Christiane Rodriguez Gutierrez Madalena

**DNA repetitivo e seu papel na estrutura
cromossômica terminal de *Rhynchosciara*
americana (Diptera: Sciaridae)**

São Paulo

2008

Christiane Rodriguez Gutierrez Madalena

**DNA repetitivo e seu papel na estrutura
cromossômica terminal de *Rhynchosciara*
americana (Diptera: Sciaridae)**

Tese apresentada ao Instituto de
Biociências da Universidade de São
Paulo, para a obtenção de Título de
Doutor em Ciências, na Área de
Genética e Biologia Evolutiva.

Orientador: Eduardo Gorab

São Paulo

2008

Ficha Catalográfica

Madalena, Christiane Rodriguez Gutierrez
DNA repetitivo e seu papel na estrutura
cromossômica terminal de *Rhynchosciara*
americana (Diptera: Sciaridae)
181 páginas + anexos

Tese (Doutorado) - Instituto de Biociências
da Universidade de São Paulo. Departamento de
Genética e Biologia Evolutiva.

1. *Rhynchosciara americana*
2. Sequências repetitivas 3. Telômeros
I. Universidade de São Paulo. Instituto de
Biociências. Departamento de Genética e Biologia
Evolutiva.

Comissão Julgadora:

Prof (a). Dr.(a)

Prof (a). Dr(a).

Prof (a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof . Dr. Eduardo Gorab
Orientador

Aos meus avós Miguel e Micaela, Antonio e Maria de Lourdes,
pela constante vigília e inspiração.
À minha mãe, Paulinho e Julinho,
pelo carinho e dedicação.

This is Ground Control to Major Tom
You've really made the grade
And the papers want to know whose shirts you wear
Now it's time to leave the capsule if you dare
This is Major Tom to Ground Control
I'm stepping through the door
And I'm floating in a most peculiar way
And the stars look very different today.

David Bowie, "Space Oddity"

Agradecimentos

Ao meu orientador, Eduardo Gorab, por ter me aceitado em seu laboratório e me orientado, com dedicação e muita paciência, no caminho da Ciência;

À Renata, minha grande amiga na alegria, na tristeza e nas horas de trabalho;

À Miriam e à Susy, que me ajudaram muito com seu apoio técnico em experimentos; pelo carinho, bom humor, conselhos e preciosa amizade;

À Dani, pelas bactérias competentes totalmente excelentes, longas conversas e amizade sincera;

À Merari, que me ajudou muito com a formatação desta Tese; pelo carinho e anos de amizade;

Ao Max, pelo apoio técnico, pela coleta e cuidado com a nossa importante *Rhynchosciara*; e pela amizade;

À Família Lopes (Leo, Ricardo, Marcos, Alex, Michele), pelo apoio e diversão garantida;

À Ann, pelas hibridações *in situ*, correções de “Abstracts”, amizade e carinho;

Ao Luis Paulo, pelo apoio e estímulo;

Ao professor Renato Basile, por ter me mostrado como era um ovário de *Rhynchosciara americana*;

Aos amigos Alayne, Alisson, Ligiane e Glauber pelo apoio e amizade;

À querida Mariângela, que sempre “me empurrou pra frente” com sua força, carinho e palavras reconfortantes;

À Lucy, que tornou a minha vida muito mais fácil com seus seqüenciamentos maravilhosos;

À Profa. Dra. Ângela Morgante, que cedeu seu microscópio de fluorescência para que fizéssemos as fotos deste trabalho;

À FAPESP, pela concessão da bolsa e apoio financeiro para o desenvolvimento deste trabalho; e

À todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a concretização dessa Tese.

Índice

Capítulo 1. Introdução geral

1.1. A heterocromatina	1
1.2. DNA repetitivo	2
1.2.1. A descoberta das seqüências repetitivas nos genomas de eucariotos	2
1.2.2. Tipos de seqüências repetitivas	3
1.2.3. Os telômeros	5
1.2.3.1 A descoberta dos telômeros	5
1.2.3.2. O problema da replicação nas extremidades	6
1.2.3.3. A elucidação dos mecanismos de replicação telomérica e a caracterização molecular dos telômeros	7
1.2.3.4. Exceções ao modelo geral de organização telomérica	8
1.2.3.4.1 Seqüências teloméricas em dípteros	10
1.2.3.5. Seqüências subteloméricas	11
1.2.4. O DNA ribossômico	13
1.3. Nosso objeto de estudo: <i>Rhynchosciara</i> (Diptera: Sciaridae)	15
1.3.1. Aspectos gerais	15
1.3.2. Os cromossomos politênicos	16
1.3.3. O rDNA de <i>Rhynchosciara americana</i>	18
1.3.4. O nucléolo de <i>Rhynchosciara americana</i>	18
1.3.5. DNA repetitivo em <i>Rhynchosciara</i>	19
1.3.6. Estrutura telomérica em <i>Rhynchosciara</i>	21
1.4. Objetivos/ Justificativa	22
1.5. Referências Bibliográficas	23

Capítulo 2. Revisão da localização do DNA ribossomal em Sciaridae (Diptera: Nematocera)

Abstract/ Resumo	36
2.1. Introdução	38
2.2. Materiais e métodos	40
2.2.1. Animais	40
2.2.2. Preparação de lâminas de cromossomos politênicos e metafásicos	41
2.2.3. Preparação das sondas de DNA e hibridações <i>in situ</i>	41
2.2.4. Preparação da sonda de rRNA e hibridações <i>in situ</i>	43
2.2.5. Coloração com orceína	45
2.3. Resultados	45
2.3.1. <i>Trichosia pubescens</i>	45
2.3.2. <i>Rhynchosciara americana</i> .	47
2.2.3. <i>Rhynchosciara milleri</i> .	51
2.3.4. <i>Schwenkfeldina sp</i>	53
2.4. Discussão	59
2.5. Referências Bibliográficas	63

Capítulo 3. Caracterização de uma seqüência satélite terminal de *Rhynchosciara americana* com características de repetições teloméricas encontradas em Nematocera

Abstract/ Resumo	67
3.1. Introdução	69
3.2. Materiais e métodos	70
3.2.1. Animais	70

3.2.2. Procedimentos para preparações citológicas	71
3.2.3. Microdissecção	71
3.2.4. DOP-PCR	72
3.2.5. Clonagem e seqüenciamento dos produtos de PCR	72
3.2.6. PCR inverso	73
3.2.7. Marcação de sondas não-radiativas	74
3.2.8. Hibridações <i>in situ</i>	74
3.2.9. Hibridação simultânea à detecção da transcriptase reversa	75
3.2.10. “Southern blot”	75
3.3. Resultados	76
3.3.1. Isolamento de DNA repetitivo clonado e sua localização em <i>R. americana</i>	76
3.3.2. Análise da seqüência pRa-38 e caracterização total do satélite	78
3.3.3. O satélite terminal em outras espécies de <i>Rhynchosciara</i> .	80
3.3.4. Localização cromossômica do satélite terminal e da transcriptase reversa em <i>R. americana</i>	83
3.4. Discussão	85
3.5. Referências Bibliográficas	88

Capítulo 4. Identificação de seqüências repetitivas nas extremidades teloméricas de *Rhynchosciara americana* (Diptera: Sciaridae)

Abstract/ Resumo	91
4.1. Introdução	93
4.2. Materiais e métodos	95
4.2.1. Animais	95
4.2.2. Bactérias	95
4.2.3. Biblioteca genômica clonada em fagos	95
4.2.4. Metodologia para exploração da biblioteca genômica clonada em fagos	95
4.2.4.1. Preparo das bactérias hospedeiras HFA600	96
4.2.4.2. Plaqueamento dos fagos e cálculo do título do banco genômico	96
4.2.4.3. Transferência dos halos de lise para membrana de nitrocelulose	97
4.2.4.4. Marcação das sondas radiativas	97
4.2.4.5. Hibridação de sonda radiativa nas membranas de nitrocelulose	98
4.2.4.6. Seleção dos halos de interesse	99
4.2.4.7. Amplificação do DNA de fago contendo insertos de interesse	99
4.2.4.8. Extração de DNA de fago com insertos de interesse	100
4.2.4.9. Preparação citológica de cromossomos politênicos	101
4.2.4.10. Marcação de sondas, para hibridação <i>in situ</i> , através de reação de “Nick Translation”	102
4.2.4.11. Marcação de sondas, para hibridação <i>in situ</i> , através de reação de PCR	102
4.2.4.12. Hibridação <i>in situ</i> em lâminas com preparações de cromossomos politênicos de <i>R. americana</i>	103
4.2.4.13. Digestão de DNA dos fagos de interesse com enzimas de restrição	103
4.2.4.14. “Southern blot” e hibridação com sonda radiativa	104
4.2.4.15. Digestões <i>EcoRI</i> e <i>Sall</i> para subclonagem dos insertos de interesse.	105

4.2.4.16. Preparação de vetores plasmidiais para ligações com o DNA de fagos digeridos com enzimas de restrição <i>EcoRI</i> ou <i>Sall</i>	105
4.2.4.17. Clonagem dos fragmentos obtidos a partir da digestão do inserto dos fagos de interesse: ligação do DNA de fago, transformação bacteriana, extração plasmidial e análise dos subclones de interesse	106
4.2.4.18. Reações de seqüenciamento; seqüenciamento das amostras e análise das amostras seqüenciadas	107
4.2.4.19. Reações de PCR com primers M16f e M16r	107
4.2.4.20. Clonagem das amostras de interesse: a obtenção do clone pRa5.2	108
4.2.4.21. Detecção simultânea de hibridação e da transcriptase reversa	108
4.2.4.22. Hibridação em “Southern blot” para verificação da repetitividade dos subclones do inserto do fago λ 1	109
4.2.4.23. Mapeamento do inserto do fago λ 1	109
4.3. Resultados	110
4.3.1. Exploração da biblioteca genômica de <i>R. americana</i> clonada em fagos λ Dash utilizando-se como sonda o clone pRaM47.33, representativo da repetição M22	110
4.3.1.1. A seleção dos fagos de interesse	110
4.3.1.2. Análise do inserto do fago λ 11	113
4.3.1.3. Subclonagem dos fragmentos de DNA produzidos pela digestão <i>EcoRI</i> do inserto do fago λ 11	114
4.3.1.4. Seqüenciamento dos insertos dos subclones obtidos	115
4.3.2. Exploração de biblioteca genômica de <i>R. americana</i> clonada em fago λ Dash, com sonda das repetições M16 de <i>R. americana</i>	122
4.3.2.1. A seleção dos fagos de interesse	122
4.3.2.2. Análise dos insertos dos fagos λ 2, λ 8, λ 14, λ 16 e λ 22	123
4.3.2.2.1. O elemento “Mariner” em <i>R. americana</i>	126
4.3.2.3. Análise do inserto do fago λ 1	128
4.3.2.4. Grau de repetitividade de seqüências do inserto do fago λ 1	140
4.3.2.5. Análise do inserto do fago λ 1 através de digestões com enzima de restrição <i>Sall</i>	142
4.3.2.6. Localização cromossômica das seqüências subclonadas	144
4.3.2.7. Hibridação em “Southern blot” para mapeamento do fago λ 1	146
4.3.3. Exploração de biblioteca genômica de <i>R. americana</i> clonada em fago λ Dash, com sonda de parte do retrotransposon telomérico “TAHRE”, de <i>D. melanogaster</i>	149
4.3.3.1. A seleção dos fagos de interesse	149
4.4. Discussão	150
4.5. Referências Bibliográficas	156

Capítulo 5. Considerações finais e conclusões	161
--	-----

Anexos	163
---------------	-----

Anexo I. Artigo I. The localization of ribosomal DNA in Sciaridae (Diptera: Nematocera) reassessed

Anexo II. Artigo II. A chromosome end satellite of *Rhynchosciara americana* (Diptera: Sciaridae) resembling nematoceran telomeric repeats

Anexo III. Artigo III. Unusually short tandem repeats in the chromosome end structure of *Rhynchosciara* (Diptera: Sciaridae)

CAPÍTULO 1. INTRODUÇÃO GERAL

1.1. A heterocromatina

A heterocromatina foi originalmente descrita por HEITZ (1928), como regiões que apareciam mais coradas em relação às demais regiões cromossômicas. A heterocromatina não se descondensa após a divisão celular e permanece compactada ao longo da intérfase. É caracterizada em dois tipos, facultativa e constitutiva, sendo o primeiro tipo restrito a determinados tipos celulares, como por exemplo o cromossomo X inativo nos mamíferos. Já a heterocromatina constitutiva é encontrada em todos os tipos celulares e observada em compartimentos cromossômicos essenciais para a função celular como os centrômeros, telômeros e em regiões organizadoras do nucléolo (HEITZ, 1928; MCCLINTOCK, 1938). A heterocromatina possui pouquíssimos genes (PIMPINELLI *et al.*, 1985) e seu DNA replica tardiamente na fase S (LIMA DE FARIA & JAWORSKA, 1968). Bioquimicamente, a heterocromatina é composta principalmente de DNA repetitivo complexado com proteínas histônicas e não-histônicas, cuja caracterização em detalhe iniciou-se a partir da década de 1980. Têm chamado a atenção nestes estudos os que são voltados às modificações pós-traducionais que ocorrem em histonas na heterocromatina (revisões em CARROL & STRAIGHT, 2006; HEDIGER & GASSER, 2006; NIGHTINGALE *et al.*, 2006). Muito do que se sabe hoje sobre a estrutura e função da heterocromatina vem dos trabalhos realizados em *Drosophila* (referências acima). Contudo, a investigação feita em organismos que não apresentam as facilidades de *Drosophila* tem permitido descobertas que ampliam o horizonte do conhecimento estabelecido pelos organismos-modelo. Estudos moleculares da heterocromatina de dípteros da família Sciaridae (sub-ordem Nematocera) tiveram início com a localização do rDNA e do DNA satélite em cromossomos politênicos de

Rhynchosciara hollaenderi (PARDUE *et al.*, 1970; ECKHARDT & GALL, 1971). Pouco mais tarde, métodos de hibridação usando como sonda RNA poli-U revelaram a existência de DNA homopolimérico (dA/dT) na heterocromatina centromérica e telomérica de *R. americana* (JONES *et al.*, 1973). A continuidade destes estudos deu-se com a introdução de sondas não marcadas ou marcadas não-radiativamente para hibridação *in situ*. Extremidades cromossômicas não-centroméricas de duas espécies do gênero *Rhynchosciara* hibridam com poli-rA, enquanto que o rDNA está geralmente localizado nas extremidades centroméricas (STOCKER *et al.*, 1993; STOCKER & GORAB, 2003).

1.2. DNA repetitivo

1.2.1. A descoberta das seqüências repetitivas nos genomas de eucariotos

Por volta do ano de 1965, pesquisadores constataram que era possível observar a renaturação do DNA de mamíferos e que uma certa fração desse DNA era capaz de se renaturar até mais rapidamente que o DNA de *E. coli*, cujo genoma é menos extenso que o genoma dos mamíferos. Esta fração em particular foi denominada fração satélite, pois apresentava-se como uma banda distinta da fração principal em experimentos de centrifugação por gradiente de densidade de CsCl. Com base nesses resultados, lançou-se a hipótese de que essa capacidade de renaturação rápida devia-se à existência de seqüências que se encontram repetidas muitas vezes no genoma (WARING & BRITTEN, 1966). A partir destas primeiras observações, diversos experimentos adicionais foram realizados, até que se chegou à conclusão de que nos genomas de eucariotos existem, de modo geral, três tipos de seqüências de DNA:

- Sequências altamente repetitivas (renaturação rápida): essa fração é constituída por sequências que renaturam rapidamente, que podem estar repetidas milhares de vezes no genoma;
- Sequências moderadamente repetitivas: nesta fração estão inclusos os genes de rRNA e de histonas;
- Sequências de cópia única (renaturação lenta): é a maior fração, e contém a maioria dos genes funcionais. Para uma revisão sobre o assunto, ver LARA *et al.*, 2002.

1.2.2. Tipos de sequências repetitivas

Atualmente, sabe-se que os fragmentos genômicos que formam as bandas satélite de DNAs eucarióticos são constituídos principalmente por repetições em tandem, as quais podem ser subdivididas, de acordo com o tamanho da unidade de repetição, em três classes principais: satélites, minissatélites e microsatélites.

Geralmente, são consideradas satélites as repetições em tandem cujo tamanho da unidade de repetição em pares de bases é maior ou igual a 100 (GRIFFITHS *et al.*, 1996). Estas repetições normalmente encontram-se organizadas em arranjos muito longos, e concentram-se principalmente nas heterocromatinas pericentromérica e subtelomérica (revisto em UGARKOVIC & PLOHL, 2002).

Os minissatélites compreendem uma classe de sequências repetitivas cuja unidade de repetição pode ter entre 10 e 100 pares de bases (revisto em INUKAI, 2004). Em seres humanos, estas repetições são freqüentemente ricas em GC (JEFFREYS *et al.*, 1985; NAKAMURA *et al.*, 1987). Minissatélites já foram caracterizados em diversos organismos, como por exemplo, seres humanos (INGLEHEARN & COOKE, 1990; ARMOUR & JEFFREYS, 1992), outros primatas

(ROYLE *et al.*, 1994), alguns mamíferos (BRENIG & BREM, 1991; KITAZAWA *et al.*, 1994; JOSEPH & SAMPSON, 1994), aves (GYLLENSTEN *et al.*, 1989), insetos (BLANCHETOT, 1990; JACOBSEN *et al.*, 1992), peixes (HARRIS & WRIGHT, 1995) e plantas (BROUN & TANKSLEY, 1993; WINBERG *et al.*, 1993). Podem ser encontrados em diversas regiões do genoma, porém costumam estar concentrados nas regiões subteloméricas dos cromossomos (ROYLE *et al.*, 1988). Há uma hipótese de que estas seqüências possam desempenhar algum papel na recombinação gênica (FLETCHER, 1994) e alguns estudos revelaram a existência de proteínas que se ligam especificamente a minissatélites nos cromossomos (COLLICK & JEFFREYS, 1990; WAHLS *et al.*, 1991; YEE *et al.*, 1991). Existem também minissatélites codificantes localizados em genes. Nos genes humanos de apolipoproteína existem minissatélites codificantes cuja unidade de repetição pode ter 33 ou 66 pares de bases (revisto em BOIS & JEFFREYS, 1999).

Os microssatélites, também chamados de SSRs (do inglês “Simple Sequence Repeats”), possuem unidades de repetição inferiores a 10 pares de bases (revisto em RICHARD & PÂQUES, 2000). Encontram-se geralmente concentrados nas regiões centroméricas e teloméricas dos cromossomos, mas podem estar presentes em outras regiões do genoma. Até pouco tempo atrás, acreditava-se que estas seqüências não possuíam importância funcional, sendo consideradas apenas marcadores evolutivamente neutros. No entanto, estudos recentes mostram que existem SSRs envolvidos na regulação da expressão gênica, organização da cromatina, replicação do DNA e também correlacionados a algumas enfermidades humanas. Porém, o papel funcional da maioria dos microssatélites permanece desconhecido (LI *et al.*, 2002).

Os loci de minissatélites e microssatélites possuem alto grau de polimorfismo e apresentam altas taxas de mutação por geração, sendo amplamente utilizados como

marcadores moleculares em estudos populacionais, em testes de paternidade e como ferramentas de reconhecimento individual em investigações criminais (JEFFREYS *et al.*, 1985; LI *et al.*, 2002).

Nem todas as seqüências repetitivas formam arranjos em tandem; elas podem aparecer dispersas no genoma, alternadas com outras seqüências. Exemplos de seqüências repetitivas dispersas são as seqüências “Alu” do genoma humano e os elementos móveis (transposons e retrotransposons). Os elementos móveis são seqüências capazes de se transportar de um local a outro dentro do genoma, e podem ser divididos em duas grandes classes: transposons e retrotransposons. Os transposons são constituídos por seqüências de DNA que codificam proteínas capazes de realizar a propagação destes elementos no genoma. Já os retrotransposons, mobilizam-se via um intermediário de RNA que, por transcrição reversa, geram novas cópias de DNA que poderão ser integradas ao genoma (LEWIN, 2001).

1.2.3. Os telômeros

1.2.3.1 A descoberta dos telômeros

A palavra telômero vem do grego *telos* (final) e *meros* (parte), e foi empregada pela primeira vez por Hermann J. Müller, em 1938, para designar as extremidades naturais dos cromossomos. Estudando o efeito da irradiação com raios X em larvas de *Drosophila*, Müller sugeriu que estas extremidades possuíam uma estrutura particular, diferente do resto do cromossomo, já que não observava mutantes com inversões ou deleções que envolvessem as extremidades cromossômicas. Propôs ainda que estas extremidades possuíam a função de "selar" o cromossomo. Também

em 1938, analisando cromossomos de milho, Barbara McClintock observou que as extremidades naturais podiam, em alguns casos, se regenerar após a ruptura do cromossomo, selando novamente as extremidades coesivas que haviam se formado como consequência da ruptura, fenômeno que denominou “chromosome healing”. A partir destas observações, McClintock formulou o conceito de que as extremidades naturais dos cromossomos encontram-se protegidas dos eventos de fusão a que estão sujeitas outras regiões cromossômicas ao sofrerem quebras (revisto em MCKNIGHT & SHIPPEN, 2004).

A primeira concepção de telômero, baseada nos estudos descritos acima, era a de uma extremidade protetora que assegurava a integridade do cromossomo, impedindo a degradação do DNA terminal e a fusão entre cromátides.

Atualmente sabe-se que, além da função protetora, estas estruturas terminais devem compensar a perda de DNA pela incapacidade da DNA polimerase em replicar completamente a extremidade de uma molécula de DNA linear. Além disso, as extremidades cromossômicas estão relacionadas a senescência celular, pontos de parada durante o ciclo celular e desenvolvimento de tumores (revisado em BLACKBURN, 2001; GREIDER, 1998).

1.2.3.2. O problema da replicação nas extremidades

Logo após a descoberta de que a replicação do material genético é semiconservativa, dois pesquisadores, em estudos independentes, (OLOVNIKOV, 1971,1973; WATSON, 1972) levantaram a questão do problema da replicação nas extremidades cromossômicas.

A DNA polimerase requer um oligoribonucleotídeo iniciador (do inglês, “primer”) e uma cadeia molde para iniciar a síntese de uma fita de DNA. A cadeia

“leading” necessita de apenas um “primer”, a partir do qual a síntese ocorre de forma contínua. Porém a cadeia “lagging”, sintetizada de forma semi-descontínua, necessita de um “primer” para iniciar a síntese de cada fragmento de Okazaki. Como a DNA polimerase só consegue adicionar nucleotídeos a uma cadeia em crescimento no sentido 5'-3', mesmo que um “primer” seja posicionado bem no final do último fragmento de Okazaki, quando este “primer” for removido, não haverá como adicionar nucleotídeos para substituí-lo, já que restará apenas a extremidade 5' livre da cadeia em crescimento. Como consequência, a síntese desta cadeia ficará incompleta, levando ao encurtamento gradual do cromossomo a cada ciclo de replicação. Passou-se então a buscar a resposta para a seguinte pergunta: como a perda de material genético a cada ciclo de replicação é compensada?

1.2.3.3. A elucidação dos mecanismos de replicação telomérica e a caracterização molecular dos telômeros

Em 1978 foi isolada pela primeira vez, no ciliado *Tetrahymena* (Protozoa: Ciliata), uma sequência repetitiva associada ao seu DNA ribossômico extracromossômico, que posteriormente foi caracterizada como telomérica (BLACKBURN & GALL, 1978). A partir daí, foram descritas sequências teloméricas de diversas espécies, chegando-se à conclusão de que a maioria dos organismos eucariontes estudados até o momento possuem telômeros constituídos por sequências curtas e ricas em G, formando blocos de repetições em tandem, sendo o motivo mais comum a repetição (TTAGGG)_n, caracterizada inicialmente em humanos (MOYZIS *et al.*, 1988) e encontrada também na maioria dos vertebrados (MEYNE *et al.*, 1989). Outro exemplo de sequência telomérica curta é o motivo (TTTAGGG)_n, aparentemente conservado no reino vegetal (COX *et al.*, 1993; FUCHS *et al.*, 1995).

O estudo dos telômeros de *Tetrahymena* possibilitou a elucidação do mecanismo pelo qual as seqüências teloméricas se replicavam (GREIDER & BLACKBURN, 1985). Descobriu-se que uma enzima especial, a telomerase, impedia o encurtamento dos cromossomos a cada ciclo celular. Essa enzima é uma ribonucleoproteína com atividade de transcriptase reversa, e é a responsável pela replicação das seqüências teloméricas curtas observadas na grande maioria dos eucariontes. Ela reconhece a fita rica em G de uma seqüência telomérica alongando-a na direção 5'- 3', e possui uma molécula de RNA própria, que serve de molde para a síntese de novas cópias da repetição telomérica. Após vários ciclos de extensão pela telomerase, a replicação da extremidade do cromossomo pode ser completada pela DNA polimerase, que utiliza estas extensões como moldes para a síntese de uma nova fita complementar.

Atualmente, sabe-se que os telômeros são estruturas nucleoprotéicas localizadas nas extremidades dos cromossomos, constituindo uma proteção contra o ataque de endonucleases, recombinação e fusões intercromossômicas. Além disto, possuem a importante função de preservar o cromossomo, compensando a perda de material genético a cada ciclo de replicação, uma vez que a DNA polimerase não é capaz de replicar completamente as extremidades de uma molécula de DNA linear (BLACKBURN, 2005).

1.2.3.4. Exceções ao modelo geral de organização telomérica

Embora a maioria dos organismos eucariontes possua telômeros constituídos de repetições curtas em tandem do tipo (TTAGGG)_n, replicadas através da enzima telomerase (revisado em ZAKIAN, 1995), existem certos insetos e plantas que representam exceções a esta regra. No vegetal *Allium cepa*, por exemplo, foi observado que os telômeros podem ser constituídos por repetições de uma seqüência complexa de

aproximadamente 375 pares de bases, ou por DNA ribossômico (PICH & SCHUBERT, 1998). Outros trabalhos descrevem o rDNA como sequência telomérica em algas e plantas superiores (GILSON & MCFADDEN, 1995; PICH & SCHUBERT, 1998), e também como componente dos centrômeros em *Pinus densiflora* (HIZUME *et al.*, 2001). Em *Octodrilus complanatus* (Annelida: Oligochaeta: Lumbricidae), as unidades de rDNA foram descritas como sequências associadas a regiões teloméricas (VITTURI *et al.*, 2002).

No lepidóptero *Bombyx mori* a sequência telomérica é do tipo (TTAGG)_n, muito semelhante às observadas em organismos cujos telômeros são replicados pela telomerase (OKAZAKI *et al.*, 1993). Estudos posteriores mostraram que não apenas *B. mori*, mas também outros artrópodes (SAHARA *et al.*, 1999) possuíam o motivo (TTAGG)_n como sequência telomérica. Entretanto, a atividade da telomerase só foi encontrada em duas espécies de lepidópteros e em algumas espécies de grilos e baratas (SASAKI & FUJIWARA, 2000). Nos insetos *Bombyx mori* (Lepidoptera), *Drosophila melanogaster* (Díptera) e *Sarcophaga peregrina* (Diptera), não foi detectada a atividade da telomerase, o que sugere que estes organismos mantêm seus telômeros sem o auxílio desta enzima (SASAKI & FUJIWARA, 2000). Recentemente, uma subunidade da telomerase, denominada TERT (do inglês “Telomerase Reverse Transcriptase”) foi identificada no genoma de *B. mori* e do besouro da farinha, *Tribolium castaneum* (OSANAI *et al.*, 2006). Neste mesmo trabalho, foi observado que o gene que codifica para a telomerase em *B. mori* é expresso em baixos níveis, o que poderia explicar a não-detecção de atividade da telomerase neste inseto.

