

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

**O TRANSPOSON *piggyBac*: QUANTIFICANDO SUA
MOBILIZAÇÃO**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Valéria de Lima Kaminski

Santa Maria, RS, Brasil

O TRANSPOSON *piggyBac*: QUANTIFICANDO SUA MOBILIZAÇÃO

por

Valéria de Lima Kaminski

Dissertação apresentada ao curso de Mestrado do Programa de Pós Graduação em Biodiversidade Animal, área de concentração em Sistemática e Biologia Evolutiva, pela Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS) como requisito para obtenção do título de **Mestre em Ciências Biológicas, Biodiversidade Animal.**

Orientador: Elgion Lúcio da Silva Loreto

Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil

2015

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

de Lima Kaminski, Valéria
O transposon PiggyBack: quantificando sua mobilização
/ Valéria de Lima Kaminski.-2015.
37 p.; 30cm

Orientador: Elgion Lúcio da Silva Loreto
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Programa de
Pós-Graduação em Biodiversidade Animal, RS, 2015

1. Elementos transponíveis 2. Genética 3. Biologia
Molecular 4. Cultura de células de inseto 5.
Biodiversidade I. da Silva Loreto, Elgion Lúcio II.
Título.


A comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Dissertação de Mestrado

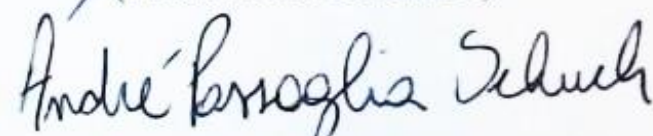
**O TRANSPOSON *piggyBac*: QUANTIFICANDO SUA
MOBILIZAÇÃO**

elaborada por
Valéria de Lima Kaminski

como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Biodiversidade Animal

COMISSÃO EXAMINADORA


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


André Passaglia Schuch, Dr. (UFSM)


Daniel Angelo Sganzerla Graichen, Dr. (UFSM)


Vera Lúcia da Silva Valente, Dr^a. (UFRGS)

Santa Maria, 5 de maio de 2015.

Aos cafofeiros Pedro, Larissa, Sinara e Francine.

“Um verdadeiro amigo é alguém que te conhece tal como és, compreende onde tens estado, acompanha-te em teus lucros e teus fracassos, celebra tuas alegrias, compartilha tua dor e jamais te julga por teus erros.”

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu orientador, Dr. Elgion Loreto por ter me iniciado na carreira científica e por me ajudar a chegar até o final de um curso mestrado. Ao PPGBA, agradeço pela oportunidade e espaço para desenvolver este trabalho e pela formação recebida. Ao CNPq, pelo indispensável apoio financeiro e à querida UFSM por proporcionar-me estudar em uma instituição federal e de qualidade. À minha banca examinadora, obrigada por me concederem a honra de ter a contribuição de vocês com suas críticas fundamentais. Sem tirar nem por agradeço, a todos os meus colegas de LabDros, tanto os do presente quanto os que por lá já passaram e deram-me o privilégio de conviver ou conhecer. Aos meus grandes amigos egressos, Paloma, Mauro, Bruna, Ana, Francis, Gabriela e Geovani, bem como às queridas amigas de fora do LabDros, Lilian e Aimée, agradeço pelo carinho e força mandados de longe e por me darem a alegria de uma amizade continuada fora das bancadas do laboratório e fora do arco da universidade. O Ronaldo, sempre um missioneiro entusiasta, obrigada pela paciência com os pedidos de compras por e-mail e pela amizade! Um muito obrigada especial à Sinara e ao Marcos, sem a ajuda deles minhas análises finais teriam sido bastante complicadas. Michelle e Vanessa, foi um verdadeiro privilégio ter me aproximado de vocês, obrigada pela amizade e por permitir que eu compartilhasse minha vida com vocês. Aos cafofeiros, dedico essa dissertação como forma de dividir a conquista. Obrigada por não soltarem minha mão nos períodos que, vocês sabem, mais precisei. Obrigada pelos momentos bons e por dividirem comigo os seus momentos ruins, obrigada pelos posos, colos e caronas. Obrigada, amigos, pelos anos dividindo o chimarrão de manhã, a tarde e, às vezes, a noite. Obrigada pelos nossos 'madrugadões da esperança' no LabDros. Por último, mas mais importante, agradeço aos meus quatro pilares: Antonio, Ligia, Vanessa e João Miguel, meus pais e irmãos respectivamente, por absolutamente tudo, desde o conforto na véspera da prova de seleção e na escolha em assumir a vaga no PPGBA, pelos puxões de orelha e, mais importante ainda, agradeço pelo carinho recebido por telefone ou ao chegar em casa. Mãe, sou grata por me dar o melhor aconchego do mundo nas horas complicadas e por sempre tentar elevar minha autoestima. Ao meu pai, meu guia e maior conselheiro, digo novamente que não chegaria nem na metade de toda essa jornada sem ele. Pilares da minha vida: meu amor por vocês é incondicional. Obrigada.

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

O TRANSPOSON *piggyBac*: QUANTIFICANDO SUA MOBILIZAÇÃO

AUTORA: VALÉRIA DE LIMA KAMINSKI

ORIENTADOR: ELGION LÚCIO DA SILVA LORETO

Data e Local da Defesa: Santa Maria, 05 de maio de 2015.

RESUMO

Neste trabalho apresentamos a ideia de realizar ensaios de excisão utilizando o elemento transponível *piggyBac* como fornecedor da enzima e das sequências terminais invertidas do elemento, ambos necessários para mobilização. Células S2 de *Drosophila melanogaster* foram eletroporadas para que houvesse inserção de dois diferentes plasmídeos no citoplasma das células, um plasmídeo portando as repetições terminais invertidas do elemento *piggyBac* flanqueando um gene GFP e o outro com a sequência codificadora da enzima transposase, a qual reconhece as repetições terminais invertidas e excisa o elemento da região onde está inserido, num sistema *vector-helper*, em que um fragmento é excisado de um plasmídeo com ajuda da transposase localizada no outro. PCR convencional foi usado para verificar os eventos de excisão, mostrando uma região de amplificação de 200pb nos casos de excisão do fragmento e uma região amplicada de 3kb, nas ocasiões em que o fragmento ficou inteiro, ou seja, não foi mobilizado. A qPCR foi utilizada para quantificar a excisão desse fragmento, realizando comparações da quantidade de DNA plasmidial recuperado das células S2 após o término do experimento com diluições em série do plasmídeo com as ITRs, que foi utilizado como *standard*. Os resultados mostraram que a técnica envolvendo eletroporação e qPCR é exequível e pode ser utilizada para quantificar mobilização de elementos transponíveis. Fazendo um paralelo com as ferramentas já existentes para esse tipo de quantificação, qPCR mostra-se como uma técnica bastante sensível de detecção de mobilização, bem como uma técnica de baixo custo orçamentário.

Palavras-chaves: células S2, *piggyBac*, excisão, eletroporação, qPCR.

ABSTRACT

A new way to quantify transposon mobilization using *piggyBac* as model

In this work we presented the idea to perform excision assays using the *piggyBac* transposable element as enzyme supplier and the inverted terminal sequences of the element, both necessary for mobilization of a transposable element. *Drosophila* S2 cells were electroporated to perform insertion of two different plasmids in the cytoplasm of cells, a plasmid carrying the terminal inverted repeats of *piggyBac* element flanking a GFP gene and other with the transposase coding sequence enzyme which recognizes the terminal inverted repeats, excise of the region where the element is and insert it into another locus. This is a vector-helper system, in which a fragment is excised from a plasmid with the help of the transposase located in the other. Conventional PCR was used to verify excision events showing a 200bp amplification region where the fragment was excised and a region 3kb amplification region at times when the fragment was full, ie, it has not mobilized. The qPCR technique was used to quantify the excision of this fragment, carrying out comparisons of the amount of plasmid DNA recovered from the S2 cells after the end of experiment with serial dilutions of the original plasmids carrying the ITRs, which was used as standard. The results showed that the technique involving electroporation and qPCR is feasible and can be used to quantify mobilization of transposable elements. Paralleling with existing tools for this type of quantification, qPCR shows up as a very sensitive technique of detection mobilization, as well as a low cost technique budget.

Key words: S2 cell lineage, *piggyBac*, excision, electroporation, qPCR.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Elementos transponíveis

Inseridas no genoma da grande maioria dos organismos já estudados até hoje, podemos encontrar sequências de DNAs chamadas elementos de transposição (TEs – do inglês *Transposable Elements*). Os TEs são portadores de mobilidade, podendo saltar e de uma região cromossômica para outra do mesmo ou de cromossomos diferentes. Essa habilidade de movimentação e integração em outro local do genoma chama-se transposição, e diferentes TEs possuem diferentes mecanismos de transposição e diversidade em suas sequências. Tal diversidade confere-lhes ampla distribuição entre os organismos já estudados, com apenas algumas exceções (Feschotte & Pritham, 2007; Pritham, 2009).

Além disso, podem compor grande porcentagem dos genomas, como em *Drosophila melanogaster* em que são 15% a 22% do genoma, 45% em *Homo sapiens* e em algumas espécies de plantas e anfíbios, mais de 70% (Biémont & Vieira, 2006). Os TEs são, também, considerados sequências de DNA “parasitas” e a presença ou ausência de controle da transposição pelo hospedeiro pode provocar alterações no genoma. Pode ocorrer inativação de genes se o TE instala-se no meio da sequência deste; alterações de expressão gênica, se inserido em regiões promotoras, ou a redução da capacidade de sobrevivência e reprodução do hospedeiro, gerada por rearranjos cromossômicos e outras mutações (Feschotte & Pritham, 2007; Giraud & Capy, 1996; Kidwell & Lisch, 1997).

Entretanto, a mobilização dos TEs é uma importante fonte de variabilidade genética, pois agem como modeladores da estrutura, função e evolução dos genomas hospedeiros (Biémont, 2010). A mobilidade também gera grande variação no número de cópias dos TEs dentro dos genomas (Kidwell & Lisch, 1997), e algumas dessas cópias podem ser incorporadas pelo genoma

hospedeiro por meio de 'domesticação gênica', quando os TEs passam a exercer funções favoráveis ao genoma (Cordaux et al. 2006; Nowacki et al. 2009).

