Universidade de São Paulo

Instituto de Química

**Identificação e Caracterização de
Elementos de Transposição no
genoma de *Rhynchosciara***

Paula Rezende Teixeira

Tese de Doutorado

Orientação:

Prof. Dr. Roberto Vicente Santelli

Prof^a Dr^a Gláucia M. Machado-Santelli

São Paulo, 01 de Março de 2007

PAULA REZENDE TEIXEIRA

Identificação e Caracterização de Elementos de Transposição
no genoma de *Rhynchosciara*

Tese apresentada ao Instituto de Química da
Universidade de São Paulo para obtenção do
Título de Doutor em Ciências (Bioquímica)

Orientadora: Profa. Dra. Gláucia Maria Machado Santelli

São Paulo

2007

RESUMO

Rezende-Teixeira, P. **Identificação e Caracterização de Elementos de Transposição no genoma de *Rhynchosciara***. 2007. 148p. Tese - Programa de Pós-Graduação em Bioquímica. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Os elementos de transposição são seqüências discretas que são capazes de mover-se de um locus para outro, constituindo uma parte significativa do genoma de eucariotos. São agrupados em duas classes principais, os elementos da Classe I, que se transpõem via um intermediário de RNA (retrotransposon), e os elementos da Classe II, que se transpõem via mecanismo de DNA do tipo corta e cola (transposon). A análise das seqüências de um banco de cDNA construído com RNA mensageiro da glândula salivar de *Rhynchosciara americana* mostrou a presença de representantes das duas classes de elementos.

Nesse trabalho caracteriza-se quatro elementos de transposição tipo *mariner*, onde as seqüências consenso de nucleotídeos foram derivadas de múltiplas cópias defectivas contendo deleções, mudança no quadro de leitura e códons de terminação. *Ramar1*, um elemento *full-length* e *Ramar2* um elemento defectivo que contém uma deleção na região interna da ORF da transposase, mas mantém as extremidades intactas. *Ramar3* e *Ramar4* são elementos defectivos que apresentam muitas deleções no interior da ORF. As seqüências preditas das transposases demonstraram que *Ramar1* e *Ramar2* estão filogeneticamente muito próximos dos elementos *mariner* da subfamília *mauritiana*. Enquanto, *Ramar3* e *Ramar4* pertencem às subfamílias *mellifera* e *irritans*, respectivamente. Hibridização *in situ* mostrou que *Ramar1* localiza-se em muitas regiões do cromossomo, principalmente na heterocromatina pericentromérica, enquanto *Ramar2* aparece em uma única banda no cromossomo A.

Resultado ainda mais curioso foi a caracterização molecular de um elemento de retrotransposição, denominado RaTART, que provavelmente é o responsável pela reconstituição telomérica em *R.americana*, assim como os elementos TART, HeT-A e TAHRE de *Drosophila*. Experimentos de Southern Blots do retroelemento RaTART indicam que este está representado por seqüências repetidas no genoma de *R.americana*, enquanto que Northern Blots mostraram uma expressão em diferentes estágios do desenvolvimento e o transcrito de alto peso molecular detectado representa o retrotransposon non-LTR inteiro. Enquanto a localização cromossômica de RaTART por hibridização *in situ* mostrou uma marcação predominante nas extremidades dos cromossomos, indicando possivelmente o primeiro elemento de transposição descrito em *R.americana* com função definida na estrutura do cromossomo.

O último retrotransposon, identificado nesse projeto, presente no genoma de *R.americana*, denominado R2Ra, foi isolado a partir de uma varredura em um banco genômico construído no bacteriófago lambda dash usando como sonda o recombinante pRa1.4 que contém a unidade de repetição do rDNA. A análise da seqüência mostrou a presença de regiões conservadas, como o domínio de transcriptase reversa e o motivo *zinc finger* na região amino-terminal. O sítio de inserção no gene 28S do rDNA é altamente conservado em *R.americana* e a análise filogenética mostrou que este elemento pertence ao grupo R2. A localização cromossômica confirma que o elemento móvel R2Ra se insere em um sítio específico no gene rDNA.

Palavras-chave: *Rhynchosciara*, elemento de transposição, *mariner*, retrotransposon, transposon, ITR.

ABSTRACT

Rezende-Teixeira, P. **Identification e Characterization of Transposable Elements in genome of *Rhynchosciara***. 2007. 148p. PhD Thesis - Graduate Program in Biochemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Transposable elements are discrete sequences that are able to move from one locus to another within the genome, constituting a significant part of eukaryotic genome. They are grouped into two main types, Class I elements transpose via an RNA intermediate (retrotransposon), and Class II elements transpose via a DNA "cut-and-paste" mechanism (transposons). The analysis of sequences of a cDNA bank constructed from mRNA of the salivary glands of *Rhynchosciara americana* showed the presence of putative types of two classes elements.

In the present thesis we describe four *mariner* elements, where the nucleotides consensus sequences were derived from multiple defective copies containing deletions, frame shifts and stop codons. *Ramar1*, a full-length element and *Ramar2* is a defective *mariner* element that contains a deletion overlapping most of the internal region of the transposase ORF and the extremities of the element maintain intact. *Ramar3* e *Ramar4* are defective *mariner* element that were impossible to predict a complete ORF. Predicted transposase sequences demonstrated that *Ramar1* and *Ramar2* are phylogenetically very close to *mariner*-like elements of *mauritiana* subfamily. However, *Ramar3* and *Ramar4* belong to *mellifera* and *irritans* subfamilies, respectively. In situ hybridisations showed *Ramar1* localized in several chromosome regions, mainly in pericentromeric heterochromatin and their boundaries, while *Ramar2* appeared as a single band in chromosome A.

More interesting data were the molecular characterization of the non-LTR retrotransposon element, called as *RaTART*, that probably is the responsible by telomeric reconstruction in *R.americana*, as well as the telomeric retrotransposable elements *TART*, *Het-A* and *TAHRE* of *Drosophila*. Southern blot analysis indicated that this transposable element is represented by repeat sequences in the genome of *R. americana*, and Northern blot analysis showed a expression in different developmental stages and the transcript of high molecular mass detected represents the full-length non-LTR retrotransposon. However, the chromosomal localization of the retroelement by in situ hybridisation showed a labelling predominant on chromosome ends, indicating possibly the first transposable element described in *R.americana* with a defined role in chromosome structure.

The last retrotransposon, identified in this project, present in the genome of *Rhynchosciara americana*, called R2Ra, was isolated from screening of a lambda dash genomic library using as probe the recombinant pRa1.4 of rDNA. The analysis of sequence showed the presence of conserved regions, like transcriptase reverse domain and zinc finger motif in the amino terminal region. The insertion site is high conserved in *R.americana* and a phylogenetic analysis showed that this element belongs to the R2 clade. The chromosomal localization confirm that the R2Ra mobile element insert into the site specific in rDNA gene.

Keywords: *Rhynchosciara*, transposable element, *mariner*, retrotransposon, transposon, ITR.

LISTA DE ABREVIATURAS

MLE	<i>mariner-like</i> element
ITR	inverted terminal repeat
EST	expressed sequence tag
ORF	open reading frame
LTR	long terminal repeat
non-LTR	non-long terminal repeat
TE	transposable element
cDNA	DNA complementar
rDNA	DNA ribossomal
FITC	fluorêscena

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	01
1.1. Sistema de estudo <i>Rhynchosciara americana</i>	01
1.2. Elementos de Transposição.....	04
1.2.1. Transposon – Classe II.....	05
1.2.2. Retrotranspon – Classe I.....	14
2. OBJETIVOS.....	25
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	26
3.1. <i>Rhynchosciara americana</i>	26
3.2. Seqüenciamento.....	26
3.3. PCR amplificação.....	28
3.4. Extração de DNA Genômico.....	29
3.5. Southern Blotting Genômico.....	30
3.6. Extração de RNA.....	31
3.7. Northern Blotting.....	32
3.8. RT-PCR.....	33
3.9. Lâminas de cromossomos politênicos.....	34
3.10. Hibridização in situ.....	35
3.11. Varredura de banco genômico de <i>Rhynchosciara americana</i>	35
3.12. Purificação do clone genômico.....	37
3.13. Reação de Clonagem.....	38
3.14. Primers de Seqüenciamento.....	39
3.15. PCR tempo real.....	41
3.16. Síntese de dsRNA e Microinjeções.....	41
4. RESULTADOS & DISCUSSÃO.....	43
4.1. Análise de ESTs e Identificação de Elementos Móveis.....	43
4.2. Caracterização de um Fragmento de Transposase <i>mariner</i> dentro do gênero <i>Rhynchosciara</i>	44
4.3. Seqüência de Repetição Terminal Invertida (ITR).....	46
4.4. Análise das Seqüências dos Elementos de Transposição tipo <i>mariner</i> ..	50
4.5. Caracterização Molecular do Elemento de Transposição <i>mariner</i> <i>Ramar1</i>	51
4.5.1. Análise Genômica do Elemento <i>mariner</i> <i>Ramar1</i>	60
4.6. Caracterização Molecular do Elemento de Transposição <i>mariner</i> <i>Ramar2</i>	66
4.6.1. Análise Genômica do Elemento <i>mariner</i> <i>Ramar2</i>	71
4.7. Caracterização Molecular e Genômica do Elemento de Transposição <i>mariner</i> <i>Ramar3</i>	76
4.8. Caracterização Molecular do Elemento de Transposição <i>Ramar4</i>	78

4.9. Análise Filogenética dos Elementos <i>mariner</i> de <i>Rhynchosciara americana</i>	80
4.10. Amplificação Genômica dentro do gênero <i>Rhynchosciara</i>	83
4.11. Análise Filogenética dos Elementos <i>mariner</i> no gênero <i>Rhynchosciara</i>	91
4.12. Caracterização Molecular do Retroelemento RaTART.....	95
4.12.1. Análise Genômica do Retroelemento RaTART.....	102
4.13. Caracterização da Estrutura Molecular do Retroelemento RaR2 rDNA.....	106
4.13.1. Análise Genômica do Retroelemento RaR2.....	126
 5. CONSIDERAÇÃO FINAIS E CONCLUSÕES.....	 134
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	140

1. INTRODUÇÃO

1.1. Sistema de estudo *Rhynchosciara americana*

O díptero *Rhynchosciara americana*, pertencente à família dos Sciarídeos, foi descrito pela primeira vez por Wiedemann em 1821, no entanto em 1951 Nonato & Pavan redescobriram a espécie e a classificaram como *Rhynchosciara angelae*. Foi somente em 1969, quando Breuer fez uma revisão do gênero *Rhynchosciara* que ficou estabelecida a sinonímia entre as espécies, prevalecendo então o nome previamente sugerido por Wiedemann. *Rhynchosciara americana* tem sido, nas últimas cinco décadas, um modelo de estudo bastante utilizado entre os dípteros, por apresentar uma série de vantagens práticas: cromossomos politênicos presentes em diferentes tecidos, cromossomos grandes com morfologia favorável a excelentes preparações citológicas, desenvolvimento sincrônico entre as larvas irmãs de mesmo sexo, ciclo de vida longo, além do fenômeno de amplificação em determinados períodos do desenvolvimento larval, dando origem aos conhecidos pufes de DNA e RNA.

Os cromossomos politênicos aparecem em diferentes tecidos ao longo do desenvolvimento de Sciarídeos, são resultados de um processo endomitótico, conhecido como politenia. Geralmente são longos e largos, e permanecem intimamente pareados com seu homólogo, são várias vezes a largura dos cromossomos mitóticos, e quando corados apresentam um padrão de coloração de faixas e interfaixas longitudinais característico para cada cromossomo e espécie. Estas faixas podem sofrer alterações estruturais durante o desenvolvimento da espécie, dando origem aos pufes que são considerados como “expressão da atividade gênica” (Beermann, 1952) por serem muito ativos na síntese de RNA e em alguns casos apresenta também síntese extra de DNA, ficando conhecidos como

pufes de DNA.

Em *Rhynchosciara americana* é possível encontrar os cromossomos politênicos não só nas glândulas salivares, mas também nos túbulos de Malpighi, intestinos e vesícula seminal, permitindo estudos comparativos da morfologia (Dreyfus *et al.*, 1951). A politenia inicia-se junto com o desenvolvimento larval e algumas alterações estruturais nos cromossomos politênicos são normalmente encontradas e relacionadas diretamente com o estágio do desenvolvimento. No final da vida larval, imediatamente antes das larvas começarem a tecer o pupário coletivo, ocorre o último ciclo de replicação, que tem duração aproximadamente de cinco a seis dias, a partir daí tem início a metamorfose e o aparecimento dos pufes de DNA, onde é possível observar além de intensa síntese de RNA, o fenômeno de amplificação gênica (Breuer & Pavan, 1955; Machado-Santelli & Basile, 1973; Guevara & Basile, 1973; Glover *et al.*, 1981). Os produtos da transcrição dos pufes de DNA foram relacionados com proteínas estruturais secretadas para construção do casulo comunal (Winter *et al.*, 1977). Os pufes de DNA mais marcantes que ocorrem durante a metamorfose já foram bem caracterizados e para cada um, apenas uma unidade de transcrição foi encontrada (B2, C3 e C8) (Santelli *et al.*, 2004; Penalva *et al.*, 1997; Frydman *et al.*, 1993).

O desenvolvimento sincrônico das larvas irmãs de *Rhynchosciara americana* bioquimicamente é uma vantagem, em um grupo as larvas apresentam a mesma idade o que facilita a manipulação em diferentes estágios ou dias subseqüentes, ou permitir um estudo detalhado do aparecimento e regressão dos pufes ao longo do desenvolvimento larval (Guevara & Basile, 1973). Estes pufes podem durar de algumas horas a dias, aparecem em um período específico do desenvolvimento larval sendo característico de um tecido (Breuer & Pavan, 1955; Pavan, 1965). A

glândula salivar de *R.americana* é dividida em três regiões morfológicamente e citologicamente distintas: proximal S1, mediana S2 e distal S3 (Pavan, 1965). O padrão de pufes é bastante similar ao longo das tres regiões, embora as células da região distal (S3) sejam sempre um pouco mais avançadas no desenvolvimento dos pufes que as células da região proximal (S1).

O ciclo de vida larval do Sciarídeo *Rhynchosciara* é de aproximadamente sessenta dias à 22⁰C, uma fêmea adulta tem uma única ovoposição e os ovos eclodem após cerca de treze dias, a partir daí o ciclo de vida é dividido em quatro estágios. E é no quarto estágio, o mais longo, que compreende a maior parte da vida larval. É também no quarto estágio do desenvolvimento, quando as larvas começam a tecer o pupário coletivo, que aparecem os maiores e mais estudados pufes de DNA. Esse último estágio é então dividido ainda em seis períodos que apresentam algumas características particulares: no segundo período aparece a pigmentação na hemolinfa a qual é responsável pela cor avermelhada da larva. No terceiro período as larvas formam uma tenda delicada que depois é abandonada e as larvas recomeçam a comer. Alguns dias depois as larvas param de comer e recomeçam a tecer o pupário coletivo, progressivamente o casulo torna-se mais compacto. No quarto e quinto períodos têm o aparecimento do pufe B-2 e seu máximo desenvolvimento, o pupário coletivo apresenta uma consistência firme e as larvas estão quietas na posição curva. E é no sexto período que ocorre o máximo desenvolvimento do pufe C-3 e as larvas já na posição reta se encontram individualizadas no pupário coletivo (Terra et al., 1973) (Figura 01).

Figura 01 – Ciclo de vida do sciarídeo *Rhynchosciara americana*.

1.2. Elementos de Transposição

Os elementos de transposição foram descobertos inicialmente no milho, por Bárbara McClintock na década de 50, a partir da observação de que o padrão de pigmentação variado dos grãos de milho era resultado da ação de elementos genéticos que tinham a capacidade de mover-se dentro do genoma.

Os elementos de transposição ou transposons são, portanto, seqüências discretas no genoma que são móveis, ou seja, são capazes de transportar-se diretamente de um sítio para outro do genoma. Diferente da maioria dos outros processos envolvidos na reestruturação genômica, a transposição não depende de qualquer relação entre as seqüências dos sítios doadores e receptores. Os transposons limitam-se a mover a si mesmos, e, às vezes, algumas seqüências adicionais, para novos sítios dentro do mesmo genoma. Os elementos de transposição em eucariotos são divididos em duas classes, aqueles que se transpõem via um RNA intermediário, os retrotransposons (Classe I), e aqueles que se transpõem via DNA excisão e reparo, os transposons (Classe II).

1.2.1. Transposon – Classe II

Os elementos da Classe II são dotados de algumas características comuns: possuem seqüências nucleotídicas muito similares nas extremidades (repetições terminais invertidas) de cerca de 31bp, carregam genes que codificam enzimas capazes de transportá-los, criam ao se inserir no DNA pequenas duplicações no sítio alvo de inserção (repetições diretas) e existem em cópias múltiplas no genoma. Muitos elementos de transposição, o elemento P de *Drosophila*, o elemento Tc de *Caenorhabditis*, o Tn10 e o Tn7 entre outros, movem-se através de um mecanismo denominado corta-e-cola, onde as extremidades do transposon são desconectadas do DNA por reação de clivagem expondo a extremidade 3'-OH, essas extremidades são unidas ao DNA alvo por uma reação de transferência, que envolvem transesterificações, onde as extremidades 3'-OH atacam diretamente o DNA, estas reações ocorrem no interior de um complexo nucleoprotêico (Craig, 1995) (Figura 02).

Figura 02 - Esquema Mecanismo de Transposição de Elementos tipo *mariner*.

O estabelecimento de *Drosophila melanogaster* como um sistema modelo foi, desde o início, baseado nas amplas possibilidades de estudo genético. Isto graças à facilidade de manutenção em cultura de laboratório, rápido ciclo de vida e observação excelente dos cromossomos. Com o advento das técnicas de engenharia genética uma outra peculiaridade foi estendida ao sistema, ou seja, a possibilidade de transformação genética de um organismo superior. Interessante é que esta técnica foi adaptada de um fenômeno natural que é conhecido como disgenia híbrida (*hybrid dysgenesis*). Esta característica está associada à algumas linhagens de *Drosophila* e consiste na presença de um elemento de transposição chamado elemento P (Bingham *et al.*, 1984). Em *Drosophila* este elemento está presente em um DNA de 2,9 kb, mas outras formas menores também podem ser encontradas. Sendo um transposon, ele apresenta nas extremidades repetições invertidas de 31 bp. A capacidade de transposição é fornecida por elementos presentes no próprio elemento, mas não está excluída a participação de elementos celulares.

A disgenia híbrida é causada pela introdução de um elemento P residente nos cromossomos num meio ambiente particular, um ovo de uma linhagem sem o elemento. A seqüência nucleotídica do elemento P completo apresenta 4 ORFs (Open Reading Frame – ou quadro aberto de leitura) na mesma fita. Os RNAs formados nas células somáticas transformadas são diferentes da forma encontrada nas células germinativas. Como só há mobilização na linhagem germinativa, um dos mecanismos propostos é que o terceiro (último) intron não é retirado no processamento nas células somáticas, o que impediria a formação de uma transposase funcional.

Uma experiência realizada pelos pesquisadores Spradling e Rubin (1982)

ilustra o estabelecimento posterior da técnica de transformação. O elemento P completo foi construído anexando-se as extremidades seqüências do plasmídio pBR 322. A injeção em ovos da linhagem M resultou na inserção do elemento sem as seqüências exógenas plasmidiais. Isto mostrou que a transposição não envolve um fenômeno de recombinação (pela ausência de DNA do plasmídeo) e sim é dependente do próprio sistema contido no elemento P. Modificações da técnica são feitas com a presença de um gene repórter, por exemplo de beta galactosidase e de um marcador *rosy* (olhos vermelhos), que é injetado num *background white* (olhos brancos) para facilitar o isolamento dos transformados. O vetor de interesse é co-injetado com um plasmídio defectivo no elemento de inserção, o ITR, mas que contém a transposase (*helper*). Assim na co-injeção, o gene que se quer estudar será integrado junto ao repórter e marcado pela ação da transposase. O elemento defectivo não pode, portanto, ser incorporado e apenas fornece o elemento funcional (Rubin & Spradling, 1982).

O elemento P não tem sido utilizado em outros insetos, pois não se obteve sucesso com a utilização desse sistema em outras espécies diferentes de *Drosophila*, mas propiciou uma busca intensa de outros elementos que poderiam, com as mesmas características básicas permitir a transformação, principalmente em insetos envolvidos em doenças ou pragas. Um desses elementos, encontrado pela primeira vez em *Drosophila mauritiana* (Jacobson *et al.*, 1986) é chamado de *mariner* (*Mos1*) e foi descrito inicialmente como um gene pequeno (~1,3kb) que codificava uma única proteína (transposase *mariner*), flanqueado por pequenas seqüências de repetições terminais invertidas (ITRs) de 28pb. A transposase consiste de dois domínios, um N-terminal que é o domínio de ligação ITR e um domínio catalítico na região C-terminal (Hartl *et al.*, 1997). O processo de

transposição é mediado pela habilidade da transposase de reconhecer a sequência ITR, ocorre via um intermediário de DNA catalisado pela transposase com uma duplicação dos nucleotídeos TA no sítio de inserção (Hartl *et al.*, 1989; Lohe *et al.*, 1997). As duas funções da transposase, ligação na sequência-específica do DNA e excisão e inserção do elemento de transposição, são mediados separadamente pelos domínios de ligação ao DNA e catalítico. A transposase *mariner* contém dois motivos altamente conservados: WVPHEL e YSPDLAP, assim como o motivo assinatura D,D(34)D (Robertson, 1993; Doak *et al.*, 1994).

Os elementos de transposição *mariner* são amplamente distribuídos na natureza, podem ser encontrados em uma grande variedade de insetos e outros artrópodes. Membros da família *mariner* tem sido também identificados em diversos organismos como nematodes, espécies marinhas, fungos, plantas e mamíferos, incluindo humanos (Leroy *et al.*, 2003; Robertson, 1993, Halaimia-Toumi, *et al.*, 2004; Capy *et al.*, 1996; Mandrioli, 2003; Jarvik & Lark, 1998).

Atualmente sabe-se que esses elementos são membros de uma grande família de transposons, que ficou conhecida como *mariner* ou *mariner-like elements* (MLEs) (Lampe *et al.*, 1996). São conhecidas mais de 13 subfamílias desse elemento *mariner* que tipicamente apresentam cerca de 40-56% de identidade em nucleotídeos e 23-45% de identidade em aminoácidos entre as subfamílias e de 25%-100% de identidade em aminoácidos com uma subfamília em particular. A história filogenética dos elementos da família *mariner* é conhecida pela extensiva transferência horizontal entre espécies, alguns separados por grandes distâncias filogenéticas. Quando espécies são examinadas para a presença de *mariner*, tipos diferentes são encontrados em um mesmo genoma, por exemplo: o genoma humano contém dois elementos da família *mariner* distintos. *Hsmar1* (*homo sapiens mariner*

1) pertencente a subfamília *cecropia*, enquanto que o *Hsmar2* (*homo sapiens mariner 2*) pertence a subfamília *irritans*. Esses dois elementos apresentam cerca de 37% de identidade nos aminoácidos, e cada um está presente em muitas cópias no genoma (Robertson & Zuppan, 1997; Robertson & Martos, 1997; Lampe *et al.*, 2003). Já o nematódio, *Caenorhabditis elegans* tem nove tipos distintos de elementos *mariner* de três subfamílias diferentes (Lampe *et al.*, 2001).

No genoma do mosquito *Ochlerotatus atropalpus* foi identificado a presença de dois elementos *mariner* distintos, que pertencem a diferentes subfamílias. *Atmar-1* e *Atmar-2* pertencem a subfamílias, *irritans* e *cecropia*, respectivamente (Zakharkin *et al.*, 2004). Distintos elementos de transposição da família *mariner* também foram identificados no genoma da mosca *Bactrocera tryoni*, representantes das subfamílias *mellifera* e *irritans* (Green & Frommer, 2001).

Elementos de diferentes subfamílias *mariner*, que ocupam o mesmo genoma, não são capaz de interagir. Um ensaio para determinar o limite de interação desses elementos *mariner* foi realizado em um sistema in vitro utilizando transposases *mariner* purificadas. O resultado mostrou que apenas elementos muito próximos em identidade (84%) podem interagir, no entanto ineficientemente para transposição. Ocorre uma drástica supressão na transposição até entre elementos muito relacionados, o que leva a crer que um elemento funcional tem um fino reconhecimento da sua sequência para que ocorra a transposição. Dessa forma é possível explicar a grande diversidade dos elementos *mariner* nos genomas por duas vias (Figura 03) (Lampe *et al.*, 2001).

De acordo com a figura 03, que mostra o ciclo pelo qual um elemento *mariner* pode atravessar, pode-se observar que após a invasão de um novo elemento no genoma, este inicialmente vai se proliferar, aumentando em número de cópias tão

rápido quanto puder. Cópias ativas então são capazes de invadir um novo genoma por transferência horizontal. Nesse ponto o elemento pode sofrer mutações pontuais que podem tanto causar uma inativação vertical, quanto originar um elemento divergente ainda funcional, levando a uma diversificação na espécie (via II) ou ainda a transmissão horizontal de um elemento divergente (via I).

Figura 03 – Ciclo de vida de um elemento de transposição tipo *mariner*.

No cromossomo politênico das células do ovário do inseto *Anopheles gambiae* foi feita a localização cromossômica, de quatro famílias de elementos de transposição (*T1*, *Q*, *Pegasus* e *mariner*) por hibridização *in situ*, mostrando uma alta distribuição destes elementos por todos os cromossomos e que estes não se distribuem randomicamente ao longo do braço do cromossomo (Mukabayire & Besansky, 1996). O mapeamento e o conhecimento do sistema de transposição pode levar a construção de vetores que carreguem genes com marcadores de resistência a determinados parasitas, como é o caso do inseto *Anopheles gambiae* que é hospedeiro do parasita *Plasmodium* causador da malária.

Muitos desses elementos de transposição pertencentes a família *mariner* não

são funcionais, sofreram algum tipo de mutação durante sua evolução e com isso transcrevem proteínas inativas. Até o momento, apenas dois elementos *mariner* funcionais são conhecidos: *Mos1*, originalmente descoberto em *Drosophila mauritiana* (Medhora *et al.*, 1991), e *Himar1*, construído como uma seqüência consenso de elementos encontrados no inseto *Haematobia irritans* (Lampe *et al.*, 1996).

O número de elementos *mariner-like* por genoma pode variar tremendamente de espécie para espécie (Hartl *et al.*, 1997). Em várias espécies que tiveram elementos parciais ou *full-length* caracterizados obtiveram MLEs inativos, com múltiplos códons de terminação, deleções ou mutações que alteraram o quadro de leitura. Isto foi observado no genoma de insetos: *Musca domestica* (Yoshiyama *et al.*, 2000); *Hessian fly* (Russell & Shukle, 1997), *Bombyx mori* (Robertson & Asplund, 1996, Robertson & Walden, 2003, Kumaresan & Mathavan, 2004), *Bactrocera tryoni* (Green & Frommer, 2001), *Ochlerotatus atropalpus* (Zakharkin *et al.*, 2004), em lepidópteros: *Antheraia mylitta* (Prasad & Nagaraju, 2003), *Mamestra brassicae* (Mandrioli, 2003), em nematode: *Meloidogyne chitwoodi* (Leroy *et al.*, 2003) e em várias outras espécies. A prevalência de cópias inativas de elementos *mariner* em muitos genomas sugere que a inativação vertical por mutação tem um importante, provavelmente predominante, papel na dinâmica evolutiva dos elementos *mariner* (Lohe *et al.*, 1995).

O domínio de ligação da seqüência de repetição terminal invertida (ITR) da transposase *mariner Mos1* foi definido por Augé-Gouillou e colaboradores (2001), quando analisaram a interação entre o ITR e a transposase. A partir de deleções feitas na transposase foi possível identificar um domínio de ligação mínimo de ITR, que como já havia sido proposto por Pietrokovski e Henikoff (1997) encontrava-se na

região amino terminal. O domínio ITR está associado a 82 aminoácidos da região N-terminal, que provavelmente formam uma região de α -hélice, predito por análises computacionais. Esses resultados estão de acordo com um estudo que descrevia a produção de elementos da família *mariner* hiperativos (Lampe *et al.*, 1999). Um destes mutantes hiperativos da transposase *Himar1* apresentava dois aminoácidos alterados no domínio de ligação de ITR, definido por Augé-Gouillou e colaboradores (2001) para a transposase *Mos1*. As modificações de aminoácidos que a proteína transposase do mutante *Himar1* hiperativo possuía levavam a um aumento na afinidade da proteína com a sequência ITR, mostrando que existe uma forte interação entre a afinidade da transposase pelo ITR e a eficiência da transposição (Augé-Gouillou *et al.*, 2000).