1.2.3.4.1. Seqüências teloméricas em dípteros

Dentro do grupo dos insetos, o caso mais peculiar em relação às seqüências teloméricas é o da ordem Díptera. Nos dípteros mais estudados até o momento, como *Drosophila*, *Anopheles* e *Chironomus*, as seqüências teloméricas caracterizadas são diferentes da seqüência telomérica de *B. mori*, apresentando-se em repetições mais longas e complexas.

Em *Drosophila melanogaster* e também em *D. virilis*, observou-se que existem repetições de seqüências complexas do tipo transposon constituindo a estrutura telomérica. Foram identificados dois retrotransposons do tipo “Non-LTR” (do inglês “Non Long Terminal Repeats”) com localização telomérica, denominados “Het-A” e “TART”, de aproximadamente 6kb e 10kb de extensão, respectivamente. Estes elementos formam grandes blocos de seqüências unidas em direção à extremidade do cromossomo e seriam o equivalente funcional das seqüências curtas tipo telomerase (TRAVERSE & PARDUE, 1988; CASACUBERTA & PARDUE, 2003 a e 2003b; revisão em PARDUE & DEBARYSHE, 2003).

Em 2004, foi descrito em *D. melanogaster* um outro retrotransposon telomérico do tipo “Non-LTR”, denominado “TAHRE” (do inglês “Telomere Associated Het-A-Related Element”) (ABAD *et al.*, 2004). Recentemente, um estudo mostrou que os elementos teloméricos “TAHRE” também estão presentes em outras espécies de *Drosophila*, e que ele seria o responsável pela retrotransposição do elemento “Het-A”, que não possui uma retrotranscriptase própria (SHPIZ *et al.*, 2007).

Os telômeros de *Chironomus* são formados por repetições de seqüências longas e complexas. Os telômeros de *C. thummi*, caracterizados na década de 1980, possuem uma repetição telomérica de 176pb (CARMONA *et al.*, 1985) e a seqüência telomérica de *C. pallidivittatus*, caracterizada na mesma época, possui 340pb (SAIGA &

EDSTRÖM, 1985). Posteriormente, a sequência telomérica de *C. tentans* também foi caracterizada, apresentando arranjos repetitivos complexos de 350pb (NIELSEN *et al.*, 1990). Nos três casos, as sequências são ricas em AT, contrastando com as sequências curtas tipo telomerase, que são ricas em G. Em *C. pallidivittatus*, foram sugeridos dois modelos de extensão das sequências teloméricas, um através de recombinação, e outro através de conversão gênica (COHN & EDSTRÖM, 1992; LÓPEZ *et al.*, 1999 a), embora ainda não se saiba se estes processos de fato levam à extensão do DNA terminal. Contudo, não se descarta a existência de uma enzima do tipo transcriptase reversa atuando nos telômeros dessas espécies (LÓPEZ *et al.*, 1999 b). Em *C. pallidivittatus* e em *C. thummi* foram detectados transcritos longos que hibridam com as respectivas repetições teloméricas (SAIGA & EDSTRÖM, 1985; CARMONA *et al.*, 1985). Estes transcritos poderiam estar envolvidos no mecanismo de alongação do telômeros nestas espécies.

Unidades de repetição telomérica maiores que as de *Chironomus* também foram caracterizadas em *Anopheles gambiae* (BIESSMANN *et al.*, 1998).

1.2.3.5. Sequências subteloméricas

Na ausência de telomerase, telômeros canônicos podem ser regenerados por meio de eventos de recombinação entre blocos de sequências subteloméricas, também conhecidas como TAS (do inglês “Telomere Associated Sequences”) (revisto em MEFFORD & TRASK, 2002; BHATTACHARYYA & LUSTIG, 2006). Este mecanismo alternativo de manutenção dos telômeros foi observado em diversos organismos, como *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Kluyveromyces lactis*, *Candida albicans* e também em humanos (revisto em BHATTACHARYYA & LUSTIG, 2006).

Diferentemente das seqüências que compõem as extremidades cromossômicas, as regiões subteloméricas apresentam uma estrutura geral que é supostamente conservada entre organismos evolutivamente distantes (MEFFORD & TRASK, 2002). Essas seqüências abrangem, entre outras seqüências, uma variedade de elementos repetitivos, organizados em tandem ou dispersos, como microssatélites, satélites e elementos móveis (revisto em PRYDE *et al.*, 1997; MEFFORD & TRASK, 2002).

O lepidóptero *Bombyx mori* apresenta retrotransposons do tipo “Non-LTR” inseridos em suas seqüências teloméricas e acumuladas em regiões subteloméricas (OKAZAKI *et al.*, 1995; TAKAHASHI *et al.*, 1997). Outro inseto, um grilo da espécie *Teleogryllus taiwanemma*, possui como seqüência subtelomérica uma repetição complexa de cerca de 9kb, derivada da seqüência telomérica (TTAGG)_n e de uma outra classe de seqüências repetitivas chamada ST2, rica em GT (KOJIMA *et al.*, 2002).

Em *Drosophila virilis*, sugeriu-se que a seqüência de 370 pb que inicialmente foi caracterizada como seqüência telomérica (BIESSMANN *et al.*, 2000) fosse considerada como subtelomérica, uma vez que retrotransposons do tipo “TART” e “Het-A” foram identificados nessa espécie (CASACUBERTA & PARDUE, 2003 a e b) e os mesmos foram anteriormente descritos como seqüências teloméricas em *D. melanogaster* (TRAVERSE & PARDUE, 1988; revisto em PARDUE & DEBARYSHE, 2003).

O estudo das regiões subteloméricas tem merecido atenção devido a certos eventos que ocorrem nessas regiões. Por exemplo, a regeneração do DNA telomérico através de processos de recombinação em nível subtelomérico (TENG & ZAKIAN, 1999; DUNHAM *et al.*, 2000) permite que regiões subteloméricas, na ausência de telomerase, tenham a capacidade de atuar funcionalmente como regiões teloméricas.

1.2.4. O DNA ribossômico

O DNA ribossômico (rDNA), que codifica para o RNA ribossomal (rRNA), é essencial na fisiologia das células. Os RNAs ribossômicos interagem de modo altamente específico com as proteínas ribossomais para formar as subunidades ribossomais que funcionam na síntese das proteínas. O nucléolo pode ser visto como a manifestação morfológica da atividade dos genes ribossômicos, sendo formado nas chamadas regiões organizadoras do nucléolo, que estão localizadas em uma ou mais regiões cromossômicas. Em células somáticas metabolicamente ativas de animais e plantas, o nucléolo contém de dezenas a centenas de genes ribossômicos ativos, os quais representam cerca de 50% da produção de RNA celular. Entretanto, a maioria das evidências mostram que mais de 50% do rDNA está transcricionalmente inativo (revisão em RASKA *et al.*, 2006).

A subunidade ribossomal maior dos eucariotos contém três moléculas de rRNA com coeficientes de sedimentação 25-28S; 5,8S e 5S, ao passo que a subunidade ribossomal menor contém uma única molécula de rRNA com coeficiente de sedimentação 18S. Cada molécula de rRNA 25-28S, 18S e 5,8S deriva de uma única molécula precursora. O tamanho dessa molécula varia nas diferentes classes de eucariotos, variando de 45S (13kb) no caso de mamíferos e aves, até 36-40S (7,5 a 8,1kb) em vertebrados inferiores e invertebrados. Estas moléculas precursoras são posteriormente clivadas dando origem a moléculas de rRNA maduras. A molécula de rRNA 5S é sintetizada independentemente na maior parte dos eucariontes estudados. O DNA ribossômico, de maneira geral, está organizado em diversos segmentos: espaçador externo transcrito; sequência codificadora para rRNA 18S; espaçador interno transcrito; sequência codificadora para rRNA 25-28S; e espaçador não transcrito (para uma revisão ver LEWIN, 2001).

A organização dos genes ribossômicos (rDNA) tem sido estudada em diversos organismos. Em todos os casos estudados detalhadamente, foi observado que esses genes são moderadamente repetitivos e estão organizados em tandem. Em *Drosophila melanogaster* existem aproximadamente 200 cópias dos genes ribossômicos, localizadas em regiões heterocromáticas dos cromossomos X e Y (revisto em EICKBUSH & EICKBUSH, 2007). Outro dado importante em relação ao rDNA de *Drosophila* foi obtido em *D. hydei* e *D. melanogaster*, onde observou-se que esses genes estão subreplicados em tecidos politênicos em relação à tecidos diplóides (HENNIG & MEER, 1971; SPEAR & GALL, 1973).

O tamanho das unidades de rDNA também varia entre os organismos, de 44kb no rato (CORY & ADAMS, 1977) até 7,8kb na soja (VARSANYI-BREINER *et al.*, 1979). A extensão dessas repetições é diferente nos diversos organismos devido ao tamanho variável do espaçador não-transcrito (WELLAUER & DAWID, 1978). Além disso, outro fator que pode interferir em seu tamanho é a existência de inserções na região que codifica para o rRNA 26S, inserções estas descritas inicialmente em *D. melanogaster* (GLOVER & HOGNESS, 1977; WHITE & HOGNESS, 1977).