Os TEs podem ser denominados autônomos ou não-autônomos. Os TEs ditos elementos autônomos codificam todos os domínios que são normalmente necessários para a sua transposição, já os TEs não-autônomos carecem de algum domínio e podem utilizar enzimas fornecidas por outros TEs.

1.2 Classificação dos elementos transponíveis

Em virtude da grande variedade de elementos transponíveis descobertos nos genomas, foi preciso estabelecer um sistema de classificação. O primeiro sistema de classificação, proposto por Finnegan (1989), foi baseado nos mecanismos de transposição e dividiu os TEs em duas classes: os elementos de classe I e os elementos de classe II.

Elementos de classe I, ou retrotransposons, possuem o mecanismo de transposição chamado de “cópia e cola”, em que um intermediário de RNA é transcrito a partir de uma cópia do TE pré-existente no genoma hospedeiro, esse RNA é, então, usado como molde para síntese de DNA pela enzima transcriptase reversa e esta cópia de DNA é inserida em outra região genômica por ação da enzima integrase. Essas enzimas podem ser codificadas pelo TE e transcritas pelo hospedeiro, sendo que cada ciclo pode gerar novas cópias do retrotransposon.

Os retrotransposons são subdivididos em cinco ordens de acordo com suas características de mecanismo de inserção, organização e filogenia da transcriptase reversa: retrotransposons com LTRs (do inglês *Long Terminal Repeats*), elementos *DIRS-like*, elementos *Penelope-like*, LINEs (do inglês *Long Intersperced Nuclear Elements*) e SINEs (do inglês *Short Intersperced Nuclear Elements*). Os SINEs são sequências não-autônomas e não são derivados de TEs, mas podem abrigar um domínio interno com capacidade de codificar genes de transposição e podem

mobilizarem-se por ativação cruzada de um elemento autônomo (Wicker et al. 2007).

Os elementos da Classe II são chamados de transposons e o mecanismo de transposição é do tipo “corta e cola” (Wicker et al. 2007). Nessa classe, há um intermediário de DNA que pode ser retirado do seu sítio original e inserido em outra região do genoma hospedeiro por ação da enzima transposase, que pode ser codificada pelo próprio elemento.

Outra classificação já foi proposta para organizar os TEs (Capy et al., 1998). Segundo Wicker et al. (2007), os TEs são classificados em um sistema mais atual que manteve as duas classes já descritas, porém novas classificações mais inclusivas foram adicionadas seguindo uma ordem hierárquica taxonômica:

- Subclasse: TEs que, durante a mobilização, cortam os dois filamentos de DNA e deixam um sítio doador no local para inserirem-se em outra região pertencem a subclasse I, enquanto aqueles que cortam apenas um filamento de DNA, gerando cópias de si mesmo, pertencem a Subclasse II.
- Ordem: distingue entre os mecanismos de inserção, organização geral e enzimologia dos TEs.
- Superfamília: além de compartilhar a mesma estratégia de transposição dentro de uma ordem, são identificados por apresentarem características uniformes como estrutura de proteínas, domínios não codificantes, presença e tamanho de repetições de nucleotídeos geradas nas extremidades dos TEs quando são inseridos em outros locais dos genomas. Esse sítio é chamado de sítio alvo de duplicação (TSD do inglês – *Target Site Duplication*).
- Família: baseia-se na conservação de aminoácidos. A similaridade entre TEs que pertencem à mesma família em suas sequências codificadoras, domínios internos ou em regiões repetidas terminais deve ser de 80% ou mais.
- Subfamília: são definidas através de análises filogenéticas podendo distinguir em alguns casos entre populações muito homogêneas de elementos autônomos e não autônomos.

1.3. O transposon *piggyBac*

O transposon *piggyBac* é um elemento de classe II, inicialmente considerado como o elemento IFP2 da linhagem de células de insetos lepidópteros TN-368 (Fraser et al. 1983; Fraser et al. 1985). Funcionalmente, *piggyBac* codifica uma transposase com um mecanismo “corta e cola” com preferência de inserção em sítios TT'AA (Fraser et al. 1995; Elick et al. 1996), caracterizando-se um elemento típico da família de transposons específico- TTAA (Fraser et al. 2000). Estruturalmente, *piggyBac* é uma molécula de DNA de 2,4kb com um único quadro aberto de leitura de 1,8kb que termina, em ambas as extremidades, com domínios de ITRs perfeitas de 13pb e, também, tem duas repetições invertidas subterminais adicionais de 19pb localizados assimetricamente 31pb de 5'- TRD (do inglês *Target Recognition Domain*- domínio de reconhecimento-alvo, no caso, “TTAA”) e 3pb de 3'-TRD (Cary et al. 1989). Sequências semelhantes ao quadro aberto de leitura de *piggyBac* foram identificados em todas as espécies animais cujas sequências genômicas estão disponíveis, incluindo o ser humano. No entanto, a maioria dessas sequencias parece ser incompleta ou interrompida e, por conseguinte, provavelmente não codifica transposases funcionais (Sarkar et al. 2003).

As funções de mobilidade e de transposição de *piggyBac* foram estabelecidas e exploradas para desenvolver um importante sistema binário para a transformação da linha germinativa de insetos (Fraser et al. 1995). Este sistema consiste de um vetor de DNA, que pode ser mobilizado devido à presença das sequencias 5'- e 3'- TRDs do *piggyBac*, mais um plasmídeo auxiliar, contendo o quadro aberto de leitura que codifica a transposase. O vetor também inclui um promotor, o qual controla a transcrição de um inserto (o gene heterólogo de interesse) e um marcador que manifesta expressão ao longo todo o corpo ou na cor dos olhos, que pode ser utilizado para identificar descendência transgênica. A mosca-das-frutas mediterrânea foi o primeiro organismo a ser transformado com sucesso utilizando o sistema *piggyBac* (Handler et al. 1998) e

tem sido subsequentemente utilizado para transformar uma vasta variedade de insetos (revisto em referência (Handler et al. 2002). Recentemente, o sistema vetor- *piggyBac* foi utilizado para transformar muitos outros tipos de organismos que vão desde protistas, *Plasmodium falciparum* (Balu et al. 2005) até rato, *Mus musculus* (Ding et al. 2005). Assim, *piggyBac* é amplamente e cada vez mais reconhecido como uma ferramenta importante para a transformação genética em muitos sistemas biológicos diferentes.

1.4. O sistema vector-helper em estudos com ensaios de excisão de elementos transponíveis

Dentre as características mais marcantes de um TE, duas são de fundamental importância: os TEs possuem em sua sequência uma ORF (*open reading frame* ou 'quadro aberto de leitura') que codifica uma enzima chamada de transposase, a qual atua na clivagem do elemento em uma determinada região e insere-o em outra porção do genoma do hospedeiro. A segunda característica importante a ser observada são as regiões terminais destes elementos, as quais, em alguns, são altamente conservadas e estão dispostas de forma invertida (ITR - *inverted terminal repeat*). Assim, podemos dizer que um TE generalizado necessita de um gene codificador de uma enzima que reconhece as próprias extremidades flanqueadoras do gene, cliva-as e então carrega o TE para novas regiões do genoma para ali inseri-lo.

Nesse trabalho, lançamos mão de um sistema binário de plasmídeos chamado *vector-helper*, para realizar os ensaios de excisão. Representando o *vector*, utilizamos o plasmídeo pBac [3xp3-EGFPafm] (Horn & Wimmer, 2000), contendo as repetições terminais invertidas (ITRs) do elemento *piggyBac* (figura 1). O plasmídeo *pBΔSac helper-plasmid* foi utilizado como *helper*, contendo o gene que codifica a transposase do elemento *piggyBac* com sua subunidade 5' deletada (Handler & Harrell, 1999) (figura3).

Sobre as características e o histórico de ensaios de excisão do elemento *piggyBac*, outro tipo celular já fora testado, bem como foi utilizado um baculovírus como vetor. No entanto, uma vez que este ensaio foi em células infectadas por vírus, o envolvimento dos produtos dos genes virais codificados para gerar estes eventos de excisões precisas não poderiam ser excluídos. Já foi demonstrado que a excisão precisa da *piggyBac* ocorre na ausência de quaisquer proteínas virais codificadas. A frequência destes eventos de excisão precisas em células IPLB-SF21AE (cultura de células de nome popular sf21, do inseto *Spodoptera frugiperda*) transitoriamente transfectadas é grandemente aumentada pela presença de um elemento auxiliar, o plasmídeo *helper*, que codifica uma transposase completa de *piggyBac* deixa para trás, depois da excisão, uma pegada característica, um único sitio TT'AA. A partir destes resultados pode-se inferir que a excisão de *piggyBac* envolve quebras de cadeia dupla em algum lugar dentro dos locais-alvo flanqueados por TT'AA e que o vazão criado pela excisão do transposon é imediatamente reparado por ligações das extremidades livres de DNA (Elick et al. 1996).

Segundo Fraser et. al 1995, a ausência de técnicas moleculares com capacidade de recuperar facilmente excisões independentes de plasmídeos *helper* reflete uma frequência de excisão que está ligeiramente abaixo ou, então, no limite de detecção. Em contraste, os eventos de excisões precisas, independente de plasmídeos auxiliares e relativamente pouco frequentes são mais fáceis de detectar no ensaio de excisão de baculovírus, visto que estes eventos são amplificados em vírus do tipo selvagem, competentes para a replicação. Resultados de estudos combinados de ensaios de excisão do vírus e do plasmídeo sugerem que, embora a transposase de *piggyBac* não seja necessariamente requerida para a excisão precisa do elemento *piggyBac* em células IPLB-SF21AE, a adição de um transposon *piggyBac helper* assegura um aumento da frequência de eventos de excisão detectáveis.

1.5. A importância da quantificação de mobilização de elementos transponíveis

Elementos transponíveis podem ser explorados em estudos de diversas maneiras para

estudos avançados de genética. Aplicações típicas incluem mutagêneses insercionais (Dupuy et al. 2005), manipulações genômicas (Robert & Bessereau, 2007), transgênese, estudos de genômica funcional (Kekarainen et al. 2002; Miskey et al. 2005), terapia gênica (Ivics & Izsvák, 2006; VandenDriessche et al. 2009) e indução de células-tronco pluripotentes (VandenDriessche et al. 2009). Atualmente, essas metodologias estão em forte desenvolvimento e é esperado que novas aplicações baseadas em transposição sejam desenvolvidas e que novas estratégias surjam num futuro próximo. Um número crescente de sistemas com transposons estão sendo adaptados para estudos avançados de biologia molecular e aplicações genômicas, bem como modificações e adaptações desses sistemas estão sendo realizadas para que seja possível uma melhor performance desses experimentos. Concomitante a isto, novos genomas estão sendo sequenciados para estudos e, conseqüentemente, novos elementos transponíveis estão sendo descobertos em questão de dias de análise de dados de bioinformática.

É esperado que o uso das plataformas existentes bem como a proposta nesse trabalho gerem melhores versões para as futuras táticas de estudo dos sistemas de transposição dos TEs, fornecendo melhores ferramentas para a biologia molecular e oferecendo veículos de modificação genômica para uma variedade de estudos futuros, principalmente no que se refere a biologia do câncer, terapia gênica, pesquisas com células-tronco e estudos de transgenia.

Tanto o melhoramento das técnicas existentes utilizando transposição quanto o desenvolvimento de métodos mais sensíveis necessitam de análises quantitativas robustas, então, nosso trabalho apresenta uma forma de análise quantitativa de mobilização de elementos transponíveis que pode ser aplicada a uma grande variedade de elementos móveis de DNA.

1.6. Linhagem de Células *Schneider 2*

Cerca de 94 linhagens de células de drosófila são independentemente cultivadas, das quais 12 aproximadamente têm sido mais facilmente manipuladas. Para a expressão de genes heterólogos,

as linhagens S2 e S3 (Cherbas et al.,1994) têm sido bastante utilizadas. Neste trabalho utilizamos apenas a linhagem S2, mas ambas constituem células semi- aderentes derivadas de uma cultura primária de embriões em estágio tardio de desenvolvimento. Dentre as vantagens do sistema de expressão gênica em células de drosófila observa-se a alta taxa de crescimento celular, a simplicidade de manipulação, além das condições de manutenção não requererem atmosfera de gás carbônico (CO₂) e serem capazes de cultivo em temperatura ambiente. Estas características tornam a cultura de células de inseto vantajosa economicamente, pois requer baixo custo para sua manutenção e manipulação.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Contribuir para o entendimento do ciclo de vida dos TEs como os grandes geradores de variedade genética e, conseqüentemente, da biodiversidade dos organismos.

2.2. Objetivos Específicos

1. Desenvolver ensaios de excisão com o transposon *piggyBac* e a técnica de eletroporação em células cultivadas de *Drosophila melanogaster* da linhagem *Schneider 2* (S2)
2. Verificar a excisão do elemento por meio da técnica de PCR (*Polymerase Chain Reaction*)
3. Quantificar a mobilização do elemento por meio de qPCR (*Quantitative PCR*)

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Cultura de Células

Células da linhagem S2 de *Drosophila melanogaster* são mantidas congeladas em

Nitrogênio líquido (-196°C). Para os experimentos, as células foram descongeladas e cultivadas com meio de cultura Schneider em garrafas de cultivo celular de 25cm², mantidas em temperatura de 25°C. Em cada garrafa, foram aliqüotados 5mL de meio de cultura suplementado com 10% de SFB (Soro Fetal Bovino), 25µL de penicilina/estreptomicina e 12,5µL de anfotericina. Em cada experimento foram utilizadas 3 garrafas de cultura com células. Um dia após o descongelamento, cada garrafa teve seu conteúdo de células contados em câmara de Neubauer, utilizando o corante Azul de Tripán para diferenciar células viáveis e não viáveis. Uma vez que a garrafa apresentasse um número de células viáveis próximo a 2×10^7 células/mL, a mesma foi utilizada nos experimentos.

2.2. Plasmídeos

Neste trabalho, foi utilizado um sistema binário de plasmídeos, chamado “*vector-helper*”. Representando o *vector*, utilizamos o plasmídeo pBac [3xp3-EGFPafm] (Horn & Wimmer, 2000), contendo as repetições terminais invertidas (ITRs) do elemento *piggyBac* (figura 1). O plasmídeo *pBASac helper-plasmid* foi utilizado como *helper*, contendo o gene que codifica a transposase do elemento *piggyBac* com sua subunidade 5' deletada (Handler & Harrell, 1999) (figura2). Ambos os plasmídeos possuem, além das sequências de interesse, um gene que confere resistência ao antibiótico Ampicilina. Para o uso nos experimentos, os plasmídeos de interesse foram clonados, extraídos e purificados.

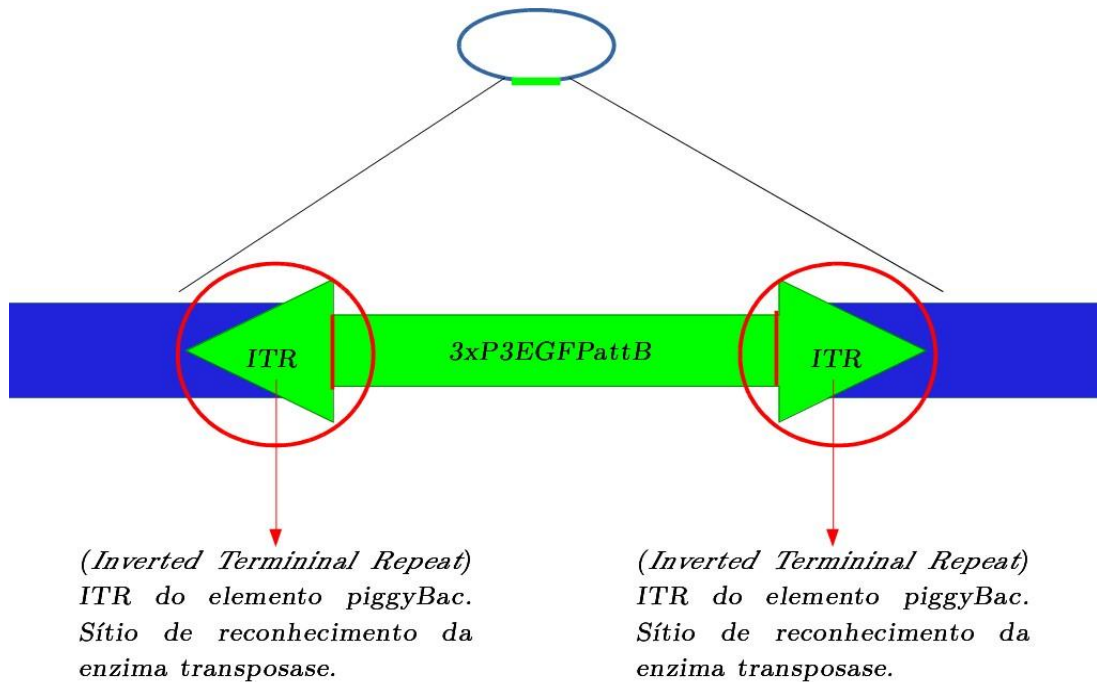


Figura 1. Esta figura está representando esquematicamente as ITRs (circuladas em vermelho) do elemento *piggyBac*, que são os sítios de reconhecimento da enzima transposase. O plasmídeo utilizado nesse experimento tem, flanqueado pelas ITRs, um gene que codifica a proteína GFP (*Green Fluorescent Protein*) que, para estudos futuros, pode ser utilizada para ensaios de expressão do fragmento excisado.

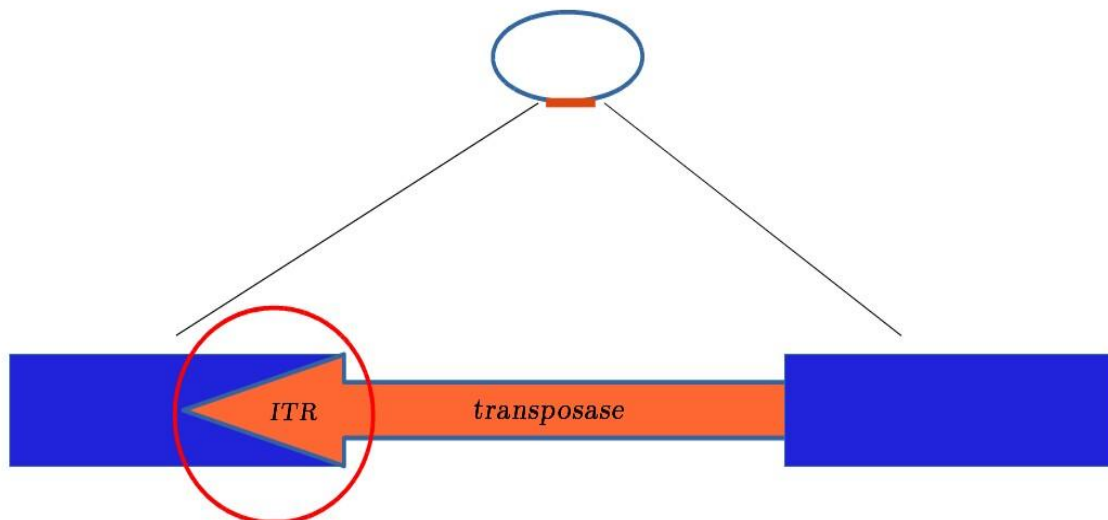


Figura 2. Representação esquemática do plasmídeo *helper*. Esse plasmídeo é utilizado como fonte da enzima transposase do elemento *piggyBac*, que terá como alvo as ITRs encontradas no plasmídeo vector. O círculo mostra que apenas uma das ITRs do elemento está presente no plasmídeo *helper*, o que impede sua automobilização, já o plasmídeo vector, possuidor das duas ITRs necessárias para mobilização, pode ser mobilizado na presença da enzima codificada pelo gene da transposase presente nesse plasmídeo auxiliar. O gene dessa transposase está sob efeito de um promotor artificial do gene Pax6.

2.2.1. Clonagem dos plasmídeos vetores

Para obter uma grande quantidade dos plasmídeos utilizados nos experimentos, os plasmídeos foram clonados em *Escherichia coli*, linhagem TOP 10, por meio de transformação por eletroporação em equipamento Gene Pulser Xcell TM System, seguindo as instruções do fabricante. Após a eletroporação, os plasmídeos foram clonados utilizando-se o TA Cloning Kit (Invitrogen), seguindo o protocolo do fabricante.