Complexos envolvidos na mobilização do elemento de transposição têm sido extensivamente explorados. Um modelo proposto recentemente (Augé-Gouillou *et al.*, 2005) consiste de um complexo tetramérico de moléculas de transposase que se ligam juntas às pontas dos elementos. Embora a transposase exista principalmente como um monômero em solução, foram obtidas evidências que o dímero da transposase é uma espécie ativa na ligação com o repeat terminal invertido (ITR). Uma outra observação feita pelo mesmo grupo mostra que o domínio catalítico da transposase *mariner Mos1* modula eficientemente a interação transposase-transposase na ausência das extremidades do transposon.

A transposase dos elementos *mariner*-like (MLEs) especificamente se ligam como um dímero no repeat terminal invertido do transposon que o codifica. Dois motivos de ligação foram localizados na sequência ITR (Bigot *et al.*, 2005). Estes motivos estão envolvidos na ligação da transposase *mariner* ao seu ITR, definidos por análises das sequências de ácidos nucleicos das sequências ITR 5' e 3' de 45

MLEs. Outra descoberta interessante foi a caracterização dos motivos palíndromo e *mirror* específicos para cada elemento *mariner*. O motivo palíndromo está correlacionado com a ligação do dímero de transposase, enquanto as propriedades do motivo *mirror* mostram ser responsável pelo dobramento de cada ITR que ajuda a estabilizar a interação transposase-ITR. A conservação e evolução das seqüências ITRs nos elementos *mariner* e seus estudos bioquímicos recentes podem oferecer uma estratégia alternativa para desenhar seqüências ITRs hiper-eficientes. Este fato contribuiria para a realização de ensaios de transposição *in vivo* com um alto grau de eficiência.

A simples purificação de uma transposase (*Himar1*) da família *mariner* foi suficiente para gerar sua transposição *in vitro*, confirmando a sugestão de que a transposição independe de fatores específicos do hospedeiro e de porque estão largamente distribuídos entre diferentes espécies (Lampe *et al.*, 1996).

Por sua larga presença em insetos e capacidade de transposição na ausência de fatores do hospedeiro, o elemento *mariner* foi considerado um excelente candidato para o desenvolvimento de um sistema de transformação gênica para os insetos (Berghammer *et al.*, 1999), foi responsável, por exemplo, pela integração de elementos marcadores nas células germinativas do mosquito *Aedes aegypti* (mosquito da febre amarela) através de uma transposase purificada (*mariner* - *Mos1*) utilizando plasmídeo helper, que produz uma proteína transposase sobre o controle de um promotor de gene de heat-shock (Coates *et al.*, 2000). O uso dessa transposase *Mos1* (purificada) foi ideal para a geração de uma família de transgênicos de espécies de insetos diferentes, particularmente nos casos onde fosse necessária a utilização de um plasmídeo *helper* para a indução da transposase. Um outro exemplo de desenvolvimento seria a transformação com

promotores específicos para determinados órgãos que guiam a expressão de um gene produto que tem como alvo a expressão de uma proteína anti-patógeno nos insetos *Aedes aegypti* e *Anopheles gambiae* (Moreira *et al.*, 2000).

Um outro exemplo, foi realizado com uma cultura de células derivadas de ovário de *Bombyx mori* (bicho da seda), que foram co-transfectadas com um vetor helper expressando uma transposase ativa *Mos1* de *Drosophila* e um vetor doador que continha além das seqüências IR (repetição invertida) uma seqüência adicional que funcionaria como marcador da inserção. Neste caso, o elemento *Mos1* foi capaz de mediar eventos de excisão e transposição nas células em cultura de *Bombyx mori* (Wang *et al.*, 2000).

Ensaio de transposição foram também realizados em diversos organismos. No nematode *Caenorhabditis elegans* a transposase *Mos1* de *Drosophila mauritiana* foi mobilizada com sucesso nas células da linhagem germinativa. Mostrando uma eficiência de transposição que perdurou por gerações (Bessereau *et al.*, 2001).

1.2.2. Retrotransposon – Classe I

Os elementos da Classe I, chamados coletivamente de retrotransposons, dependem de uma fase replicativa via RNA para inserção no genoma. Ou seja, inicialmente a partir do RNA transcrito é feita a fita dupla, com o auxílio da transcriptase reversa do retroelemento, e este então é inserido no genoma (Figura 04).

Figura 04 – Mecanismo de retrotransposição: a partir do RNA mensageiro do retrotransposon é feita a transcrição reversa com o auxílio de enzimas apropriadas, presentes no próprio elemento.

Estes elementos são divididos em duas categorias: aqueles que possuem uma longa sequência de repetição terminal (elementos LTR – “long terminal repeat”), como por exemplo os elementos *copia*, *gypsy* e *roo*, e aqueles que não possuem esta sequência (non-LTR – “non-long terminal repeat”), alguns exemplos desse tipo de elemento são *TART*, *Jockey*, *Doc* e *I factor*. Muitos retrotransposons non-LTR possuem duas grandes ORFs com uma forte similaridade com as regiões que codificam *gag* e *pol* em retrovírus. A sequência *pol* codifica uma transcriptase reversa entre outras atividades enzimáticas necessárias para sua transposição, como a atividade de endonuclease (Figura 05).

(a)

(b)

Figura 05 - Diagrama dos retrotransposons. (a) Esquema geral de um retrotransposon LTR. (b) Esquema dos RNA intermediário da transposição de elementos non-LTR. A região pintada representa *gag* e a sem pintar *pol*. (Rashkova *et al.*, 2002).

A região da heterocromatina, em algumas espécies de eucariotos, é formada por seqüências repetitivas de DNA e também muitas vezes povoada por elementos móveis. No entanto, alguns elementos cromossômicos importantes, tais como centrômeros e telômeros, estão incluídos nas regiões heterocromáticas do cromossomo, e muito tem sido feito para um melhor conhecimento da estrutura e função dessas regiões. Os telômeros são as extremidades, que protegem os cromossomos de eucariotos contra a degradação e replicação incompleta, são conhecidos por manter a estabilidade cromossômica. Estudos em diferentes organismos têm atribuído aos telômeros outras participações em processos celulares, tais como a regulação da proliferação celular e oncogênese. Embora estes mecanismos ainda sejam pouco conhecidos, fica evidente que a regulação do comprimento dos telômeros tem conseqüências variadas para a célula e por isso as células investem significantes recursos na manutenção das regiões teloméricas (McEachern *et al.*, 2000).

Telômeros de muitos animais, plantas e eucariotos unicelulares são formados por curtas seqüências, denominadas seqüências teloméricas, produzidas por uma enzima específica que possui atividade de transcriptase reversa, a telomerase. Essa enzima é responsável pela inserção de uma pequena seqüência de nucleotídeo, utilizando como molde um segmento de RNA interno. Essas seqüências variam de espécie para espécie, mas são geralmente de cinco a dez pares de base de comprimento e rica em A+C (Okazaki *et al.*, 1993; Sahara *et al.*, 1999). Em muitos insetos a sequência consiste de um pentanucleotídeo (CCTAA)_n, no entanto entre os dípteros essa sequência de repetição parece ter sido perdida, o que fez com que esses insetos desenvolvessem um mecanismo alternativo para manutenção dos telômeros.

Em alguns dípteros inferiores foi descrito uma seqüência satélite de repetição que estaria associada à manutenção do telômero por recombinação homóloga. Essas seqüências satélites de repetição tem ordem de magnitude maior que o *repeat* telomérico, porém menor que os retrotransposons non-LTR, que parecem constituir as extremidades dos cromossomos. Em *Chironomus* os *repeats* de DNA que compõem os finais dos cromossomos possuem cerca de 176, 350 ou 360 pares de base, o comprimento e as seqüências são espécie-específica (Martínez-Guitarte *et al.*, 2004). Em *Rhynchosciara americana* a seqüência encontrada chega a 414 pares de base e em *Drosophila virilis* é de 370 pares de base (Madalena & Gorab, 2005; Biessmann *et al.*, 2000).

López e colaboradores (1999) reportaram a descoberta de uma proteína transcriptase reversa associada com os telômeros de *Chironomus*. Em *Rhynchosciara americana* a mesma proteína foi localizada nos cromossomos politênicos da glândula salivar em extremidades não centroméricas (Gorab, 2003). Com uma curiosidade adicional, algumas espécies dentro do gênero *Rhynchosciara* não foi observada a marcação localizada nas extremidade dos cromossomos, apenas na região da eucromatina. O envolvimento de uma enzima com atividade de transcriptase reversa na manutenção do telômero e sua localização nucleolar, nestes organismos que não possuem a enzima telomerase, tem sido sugerido como um elemento essencial para manter a integridade das pontas dos cromossomos (Díez *et al.*, 2006).

No caso de *Bombyx mori*, uma constituição do telômero pouco usual também ocorre. É possível identificar regiões de repetições curtas (TTAGG)_n, no entanto, nenhuma atividade da enzima telomerase é detectada em nenhum estágio de vários tecidos ou em nenhuma linhagem celular que mantém o repeat telomérico TTAGG

nas extremidades dos cromossomos (Sasaki & Fujiwara, 2000). Logo, a manutenção dessas extremidade é realizada por dois retroelementos non-LTR, denominados de TRAS1 e SART1, que se inserem no sítio de repetição telomérico e não nas pontas cromossômicas (Okazaki *et al.*, 1995; Fujiwara *et al.*, 2005). O retrotransposon non-LTR TRAS1 possui as duas ORFs comuns a esse tipo de retroelemento, com homologia a *gag* e *pol* de retrovírus e apresenta cerca de 7,8kb de comprimento. Embora SART1 apareça um pouco menor com 6,7kb, está presente em maior número de cópias que TRAS1 nas regiões teloméricas. Os elementos SART1 e TRAS1 parecem estar randomicamente distribuídos entre os cromossomos, no entanto não possuem uma direção única de inserção no DNA, normalmente são inseridos na direção contrária do *repeat* (TTAGG)_n. São elementos com altos índices de transcrição e o mecanismo de retrotransposição aparece funcionando ativamente nesse sistema.

Em *Drosophila melanogaster* um mecanismo ainda mais bizarro foi desenvolvido pela célula em substituição à perda da atividade da enzima telomerase. Os telômeros nesse sistema são formados por várias cópias dos retrotransposons non-LTR HeT-A, TART e TAHRE (Danilevskaya *et al.*, 1994; Levis *et al.*, 1993; Pardue *et al.*, 1996; Abad *et al.*, 2004a; Abad *et al.*, 2004b). Esses elementos se transpõem repetidamente nas extremidades dos cromossomos através do envolvimento da transcriptase reversa e da proteína *gag* que eles contêm (Rashkova *et al.*, 2002a; Rashkova *et al.*, 2002b). Apesar das diferenças, é curioso notar que tanto a enzima telomerase quanto os retrotransposons HeT-A, TART e TAHRE mantêm a integridade das pontas dos cromossomos utilizando como molde um template de RNA de sequência específica. Estes retrotransposons foram os primeiros elementos de transposição com função definida na estrutura dos

cromossomos (Pardue *et al.*, 1997; Pardue & DeBaryshe, 1999) (Figura 06).

Figura 06 – Estrutura de vários telômeros de insetos. Os pequenos triângulos nos vertebrados e em *Bombyx mori* representam o repeat telomérico. TA repeat representa as repetições associadas ao telômero (Fujiwara *et al.*, 2005).

Os elementos HeT-A, TART e TAHRE compartilham duas características que os distinguem dos outros retroelementos conhecidos: se inserem somente nas extremidades dos cromossomos e cada um contém um largo segmento de sequência não traduzida. Portanto esses elementos apresentam uma atividade na região da heterocromatina, onde se acreditava ser uma região transcricionalmente inativa (Pardue & DeBaryshe, 2000; Danilevskaya *et al.*, 1999; Fortunati *et al.*, 1999). Atualmente o mapeamento da região da heterocromatina tem gerado como resultado um melhor entendimento da organização genômica destes retrotransposons no telômero de *Drosophila* (George *et al.*, 2006). Também apresentam diferenças significantes, o elemento HeT-A possui cerca de 6kb enquanto TART e TAHRE possuem aproximadamente 10kb de comprimento. TART e TAHRE apresentam as duas grandes ORFs, ORFI codifica a proteína *gag*, e a ORFII codifica *pol*, uma enzima com atividade de transcriptase reversa e

endonuclease. Já o elemento HeT-A possui apenas a ORF I que codifica *gag*, não possui *pol*. O retroelemento TAHRE parece ser um híbrido de HeT-A e TART, pois possui uma forte similaridade em sequência com a ORF I de HeT-A, mas contém uma segunda ORF que codifica *pol* e tem maior similaridade em sequência com a ORF II de TART. HeT-A é muitas vezes mais abundante que TART e TAHRE, e parecem estar randomicamente misturados. O comprimento e a composição destes retrotransposons na região telomérica pode variar significativamente entre uma e outra extremidade e entre linhagens diferentes de insetos, sugerindo que essa variação não é essencial para a viabilidade do inseto (Mason *et al.*, 2000; Mason *et al.*, 2003; Melnikova & Georgiev, 2005).

Embora HeT-A, TART e TAHRE sejam de diferentes sub-famílias de retrotransposons non-LTR, eles codificam uma proteína *gag* muito similar, isto sugere que a proteína *gag* está envolvida na localização do sítio alvo de transposição; ambas proteínas *gag* localizam-se no núcleo onde *gag* HeT-A forma estruturas que se associam com os telômeros. Enquanto que *gag* TART não se associa com o telômero a menos que *gag* HeT-A esteja presente, sugerindo um relação de simbiose em que *gag* HeT-A dirige a transposição para a região telomérica (Danilevskaya *et al.*, 1998; Rashkova *et al.*, 2002a, Rashkova *et al.*, 2002b; Rashkova *et al.*, 2003) (Figura 07).

Figura 07 – Modelo da reconstituição das extremidades do cromossomo pelos retrotransposons TART e Het-A. No passo 1 o elemento é transcrito e no citoplasma esse mensageiro é traduzido (Passo 2) nas suas proteínas *gag* e *pol*, em associação com *gag* o RNA transcrito volta para o núcleo, onde servirá de RNA template para atividade da transcriptase reversa (Passo 3) (Pardue *et al.*, 2005).

Para conhecer a distribuição filogenética e a extensão da variação dos retrotransposons teloméricos é necessário comparar seqüências homologas à TART e HeT-A (Casacuberta & Pardue, 2002), e como acontece nos retrovírus a ORFII (*pol*), que codifica uma proteína com atividades de endonuclease e transcriptase reversa, é mais conservada que a seqüência *gag*, sendo que a parte mais conservada RT (transcriptase reversa) é a mais utilizada para definir a homologia entre as diferentes espécies em *Drosophila*.

Uma identificação dos elementos TART e HeT-A em *Drosophila virilis* mostrou que estes elementos de transposição podem ter sido recrutados para manter a função celular da manutenção do telômero há pelo menos 60 milhões de anos (Casacuberta & Pardue, 2003a, Casacuberta & Pardue, 2003b), no entanto a origem evolutiva destes elementos permanecia controversa. Uma vez que, sendo a ORFI de *TART* e *Het-A* similares, foi sugerido que características comuns destes elementos resultaram de uma evolução convergente e não da evolução de um ancestral comum (Danilevskaya *et al.*, 1999, Pardue & DeBaryshe, 2003, Casacuberta & Pardue

2005).

Em contraste, existem outros retrotransposons non-LTR (*Jockey, Doc e I factor*) que possuem regiões codificantes similares porém nunca são encontrados nas regiões teloméricas, esses elementos não teloméricos apresentam atividade de transposição na eucromatina (Berizikov *et al.*, 2000).

Ainda é possível identificar retrotransposons que apresentam outras características bem definidas, são elementos que possuem sítios específicos para sua inserção, por exemplo os elementos que tem como sítio de inserção a região correspondente ao 28S do rDNA (Figura 08). Os genes do RNA ribossomal são transcritos por uma larga unidade de repetição, cada unidade é composta pelos genes 18S, 5.8S e 28S formando o rDNA (Zaha *et al.*, 1982). Estes elementos foram inicialmente identificados interrompendo o gene 28S rDNA em *Drosophila melanogaster* e em *Bombyx mori* e foram posteriormente caracterizados como retrotransposon non-LTR e identificados em várias espécies (Glover & Hogness, 1977; Fujiwara *et al.*, 1984; Kojima & Fujiwara, 2005).

Figura 08 – Esquema do rDNA com as porções 28S, 5,8S e 28S do ribossomal identificadas e o sítio de inserção do retrotransposon R2 no 28S rDNA destacada.

Estes retrotransposons sem longas seqüências de repetição (non-LTR), que possuem as características de se inserirem especificamente na região do gene 28S

rDNA, são conhecidos como R1 e R2. Entre outros retrotransposons que apresentam também sítios específicos de inserção no rDNA em outros genes ribossomais (Kojima & Fujiwara, 2003). Em algumas espécies os elementos R1 e R2 já estão bem caracterizados (Burke *et al.*, 1987; Christensen *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2005). O elemento R1 é um retroelemento non-LTR que possui cerca de 5,3 kb de comprimento e duas ORFs, uma codifica a proteína *gag* e a outra ORF codifica uma transcriptase reversa. O elemento R2 se trata de um retrotransposon non-LTR que *full-length* apresenta cerca de 3,6 kb e uma única ORF que codifica uma transcriptase reversa. E os sítios de inserção destes elementos são considerados altamente conservados entre os artrópodes (Burke *et al.*, 1999). Contudo as junções possuem graus diferentes de conservação, a junção 3' é altamente conservada, uma vez que representa o sítio de clivagem do elemento na sequência do gene 28S rDNA, enquanto a junção 5' é sujeita a deleções, duplicações e inserções de nucleotídeos. Estes dois elementos podem ocupar a mesma unidade de rDNA ou se inserirem em unidades diferentes (Jakubczak *et al.*, 1992). Portanto, possuem distintos sítios de inserção, o sítio de inserção do retroelemento R2 fica a dois terços do início do segmento 28S, enquanto que o sítio de inserção do R1 fica a 74 bases downstream do sítio de R2 (Xiong & Eickbush, 1988).

Em *Drosophila melanogaster*, as unidades de rDNA interrompidas são transcritas em quantidades significativamente menores que as unidades de rDNA não interrompidas (Jamrich & Miller, 1984). Isso sugere que a unidade de rDNA que carrega a inserção do retrotransposon esteja silenciado na cromatina. Um estudo comparativo da estrutura da cromatina da unidade rDNA de *D.melanogaster* com e sem o inserto do retroelemento e sua capacidade de transcrição, mostrou que em células embrionárias não ocorre substancial diferença, tanto na acessibilidade da

cromatina, quanto na transcrição do gene e retrotransposon (Ye & Eickbush, 2006).

O retrotransposon non-LTR R2 codifica um único polipeptídeo com atividades de transcriptase reversa, endonuclease e domínio de ligação ao DNA. Os dois motivos conservados de ligação ao DNA, um CCHH *zinc finger* e um motivo myb, localizado no domínio N-terminal da proteína não apresentam um papel definido na reação de retrotransposição, estão diretamente envolvidos na habilidade de reconhecer o alvo de ligação ao DNA (Christensen *et al.*, 2005).

Um sistema de integração *in vivo*, onde componentes do elemento R2 de *Bombyx mori* foram injetados na pré-blastoderme do embrião de *Drosophila melanogaster*, mostrou que o elemento foi prontamente detectado no gene 28S rDNA de adultos, assim como inserido no rDNA da progênie (Eickbush *et al.*, 2000). Esse sistema de integração se tornou uma ferramenta importante de entrega de seqüências definidas de DNA para o gene 28S rDNA, podendo ser utilizado em diferentes sistemas.

2. OBJETIVOS

As características biológicas do díptero *Rhynchosciara* colocam-no como um importante modelo de estudo biologia do desenvolvimento, permitindo a associação da biologia molecular a abordagens morfológicas. A construção de um banco de ESTs com RNA poli A+ das glândulas salivares representava a disponibilização de ferramentas para um grande avanço no conhecimento do sistema e levou ao estabelecimento dos objetivos deste trabalho.

Identificação e caracterização de elementos de transposição expressos neste organismo. Elementos tipo *mariner* seriam candidatos a possíveis vetores de transformação o que representaria um aspecto importante, uma vez que uma das limitações do sistema é a inexistência de mutantes que possam ser mantidos.

Um outro aspecto relevante seria o estudo dos elementos retrotransposons non-LTR que estariam envolvidos na manutenção da região telomérica neste inseto, como foi observado em *Drosophila*. Assim como a caracterização de um elemento de retrotransposição também non-LTR que estaria inserido na região do gene ribossomal 28S, inativando a unidade ribossomal.

Todavia, o levantamento dos elementos de transposição e retrotransposição presentes no genoma deste inseto seria um dado novo e importante para um melhor entendimento deste sistema biológico.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. *Rhynchosciara americana*

As larvas de *Rhynchosciara americana* são coletadas na região de Ubatuba, estado de São Paulo. E são crescidas em laboratório, usando as condições estabelecidas por Lara *et al.* (1965).

3.2. Seqüenciamento

Os clones são transformados por choque térmico, utilizando bactérias competentes *E. Coli* DH5 α preparadas em cálcio 50mg/L, e placas com meio LB (5g/L NaCl, 5g/L extrato de levedura, 10g/L triptona) contendo ampicilina 100mg/L, 4 μ L IPTG 1M e 40 μ L Xgal 20mg/ml. As colônias selecionadas são crescidas *overnight* em meio LB com ampicilina 100mg/L. Após este tempo as bactérias são coletadas por centrifugação (5min a 5000g) e a extração do DNA plasmidial é feita utilizando o kit Concert Mini-prep (GIBCO), ou através de um método denominado Fast Mini Prep, que consiste em adicionar 100 μ L da solução I (50mM glicose, 25mM Tris-HCl pH8 e 10mM EDTA), homogeneizar em *vórtex* para ressuspender as células, adicionar então 200 μ L da solução II (1% SDS e 0,2M NaOH), solução de lise, misturar por inversão e após 3-5 min adicionar 200 μ L da solução III (60mL acetato de potássio 5M, ácido acético glacial 11,5mL e água MilliQ 28,5mL, para que a solução final tenha 3M de potássio e 5M de acetato), solução de neutralização, misturar por inversão e deixar no gelo por 20 min. Centrifugar por 15min a >14000g a temperatura ambiente. Adicionar 300 μ L de isopropanol em tubos limpos. Coletar com cuidado 400 μ L do sobrenadante e transferir para o tubo com isopropanol, misturar por inversão. Centrifugar por 10min a >14000g a temperatura ambiente, drenar os tubos. Adicionar 500 μ L de etanol 70% gelado, misturar por inversão.

Centrifugar por 5min a $>14000g$ a temperatura ambiente, descartar o sobrenadante cuidadosamente. Secar e ressuspender em água MilliQ ou TE (10mM Tris-HCl pH 8 e 1mM EDTA).

O DNA obtido foi verificado em gel de agarose 0,8% por digestão com enzima de restrição apropriada para checar o inserto e a partir deste DNA prepara-se a reação de PCR de seqüenciamento [1,5 μ L de DNA (~150ng), 1,0 μ L de primer, 3,0 μ L tampão, 1,0 μ L de BigDye e 3,5 μ L de água MilliQ] utilizando o modelo de PCR GeneAmp 9700 (Perkin Elmer) e terminador BigDyeIII (Perkin Elmer) e as seguintes condições: 96 $^{\circ}$ C por 1min, 35 ciclos [96 $^{\circ}$ C por 20 seg; 50 $^{\circ}$ C por 1 min; 60 $^{\circ}$ C por 4 min].

O produto de PCR foi precipitado seguindo o seguinte protocolo; adicionando em cada amostra 25 μ L de solução gelada de precipitação que continha 23 μ L de etanol absoluto, 1 μ L de acetato de sódio 3M pH 5 e 1 μ L de glicogênio 1g/L, após uma breve agitação em *vórtex* as amostras permanecem em gelo por 40 min, e são então centrifugadas por 40 min a 4000rpm e 4 $^{\circ}$ C, após descartar o sobrenadante adiciona-se 50 μ L de etanol 70% gelado e repete-se o passo de centrifugação, descarta-se o sobrenadante e seca-se as amostras no escuro a temperatura ambiente por uma hora, por fim adiciona-se 10 μ L de tampão de corrida (loading buffer: 10% formamida). Utilizou-se um seqüenciador automático de 16 capilares modelo ABI-3100 (PerkinElmer).

As análises dos eletroferogramas gerados a partir da corrida foram realizadas em sistema operacional Linux onde rodavam os programas *Phred*, *Phrap*, *CrossMatch* e *Consed 14* (Ewing and Green, 1998; Ewing *et al.*, 1998; Gordon *et al.*, 1998), cujas licenças de uso para fins acadêmicos são gratuitas e obtidas diretamente com os autores. Com estes programas foi possível alinhar seqüências,

separando as que se sobrepõem em *contigs* e as seqüências isoladas em *singlets*, além de eliminar das seqüências possíveis contaminações de vetores seqüenciados.

3.3. PCR amplificação

Para amplificar seqüências genômicas com homologia a transposases foram utilizadas informações geradas pelo seqüenciamento de um banco de cDNA de *Rhynchosciara americana* (Siviero *et al.*, 2006).

Os primers gerados foram (GIBCO BRL Custom Primers e IDT – Integrated DNA Technologies, Inc):

pMay 5' : 5' – GGTGGAGAACGTACCGAGAG - 3'

pMay 3' : 5' - CGAGCATTGTCATGCAGAAG - 3'

pITR: 5' - AACGGAAGAACTTATTTGTACACCTAA - 3'

pRamar1-5: 5' – TTTGCACAACAAGTTCAATT – 3'

pRamar1-3: 5' – TTTCTGGCAATTTACGGAT – 3'

pRamar2-5: 5' – TTCGGTTAGCTTTTCGCAGAT – 3'

pRamar2-3: 5' – CTTTTCCCATCTCTCAGGCAG – 3'

A reação de PCR foi realizada utilizando um par de primer específico, um termociclador Perkin Elmer 9700 e as seguintes condições: 1µL DNA (10ng), 1,5µL MgCl₂ 50mM, 2µL dNTP Mix 20mM, 5µL tampão PCR 10X, 2µL PrimerF 10mM, 2µL PrimerR 10mM, 0,5µL Taq DNA polimerase (Invitrogen life technologies) e água MilliQ para 50µL final de reação. Os programas utilizados variaram um pouco nas temperaturas de anelamento e tempo de extensão. Para o par de primers pMay foi utilizado o seguinte programa: 94⁰C por 30seg, 35 ciclos [94⁰C por 30seg; 50⁰C por 30seg; 72⁰C por 3min] e uma extensão final a 72⁰C por 7min. Para os demais primers foi utilizado o seguinte programa: 94⁰C por 30seg, 35 ciclos [94⁰C por 1min;

49°C por 1min; 72°C por 1min30seg] e uma extensão final a 72°C por 7min.

Os produtos de PCR foram purificados utilizando o kit Microcon PCR (Millipore), e clonados utilizando o kit *pGEM-T easy* (Promega) que é ideal para clonagem de produtos de PCR, uma vez que o vetor foi construído com 3' timidina em ambas extremidades, o que possibilita uma aumento na eficiência da ligação uma vez que a enzima usada nos experimentos também deixa um nucleotídeo não pareado nas extremidades. Após transformação por choque térmico, os clones selecionados com inserto foram crescidos para a extração do DNA plasmidial e posterior seqüenciamento, utilizando os mesmos protocolos já descritos.

3.4. Extração de DNA Genômico

O método descrito foi utilizado para extrair DNA de moscas, foram utilizadas de 3 a 5 moscas em cada procedimento. Em um tubo estéril, já contendo as moscas, adicionou-se 300µL de TMD (10mM Tris-HCl pH8, 5mM EDTA e 0,3M cloreto de sódio) e homogeneizou-se com um bastão de vidro (aproximadamente 5 movimentos). Adicionou-se então 12 µL de SDS 20% e 1,5µL de proteinase K 20mg/mL misturando o tubo por inversão. Incubou-se a reação por cerca de 60min a 65°C. Em seguida adicionou-se 300µL de fenol:clorofórmio, agitou-se por inversão durante 3min e centrifugou-se por 5min a 16000g. A fase aquosa foi transferido para um novo tubo estéril e precipitado o DNA com 600µL de etanol 100%. Centrifugou-se por mais 5min a 16000g, o sobrenadante foi cuidadosamente descartado e o *pellet* foi lavado com etanol 70%, mais uma vez centrifugado por 5min a 16000g, o sobrenadante foi retirado com extremo cuidado. O DNA então foi seco a temperatura ambiente e ressuspenso em aproximadamente 40µL de TE (10mM Tris-HCl pH 8 e 1mM EDTA) ou água MilliQ.

Para a extração de DNA das glândulas salivares foi executado o seguinte procedimento: utilizou-se cerca 5 glândulas de cada período desejado, e em um tubo de 1,5mL adicionou-se 300µL de solução de digestão (25mM Tris-HCl pH 7,5, 20mM NaCl, 20mM EDTA pH 8 e 4% SDS) mais 1,5µL de proteinase K 200mg/mL, incubou-se à 37°C por cerca de 60 min. Fez-se a extração com fenol:clorofórmio 1X, agitou-se por inversão e centrifugou-se por 5 min a 16000g. A fase aquosa foi transferida para um tubo novo e precipitada com acetato de sódio 3M pH7 para concentração final de 0,3M e 2,5V etanol absoluto gelado. Centrifugou-se então por 15 min a 16000g e o sobrenadante cuidadosamente descartado, o precipitado foi lavado com etanol 70%, novamente centrifugado por 5 min a 16000g. O sobrenadante foi descartado e o precipitado seco e ressuspenso em cerca de 40µL de TE (10mM Tris-HCl pH 8 e 1mM EDTA) ou água MilliQ. Os DNAs foram quantificados utilizando o aparelho NanoDrop ND1000 Spectrophotometer.

3.5. Southern Blotting Genômico

O DNA de *Rhynchosciara americana* 8µg foi clivado por cerca de 5 horas a 37°C, utilizando enzimas de restrição EcoRI, HindIII e BamHI (GIBCO ou Amersham Life Science), então foi colocado por 15 min à 65°C para a inativação das enzimas e aplicado em gel de agarose 0,8% contendo brometo de etídeo, após a eletroforese o gel foi tratado com as soluções: 15 min na solução HCl 0,25M para hidrólise parcial, 15 min em NaCl 1,5M/NaOH 0,5M para desnaturação e 30 min em NaCl 1,5M/Tris-HCl 0,5M para neutralização do DNA. O DNA foi então transferido para uma membrana de Nylon HybondTM-N da Amersham Life Science de acordo com Southern (1975), como descrito em Sambrook *et al.* (2001). A transferência ocorreu por cerca de 12 horas e o filtro foi então deixado à 80°C por 2 horas, ficando pronto

para ser hibridizado.

A sonda foi marcada com $\alpha^{32}\text{P}$ dCTP (Amersham) utilizando o kit Nick Translation System da GIBCO/Invitrogen, a reação consistiu de: 5 μL DNA template, 5 μL mix dNTP (menos dCTP), 5 μL dCTP $\alpha^{32}\text{P}$, 5 μL enzima Poll/DNAseI mix e 30 μL água, agitou-se cuidadosamente e encubou-se a 15 $^{\circ}\text{C}$ por 1 hora. Depois disso foi necessário desnaturar a sonda por aquecimento por 5 min. Os filtros incubados em solução 6X SSC, 4X Denhardts, 1% SDS, 200 $\mu\text{g/mL}$ DNA de espermatozoides de salmão, primeiramente foram pré-hibridizados por uma ou duas horas à 65 $^{\circ}\text{C}$ e então adicionou-se a sonda com o DNA marcado aos filtros que foram hibridizados *overnight* à mesma temperatura. No dia seguinte, os filtros foram lavados quatro vezes com solução de lavagem 2X SSC, 0,1% SDS e duas vezes com solução 0,2X SSC, 0,1% SDS. Foram analisados após exposição no aparelho PhosphorImager Storm (Storm, Molecular Dynamics).

3.6. Extração de RNA

Para extração de RNA de glândula utilizou-se 5 glândulas de cada período desejado, e em um tubo de 1,5mL adicionou-se 300 μL de solução de digestão (25mM Tris pH 7,5, 20mM NaCl, 20mM EDTA pH 8 e 4% SDS) mais 1,5 μL de proteinase K 200mg/mL, incubou-se à 37 $^{\circ}\text{C}$ por cerca de 60 min. Fez-se a extração com fenol:clorofórmio 1X, agitou-se por inversão e centrifugou-se por 5 min a 16000g. A fase aquosa foi transferida para um tubo novo e precipitada com acetato de sódio 3M pH7 para concentração final de 0,3M e 2,5V etanol absoluto gelado.

Os RNAs foram então checados com o método do glioxal-DMSO (Gerard & Miller, 1997), que consiste em adicionar 30 μL da Solução de Glioxal (390 μL Glioxal, 450 μL DMSO e 90 μL tampão fosfato 0,2M) e deixar por 60 min à 50 $^{\circ}\text{C}$. Após o

banho, o RNA foi chegado em gel agarose 1,2% com tampão fosfato, após a corrida o gel é corado com azul de metileno. Os RNAs foram quantificados utilizando o aparelho NanoDrop ND1000 Spectrophotometer.

3.7. Northern Blotting

Os RNAs extraídos de fases anteriores à amplificação (2º período e início de rede 3º período), e subseqüentes abrangendo a expressão dos pufes de DNA (B2 máximo expresso e C3) foram tratados com glyoxal-DMSO (Gerard & Miller, 1997), que consiste em adicionar 30µL da Solução de Glioxal (390µL Glioxal, 450µL DMSO e 90µL tampão fosfato 0,2M) e deixar por 60 min à 50°C, em seguida são submetidos a eletroforese em gel de agarose 1,2% sob recirculação do tampão. Juntamente com os RNAs que foram hibridizados, um RNA de *E. coli* foi submetido a eletroforese para servir como marcador, a raia onde o RNA de *E. coli* correu é cortado e corado com solução de azul de metileno. Após a transferência para membrana de nylon (Zetaprobe) como descrito em Sambrook et al. (2001), os filtros foram então deixado à 80°C por 2 horas, ficando pronto para ser hibridizado.

A sonda foi marcada com $\alpha^{32}\text{P}$ dCTP (Amersham) utilizando o kit Nick Translation System da GIBCO/Invitrogen, a reação consistiu de: 5µL DNA template, 5µL mix dNTP (menos dCTP), 5µL dCTP $\alpha^{32}\text{P}$, 5µL enzima Poll/DNAseI mix e 30µL água, agitou-se cuidadosamente e encubou-se a 15°C por 1 hora. Depois disso foi necessário desnaturar a sonda por aquecimento por 5 min. Os filtros de northern foram incubados em solução 5X SSPE , 1% SDS, 5X Denhardts, 200µg/mL DNA de esperma de salmão e 50% formamida, pré-hibridizados por uma hora à 42°C e hibridizados *overnight* à mesma temperatura. A lavagem foi feita quatro vezes com solução 2X SSC, 0,1% SDS e duas vezes com solução 0,1% SSC, 0,1% SDS.

Foram analisados após exposição no aparelho PhosphorImager Storm (Storm, Molecular Dynamics).

3.8. RT-PCR

As reações de RT-PCR foram realizadas utilizando RNA de diferentes estágios do desenvolvimento de *Rhynchociara americana*, previamente tratados com DNase (Sigma). Para 1 µg RNA foi adicionado 8 µL de água livre de RNase, 1 µL tampão 10X e 1 µL DNase I (1 unit/µL), incubou-se por 15 min a temperatura ambiente e em seguida 1 µL StopSolution foi adicionado e incubou-se por 10 min a 70°C, para inativação da enzima, e então para o gelo e pronto para adicionar os reagentes para o RT-PCR.

Foram utilizados os seguintes pares de primers:

pRamar1-5F:	5' – TTTGCACAACAAGTTCAATT – 3'
pRamar1-3R:	5' – TTTCTGGCAATTTACGGAT – 3'
pRamar2-5F:	5' – TTCGGTTAGCTTTCGCAGAT – 3'
pRamar2-3R:	5' – CTTTTCCCATCTCTCAGGCAG – 3'
pActinaF:	5' – ACAATTGATGGACCGGACTC – 3'
pActinaR:	5' – GGGAAATCGTTCGTGACATC – 3'

A síntese da primeira fita foi realizada com as seguintes condições: 1 µg RNA (10 µL), 1 µL PrimerR 10 mM, 4 µL tampão 5X, 1 µL dNTP Mix 10 mM, 2 µL DTT 0,1 M, 1 µL SuperScript II (Invitrogen life technologies).

Em um microtubo estéril foi adicionado o RNA, o primer e o dNTP mix, aqueceu-se à 65°C por 5 min e colocou-se rapidamente no gelo, depois de uma breve centrifugação adicionou-se o tampão e o DTT e incubou à 42°C por 2 min. Adicionou-se então a enzima SuperScript II e deixou a reação prosseguir à 42°C por 50 min. Depois de inativada a enzima à 70°C por 15 min, adicionou-se RNaseH para

remover o RNA complementar ao cDNA incubando à 37°C por 20min.

A reação de PCR foi realizada utilizando um par de primer específico, um termociclador Perkin Elmer 9700 e as seguintes condições: 2µL cDNA, 1,5 µL MgCl₂ 50mM, 2µL dNTP Mix 20mM, 5µL tampão PCR 10X, 2µL PrimerF 10mM, 2µL PrimerR 10mM, 0,5µL Taq DNA polimerase (Invitrogen life technologies) e água MilliQ para 50µL final de reação. O programa utilizado foi: 94°C por 2min, 35 ciclos [94°C por 30 seg; 50°C por 30seg; 72°C por 1min30seg] e uma extensão final a 72°C por 7min.

Os fragmentos amplificados foram checados em gel de agarose 0,8% contendo brometo de etídeo para verificar se existia ou não a presença dos transcritos correspondentes em determinado período do desenvolvimento larval de *Rhynchosciara americana*.

3.9. Lâminas de cromossomos politênicos

As lâminas de cromossomos politênicos foram preparadas a partir de glândulas salivares de *Rhynchosciara americana*. As larvas foram dissecadas em PBS (140mM NaCl; 2,7mM KCl; 1,5mM KH₂PO₄; 6,5mM Na₂HPO₄), fixadas em etanol - ácido acético (3:1) por aproximadamente 15min, e então as regiões S1, S2 e S3 separadas. Sob a lamínula foi colocado uma gota de ácido acético 45% junto com o material e pingou-se orceína acética. Deixa o material corar por 2 ou 3 min e então a glândula é esmagada. O excesso de ácido acético foi retirado e a lâmina fechada e analisada.

3.10. Hibridização *in situ*

Lâminas de cromossomos politênicos foram preparadas a partir de glândulas salivares de *Rhynchosciara americana*, fixadas em etanol - ácido acético (3:1). Os cromossomos foram então desnaturados em NaOH 0,07N por 5 min, lavados 3X em SSC 2X, etanol 70% e etanol absoluto. Após secas, receberam a mistura de hibridização contendo a sonda previamente marcada por random-primer com digoxigenina-11-dUTP (Boehringer - Mannheim) e desnaturada por aquecimento. As hibridizações foram feitas a 58°C, com SSC 4X, *overnight*. As hibridizações foram reveladas por anti-digoxigenina conjugado com Fluoresceína. A contra-coloração foi iodeto de propídio. As preparações foram analisadas ao microscópio confocal de varredura a laser (Zeiss- LSM510).

As imagens fluorescentes foram obtidas por microscopia confocal de varredura a laser (Zeiss LSM 510), com laser de Argônio com comprimento de onda de 488 nm e outro de Hélio Neônio com comprimento de onda de 543nm, ligados a um microscópio invertido de fluorescência Zeiss Axiovert 100 M, usando lente objetiva de imersão em água, com aumento de 40X. A fluorescência emitida é selecionada por filtros LP 505 nm e 560 nm e as imagens detectadas em dois canais são exibidas com uma resolução de 512x512 pixels, em modo RGB. As imagens de secções verticais obtidas por intervalo de seccionamento apropriado no eixo z entre 0,3 a 0,7mm são processadas do modo mais adequado à visualização dos resultados: reconstrução tridimensional, projeções ou cortes ortogonais.

3.11. Varredura do banco genômico de *Rhynchosciara americana*

O banco genômico foi construído a partir de DNA de mosca no bacteriófago lambda DashII (Stratagene). A cada plaqueamento o título do banco era

determinado de modo que as placas ficassem com lise quase confluyente para maior aproveitamento da varredura. A infecção foi feita a 37⁰C por 20 min utilizando a bactéria *E. coli* DL 538, cerca de 12 placas quase confluentes eram geradas. As placas de lise eram transferidas para filtros de Nylon Amersham HibondTM-N e tratados com as soluções: NaOH 0,5M / NaCl 1,5M (1 min), Tris-HCl 0,5M pH 7,8/NaCl 1,5M (4 min) e SSC2X (8 min), secos a temperatura ambiente e deixados por 2 horas na estufa a 80⁰C para fixação do DNA na membrana.

Como sondas foram utilizados clones obtidos do banco de ESTs de *Rhynchosciara americana*. A sonda foi marcada com $\alpha^{32}\text{P}$ dCTP (Amersham) utilizando o kit Nick Translation System da GIBCO/Invitrogen, a reação consistiu de: 5 μ L DNA template, 5 μ L mix dNTP (menos dCTP), 5 μ L dCTP $\alpha^{32}\text{P}$, 5 μ L enzima PolI/DNAseI mix e 30 μ L água, agitou-se cuidadosamente e encubou-se a 15⁰C por 1 hora. Depois disso foi necessário desnaturar a sonda por aquecimento por 5 min. Os filtros incubados em solução 6X SSC, 4X Denhardts, 1% SDS, 200 μ g/mL DNA de esperma de salmão, primeiramente foram pré-hibridizados por uma ou duas hora a 65⁰C e então adicionou-se a sonda com o DNA marcado aos filtros que foram hibridizados por 12 horas a mesma temperatura, sob agitação. Os filtros então foram lavados com as soluções: SSC 2X / SDS 0,1% e SSC 0,2x / SDS 0,1%, cerca de um litro de cada solução, secos e expostos a placa sensível e escaneados no PhosphorImager Storm (Storm, Molecular Dynamics).

Após a hibridização da primeira varredura, os resultados foram impressos numa transparência, isso possibilita uma fácil sobreposição da transparência contra os filtros e as placas, permitindo uma precisa localização dos pontos positivos. Com a ajuda de uma pipeta Pasteur, de cabeça para baixo, cada *plug* correspondente a cada ponto positivo foi transferido para um tubo contendo 0,5mL *lambda buffer*

(10mM Tris-HCl pH7,5 e 10mM MgCl₂) e uma gota de clorofórmio. Depois de aproximadamente 2 horas, 5µL de cada suspensão foi pipetada sob uma placa LB onde já havia sido plaqueada a bactéria competente (DL 538 *E.coli*) e incubada *overnight* a 37⁰C (Rezende-Teixeira *et al.*, 2005). O resultado era uma placa com algumas placas de lise gigantes que foram transferidas para as membranas de nylon, e tratadas e hibridizadas como descrito anteriormente. Só depois então de confirmado o *plug* como positivo prosseguiam-se as diluições seriadas e hibridizações para obter uma placa de lise isolada e positiva.

3.12. Purificação do clone genômico

Para purificação de fagos recombinantes foram utilizados dois métodos. A purificação de fagos em gradiente de cloreto de cézio sem tratamento enzimático e com uma extração por fenol, descrita por Santelli & Navarro-Cattapan (2000). Em uma placa confluenta do recombinante de interesse, foi adicionado *lambda buffer*, aproximadamente 4mL sob agitação por 4 horas a temperatura ambiente. A suspensão foi recolhida e a partir dessa suspensão prepara-se uma nova infecção na bactéria competente (DL 538 *E.coli*). Incubou-se 1mL da suspensão de fago com 1mL da bactéria competente por 15min a 37⁰C. Após este período de incubação o inóculo é transferido para meio líquido LB (5 g/L NaCl, 5 g/L extrato de levedura, 10 g/L triptona) contendo 10mM magnésio e incubado *overnight* sob forte agitação a 37⁰C. Após o crescimento *overnight* foi adicionado ao meio 2mL de clorofórmio e agitou-se vigorosamente, adicionando em seguida 20g NaCl, continuou-se agitando o frasco até solubilização total do sal. E então centrifugou-se por 10 min a 8000 rpm em um rotor GSA. Ao sobrenadante foi adicionado 40g PEG 8000, agitou-se para total solubilização e incubou-se por, no mínimo, 2 horas a 4⁰C.

Uma nova centrifugação foi realizada a 8000 rpm por 10 min em um rotor GSA, no entanto, agora o sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspenso em 5mL de *lambda buffer*. Essa suspensão foi transferida a um tubo de centrífuga, o qual já havia sido adicionado 6,48g CsCl, ajustou-se o volume para 9mL com *lambda buffer* e cobriu-se com óleo mineral. Seguiu-se então uma ultracentrifugação em rotor SW41 a 35000 rpm por 24 horas. A banda de DNA formada foi retirada com auxílio de uma seringa e agulha, perfurando a lateral do tubo cuidadosamente. Uma etapa de diálise com TE (10mM Tris-HCl pH 8 e 1mM EDTA) por cerca de 2 horas foi realizada para retirada de sais. Então na solução com o DNA foi adicionado fenol 1V, agitou-se cuidadosamente por inversão e centrifugou-se por 15 min a 10000g. A fase aquosa foi adicionado NaCl 5M para concentração final de 0,2M e 2,5V de etanol absoluto gelado. Dessa forma é possível observar o DNA precipitando formando um véu, que pode então ser enrolado em um bastão de vidro, lavado em etanol 70% e ressuspenso em 0,5mL de TE (10mM Tris-HCl pH 8 e 1mM EDTA). A qualidade e a quantidade de DNA obtida permitem manipulações adicionais, tais como digestões, ligações, marcações, subclonagem etc.

O outro método utilizado foi a purificação com o kit QIAGEN^R Lambda Midi, é um método rápido e fácil, onde se obtêm no entanto quantidades menores de DNA, porém de qualidade.

3.13. Reação de Clonagem

Nas reações de clonagem o vetor utilizado foi o pBluescriptKS (Stratagene) devidamente clivado com a enzima específica para cada ligação, assim como os fragmentos utilizados na clonagem. Foram gerados subclones para seqüenciamento dos recombinantes genômicos ou para utilização como sondas.

A ligase utilizada foi a T4 DNA ligase da Invitrogen life technologies, e as reações de ligação foram realizadas à 16°C por 12 horas: 4µL DNA digerido, 1µL vetor KS aberto, 4µL tampão 10X, 1µL T4 DNA ligase e água milliQ para 20µL total de reação.

O produto da ligação foi transformado utilizando a bactéria *E. coli* DH5α em placas com meio LB (5 g/L NaCl, 5 g/L extrato de levedura, 10 g/L triptona) contendo ampicilina 100 mg/L, 4µL IPTG 1M e 40µL Xgal 20mg/ml. Após a transformação os clones com insertos foram crescidos *overnight* em meio LB (5 g/L NaCl, 5 g/L extrato de levedura, 10 g/L triptona) contendo ampicilina 100 mg/L, foram feitas as extrações de DNA plasmidial, checados e tratados para seqüenciamento ou foram utilizados como sonda, de acordo com os protocolos já descritos.

3.14. Primers de Seqüenciamento

Alguns primers foram desenhados exclusivamente para seqüenciamento, possibilitando juntar contigs e poder finalizar as sequências genômicas.

A tabela 01 mostra a seqüência dos oligonucleotídeos e a figura 09 o local correspondente dos oligos na seqüência final do retroelemento RaTART.

Tabela 01 – Primers utilizados no seqüenciamento do gene retrotransposon RaTART de *Rhynchosciara americana*.

Nome	Seqüência Oligonucleotídeo 5' → 3'
1RT-5'	AGCCTTTGTAGTTCGCTGGA
P21	CGGGACCACTATCACTCA
P08	TCATCCTTGATCGCAAATA
PF	AACGGCGCAAATTAAGA
P11	TGAGTGTGATATTGGATTTCATT
P12	TGAGATTTTGTTTCTTCACTTTT
P22	GGCTTTTGACAAGGTATGGTA
RT4-3	TTTGAAGTGAAGCGTTTGGTG
P09	GCTTGCCTTCGACTGAAGTA

Figura 09 - Esquema do gene RaTART e as regiões em que os primers foram desenhados para seqüenciamento.

A tabela 02 mostra a seqüência dos oligonucleotídeos e a figura 10 o local correspondente dos oligos na seqüência final do retroelemento RaR2.

Tabela 02 – Primers utilizados no seqüenciamento do gene retrotransposon R2Ra de *Rhynchosciara americana*.

Nome	Seqüência Oligonucleotídeo 5' → 3'
R2p13	TGAAGCTTGCACGATATCATA
R2p14	CAAGTCACGTACGCTTTCTC
R2p2	TGGTAAAACAGCCCTGCTA
R2C12	CATGATCCGATGTTCAAGTT
R2p1	CTGTTTGCCTTTCATCATATTT

Figura 10 – Esquema do gene R2Ra e as regiões em que os primers foram desenhados para seqüenciamento.

3.15. PCR tempo real

As reações de PCR em tempo real foram realizadas em um aparelho da Corbett Research modelo Rotor Gene 2000 real-time cycler, para cada reação foram adicionados: 10 μ L SuperMix; 2 μ L Primer Mix; 0,5 μ L DNA e 7,5 μ L água milliQ (Abgene – Absolute QPCR Sybr Green Mix). As condições dos PCR foram 95°C por 10 min, 40 ciclos [95°C por 20 seg; 55°C por 20 seg; 72°C por 40 seg], seguindo então o melt. Os primers utilizados estão listados na tabela 03.

Tabela 03 – Primers utilizados nas reações de PCR em tempo real.

Nome	Seqüência Oligonucleotídeo 5' → 3'
qRaTART-Left	tccagccgaaatcagagagt
qRaTART-Right	ccaatgcagctctgttgaa
qRaR2-Left	agcgaacagataggcagata
qRaR2-Right	cactgcgttgactttctgta
qRa18S-Left	taaaccgctgaaccaccttc
qRa18S-Right	cggccaactctgtgaagca

3.16. Síntese de dsRNA e Microinjeções

Os RNAs dupla fita foram produzidos com o auxílio do kit Megascript RNAi (Ambion), utilizando-se como template para a T7 RNA polimerase a região codificante amplificada com primers contendo a seqüência do promotor T7, os primers utilizados para a amplificação da transcriptase reversa foram: RT-Right (5'-TAATACGACTCACTATAGGGAGAGGGCGATACGATGTCACCTTT-3') e RT-Left (5'-TAATACGACTCACTATAGGGAGATCCGGTTCTCCTCTCTCTCA-3').

A reação de transcrição *in vitro* foi montada conforme manual fornecido pelo fabricante, contendo água livre de nucleases, ATP, UTP, GTP, CTP, 1 μ g de DNA template, tampão e T7 RNA polimerase. A reação é então incubada a 37°C *overnight*, ao término da reação eleva-se a temperatura a 75°C por 5 min e sobre a bancada a reação resfria à temperatura ambiente por 10 min, permitindo assim o

anelamento das fitas complementares. A reação é então tratada com DNase e RNase, de forma que o DNA utilizado como template e as fitas simples de RNA não aneladas sejam eliminados. O dsRNA é então purificado em coluna de afinidade (fornecida com o Kit) e solução de lavagem de alta força iônica contendo etanol e eluída com solução de baixa força iônica (TE 10mM Tris-HCl pH 8 e 1mM EDTA).

O rendimento foi em média de 550 μ g/mL, e foram injetadas em cada larva 0,15 μ g de dsRNA durante o segundo período de desenvolvimento larval. Como controle larvas do mesmo grupo foram injetadas com PBS (140mM NaCl; 2,7mM KCl; 1,5mM KH₂PO₄; 6,5mM Na₂HPO₄) ou não. As injeções foram inoculadas com capilares e um injetor automático (Femtojet - Eppendorf).

4. RESULTADOS & DISCUSSÃO

4.1. Análise de ESTs e Identificação de Elementos Móveis

Um banco de ESTs, construído com RNA poli A+ de glândula salivar de *Rhynchosciara americana* no início do quarto estágio do desenvolvimento larval, apresentou 2580 seqüências únicas (843 *contigs* e 1734 *singlets*) (Siviero *et al.*, 2006). Dentre as seqüências de ESTs geradas, as que apresentaram homologia com elementos móveis tiveram sua caracterização iniciada nesse projeto. Foi possível identificar representantes das duas classes de elementos de transposição: um da classe dos retrotransposons (Classe I) foi caracterizado a partir de cDNA com 67% similaridade com uma proteína com atividade de transcriptase reversa de *Drosophila melanogaster*, e representantes da classe dos transposons (Classe II), foram caracterizados a partir de elementos *mariner* de transposição que apresentaram 82% identidade na região carboxi-terminal com o elemento *mariner* de *Mayetiola destructor* (Russel & Shukle, 1997).

A figura 11 mostra alguns dos principais transcritos expressos na glândula salivar de *Rhynchosciara americana* no período em que se inicia a construção do casulo comunal. Nesta figura é possível identificar as duas diferentes classes de elementos de transposição que apresentam um nível de transcrição comparável a proteínas de pufe, proteínas estruturais da célula (actina e tubulina), assim como transcritos de proteínas estruturais da cromatina (HMG-D e Putative histone H3,3) e choque térmico (HSC70 e HSP40).

Figura 11 – Frequência de alguns dos transcritos expressos na glândula salivar de *Rhynchosciara americana*.

4.2. Caracterização de um Fragmento de Transposase *mariner* dentro do gênero *Rhynchosciara*

Com a intenção de amplificar elementos de transposição tipo *mariner* em *Rhynchosciara americana*, foram desenhados primers (May5: 5'GGTGGAGAACGTACCGAGAG3' e May3: 5'CGAGCATTGTCATGCAGAAG3') (GIBCO BRL Custom Primers) para a região interna da ORF de uma transposase putativa ao elemento *mariner Desmar1* de *Mayetiola destructor*, a partir de uma sequência presente no banco de ESTs. Foram utilizados DNAs de *Rhynchosciara americana*, *Rhynchosciara baschanti*, *Rhynchosciara sp*, *Rhynchosciara hollaenderi* e *Rhynchosciara milleri* (Figura 12).

Na figura 12 observa-se que o padrão de amplificação genômica apresentou algumas variações no gênero *Rhynchosciara*, esta variação poderia ser vantajosa se

fosse possível utilizá-la como um marcador, para uma rápida identificação da espécie relacionada. Portanto os fragmentos foram então clonados em pGemT-easy (Promega), seqüenciados e as seqüências caracterizadas.

Figura 12 – PCR de amplificação utilizando os primers May3 e May5 e diferentes DNAs: PM - 1Kb Plus Ladder; 1) *Rhynchosciara americana* (Ra); 2) *Rhynchosciara baschanti* (Rb); 3) *Rhynchosciara sp* (Rsp); 4) *Rhynchosciara hollaenderi* (Rh); 5) *Rhynchosciara milleri* (Rml).

Foram clonados os fragmentos de cerca de 200 bases de *Rhynchosciara americana* e *Rhynchosciara baschanti*, e fragmentos de cerca de 600 bases de *Rhynchosciara sp*, *Rhynchosciara hollaenderi* e *Rhynchosciara milleri*. A seqüência em nucleotídeos apresentou alta identidade entre as diferentes espécies de *Rhynchosciara* (Tabela 04), chegando a 97% identidade entre *Rhynchosciara milleri* e *Rhynchosciara sp*. A seqüência em aminoácidos dos fragmentos amplificados também se mostrou muito conservada (Figura 13) e compreende a região do domínio catalítico da transposase e alguns outros motivos característicos dos elementos de transposição *mariner*, como a seqüência WVPHEL descrita por Robertson (1993) que está presente em *Rsp*, *Rh* e *Rml* (mostrada sublinhado na figura 13). O domínio da transposase está assinalado em negrito.

Tabela 04 – Comparação entre as seqüências amplificadas no gênero *Rhynchosciara*. Os números representam porcentagem de identidade/substituições conservativas em aminoácidos e entre parênteses identidade em nucleotídeos.

	<i>Ra</i>	<i>Rml</i>	<i>Rh</i>
<i>Rb</i>	80/84 (87)		
<i>Rsp</i>		70/77 (97)	70/77 (88)
<i>Rml</i>			78/85 (89)

<i>Ra</i>	-RTCREWFQK	FKNGDFDVKD	EDRSGRPKIY	EDAELEELLK	E-----	-----	40
<i>Rb</i>	-RTYREWFQK	FKNGDFDVED	KDRSGRPKVY	EDAELEELLE	E-----	-----	40
<i>Rsp</i>	GENVPRVVS	FKNGDFDVED	KDRSGRPKIY	EDGELEELLE	EDSST-QKEL	ALTLEIAQQA	59
<i>Rh</i>	-----FK	FKNGDFDVED	EDRSARPKIY	EDAELEE---	-DSSQTQKEL	ALTLEVT-QT	47
<i>Rml</i>	-----ERFQK	FKNGDFDLDD	THRSGRPKIY	EDAELEELLE	EDSSQTQKDL	ALTLDVTTQA	55
<i>Ra</i>	-----	-----	-----	-----	-----	-----	40
<i>Rb</i>	-----	-----	-----	-----	-----	-----	40
<i>Rsp</i>	VSRRLKSLVM	IHKQGNWVPY	ELMPRIER-	----RCLSA	STKKGFLHRI	VTGDEKWIHY	114
<i>Rh</i>	VSHRLKSLGM	IHKQGNWVPY	ELKPRDIECR	LCSSEMLLAR	HKKS-FLNRI	VTGDDKWIHY	106
<i>Rml</i>	ISHRLKSLGM	IHKQGNWVPY	ELKPRDIERR	LCLSEMLLAR	HKKKVFLHRI	VTGGEKVVHY	115
<i>Ra</i>	-----	-----	-----	-----	-----	---TITGALYQ	48
<i>Rb</i>	-----	-----	-----	-----	-----	---DSS-NTHR	47
<i>Rsp</i>	DNPKRKRSWG	LSGHASTSTV	KLNIHRIVDF	VGLCIWWDQL	GVVYYELLNP	RKTITGALYR	174
<i>Rh</i>	DNLKRKRSW-	LSDQASTSTA	KPNIHG--KI	CMLCIWWDQL	SVVYYELLNP	SETTTGALYR	163
<i>Rml</i>	DNPKRK---	-----STSTA	KPNIHR--KK	FMLCIWWDQL	GVVYYDLLNP	SEIITGYLYR	165
<i>Ra</i>	TQLMRLSRAL	KEKRPQYYSR	HEKIILLHDN	A- 79			
<i>Rb</i>	TQLMRLIRAL	KEKRPQYYCR	HEKIILLHDN	A- 78			
<i>Rsp</i>	THLMRLSRAL	KEKRPQYCSR	NEKIILLHDN	A- 205			
<i>Rh</i>	IQLMRLSRAL	KEKRPQYYSR	HEKIILLHDN	AR 195			
<i>Rml</i>	TQLMRLSRAL	KEKRPQYYSI	HEKIILLHDN	AR 197			

Figura 13 - Comparação das seqüências, em aminoácidos, dos fragmentos amplificados dos clones putativos de transposases *mariner* de *Rhynchosciara americana* *Ra*, *Rhynchosciara baschanti* *Rb*, *Rhynchosciara sp Rsp*, *Rhynchosciara hollaenderi* *Rh* e *Rhynchosciara milleri* *Rml*.

4.3. Seqüência de Repetição Terminal Invertida (ITR)

O estudo detalhado dos ESTs mostrou a presença de uma seqüência bem característica em elementos de transposição tipo *mariner* denominada ITR (repetições terminais invertidas). São seqüências curtas de aproximadamente 28pb que flanqueiam o elemento de transposição, fundamentais no processo de transposição por serem responsáveis pela ligação da transposase. Foi possível identificar duas seqüências terminais invertidas (ITRs) em dois diferentes elementos que passarão a ser denominados desde já *Ramar1* e *Ramar2* embora de fato isto tenha ocorrido posteriormente (ver itens 4.5. e 4.6., respectivamente).

A seqüência de repetição terminal invertida (ITR) encontrada para *Ramar1* 5'-TTGGGTGTACAACTTAATTCCTTCCGTT-3', possui 3 *mismatches*, onde o nucleotídeo G (guanina) sublinhado, na quinta e na sétima posição, podem estar substituídos pelo nucleotídeo A (adenina). E o nucleotídeo A (adenina) sublinhado

na nona posição pode estar substituído pelo nucleotídeo G (guanina). Nesses casos ocorre uma transição, onde uma purina é substituída por outra purina, e a sequência encontrada poderia ser 5'-TTGG^G/_AT^G/_AT^A/_GCAACTTAATTCCTTCCGTT-3'. Para a sequência ITR de *Ramar2*, 5'-TTAGGTGTACAAATAAGTTTCTTCCGTT-3', foi encontrado somente 1 *mismatch* e nesse caso, o nucleotídeo T (timina) sublinhado na décima posição pode estar substituído pelo nucleotídeo G (guanina). Esta substituição é do tipo transversão, onde uma pirimidina é trocada por uma purina, 5'-TTAGGTGTACAAATAAGT^T/_GTCTTCCGTT-3'. As sequências ITRs dos elementos *Ramar1* e *Ramar2* compartilham alta identidade (82%), incluindo nove nucleotídeos contínuos (5'-GGTGTACAA) na extremidade 5' e os oito últimos nucleotídeos (CTTCCGTT-3') da sequência (Figura 14).

Figura 14 – Comparação entre as sequências ITRs de *Ramar1* e *Ramar2*, o logo foi gerado utilizando <http://weblogo.berkeley.edu/>.

A comparação de algumas repetições terminais mostrou que existe um alto grau de conservação entre as sequências de diferentes espécies. As comparações foram feitas entre as sequências ITRs dos elementos *Ramar1* e *Ramar2*, ambos com 28pb, e cada uma das outras sequências de repetição terminal invertida, representantes das diferentes subfamílias de elementos *mariner* (Figura 15).

As sequências de repetição terminais invertidas de *Ramar1* e *Ramar2* possuem os mais altos graus de similaridade com as repetições invertidas dos elementos *mariner* *Mos1* (57% e 68% identidades) de *Drosophila mauritiana* e

Desmar1 (71% e 57% identidades) de *Mayetiola destructor*, ambos da subfamília *mauritiana*, incluindo os mesmos nove nucleotídeos contínuos (5'-GGTGTACAA) descritos anteriormente (Figura 16). As outras seqüências ITRs das outras diferentes subfamílias compartilham entre 56% e 33% identidade com *Ramar1* e entre 57% a 43% identidade com *Ramar2*.

Transposon	Seqüência ITR	% Identidade com <i>Ramar1</i>	% Identidade com <i>Ramar2</i>	Subfamília
	1.....10.....20.....30			
<i>Ramar1</i>	TTGGG<u>TGT</u>CAACTTAATTCCTTCCGTT			<i>mauritiana</i>
<i>Ramar2</i>	TTAGG<u>TGT</u>CAAAATAAGTTCTTCCGTT	82	--	
<i>Mos1</i>	TCAGG<u>TGT</u>ACAAGTATGAAATGTCGGTT	57	68	
<i>Desmar1</i>	TTGGG<u>TGT</u>CAACTTAAAAACCGGAATT	71	57	
<i>Ammar1</i>	TTGGGTTGGCAACTAAGTAATTGCGGATTT	56	56	<i>mellifera</i>
<i>Hcmar1</i>	TTAGGTCCTTACATATGAAATTAGCGTT	43	57	<i>cecropia</i>
<i>Cemar1</i>	TCAGGTTGTCCCATTTGTTTTTGCACTA	43	54	<i>elegans</i>
<i>Himar1</i>	ACAGGTTGGCTGATAAGTCCCGGTCTGAC	33	43	<i>irritans</i>
<i>Bmmar1</i>	CAGGTGTGTAAATATGAAACCGGAATT	39	55	<i>mori</i>

Figura 15 – Comparação das seqüências ITR entre *Ramar1* e *Ramar2* de *Rhynchosciara americana* e outros elementos. Os ITRs dos diferentes elementos representados são *Mos1* de *D.mauritiana*, *Desmar1* de *M.destructor*, *Ammar1* de *A.mellifera*, *Hcmar1* de *H.cecropia*, *Cemar1* de *C.elegans*, *Himar1* de *H.irritans*, *Bmmar1* de *B.mori*. Os nucleotídeos mismatches em *Rhynchosciara americana* estão sublinhados.

Figura 16 – Comparação entre as seqüências ITRs de *Ramar1*, *Ramar2*, *Mos1* e *Desmar1*, o logo foi gerado utilizando <http://weblogo.berkeley.edu/>.

As seqüências ITRs apresentam resíduos fortemente conservados (Bigot *et al.*, 2005), incluindo uma região consenso localizada 5'-YYAGRT-3', onde Y representa T ou C e R representa A ou G. Essa seqüência consenso pode ser encontrada nos elementos *Ramar1* e *Ramar2* do díptero *Rhynchosciara americana*.

O alto grau de identidade entre as seqüências de repetição e a seqüência de proteínas dos elementos de transposição *mariner* *Ramar1* e *Ramar2* identificados no genoma de *Rhynchosciara americana*, pode ser um indicativo que estes elementos tiveram um ancestral comum. Entretanto, os *mismatches* nestas seqüências ITR poderiam ter levado a inativação destes elementos, perdendo a capacidade de mobilidade. Alguns trabalhos mostram características importantes a respeito das seqüências ITRs, como a conservação de uma seqüência palindroma e motivos *mirror* (Bigot *et al.*, 2005), e uma possível função, inicialmente proposta por Pietrokovski & Henikoff (1997) e depois confirmada por Augé-Gouillou *et al.* (2001), onde a seqüência ITR poderia ser uma região envolvida na ligação da transposase *mariner* pelo motivo HTH presente na porção N-terminal, entretanto a conservação e evolução das seqüências ITRs nos elementos *mariner* representam um enigma a ser resolvido.

As seqüências ITRs identificadas serviram de molde para o desenho de um primer, que foi denominado de pITR (5´ - AACGGAAGAACTTATTTGTACACCTAA - 3´), uma vez que essas seqüências são invertidas, era de se esperar que um único oligonucleotídeo fosse suficiente para a amplificação do elemento de transposição inteiro. Foram feitas amplificações genômicas, utilizando como templates DNAs de *Rhynchosciara americana* (*Ra*), *Rhynchosciara sp* (*Rsp*), *Rhynchosciara baschanti* (*Rb*) e *Rhynchosciara hollaenderi* (*Rh*) (Figura 17).

Figura 17 – PCR amplificação utilizando o primer pITR e DNA de diferentes *Rhynchosciaras*: PM- 1Kb *Plus Ladder* (Invitrogen); Ra - *Rhynchosciara americana*; Rsp - *Rhynchosciara sp*; Rb - *Rhynchosciara baschanti*; Rh - *Rhynchosciara hollaenderi*.

A figura 17 mostra os fragmentos obtidos das amplificações com o primer pITR, diferentes fragmentos foram amplificados nas diferentes espécies de *Rhynchosciara*. Inclusive fragmentos de aproximadamente 1,3kb, que poderiam conter um elemento de transposição tipo *mariner* inteiro. Dessa forma, partiu-se para a clonagem e caracterização dos fragmentos de 1,3kb e 1kb de *Rhynchosciara americana*, inicialmente.

4.4. Análise das Seqüências dos Elementos de Transposição tipo *mariner*

As seqüências geradas, a partir do seqüenciamento de ESTs de *Rhynchosciara americana* e das seqüências amplificadas com homologia a transposase, foram analisadas pelos programas *Phred*, *Phrap*, *CrossMatch* e *Consed 10*. Com estes programas é possível alinhar seqüências a partir dos eletroferogramas gerados no seqüenciador, separando as seqüências que se sobrepõem em *contigs* e as seqüências isoladas em *singlets*, além de eliminar possíveis contaminações por vetores seqüenciados.

A partir desta análise foi possível reconstruir quatro putativas transposases, que apresentam algumas das características dos elementos de transposição tipo

mariner, mostradas na figura 18: seqüência ITR (repetições terminais invertidas); sítios de ITR flanqueados por nucleotídeos TA, essa duplicação de dois pares de bases (TA) no sítio de inserção é característico dos elementos *mariner*; domínio catalítico, que contém a tríade catalítica D,D(34)D e o domínio de transposase; domínio de ligação do DNA, que contém o sinal de localização nuclear (NLS) e o motivo *helix-turn-helix* (HTH) e finalmente, um tamanho apropriado de cerca de 1300pb.

Figura 18 - Diagrama de um elemento de transposição *mariner* típico.

4.5. Caracterização Molecular do Elemento de Transposição *mariner* *Ramar1*

A primeira seqüência descrita foi resultado da adição de ESTs e de seqüências amplificadas com homologia a transposase utilizando primers apropriados, sendo um representante da família dos elementos de transposição tipo *mariner*, foi denominada *Ramar1*, de acordo com a convenção proposta por Robertson & Asplund (1996) e a seqüência de *Ramar1* foi depositada no GenBank sob o *accession number* **DQ784570**.

A figura 19 corresponde à seqüência proposta para a transposase putativa *Ramar1*. O elemento de transposição (*Ramar1*) apresenta 1278 pb de comprimento,

um tamanho típico encontrado nesses elementos de transposição tipo *mariner*, pois são genes pequenos que codificam uma única proteína, a transposase. A sequência de repetição terminal invertida possui 28 pb sendo flanqueada pelo dinucleotídeo TA.

```
TA-TTGGGTGTGCAACTTAATTCCCTTCCGTTTCCACAAAATGGCTTAAGGTGCTATAAATAGTCAA
GACAGCTGATTTTTGCTGAATCGTGAAGTGTGACATCTGCCAACCAAATATTGTTTACAAGT
CTTTGAGTTTTGCACAACAAGTTCAATTTTTTACTGCGTTGAAA ATG TCG AGT TTC GTT
GAA AAT AAC CAC CAT TTG CGA GAA GTT TTG ATT TTC TGT TTC AAT TGA
AAG AAA AGT GTA GCT GAA GCG CAT CAA ATG CTT GTG GAA GTT TAT GGT
GAC TCT GCA CCA TCG GAT AGA TTT TGT AAG GAA TGG TTT GGA TGA TTT
AAA AGT TGT GAT TTT AGT GGT AAA GAC GAG AAG CGT ATG GCT CAA CCG
AAA AAT TTG AAG ACG AAG AAT TAG AGA CAT TAC TCG AAC AAG ATT CGT
GTC AAA CGC AAA CAG AGC TTA CAG AAT CAT TGG GAG TAA CTC AAC AAG
CTA TTT TTA AAC GAC TCA AAG CCG CAG GAT GGA TGT ATC CTG CAT GGA
AAT TAT GTT CCA TAC GAA TTG AAA GCG AGA GAT GTC GAA CGG CGA TTT
TGC ATG TCC GAA ATG TTG CTT GAA CGG CAC AAA AGG AAG TCT TTT TTG
CAT CGA ATC GTA CGC GGG GAC GAA AAA TTA ATT CAA TAC GAC AAT CCA
AAA CGC AAA AAG ATG GAT ATG TAA AGT CCG GGC CAA CCA GGA ACA TCA
ACG CCG AAG CCG AAT ATC CCA CGG GTG CCA AAG TAA TGC TCT GCA TTT
GGT GGG GTC AAA AGA GGT CTG ATC CAC TGT GAG GCT GTT AAA ACC TGG
TCA AAC GAT CAA TGG AGA CTT CTC AAG CAA CAA TTG ATC CGT TTA AAG
CAA GCT ATT GCC GAA AAA CGT CCA GAT TAT GCG ACC AGA CAC GAG TCG
ATA ATG TTT CAT CAT GAC AAC GCT CGG CCT CAT GTT GCT GTT CAA GTT
AAA AAC TAT TTG AAA AAT AGC GGA TGG GAA ATT CTG GTT CAC CCG CCT
TAT AGC CCA GAC CTT GCC CCT TCC GAC TAC CAT TTG TTT CGA TCG ATG
CAG AAC GTT TTG AGT GGA ATA CGC TTT ACT TCA GAA CAG GGG ATC AAA
AAT TGG CTG AAT TCA TTC TTG GCT TCA AAA GAT GAA CGC TTC TTT CGC
GAC GGA ATC CGT AAA TTG CCA GAA AGA TGG GAA AAA GTA GTA GCT AGC
GAT GGC CAA TAC TTT AATTCATTTTATTATTCAAATAAATGTGTTTTTCATGCAAAAA
AACGGAAGGAATTAAGTTGCACACCCAA-TA
```

Figura 19 - Sequência proposta para a transposase putativa *Ramar1*, em negrito a sequência ITR (repetições terminais invertidas). A sequência correspondente aos primers pRamar1-5 e pRamar1-3 está marcada em negrito-sublinhado.

A partir da sequência proposta na figura 19 para a transposase putativa *Ramar1* desenhou-se primers para amplificar a porção central do elemento (pRamar1: 5'-TTTGCACAACAAGTTCAATTT-3' e 5'-TTTCTGGCAATTTACGGAT-3'). Dessa forma, o fragmento amplificado seria utilizado como sonda em experimentos de Southern e Northern Blot e também clonado e seqüenciado, definindo a região central do elemento onde estão presentes motivos conservados da transposase. Estes primers seriam ainda utilizados para análises de RT-PCR, para a detecção de transcritos.

A seqüência e as regiões correspondentes aos primers são mostrados na figura 20, indicando que o produto amplificado do PCR contém os principais domínios da transposase.

Figura 20 – Esquema mostrando as regiões em que os primers pRamar1-5 e pRamar1-3 foram desenhados, englobando os principais domínios da transposase.

Utilizado como template DNA de mosca de *Rhynchosciara americana* e os primers pRamar1-5 e pRamar1-3 mostrados na figura 20 foi possível amplificar um fragmento (Figura 21), de aproximadamente 1000pb. Este corresponde ao esperado de acordo com a seqüência apresentada na figura 19 e foi denominado de fRamar1. O produto de PCR foi clonado em pGEM-T easy (Promega) e completamente seqüenciado.

Figura 21 – PCR amplificação utilizando como primers pRamar1-5 e pRamar1-3 e DNA de *Rhynchosciara americana*. PM - 1kb Plus Ladder (Invitrogen) Raia 1 – fRamar1 (~ 1Kb).

O elemento de transposição *Ramar1* representa um elemento *full-length*, a seqüência consenso de nucleotídeos e a tradução predita da transposase são apresentadas na figura 22.

TA-**TTGGGTGTACAACCTTAATTCCTTCCGTTTTT**CACAAGATGGCTCAAGGTGCTATATAAATAGTCGACGGCGATAGCTGATT
TTTGCTGAATCGTGAAATGTCGACATCTGTCAACCAAATATTGTTGACAAGTTTTTGAGTTTTGACAACAAGTTCAATTTT
TGCTGTGTTGAAA ATG TCG AGT TTC GTT GCA AAT AAG CAC CAT TTG CGG GAA GTT TTG ATT TTC

M S S F V A N K H H L **R E V L I F**

TGT TTC CAT TGG AAG AAA AGT GCA GCT GAA GCG CAT CAA ATG CTT GTG GAA GTT TAT GGT
C F H W K K **S A A E** A H Q M L V E V Y G
GAC TCT GCA CCA TCG GAA AGA TTT TGT AGG GAA TGG TTT GGA CGA TTT AAA AGT GGT GAT
D S A P S E R F C R E W F G **R F K S** G D
TTT AGT GTT AAA GAC AAA GAG CGT CCG GGT CAA CCG AAA AAG TTT GAA GAC GAA GAA TTA
F S V K D K E **R P G Q** P K K F E D E E L
GAG ACA TTA CTC GAA CAA GAT TCG TGT CAA ACG CAA ACA GAG CTT GCA AAA TCA TTG GGA
E T L L E Q D S C **Q T Q T E L A K S L G**
GTA ACT CAA CAA GCT ATT TCT AAA CGA CTC AAA GCC GCA GGA TAT ATC CAA AAG CAA GGA
V T Q Q A I S K R L K A A G Y I Q K Q G
AAT TAT GTT CCA TAC GAA TTG AAA GAG AGA GAT GTC GAA CGG CGA TTT TGC ATG TCC GAA
N **Y V P Y E L** K E R D V E R R F C M S E
ATG TTG CTT GAA CGG CAC AAA AGG AAA TCT TTT TTG CAT CGA ATC GTT ACC GGG GAC GAA
M L L E R H K R K S F L H R I V T G **D* E**
AAA TTA ATT CAC TAC GAC AAT CCA AAA CGC AAA AGA TCG TAT GTA AAG CCC GGC CAA CCA
K L I H Y D N P K R K R S Y V K P G Q P
GGA ACA TCA ACA TCG AAG CCG AAT ATC CAC GGT GCC AAA GTA ATG CTC TGC ATT TGG TGG
G **T S T S K P N I H G A K V M L C I W W**
GAT CAA AAG GGT CTG ATC CAC TAT GAG CTG CTA AAA CCT GGT CAA ACG ATC AAT GGA GAC
D Q K G L I H Y E L L K P G Q T I N G D
TTC TAC AGG CAA CAA TGG ATC CGT TTA AAG CAA GCT GTT GCC GAA AAA CGT CCA GAT TAT
F Y R Q Q W I R L K Q A V A E K R P D Y
GCG ACC AGA CAC GAG TCG ATA ATA TTT CAT CAT GAC AAC GCT CGG CCT CAT GCT GCT GTT
A T R H E S I I F H **H D* N A R P** H A A V
CAA GTT AAA AAC TAT TTG AAA AAT AGC GGA TGG GAA ATT CTG GTT CAC CCG CCT TAT AGC
Q V K N Y L K N S G W E I L V **H P P Y S**
CCA GAC CTT GCC CCT TCC GAC TAC CAT TTG TTT CGA TCG ATG CAG AAC GCT TTG AGT GGA
P D L A P S D* Y H L F R S M Q N A L S G
ATA CGC TTT ACT TCA GAG CAG GGT ATC AAA AGT TGG CTG AAT TCA TTC TTG GCT TCA AAA
I R F T S E Q G I K S W L N S F L A S K
GAT GAA AGG TTT TTT CAC GAC GGA ATC CGT AAA TTG CCA GAA AGA TGG GAA AAG GTA GTA
D E R F F H D G I R K L P E R W E K V V
GCT AGC GAT GGA CAG TAT TTT AATTCATTTTATTATTCAATAAATGTGTTTTTCATGCAAAAAACGGAAGG
A S D G Q Y F
AATTAAGTTGTACACCCAA-TA

Figura 22 – Sequência de nucleotídeos e tradução do elemento de transposição *Ramar1* inserido no sítio duplicado do dinucleotídeo TA. A sequência ITR mostrada em negrito, o TATA box e o sinal de poliadenilação sublinhados. Os dois motivos conservados, descritos por Robertson (1993) estão representados por duplo sublinhado. Os ácidos aspárticos (D) do motivo D, D(34)D do domínio catalítico estão representados com asteriscos. Os aminoácidos do sinal de localização nuclear bipartido estão na caixa preta, o motivo HTH pintado de cinza, um motivo putativo de α -hélice no pontilhado e um sinal de fosforilação CKII pintado de preto.

O elemento *Ramar1* possui 1278 pares de bases de comprimento e a ORF é flanqueada pela sequência de repetição terminal invertida imperfeita de 28 bp, apresentando 3 *mismatches*, como já discutido anteriormente. Um ATG no nucleotídeo 173 inicia um quadro de leitura de 1032 pb e que codifica uma transposase putativa com 344 aminoácidos. O sítio de inserção do elemento *mariner*

no genoma de *Rhynchosciara americana* está flanqueado pelos nucleotídeos TA em ambas as extremidades 5' e 3'. O dinucleotídeo TA representaria o sítio de inserção do elemento, que seria então duplicado após a inserção no genoma.

Como esperado para um elemento tipo transposon *mariner*, *Ramar1* possui uma região UTR 5' longa, cerca de 174 bases, e uma região UTR 3' curta, cerca de 63 bases, o comprimento destas regiões UTRs são bem conservadas neste tipo de elemento (Leroy *et al.*, 2003). A análise das seqüências revelou na região 5' UTR dois sítios putativos CAAT, um deles iniciando no nucleotídeo 115 e outro 155. O segundo sítio é canônico, enquanto o primeiro apresenta uma degeneração na quarta base. Um TATA box degenerado também foi identificado, localizando-se no nucleotídeo 53. O sítio de início da tradução, que já foi descrito em alguns elementos *mariner full-length*, está localizado em um *Kozak's box* não canônico (PuXXATGPu), assim também foi observado no elemento *Ramar1* de *Rhynchosciara americana*, onde a última posição do motivo contém um nucleotídeo pirimidina (timidina). Na região 3' UTR foi identificado um sinal de poliadenilação, localizado no nucleotídeo 1225.

Na região amino-terminal está localizado o domínio de ligação do DNA que é um domínio menos conservado em relação ao domínio catalítico. Nesta região encontra-se um motivo putativo de α -hélice e um motivo *helix-turn-helix* (HTH) formando o domínio de ligação do ITR que foi determinado utilizando o programa *helix-turn-helix* do pacote EMBOSS (<http://sbcr.bii.a-star.edu.sg/emboss/>). Um sinal de localização nuclear bipartido (NLS) e um sinal de fosforilação (CK-II), mostrando um possível sítio de modificação pós-traducional (Augé-Gouillou *et al.*, 2001; Pietrokovski & Herikoff, 1997).

A seqüência-assinatura **D,D(34)D**, que é também uma característica dos

elementos *mariner*, define o segundo domínio funcional da transposase, que é o domínio catalítico (141 aminoácidos em *Rhynchosciara americana*). Esse domínio é responsável pela clivagem e junção sítio-específica no processo de transposição (van Luenen *et al*, 1994; Craig, 1995). O sítio ativo desse domínio é definido por 3 motivos de aminoácidos, consistindo de dois resíduos de ácido aspártico (**D**) separados por 94 aminoácidos, seguido por um outro resíduo de ácido aspártico separado por 34 aminoácidos. A tríade catalítica **D,D(34)D** que compõe o sítio ativo serve como um domínio de ligação do cátion divalente necessário para a catálise (Prasad *et al.*, 2003).

O domínio de transposase, contido no domínio catalítico, que inclui a família dos elementos *mariner*, foi identificado na transposase *Ramar1* de *Rhynchosciara americana* estando entre os aminoácidos 161 a 241, apresentando 81 resíduos 100% alinhados (Figura 23).

Figura 23 – Domínio da transposase presente na sequência do elemento *Ramar1*. (a) Representação da posição do domínio na sequência de aminoácidos da transposase. (b) Alinhamento do domínio de transposase assinalando os aminoácidos idênticos em cinza e substituições conservativas em preto.

Observou-se que algumas seqüências (WVPHEL, DEKW, H/QDNAP e HPPYSPDLAPSD) altamente conservadas nos elementos de transposição tipo *mariner* (Prasad *et al.*, 2003) estão também presentes no elemento *Ramar1*, porém alguns aminoácidos aparecem alterados. As seqüências encontradas em

Rhynchosciara americana são: YVPYEL, DEKL, HDNAP e HPPYSPDLAPSD, onde os aminoácidos sublinhados são as modificações encontradas em *Ramar1*. Estas seqüências correspondem às regiões dos resíduos de ácido aspártico, que compõem a tríade catalítica e aos dois motivos conservados (WVPHEL e YSPDLAP), característicos de transposases *mariner*, descritos por Robertson (1993).

O alinhamento com as seqüências de aminoácidos dos elementos *mariner*: *Ramar1* de *Rhynchosciara americana*, *Mos1* de *Drosophila mauritiana* (Genbank accession no. **AAA28678**) e *Desmar1* de *Mayetiola destructor* (Genbank accession no. **AAA66077**) é mostrado na figura 24. Os elementos *Ramar1* e *Mos1* compartilham 58% identidade e 77% substituições conservativas, enquanto que a seqüência de aminoácidos da transposase de *Mayetiola destructor*, *Desmar1*, aparece como o elemento *mariner* mais próximo de *Ramar1*, compartilhando 74% identidade e 86% substituições conservativas.

<i>Ramar1</i>	1	MSSFVAN--K	HHLREVLIFC	FHWKKSAAEA	HQMLVEVYGD	SAPSERFCRE	WFGFRKSGDF	58
<i>Mos1</i>	1	MSSFVPN--K	EQTRTVLIFC	FHLKKTAAES	HRMLVEAFGE	QVPTVKKCER	WFQRFKSGDF	58
<i>Desmar1</i>	1	MENFENWRKR	RHLREVLLGH	FFAKKTAAES	HRLLEVEVYGE	HALAKTQCFE	WFQRFKSGDF	60
<i>Ramar1</i>	59	SVKDKERPGQ	PKKFEDEELE	TLLFQDSCQT	QTELAKSLGV	TQQAISKRLK	AAGYIQKQGN	118
<i>Mos1</i>	59	DVDDKEHGKP	PKRYEDAELQ	ALLDEDDAQT	QKQLAEQLEV	SQQAVSNRLR	EMGKIQKVGR	118
<i>Desmar1</i>	61	DTEDKERPGQ	PKKFEDEELE	ALLDEDCCQT	QTELAKSLGV	TQQAISKRLK	AAGYIQKQGN	120
<i>Ramar1</i>	119	YVPYELKRD	VERRFCMSEM	LLERHKRKSF	LHRIVTGDEK	LIHYDNPKRK	RSYVKPGQPG	178
<i>Mos1</i>	119	WVPHELNERQ	MERRKNTCEI	LLSRVYKRKSF	LHRIVTGDEK	WIFVSPKRK	KSYVDPGQPA	178
<i>Desmar1</i>	121	WVPHELKPRD	VERRFCMSEM	LLQRHKRKSF	LSRIITGDEK	WIHYDNSKRK	KSYVKGGRRA	180
<i>Ramar1</i>	179	TSTSKPNLHG	AKVMLCIWWD	QKGLIHYELL	KPGQTINGDF	YRQQWIRLQK	AAAEKRPDYA	238
<i>Mos1</i>	179	TSTARPNRFG	KKTMLCVWWD	QSGVIYYELL	KRGETVNTAR	YQQQLINLNR	ALQKRPEYQ	238
<i>Desmar1</i>	181	KSTPKSNLHG	AKVMLCIWWD	QRGVIYYELL	EPGQTITGDL	YRTQLIRLQK	ALAEKRPEYA	240
<i>Ramar1</i>	239	TRHESIIFHH	DNARPHAAVQ	VKNYLKNSGW	EILVHPPYSP	DLAPSDYHLF	RSMQNALSGI	298
<i>Mos1</i>	239	KRQHRVIFLH	DNAPSHTARA	VRDTLETNLW	EVLPHAAAYSP	DLAPSDYHLF	ASMGHALAEQ	298
<i>Desmar1</i>	241	KRHGAIVFHH	DNARPHVALP	VKNYLENSGW	EVLPHPPYSP	DLAPSDYHLF	RSMQNDLAGK	300
<i>Ramar1</i>	299	RFTSEQGIKS	WLNSFLASKD	ERFFHDGIRK	LPERWEKVVA	SDGQYF-	344	
<i>Mos1</i>	299	RFDSEYSVKK	WLDEFFAAKD	DEFYWRGIHK	LPERWEKCVV	SDGKYLE	345	
<i>Desmar1</i>	301	RFTSEQGIRK	WLDSFLAAKP	AKFFEKGIHE	LSEWEKVIA	SDGQYFE	347	

Figura 24 – Alinhamento da tradução consenso da seqüência da transposase *Ramar1* com as seqüências dos elementos de *Drosophila mauritiana* *Mos1* e *Mayetiola destructor* *Desmar1*: aminoácidos consensos em cinza e substituições conservativas em preto.

Utilizando o programa ClustalX 1.83 com os parâmetros padrão foi feito um alinhamento, com diferentes seqüências de elementos de transposição tipo *mariner* representantes de diferentes subfamílias que é apresentado na figura 25. As seqüências utilizadas obtidas do GenBank foram: *Desmar1* de *Mayetiola destructor* **AAA66077**; *Mos1* de *Drosophila mauritiana* **AAA28678** ; *Ccmar1* de *Ceratitis capitata* **AAB17945**; *Himar1* de *Haematobia irritans* **U11645**; *Cpmar1* de *Chrysoperla plorabunda* **AAA28265**; *Bmmar1* de *Bombyx mori* **AAB47739**; *Atmar1* de *Ochlerotatus atropalpus* **AAL16723** e *Ramar1* de *Rhynchosciara americana* **DQ784570**. Os elementos das diferentes subfamílias *mariner* apresentam algumas seqüências altamente conservadas (WVPHEL, DEKW, H/QDNAP e HPPYSPDLAPSD) (Prasad *et al*, 2003). Quando comparadas as seqüências de aminoácidos das transposases das diferentes subfamílias com o elemento *mariner* *Ramar1*, observa-se que os elementos da mesma subfamília apresentam os maiores índices de identidade e similaridade, variando entre 58-74% identidade e 77-86% substituições conservativas. Enquanto que os elementos das diferentes subfamílias compartilham de 10-40% identidade e 37-65% substituições conservativas.

<i>R.americana_Ramar1</i>	1	MSSFVAN--K	HHLREVLIFC	FHWKKSAAEA	HOMLVEVYGD	SAPSERFCRE	48
<i>M.destructor_Desmar1</i>	1	MENFENWRKR	RHLREVLLGH	FFAKKTAAES	HRLLVEVYGE	HALAKTQCCE	50
<i>D.mauritiana_Mos1</i>	1	MSSFVPN--K	EQTRTVLIFC	FHLKKTAAES	HRMLVEAFGE	QVPTVKKCER	48
<i>C.capitata_Ccmar1</i>	1	-----M	DNEKDHMLYE	FRKGKTVGAA	TKDTREVYSQ	RAPALRTVKK	41
<i>H.irritans_Himar1</i>	1	-----MEK	K-FRVLIKYC	FLKGKNTVAK	T--LDNEFP-	SAPGKSTIID	39
<i>C.plorabunda_Cpmar1</i>	1	-----MEK	KEFRVLIKYC	FLKGKNTVEA	KTWLDNEFPD	SAPGKSTIID	43
<i>B.mori_Bmmar1</i>	1	-----M	EWGDKENRIA	VIALHKVGME	PNATFKTLHT	LGISKMEVYR	41
<i>O.atropalpus_Atmar1</i>	1	-----ME	AERDRKIVHS	FLEN--PLL	ASKLAKQLKM	PRNTVWRVIK	40
<i>R.americana_Ramar1</i>	49	WFGRFKSGDF	SVKDKERPGQ	PKKFEDEE--	--LETLLQD	SCQTOTELAK	94
<i>M.destructor_Desmar1</i>	51	WFQRFKSGDF	DTEDKERPGQ	PKKFEDEE--	--LEALLDED	CCQTQELAK	96
<i>D.mauritiana_Mos1</i>	49	WFQRFKSGDF	DVDKKEHGKP	PKRYEDAE--	--LQALLDED	DAQTKQLAE	94
<i>C.capitata_Ccmar1</i>	42	WFAKFRSGDF	NLEDPRPSGR	PCELDNDV--	--LRISVANN	SRISTKEVAS	87
<i>H.irritans_Himar1</i>	39	-YAKFKRGEM	STEDGERSGR	PKEVVTDENI	KKIHKMILND	RKMKLTKIAE	88
<i>C.plorabunda_Cpmar1</i>	44	WYAKFKRGEM	STEDGERSGR	PKEVVTDENI	KKIHKMILND	RKMKLTKIAE	93
<i>B.mori_Bmmar1</i>	42	AINRCN-ETS	SVCDKRKSGR	PRSVRTKKVV	KAVRERIRRN	PVRKQKILSR	90
<i>O.atropalpus_Atmar1</i>	41	QYKETLMTAP	KPHSKRRSGT	VDRKLRGK--	--VIKAIKRN	PNLSDRDLAN	86

<i>R.americana_Ramar1</i>	95	SLGVTQQAIS	KRLKAAGYIQ	KQ-GNYVPYE	LKERDVERRF	CMSEMLLERH	143
<i>M.destructor_Desmar1</i>	97	SLGVTQQAIS	KRLKAAGYIQ	KQ-GNWPVPE	LKPRDVERRF	CMSEMLLQRH	145
<i>D.mauritiana_Mos1</i>	95	QLEVSQQAVS	NRLREMKGIO	KV-GRWVPHE	LNERQMERRK	NTCEILLSRY	143
<i>C.capitata_Ccmar1</i>	88	ELNVNKPTAF	RRLLKKVGYTL	KL-DKWVPHQ	LSEKNKVDRM	STAISLLRRV	136
<i>H.irritans_Himar1</i>	89	ALKISK-RVG	HIITQOYLDNR	KLCAKWVPRV	LTFDQKQQRV	DDSERQMOLL	137
<i>C.plorabunda_Cpmar1</i>	94	ALKISKERVG	HIITQOYLDNR	KLCAKWVPRE	LTFDQKQQRV	DDSERCLQLL	143
<i>B.mori_Bmmar1</i>	91	EMKIAPRFMS	RILKDDLGLA	AY-KRRTGHF	LTDNLKENRV	VKSKOLLKRY	139
<i>O.atropalpus_Atmar1</i>	87	KFQAASHSTVR	RIRLREGRRS	FRASKQLNRT	LKQNNVAR--	IRARKLYDQV	134
<i>R.americana_Ramar1</i>	144	KR--KSFLHR	IVTGDEKLIH	YDNPKRKRS-	--YVKPG-QP	GTSTSKPNIH	187
<i>M.destructor_Desmar1</i>	146	KK--KSFLSR	IIITGDEKWIH	YDNSKRKKS-	--YVKRG-GR	AKSTPKSNLH	189
<i>D.mauritiana_Mos1</i>	144	KR--KSFLHR	IVTGDEKWIF	FVSPKRKKS-	--YVDPG-QP	ATSTAPNRF	187
<i>C.capitata_Ccmar1</i>	137	KN--EPFLDR	LLTGDEKWIL	YNNVQRKRT-	--WKQAH-EG	AEPMSKGGLH	180
<i>H.irritans_Himar1</i>	138	TR-TPEFFRR	YVTMDETWLH	HYTPESNRQS	AEWTATG-EP	SPKRGTQKS	185
<i>C.plorabunda_Cpmar1</i>	144	TRNTPEFLRR	YVTMDETWLH	HYTPESKRQS	AEWTATG-EP	SPKRGTQKS	192
<i>B.mori_Bmmar1</i>	140	AK--GGHRK	ILFTDENFFT	TEQHFNKOND	RIYAQSSKEA	SQLVDFVORG	186
<i>O.atropalpus_Atmar1</i>	135	LT--KFDGC	ILMDETYVK	AEFGQIPGQK	IYLATARGDV	SAKFKFVFAD	181
<i>R.americana_Ramar1</i>	188	GAKVMLCIWW	DQKGL-IHYE	LLKPGQTING	DFYRQQWIRL	KQAAEKRPD	236
<i>M.destructor_Desmar1</i>	190	GAKVMLCIWW	DQRGV-LYYE	LLEPGQITIG	DLVRTQLIRL	KQAAEKRPE	238
<i>D.mauritiana_Mos1</i>	188	GKKTMLCVWW	DQSCV-IYYE	LLKRGETVNT	ARYQQQLINL	NRALQRKPE	236
<i>C.capitata_Ccmar1</i>	181	PMMVLLCIWW	DIRGV-IYFE	LLPAGETITA	NKYCQQLVEL	KKATDEKRI	229
<i>H.irritans_Himar1</i>	186	TGKVMASVFW	DAHG--IFID	YLQKGKTINS	DYMMALLERL	KVEIAAKWP-	232
<i>C.plorabunda_Cpmar1</i>	193	AGKVMASVFF	DAHGI-IFID	YLEKGKTINS	DYMMALLERL	KVEIAAKRP-	240
<i>B.mori_Bmmar1</i>	187	HYPTSMVWW	GISYE-GVTE	PYFCEKGIKT	SAQVYQDTIL	EKVVKPLNNT	235
<i>O.atropalpus_Atmar1</i>	182	KFARKNIWQ	GICSCGQKTK	VFLTDKTMIS	EYVKKECLOK	R-----ILPF	226
<i>R.americana_Ramar1</i>	237	YATRHESTIF	HHDNARPHAA	VQVKNYLKNS	GWEILVHPPY	---SPDLAPS	283
<i>M.destructor_Desmar1</i>	239	YAKRHGAVIF	HHDNARPHVA	LPVKNYLENS	GWEVLPHPPY	---SPDLAPS	285
<i>D.mauritiana_Mos1</i>	237	YQKRQHRVIF	LHDNAPSHTA	RAVRDTLETL	NWEVLPHAAAY	---SPDLAPS	283
<i>C.capitata_Ccmar1</i>	230	FANRKG-VLF	HYDNARPHVA	KPTLAKLKEM	NWEIMPHSPY	---SPDLAPS	275
<i>H.irritans_Himar1</i>	232	-HMKKKKVLF	HQDNASCHK	LRTMAKTYEL	GFOLLPHPTY	---SPDLAPS	278
<i>C.plorabunda_Cpmar1</i>	240	-HMKKKKVLF	HQDNAPCHK	LRTMAKTHEL	GFELLPHPPY	---SPDLAPS	286
<i>B.mori_Bmmar1</i>	236	MFNNQE-WSE	QPDAPGHKA	RSTQSWLETN	VSEFIRAEDW	PSSSPDLNPL	284
<i>O.atropalpus_Atmar1</i>	227	IRAHDRPVML	WPDLASCHYS	KTVIEWYATN	GVSVIPKDLN	PPNCPQFRPI	276
<i>R.americana_Ramar1</i>	284	D-YHLFRSMQ	NALSGIRFTS	EQGIKSWLNS	FLASKDERFF	HDGIRKLPER	332
<i>M.destructor_Desmar1</i>	286	D-YHLFRSMQ	NLAGKRFSTS	EQGIRKWLDS	FLAAKPAKEF	EKGIRHELSE	334
<i>D.mauritiana_Mos1</i>	284	D-YHLFASMG	HALAEQRFDS	YESVKKWLDE	WFAAKDDEFY	WRGIHKLPER	332
<i>C.capitata_Ccmar1</i>	276	D-YHLFRSLQ	NNLNGKKFKN	VEDVKSHLDN	FEENEKPRDFY	ESGIRKLVER	324
<i>H.irritans_Himar1</i>	279	D-FFLFSDLK	RMLAGKKIGC	NEEVIAETEA	YFE--PKEYY	QNGIKKLEGR	325
<i>C.plorabunda_Cpmar1</i>	287	D-FFLFSDLK	RMLAGKKFGC	NEEVIAETEA	YFEAKPKEYY	QNGIKKLEGR	335
<i>B.mori_Bmmar1</i>	285	D-YDLWSVLE	STACSKRHDN	LESLKQSVRL	AVKIFPMERV	RASIDNWPQR	333
<i>O.atropalpus_Atmar1</i>	277	EKYWAITKRR	LKAKGKLVKN	MTQMKNWWNQ	IAKTVDEKGV	RRLMCRITGK	326
<i>R.americana_Ramar1</i>	333	WEKVVASDGO	YF--	344			
<i>M.destructor_Desmar1</i>	335	WEKVIASDGO	YFE-	347			
<i>D.mauritiana_Mos1</i>	333	WEKCVASDGO	YLE-	345			
<i>C.capitata_Ccmar1</i>	325	WEWIAEHDGE	YIID	338			
<i>H.irritans_Himar1</i>	326	YNRCITLERN	YLE-	338			
<i>C.plorabunda_Cpmar1</i>	336	YNRCIALEGN	YVE-	348			
<i>B.mori_Bmmar1</i>	334	LKDCIAANGD	HFE-	346			
<i>O.atropalpus_Atmar1</i>	327	VREFLRNSNE	----	336			

Figura 25 - Comparação das seqüências traduzidas de *Ramar1* de *Rhynchosciara americana* com *Desmar1* de *Mayetiola destructor*, *Mos1* de *Drosophila mauritiana*, *Ccmar1* de *Ceratitis capitata*, *Himar1* de *Haematobia irritans*, *Cpmar1* de *Chrysoperla plorabunda*, *Bmmar1* de *Bombyx mori* e *Atmar1* de *Ochlerotatus atropalpus*: aminácidos idênticos em cinza e substituições conservativas em preto.

As transposases compartilham funções e características estruturais que sugerem fortemente que estes elementos derivaram de um ancestral comum.

Ramar1 foi provavelmente herdado horizontalmente, uma vez que elementos

relatados em outros insetos apresentam alta identidade com o elemento de *Rhynchosciara americana* (Jacobson *et al.*, 1986; Russell & Shukle, 1997). A hipótese predita para o evento de transfêrencia horizontal é que os elementos de transposição *mariner* seriam herdados de espécies relacionadas ou próximas, embora também já tenha sido observado elementos *mariner* com relativa similaridade entre espécies mais distantes. Após sua invasão, em cada uma das espécies o elemento pode ter evoluído de maneira independente, o que estaria de acordo com o fato de não ter sido identificado um elemento funcional em *Rhynchosciara americana* não se identificou um elemento funcional, como está presente em *Drosophila mauritiana*. O mecanismo de aumento do número de cópias desse elemento no genoma, assim como a regulação da sua atividade ainda encontram-se pouco esclarecidas. Esse tipo de elemento de transposição *mariner* apresenta diferentes maneiras e velocidades de evolução, dependendo da espécie relacionada, o que torna ainda mais difícil explicar a existência de diversos elementos no mesmo genoma.

4.5.1. Análise Genômica do Elemento *mariner* *Ramar1*

No experimento de Southern Blot foi utilizado como sonda o fragmento amplificado do elemento *Ramar1*, denominado de fRamar1, e DNA de mosca de *Rhynchosciara americana* (Figura 26).

O resultado observado foi um *smear*, entre 12kb e 1kb. Isto sugere que um grande número de cópias deste elemento está presente no genoma de *Rhynchosciara americana*.

Figura 26 – Southern Blot utilizando como sonda o fragmento amplificado *fRamar1*, e DNA de *Rhynchosciara americana*: PM – 1kb Plus Ladder (Invitrogen); 1) 1 μ g DNA sem digerir; 2) 8 μ g DNA digerido *EcoRI* (Invitrogen); 3) 8 μ g DNA digerido *HindIII* (Invitrogen).

Os níveis de expressão de *Ramar1* foram avaliados durante o período larval, por experimentos de Northern Blot (Figura 27) utilizando RNA de glândula salivar de larvas em três períodos do quarto estágio de desenvolvimento de *Rhynchosciara americana*. Lembrando que o quarto estágio coincide com a construção de um elaborado casulo comunal quando ocorre a amplificação de DNA, os pufes de DNA. Foram utilizados os seguintes períodos do quarto estágio: o terceiro período larval que corresponde ao início da construção do casulo, denominado início de rede (IR – raia 1), o quarto período que corresponde ao desenvolvimento do pufe B2 (B2– raia 2) e o quinto período que coincide com o desenvolvimento dos pufe C3 e C8 (C3 – raia 3), e como sonda foi utilizado o fragmento amplificado *fRamar1*.

Figura 27 – Northern Blot utilizando como sonda o fragmento amplificado fRamar1 e RNAs de diferentes estágios do desenvolvimento larval de *Rhynchosciara americana*: 1) IR (6μg); 2) Pufe B2 (6μg); 3) Pufe C3 (6μg); 4) RNA *E.coli*.

O resultado observado foi uma banda em torno de 1500 bases e aparentemente de mesma intensidade correspondendo a uma expressão constante durante o desenvolvimento larval. O elemento de transposição *Ramar1* é um elemento inativo, pois não foi possível identificar uma ORF sem interrupção e códons de terminação também foram identificados no interior do elemento. No entanto, este elemento continuaria sendo transcrito, mesmo defeutivo.

O experimento de RT-PCR foi realizado utilizando como controle interno positivo a actina e RNAs dos mesmo estágios do desenvolvimento que para o Northern (IR-início de rede; pufe B2 expresso e pufe C3 presente) tratados inicialmente com DNAase.

Figura 28 – RT-PCR utilizando os primers pRamar1-3 e pRamar1-5 e RNAs de diferentes estágios do desenvolvimento larval de *Rhynchosciara americana*: PM – 1kb Plus Ladder (Invitrogen); 1) RNA IR; 2) RNA pufe B2; 3) RNA pufe C3.

O resultado mostrado na figura 28 foi um fragmento amplificado em torno de 1000 pares de bases, que confirma que este elemento está sendo transcrito na célula mesmo sendo defeutivo. Esses resultados estão de acordo com o obtido no seqüenciamento da biblioteca de cDNA de glândula salivar de *Rhynchosciara americana* em início de rede, que detectou a presença de transcritos com transposases incompletas ou defeitivas sendo expressas na larva (Siviero *et al.*, 2006).

A localização cromossômica foi determinada por hibridização *in situ* utilizando os cromossomos politênicos da glândula salivar de *Rhynchosciara americana* e como sonda o elemento de transposição *Ramar1*.

A figura 29 mostra a localização do elemento *mariner Ramar1* de *Rhynchosciara americana* em algumas bandas dos cromossomos, principalmente próximo da região heterocromática dos cromossomos. A região com maior frequência de positividade foi determinada como sendo: no cromossomo A, regiões 9, 10, 12 e 13; no cromossomo B, regiões 13 e 15; no cromossomo C, região 10 e no cromossomo X, regiões 11 e 12. A localização na heterocromatina do elemento de transposição *mariner Ramar1* de *Rhynchosciara americana* é similar ao observado em outros sistemas. Em *Mayetiola destructor* (Russell & Shukle, 1997) e *Drosophila erecta* (Lohe *et al.*, 1995) a localização dos elementos *mariner*, foi predominante, mas não exclusivamente, nas regiões pericentroméricas, incluindo aproximadamente quinze sítios discretos de hibridização na eucromatina em *D. erecta*. Enquanto que em *Mamestra brassicae* o elemento *mariner* (Mandrioli, 2003) foi detectado somente nas regiões heterocromáticas.

De acordo com o modelo de transposição proposto (Torti *et al.*, 2000) a distribuição diferencial e abundante dos elementos *mariner* pode ser interpretada como reflexo de diferentes etapas na história evolutiva destes elementos. O processo começaria com a invasão do genoma pelo elemento de transposição, sua rápida multiplicação por transposições replicativas e finalmente terminaria com a inativação vertical (Lohe *et al.*, 1995) e seu acúmulo na heterocromatina. O acúmulo dos elementos na heterocromatina é o resultado da seleção negativa contra os rearranjos deletérios causados por recombinação entre cópias dos elementos na eucromatina. Com base nesta hipótese, elementos ativos, ou recém adquiridos, são localizados preferencialmente na eucromatina enquanto que elementos antigos ou inativos na heterocromatina (Torti *et al.*, 2000). É o que foi observado em *R.americana*, onde o elemento *full-length Ramar1* encontra-se inativo e apresenta localização preferencial em regiões pericentroméricas que podem estar sofrendo efeito da heterocromatinização.

Figura 29 – Imagens obtidas ao microscópio confocal de varredura a laser da hibridização *in situ* do elemento *mariner1*, nos cromossomos politênicos da glândula salivar de *Rhynchosciara americana*. Os cromossomos (A, B, C e X) estão identificados, as regiões da heterocromatina estão indicadas pelas setas brancas e as regiões positivas indicadas pelas linhas verdes. A) e B) mostram as várias marcações próximas das regiões heterocromáticas.

4.6. Caracterização Molecular do Elemento de Transposição *mariner* *Ramar2*

O segundo elemento distinto, denominado *Ramar2* (Genbank *accession number*: DQ784571), foi caracterizado a partir dos ESTs de *Rhynchosciara americana*, que apresentavam homologia com transposase.

O transposon *Ramar2* é um elemento de transposição defeutivo com respeito a sua própria transposição, pois exibe uma deleção na ORF necessária para sua transposição. No último Release da *Drosophila melanogaster* realizado pelo Berkeley Drosophila Genome Project foi observado que dois terços dos elementos de transposição são parciais, e quando se considera as diferentes famílias, 55% dos elementos tipo ITR são parciais. Apresentam um padrão de mutação bem característico, onde deleções nas regiões internas são predominantes, deixando as seqüências de repetição terminais invertidas intactas, o que foi observado em *Ramar2* (Kaminker *et al.*, 2002).

A figura 30 corresponde à seqüência proposta para a transposase putativa *Ramar2*. O elemento de transposição *Ramar2* apresenta 901 pb de comprimento, a seqüência de repetição terminal invertida (ITR) possui 28 pb, flanqueadas pelos nucleotídeos TA.

TA-**GGTGACAAATAAGTGTCTTCCGTTTTATTGTAGATAACGCGGCACTATGTTTCGGTTAGCT**
TTCGCAGATGATAACCGGCTTAAAAAATAGATTGGACATTCAAGAACAACAAAACCTTATTAATA
TCACTGATTTTATATTGGTAAAAATATAATTTTATAAGTTGAA **ATG** TCA AAA TTT TAG
CCA AGT AAG CGT CAT TTG CGG GAA ATA TTA GTT TAC TTC TTT AAA TAT
AAA GAA ATC TGC TGC TGA GGC GCA ACA ATT GCT CGT AAA AGC ATA TGG
TGA GGG TGC TTT GAG TGG TTT CAA AAA TTT ATA AGC GGT GAT TTC GAC
GTA GAA GAC AAA GAT CGC AGT GGA AGG CCA AAA ATT TAC GAG GAT GCA
XX
Região de deleção ~ 408 bases ou 136 aa
GCC CTC TAT CAA ACA CAA TTG ATG AGA TTG AGC CGT GCT CTG AAG GAA
AAA CGC CCT TAA TAC TAT TCT AGA CAC GAA AAA ATT ATT TTT CTG CAT
GAC AAT GCT CGT CCA CAT GTT GCG GCT CCC GTG AAA AAG TAC TTG GAA
ACA CTT GAT TGG GAA GTG TTA CGC CAC CCG CTG TAT TCA TCC GAC ATT
GCA CCG TCC GAT TAT CAC CTG TTC CGG TCC ATG GCA CAT GCT CTG ACG
GCG CAG CGG TTC ATA TTT TAT GAG GAT ACC AAA CAT TGG ATT GAT TCG
TGG ATA GCC TCA AAA GAC AAG GAG TTC TTC AGA CGT GGG ATT CAA ATG
CTG CCT GAG AGA TGG GAA AAG TGG TTG CAA GTG ATG GGC AAT ATT TTA
AAT AAA TTT ATATTACCGTTCTTCTATAATAAATATTTAATTTGTCTTAA**AAACCGGAAGAA**
ACTTATTTGTACACC-TA

Figura 30 - Sequência proposta para a transposase putativa *Ramar2*, em negrito a sequência ITR (repetições terminais invertidas). A sequência correspondente aos primers pRamar2-5 e pRamar2-3 em negrito sublinhado.

A partir da sequência proposta na figura 30 para a transposase putativa *Ramar2* desenhou-se primers para amplificar a porção central da sequência (pRamar2: 5'- **TTCGGTTAGCTTTCGCAGAT** -3' and 5'- **CTTTTCCCATCTCTCAGGCAG** -3'), assim como foi feito para o elemento *mariner* *Ramar1*. Dessa forma, poderíamos concluir se algum elemento deste tipo estaria completo (*full-length*) ou se todos apresentariam a deleção no interior da ORF. Da mesma maneira o fragmento amplificado poderia ser usado como sonda em experimentos de Southern e Northern Blot, ou ainda para ser utilizado para análises de RT-PCR, permitindo a detecção de transcritos.

A sequência e as regiões correspondentes dos primers são mostrados na figura 31, indicando que o produto amplificado do PCR poderia mostrar a presença de um elemento inteiro, caso existisse ou somente aqueles defectivos.

Figura 31 – Esquema mostrando as regiões em que os primers pRamar2-5 e pRamar2-3 foram desenhados, permitindo a amplificação de um elemento sem deleção, se existir.

Foi utilizado como template DNA de mosca de *Rhynchosciara americana* e os primers pRamar2-5 e pRamar2-3. O fragmento amplificado (Figura 32 - raia 2), aproximadamente 800pb, está de acordo com a sequência apresentada na figura 30, e nos certifica que este elemento *Ramar2* se apresenta defectivo no genoma da *Rhynchosciara americana*, ou seja, com uma deleção no interior da ORF. O produto de PCR foi clonado e seqüenciado por completo.

Figura 32 - PCR amplificação utilizando como primers pRamar2-5 e pRamar2-3 e DNA de *Rhynchosciara americana*: PM - 1kb Plus Ladder (Invitrogen); 1) fRamar1 (~ 1Kb); 2) fRamar2 (~ 800 bases).

O elemento de transposição *Ramar2* corresponde a um elemento defectivo com uma deleção no interior da ORF. No entanto, o elemento *Ramar2* apresenta 901 pares de base de comprimento, a sequência de repetição terminal invertida imperfeita (ITR) possui 28 pb, apresentando um *mismatch*, e está flanqueada pelos nucleotídeos TA (Figura 33).

TA-**TTAGGTGTACAAATAAGTTTCTTCCGTT**TTTATTGTAGATAACGCGGCACTATGTTTCGGTTAGCTTTTCGAGATGATA
ACCGGCTTAAAAAATAGATTGGACATTCAAGAACAACAAACTTATTAATATCACTGATTTTATATTGGTAAAA**TATAAT**
TTTATAAGTTGAAA **ATG** TCA AAA TTT GAG CCA AGT AAG CGT CAT TTG CGG GAA ATA TTA GTT
M S K F E P S K R H L R E I L V
TAC TTC TTT AAT ATA AAG AAA TCT GCT GCT GAG GCG CAA CAA TTG CTC GTA GAA GCA TAT
Y F F N I K K S A A E A Q Q L L V E A Y
GGT GAG GGT GCT TTG AGT GAG AGA ACG TAT CGA GAG TGG TTT CAA AAA TTT AAA AAC GGT
G E G A L S E R T Y R E W F Q K F K N G
GAT TTC GAC GTA GAA GAC AAA GAT CGC AGT GGA AGG CCA AAA ATT TAC GAG GAT GCA GAA
D F D V E D K D R S G R P K I Y E D A E
TTG GAG GAA TTA TTG GAG GAA XXX
L E E L L E E **Deleção de cerca de 408 nucleotídeos ou 136 aminoácidos**
ACC ATT ACT GGA GCC CTC TAT CAA ACA CAA TTG ATG AGA TTG AGC CGT GCT CTG AAG GAA
T I T G A L Y Q T Q L M R L S R A L K E
AAA CGC CCT CAA TAC TAT TCT AGA CAC GAA AAA ATT ATT TTT CTG CAT GAC AAT GCT CGT
K R P Q Y Y S R H E K I I F L H D N A R
CCA CAT GTT GCG GCT CCC GTG AAA AAG TAC TTG GAA ACA CTT GAT TGG GAA GTG TTA CGC
P H V A A P V K Y L E T L D W E V L R
CAC CCG CTG TAT TCA TCC GAC ATT GCA CCG TCC GAT TAT CAC CTG TTC CGG TCC ATG GCA
H P L Y S S D I A P S **D** Y H L F R S M A
CAT GCT CTG ACG GCG CAG CGG TTC ATA TTT TAT GAG GAT ACC AAA CAT TGG GTT GAT TCG
H A L T A Q R F I F Y E D T K H W V D S
TGG ATA GCC TCA AAA GAC AAG GAG TTC TTC AGA CGT GGG ATT CAA ATG CTG CCT GAG AGA
W I A A S K D K E F F R R G I Q M L P E R
TGG GAA AAA GTG GTT GCA AGT GAT GGG CAA TAT TTT AAA TAA ATTTATATTACCGTTCTCTATA**A**
W E K V V A S D G Q Y F K *
ATAAATATTTAATTTGTCTTAAAAACGGAAGAACTTATTTGTACACCTAA-TA

Figura 33 – Seqüência de nucleotídeos e tradução do elemento de transposição defeutivo *Ramar2* inserido no sítio duplicado do diclucleotídeo TA. A seqüência ITR em negrito e os sítios TATA box e o sinal de poliadenilação sublinhado.

Um ATG no nucleotídeo 175 inicia um quadro de leitura com 83 aminoácidos ou 249 nucleotídeos que é interrompido por uma deleção de cerca de 408 nucleotídeos ou 136 aminoácidos, e termina com TAA (códon de terminação *ochre*) na posição 823. A análise da seqüência revelou na região 5'UTR um TATA box (**ATATAA**) no nucleotídeo 155 e um sinal de poliadenilação (**AATAAA**) na região 3' UTR no nucleotídeo 848.

A seqüência-assinatura **D,D(34)D**, característica dos elementos *mariner*, aparece defectiva no elemento *Ramar2*, apenas os últimos dois resíduos de ácido aspártico aparecem na seqüência proposta. Assim como o domínio da transposase, que aparece apenas a região final, resultando em 35,8% dos 81 resíduos que compõe este domínio alinhados (Figura 34).

(a)

(b)

Ramar2: 84 TITGALYQTLMLRLSRALKEKRPQYYSRH 112
Traspo: 53 TINAELYCQLDRLKEALAEKRPELANRK 81

Figura 34 – Domínio da transposase presente na sequência do elemento *Ramar2*. (a) Representação da posição do fragmento do domínio na sequência de aminoácidos da transposase. (b) Alinhamento do fragmento do domínio de transposase: aminoácidos idênticos em cinza e substituições conservativas em preto.

Um alinhamento entre os elementos de transposição *Ramar2* de *Rhynchosciara americana*, *Mos1* de *Drosophila mauritiana* e *Desmar1* de *Mayetiola destructor* foi feito a partir das seqüências de aminoácidos, algumas regiões altamente conservadas ainda é possível identificar neste elemento defectivo, como os motivos HDNAP e HPPYSPDLAPSD (Figura 35).

<i>Ramar2</i>	1	MSKFEP--K	RHLREILVYF	FNIKKSAAEA	QQLLVEAYGE	GALSERTYRE	WFOKFKNGDF	DVEDKDRSGR	68
<i>Mos1</i>	1	MSSFVPM--K	EQTRTVLIFC	FHLKKTAAES	HRMLVEAFGE	QVPTVKKCER	WFQRFKSGDF	DVDKKEHGKP	68
<i>Desmar1</i>	1	MENFENWRKR	RHLREVLLGH	FFAKKTAAES	HRLLVEVYGE	HALAKTQCFE	WFQRFKSGDF	DTEDKERPGQ	70
<i>Ramar2</i>	69	PKIYEDAELE	ELLLE-----	-----	-----	-----	-----	-----	83
<i>Mos1</i>	69	PKRYEDAELQ	ALLDEDDAQT	QKQLAEQLEV	SQQAIVSNRLR	EMGKITQKVGR	WVPHELNERQ	MERRKNTCEI	138
<i>Desmar1</i>	71	PKKFEDEELE	ALLDEDCCT	QEELAKSLGV	TQQAISKRLK	AAGYIQKQGN	WVPHELKPRD	VERRFCMSEM	140
<i>Ramar2</i>	83	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	83
<i>Mos1</i>	139	LLSRYKKRKSF	LHRIIVTGDEK	WIFFVSPKRR	KSYVDPGQPA	TSTARPNRFG	KKTMLCVWWD	QSGVIYYELL	208
<i>Desmar1</i>	141	LLQRHKKKSF	LSRIITGDEK	WIHYDNSKRR	KSYVKRGGRA	KSTPKSNLHG	AKVMLCIWWD	QRGVLYYELL	210
<i>Ramar2</i>	83	---TITGAL	YQTQLMRLSR	ALKEKRPQYY	SRHEKLIIFLH	DNARPHVAAP	VKKYLETLDW	EVLRHPLYSS	149
<i>Mos1</i>	209	KRGETVNTAR	YQQQLINLNR	ALQRKRPEYQ	KRQHRVIFLH	DNAPSHTARA	VRDTLETINW	EVLPHAAAYSP	278
<i>Desmar1</i>	211	EPGQTITGDL	VRTQLIRLKO	ALAEKRPEYA	KRHGAVIFHH	DNARPHVALP	VKNYLENSGW	EVLPHPPYSP	280
<i>Ramar2</i>	150	DLAPSDYHLF	RSMHALTAQ	RFIFYEDTKH	WVDSWIASKD	KEFFRRGIQM	LPERWEKVVA	SDGQYFK	216
<i>Mos1</i>	279	DLAPSDYHLF	ASMGHALAEQ	RFDSYESVKK	WLDEWFAAKD	DEFYWRGIHK	LPERWEKCVA	SDGKYLE	345
<i>Desmar1</i>	281	DLAPSDYHLF	RSMQNDLAGK	RFTSBOGIRK	WLDSEFAAKP	AKFFEKGIHE	LSERWEKVIA	SDGQYFE	347

Figura 35 – Alinhamento da tradução consenso da sequência defectiva da transposase *Ramar2* com seqüências traduzidas dos elementos *Mos1* de *Drosophila mauritiana* e *Desmar1* de *Mayetiola destructor*. aminoácidos idênticos em cinza e substituições conservativas em preto; aminoácidos sublinhados representam os motivos conservados.

Uma comparação direta entre as seqüências de aminoácidos dos elementos identificados no genoma de *Rhynchosciara americana* *Ramar1* e *Ramar2* é mostrado na figura 36: estes elementos compartilham 61% identidade e 80% substituições conservativas.

<i>Ramar1</i>	1	MSSFVANKHHLREVLIFCFHWKKSAAEAHQMLVEVYGD	SAPSERFCREWFGRFKSGDFS	SVKDKERPGQPK	70
<i>Ramar2</i>	1	MSKFEPSSKRHLREILVYFFNIKKSAAEAQQLLVEAYGEGAL	SERTYREWFQKFKN	GDFDVEDKDRSGRPK	70
<i>Ramar1</i>	71	KFEDEELETLLLEQDSCQTQTELA	KS LGVTQQAISKRLKAAGYIQKQGNYPYELKERD	VERRFCMSEMLL	140
<i>Ramar2</i>	71	IYEDAELEELLE	-----	-----	83
<i>Ramar1</i>	141	ERHKRKSFLHRIVTGDEKLIHYDNP	KRKRSYVKGPGTSTSKPNIHGAKVMLCI	WWDQKGLIHYELLKP	210
<i>Ramar2</i>	83	-----	-----	-----	83
<i>Ramar1</i>	211	GQTINGDFYRQQWIRLKQAVAEKRPDYATR	HESIIFHHDNARPHAAPVKNYLKNSWEILVHPPYSPDL		280
<i>Ramar2</i>	83	--TITGALYQTQLMRLSRALKEKRPQYYSRHE	IIFLHDNARPHVAAPVKKYLETLDWEVLRHPLYSSDI		150
<i>Ramar1</i>	281	APSDYHLFRSMQNALS	GIRFTSEQGIKSWLNSFLASKDERFFHDGIRKLPERWEKVVASDGQYF-	344	
<i>Ramar2</i>	151	APSDYHLFRSMAHALTAQRFIFYEDTKHWVDSW	LASKDKEFFRRGIQMLPERWEKVVASDGQYFK	216	

Figura 36 – Alinhamento das seqüências consenso em aminoácidos dos elementos *Ramar1* e *Ramar2* de *Rhynchosciara americana*: aminoácidos idênticos em cinza e substituições conservativas em preto.

4.6.1. Análise Genômica do Elemento *mariner* *Ramar2*

O experimento de Southern Blot foi feito utilizando como sonda o fragmento amplificado, denominado de fRamar2, e DNA de mosca de *Rhynchosciara americana* sem digerir e digeridos com EcoRI e Hind III (Promega/Invitrogen) (Figura 37).

O resultado observado, assim como para o Southern genômico de *Ramar1*, foi um *smear*, dando evidências de que um grande número de seqüências deste elemento *mariner* está presente no genoma de *Rhynchosciara americana*.

Figura 37 - Southern Blot utilizando como sonda o fragmento amplificado fRamar2, e DNA de *Rhynchosciara americana*: PM – 1Kb Plus Ladder (Invitrogen); 1) 1 μ g DNA sem digerir; 2) 8 μ g DNA digerido EcoRI (Promega); 3) 8 μ g DNA digerido HindIII (Invitrogen).

Experimentos de Northern Blot foram realizados para verificar se havia expressão de *Ramar2* durante o período larval. Utilizou-se três estágios do desenvolvimento da *Rhynchosciara americana*: início de rede (IR – raia 1), pufe B2 – raia 2 e pufe C3 – raia 3, e como sonda foi utilizado o fragmento amplificado *fRamar2*. (Figura 38).

Figura 38 – Northern Blot utilizando como sonda o fragmento amplificado fRamar2 e RNAs de diferentes estágios do desenvolvimento larval de *Rhynchosciara americana*: 1) IR (6 μ g); 2) Pufe B2 (6 μ g); 3) Pufe C3 (6 μ g); 4) RNA *E.coli*.

O resultado observado foi uma marcação na região correspondente a cerca de 1500 bases, o que revelaria a expressão do elemento *Ramar2* durante o desenvolvimento larval. No entanto, o tamanho da banda observada não corresponde ao elemento *Ramar2*, que por ser defeutivo, ou seja, por apresentar uma deleção no interior da ORF, possui um tamanho de aproximadamente 900 bases, esta marcação poderia estar relacionada então a outros elementos de transposição, uma vez que existe uma alta homologia entre os elementos da família *mariner*.

Uma vez que a marcação por Northern Blot não nos relevou claramente se o elemento *Ramar2* estaria sendo transcrito ao longo do desenvolvimento, optou-se por realizar um RT-PCR (Figura 39).

O experimento de RT-PCR foi realizado utilizando como controle interno positivo a actina e RNAs dos mesmo estágios do desenvolvimento que para o Northern (IR-início de rede; pufe B2 expresso e pufe C3 presente) tratados inicialmente com DNAase.

Figura 39 – RT-PCR utilizando os primers *Ramar2*-3 e *Ramar2*-5 e RNAs de diferentes estágios do desenvolvimento larval de *Rhynchosciara americana*: PM – 1kb Plus Ladder (Invitrogen); 1) RNA IR; 2) RNA pufe B2; 3) RNA pufe C3.

O resultado observado foi uma banda em torno de 800 bases, estando de acordo com o previsto (ver Figura 32). Aparentemente os níveis de expressão se

mantêm constante durante o desenvolvimento larval e constatou-se que, apesar deste elemento apresentar uma deleção na ORF que o torna potencialmente inativo, ainda está sendo transcrito no genoma de *Rhynchosciara americana*.

A localização cromossômica do elemento *mariner* *Ramar2* foi determinada por hibridização *in situ* utilizando os cromossomos politênicos da glândula salivar de *Rhynchosciara americana*, como sonda foi utilizado o elemento de transposição defectivo *Ramar2*.

A figura 40 mostra a localização do elemento *Ramar2*, uma única banda foi observada na região 12 do cromossomo A, em contraste com as várias bandas cromossômicas marcadas, preferencialmente nas regiões heterocromáticas, para o elemento *Ramar1*.

O transposon *Ramar2* foi provavelmente herdado via transferência horizontal como um elemento não funcional, desta forma não poderia aumentar o número de cópias após a invasão, permanecendo como um elemento inativo. Outra possível explicação para o elemento *Ramar2* ter permanecido com baixo número de cópias, seria sua imediata mutação levando a uma deleção na região interna, tão logo este elemento tenha invadido o genoma de *Rhynchosciara americana*.

Figura 40 – Imagens obtidas ao microscópio confocal de varredura a laser da hibridização *in situ* do elemento *mariner* *Ramar2*, nos cromossomos politênicos da glândula salivar de *Rhynchosciara americana*. Os cromossomos (A, B, C e X) estão identificados, as regiões da heterocromatina estão indicadas pelas setas brancas e as regiões positivas indicadas pelas linhas verdes.

4.7. Caracterização Molecular e Genômica do Elemento de Transposição *mariner* *Ramar3*

O terceiro elemento de transposição caracterizado em *Rhynchosciara americana*, foi denominado *Ramar3* e foi resultado da análise dos ESTs gerados.

O elemento de transposição *mariner* *Ramar3*, que apresenta homologia com a transposase de *Chymomyza amoena*, apresenta uma deleção na porção amino-terminal da proteína. A porção carboxi-terminal da transposase encontra-se intacta, onde é possível identificar o domínio de transposição, com a tríade catalítica **D,D(34)D**. Os motivos conservados dos elementos de transposição *mariner* também são possíveis identificar (DEKW, HDNAP e HPPYSPDLAPSD), assim como um sinal putativo de localização nuclear (**SRKR**). Este tipo de NLS (*Nuclear Localization Signal*) é também encontrado na transposase *Himar1*, mas não na transposase *Mos1* (Lampe *et al.*, 1999), que apresenta um sinal de localização nuclear bipartido (Figura 41).

Figura 41 – Esquema da ORF defeitiva proposta para o elemento de transposição *mariner* *Ramar3* de *Rhynchosciara americana*.

A figura 42 apresenta a sequência em aminoácidos proposta para *Ramar3* de *Rhynchosciara americana* e sua comparação com o elemento *mariner* de *Camar1* de *Chymomyza amoena*. Pode-se observar na figura 42 os domínios e motivos conservados nos elementos *mariner* e seu alto grau de similaridade com o elemento *Camar1* de *Chymomyza amoena*, que apresentou cerca de 52% identidade e 72%

substituições conservativas. A região carboxi-terminal, onde está contido o domínio da transposase, encontra-se mais conservada que a região amino-terminal.

<i>Ramar3</i>	1	-----HLREIFLVSIGKKKCXLEAH-NACWKFIGDSAPSDRFCRGWFGRFISGDFSGED
<i>Camar1</i>	1	MESTKEHFRHILYYYFRKGKN-AEQVAKKLRDVYGDKALKERQCQNWFRKFRSGDFSLKD
<i>Consensus</i>		*:*:*:* : * * * : : : *:*:* ::* *:*:* :* ***** :*
<i>Ramar3</i>	55	EKRMAQPKNLKT-KNRHYSNKIRVKKQSLQNHWE LNKLFLNDSKPQDGCILHGN-YVPY
<i>Camar1</i>	60	EPRSGRPNEVDDDQIKALIELDRHVTEREIGEKLNI PKSTVHYHIKSLGLVKKLDI WVPH
<i>Consensus</i>		* * :*:*:* : : : * : : : : * : : : * : : : :*:*:
<i>Ramar3</i>	113	ELKARDSR-RMNVCDQFIKCEENDPFLKRMITCDEKWI VFNNVSRKRSWSRRDEAPERQA
<i>Camar1</i>	120	ELKEIHLTNRINACDMHLKRNEFD PFLKRIITGDEKWI VYNNVNRKRSWSKHGEPAQTTS
<i>Consensus</i>		*** : *:*:*:* ::* :* *****:* * *****:*:*:*:*:*:*:*:*:* : *
<i>Ramar3</i>	172	KADIHQKKVMLSIIWWDWKEPVFYELLPKNKT TNSDFYCEQLQKLSDAIAQKRPVLINRKG
<i>Camar1</i>	180	KADIHQKKVMLSIVWWDWKG VVYFELLPRNQTINSDVYCQQLDKLNAAINEKRPELINRKG
<i>Consensus</i>		*****:*:*:* * :*:*:*:*:* * * * :*:*:*:*:*:* : * * :*:* *****
<i>Ramar3</i>	232	VMFHHDNARPHTSLITRQKLKNSGWEVLP HPPYSPDFAPSD FHLFRFMQNSLNGKMF TSE
<i>Camar1</i>	240	VIFHQDNARPHTSLMTRQKLREL GWEVLMHPPYSPDLAPSDYHLFRSLQNSLNGKTFGND
<i>Consensus</i>		*:*:*:*:*:*:*:*:*:* : * * * * * * * * * * :*:*:*:* * :***** *
<i>Ramar3</i>	292	NLIKQDLDKFLAEKDRKSYKRGIMNLPDRWQKVIEQSGQYIFD
<i>Camar1</i>	300	EAIKSHLVQFFADKGQKFYERGIQNLPGRWQKVIEQNGNYIFD
<i>Consensus</i>		: * * . * :*:*:*:* :* * :*:* * * . * * * * * . * :*:*:*

Figura 42 - Comparação da tradução da ORF putativa da transposase *mariner* de *Rhynchosciara americana*, *Ramar3*, com *Camar1* de *Chymomyza amoena*; aminoácidos consensos marcados com * e : para substituições conservativas. Aminoácidos em vermelho representam os motivos conservados descrito por Robertson (1993) e a tríade catalítica D,D(34)D. O domínio da transposase em azul e sublinhado o sinal de localização nuclear.

Para realização do experimento de Southern Blot foi utilizado o clone *Ramar3* de *R.americana* como sonda e DNA de mosca de *Rhynchosciara americana* sem digerir e digeridos com EcoRI e Hind III (Promega/Invitrogen) (Figura 43).

Figura 43 - Southern Blot utilizando como sonda o elemento *mariner* *Ramar3*, e DNA de *Rhynchosciara americana*: PM – 1Kb Plus Ladder (Invitrogen); 1) 1 μ g DNA sem digerir; 2) 8 μ g DNA digerido EcoRI (Promega); 3) 8 μ g DNA digerido HindIII (Invitrogen).

O resultado foi um *smear*, entre 12kb e 1kb. Exatamente o que foi observado para os elementos *Ramar1* e *Ramar2*. Sugerindo que um grande número de cópias deste elemento está presente no genoma de *Rhynchosciara americana*.

Apesar de abundante, o elemento de transposição *Ramar3* de *Rhynchosciara americana* também se trata de um elemento não funcional presente no genoma, o elemento isolado apresenta uma deleção na extremidade 5' e códons de terminação no interior da ORF na porção carboxi-terminal, o que leva a tradução de uma proteína inativa.

4.8. Caracterização Molecular do Elemento de Transposição *Ramar4*

O quarto elemento de transposição caracterizado em *Rhynchosciara americana* foi denominado *Ramar4*, e foi também resultado das análises das seqüências de ESTs geradas de *Rhynchosciara americana*. Esta seqüência apresenta homologia com o elemento *mariner* *Cbmar1* de *Chrysoperla plorabunda*. E trata-se de um elemento inativo, uma vez que apenas encontrou-se fragmentos

deste elemento no banco de ESTs, com códons de terminação no interior da ORF, mudança no quadro de leitura e não foi possível prever uma ORF completa para este elemento (Figura 44).

Figura 44 – Esquema da ORF defectiva proposta para o elemento de transposição *mariner Ramar4* de *Rhynchosciara americana*.

A figura 45 apresenta a sequência em aminoácido do elemento *mariner Ramar4* e de *Cbmar1* que apresentam cerca de 37% identidade e 56% substituições conservativas, mesmo a ORF não estando completa.

<i>Ramar4</i>	1	--RKQWRAVLRLFLFLEGKSRREIKEWGDAENTNSCPGGATLFDNWFSKFERGCTSI	FDNP
<i>Cbmar1</i>	1	MEKKEFRVLIKYCFLKGKNTVEAKTWLDNEFPDSAPGKSTIID-WYAKFKRGEMSTEDGE	
<i>Consensus</i>		:*::*:::: **::*: * * * * * :*:** :*:~* *::*:~* * *	
<i>Ramar4</i>	59	RTGAPKMLITEDNVRKIHDVLDDRRLKVLEIAKTAKISKDRVSHILHKILEIKKLSAQ	W
<i>Cbmar1</i>	60	RSGRPKEVVTDENIKKIHKMILNDRKMKLIEIAEALKISKERVGHI IHQYLMRKLCAK	W
<i>Consensus</i>		*:* * * :*:~*:~*:~*:~*:~*:~*:~*:~*:~*:~*:~*:~*:~*:~*:~*	
<i>Ramar4</i>	119	VKRSLFLDNKRNRF	TTLERCLQLFKRNP
<i>Cbmar1</i>	120	VPRELTFDQKQQRVDDSERCLQLLTRNTPEFLRRYVTMD	ETWLHHYTPESKRQSAEWTAT
<i>Consensus</i>		* * * :*:~*:~*:~*:~*:~*:~*:~*:~*:~*:~*:~*:~*:~*:~*:~*	
<i>Ramar4</i>	171	-----	SSKR
<i>Cbmar1</i>	180	GEPSPKRGKTQKSAGKVMASVFWDAGHII	FDYLEKGKTINSDYMALLERLKVEIAAKR
<i>Consensus</i>			:~*~*
<i>Ramar4</i>	176	SQFSNKRVL	FHHNMVPAQRHAVDTAKLIELTYELLPHPPYSPDLGGATF--FLFLNMKK-
<i>Cbmar1</i>	240	PHMKKKKVL	FHQDNAPCHKSLRTMAKIHGFEFLPHPPYSPDLAPSDF--FLFSDLKRM
<i>Consensus</i>		:~*:~*:~*:~*:~*:~*:~*:~*:~*:~*:~*:~*:~*:~*:~*	
<i>Ramar4</i>	233	LAGQKFGSNEESIAATEAYFADIEETYFSGGLK	KKLE-----
<i>Cbmar1</i>	298	LAGKKFGCNEEVIAETEAYFEAKPKEYYQNGIKKLEGRYNRCIALEGNYVE	
<i>Consensus</i>		*~*:~*:~*:~* * * ~*~*~*~*~*~*~*~*~*~*~*~*~*~*~*~*	

Figura 45 - Comparação da tradução da ORF putativa da transposase *mariner* de *Rhynchosciara americana*, *Ramar4*, com *Cbmar1* de *Chymomyza amoena*. Aminoácidos consensos marcados com * e : para substituições conservativas. Aminoácidos em vermelho representam os motivos conservados descrito por Robertson (1993) e a tríade catalítica D,D(34)D; e o domínio da transposase em azul.

Mesmo sendo apenas fragmentos, os motivos conservados (WVPHEL e YSPDLAP) descritos por Robertson (1993) podem ser encontrados com algumas restrições. As seqüências presentes em *Ramar4* são WVKRSL e YSPDLGG, onde os aminoácidos sublinhados são os substituídos. O domínio da transposase, que forma o domínio catalítico do elemento e onde está presente a tríade D,D(34)D apresenta-se alterado, somente o primeiro ácido aspártico da tríade está conservado e o domínio praticamente ausente.

4.9. Análise Filogenética dos Elementos *mariner* de *Rhynchosciara americana*

Os elementos *mariner* podem ser agrupados em mais de 13 subfamílias, onde pelo menos 5 são consideradas como grandes subfamílias: *mauritiana*, *cecropia*, *mellifera*, *irritans* e *capitata* (Robertson & MacLeod, 1993). Essa divisão é baseada na análise filogenética e comparação das seqüências (Robertson, 1993; Robertson & Lampe, 1995). Geralmente, membros da mesma subfamília *mariner* compartilham de 40% a quase 100% identidade em aminoácidos, enquanto membros de subfamílias diferentes compartilham de 25% a 49% identidade em aminoácidos. Já foi reportado que elementos de algumas subfamílias podem coexistir na mesma espécie (Robertson & MacLeod, 1997).

Para verificar a distribuição filogenética dos elementos *mariner full-length*, parciais ou defectivos, caracterizados em *Rhynchosciara americana*, as seqüências dos elementos: *Ramar1*, *Ramar2*, *Ramar3* e *Ramar4* foram alinhadas com elementos de diferentes organismos que representam as 5 maiores subfamílias dos elementos *mariner*: *mauritiana*, *irritans*, *cecropia*, *mellifera* e *elegans*, e com elementos representantes de uma subfamília menor, a subfamília *mori*. O

alinhamento foi gerado usando o programa ClustalX 1.83 com os parâmetros padrão, e as seqüências dos elementos usados foram adquiridas no GenBank e os *accession numbers* são: *Drosophila erecta* Demar1 (U08094), *Apis mellifera* Ammar1 (U19902), *Ceratitis capitata* Ccmar1 (AAB17945), *Caenorhabditis elegans* Cemar1 (NP_497296), *Caenorhabditis elegans* Cemar2 (NP_497120), *Mayetiola destructor* Desmar1 (AAA66077), *Drosophila mauritiana* Mos1 (AAA28678), *Haematobia irritans* Himar1 (U11645), *Chrysoperla plorabunda* Cpmar1 (AAA28265), *Mantispa pulchella* Mpmar1 (U11649), *Homo sapiens* Hsmar2 (AAC52011), *Ochlerotatus atropalpus* Atmar1 (AAL16723), *Hyalophora cecropia* Hcmar1 (M63844). A árvore foi elaborada utilizando o algoritmo *Neighbour Joining* e a seqüência do elemento Bmmar1 de *Bombyx mori* (AAB47739), representando a linhagem *mariner* basal (Robertson & Asplund, 1997) foi usada como grupo externo. O agrupamento dos elementos Ramar1 e Ramar2 na subfamília *mauritiana* foi fortemente suportado pela análise de *bootstrap* e identidade e similaridade na sua clade irmã. Já o elemento de transposição *mariner* Ramar3 foi agrupado na subfamília *mellifera* enquanto o elemento Ramar4 foi agrupado na subfamília *irritans* (Figura 46).

A presença de diferentes subfamílias de elementos de transposição MLEs no mesmo genoma não é um fenômeno isolado, já foi observado em outras espécies. Como por exemplo, em *Ceratitis capitata* ocorrem representantes de quatro das cinco maiores subfamílias (Robertson *et al.*, 1997). Ou no mosquito *Ochlerotatus atropalpus* coexistem dois elementos distintos de diferentes subfamílias, *irritans* e *cecropia* (Zakharkin *et al.*, 2004). Assim como em *Bactrocera tryoni*, que também foram identificados representantes das subfamílias *mellifera* e *irritans* (Green & Frommer, 2001).

A presença de elementos de diferentes subfamílias no genoma de

Rhynchosciara americana, e cada uma em diferente estágio de evolução, sugere fortemente que estes não podem interagir entre si. Provavelmente os elementos parciais *Ramar3* e *Ramar4*, que aparecem apenas como fragmentos, foram herdados a mais tempo, e por isso acumularam muito mais mutações ao longo das gerações, quando comparados com *Ramar1*, que foi possível predizer uma transposase *full-length*. Enquanto que o elemento defectivo *Ramar2*, pode ter sofrido uma inativação assim que invadiu o genoma de *Rhynchosciara americana*.

Figura 46 – Análise filogenética dos elementos *mariner* descritos em *Rhynchosciara americana* *full-length*, parciais ou defectivos (*Ramar1*, *Ramar2*, *Ramar3* e *Ramar4*) com outros membros da família *mariner*, baseados nas seqüências de aminoácidos.

4.10. Amplificação Genômica dentro do gênero *Rhynchosciara*

A partir dos primers desenhados para amplificar a região central da sequência da transposase *Ramar1*, foi feita uma amplificação genômica utilizando como templates DNAs de *R.sp*, *R.baschanti*, *R.hollaenderi* e *R.milleri*. A sequência dos primers utilizada é mostrada na figura 47.

Figura 47 – Esquema mostrando as regiões em que os primers pRamar1-5 e pRamar1-3 foram desenhados, englobando os principais domínios da transposase.

Os fragmentos amplificados (Figura 48), aproximadamente 1000pb, foram clonados em pGEM-T easy (Promega) e seqüenciados pelas extremidades.

Figura 48 – PCR amplificação utilizando como primers pRamar1-5 e pRamar1-3 e DNAs de *Rhynchosciara baschanti* (1), *Rhynchosciara hollaenderi* (2), *Rhynchosciara milleri* (3) e *Rhynchosciara sp* (4). PM - 1kb Plus Ladder (Invitrogen).

Os elementos amplificados com os primers pRamar1-5 e pRamar1-3 apresentaram homologia com o elemento de transposição *mariner* e foram então denominados: *Rspmar1*, o elemento de *Rhynchosciara sp*; *Rbmar1*, o elemento de *Rhynchosciara baschanti*; *Rhmar1*, o elemento de *Rhynchosciara hollaenderi* e

Rmlmar1, o elemento de *Rhynchosciara milleri*.

As seqüências em nucleotídeos dos elementos amplificados foram alinhadas e estão apresentadas na figura 49. Em itálico, nas extremidades, observa-se a seqüência de repetição terminal invertida no elemento de transposição *Ramar1*; sublinhado as seqüências dos oligonucleotídeos utilizadas para as amplificações; e ainda sublinhado o códon ATG de inicialização da ORF.

```

      710      720      730      740      750      760      770      780      790      800
Rbmar1      ...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|
Rhmar1      CCAGGAACATCAACGCCGAAGCCGAATATCCACGGTGCCAAAGTAATGCTCTGTATTTGGTGGGATCAAAAGGGTCTGATCCTCTATGAGCTGCTAAGAC
Rmlmar1      CCAGGAACATCAACGCCGAAGCCGAATATCCACGGTGCCAAAGTAATGCTCTGTATTTGGTGGGATCAAAAGGGTCTGATCCTCTATGAGCTGCTAAGAC
Rspmar1      CGAGGAACATCAACGCCGAAGCCGAATATCCACGGTGCCAAAGTAATGCTCTGTATTTGGTGGGATCAAAAGGGTCTGATCCTCTATGAGCTGCTAAGAC
Ramar1      TCAGGAACATCAACGCCGAAGCCGAATATCCACGGTGCCAAAGTAATGCTCTGTATTTGGTGGGATCAAAAGGGTCTGATCCTCTATGAGCTGCTAAGAC
Consensus    *****
      810      820      830      840      850      860      870      880      890      900
Rbmar1      ...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|
Rhmar1      CTGGTCAAACGATCAATGGAGACTTCTACAGGCAACAATTGATCCGTTTAAAGCAAGCTATTGCCGAAAAACGTCCAGATTATGCGACCAGACACGAGTC
Rmlmar1      CTGGTCAAACGATCAATGGAGACTTCTACAGGCAACAATTGATCCGTTTAAAGCAAGCTATTGCCGAAAAACGTCCAGATTATGCGACCAGACACGAGTC
Rspmar1      CTGGTCAAACGATCAATGGAGACTTCTATACGCAACAATTGATCCGTTTAAAGCAAGCTATTGCCGAAAAACGTCCAGATTATGCGACCAGTCACGAGTC
Ramar1      CTGGTCAAACGATCAATGGAGACTTCTACAGGCAACAATTGATCCGTTTAAAGCAAGCTATTGCCGAAAAACGTCCAGATTATGCGGGCAGACACGAGTC
Consensus    *****
      910      920      930      940      950      960      970      980      990      1000
Rbmar1      ...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|
Rhmar1      GATAATATTTTCATCATGACAAAGCTCGGCCTCATGCTGCTGTTTCGAGTTAAAAAATATTGGAAAAATAAGGATGGGAAATTTGGTCCACCCGCTTAT
Rmlmar1      GATAATATTTTCATCATGACAAAGCTCGGCCTCATGTTGCTGTTAGAGTTGAAAGCTATTGTGAAAAATAGCGGATGAAAAATTTGGTTCACCCGCTTTAC
Rspmar1      GATAATATTTTCATCATGACAAAGCTCGGCCTCATGTTGCTGTTTCGAGTTAAAAAATATTGGAAAAATAGCGGATGGGAAATTTCTGGTTCACCCGCTTTAT
Ramar1      GATAATATTTTCATCATGACAAAGCTCGGCCTCATGCTGCTGTTCAAGTTAAAAAATATTGTGAAAAATAGCGGATGGGAAATTTCTGGTTCACCCGCTTTAT
Consensus    *****
      1010     1020     1030     1040     1050     1060     1070     1080     1090     1100
Rbmar1      ...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|
Rhmar1      AGCCAGACATTTGCCCTTCCGACTACCATTTGTTTCGATCGATGCAGAACGCTTTGAGTGGAATACGCTTTACTTCAGAACAGGGTATCAAAAATTGAC
Rmlmar1      AGCCAGACCTTGCCCTTCCGACTACTATTTGTTTCGATCGATACAGAACGCTTTGAGTGGAATACGCTTTACTTCAGAACAGGATATCAAAAATTGGC
Rspmar1      AGCTCAGACCTTGCCCTTCCGACTACCATTTGTTTCGATCGATACAGAACGCTTTGAGTGGAATACGCTTTACTTCAGAACAGGGTAT-----GGC
Ramar1      AGCCAGACCTTGCCCTTCCGACTACCATTTATTTTCGATCGATGCAGAACGCTTTGAGTGGAATACGCTTTACTTCAGAACAGGGTATCAAAAATTGGG
Consensus    AGCCAGACCTTGCCCTTCCGACTACCATTTGTTTCGATCGATGCAGAACGCTTTGAGTGGAATACGCTTTGCTTCAGACAGGGTATCAAAAGTTGGC
      1110     1120     1130     1140     1150     1160     1170     1180     1190     1200
Rbmar1      ...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|
Rhmar1      TGAATTCATTCTTGGCTTCAAAAGATGAACGCTTCTTTCGCGACGGAATCCGTAAATTGCCAGAA-----
Rmlmar1      TGAATTCATTCTTGGCTTCAAAATATGAACGCTTCTTTCGCGAAGGAATCCGTAAATTGCCAGAA-----
Rspmar1      TGAATTCATTCTTGGCTTCAAAAGGTGAACGCTTCTTTCGCGACGGAATCCGTAAATTGCCAGAA-----
Ramar1      TGAATTCATTCTTGGCTTCAAAAGATGAACGCTTCTTTCACGACGGAATCCGTAAATTGCCAGAA-----
Consensus    TGAATTCATTCTTGGCTTCAAAAGATGAACGCTTCTTTCACGACGGAATCCGTAAATTGCCAGAA-----
      1210     1220     1230     1240     1250     1260
Rbmar1      -----
Rhmar1      -----
Rmlmar1      -----
Rspmar1      -----
Ramar1      TTTTTCATTATTCAAATAAATGTGTTTTCATGCAAAAAACGGAAGGAATTAAGTTGTACACCCAA
Consensus    -----

```

Figura 49 – Sequência de nucleotídeos dos elementos *mariner* amplificados no gênero *Rhynchosciara*, utilizando o par de oligonucleotídeos pRamar1. A região ITR de *Ramar1* em itálico e a sequência de primer utilizada na amplificação sublinhada.

A figura 50 mostra as seqüências em aminoácidos dos elementos *Rspmar1*, *Rbmar1*, *Rhmar1* e *Rmlmar1* e algumas regiões características destes elementos em comparação com os elementos *mariner* *Ramar1* de *Rhynchosciara americana* e *Desmar1* de *Mayetiola destructor*. Na região amino-terminal, conhecida por conter o domínio de ligação do DNA, é possível identificar o sinal de localização nuclear bipartido (RFKS... RPGQ), que se apresenta defeitivo para o elemento *Rhmar1* de *R.hollaenderi* e intacto para os demais elementos. O motivo *Helix-turn-Helix* (HTH) (QTQTELAKSLGVTTQQAISKRLK), responsável pelo domínio de ligação do ITR,

encontra-se defectivo apenas no elemento *Rspmar1* de *Rhynchosciara sp.*

Na região carboxi-terminal, onde está localizado o domínio catalítico do elemento, caracterizado pela tríade catalítica D,D(34)D, é possível identificar o domínio da transposase, mas a seqüência-assinatura D,D(34)D aparece com o primeiro ácido aspártico alterado em quase todos os elementos, restando apenas o elemento *Rspmar1* de *Rhynchosciara sp.*, que apresenta esse motivo intacto. Os dois motivos conservados (WVPHEL e YSPDLAP), descritos por Robertson (1993), estão presentes, porém com algumas modificações. As alterações encontradas para estas seqüências, já descritas para o elemento *Ramar1* de *R.americana*, também ocorrem nesses elementos, onde é observado YVPYEL no lugar de WVPHEL. Enquanto que para o segundo motivo YSPDLAP, ocorrem alterações apenas nos elementos *Rspmar1* de *Rhynchosciara sp* (YSPDLAR) e *Rmlmar1* de *Rhynchosciara milleri* (YSSDLAP).

Uma comparação direta da seqüência de aminoácidos dos elementos presentes em *Rhynchosciara*, com o elemento *Desmar1* de *Mayetiola destructor* apresentou cerca de 61,1% identidade e 74,6% substituições conservativas com a seqüência proposta para *Rspmar1* de *Rhynchosciara sp*, 69,2% identidade e 80,7% substituições conservativas com a seqüência proposta para *Rbmar1* de *Rhynchosciara baschanti*. Enquanto que quando comparadas as seqüências das transposases dos elementos de *Rhynchosciara milleri* *Rmlmar1* e *Rhynchosciara hollaenderi* *Rhmar1* com *Mayetiola destructor Desmar1*, obteve-se 62,2% e 59,6% identidade e 73,5% e 72,6% substituições conservativas, respectivamente.

Embora tenha sido possível a identificação de uma ORF para todas as transposases nos elementos descritos, os clones seqüenciados foram considerados inativos, uma vez que apresentaram diferentes tipos de mutação, como códons de

terminação no interior da seqüência, mudança no quadro de leitura e pequenas deleções.

<i>Ramar1</i>	1	MSSFVAN--KHLREVLIFCFHWKKSAAEAHQMLVEVYGDSAPSERFCREWFGRFKSGDF	58
<i>Rspmar1</i>	1	MSSFVAN--KHLREVSIFCFYWKKSADAHQMLVKVYGDSAPSDRFCREWFGRFKSGKF	58
<i>Rbmar1</i>	1	MSSFVAN--KYPLREVLIFCFH-KKSAAEAHQMLVEVYGDSAPSDRFCRKWFGGRFKSGDF	57
<i>Rhmar1</i>	1	MSSFVAN--KHLRKVLIFCFHWKKSAAEAHQTLVEVYGDSK-----	40
<i>Rmlmar1</i>	1	MSSFVAN--KHLREVLIFCFHWKKSAAEAHRMLVEVYGDSAPSDRFCREWFGRFKSGDF	58
<i>Desmar1</i>	1	MENFENWRKRRLREVLGLGHFFAKKTAAESHRLLEVEVYGEHALAKTQCFEWFGRFKSGDF	60
<i>Ramar1</i>	59	SVKDKERPGQPKKFEDEELETLLQDSCQTQTELAESLGVTTQQAISKRLKAAGYIQKQGN	118
<i>Rspmar1</i>	59	SDTDKKRPGQPKKFKDEELKTR-----SRFVLVFIQAISKRLRAAGYIQKQGT	105
<i>Rbmar1</i>	58	SVKDKKRPGQPKKF-----QDSCQTQTELAESLGVTRQAISKRLAAGYIQK-QGN	106
<i>Rhmar1</i>	41	SVRVKKRPGQPKKFEDEELETLLGQDLQMQTELAQSLGVTTQQAISKRIKAARYIQKQGN	100
<i>Rmlmar1</i>	59	SAKDKNRPGQPKKFEDEELETILDQDSCQTQTELAESLGVTTQQAISKRLAACIQSKKQGN	118
<i>Desmar1</i>	61	DTEDKERPGQPKKFEDEEELALDEDCQTQEELAKSLGVTTQQAISKRLKAAGYIQKQGN	120
<i>Ramar1</i>	119	YVPYELKERDVERRFCMSEMLLERHKKRSFLHR-IVTGDEKLIHYDNPKRKRSYVKPGQP	176
<i>Rspmar1</i>	106	YVPYELKARDVERQFCISEMLLERLKRKSFLHR-IVTGDEKRIHYDNQNEKNRKQSPGQS	164
<i>Rbmar1</i>	107	YVPYELKARDVEWRFAWSKCGWTDQKRKSFLPWNRFPGAKKGFHSANSKRKKIVISRFTQ	166
<i>Rhmar1</i>	101	YVPYELKARSVERRFCMFEMLLER-HKKSIFASNRFGRKMDSPPTIRHAKDSMVRPGQQ	159
<i>Rmlmar1</i>	119	YVPYELK-REVRTPFFFS-----EILNAILYGLVPGTEKIFRPTQTP--KVGIKARPR	168
<i>Desmar1</i>	121	WVPHELKPRDVERRFCMSEMLLQR-HKKKSFLSRIITGDEKWIHYDNSKRKKSIVKRGGR	179
<i>Ramar1</i>	177	GTSTSKPNIHGAKVMLCIWWDQKGLIHYELLKPGQTINGDFYRQQWIRLQQAIAEKRPDY	236
<i>Rspmar1</i>	165	GTSTPKPKIHGAKVMLCIWWDQKGLIHFEELLKPGQTINGDIYRQQLIRLQQAIAEKRPDY	224
<i>Rbmar1</i>	167	EHQRRKPNIHGAKVLLCIWGDQKGLIYELLRPGQTINGDFYRQQLIRLQQAIAEKRPDY	226
<i>Rhmar1</i>	160	EHSRPSRIFRGPKICSVLVR--KCLIHVYLLKPGQTINGDFYRQQLIRLQQAIAEKRPDY	217
<i>Rmlmar1</i>	169	GTSPR-SRFHVAKIMLCIGGDQKDLIHYELLKPGQTINGDFYTQQLIRLQQAIAEKRPDY	227
<i>Desmar1</i>	180	AKSTPKSNLHGAKVMLCIWWDQRGVLYELLEPGQTITGDLYRTQLIRLQQAIAEKRPDY	239
<i>Ramar1</i>	237	ATRHESIIFHHDNARPHAAVQVKNYLKNSGWEILVHPPYSPDLAPSDYHLFRSMQNALSG	296
<i>Rspmar1</i>	225	AGRHESIIFHHDKAQPHVAVRVKNYLENSGWEILVHPPYSPDLARSDYHLFRSMQNALRG	284
<i>Rbmar1</i>	227	ATRHESIIFHHDNARPHAAVRVKNYLENKGWEILVHPPYSPDIAPSDYHLFRSMQNALSG	286
<i>Rhmar1</i>	218	ATRHESIIFHHDKARPHVAVRVESYLSNG--KILVHPLYSPDLAPSDYYLFRSIQNALSG	275
<i>Rmlmar1</i>	228	VTSHESIIFHHDNARPHVAVRVKN-LENSGWEILVHSLYSSDLAPSDYHLFRSIQNALSG	286
<i>Desmar1</i>	240	AKRHGAVIFHHDNARPHVALPVKNYLENSGWEVLPHPPYSPDLAPSDYHLFRSMQNLAG	299
<i>Ramar1</i>	297	IRFTSEQGIKSWLNSFLASKDERFFHDGIRKLPERWEKVVASDGQYF-	344
<i>Rspmar1</i>	285	IRFTSKQGIKSWVNSFLASKNERFFHDGIRKLPE-----	319
<i>Rbmar1</i>	287	IRFTSEQGIKN-LNSFLASKDERFFRDGIRKLPEK-----	320
<i>Rhmar1</i>	276	IRFTSEQDIKNWLSFLASKYERFFREGIRKLPE-----	309
<i>Rmlmar1</i>	287	IRFTSEQGMRKWLNSFLTSGGERFFRDGIRKLPE-----	320
<i>Desmar1</i>	300	KRFTSEQGIRKWLDLSFLAAKPAKFEEKGIHELSEKWEKVIASDGQYFE	347

Figura 50 - Seqüências em aminoácidos, das ORFs dos elementos de transposição *mariner* identificados em *Rhynchosciara americana* *Ramar1*, *Rhynchosciara sp* *Rspmar1*, *Rhynchosciara baschanti* *Rbmar1*, *Rhynchosciara hollaenderi* *Rhmar1*, *Rhynchosciara milleri* *Rmlmar1* e o elemento *mariner* *Desmar1* de *Mayetiola destructor*. Aminoácidos em vermelho representam os motivos conservados descrito por Robertson (1993) e a tríade catalítica D,D(34)D. O domínio da transposase em azul e sublinhado o sinal de localização nuclear bipartido em cinza escuro e o motivo HTH em cinza claro.

A tabela 05 mostra uma comparação nas seqüências, em aminoácidos e nucleotídeos, de todos os elementos de transposição tipo *mariner*, identificados e

descritos no gênero *Rhynchosciara*. É possível observar o alto grau de similaridade entre as diferentes espécies, que varia de 69,2% a 91% identidade e 75,2% a 95,2% nas substituições conservativas em aminoácidos e de 82% a 95,5% identidade em nucleotídeos.

Tabela 05 – Comparação entre as seqüências de elementos de transposição tipo *mariner* amplificadas no gênero *Rhynchosciara*, os números representam porcentagem de identidade/substituições conservativas em aminoácidos e entre parênteses identidade em nucleotídeos.

	<i>Ramar1</i>	<i>Rspmar1</i>	<i>Rhmar1</i>	<i>Rbmar1</i>
<i>Rspmar1</i>	83,1/88,0 (89,8)	-	-	-
<i>Rhmar1</i>	79,5/84,3 (87,4)	70,1/77,6 (82,0)	-	-
<i>Rbmar1</i>	91,0/95,2 (95,5)	79,5/85,5 (89,8)	77,4/83,1 (87,7)	-
<i>Rmlmar1</i>	81,0/86,1 (92,2)	70,7/77,3 (86,7)	69,2/75,2 (84,6)	80,1/84,6 (92,5)

O segundo conjunto de primers (pRamar2-5 e pRamar2-3) desenhados da região central da seqüência proposta para a transposase *Ramar2*, também foi utilizado para fazer amplificações genômicas usando como templates DNAs de *R.sp*, *R.baschanti*, *R. hollaenderi* e *R.milleri*. A seqüência dos primers utilizada é mostrada na figura 51.

Figura 51 - Esquema mostrando as regiões em que os primers pRamar2-5 e pRamar2-3 foram desenhados, englobando os principais domínios da transposase.

Os fragmentos amplificados em *R.baschanti*, *R.hollaenderi* e *R.milleri* (Figura 52) de aproximadamente 700pb foram clonados e seqüenciados pelas extremidades. Enquanto em *R.sp* o fragmento amplificado apresentou cerca de 1kb (dado não mostrado). Dessa forma é possível que em *Rhynchosciara sp* o elemento tipo 2 não possua a deleção no interior da ORF observada no elemento de transposição *mariner* caracterizado em *R.americana* e denominado *Ramar2*.

Figura 52 - PCR amplificação utilizando como primers pRamar2-5 e pRamar2-3 e DNAs de *Rhynchosciara baschanti* (Raia 1); *Rhynchosciara hollaenderi* (Raia 2); e PM - 1kb Plus Ladder (Invitrogen).

Os elementos amplificados com o conjunto de primer pRamar2-5 e pRamar2-3 apresentaram homologia ao elemento de transposição *mariner*, logo, foram denominados: *Rspmar2* para o elemento amplificado de *R.sp*; *Rbmar2* o elemento amplificado de *R.bashanti*, *Rhmar2* o elemento amplificado de *R.hollaenderi* e *Rmlmar2* o elemento amplificado de *R.milleri*.

Na região amino-terminal, o sinal de localização nuclear bipartido é possível de se identificar, porém o motivo *Helix-Turn-Helix* (HTH) está ausente. Os dois motivos conservados WVPHEL e YSPDLAP, descrito por Robertson (1993), não aparecem bem definidos, muitas alterações nos resíduos de aminoácidos são observadas. A tríade catalítica que compõe o domínio da transposase também se encontra defectiva, onde apenas os dois últimos resíduos de ácidos aspárticos são identificáveis (Figura 53).

A figura 53 mostra a comparação das seqüências em aminoácidos dos elementos *mariner* amplificados das diferentes espécies de *Rhynchosciara*. A tabela 06 mostra uma comparação das seqüências, em aminoácidos e nucleotídeos, de todos os elementos de transposição tipo 2 *mariner*, identificados e descritos no gênero *Rhynchosciara*. É possível observar o alto grau de similaridade entre os

elementos defectivos: *Ramar2*, *Rbmar2* e *Rhmar2*, que varia de 70,0% a 86,4% identidade e 77,0% a 88,4% nas substituições conservativas em aminoácidos e de 58% a 91,0% identidade em nucleotídeos. No entanto a similaridade é diminuída quando as seqüências são comparadas com o elemento *Rspmar2*, que possui a ORF quase completa e apenas uma deleção na região amino-terminal, variando de 34,1% a 35,7% identidade e 39,3 % a 42,8 % nas substituições conservativas em aminoácidos e de 32,7% a 34,7% identidade em nucleotídeos.

Entretanto, mudanças no quadro de leitura, códons de terminação, deleções no interior da ORF tornam os elementos amplificados defectivos. Estes elementos defectivos, com deleções no meio da ORF e extremidades intactas, são característicos entre os elementos de transposição *mariner* e já foram observados em diferentes organismos (Kaminker *et al.*, 2002; Zakharkin *et al.*, 2004).

Ramar2	1	MSKFEP	SKRHLREILVYFFN	IKKSAAEA	QQLLVEAYGEGALSERTYRE	WFQKF	KNGDFDVEDKDRSGRP	69	
Rbmar2	1	MSKFEP	SKRHLREILVYFFN	LKKSAAEA	HQQLLVEAYGEGALSERTCRG	WFQKF	KNGDFDVEDKDRSGRP	69	
Rhmar2	1	MSKFEP	SKRHLPEILVYLFNL	LKKSAAEVH	QQLLVEAYGENALSERTCRE	WFQKF	KNGYFDVEDKDRSGMP	69	
Rmlmar2	1	MSKFEP	SKRHLREILVYFF	TLKQ	SAAEAHQLLVEVYGD	SAPSD	RFREW--FGGFKSGDFS	VKDKNRPGQP	68
Rspmar2	1	MSKS	-----	FKKSAAEAH	LLVKVIG	-----	DRFCRE--FGRFKSGDFS	VKDKERPGQP	46
Ramar2	70	KIYEDAE	LEELLEETIT	GALYQTQLMRLSRA	-----	-----	-----	100	
Rbmar2	70	KIYEDAE	LEELLEEDSL	-----	MRLSRS	-----	-----	92	
Rhmar2	70	KIYEDAK	LEELLEETIT	-----	EAA	-----	-----	89	
Rmlmar2	69	KKFEDEE	LETLLNQD	SCKTQTELAETLGVTQ	-----	-----	-----	99	
Rspmar2	47	KKFEDEE	LETLLNQD	SCQAQTELAETLGVTQ	AI	SKLKAAGYIQKQGMFHTNKREMSNGDFACPKCCLHKL	116		
Ramar2	101	-----	-----	-----	-----	-----	-----	101	
Rbmar2	93	-----	-----	-----	-----	-----	-----	93	
Rhmar2	90	-----	-----	-----	-----	-----	-----	90	
Rmlmar2	100	-----	-----	-----	-----	-----	-----	100	
Rspmar2	117	HERKSFL	HRIVTGYEKI	IHYDNP	KRKRSYVKPSQ	PGTSTPKPNIYGA	VMLCIWWDQKSLIH-YELLKPGQ	185	
Ramar2	101	-----	-----	LKEKRP	QYYSRHEKII	FLHDN	ARPHVAAPVKKYLETLDWEVLRHPLYSSDIAP	153	
Rbmar2	93	-----	-----	LKGKRP	QYYSRHEKII	LLHDN	ARPHVAAPVKKYLETLDWEVLRHPLYSSDIAP	145	
Rhmar2	90	-----	-----	LKEKRP	QYYSRHEKII	LLHDN	ARPHVAAPVKKYLETLDWEVLRHPLYSSDIAP	142	
Rmlmar2	100	-----	-----	EKRPDYA	TRHE	IFHRD	NARPHVAAPVKKYLETLDWEVLRHPLYSSDIAP	150	
Rspmar2	186	TINGYFYR	QQLIRLKQA	IAEKRP	DYATRYESI	IFHHDN	ARTRCSR---KYLETLDWEVLRHPLYSSDIAP	249	
Ramar2	154	SDYHLFR	SMAHALTAQRF	IFYEDTK	HWVDS	WIASKDK	KEFFRRGIQMLPERWEK	VVASDGQYFK	216
Rbmar2	146	FDYHLFR	SMAHALTAQRF	TSYENT	KNWVDS	WIASKDK	KEFFRRGIRMLPERWEK	-----	198
Rhmar2	143	SDYHMF	FRSMAHALTAQRF	TSYEDTK	NWVDS	WIASKDK	NFFRTGILMLPERWEK	-----	195
Rmlmar2	151	SNYHLFR	SMAHALTAQRF	TSYEDT	INWVDS	WIASKDK	KEFFRRGIRMLPERWEK	-----	169
Rspmar2	250	FDYHLFR	SMAHALAAQRF	TSYEDTK	NWVDS	WIASKDK	KFFRRGIRMLPERWEK	-----	302

Figura 53 - Comparação das seqüências, em aminoácidos, das ORFs putativas das transposases *mariner* de *Rhynchosciara sp*: *Rhynchosciara baschanti* *Rbmar2*, *Rhynchosciara hollaenderi* *Rhmar2*, *Rhynchosciara americana* *Ramar2* e *Rhynchosciara sp* *Rspmar2*: aminoácidos idênticos em cinza e substituições conservativas em preto.

Tabela 06 – Comparação entre as seqüências de elementos de transposição tipo *mariner* amplificadas no gênero *Rhynchosciara*, os números representam porcentagem de identidade/substituições conservativas em aminoácidos e entre parênteses identidade em nucleotídeos.

	<i>Ramar2</i>	<i>Rspmar2</i>	<i>Rhmar2</i>	<i>Rbmar2</i>
<i>Rspmar2</i>	35,2/42,8 (34,3)	-	-	-
<i>Rhmar2</i>	79,2/81,0 (74,7)	34,1/40,6 (32,7)	-	-
<i>Rbmar2</i>	82,4/84,7 (75,6)	35,7/42,8 (33,4)	86,4/88,4 (91,0)	-
<i>Rmlmar2</i>	70,0/77,8 (58,0)	35,1/39,3 (34,7)	70,1/77,0 (73,0)	74,0/80,4 (71,8)

4.11. Análise Filogenética dos Elementos *mariner* no gênero *Rhynchosciara*

As seqüências em aminoácidos dos elementos *mariner* amplificados das diferentes espécies de *Rhynchosciara* foram alinhadas pelo programa ClustalX1.83, e o dendrograma mostrado na figura 54 foi gerado.

O dendrograma mostra que os elementos estão claramente agrupados em dois diferentes grupos, denominados *Rmar1* e *Rmar2*, representando as diferentes espécies de *Rhynchosciara*: *americana*, *hollaenderi*, *sp*, *baschanti* e *milleri*. Quando um dendrograma com diferentes elementos *mariner* pertencentes a diferentes subfamílias foi gerado (Figura 55). Todos os elementos amplificados nas diferentes espécies de *Rhynchosciara* se agruparam formando o clado pertencente à subfamília *mauritiana*.

Mais de um tipo de elemento *mariner* pode estar presente no mesmo genoma, considerando membros de uma mesma subfamília ou de subfamílias diferentes. No entanto, segundo Lampe *et al.* (2001), dois *mariners* que ocupam o mesmo genoma não podem interagir. Quando observamos os grupos *Rmar1* e *Rmar2* verificamos algo parecido com o proposto por Lampe *et al.* (2001), pois os dois grupos relacionados, mesmo sendo membros da mesma subfamília, apresentam diferentes mecanismos de evolução. Um grupo sofreu mutações que levaram a deleção de um fragmento no interior da ORF, gerando um elemento defectivo (*Rmar2*), enquanto

que no outro grupo, apesar da presença de pequenas mutações, ainda foi possível prever uma ORF putativa (*Rmar1*).

Figura 54 - Análise filogenética dos elementos *mariner* descritos nas diferentes espécies de *Rhynchosciara*, baseados nas seqüências de aminoácidos.

Outro fator a se considerar é que a invasão do genoma de *Rhynchosciara* pelo grupo *Rmar2* pode ter sido um evento mais antigo quando comparado com a invasão pelo grupo *Rmar1*. Desta forma o primeiro *Rmar2* poderia ter acumulado um maior índice de mutações, levando-o a uma inativação vertical e ao elemento defectivo que é encontrado atualmente.

A habilidade destes elementos de transposição de se moverem no genoma independe de fatores presentes no hospedeiro, permitindo que eventualmente ocorra transferência entre diferentes espécies. Os mecanismos utilizados no evento de transferência horizontal ainda não são totalmente conhecidos, mas podem representar o mecanismo fundamental para a evolução e permanência dos elementos de transposição nos diferentes organismos (Maruyama & Hartl, 1991). Na

invasão de um novo genoma o elemento passa por uma fase de rápida multiplicação por transposições replicativas, e com o passar do tempo as cópias do elemento podem sofrer mutações que levem a um aumento na eficiência de transposição, ou a sua inativação.

O grupo *Rmar1* presente em todas as espécies estudadas de *Rhynchosciara* possivelmente veio de um ancestral comum, é observada uma alteração no motivo conservado (WVPHEL), descrito por Robertson (1993), que se mantém (YVPYEL) em todos os elementos. Esta alteração não deve ter sido suficiente para gerar um elemento inativo, uma vez que somente cópias autônomas são capazes de sofrer transferência horizontal, desta forma o motivo (YVPYEL) permaneceu conservado em *Rhynchosciara* e teria sido transferido por herança horizontal.

O evento de transferência horizontal que deu origem aos transposons *mariner* identificados em *Rhynchosciara* até o momento (*Rmar1* e *Rmar2*) deve ter ocorrido a milhões anos, talvez antes da especiação do gênero *Rhynchosciara*, isso porque todos estes elementos aparecem como cópias inativas no genoma. No entanto isso não exclui a possibilidade de que existam cópias de elementos ativos que tenham invadido o genoma de *Rhynchosciara* mais recentemente, mas que ainda não foram identificados.

Figura 55 - Análise filogenética dos elementos *mariner* descritos em *Rhynchosciara americana full-length*, parciais ou defectivos (*Ramar1*, *Ramar2*, *Ramar3* e *Ramar4*) com outros membros da família *mariner*, baseados nas seqüências de aminoácidos. E os elementos *mariner* identificados nas diferentes espécies de *Rhynchosciara*.

4.12. Caracterização Molecular do Retroelemento RaTART

A caracterização do elemento de retrotransposição teve início com a identificação de um cDNA com homologia a transcriptase reversa. Esse cDNA foi utilizado como sonda para o isolamento de um recombinante genômico em uma biblioteca de *Rhynchosciara americana* construída no bacteriófago lamba dashII (Stratagene).

A estrutura do elemento retrotransposon identificado em *Rhynchosciara americana*, denominado RaTART, putativo ao elemento TART de *Drosophila*, é proposta na figura 56 em comparação com os elementos HeT-A, TART e TAHRE de *Drosophila melanogaster*, responsáveis neste organismo pela reconstituição do telômero, e com o elemento TRAS de *Bombyx mori*, um retroelemento subtelomérico. O elemento de retrotransposição RaTART apresenta duas ORFs: a ORF I que codifica *gag*, e a ORFII que codifica *pol*, com os domínios de endonuclease e transcriptase reversa, assim como longas regiões UTRs.

Figura 56 – Estrutura proposta para o retrotransposon RaTART de *Rhynchosciara americana* e os elementos teloméricos de *Drosophila melanogaster* HeT-A, TART e TAHRE e o elemento subtelomérico de *Bombyx mori* TRAS.

A análise da sequência do elemento RaTART em *Rhynchosciara americana* revelou que este elemento possui 8268 pares de base de comprimento. A ORFI possui 1656 bases e codifica uma proteína com homologia a proteína *gag* com 551 aminoácidos. Na região carboxi-terminal dessa ORF é possível identificar três motivos CCHC de ligação ao DNA (*Zinc Finger*), o primeiro com estrutura geral de Cys-X₂-Cys-X₄-His-X₄-Cys, o segundo motivo com estrutura geral Cys-X₂-Cys-X₃-His-X₄-Cys e o último Cys-X₂-Cys-X₄-His-X₆-Cys, esses motivos são também conhecidos como *zinc knuckle* porque formam estruturas com projeções similares aquelas formadas pelo motivo C₂H₂ *zinc finger*, que é um motivo muito comum em proteínas de retroelementos. O segundo motivo presente na proteína *gag* possui estrutura geral QGX₂EX₇R e foi localizado na região amino-terminal dos motivos *zinc finger* com cerca de 13 aminoácidos, esse motivo é conhecido como *major homology region* (MHR) porque é o único segmento na ORF I que codifica a proteína *gag*, com significativa homologia entre diferentes grupos de retrovírus e retroelementos (Rashkova *et al.*, 2003). Estudos de outros elementos mostram a atuação desses motivos tanto na ligação de ácidos nucleicos quanto na associação de proteína-proteína. Enquanto que a ORFII possui 2658 bases de comprimento e codifica uma proteína de 886 aminoácidos com homologia a transcriptase reversa, nessa ORF é possível identificar dois domínios, um domínio de transcriptase reversa e outro com atividade de endonuclease. Não foi possível identificar nenhuma sequência de repetição terminal direta ou invertida, indicando que o elemento RaTART é um retrotransposon non-LTR. As duas ORFs do elemento RaTART praticamente se sobrepõem, uma mudança no quadro de leitura para +2 alterna entre uma e outra proteína, a figura 57 mostra o ponto em que as ORFs se sobrepõem. Nesse tipo de retrotransposon non-LTR é muito comum as

sobreposições das ORF, isso também foi observado no retroelemento TRAS1 de *Bombyx mori* (Okazaki *et al.*, 1995). Um sinal de inicialização TATA box foi identificado na posição 1812, e um sinal de poliadenilação na posição 6341.

```
AGGTGAGATTTTCATCAAATCCTGGCGCTTTCTTGAATTCAGGTTTTTGTGCGATTTCTGTGCCACTTCGTACGGGGT
GATTGGTTTAATCGTTGCTTCAGGTAGGTATTCTGGAGCCGTGCTGATGTTTCGAGTTTATTTTCATGTGGTTGAAATAC
ACTCGAAAGATACTGAGCAAAGAGTTTCAGCTTTTTCTTTATCCTTTCTAATCCATTGGCCTTGTGCATTTTTGATTGG
CGGCACCTTGACTGTTGGTCTTTTAAGTCGTCCTTGTGTCGTCCTTGTCCATAGTGAATATTCTTTTCGGCTCCTGGTC
CCAATCCGTTGAGGTATTCACCTAATGCAGCTCTGCTTGAATTCCTTTGATAAGTCGGTTAACACGATTGCTCACCTCAT
TGAAGTTCTTTTATCTGAAGGATGTCTGGATCCGTGCCATATTCGTCTTAATTTGCGCCGTTCTTGATTAGCTCTC
TAATTTTCAGTTGGGTAAATGGTTTCGTATTCTGGTTTGTACATGGAGCTGGAGTTGCCTTTTGGCAGCCATTGTA
TCCAGTTGATAAATATTTGAGCAGCACTCTCTAGCTCATCTTTGTCTCTCAGTTTAAACGTTTCAGATCAATTAGTTCAT
CCAAATATTCTCTGAAAGTTTCCAGTTTGTACGTTTGGTTGTGAGATTTTGTTCCTTCACTTTTTTGATGACTTTAC
TACTAATAATCAGGAGTACTGGGGTGTGATCTGACGATAGATCTTCTATTCCCTCTGTTGAGCAGCAATTATTATTGA
TTCCTTTAGAGATGAAGAAGTCGATCAAATCCGGAACCTTTTTGTGTGTCAGTTGGCCAGTACGTAGGCTTTCTGTATG
AGTGGAATCCGCATTTTCCCTCATTAATGGCCGATAATAATTGACTGCCTTTATTTGGAGTAATCAGTCTTGATTCCC
AAGCTGTGTGTTTTACGTTGAAGTCTGCCCCCAGGATGAATTTTGATCCAAATTTGTTGAAAATATCAAGATATTGTG
TTTTAGTTATTGTGCGTCTAGGAGGACAGTATACAATTATGTGAACGCAAACAATTGTAGCCTGAATATATGGTTCC
CGTATGATCAGGACTGCTGTACCTCCGCAGGGTCTGCTCACGCGGGTGCCTTTAAATTTAATGAAGTTCTTGTT
CGAGAAATGCGTCTCCGAAATGAGTGCAATATCGATGTTGTGCTGTCTTAGAAAGAATTTTAGTTCTTGAGCTCGTTG
GTTGAGCCCATTCGCGTTCCAAGTCAATATCCTCAGGAACGATTGATCATTTTTAAATTTTTTTGACTTACTGTTT
GATGGCTTCTGCGCATTCCTCATTTTTGCCACCCTTTCTGTTAATTGGCTGAATTTCTGATTGGATTACAGCTGGAAG
AGTCTGAGCTGTTGCATGATGTCTGCTAATGTCTGGCTCGTTATTTTCAGCACATTTACTGTTTGTGTAGTTTGTGTTG
GCATTTTGTGCGGAGCATGATTTTGCCTGGTTTGAATTTTTTGAGCGGTAGCAGTAGCCTGCTTATCGTTTTTCTTC
ATATCCTGTAGTCGGGAAGTGACTGGAGATTTTTTGGCTTGTAGCGGCTTACGATTTTTTGTATTTCCAAACAACCT
TTGTAGTTAGCTGGGTGTCCGAATTGATCACATAACACGCACTTAACAGGGCTGTTTGGCGTTTTTGTGCAATCATTT
GTCAGGTAGAGTGAGTTTCGACAGCCATAGAGAGCGGACGTGTTTTTACTTCGTTCTTTCAAAACATTTATTTCAGTGCC
TCTTTGTATTAATTGTGTATAAATTGTGTGCTTGTGTAGTCAAGTCATACAAAAACAACGTGCTGCATGCAAAAAAACT
M Q K N C
GTTACCCATTGTTTAAACATGCGGTTAGCACCGCATGTGCTAACTAAAAACAATTAAAAACATGTGCGAGAAACATGTGC
Y P L F N M R L D L H V L T K T I K T H V E K H V L
TGTGCTGTGTATTATGCTTACTGAACCATAGTGACAATAGAACAATAGAACTCAGCAAATACAATAAAGCAGTGTTAT
C C V L C L L N H S D N R T I E L S K Y N K A V L Y
ACGGACTGTGTTATTTTTGTGTGTTATTTTATTTTAAAAAACTTATAAACGTGTGTGCTGTGTACTATACTTACGGT
G L C Y F V V L F Y F K K T Y K R V C C V L Y L R S
CAACTATAGTGAAATAGTACTCAGCAAAATGCAATCTAACCTAGTTGATGCTAGCTGTATGCAATTGCCATACGATC
T I V K I V L S K M Q S N L V D A S C M Q L P Y D Q
AGCTATGGAATTGCATATCAACAACAATCTACCATTGCTCAATTACAGCAGGATCTTGCAGAAATTGAAGCGAAAAA
L W I A Y Q Q Q Q S T I A Q L Q Q D L A E L K R K I
TACTTCCCAATCCAATTACTGTCCCGAGATACAGTGACATACTTTTGAACAATCCATATGGAAGCCTAGGCGAACAAA
L P N P I T V P R Y S D I L S N N P Y G S L G E Q S
GCGAGTCGAGGGAATACCACACAGATGAAGAAGAACTAGAGAACCTAACCTTAGTTTCTCATGACCAGCCAAAAAAAC
E S R E E Y H T D E E E L E N L T L V S H D Q P K K R
GCAGGAGAACTAAACAAAAAATCCCCCAATACTACTGCTCAAAGTACAAAAGTAACCAAAGTAAAAGGAACCAACC
R R T K T K T P P I T T A Q S T K V T K V G T T P
CATTGCCACCTCCCACTTTTGTGTTAGCAATGTTAAGGACTTTAGTCTTTTCCAAAAGGAAATATTAAACAAAGCACCA
L P P P T F V S N V K D F S L F Q K E I L N K A P N
ACGCTCAGTTCAAAGCTCTTTCCAATACAGATATAAAAAATAACAGTAAAAACTGAAGAAGAATATAGGAATCTGAAAG
A Q F K A L S N T D I K I T V K T E E E Y R N L K E
AGTTGCTGAAGAGAATGAAAACGGATAAAAAATGAAATCCAATACACTCATCAGCTCAAAGCGAAAAATATTCA
L L K R M K T D K N E I Q Y H T H Q L K S E K L F R
GGGTAGTACTCAGAGGACTACCTTATTCAATCCACATAACGATATAAAAAACTGCCGTGATGCTAAAGGACACGATG
V V L R G L P Y S I P H N D I K T A V D A K G H D V
TAGCTGCAATTATAAATGTCAAAGAAGCACGAAGATTAATGGAGAGAAAAATTATCAAAAACCTTCCACTCTTCTACG
A A I I N V K R S T K I N G E K I I K N F P L F Y V
TAGATTTATTTCCCGAAAGAGAACAATAAGGAGATCTATAACATTAAAGATATCCTTCACTGCAAAATCACAGTGGAAAC
D L F P K E N K E I Y N I K D I L H C K I T V E P
CTCCTAAGAAGGTTAAAGGAATTCACAATGTATAAATTGTGAGAGACTTGGACACACTAAAGCTTTTTGTAGCCGTG
P K K V K G I P Q C I N C Q R L G H T K A F C S R E
```


AACCGAGATGTGTGAAATGTGCTGGTAATCACCTAACAAAATCTTGTACAAAAACACTTAATAGCCCCGCCAAGTGCG
P R C V K C A G N H L T K S C T K T L N S P A K C V
TGCTATGCAAAACAACTGGACATCCAGCGAACTACAAAGGCTGTACAGAATACCAAAAAATGCTGAAGCCGTTTCAAA
L C K Q T G H P A N Y K G C T E Y Q K M L K P F Q T
CAACAAAAGCTCCGGTCACATCCCAGACTACAGGAGATGAAAAACGATAAGCATACTACAGCAACTACTCAAAACAACC
T K A P V T S R L Q E M K N D K H T T A T T Q N N R
GAATGAGACATAACGCCGCACAAGTTCCGCAACAAGGCGTTAATAAACTCAAAACAGCTGAATCGAAAAACAGTAAAA
M R H N A A Q V P Q Q G V N K L K T A E S K N S K N
ATGCTGTAAACAACGAGCCGACATTGGCAGATGTCATGCAACAGCTCAGACTATTCCAGGCTGAATCAAATCAGAAAT
A V N N E P T L A D V M Q Q L R L F Q A E S N Q K F
TCAGTCAGCTAACGAAAGGATGACAAAGATAGAGAATGCACAGAAGTCATCGAGTAACAAGTCCAAAAAATCTAAAA
S Q L T E R M T K I E N D Q K S S S N K S K K K
AATGATAAATCAGTTCCTGCGAATAATGACATGGAACGCGAACGGGCTCAATCAACGAGCTCAAGAAGTAAAGTATT

*

M I N Q F L R I M T W N A N G L N Q R A Q E L E V F
TCTAAGACAACACAACATCGACATTGCACTTATCTCTGAGACGCATTTCTCGAATAAAAACTACATCAAATTTAAAGA
L R Q H N I D I A L I S E T H F S N K N Y I K F K D
CCACTGCACCTATTGGACTACCCACCCGAGCGAGCGTGCCTGGAGGTACAGCAGTACTGATAAAACAAAACACTTCC
H C T Y W T T H P S E R A R G G T A V L I K Q N I P
GCATTACCTGCAAGAAGAAATACGGGAGTCATACATTGCTCAGCTACAATTGTTTGCATTCAACAAAGTGGGACTGAATT
H Y L Q E E I R E S Y I Q A T I V C I Q Q S G T E L
AAATATAGGAGCAGCATATTGCCCTCCTAGAGAAACAATACTAAAAACACAATATACTGATATCTTCAGCAAACTTGG
N I G A A Y C P P R E T I T K T Q Y T D I F S K L G
ACCCAAATTCATCCTAGGAGGAGATTTCAACGCTAAACACACAGCCTGGGGATCGAGACTCATCTCCAAATAAAGG
P K F I L G G D F N A K H T A W G S R L I T P K G
CAAATTACTATTGTGCTATCAACGAAGGAAAAATGCGGATTCCACTCATCGCGCAAGCCAACCTCATTGGCCAACCTGA
K L L L S A I N E G K C G F H S S R K P T H W P T D
CAACAAAAAATTCGGGATCTGATTGACTTCTTCATTTCCAAAGGAATAAACCCGAATTGCGCTGTGCAGAGAAGGAAT
N K K I P D L I D F F I S K G I N P N C A V T E G I
AGACGATCTATCATCAGATCATACTCCGGTTCTCCTCTCTCTCAGCACAACAGTCATCAAAAAATAAAAAAGCAAAA
D D L S S D H T P V L L S L S T T V I K K I K Q N
TCTCACAATAAACTCACGAATTGGGAGACATTGAGGAAAAATGGACAATTCGATTGACATAAAGCTTAAATTAAG
L T T K L T N W E T F R E K M D N S I E L N V K L R
AAACAAGGAAGACTTGGAGTTTGTCTCTCCAAAACCTCATCAATCAACTTCATCTGGCTGCAAGAGAAGCGACTCCAGC
N K E D L E F A L Q N L I N Q L H L A A R E A T P A
ACCAGGGGATAAACAGAACAAAGAAATCAATTATCCAGCCGAAATCAGAGAGTTAATCAAAGAAAGGCGTAACCGGAG
P G D K P E Q E I N Y P A A E I R E L I K E R R K R R
GCGAATCGGCACGGATCAAGACACCCAGAAAGATAAAGGAATTTAATCAGGTGAGTAATCTTGTTAGCCAAAGCTAT
R T W H G S R H P E D K R K F N Q V S N L V S Q A I
TAAGGAATTCAAACAGAGCTGCATTGGTGAATACCTGAACGGACTGGGGGGAGGAGGAGAGAAGGACTATTCACTATG
K E F K Q S C I g E Y L N G L G G G G E K D Y S L W
GAAAGCAACAAGACGGTTCAAACGACCAATAATCCAAGTACCGCCAATCAAAAATTCACAACATCAGTGGATCAGGAA
K A T R R F K R P I I Q V P P I K N S Q H Q W I R K
GGATCAAGAAAAGCTGAACTTTTTGCCAGCACCTATCGCAAGTATTTCAACCACATGAAATAAATTCGAATATTAA
D Q E K A E L F A Q H L S Q V F Q P H E I N S N I K
AGTGACTTTAGATTACTCACCTGAAGAAACGATTAAGCCATTACCCCCCTACGAAGTAGCACAAGAAATAGACAAAA
V T L D Y S P E E T I K P F T P Y E V A Q E I D K N
CCTCAACCCAAAGAAATCACCAGGAATCGACGAAATATCGCCCGGTCTTCTCAAGGAATTGACAGGTAAAGCAGTTAA
L N P K K S P G I D E I S P G L L K E L T G K A V K
GCTGATTACATACTTATTCAATGCCTGCCTCAGATTGAAGTACGTCCCAAAGTGTTTCAAGACGGCTCAGATAATTAT
L I T Y L F N A C L R L K Y V P K C F K T A Q I I M
GATCAGTAAACCAGACAAACCAGTGGAAGAAAGTGACATCGTATCGCCCTATTTCACTACTGATCGCAATCTCAAAGCT
I S K P D K P V E K V T S Y R P I S L L I A I S K L
TTTTGAAAAGTTACTCATAAAGAGACTAAAGCCATTTCATAAATATTCCAAATTTCCAATTCGGATTTCAGAAACAAGCA
F E K L L I K R L K P F I N I P N F Q F G F R N K H
TTCAGCAATCGATCAAGTGCACAGAGTGGTCACTGAGATTGAAAAAGCATTGGAAGCAAAGAAATCTGTGTCGGCAT
S A I D Q V H R V V T E I E K A F E A K K Y C V G I
ATTTCTTGACGTATCACAAGCGTTTCGACAAAGTGTGGCAGCAAGGACTCTTCTATAAAATGAGTAAACTTCTACCAGG
F L D V S Q A F D K V W H E G L F Y K M S K L L P G
CAACTTGTCAACTGCAGAGTCATACCTGACAAATCGTGAATTCAGAGTTATGCATGAAGGAGAATTCTCAAACATATTA
N L S T A E S Y L T N R E F R V M H E G E F S N Y Y
TCAAATCAAGGCTGAAGTACCACAAGGGAGCGTCTAGGACCACTCCTCTACCTACTGTACACGGCTGACATACCCAC
Q I K A E V P Q G S V L G P L L Y L L Y T A D I P T
CACAGATGAACGTTTCACGGGCACCTTCGCTGATGACACGACAATCATGGCAACTGCAGACACGCAADTTTGAGGCCAC
T D E A T F T G T F A D D T T I M A T A D T Q F E A T
AGAAATACTACAACGAACAGTAGACAAAGTTTACCAATGGACCACTGACTGGAAGATCAAAATCAATGATACCAATC
E I L Q R T V D K V Y Q W T T D W K I K I N D T K S
CACTCATGTCACATTTGCATTGCGAAAAACATCGAGCAATCATAAGGTTTATCTCAACGGAACCTCTGTTCCGCAAGC

T H V T F A L R K T S S N H K V Y L N G T P V P Q A
AGATACAGTTAAACTTCTTGGCTTGCATCTTGACAAGAGGCTAAGCTGGAAACACCACGTTCAACAAAAAGTCAAACA
D T V K L L G L H L D K R L S W K H H V Q Q K V K Q
AATAAAGTTCAAAACACGCAAAATGTATTGGATGGTTGGACCAATCTCAACTAAGCCTGTATAACAAAAAGCTGAT
I K F K T R K M Y W M V G H Q S Q L S L Y N K K L I
TTATCAAACCATCTTTAAACCGATCTGGACGTACGGAATCCAATCTGGGGATGTACTAAAAATCCAATCGTGAAAT
Y Q T I F K P I W T Y G I Q L W G C T K K S N R E I
CATCCAAAGATGTCAAACAAGTTTCTGCGAATGATCACAAACGCCTATCAATTTGAGACCAACGAAGAAATCCACAA
I Q R C Q N K F L R M I T N A Y Q F E T N E E I H N
CGATCTCAACATCAAACAAATTTCCGAGGTTATCCAGGAATACGCCATCAAACATGAAAAAGGCTACTACACCATAC
D L N I K Q I S E V I Q E Y A I K H E K R L L H H T
CAACATAGAGCCATCCGACTCTTGGATATCACCTACGAATTGAGAAGGCTGAAACGAACCTAAGCCTCATGAGCTAAC
N I E A I R L L D I T Y E L R R L K R T K P H E L T
GTGTTAAATTAATAAACTCAGCGAACCTAATCATTCTTGTCTCGTTCTAGGAGCTGCACACTGGTATAGTGGCCCTA
C *
CACCCGTCTTATGCTTATCATCATCTTCAACAAAAATGATATTAAGCACAATTCAAAAGTGCTAATAAATTAACATAG
TTAAGATTGTAGTGGTCATGCTAATAAAAGCGTTTTTAAAAAAGGCTTTTGTGAGGTGATTTCCAGCACACTTTAC
ACATTTCCGTTCCCTGCAACAGATAGCCTTAGTGTGTCCAAGTCTCTGGCAACTGGTGCACTGTGGAATCACTTTAAT
TTTCTTTGGAGGTTCCACGGTGATTTTGCATGAAGTAGGTCTTTAATGTTGTAGACCTCCTTATTGTTGTCTTTTCGG
GTGTAAGTCCACGTAGAACAGTGGAAAGTTTATGATACTTTCTCGCCGTTATTTTTCACAGTTTTTCTGATATTTGT
AACTGCAGCAACTTCGTGAGCATCTACAGCAGTTTTAATGTCGTTGTGCGGGATTGTATAAGGTAGTCTCTGAATAC
TACCCTAAATAATCTATCGCTTTTCAGCTGATGAGTGTGGAATTGGATTTTGTCTTAGCTCTCCATCATTCTGTTTT
GATACTCTTCAGCAGTTCTTTCATGTCCCTATATTCTTTTTCAGTTTGAACAGTCACTTTGATGTCTGTGTTTGAAG
AGCTTTGAACTGTGCACTCGGTGCTTTGTTTCAGAATCCTCTTTTGAACGGGAAAAATCCTTGATGTTACTCACGAA
AGTGGGAGGTGGCAACGGACGATTTTTTGGCTTTTTGTCTTTATTCAATTTCCATTGGTTTTTGGATAGAATTTTAGG
GGGAGTTTTAGTCTTTGTCTCTCTCTCTTTCTTGGTTGATCTTGAGAGACGAAAGTAAGATTTTCGAGTTCGTTTTT
ATCCGCTTGTTCGCCTCGTGTGTCTAGGCTTCCGAATAGATTGTTCTGGAGCAACTCGTTGGATCCTGGGACAAACA
TTGACTTTTTAGAGGGAAACGTCGCTGCTTCATTCTGCAATTTCTTGCCGTAATTGTGCAATGATGGATTTTTGTG
TTGAAACTCATTTAATAGGTAATCATAAGACATTTGTGTCCGTTGGCAACAACCTTGATTGAATTGCATTATGCTGGC
TAATATTTTACACGTGGTTATAATATCACACAGCACATAACCTTTTATGGTTTCTTATAAAATAAAATAAAATAAAC
ACAGTCCGTACACAGTGTGTTTTTGCACGGTGTTATATTAATAGTTTTGTATTTGATAATTGTTTTGATAATTGTTTT
TTTTTATATTAATAAAATAAGAAAAAAGACAATAAACTTCTAGAATGTTCTCATGAAGCATGGTGTCTTTGTT
GCACTTCTATAATTTCAATTGTTTCGCAACACAGTTATTAGCACAGATGTTCTCTGTTTGAAGCTACACATCGACTG
ACTTTGGTAAGTGAAACGAAACCAAAGTAAACCTAACAGACGCTGCTAAGTAACCCAGTACTATCAAGTATAGGCAT
TTCGTCCATAACCTTAGCATTGCCATTTTGGAAACCTCGAAATACTAGGAACAACTAAACACTTCAACAGTTCAAAA
AGTTTCAAAAAGAACCAAGAAACTTTTTTTTTTAACTTGTATATCAAACTGGTCAATTAGACCAACCATTA
TATTATAATTTAACAATGTAGGTTTTTATATTTTTTACAAAGAATCCATTAATTACTTTGCACTTGATTTATGTG
TTGACGCCAACCGAAGGGAGATTCAAGAGTGTGTTACTCTTGTCTGTCTACAAGTTCAAAAGTTTGTATCCTTTTAA
GTCGTCTAATATTAGAAGTTCAAGTGCTTCAGGATTTTCATGTTGTAATAGTCCGTCTTCATGTTTTGCAGCAATCTG
TTTAATGACCTCAGCTACCATAGGAACCTTAAGATCTCGATGGATGTCAATGTTACGGGCATACTAAGGTGCGCTGAT
TATTGTTCTTAATGATTTGTTTTGAAATCTCTGTATTTTTAATATATTACTTTTACTAGTACATCCTCAGAGTTGGAT

Figura 57 – Sequência de nucleotídeos do gene RaTART com a tradução consenso das ORFs I e II. Na ORF I, pintado de cinza o domínio MHR e na região N-terminal em sublinhado duplo os 3 motivos CCHC. Na sobreposição das ORFs o sublinhado representa o códon de terminação da ORF I e pintado de cinza o códon de iniciação (Metionina) da ORF II. