896-0. 2015.

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

XIE, W.; DONOHUE, R.C.; BIRCHLER, J.A. Quantitatively increased somatic transposition of transposable elements in *Drosophila* strains compromised for RNAi. **PLoS ONE**. v.8(8): e72163. doi:10.1371/journal.pone.0072163. 2013.

YAMANAKA, S. et al RNAi triggered by specialized machinery silences developmental genes and retrotransposons. **Nature**. v.493, p.557–560. doi:10.1038/ nature11716. 2013.

Supporting Information

Table S1. Primer sequences used for gene amplification in RT-qPCR analyses.

EF1_F*	5’ CAAGCCAGGCATGGTCGTC 3’
EF1_R*	5’ ACGGACACGTTCTTCACGTT 3’
GPDH_F*	5’ GAGGTGGCTGAGGGCAACTT 3’
GPDH_R*	5’ AACCTCCACGGCATCAGCAT 3’
HSP70_F	5’ GCTGACGTTCAGGATTCCAT 3’
HSP70_R	5’ CGGAGTCTCCATTCAGGTGT 3’
MAR 308_F	5’ GTGAACGGTGGTTTCAACG 3'
MAR 490_R	5’ AGCGATTGGAAACTGCTTGT 3’
RPL17_F*	5’ CCCTCCTTTTCGTTTTCGTT 3’
RPL17_R*	5’ GTGTTGTCGGCACAGTTCAT 3’
SOD_F	5’GGAGTCGGTGATGTTGACCT 3’
SOD_R	5’ GTTCGGTGACAACACCAATG 3’

Legend: F: forward primer, R: reverse primer. *Genes used for mRNA normalization input

Table S2. Total of individual analyzed in each independently replica and classified by spots level in the different treatments.

Spots levels		Replicas	
Control	A	B	C
0	72	44	63
1-4	16	17	21
5-10	0	0	0
+10	1	0	0
Total absolute	89	61	84
0.25mM			
0	52	47	73
1-4	18	19	19
5-10	0	0	0
+10	0	0	0
Total absolute	70	66	92

Spots levels	Replicas		
	A	B	C
0.5mM			
0	71	51	80
1-4	11	18	19
5-10	0	0	1
+10	0	0	0
Total absolute	82	69	100
1.0mM			
0	66	93	82
1-4	17	7	18
5-10	0	0	0
+10	0	0	0
Total absolute	83	100	100
2.0mM			
0	57	69	97
1-4	25	23	1
5-10	0	0	0
+10	0	0	0
Total absolute	82	92	98
3.0mM			
0	10	10	9
1-4	2	0	1
5-10	0	0	0
+10	0	0	0
Total absolute	12	10	10

Table S3. Average and standard derivation of relative expression of *mariner-Mos1*, *Hsp70* and *Sod* genes after paraquat treatments.

A)

	Control	SD ±	1mM_6h	SD ±	2mM_6h	SD ±
RPLQ2						
MAR	1	0.08	1.49	0.1	0.78	0.15
HSP70	1.21	0.97	4.92	2.62	6.77	0.97
SOD	1	0.12	1.59	0.48	1.93	0.47
EF1						
MAR	1.00	0.07	1.75	0.05	1.12	0.56
HSP70	1.22	0.98	5.96	3.67	10.87	8.36
SOD	1.00	0.11	1.84	0.38	3.20	2.68
GPDH						
MAR	1.10	0.65	1.66	0.07	1.09	0.13
HSP70	1.03	0.36	5.69	3.55	9.56	2.07
SOD	1.11	0.69	1.75	0.34	2.74	0.86

B)

	Control	SD ±	1mM_24h	SD ±	2mM_24h	SD ±
RPLQ2						
MAR	1.04	0.34	0.74	0.18	0.78	0.10
HSP70	1.11	0.58	0.56	0.24	6.00	0.00
SOD	1.01	0.14	1.33	0.30	1.94	0.48
EF1						
MAR	1.01	0.12	1.27	0.70	0.61	0.16
HSP70	1.11	0.58	1.06	0.83	5.21	0.00
SOD	1.10	0.56	3.03	0.67	1.48	0.17
GPDH						
MAR	1.04	0.33	0.67	0.12	0.75	0.02
HSP70	1.06	0.41	0.52	0.26	5.30	0.00
SOD	1.03	0.29	1.20	0.26	1.92	0.75

Legend: Table S1. The input normalization was performed with the reference, RPL17q2, EF1 and GPDH genes independently. The larvae (second instar) were maintained at medium culture supplemented with doses of paraquat (1mM or 2mM) **A)** and maintained for 6 hours or **B)** 24h after RNA extraction, cDNA and expression protocols were performed. The method used were $2^{\wedge-\Delta\Delta cq}$ (LIVAK; SCHMITTGEN 2001) Standard derivation, SD.

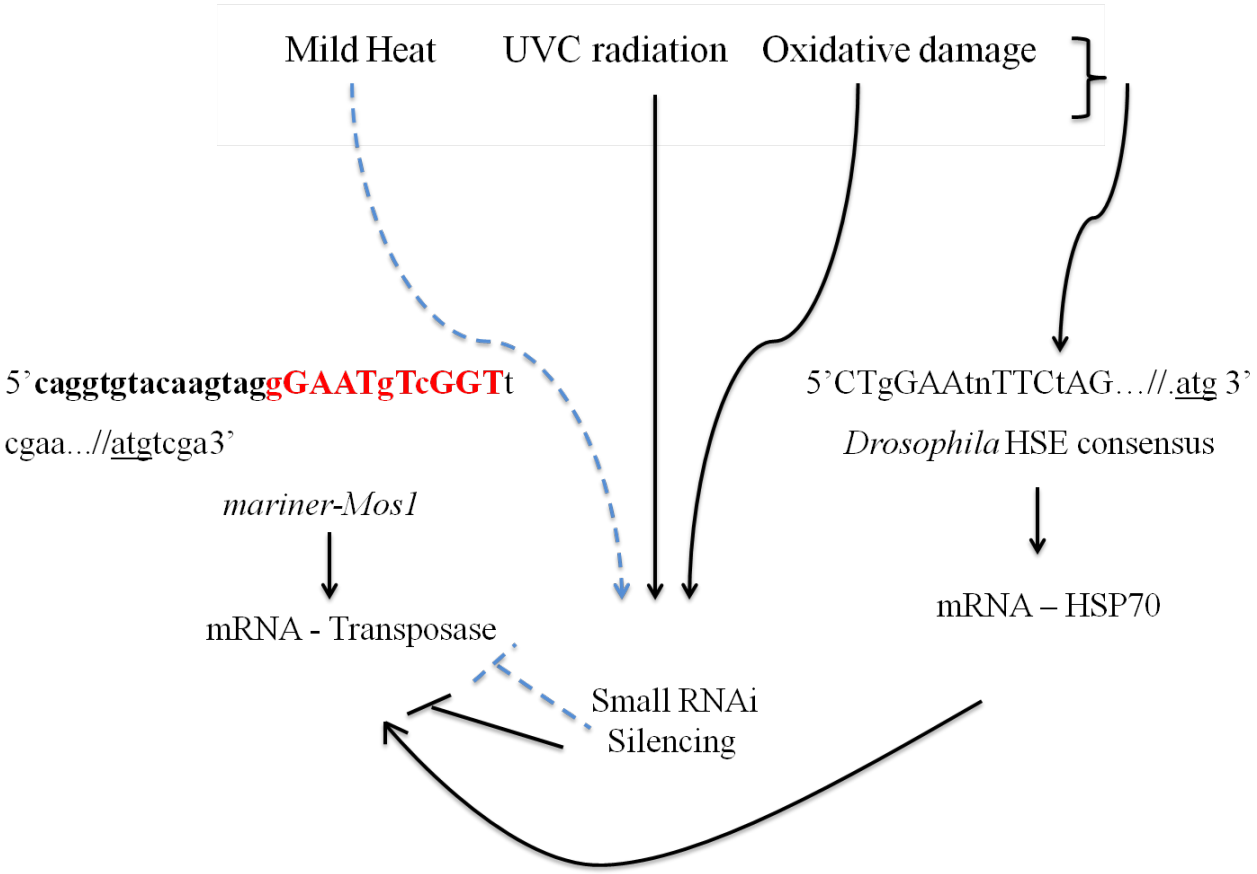


Figure S1: Putative *mariner-Mos1* regulation mechanism involving stress conditions. The damage induced by mild heat, UVC radiation and oxidative stress promote the (black arrow) binding of the heat shock factor (HSF) to the heat shock elements (HSE), inducing the activation (black arrow) of the *Hsp70* transcription. The *mariner-Mos1* sequence has homology to HSE in the essential region to its transposition, suggesting that it may be possible co-activated with *Hsp70* when submitted to mild heat stress. UVC and oxidative stress also activate *Hsp70* but not *mariner-Mos1*. In this case, it seems possible that both stresses can induce the small RNAi silencing machinery (RNA interference) and degrading the element transcripts. In contrast, mild heat stress would relax this silencing making possible the *mariner-Mos1* activation (blue arrow). Legend: *mariner-Mos1*, initial sequence of *mariner-Mos1*: Terminal Inverted Repeated (TIR), (bold letters); The regions with homology with HSE (red letters) Chrakrani et al (1993), atg, start of coding region transposase. *Drosophila* HSE consensus. Sequence recognized by HSF, located within the *hsp* gene promoters.

5 CONCLUSÕES

Os elementos transponíveis podem ter diferentes papeis dentro dos genomas que os contém como se inserir próximo a genes importantes, aumentando sua expressão, e até mesmo participando positivamente em redes gênicas regulatórias. Podem também causar mutações, deleções e rearranjos, diminuindo o *fitness* do hospedeiro, ou até mesmo não terem influência, sendo neutros no genoma. A importância evolutiva de