2.2.2. Extração de plasmídeo das bactérias transformadas

O DNA plasmidial utilizado nos ensaios de excisão foi extraído das colônias de bactérias. Após serem semeadas em placa de Petri e deixadas por 16h à 37°C, cada colônia foi semeada em 3 mL de meio LB líquido contendo ampicilina. A extração de plasmídeo foi realizada seguindo o método de lise alcanina, 16h após exposição direta a 37°C, onde cada tubo contendo uma colônia positiva para o plasmídeo de interesse teve seu conteúdo de 3mL concentrado em tudo de 1,5mL. As bactérias presentes no *pellet* coletado por meio de centrifugação foram ressuspensas em 200uL de solução contendo 8% de tris(hidroximetil)aminometano (TRIS) 1M (PH=8), 2% de ácido etilenodiamino tetra- acético (EDTA) 0,5M e 90% de água destilada autoclavada. Após, foi adicionado 200uL de solução de lise contendo 20% de NaOH 1M, 10% de dodecil sulfato de sódio (SDS) 10%. Uma vez adicionada a solução de lise, o conteúdo do tubo de 1,5mL foi cuidadosamente misturado. A essa mistura acrescentou-se 200uL de acetato de potássio 5M e, novamente, o conteúdo do tubo foi cuidadosamente misturado e, então, levado ao freezer por 15 minutos. Em seguida, os tubos foram retirados do freezer e submetidos a centrifugação de 15000rpm por 15 minutos. Uma vez centrifugados, os tubos tiveram seu sobrenadante retirado e passado para um novo tubo, no qual foi acrescentado um volume de isopropanol e os tubos com os

pellets foram descartados. Uma vez acrescidos de isopropanol e cuidadosamente misturado até que o líquido ficasse completamente homogêneo, os tubos com as amostras foram deixados a 16h no freezer (aproximadamente -6°C). Depois desse período, os tubos com amostras foram novamente centrifugados a 15000rpm por 10 minutos, o sobrenadante descartado e o *pellet* (uma fina película no fundo do tubo, as vezes bem pouco visível) foi submetido a secagem em estufa a 37°C, o tempo de secagem é variável, por isso a amostra foi verificada de 20 em 20 minutos depois dos primeiros 45 minutos para garantir uma secagem perfeita e sem excesso. Seguidamente, a amostra foi eluída em 30µl de água mili-Q.

2.3. Quantificação de DNA

O DNA plasmidial que foi eletroporado e as amostras de DNA plasmidial extraído das células eletroporadas foram previamente quantificados quanto a sua concentração no equipamento NanoDrop 2000 Spectrophotometer (Thermo Scientific, USA) bem como lançamos mão desse equipamento para ajustar as concentrações das amostras que foram utilizadas na reação de qPCR.

2.4. Eletroporação

Utilizamos o sistema de eletroporação (Gene Pulser Xcell TM System), em que as células foram eletroporadas para incorporação de ambos os plasmídeos. A preparação das células seguiu as seguintes etapas (todas realizadas em ambiente estéril):

1. As células da garrafa, distribuídas em 5mL, foram centrifugadas e concentradas em um tubo de 1,5mL, o meio em que elas estavam foi descartado e a cultura lavada por duas vezes somente com meio *Schneider*, visto que para a realização do experimento, a cultura deve estar isenta de SFB.
2. Após o processo de lavagem, as células foram concentradas em 600uL de meio livre de SFB,

colocadas em uma cubeta de 2mL e 40 μ g de cada plasmídeo e 200 μ L de tampão fosfato de cálcio (PBS) foi adicionado às células na cubeta.

3. A mistura (células + plasmídeos) na cubeta foi submetida a pulsos de 715V com capacitância de 1200 μ F, por 1 segundo (Cherbas & Cherbas 1994).

4. Imediatamente após a eletroporação, as células foram deixadas em repouso por 10 minutos, os 800 μ L de células + plasmídeos + PBS foram transferidos para uma nova garrafa, previamente preparada, com as mesmas quantidades de meio e SFB anteriores ao experimento (Figura 3).

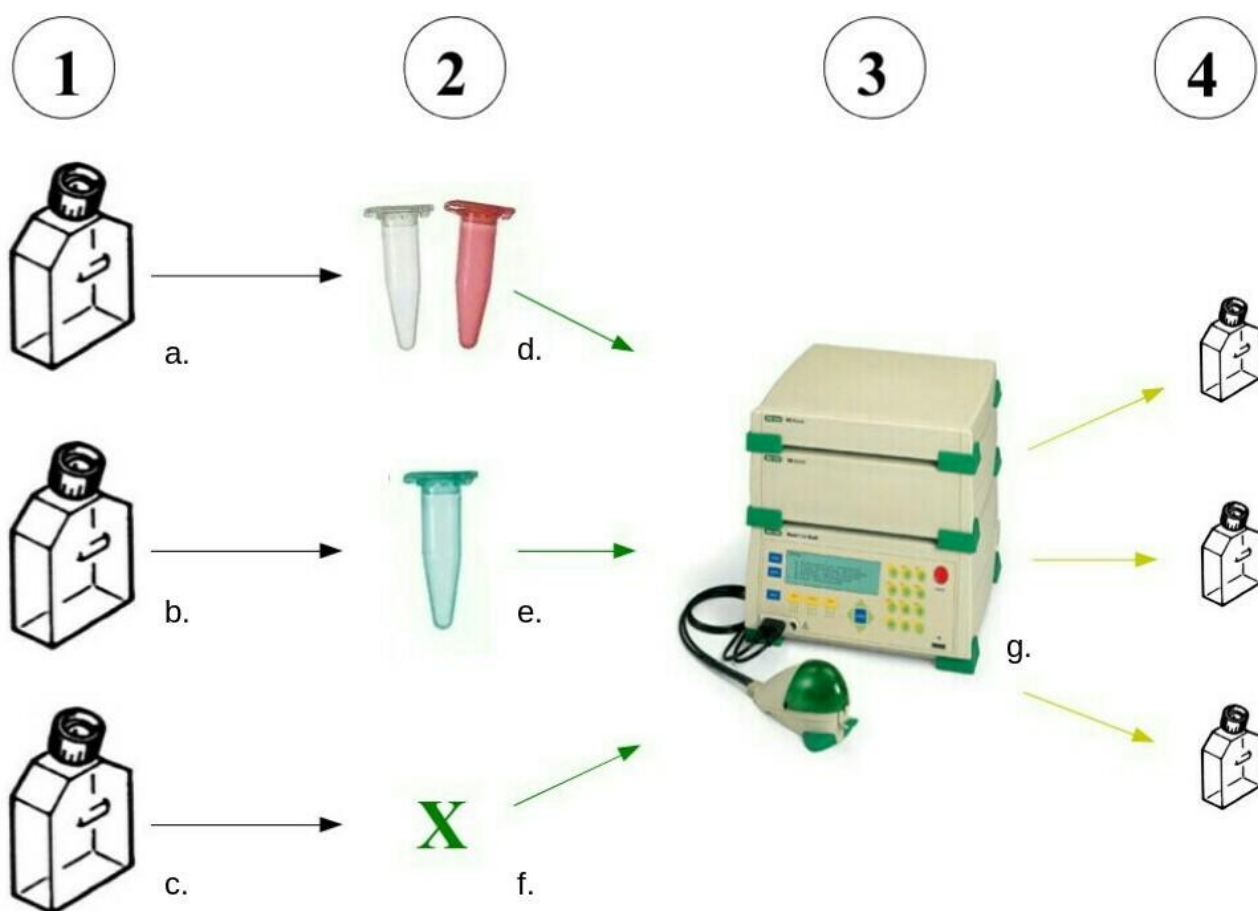


Figura 3. Esquema representando esquematicamente o processo eletroporação em. 1 (a, b e c). As células em cultura. 2. Os plasmídeos que foram eletroporados, (d) um tubo contendo o plasmídeo com as ITRs do elemento *piggyBac* e o gene *Egfp* e outro tubo contendo o plasmídeo que porta a sequência da transposase do elemento *piggyBac* que reconhece as ITRs presentes no outro plasmídeo, (e) um tubo contendo apenas o plasmídeo que possui as ITRs, para termos um controle e verificar se pode ocorrer excisão com alguma transposase que possa estar presente no genoma da linhagem de células *S2*, (f) o controle negativo do experimento, no qual as células passarão pelas mesmas etapas, mas sem serem submetidas ao contato com os plasmídeos. 3. (g) O aparelho eletroporador utilizado. 4. Após a eletroporação, as células são novamente cultivadas por 24h.

2.5. Extração de DNA

O DNA genômico das células eletroporadas foi extraído com o Kit Genomic DNA Isolation Kit (NORGEN BIOTEK CORPORATION). Também fizemos extração de plasmídeo dessas células, visto que o material de interesse é o DNA plasmidial que foi eletroporado e ambos os resultados de extração foram utilizados nos experimentos.

2.6. PCR para testar a mobilização de *piggyBac*

O DNA extraído das células foi submetido a uma reação de PCR, em que os *primers* utilizados para amplificar a região do plasmídeo contendo as ITRs do elemento *piggyBac* foram: pyBACqPCR_F (5'CAATCTCACAGACAGCGTTGA3') e pyBACqPCR_Exc (5'CGACTTGGTTTGCCATTCTT 3'), ou seja, esses foram os primers utilizados para verificar se ocorreu ou não a excisão da sequência portadora das ITRs de *piggyBac*. Uma vez que a excisão tenha acontecido, parte da sequência deixa de compor o plasmídeo e é obtido um fragmento de aproximadamente 200pb, nos casos onde não houve excisão, o fragmento continua a compor o plasmídeo original e o fragmento obtido com a reação de PCR é de 3kb.

Também foram desenhados *primers* para indicar a presença do plasmídeo, independentemente de eventos de excisão - pois mesmo em casos positivos de excisão, parte do DNA plasmidial recuperado nas células será de plasmídeos íntegros, sendo impossível muito pouco provável que ocorra uma taxa de 100% de todos os plasmídeos eletroporados com as ITRs de *piggyBac*. Para tal, utilizando para isso o *primer* pyBACqPCR_F (o mesmo utilizado para testar excisão) e o *primer* PigBinver_2 (5'CCGATAAAACACATGCGTCA3'), a região amplificada por esse par de *primers* compreende uma região do plasmídeo 3' acima de uma das ITRs e outra 5' após o término dessa ITR, gerando um fragmento de aproximadamente 160pb. A figura 5 traz uma representação esquemática das regiões de anelamento dos *primers*. Foram feitas reações de 25 µL

utilizando 20ng de DNA, 1U Taq DNA Polymerase (Invitrogen), tampão de reação em 1×, 200μM dNTPs, 20pmol de cada *primer* e 1.5mM de MgCl₂ com condições de 94°C por 2 minutos seguindo de 35 ciclos de 94°C por 1 minuto, 55°C por 30 segundos, 72°C por 30 segundos e uma extensão final de 72°C por 5 minutos. O produto das reações foi aplicado em gel de agarose 1% para comparar o tamanho das bandas e verificar se houve mobilização do elemento. Nosso controle positivo foi o plasmídeo completo, com as ITRs do elemento e a sequência do gene EGFP, totalizando um fragmento de 3kb nessa região, sendo o plasmídeo completo formado por 6kb. Nas amostras em que ocorreu mobilização, o fragmento amplificado foi de aproximadamente 200pb.