As inserções existentes no rDNA 26S de *D. melanogaster* foram classificadas em dois tipos. As inserções R1, que não possuem sítio de restrição *EcoRI*, têm tamanhos que variam entre 0,5 e 5,0 kb, e todos os elementos desse tipo estão localizados exatamente na mesma posição no gene que codifica para rDNA 26S (DAWID & REBBERT, 1981; ROIHA *et al.*, 1981; RAE, 1981). Os elementos R1 estão presentes em 49% das repetições do rDNA (PELLEGRINI *et al.*, 1977) e se localizam quase que exclusivamente no organizador nucleolar do cromossomo X (WELLAUER *et al.*, 1978), sendo que foram descritas algumas cópias que se localizam na heterocromatina centromérica e uma cópia no cromossomo 4 (ROIHA *et al.*, 1981; BROWNE *et al.*,

1984). Já as inserções R2 contêm sítio de restrição *EcoRI*, possuem tamanhos que variam entre 1,5 e 4,0kb, estão presentes em 16% das repetições do rDNA (WELLAUER *et al.*, 1978), e estão localizadas tanto no organizador nucleolar do cromossomo X quanto do Y (DAWID & WELLAUER, 1978; WELLAUER *et al.*, 1978). As inserções do tipo R2 não apresentam similaridade de sequência com as inserções do tipo R1 (WELLAUER *et al.*, 1978). Os sítios de inserção dessas sequências são específicos e constantes, o que facilitou a verificação da existência das inserções R1 e R2 em outros organismos. Estas inserções foram descritas em todos os insetos examinados até o momento (JAKUBCZAK *et al.*, 1991; BURKE *et al.*, 1993). Mais tarde, as inserções R1 e R2 foram caracterizadas como retrotransposons do tipo “non-LTR” (do inglês “Non Long Terminal Repeats”) (BURKE *et al.*, 1987; JAKUBCZAK *et al.*, 1990).

1.3. Nosso objeto de estudo: *Rhynchosciara* (Diptera: Sciaridae)

1.3.1. Aspectos gerais

O díptero *Rhynchosciara americana* (Nematocera; Bibiomorpha; Sciaroidea; Sciaridae; *Rhynchosciara*) foi descrito pela primeira vez em 1821, por WIEDEMANN, sendo que o gênero *Rhynchosciara* foi estabelecido por RÜBSAAMEN em 1894. Em 1951, NONATO & PAVAN redescobriram a espécie e a classificaram como *Rhynchosciara angelae*. Posteriormente, BREUER (1969) fez uma revisão do gênero *Rhynchosciara* estabelecido em 1821, mantendo o nome inicialmente dado por WIEDEMANN (1821).

Estes sciarídeos fitófagos (Fig.1) são comuns em locais onde ocorrem espécies dos gêneros vegetais *Tradescantia* e *Ipomea*, podendo ser encontrados desde a

Argentina até o México (PAVAN *et al.*, 1975). As fêmeas de *Rhynchosciara* põem de centenas a milhares de ovos que eclodem simultaneamente. As larvas de um mesmo grupo são todas do mesmo sexo e possuem desenvolvimento sincrônico. No final do quarto estágio larval, estas constroem um casulo coletivo, dentro do qual completam seu desenvolvimento até tornarem-se indivíduos adultos (revisto em STOCKER *et al.*, 1993).

Figura 1. *Rhynchosciara americana*. **(a):** a figura ilustra o comportamento gregário das larvas. **(b):** casulo coletivo. **(c):** tamanho da larva (em cm), tendo como referência uma régua. **(d):** larvas iniciando a construção de um casulo coletivo. **(e):** animal adulto.

1.3.2. Os cromossomos politênicos

O processo de politenização ocorre em *Rhynchosciara* durante a fase larval do desenvolvimento em diversos tecidos. Nas células destes tecidos acontecem sucessivos ciclos de replicação do material genético sem que haja divisão celular. As

múltiplas cópias das cromátides permanecem unidas, formando assim os cromossomos politênicos. Estes cromossomos gigantes ocorrem normalmente em dípteros e já foram observados também em outros insetos, em alguns protozoários e em plantas superiores (revisto em ALVARENGA, 1980).

A dimensão dos cromossomos politênicos proporciona condições extremamente favoráveis a observações citológicas (Fig. 2). Além disso, algumas de suas bandas apresentam o fenômeno da amplificação gênica em períodos distintos do desenvolvimento larval (BREUER & PAVAN, 1955).

Figura 2. Cromossomos de *Rhynchosciara americana* com as respectivas secções (modificado de STOCKER *et al.*, 1993). As regiões delimitadas pelos retângulos correspondem à heterocromatina pericentromérica.

1.3.3. O rDNA de *Rhynchosciara americana*

Estudos realizados em *R. americana* mostraram que o número haplóide de cópias de genes para rRNA nesse díptero é aproximadamente 100 na glândula salivar e 200 no ovário (GAMBARINI & MENEHINI, 1972). Dados comparativos da proporção de rDNA em diferentes tecidos de *R. americana* mostraram que os tecidos com pouca politenia apresentam aproximadamente duas vezes mais rDNA do que os tecidos com elevada politenia, indicando subreplicação de rDNA nos tecidos politênicos (GAMBARINI & LARA, 1974).

A caracterização das unidades de transcrição do rDNA de *R. americana* revelou a existência de duas unidades de rDNA de tamanhos diferentes: uma com 9,5kb e outra com 13kb, esta contendo uma inserção de 3,5kb (ZAHA *et al.*, 1982). Esta inserção está localizada na região codificante para rRNA 28S, e possui um sítio de restrição *EcoRI* interno (ZAHA *et al.*, 1982). Sua extensão já sugeria tratar-se de um retrotransposon do tipo R2, o que se confirmou em estudos recentes (RESENDE-TEIXEIRA, 2007).

1.3.4. O nucléolo de *R. americana*

Os insetos da família Sciaridae apresentam uma organização peculiar do nucléolo, observado em preparações de cromossomos politênicos. De aspecto fragmentado e disperso, o nucléolo dos sciarídeos difere morfológicamente do nucléolo de *Drosophila* ou *Chironomus*, por exemplo, que é bem delimitado.

Nos sciarídeos, o material nucleolar, estruturado como micronúcleolos, encontra-se principalmente associado às regiões que contêm cistrons ribossômicos (organizadores de nucléolo), podendo também aparecer unido a outras regiões cromossômicas, ou ainda livre no nucleoplasma.

Alguns trabalhos descreveram que o nucléolo, na família Sciaridae, estava associado ao cromossomo X, como descrito em *Sciara ocellaris* (DESSEN & PERONDINI, 1976). Este tipo de observação levou à conclusão de que os genes ribossômicos estariam localizados somente neste cromossomo. Mas trabalhos posteriores, que utilizaram técnicas de hibridação *in situ*, demonstraram que, em algumas espécies, outros cromossomos, além do X, poderiam ser portadores de rDNA. Em *Sciara coprophila*, o material nucleolar foi encontrado associado tanto à heterocromatina do cromossomo X quanto à diversas faixas distribuídas pelos 4 cromossomos (GABRUZEWCZ-GARCIA, 1972). No entanto, outros trabalhos revelaram que o rDNA de *Sciara coprophila* está restrito apenas ao organizador nucleolar do cromossomo X e aos micronúcleolos (PARDUE *et al.*, 1970; GERBI, 1971).

Estudos citológicos em cromossomos de *R. americana* mostraram a presença do nucléolo na terminação heterocromática do cromossomo X (BREUER & PAVAN, 1955; PAVAN, 1965). Entretanto, sinais de hibridação com sonda de rDNA podem ser vistos nas extremidades heterocromáticas dos cromossomos X, C e B (STOCKER *et al.*, 1993). Essas extremidades formam um cromocentro, ou seja, essas extremidades podem ser telocentroméricas, e *R. americana* poderia ser mais um organismo a possuir rDNA como sequência telocentromérica. *R. hollaenderi* segue o mesmo padrão de localização de rDNA e material nucleolar que *R. americana* (PARDUE *et al.*, 1970; STOCKER *et al.*, 1993).

1.3.5. DNA repetitivo em *Rhynchosciara*

Experimentos realizados com DNA genômico total de *Rhynchosciara americana* revelaram que o DNA deste organismo pode também ser dividido em três frações,

quando submetido à centrifugação em gradiente de CsCl: uma de renaturação lenta, outra de renaturação rápida, e uma terceira de renaturação intermediária. Foram também calculadas as porcentagens de cada fração no genoma de *R. americana*, obtendo-se os seguintes valores: a fração lenta constitui cerca de 86% do genoma; a fração rápida, 7,3% e a intermediária, 6,7%. Verificou-se também que o conteúdo de G-C da fração denominada “rápida” é significativamente menor do que o da fração denominada “lenta”. Foi estimado também o tamanho do genoma de *R. americana* em $1,3 \times 10^{11}$ daltons, cerca de 48 vezes maior que o genoma de *E.coli* (BALSAMO, 1972).

Estudos posteriores (BALSAMO *et al.*, 1973a) revelaram evidências da subreplicação de seqüências repetitivas em cromossomos politênicos de *Rhynchosciara angelae*, ao comparar a cinética de renaturação de DNA proveniente de núcleos mitóticos e politênicos desta espécie. Verificou-se que, nos núcleos mitóticos, a fração satélite encontra-se em proporção maior do que em núcleos politênicos. Outros estudos (BALSAMO *et al.*, 1973b) já haviam revelado que a fração satélite do DNA de *R. angelae* poderia corresponder à heterocromatina centromérica, que encontra-se subreplicada nos cromossomos politênicos desta e de outras espécies de dípteros. Sobre as possíveis funções das seqüências altamente repetitivas, os autores sugeriram a participação das mesmas em mecanismos de controle, além de seu papel estrutural.

Em outro trabalho, ECKHARDT & GALL (1971) obtiveram a localização citológica da fração rápida do genoma de *Rhynchosciara hollaenderi*. Eles estudaram a distribuição cromossômica do DNA satélite desta espécie através de hibridações *in situ* em preparações de cromossomos politênicos. A fração satélite do DNA extraído de machos adultos foi isolada por centrifugação em gradiente de densidade de CsCl e em seguida transcrita *in vitro*, com nucleotídeos marcados radiativamente. O RNA

resultante da transcrição foi utilizado como sonda em experimentos de hibridação *in situ* em cromossomos politênicos. Foram observados sinais de hibridação na heterocromatina centromérica de todos os quatro cromossomos da espécie, bem como nas regiões teloméricas dos cromossomos A e C. Em outro experimento de hibridação, a sonda utilizada foi RNA transcrito *in vitro* a partir da fração principal do DNA. Sinais positivos foram observados em diversas regiões cromossômicas, inclusive em algumas regiões heterocromáticas. Experimentos semelhantes realizados com *R. americana* (MACHADO-SANTELLI *et al.*, 1978) mostraram que as seqüências que formam a fração rápida do genoma desta espécie localizam-se predominantemente na heterocromatina pericentromérica e em algumas bandas intersticiais dos cromossomos.

1.3.6. Estrutura telomérica em *Rhynchosciara*

Pouco ainda se conhece a respeito das seqüências que formam a estrutura telomérica de *Rhynchosciara*. Em *R. americana* e *R. hollaenderi*, sondas de RNA homopolimérico identificaram blocos de poli-dA/dT em certas regiões intersticiais e extremidades cromossômicas (JONES *et al.*, 1973; STOCKER *et al.*, 1993; STOCKER & GORAB, 2003). Sabe-se também que uma transcriptase reversa é um componente constitutivo das extremidades não-telocêntricas de *R. americana*, porém sua função ainda é desconhecida (GORAB, 2003).

A aparente correlação entre a ausência de repetições teloméricas simples e a ausência de telomerase em dípteros é um problema de interesse, ainda não resolvido, exceto em *D. melanogaster*. Nem mesmo outro processo de transcrição reversa diferente da telomerase foi caracterizado como processo de manutenção telomérica em dípteros inferiores ou espécies distantes de *D. melanogaster*.

1.4. Objetivos/ Justificativa

Dessa forma, o objetivo geral deste trabalho é o de estudar o papel do DNA repetitivo na heterocromatina terminal de *R. americana*. Mais especificamente, procuramos:

- Caracterizar elementos de DNA repetitivo associados à heterocromatina terminal, explorando bibliotecas de DNA feitas a partir de DNA microdissecado das extremidades teloméricas de *R. americana* e de bibliotecas feitas genômicas. Assim, a elucidação do mecanismo de manutenção telomérica em *Rhynchosciara americana* implica na expansão do conhecimento sobre a estrutura terminal/subterminal cromossômica nesta espécie. Neste sentido, a caracterização da estrutura telomérica e subtelomérica em *R. americana* é um dos pré-requisitos fundamentais;
- Realizar um estudo comparativo da localização do rDNA em cromossomos politênicos e mitóticos de *Rhynchosciara americana* e de outras espécies da família Sciaridae, obtendo-se assim um panorama mais completo a respeito do papel do rDNA na estrutura cromossômicas desses insetos.

1.5. Referências Bibliográficas

- Abad JP, De Pablos B, Osoegawa K, De Jong PJ, Martin-Gallardo A, Villasante A. **2004**. TAHRE, a novel telomeric retrotransposon from *Drosophila melanogaster*, reveals the origin of *Drosophila* telomeres. *Mol Biol Evol* 21(9):1620-1624.
- Alvarenga CAS. **1980**. Influência de ecdisonas sobre a síntese de RNA e proteínas nas glândulas salivares de *Rhynchosciara*. São Paulo. Dissertação de Mestrado – Departamento de bioquímica, instituto de Química, Universidade de São Paulo.
- Armour JAL, Jeffreys A. **1992**. Recent advances in minisatellite biology. *FEBS Lett* 307: 113-115.
- Balsamo J. **1972**. Características físicas e funcionais do DNA reiterado de *Rhynchosciara americana*. Tese de doutoramento apresentada ao departamento de Bioquímica do Instituto de Química da Universidade de São Paulo.
- Balsamo J, Hierro JM, Lara FJS. **1973a**. Further studies on the characterization of repetitive *Rhynchosciara* DNA. *Cell Differentiation* 2, 131-141.
- Balsamo J. Hierro JM, Birnstiel ML, Lara FJS. **1973b**. *Rhynchosciara angelae* salivary gland DNA: kinetic complexity and transcription of repetitive sequences. *Gene expression and its regulation*, cap. 9, 101-122.
- Bhattacharyya MK, Lustig AJ. **2006**. Telomere dynamics in genome stability. *Trends Biochem Sci* 31(2): 114-122.
- Blackburn EH, Gall JG. **1978**. A tandemly repeated sequence at the termini of the extrachromosomal ribosomal RNA genes in *Tetrahymena*. *J Mol Biol* 120: 33-53.

- Blackburn EH. **2001**. Switching and signaling at the telomere. *Cell* 21;106(6):661-73.
- Blackburn EH. **2005**. Telomeres and telomerase: their mechanisms of action and the effects of altering their functions. *FEBS Lett* 579 (4):859-862.
- Blanchetot A. **1990**. A *Musca domestica* satellite sequence detects individual polymorphic regions in insect genomes. *Nucleic Acid Res.* 19: 929-932.
- Biessmann H, Kobeski F, Walter MF, Kasravi A, Roth CW. **1998**. DNA organization and length polymorphism at the 2L telomeric region of *Anopheles gambiae*. *Insect Mol Biol* 7(1): 83-93.
- Biessmann H, Zurovcova M, Yao GY, Lozovskaya E, Walter MF. **2000**. A telomeric satellite in *Drosophila virilis* and its sibling species. *Chromosoma* 109: 108-115.
- Bois P, Jeffreys AJ. **1999**. Minisatellite instability and germline mutation. *Cell Mol Life Sci* 55: 1636–1648.
- Brenig B, Brem G. **1991**. Human VNTR sequences in porcine HTF-islands. *Experientia* 58: 39-49.
- Breuer ME, Pavan C. **1955**. Behavior of polytene chromosomes of *Rhynchosciara angela* at different stages of larval development. *Chromosoma* 7: 371-386.
- Breuer ME. **1969**. Revision of the genus *Rhynchosciara* Rübsaamen (Diptera, Sciaridae) in the neotropical region. *Arq Zool (São Paulo)*, 17: 167-198.
- Broun P, Tanksley SD. **1993**. Characterization of tomato DNA clones with sequence similarity to human minisatellites 33.6 and 33.15. *Plant Mol Biol* 23: 231-242.
- Browne MJ, Read CA, Roiha H, Glover DM. **1984**. Site specific insertion of a type I rDNA element into a unique sequence in the *Drosophila melanogaster* genome. *Nucleic Acids Res* 12(23):9111-9122.

- Burke WD, Calalang CC, Eickbush TH. **1987**. The site-specific ribosomal insertion element type II of *Bombyx mori* (R2Bm) contains the coding sequence for a reverse transcriptase-like enzyme. *Mol Cell Biol* 7(6):2221-2230.
- Burke WD, Eickbush DG, Xiong Y, Jakubczak J, Eickbush TH. **1993**. Sequence relationship of retrotransposable elements R1 and R2 within and between divergent insect species. *Mol Biol Evol* 10(1):163-185.
- Carmona MJ, Morcillo J, Galler R, Martinez-Salas E, de la Campa AG, Diez JL, Edström JE. **1985**. Cloning and molecular characterization of a telomeric sequence from a temperature-induced Balbiani-ring. *Chromosoma* 92: 108-115.
- Carroll CW, Straight AF. **2006**. Centromere formation: from epigenetics to self-assembly. *Trends Cell Biol* 16(2):70-78.
- Casacuberta E, Pardue ML. **2003a**. Transposon telomeres are widely distributed in the *Drosophila* genus: TART elements in the *virilis* group. *PNAS* 100 (6): 3363-3368.
- Casacuberta E, Pardue ML. **2003b**. HeT-A elements in *Drosophila virilis*: retrotransposon telomeres are conserved across the *Drosophila* genus. *PNAS* 100(24): 14091-14096.
- Cohn M, Edström JE. **1992**. Telomere-associated repeats in *Chironomus* form discrete subfamilies generated by gene conversion. *J. Mol. Evol.* 35: 114-122.
- Collick M, Jeffreys AJ. **1990**. Detection of a novel satellite-specific DNA-binding protein. *Nucleic Acids Res* 18: 625-629.
- Cory S, Adams JM. **1977**. A very large repeating unit of mouse DNA containing the 18S, 28S and 5.8S rRNA genes. *Cell* 11(4):795-805.

- Cox AV, Bennet ST, Parokonny AS, Kenton A, Callimassia MA, Bennett MD. 1993. Comparison of plant telomere locations using PCR generated synthetic probe. *Ann Botany* 72: 239-247.
- Dawid IB, Rebbert ML. **1981**. Nucleotide sequences at the boundaries between gene and insertion regions in the rDNA of *Drosophila melanogaster*. *Nucleic Acids Res* 9(19):5011-5020.
- Dawid IB, Wellauer PK. **1978**. Ribosomal DNA and related sequences in *Drosophila melanogaster*. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 42 (2) :1185-94.
- Dessen EMB, Perondini ALP. **1976**. Evidence of hormonal control of the nucleolar activity in *Sciara ocellaris*. *Cell Diff.* 5: 275-282.
- Dunham MA, Neumann AA, Fasching CL, Reddel RR. **2000**. Telomere maintenance by recombination in human cells. *Nat Genet* 26(4):447-450.
- Eckhardt RA, Gall JG. **1971**. Satellite DNA associated with heterochromatin in *Rhynchosciara*. *Chromosoma* 32(4):407-27.
- Eickbush TH, Eickbush DG. **2007**. Finely orchestrated movements: evolution of the ribosomal RNA genes. *Genetics* 175: 477–485
- Fletcher HL. **1994**. Possible loss of length conservation and reciprocity during recombination or conversion in tandem arrays. *Genetics* 138: 511-518.
- Fuchs J, Brandes A, Schubert I. **1995**. Telomere sequence localization and karyotype evolution in higher plants. *Plant Syst Evol* 196: 227-241.
- Gabrusewycz-Garcia N. **1972**. Further studies of the nucleolar material in salivary gland nuclei of *Sciara coprophila*. *Chromosoma* 38: 237-254.
- Gambarini AG, Meneghini R. **1972**. Ribosomal RNA genes in salivary gland and ovary of *Rhynchosciara angelae*. *J Cell Biol* 54: 421-426.

- Gambarini AG, Lara FJS. **1974**. Under replication of ribosomal cistrons in polytene chromosomes of *Rhynchosciara*. J Cell Biol 62: 215-222.
- Gerbi S. **1971**. Localization and characterization of the ribosomal RNA cistrons of *Sciara coprophila* (Diptera). J Mol Biol 58: 499-511.
- Gilson P, McFadden GI. **1995**. The chlorarachniophyte: a cell with two different nuclei and two different telomeres. Chromosoma 103(9):635-41.
- Glover DM, Hogness DS. **1977**. A novel arrangement of the 18S and 28S sequences in a repeating unit of *Drosophila melanogaster* rDNA. Cell 10(2):167-176.
- Gorab E. **2003**. Reverse transcriptase- related proteins in telomeres and in certain chromosomal *loci* of *Rhynchosciara* (Diptera: Sciaridae). Chromosoma 111: 445-454.
- Greider CW, Blackburn EH. **1985**. Identification of a specific telomere terminal transferase activity in *Tetrahymena* extracts. Cell 43: 405-413.
- Grider CW. 1998. Telomerase activity, cell proliferation and cancer. PNAS USA 95: 90-92.
- Griffiths AJF, Miller JH, Suzuki DT, Lewontin RC, Gelbart WM. **1996**. A estrutura e funcionamento de cromossomos eucarióticos. In: Introdução à genética. Ganabara Koogan, 6ª edição.
- Gyllensten UB, Jakobsson S, Temrin H, Wilson AC. **1989**. Nucleotide sequence and genomic organization of bird minisatellites. Nucleic Acid Res 17: 2203-2215.
- Harris AS, Wright JM. **1995**. The nucleotide sequence and genomic organization of cichlid fish minisatellites. Genome 38: 177-184.
- Hediger F, Gasser SM. **2006**. Heterochromatin protein 1: don't judge the book by its cover! Curr Opin Genet Dev 16(2):143-50.

- Heitz, E. **1928**. Das Heterochromatin der Moose. Jahrbücher für Wissenschaftliche Botanik. 69:762–818.
- Hennig W, Meer B. **1971**. Reduced polyteny of ribosomal RNA cistrons in giant chromosomes of *Drosophila hydei*. Nat New Biol 233(37):70-2.
- Hizume M, Shibata F, Maruyama Y, Kondo T. **2001**. Cloning of DNA sequences localized on proximal fluorescent chromosome bands by microdissection in *Pinus densiflora* Sieb. & Zucc.. Chromosoma 110: 345-351.
- Inglehearn CF, Cooke HJ. **1990**. A VNTR immediately adjacent to the human pseudoautosomal telomere. Nucleic Acid Res. 18: 471-476.
- Inukai T. **2004**. Role of transposable elements in the propagation of minisatellites in the rice genome. Mol Gen Genomics. 271: 220–227.
- Jacobsen CF, Cooke HJ. **1992**. A *Drosophila* minisatellite contains multiple *chi* sequences. Insect Biochem Mol Biol. 22:785-792.
- Jakubczak JL, Xiong Y, Eickbush TH. **1990**. Type I (R1) and type II (R2) ribosomal DNA insertions of *Drosophila melanogaster* are retrotransposable elements closely related to those of *Bombyx mori*. J Mol Biol 212(1):37-52.
- Jakubczak JL, Burke WD, Eickbush TH. **1991**. Retrotransposable elements R1 and R2 interrupt the rRNA genes of most insects. Proc Natl Acad Sci USA. 88(8):3295-3299.
- Jeffreys AJ, Wilson V, Thein SL. **1985**. Individual specific fingerprints of human DNA. Nature (London) 316: 76-79.
- Jones KW, Bishop JO Brito da Cunha A. **1973**. Complex formation between poly-r (U) and various chromosomal loci in *Rhynchosciara*. Chromosoma 43: 375-390.

- Joseph SS, Sampson J. **1994**. Identification, isolation and characterization of canine minisatellite sequences. *Anim Genet* 25: 307-312.
- Kitazawa T, Kominami R, Tanaka R, Wakabayashi K, Nagoa M, Signer E M, Gu F, Gustavsson I, Andersson L, Jeffreys AJ. **1994**. A pseudoautosomal minisatellite in the pig. *Mamm Genome* 5: 48-51.
- Kojima KK, Kubo Y, Fujiwara H. **2002**. Complex and tandem repeat structure of subtelomeric regions in the Taiwan Cricket, *Teleogryllus taiwanemma*. *J Mol Evol* 54:474-485.
- Lara FJS (organizador). **2002**. Capítulo II: Renaturação do DNA. In *Hibridação de ácidos nucléicos*. 2a edição. Holos Editora.
- Lewin B. **2001**. Transposons. Retrovirus e retroposons. In: *Genes VII*. Artmed Editora, Porto Alegre.
- Lewin B. **2001**. Clusters and repeats. Genes for rRNA form a repeated tandem unit. In: *Genes VII*. Artmed Editora, Porto Alegre.
- Li YC, Korol AB, Fahima T, Beiles A, Nevo E. **2002**. Microsatellites: genomic distribution, putative functions and mutational mechanisms: a review. *Molecular Ecology* 11: 2453-2465.
- Lima de Faria A, Jaworska H. **1968**. Late DNA synthesis in heterochromatin. *Nature*. 13;217(5124):138-142.
- López CC, Kamnert I, Scherbik SV, Edström JE. **1999a**. Interspersed DNA element restricted to a specific group of telomeres in the dipterian *Chironomus pallidivittatus*. *Gene* 233: 249-259.
- López CC, Rodriguez E, Diez JL, Edström JE, Morcillo G. **1999b**. Histochemical localization of reverse transcriptase in polytene chromosomes of chironomids. *Chromosoma* 108: 302-307.

- Machado-Santelli GM, Bonaldo MF, Santelli RV, Eckhardt RA, Lara FJS. **1978**. Distribution of repetitive DNA sequences in the polytene chromosomes of *Rhynchosciara americana*. *Experientia* 35(4): 474-475.
- McClintock B. **1938**. The fusion of broken chromosomes ends of sister half-chromatids following chromatid breakage at meiotic anaphases. *Missouri Experiment Station Research Bulletin* 290: 1-48.
- McKnight TD, Shippen DE. **2004**. Plant telomere biology. *Plant Cell*. 16(4):794-803.
- Mefford ML, Trask BJ. **2002**. The complex structure and dynamic evolution of human subtelomeres. *Nat Rev Genet* 3: 91-102.
- Meyne J, Ratliff RL, Moyzis RK. **1989**. Conservation of the human telomere sequence (TTAGGG)_n among vertebrates. *Proc Natl Acad Sci USA*. 86: 7049-53.
- Moyzis RK, Buckingham JM, Cram LS, Dani M, Deaven LL, Jones MD, Meyne J, Ratliff RL, Wu JR. **1988**. A highly conserved repetitive DNA sequence, (TTAGGG)_n, present at the telomeres of human chromosomes. *Proc Natl Acad Sci USA* (18):6622-6.
- Müller HJ. **1938**. The remarking of chromosomes. *The Collecting Net* 8: 182-195.
- Nakamura Y, Leppert M, O'Connell P, Wolff R, Holm T, Culver M, Martin C, Fujimoti E, Hoff M, Kumlin E, White R. **1987**. Variable number of tandem repeat (VNTR) markers for human gene mapping. *Science* 235: 1616-1622.
- Nightingale KP, O'Neill LP, Turner BM. 2006. Histone modifications: signalling receptors and potential elements of a heritable epigenetic code. *Curr Opin Genet Dev* 16(2):125-36.
- Nielsen L, Schmidt ER, Edström JE. **1990**. Subrepeats result from regional DNA sequence conservation in tandem repeats in *Chironomus* telomeres. *J Mol Biol* 216: 577-581.