cada efeito depende do tipo celular em que ocorrem estes eventos. As transposições somáticas não são mantidas, pois não contribuem para as próximas gerações, ao contrário das transposições em células germinativas. No entanto, as transposições somáticas, podem vir a ser ativadas pela ação das mudanças ambientais, uma vez que os TEs são capazes de responderem a elas. Esta resposta às mudanças ambientais pode ser baseada na existência de promotores ou sítios de ativadores de transcrição em regiões dos TEs muito parecidas com aquelas encontradas em regiões regulatórias de genes de defesa hospedeiros, por exemplo.

Os dados gerados no primeiro capítulo desta Tese contribuíram com algumas questões em relação à ativação do elemento *mariner-Mos1* por temperatura moderada e radiação UV. O uso de cruzamentos entre *Drosophila simulans white-peach* e linhagens selvagens, já foi bastante utilizado para medir proporção de machos mosaicos e analisar a atividade do elemento *mariner-Mos1*. Neste trabalho a linhagem mutante foi adaptada para recuperar a mesma informação sem a necessidade de cruzamentos. Além disso, o uso de ferramentas moleculares atuais como o RT-qPCR e a citometria de fluxo possibilitaram uma análise mais minuciosa da maquinaria celular que poderia estar ligada a excisão e transposição do elemento em condições de estresse. Com esse tipo de abordagem fomos capazes de fazer inferências sobre a possível coativação do elemento *mariner-Mos1* e do gene de resposta ao choque térmico *Hsp70*, uma vez que o estresse por UVC foi capaz de induzir a expressão de *Hsp70*, porém, não induziu a do elemento. Assim, inferimos que a via de ativação de *Hsp70* por temperatura moderada, que também ativou *mariner-Mos1*, é diferente da via que induziu apenas *Hsp70* por UVC. Além disso, ao refazer buscas na região 5'UTR do elemento encontramos um nova sequência complementar a HSE (*heat shock element*). Esta região e a região previamente descrita com similaridade a HSE será investigada como uma possível região de reconhecimento pelo fator de transcrição de *HSP*.