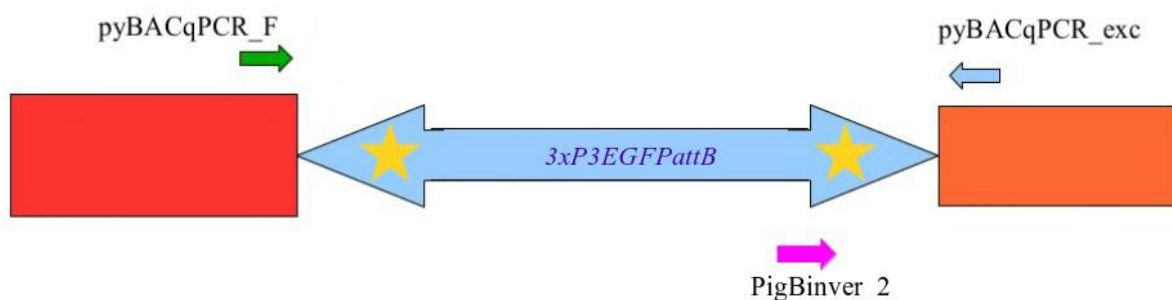


Figura 4. As setas coloridas

representam a região em que o *primer* nomeado acima deve anelar. As estrelas nas pontas da seta que representa a parte móvel do elemento representam a região das ITRs de *piggyBac*.

2.6. PCR Quantitativa – qPCR

A qPCR foi utilizada para estimar o número de excisões do elemento *piggyBac* nas células eletroporadas. Nesse trabalho, utilizamos o equipamento StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems, USA). As reações foram feitas em volume final de 10μl contendo 5μl de DNA plasmidial tanto dos ensaios quanto dos *templates* diluídos, 0.25U da enzima DNA-polimerase - Platinum Taq DNA Polymerase (Invitrogen, CA, USA), tampão de reação em 1X, 3mM de MgCl₂, 25μM de dNTPs, 0.2μM de cada *primer* e como corante foi utilizado SYBR Green (Molecular Probes, USA) em 1x.

A estimativa do número de excisões (mobilização) foi realizada construindo-se uma curva-padrão baseada dos valores de Ct obtidos da reação de qPCR, utilizando como *template* o plasmídeo original (pBac [3xp3-EGFPafm]) contendo as ITRs do elemento *piggyBac*, o qual gerou amplicons de 158pb. Foram realizadas diluições em série do plasmídeo supracitado correspondentes a 500ng, 50ng, 5ng, 0,5ng e 0,05ng. Essas diluições foram submetidas à reação de qPCR juntamente com as triplicatas do ensaio de excisão.

3. RESULTADOS

3.1. Ensaio de excisão

Após passadas 24h, as células submetidas à eletroporação foram novamente contadas antes de serem submetidas à extração de plasmídeo, apresentando uma média de $5,6 \times 10^6$ células/mL, 60% de recuperação. Uma vez extraídos os plasmídeos foi observado, por meio de PCR convencional (com os *primers* pyBACqPCR_F e pyBACqPCR_Exc), a excisão do elemento *piggyBac* em 3 ensaios independentes. Dos 40µg de plasmídeo eletroporado nas células, uma média de 12ng foram recuperados e utilizados nas reações de PCR.

O resultado das reações de PCR podem ser observados na figura 5. As bandas de amplificação entre 100 e 300pb representam a amplificação da região do plasmídeo de aproximadamente 200pb uma vez que ocorreu excisão do fragmento flanqueado pelas ITRs de *piggyBac*.

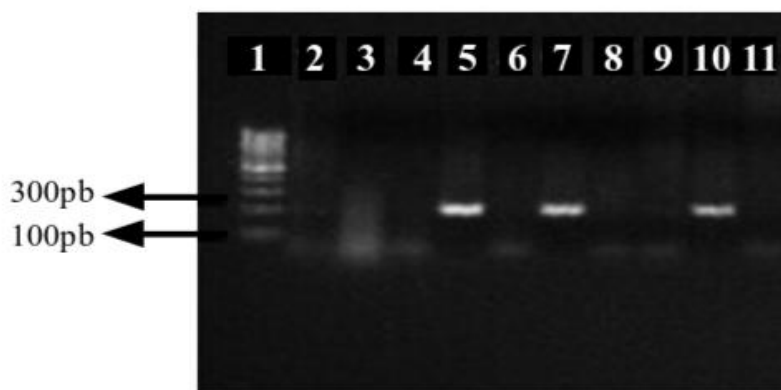


Figura 5. Foto do gel de agarose obtido os números representam: 1) Marcador de peso molecular de 100pb, 2) Controle negativo do 3º ensaio de excisão, 3) Controle negativo do 2º ensaio de excisão, 4) Controle negativo do 1º ensaio de excisão, 5) DNA plasmidial extraído das células eletroporadas com *vector* + *helper* do 1º ensaio, 6) DNA plasmidial extraído das células eletroporadas apenas com *vector* do 1º ensaio, 7) DNA plasmidial extraído das células eletroporadas com *vector* + *helper* do 2º ensaio, 8) DNA plasmidial extraído das células eletroporadas apenas com *vector* do 2º ensaio, 9) DNA plasmidial extraído das células eletroporadas apenas com *vector* do 3º ensaio, 10) DNA plasmidial extraído das células eletroporadas com *vector* + *helper* do 3º ensaio, 11) Controle negativo da PCR.

3.2.PCR Quantitativa

Os dados brutos da reação de qPCR foram coletados e analisados através da média dos valores de Ct e a média dos desvios-padrão obtidos para cada uma das diluições em série do plasmídeo *template*, o original (ou seja, o plasmídeo possuidor do inserto com as ITRs de *piggyBac* flanqueando o gene *Egfp*). A figura 6 representa o resultado dos ensaios de excisão submetidos a reação de qPCR com os *primers* pyBACqPCR_F e pyBACqPCR_Exc, os quais acusam excisão do inserto por meio da geração de um amplicon de 200pb. Os pontos de diluição do plasmídeo *template* nos permite localizar os pontos ocupados pelos ensaios e, na figura 7, podemos observar as mesmas amostras de DNA da figura 6 submetidas a uma reação de qPCR apenas com os *primers* sendo diferentes (pyBACqPCR_Exc e PigBinver_2), sendo esse último par de primers aqueles que apenas indicam a presença do plasmídeo com as ITRs de *piggyBac*, sem intenção de acusar casos de

excisão.

A figura 8 mostra a amplificação da amostra dos ensaios em que foi eletroporado nas células apenas o plasmídeo portador das ITRs de *piggyBac*, sem o plasmídeo *helper* que transporta a transposase, sendo, pois a indicação da recuperação do plasmídeo representado na figura 3 em 2-e. Os valores de “Ct” em uma reação de qPCR indicam o ciclo em que um fragmento começou ser amplificado com a geração do dobro de produto (amplicons) a cada novo ciclo.

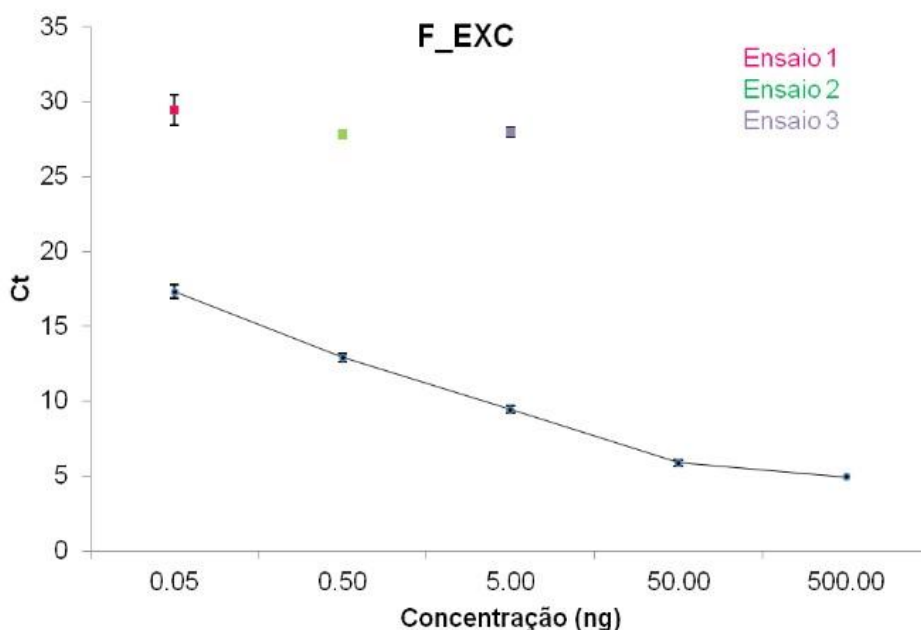


Figura 6. O gráfico gerado a partir dos dados de Ct da qPCR dos ensaios e das diluições em série, mostrando o desvio padrão de ambas séries de dados. Nos pontos em que o desvio padrão não aparece é devido ao pequeno tamanho da barra. O nome “F_EXC” faz menção aos *primers* utilizados pyBACqPCR_F e pyBACqPCR_Exc. A cor rosa faz menção ao ensaio 1, a cor verde ao ensaio 2 e cor lilás ao ensaio 3. Cada ensaio foi feito com 3 diferentes objetivos (um com os 2 plasmídeos, outro com apenas um e outro sendo o controle negativo), como mostra a figura 3. Nesse caso, estamos analisando as amostras dos ensaios em que foram eletroporados nas células o plasmídeo com a transposase reconhecadora das ITRs de *piggyBac* + o plasmídeo portador do inserto flanqueado pelas ITRs de *piggyBac*. O DNA submetido a reação de qPCR representado na figura é o DNA plasmidial extraído das células S2 24h após terem sido eletroporados nas mesmas. O que podemos estimar através desse gráfico é a quantidade, em nanogramas, de plasmídeos excisados em comparação ao *template* que já possui estimativa de quantidade estabelecida.