- Nonato E, Pavan C. **1951**. A new species of *Rhynchosciara Rubsaamen*, 1894 (Diptera, Mycetophilidae). Rev Brasil Biol 11: 435-437.
- Okazaki S, Tsuchida K, Maekawa H, Ishikawa H, Fujiwara H. **1993**. Identification of a pentanucleotide telomeric sequence (TTAGG)_n in the silkworm *Bombyx mori* and in other insects. Mol Cell Biol 13: 1424-1432.
- Okazaki S, Ishiwara H, Fujiwara H. **1995**. Structural analysis of TRAS1, a novel family of telomeric repeat-associated retrotransposons in the silkworm, *Bombyx mori*. Mol Cell Biol 15: 4545-4552.
- Olovnikov AM. **1971**. Principles of marginotomy in template synthesis of polynucleotides. Dokl Akad Nauk SSSR 201: 1496-1499.
- Olovnikov AM. **1973**. A theory of marginotomy. J Theor Biol 41: 181-190.
- Osanai M, Kojima KK, Futahashi R, Yaguchi S, Fujiwara H. **2006**. Identification and characterization of the telomerase reverse transcriptase of *Bombyx mori* (silkworm) and *Tribolium castaneum* (flour beetle). Gene 376(2):281-9.
- Pardue ML, Gerbi SA, Eckhardt RA, Gall JG. **1970**. Cytological localization of DNA complementary to ribosomal RNA in polytene chromosomes of Diptera. Chromosoma 29: 268-290.
- Pardue ML, DeBaryshe PG. **2003**. Retrotransposons provide an evolutionary robust non-telomerase mechanism to maintain telomeres. Annu Rev Genet 37: 485-511.
- Pavan C. **1965**. Chromosomal differentiation. Natl Cancer Inst Monogr 18:309-323.
- Pavan C, da Cunha AB, Sanders, P. **1975**. *Rhynchosciara*. In Handbook of genetics 3. Edited by R.C. King. Plenum, New York, London. Pp 207-256.
- Pellegrini M, Manning J, Davidson N. **1977**. Sequence arrangement of the rDNA of *Drosophila melanogaster*. Cell 10(2):213-4.

- Pich U, Schubert I. **1998**. Terminal heterochromatin and alternative telomeric sequences in *Allium cepa*. *Chromosome Research* 6:315-321.
- Pimpinelli S, Sullivan W, Prout M, Sandler L. **1985**. On biological functions mapping to the heterochromatin of *Drosophila melanogaster*. *Genetics*. 109(4):701-24.
- Pryde FE, Gorham HC, Louis EJ. **1997**. Chromosome ends: all the same under their caps. *Curr Opin Genet Dev* 7: 822-828.
- Rae PM. **1981**. Coding region deletions associated with the major form of rDNA interruption in *Drosophila*. *Nucleic Acids Res* 9(19):4997-5010.
- Raska I, Shaw PJ, Cmarko D. **2006**. New insights into nucleolar architecture and activity. *Int Rev Cytol* 255:177-235.
- Resende-Teixeira P. **2007**. Identificação e caracterização de elementos de transposição no genoma de *Rhynchospora*. Instituto de Química. Tese de doutoramento.
- Richard GF, Pâques F. **2000**. Mini and microsatellite expansions: the recombination connection. *EMBO reports* 1(21): 122-126.
- Roiha H, Miller JR, Woods LC, Glover DM. **1981**. Arrangements and rearrangements of sequences flanking the two types of rDNA insertion in *D. melanogaster*. *Nature* 290(5809):749-753.
- Royle NJ, Clarkson RE, Wong Z, Jeffreys AJ. **1988**. Clustering of hypervariable minisatellites in the proterminal regions of human autosomes. *Genomics* 3: 352-360.
- Royle NJ, Baird, DM, Jeffreys AJ. **1994**. A subterminal satellite located adjacent to telomeres in chimpanzees is absent from the human genome. *Nat Genet* 6: 52-56.
- Sahara K, Marek F, Traut W. **1999**. TTAGG telomeric repeats in chromosomes of some insects and other arthropods. *Chromosome Research* 7: 449-460.

- Saiga H, Edström JE. 1985. Long tandem arrays of complex repeat units in *Chironomus* telomeres. EMBO J 4: 799-804.
- Sasaki T, Fujiwara H. 2000. Detection and distribution patterns of telomerase activity in insects. Eur J Biochem 267: 3025-3031.
- Shpiz S, Kwon D, Uneva A, Kim M, Klenov M, Rozovsky Y, Georgiev P, Savitsky M, Kalmykova A. **2007**. Characterization of *Drosophila* telomeric retroelement TAHRE: transcription, transpositions, and RNAi-based regulation of expression. Mol Biol Evol 24(11):2535-45.
- Spear BB, Gall JG. **1973**. Independent control of ribosomal gene replication in polytene chromosomes of *Drosophila melanogaster*. Proc Natl Acad Sci USA 70(5):1359-1363.
- Stocker AJ, Gorab E, Amabis JM, Lara FJS. **1993**. A molecular cytogenetic comparison between *Rhynchosciara americana* and *Rhynchosciara hollaenderi* (Diptera: Sciaridae). Genome 36: 831-843.
- Stocker AJ, Gorab E. **2003**. Local enrichment with homopolymeric dA/dT DNA in genomes of some lower dipterians and *Drosophila melanogaster*. Chromosoma 111: 455-460.
- Takahashi H, Okazaki S, Fujiwara H. **1997**. A new family of site-specific retrotransposons, SART1, is inserted into telomeric repeats in the silkworm, *Bombyx mori*. Nucleic Acids Res 25: 1578-1584.
- Teng SC, Zakian VA. **1999**. Telomere-telomere recombination is an efficient bypass pathway for telomere maintenance in *Saccharomyces cerevisiae*. Mol Cell Biol 19(12):8083-93.

- Traverse KL, Pardue ML. **1988**. A spontaneously opened ring chromosome of *Drosophila melanogaster* has acquired Het-A DNA sequences at both new telomeres. PNAS USA 85: 8116-8120.
- Ugarkovic D, Pohl M. **2002**. Variation in satellite DNA profiles – causes and effects. EMBO J 21 (22): 5955-5959.
- Varsanyi-Breiner A, Gusella JF, Keys C, Housman DE, Sullivan D, Brisson N, Verma DP. **1979**. The organization of a nuclear DNA sequence from a higher plant: molecular cloning and characterization of soybean ribosomal DNA. Gene 7(3-4):317-34.
- Vitturi R *et al.* **2002**. rDNA (18S-28S and 5S) colocalization and linkage between ribosomal genes (TTAGGG)_n telomeric sequence I the earthworm, *Octodrilus complanatus* (Annelida: Oligochaeta: Lumbricodae), revealed by single and double FISH. J. Hered. 93: 279-82.
- Waring M, Britten RJ. **1966**. Nucleotide sequence repetition: a rapidly reassociating fraction of mouse DNA. Science 154(750):791-794.
- Watson JD. **1972**. Origin of concatemeric T7 DNA. Nat New Biol 239: 197-201.
- Wellauer PK, Dawid IB. **1978**. Ribosomal DNA in *Drosophila melanogaster*. II. Heteroduplex mapping of cloned and uncloned rDNA. J Mol Biol 126(4):769-82.
- Wellauer PK, Dawid IB, Tartof KD. **1978**. X and Y chromosomal ribosomal DNA of *Drosophila*: comparison of spacers and insertions. Cell 14(2):269-78.
- Whals, WP, Swenson G, Moore PD. **1991**. Two hypervariable minisatllite DNA binding proteins. Nucleic Acid Res. 19: 3269-3274.
- White RL, Hogness DS. **1977**. R-loop mapping of the 18S e 28S sequences in the long and short repeating units of *Drosophila melanogaster* rDNA. Cell 10: 177-192.

- Wiedemann CRW. **1821**. “Diptera exotica”. 244pp, 1 fig., 2 pls. Kiliae [=Kiel].
- Winberg BC, Zhou Z, Dallas JF, MacIntyre CL, Gustafson JP. **1993**. Characterization of minisatellite sequences from *Oryza sativa*. Genome 36: 978-983.
- Yee HA, Wong AKC, Van der Sande JH, Rattner JB. **1991**. Identification of novel single-stranded d(CT)_n binding proteins in several mammalian species. Nucleic Acid Res. 19: 949-953.
- Zaha A, Leoncini O, Hollenberg CP, Lara FJ. **1982**. Cloning and characterization of the ribosomal RNA genes of *Rhynchosciara americana*. Chromosoma 87(1):103-116.
- Zakian VA. **1995**. Telomeres: beginning to understand the end. Science 270: 1601-1607.

- Foram caracterizadas duas outras repetições, denominadas M16 e M22 que se encontram significativamente presentes em extremidades cromossômicas não-centroméricas. São as repetições mais curtas até agora encontradas em associação com extremidades cromossômicas de dípteros;
- Curtas repetições aparecem organizadas em blocos intercalados e foram identificadas ao longo de aproximadamente 50kb de DNA genômico analisado. Essas repetições podem também aparecer interrompidas por outras seqüências de localização exclusiva em extremidades cromossômicas, porém com grau de reiteração significativamente mais baixo que os das repetições M22 e M16;
- Evidências de inserção de elementos móveis em regiões onde coexistem os elementos M16 e M22 foram obtidas também neste presente trabalho;
- Resultados de hibridação e de localização da transcriptase reversa em *R. americana* sugerem que estas repetições são candidatas a seqüências teloméricas nesta espécie.