O segundo capítulo visou investigar se outro tipo de estresse, como o dano químico, é capaz de induzir a atividade do elemento *mariner-Mos1*. Para indução do estresse químico,

utilizamos o composto paraquat que é capaz de gerar ânion superóxido – uma espécie reativa do oxigênio - altamente danosa às moléculas celulares. Os métodos para análises foram muito similares aos anteriores (análise do fenótipo e ensaio molecular por RT-qPCR). Contudo, os resultados revelaram que o estresse químico gerado pelo composto não induz a transposição do elemento, uma vez que o número de manchas não aumentou após os tratamentos. Interessantemente, o estresse foi capaz de regular positivamente os transcritos de *Hsp70*, mas não os de *mariner-Mos1*. Uma vez que a falta de aumento de transcritos do elemento após o estresse químico ocorre, assim como em UVC, isso nos leva a pensar que estas condições são capazes de ativar o sistema de silenciamento por RNAi.

6 PERSPECTIVAS

Este trabalho possibilitou fazer novas inferências sobre a ativação do mecanismo de transposição do elemento *mariner-Mos1* em condições estressantes. Utilizando uma linhagem mutante associada a ferramentas moleculares atuais, os resultados apontam que o elemento pode ser regulado por certo tipo de estresse e por outros não, possivelmente utilizando diferentes vias de ativação ou inativação. Além disso, levantamos a hipótese de que a falta de aumento dos transcritos, induzida por estresse químico e danos UVC pode ser devido ao papel da maquinaria de silenciamento por RNA. Porém, mais ensaios ainda precisam ser feitos para elucidar questões ligadas à transposição do elemento.

Em relação ao primeiro artigo, inferimos uma possível coativação entre o elemento e *Hsp70* devido ao fato do elemento possuir homologia com a sequência reconhecida por fatores de transcrição do gene. Ao reanalizarmos a sequência consenso dos HSE (do inglês: heat shock element) e do elemento, além da sequencia já descrita na TIR, encontramos mais uma sequência homóloga na região não codificadora. Esta região não codificante encontra-se entre a região terminal invertida (TIR) e o início da região codificante da transposase, próxima a sítios descritos como regiões promotoras de genes eucarióticos.

Para elucidar se essas sequências em mariner-Mos1 são sítios de reconhecimento do fator de transcrição de choque térmico (HSF), temos como perspectiva isolar essa região e inseri-la em um plasmídeo (o ensaio já está em andamento). O constructo contém a região da TIR com homologia à HSE (promotor) associada ao gene GFP. Ao inserir este plasmídeo em células que contenham HSF e induzir choque térmico ou qualquer outro tipo de estresse, será

possível elucidar se *mariner-Mos1* é capaz de ser ativado pela presença da região de ligação de HSF.

Outro método que está sendo realizado pelo nosso grupo de pesquisa é a imunoprecipitação da cromatina (ChIP), que estuda a associação de certas proteínas com regiões específicas do genoma. Esta técnica pode ser usada para avaliar se a sequência de *mariner-Mos1* com homologia a HSE é, de fato, um sítio de ligação de HSF ou de qualquer outro fator de transcrição.

Por fim, as evidências da falta de transposição de *mariner-Mos1* em condições de estresse também devem continuar sendo investigadas. No segundo artigo, uma importante questão foi levantada: a falta de transcritos em condições de estresse pode estar relacionada ao silenciamento de elementos transponíveis por RNAi. Assim, estas questões abrem novas perspectivas para avaliar a ativação de RNAi em condições de danos como estresse químico e radiação UV e sua ação no silenciamento de *mariner-Mos1*.

7 REFERÊNCIAS

ÅKERFELT, M.; MORIMOTO, R. I.; SISTONEN, L. Heat shock factors: integrators of cell stress, development and lifespan. **Nature Reviews Molecular cell Biology**. v. 11, p. 545-555. 2010.

BÄCHLI G. TaxoDros: The Database on Taxonomy of Drosophilidae, v.1.04, **Database** 2015/03. http://taxodros.unizh.ch/. Last accessed on 02/08/2015.