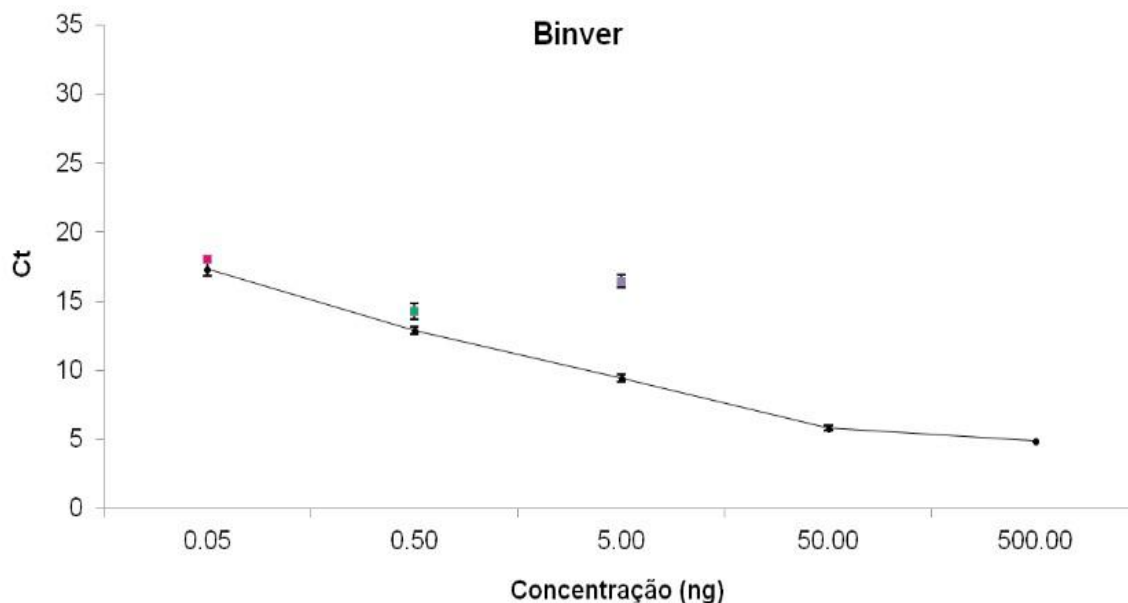


Figura 7. Gráfico mostrando a recuperação de plasmídeos portando as ITRs de *piggyBac*, independentemente de eventos de excisão, mesma amostra da figura 6, apenas *primers* diferentes. O nome “Binver” faz menção ao *primer* pigBinver_2 utilizado em conjunto com o pyBACqPCR_Exc para gerar esses dados. A cor rosa faz menção ao ensaio 1, a cor verde ao ensaio 2 e cor lilás ao ensaio 3. Cada ensaio foi feito com 3 diferentes objetivos (um com os 2 plasmídeos, outro com apenas e um sendo o controle negativo), como mostra a figura 3. Nesse caso, estamos analisando as amostras dos ensaios em que foram eletroporados nas células o plasmídeo com a transposase reconhecedora das ITRs de *piggyBac* + o plasmídeo portador do inserto flanqueado pelas ITRs de *piggyBac*. O DNA submetido a reação de qPCR representado na figura é o DNA plasmidial extraído das células S2 24h após terem sido eletroporados nas mesmas. O que podemos estimar através desse gráfico é a quantidade, em nanogramas, de plasmídeos eletroporados, mas que não sofreram excisão (fpram apenas recuperados) em comparação ao *template* que já possui estimativa de quantidade estabelecida. Se compararmos os valores de Ct dessa figura com os valores de Ct da figura anterior, veremos que aqui os valores são menores, isso indica que os amplicons dobraram em quantidade a cada novo ciclo bem antes que o representado na figura 6, assim, podemos afirmar que recuperamos muito mais plasmídeos não-excisados do que excisados.

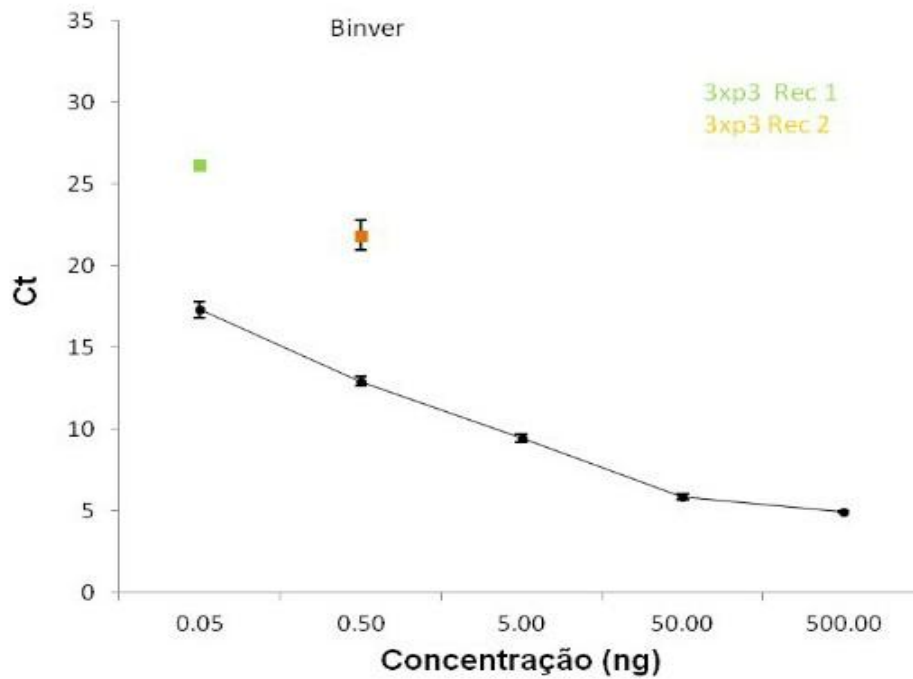


Figura 8. Gráfico mostrando o resultado da qPCR de presença do plasmídeo com as ITRs em células S2 eletroporadas sem o plasmídeo *helper*, para podermos estimar a quantidade de plasmídeos recuperados após eletroporação em comparação com o *template*, visto que plasmídeos eventualmente excisados não são amplificados com esse par de *primers*. Os *primers* pyBACqPCR_Exc e o pigBinver_2.

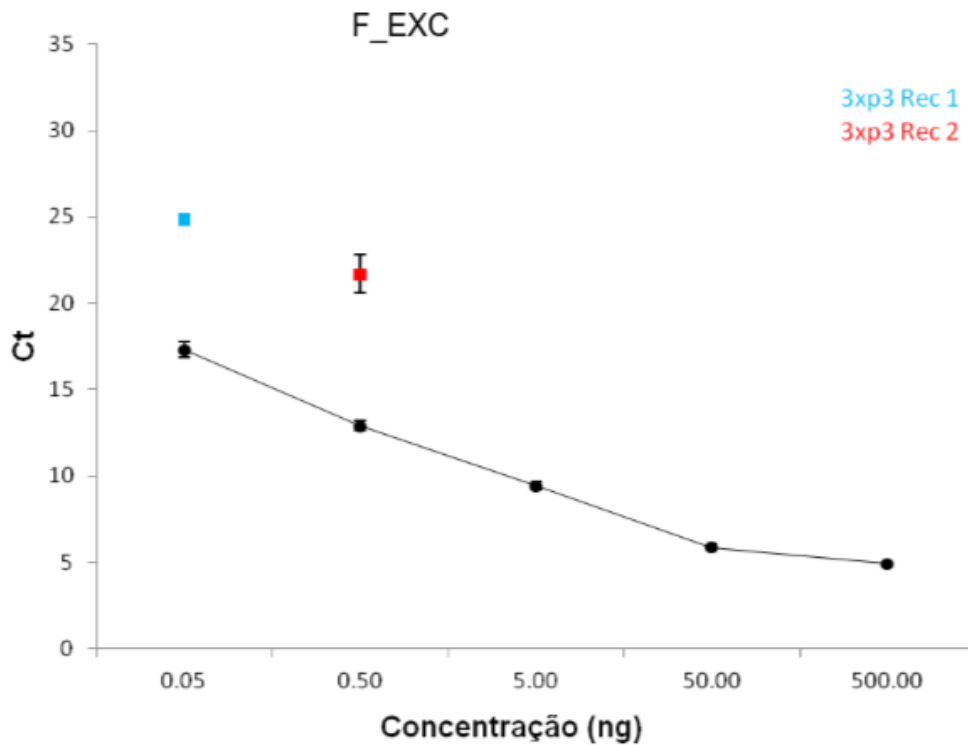


Figura 9. Gráfico mostrando o resultado da qPCR de presença do plasmídeo com as ITRs em células S2 eletroporadas sem o plasmídeo *helper*, para verificarmos se é possível que haja alguma outra fonte de transposase capaz de reconhecer as ITRs de *piggyBac* no genoma das células S2. Como podemos observar nos pontos coloridos do gráfico, a princípio podemos dizer que há uma indicação de mobilização do inserto com as ITRs de *piggyBac* sem a presença do plasmídeo *helper*, abrindo portas para novas discussões. Para a reação de qPCR que deu origem a esse gráfico foram usados os *primers* pyBACqPCR_Exc e o pyBACpPCR_F.