BAILLIE, J.K. et al. Somatic retrotransposition alters the genetic landscape of the human brain. **Nature**. v. 479, p.24. 2011.

BENJAMIN, B.; YVES, B.; CORINNE, A. G. Assembly of the Tc1 and *mariner* transposition initiation complexes depends on the origins of their transposase DNA binding domains. **Genetica.** v. 130, p. 105–120. 2007.

BIÉMONT, C.; VIEIRA, C. Junk DNA as an evolutionary force. **Nature.** v. 443, p. 4421-4424. 2006

BIRE, S. et al. Transposase concentration controls transposition activity: Myth or reality? **Gene.** v. 530, p. 165–171. 2013.

BLOUNT, J.L. Interaction between mobile DNA-element-induced lethal mutations and chemical mutagens in the hybrid dysgenic system of *Drosophila melanogaster*. **Mutat Res**. v.149, p.33-40. 1985.

BRYAN, G.; HARTL, D. L. Maternally inherited transposon excision in *Drosophila simulans.***Science.** v.240, p. 215-217. 1988.

CAPY, P et al. 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 Biol Sci.** v. 242, p. 57-60. 1990.

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

CHADHA, S.; SHARMA, M. Transposable elements as stress adaptive capacitors induce genomic instability in fungal pathogen Magnaporthe oryzae. **PLoS ONE** v. 9(4):e94415. doi:10.1371/ journal.pone.0094415. 2014.

CHAKRANI, F.; CAPY, P.; DAVID, J.R. Developmental temperature and somatic excision rate of *mariner* transposable element in three natural populations of *Drosophila simulans*. **Genet Sel Evol**. v.25,p.121-132. 1993.

CHEN, J. GREENBLATT,I. M.; DELLAPORTA, S. L. Molecular Analysis of Ac Transposition and DNA Replication. **Genetics**. v. 130, p. 665-676. 1992.

CORDAUX, R., et al. Birth of a chimeric primate gene by capture of the transposase from a mobile element. **Proc Natl Acad Sci U S A**. v. 103, p. 8101-8106. 2006.

DAWSON, A.; FINNEGAN, D. J. Excision of the *Drosophila* Mariner Transposon Mos1: Comparison with Bacterial Transposition and V(D)J Recombination. **Molecular Cell**. v.11, p.225–235. 2003.

DIAS, E, S.; CARARETO, C. M. A. O impacto dos elementos de transposição na evolução de sequências reguladoras e codificantes In: CARARETO, C. M. A.; MONTEIRO C. B. M.; SLUYS, M-A. V. (Org). **Elementos de Transposição**: Diversidade, evolução, aplicações e impacto nos genomas dos seres vivos. 22. ed. Rio de Janeiro: Fiocruz, 2015. cap. 3 p. 65-90.

DORNAN, J.; GREY, H.; RICHARDSON, J.M. Structural role of the flanking DNA in *mariner* transposon excision. **Nucleic Acids Res**. v.43, p. 2424-2432. 2015.

EICHENBAUM, Z.; LIVNEH, Z. UV light induces IS10 transposition in *Escherichia coli*. Genetics 149:1173–1181.1998.

EICKBUSH, M.T.; EICKBUSH, T. H.: Retrotransposition of R2 elements in somatic nuclei during the early development of *Drosophila*. **Mobile DNA**. v.2, p.1-5. 2011.

ENGELS, W. R. et al. High-frequency P element loss in *Drosophila* is homolog dependent. **Cell**. v. 62, p. 515-525. 1990.

FABLET, M. et al. Variable expression levels detected in the *Drosophila* effectors of piRNA biogenesis. **Gene**. v. 537, p. 149–153. 2014.

FEDER, M.; HOFMANN, G. E. Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: Evolutionary and ecological physiology. **Annu. Rev. Physiol**. v. 61, p. 243–82. 1999.

FESCHOTTE, C.; PRITHAM, E.J. DNA Transposons and the evolution of eukaryotic genomes. **Annu Rev Genet.** v. 41, p. 331-368. 2007.

FINNEGAN, D.J. Eukaryotic transposable elements and genome evolution. **Trends Genet**. v. 5, p. 103-107. 1989.

FRIEDBERG, E. C. DNA damage and repair. **Nature**, v. 421, n. 6921, p. 436-440, 2003.
GARZA, D. et al. Introduction of the transposable element *mariner* into the germline of *Drosophila melanogaster*. **Genetics**. v. 128, p. 303-310. 1991.

GIRAUD, T.; CAPY, P. Somatic activity of *mariner* transposable element in natural populations of *Drosophila simulans*. **Proc. R. Soc. Lond. B**. v. 263, p.1481-1486. 1996.

GRANDBASTIEN, M.A. Activation of plant retrotransposons under stress conditions. **Trends Plant Sci**. v. 3, p. 181-187. 1998.

GRANZOTTO, A.; CRUZ, G, M, Q. Regulação de elementos de transposição: Mecanismos epigenéticos de silenciamento, autorregulação e ativação por estresse. In: CARARETO, C. M. A.; MONTEIRO C. B. M.; SLUYS, M-A. V. (Org). **Elementos de Transposição**: Diversidade, evolução, aplicações e impacto nos genomas dos seres vivos. 22. ed. Rio de Janeiro: Fiocruz, 2015. cap. 4 p. 91-113.

GUERREIRO, M.P. What makes transposable elements move in the *Drosophila* genome? **Heredity**. v.108,p. 461-468. doi:10.1038/hdy.2011.89. 2012.

GUIO, L.; BARRÓN, M.G.; GONZÁLEZ, J. The transposable element *Bari-Jheh* mediates oxidative stress response in *Drosophila*. **Mol Ecol**.v.23, p. 2020–2030. 2014.

GUPTA, S. C. et al. Hazardous effect of organophosphate compound, dichlorvos in transgenic *Drosophila melanogaster* (*hsp70-lacZ*): induction of *hsp70*, anti-oxidant enzymes and inhibition of acetylcholinesterase. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects**, v. 1725, n. 1, p. 81-92, 2005.

HANEY, R. A.; Feder, M.E. Contrasting Patterns of Transposable Element Insertions in Drosophila Heat-Shock Promoters. **PLoS ONE**. v.4(12): e8486. 2009.

HARTL, D. L. Discovery of the transposable element *mariner*. **Genetics**. v. 157, p. 471–476. 2001.

HEGGLIN, M. I. et al. Twenty Questions and Answers About the Ozone Layer: 2014 Update, Scientific Assessment of Ozone Depletion World Meteorological Organization, Geneva, Switzerland, 2015. Published in January 2015 ISBN: 978-9966-076-02-1. p.84. 2014.

HELMAN, E. et al Somatic retrotransposition in human cancer revealed by whole-genome and exome sequencing. **Genome Res**. v. 24, p. 1053–1063. 2014.

HEMNANI, T.; PARIHAR, M. S. Reactive oxygen species and oxidative DNA damage. **Indian journal of physiology and pharmacology**, v. 42, p. 440-452, 1998.

HUA-VAN A. et al The struggle for life of the genome's selfish architects. **Biol Direct.** v.6, p. 1-29. 2011.

IKEDA, K. et al. Heat shock, copper sulphate and oxidative stress activate the retrotransposon

MAGGY resident in the plant pathogenic fungus *Magnaporthe grisea*. **Mol Genet Genomics**. v. 266, p.318–325. doi:10.1007/s004380100560. 2001

JACOBSON, J.W.; HARTL, D.L. Coupled instability of two linked genes in *Drosophila mauritiana*: germinal e somatic mutability. **Genetics**. v. 111, p. 57-65. 1985

JACOBSON, J.W.; MEDHORA, M. M.; HARTL, D.L. Molecular structure of a somatically unstable transposable element in *Drosophila*. **Proc Natl Acad Sci U S A**. v. 83, p. 8684-8688. 1986.

JAILLET J. et al. Regulation of *Mariner* Transposition: The Peculiar Case of *Mos1*. **PLoS ONE** v. 7(8) e43365. 2012.

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

JARDIM, S. S.; SCHUCH, A. P.; PEREIRA, C. M.; LORETO, E.L.S. Effects of heat and UV radiation on the mobilization of transposon *mariner-Mos1*. **Cell Stress Chaperones.** Published online. doi 10.1007/s12192-015-0611-2. 2015.

JEGO, G. et al. Targeting heat shock proteins in cancer. **Cancer letters**, v. 332, n. 2, p. 275-285, 2013.

JUNAKOVIC, N.et al. Transposition of *copia*-like nomadic elements can be induced by heat-shock. **J Mol Evol** v. 24, p. 89–92. 1986.

JURKA, J.et al. Repbase Update, a database of eukaryotic repetitive elements. **Cytogenet. Genome Res**. v.110, p. 462–467. 2005.

KAZAZIAN, H.H. Jr. Mobile DNA transposition in somatic cells. **BMC Biology**.v**.** 9, p. 1-4. 2011.

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

LACHAISE, D; SILVAIN, J-F. How two Afrotropical endemics made two cosmopolitan human commensals: *the Drosophila melanogaster-D. simulan*s palaeogeographic riddle. **Genetica**. v. 120, p.17–39. 2004.

LACHAISE, D. et al. Historical biogeography of the *Drosophila melanogaster* species subgroup. **Evol. Biol**. v. 22, p. 159-225. 1988.

LAMPE, D. J; CHURCHILL, M. E.A.; ROBERTSON, H. M. A purified mariner transposase is sufficient to mediate transposition in vitro. **EMBO J.** v. 15, p. 5470-5479. 1996.

LERMAN, D. N. et al. Modification of heat-shock gene expression *in Drosophila melanogaster* populations via transposable elements. **Mol. Biol. Evol**. v. 20(1), p.135–144. doi: 10.1093/molbev/msg015. 2003.

LINDQUIST, S.; CRAIG, E.A. The heat-shock proteins. **Annu Rev Genet** v. 22, p. 631–677. 1988.

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.

MACKENZIE, S. M. et al. Mutations in the *white* gene of *Drosophila melanogaster* affecting ABC transporters that determine eye colouration. **Biochim Biophys Acta**. v. 1419, p. 173-185. 1999.

MAHILLON, J.; CHANDLER, M. Insertion sequences. **Microbiol. Mol. Biol. Rev**. v. 62(3), p. 725–774. 1998.

MEDHORA, M.M.; MACPEEK, A.H.; HARTL, D.L. Excision of the *Drosophila* transposable element *mariner*: identification and characterization of the *Mos* factor. **EMBO.** v. 7, p. 2185-2189.1988.

MICHEL, B. After 30 years of study, the bacterial SOS response still surprises us. **PLoS Biol** v.3(7): e255. 2005.

MORALES, J.F.; SNOW, E.T.; MURNANE, J.P. Environmental factors affecting transcription of the human L1 retrotransposon. II Stressors. **Mutagenesis.** v. 18(2), p.151–158. doi:10.1093/mutage/18.2.151. 2003.

MYAKISHEV, M. et al. PCR-based detection of Pol III-transcribed transposons and its application to the rodent model of ultraviolet response. **Cell Stress Chaperones** v. 13, p.111–116. doi:10.1007/s12192-008-0010-z. 2008.

PICOT, S., et al. The *mariner* transposable element in natural populations of *Drosophila simulans*. **Heredity**. v. 101, p. 1–7. 2008.

PIÉGU, B. et al. A survey of transposable element classification systems – A call for a fundamental update to meet the challenge of their diversity and complexity. **Mol Phylogenet Evol.** v. 86, p. 90-109. 2015.

PISOSCHI, A.M.; POP, A. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. **Eur J Med Chem**. v. 97, p. 55-74. 2015.

PRITHAM, E.J. Transposable elements and factors influencing their success in eukaryotes. **J Heredity.** v. 100, p. 648-655. 2009.

QÜESTA, J.I.; WALBOT, V.; CASATI, P. Mutator transposon activation after UV-B involves chromatin remodeling. **Epigenetics**. v. 5, p. 352–363. 2010.

QÜESTA, J.I.; WALBOT, V.; CASATI, P. UV-B radiation induces *Mu* element somatic transposition in maize. **Mol Plant**. v. 6, p. 2004–2007. doi:10. 1093/mp/sst112. 2013.

RATNER, V.A. et al Induction of the mobile element *Dm-412* transpositions in the *Drosophila* genome by heat shock treatment. Proc Natl Acad Sci U S A 89:5650–5654. 1992.

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

SANTORO, M. G. Heat shock factors and the control of the stress response. **Biochemical pharmacology**, v. 59, n. 1, p. 55-63, 2000.

SCHRECK, R.; BAEUERLE, P. A. A role for oxygen radicals as second messengers. **Trends in cell biology**, v. 1, n. 2, p. 39-42, 1991.

SCHUCH, A.P. et al. DNA damage as a biological sensor for environmental sunlight. **Photochem Photobiol Sci**. doi:10.1039/c3pp00004d. 2013.

SINZELLE, L. IZSVÁK, Z. IVICS, Z. Molecular domestication of transposable elements: from detrimental parasites to useful host genes. **Cell Mol Life Sci**. v. 66, p. 1073–1093. 2009.

SLOTKIN, R. K; MARTIENSSEN, R. Transposable elements and the epigenetic regulation of the genome. **Nat Rev Genet**. v. 8, p. 272-285. 2007.

STRAND, D.J.; MCDONALD, J.F. *Copia* is a transcriptionally responsive to environmental stress. **Nucleic Acids Res** v.13, p. 4401–4410. 1985

STURM, A.; IVICS, Z.; VELLAI, T. The mechanism of ageing: primary role of transposable elements in genome disintegration. **Cell. Mol. Life Sci**. v. 72, p. 1839–1847 doi 10.1007/s00018-015-1896-0. 2015.

SYKIOTIS, G. P.; BOHMANN, D. Stress-activated cap'n'collar transcription factors in aging and human disease. **Science signaling**, v. 3, n. 112, p. re3, 2010.

TOMANEK, L. The heat-shock response: its variation, regulation and ecological importance in intertidal gastropods (genus *Tegula*). **Integrative and Comparative Biology**, v. 42, n. 4, p. 797-807, 2002.

TOWER, J. Heat shock proteins and *Drosophila* aging. **Experimental Gerontology**. v.46, p. 355–362. 2011.

VARANI, A. de M. et al. Elementos de Transposição: Classificação e Mecanismos de Mobilização. In: CARARETO, C. M. A.; MONTEIRO C. B. M.; SLUYS, M-A. V. (Org). **Elementos de Transposição**: Diversidade, evolução, aplicações e impacto nos genomas dos seres vivos. 22. ed. Rio de Janeiro: Fiocruz, 2015. cap. 1 p. 11-42.

VASILYEVA, L.A.; BUBENSHCHIKOVA, E.V.; RATNER, V.A. Heavy heat shock induced retrotransposon transposition in *Drosophila*. **Genet Res**. v. 74, p. 111–119 1999

VOS, Michel J. et al. Specific protein homeostatic functions of small heat-shock proteins increase lifespan. **Aging cell**. p.1-10. 2015.

WALBOT, V. UV-B damage amplified by transposons in maize. **Nature**. v. 397, p. 398–399. 1999.

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

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

WON, E-J., et al. In vivo effects of UV radiation on multiple endpoints and expression profiles of DNA repair and heat shock protein (*Hsp*) genes in the cycloid copepod *Paracyclopina nana*. **Aquatic Toxicology**.v.165, p. 1-8. 2015.

WU, C. Heat shock transcription factors: structure and regulation. **Annual review of cell and developmental biology**, v. 11, n. 1, p. 441-469, 1995.

YEATES, D. K. et al. Phylogeny and systematics of Diptera: Two decades of progress and prospects. **Zootaxa.** v. 1668, p. 565–590. 2007.