4. DISCUSSÃO

Sobre as características e o histórico de ensaios de excisão do elemento *piggyBac*, outro tipo celular já fora testado, bem como foi utilizado um baculovírus como vetor. No entanto, uma vez que este ensaio foi feito em células infectadas por vírus, o envolvimento dos produtos dos genes virais

codificados para gerar os eventos de excisões precisas não poderiam ser excluídos. Porém, já foi demonstrado que a excisão precisa de *piggyBac* ocorre na ausência de quaisquer proteínas virais codificadas e que a frequência destes eventos de excisão precisas em células IPLB-SF21AE (cultura de células de nome popular sf21, do inseto *Spodoptera frugiperda*) transitoriamente transfectadas é grandemente aumentada pela presença de um elemento auxiliar, o plasmídeo *helper*, que codifica uma transposase completa de *piggyBac* e que deixa para trás, depois da excisão, uma pegada característica, um único sitio TT'AA. A partir destes resultados pode-se inferir que a excisão de *piggyBac* envolve quebras de cadeia dupla em algum lugar dentro dos locais-alvo flanqueados por TT'AA e que o vazão criado pela excisão do transposon é imediatamente reparado por ligações das extremidades livres de DNA (Elick et al. 1996). Análises anteriores haviam demonstrado que a transposição de elementos *piggyBac* geneticamente marcados foi reforçada pela presença do transposon auxiliar p3E1.2 (Fraser et al. 1995), estabelecendo que a excisão precisa de *piggyBac* também é melhorada pela adição de um transposon auxiliar inserido no plasmídeo p3E1.2 em células IPLB-SF21AE transfectadas, esse plasmídeo é, pois, uma fonte de transposase de *piggyBac*. Excisões de *piggyBac* geneticamente marcados, a partir de genomas mutantes de baculovírus foram, também, observadas na ausência de um transposon *helper* (Fraser et al., 1995), entretanto, nesses experimentos, não foi possível detectar excisão como eventos significativamente reportados. Excisões independentes do plasmídeo *helper* provavelmente ocorrem em alguma frequência da linha de base. Na verdade, foi observado um único evento de excisão de *piggyBac* independentemente do plasmídeo *helper* em células IPLB-SF21AE em experimentos separados, contudo um único evento não é uma demonstração conclusiva, então acreditou-se que a confirmação de excisões precisas independentes de plasmídeos *helper*, com plasmídeos adicionais a serem escolhidos e testados, ainda precisa ser estudada.

Embora o foco do trabalho não tenha sido analisar e comparar as pegadas de excisão dos elementos, é importante a compreensão e o estudo da forma com que o elemento transponível deixa

o lugar que ocupava no genoma. Sobre *piggyBac*, a relevância de saber como é seu método de excisão resume-se ao fato de já ser considerado uma importante ferramenta para estudos de terapia gênica, por exemplo. A excisão de *piggyBac* é única dentre os transposons de Classe II, visto que nenhum outro transposon dessa classe deixa pegadas de excisão precisas na frequência observada para *piggyBac*. Outros transposons Classe II costumam deixar nucleotídeos de enchimento ou resíduos terminais nas lacunas criadas pela excisão, resultando em pegadas imprecisas de excisão (Atkinson et al. 1993; Handler & Gomez, 1995; O'Brochta & Handler, 1993; Takasu-Ishikawa et al. 1992; Coen & Carpenter, 1988; O'Brochta et al. 1991; van Leunen et al. 1994; Moerman et al. 1991).

Fazendo um paralelo com outros elementos transponíveis de mesma classe, no caso de o elemento *hobo* de *Drosophila melanogaster*, a excisão a partir de plasmídeos em embriões microinjetados envolve, mais frequentemente, a remoção completa de *hobo* e alguns nucleotídeos que o flanqueiam, com a adição de sequências de DNA relacionadas às sequências flanqueadoras do elemento nos pontos de interrupção de excisão do transposon. O processo de excisão de *hobo* requer a transposase do próprio *hobo* ou mobilização *in trans* por um transposon semelhante com atividade *hobo-like* (Atkinson et al. 1993; Gomez & Handler, 1995; O'Brochta & Handler, 1993; O'Brochta et al, 1994;. Warren et al. 1994).

Do mesmo modo, no elemento *piggyBac* a mobilização pode ser do tipo cruzada, em que o elemento é mobilizado por outros elementos TT'AA- específicos residentes na linhagem celular IPLB-SF21AE, na ausência de adição da transposase de *piggyBac* (Fraser et al., 1995), essa seria uma das formas para explicar a presença de mobilização do inserto portador das ITRs de *piggyBac* identificadas em nossas análises de qPCR (figura 9) , sendo uma interessante descoberta, uma vez que seja corroborado por outros métodos que há, no genoma da linhagem de células S2 algum gene para transposase de elementos TT'AA- específicos.

Da mesma maneira que *piggyBac*, o elemento *P* pode excisar-se precisamente de plasmídeos *in vitro* na presença de transposase (Rio et al. 1986), mas esse evento não é frequente. Além disso, o elemento *P*, na maioria das vezes, excisa imprecisamente *in vivo*, deixando para trás as sequências repetitivas terminais residuais nos pontos excisão (O'Brochta et al. 1991; Takasu-Ishikawa et al. 1992). Os eventos de excisões precisas aparentes de elementos *P* genômicos *in vivo* são homólogo-dependentes de reparação dos *gaps* gerados (Engels et al., 1990).

Como não existem modelos de reparação ectópica representando *piggyBac* nos locais vazios tanto em ensaios baseados em plasmídeos ou em células infectadas com baculovírus, a excisão precisa de *piggyBac* é mais provável que ocorra acoplada ao seu próprio processo de clivagem ao invés de ser uma consequência de um evento posterior de reparação. Elick *et al.*, 1996 deduziram um modelo de excisão de *piggyBac* que envolve a clivagem de cadeia dupla e geração de extremidades coesivas no *gap* de excisão, uma vez que este é o único modelo que explica, de forma satisfatória, a excisão precisa e de alta frequência observada em ambos os baculovírus replicantes (Fraser et al. 1995) e os plasmídeos não replicantes.

Resultados obtidos com *piggyBac* vão de encontro ao modelo abrangente que explica todas as pegadas de excisão dos elementos de Classe II, pois tal modelo não explica as pegadas de excisão variáveis de outros transposons Classe II como *hobo*, elemento *P*, *Tcl* ou *Mariner*. A linhagem celular IPLB-SF21AE, derivada de *S. frugiperda*, foi criada em meados de 1970 (Vaughn et al., 1977) e é desprovida de sequências homólogas a *piggyBac* e, mesmo assim, *piggyBac* é capaz de excisar-se em alta frequência em células IPLB-SF21AE quando lhe é fornecida uma transposase de *piggyBac*. Um relatório anterior (Fraser et al., 1995) demonstrou que *piggyBac* também é capaz de transpor nestas células, uma vez que o processo de excisão em células IPLB-SF21AE (Fraser et al. 1995). Um ensaio de excisão poderia, então, ser útil para determinar a capacidade de mobilizar *piggyBac* em outras espécies também.

Dessa forma, neste trabalho, apresentamos a capacidade de excisão de *piggyBac* em células da linhagem S2 de *Drosophila melanogaster*, abrindo caminho para estudos de eletroporação e transposição com essa linhagem celular, uma vez que podemos, a partir de agora, além de detectar excisão, quantificar a mobilidade desse elemento nessa linhagem celular e também estudar os níveis de inserção desses fragmentos excisados no genoma das células por meio da detecção de presença ou ausência da expressão do gene *Egfp* nas células em cultura, utilizando as mais modernas técnicas de microscopia confocal.

Já foram desenvolvidos vários métodos para análise *in vivo* de frequência de transposição, com exemplos típicos incluindo cruzamentos e ensaios com fagos (Miller. 1992; Wenreich & Reznicoff. 1992; Pajunen et al. 2010), porém esses métodos não são ideais para estudos em larga escala. Atualmente, os métodos mais difundidos para estudar transposição *in vivo* são por meio de coloração de microcolônias ('papilas') crescendo dentro de colônias incolores de bactérias. Esses ensaios de "papilação" foram desenvolvidos para eventos de excisão de um *locus* específico (Foster et al. 1981). Mais recentemente, a maioria dos ensaios de "papilação" exploram um transposon repórter específico, sendo típica a utilização do gene *lacZ* como marcador, onde a inserção do transposon repórter dentro de um locus genômico sob o controle de um promotor ativo, deve gerar uma fusão gênica, facilitando a expressão do gene *lacZ*, detectável como papilas coloridas Lac⁺ e Lac⁻ em colônias sem coloração, sendo o número de papilas coloridas por colônia proporcional a frequência de eventos de transposição, catalisados pela transposase. Ensaios de papilação são específicos para o transposon de interesse e há exemplos para o elemento *Tn5* (Makris et al. 1998), *Tn7* (Lu & Craig. 2000), *Tn10* (Bender & Kleckner. 1992), *IS903* (Twiss et al. 2005) e *Mu* (Lee & Harshey).

Em 2010, Pajunen e colaboradores propuseram um método de papilação com algumas diferenças utilizando como modelo-teste a transposição do fago *Mu*, sendo esse método aplicável a

uma grande variedade de elementos móveis. Muitos desses ensaios de papilação carecem de ajustabilidade para serem empregados em diferentes elementos, e, além disso, outros são bastante complicados porque requerem o uso de vários plasmídeos. Dessa maneira, fica clara a necessidade de métodos mais simples e rápidos de quantificar a excisão de elementos transponíveis. A técnica de quantificação por meio de qPCR é uma alternativa de baixo custo para laboratórios que já possuem o equipamento e de rápida execução, necessitando de pouco material além dos pares de *primers* a serem utilizados e dos reagentes necessários para as reações.

5. CONCLUSÃO

Nossos dados sugerem que, de fato, *piggyBac* pode ser mobilizado em células S2 de *Drosophila melanogaster* utilizando um plasmídeo *helper* como fonte de transposase, como mostra a figura 6. É interessante notar a posição dos ensaios de recuperação do plasmídeo sem a transposase na curva gerada pelos valores de Ct das diluições em série do plasmídeo amplificados pelos *primers* de presença na figura 8, que foi muito semelhante ao gráfico gerado na figura 7. Caso seja um evento em que *piggyBac* consegue mobilizar-se em células S2 sem a presença de um plasmídeo *helper* portando a transposase, acabamos por apresentar um método capaz de detectar pequenas taxas de excisão, resolvendo o problema citado por Fraser et al. 1995 mencionado acima. Os valores de Ct da figura 6 indicam taxas de excisão bem mais significativas do que o apresentado da figura 7.

6. PERSPECTIVAS

Os dados apresentados no presente trabalho trazem uma abordagem estimativa de quantificação de excisão, visto que para que possa ser feita a quantificação exata de eventos de excisão, necessitamos refinar ainda mais a análise das amplificações por qPCR acrescentando mais diluições para comparação, bem como mais ensaios positivos de excisão podem contribuir para uma

visão mais real dos processos moleculares envolvidos nos eventos de mobilização e transposição de elementos transponíveis.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ATKINSON EW, WARREN WD, O'BROCHTA DA. The hobo transposable element of *Drosophila* can be cross-mobilized in houseflies and excises like the Ac element of maize. **Proc. Nat. Acad. Sci. USA** 90: 9693-9697. 1993.
- BALU B, SHOUE DA, FRASER MJ JR., ADAMS JH. High-efficiency transformation of *Plasmodium falciparum* by the lepidopteran transposable element *piggyBac*. **Proceedings of the National Academy of Sciences. USA** 102(45):16391-16396. 2005.
- BENDER J, KLECKNER N. IS10 transposase mutations that specifically alter target site recognition. **EMBO J.** 11:741-750. 1992.
- BENNETZEN, J.L. Transposable element contributions to plant gene and genome evolution. **Plant Molecular Biology.** Vol. 42, No. 1, pp. 251-269. 2000.
- BIEMONT C. A Brief History of the Status of Transposable Elements: From Junk DNA to Major Players in Evolution. **Genetics.** v. 186, p. 1085–1093. 2010.
- BIÈMONT C. AND VIEIRA C. Genetics: junk DNA as an evolutionary force. **Nature.** Vol. 443, No. 7111. pp. 521-524. 2006.
- CAPY P, BAZIN C, HIGUET D, LANGIN T. Dynamics and evolution of transposable elements. **Landes Bioscience.** Austin, Texas, 197pp. 1998.
- CARY LC, GOEBEL M, CORSARO BG, WANG HG, ROSEN E, FRASER MJ. (Transposon mutagenesis of baculoviruses: analysis of *Trichoplusia ni* transposon IFP2 insertions within the FP-locus of nuclear polyhedrosis viruses. **Virology.** 172(1):156-169.1989.
- COEN ES, CARPENTER R. A semi-dominant allele, niv-525, works in trans to inhibit expression of its wild-type homologue in *Antirrhinum majus*. **J. Eur. Mol. Bio. Org.** 7: 877- 883. 1988.
- CORDAUX R, UDIT S, BATZER MA, FESCHOTTE C. Birth of a chimeric primate gene by capture of the transposase from a mobile element. **Proceedings of the National Academy of Sciences.** v. 103, p. 8101-8106. 2006.
- DING S, WU X, LI G, HAN M, ZHUANG Y, XU TH (2005). Efficient transposition of the *piggyBac* (PB) transposon in mammalian cells and mice. **Cell.** 122(3):473-483.

- ELICK TA, BAUSER CA, FRASER MJ. Excision of the *piggyBac* transposable element in vitro is a precise event that is enhanced by the expression of its encoded transposase. **Genetica**.98: 33—41. 1996.
- FESCHOTTE C, PRITHAM EJ. DNA Transposons and the evolution of eukaryotic genomes. **Annual Review of Genetics**. v. 41, p. 331-368. 2007.
- FINNEGAN DJ. Eukaryotic transposable elements and genome evolution. **Trends in Genetics**., v. 5, p. 103-107. 1989.
- FLAVELL RB. Genetical repetitive DNA and chromosome evolution in plants. **Philos. Trans. R. Soc. Lond. Ser. B** 312: 227–242. 1986.
- FOSTER TJ, LUNDBLAD V, HANLEY-WAY S, HALLING SM, KLECKNER N. Three Tn10 associated excision events: relationship to transposition and role of direct and inverted repeats. **Cell**. 23;215-227. 1981.
- FRASER MJ, BRUSCA JS, SMITH GE, SUMMERS MD. Transposon-mediated mutagenesis of a baculovirus. **Virology**. 145(2):356-361.1985.
- FRASER MJ, CARY L, BOONVISUDHI K, WANG HG. Assay for movement of Lepidopteran transposon IFP2 in insect cells using a baculovirus genome as a target DNA. **Virology**. 211(2):397-407. 1995.
- FRASER MJ, SMITH GE, SUMMERS MD. (1983). Acquisition of host cell DNA sequences by baculoviruses: Relationship between host DNA insertions and FP mutants of *Autographa californica* and *Galleria mellonella* nuclear polyhedrosis viruses. **J Virol**. 47:287-300.
- FRASER MJ. The TT'AA-specific family of transposable elements. In *Insect Transgenesis: Methods and Applications*. Edited by: James AA, Handler AH. Orlando, **CRC Press**. 2000.
- GIRAUD T, CAPY, P. Somatic activity of mariner transposable element in natural populations of *Drosophila simulans*. **Proceedings of the Royal Society B**. v. 263, p.1481- 1486. 1996.
- HANDLER AM. Use of the *piggyBac* transposon for germ-line transformation of insects. **Insect Biochem Mol Biol**, 32(10):1211-1220. 2002.
- HANDLER AM, GOMEZ SP. The hobo transposable element has transposase-dependent and independent excision activity in drosophilid species. **Mol. Gen. Genet**. 247: 399-408. 1995.
- HANDLER AM, MCCOMBS SD, FRASER MJ, SAUL SH.. The lepidopteran transposon vector, *piggyBac*, mediates germ-line transformation in the Mediterranean fruit fly. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. USA, 95(13):7520-7525. 1998.
- HORN C, WIMMER EA. A versatile vector set for animal transgenesis. **Dev Genes Evol** 210: 630-637. 2000.
- HUA-VAN A, LE ROUZIC A, BOUTIN TS, FILEE J, CAPY P.The struggle for life of the

- genomes selfish architects. **Biol Direct**. 6 (1):p19. 2011.
- JOSEPH SAMBROOK, DAVID RUSSELL. "Chapter 1". *Molecular Cloning - A Laboratory Manual 1* (3rd ed.). p. 1.27. ISBN 978-0-87969-577-4.
- KIDWELL MG, LISCH DR. Transposable elements as sources of variation in animals and plants. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. v. 94, p. 7701-7711. 1997.
- LEE I, HARSHEY RM: Importance of the conserved CA dinucleotide at Mu termini. **J Mol Biol** 314:433-444. 2001.
- LORETO ELS, ORTIZ MF, REBELO JI.. Insertion sequences as variability generators in the *Mycoplasma hyopneumoniae* and *M. synoviae* genomes. **Genetics and Molecular Biology**. 30, 1, 283-289. 2007.
- LORETO ELS, ZAHA A, NICHOLS C, POLLOCK JA, VALENTE VLS. Characterization of a hypermutable strain of *Drosophila simulans*. **Cellular and Molecular Life Science**. 54: 1283–1290.1998.
- LU F, CRAIG NL: Isolation and characterization of Tn7 transposase gain-of-function mutants: a model for transposase activation. **Embo J**. v 19, Issue 13, p. 3446-3457. 2000.
- MAKRIS JC, NORDMANN PL, REZNIKOFF WS: Mutational analysis of insertion sequence 50 (IS50) and transposon 5 (Tn5) ends. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. 85:2224-2228. USA. 1988.
- MILLER JH: *A short course in bacterial Genetics: A laboratory manual and handbook for Escherichia coli and related bacteria*. Cold Spring Harbour, NY: **Cold Spring Harbour Laboratory Press**; 1992.
- MOERMAN, D.G., J.E. KIFF , R.H. WATERSTON,. Germline excision of the transposable element Tc1 in *C. elegans*. **Nuc. Acids Res**. 19: 5669-5672. 1991.
- NOVACKI M, HIGGINS BP, MAQUILAN GM, SWART EC, DOAK TG , LANDWEBER LF. A Functional Role for Transposases in a Large Eukaryotic Genome. **Science**. v. 324, p. 935-938. 2009.
- O'BROCHTA DA, GOMEZ SP, HANDLER AM. *P* element excision in *Drosophila melanogaster* and related drosophilids. **Mol. Gen. Genet**. 225: 387-394. 1991.
- O'BROCHTA DA, HANDLER AM. Prospects and possibilities for gene transfer techniques in insects, pp. 451-488 in **Molecular Approaches to Fundamental and Applied Entomology**, edited by J. Oakeshott and M.J. Whitten. Springer-Verlag, New York. 1993.
- PRITHAM EJ. Transposable elements and factors influencing their success in eukaryotes. **Journal of Heredity**. v. 100, n. 5, p. 648-655. 2009.
- SANMIGUEL P, TIKHONOV A, JIN YK, MOTCHOULSKAIA N, ZAKHAROV D, MELAKE-

- BERHAN A, SPRINGER PS, EDWARDS KJ, LEE M, AVRAMOVA Z, BENNETZEN JL. Nested retrotransposons in the intergenic regions of the maize genome. **Science**. 274, 765–768. 1996.
- SARKAR A, SIM C, HONG YS, HOGAN JR, FRASER MJ, ROBERTSON HM, COLLINS FH. Molecular evolutionary analysis of the widespread *piggyBac* transposon family and related "domesticated" sequences. **Mol Genet Genomics**. 270(2):173-180. 2003.
- TAKASU-LSHIKAWA E, YOSHIHARA M, HOTTA Y. Extra sequences found at P element excision sites in *Drosophila melanogaster*. **Mol. Gen. Genet**. 232: 17-23. 1992.
- TORRES FP, FONTE LF, VALENTE VLS, LORETO ELS. Mobilization of hobo- related sequence in the genome of *Drosophila simulans*. **Genetica**. 126: 101–110. 2006.
- TWISS E, COROS AM, TAVAKOLI NP, DERBYSHIRE KM: Transposition is modulated by a diverse set of host factors in *Escherichia coli* and is stimulated by nutritional stress. **Mol Microbiol**. 57:1593-1607. 2005.
- VAN LEUNEN HGAM, COLLOMS SD, PLASTERK RHA. The mechanism of transposition of Tc3 in *C. elegans*. **Cell**. 79: 293-301. 1994.
- VAUGHN, GOODWIN RH, TOMPKINS GJ, MCCAWLEY P: The establishment of two cell lines from the insect *Spodoptera frugiperda* (lepidoptera; noctuidae). **In Vitro**. Volume 13, Issue 4, pp 213-217 April. 1977.
- WEINREICH MD, REZNIKOFF WS: Fis plays a role in Tn5 and IS50 transposition. **J Bacteriol**. 174;4530-4537.1992.
- WICKER T, SABOT F, HUA-VAN A, BENNETZEN JL, CAPY P, CHALHOUB B, FLAVELL, A., LEROY, P, MORGANTE M, PANAUD O, PAUX E, SANMIGUEL P, SCHULMAN, AH. A unified classification system for eukaryotic transposable elements. **Nat. Rev. Gen.**, 8: 973-982. 2007.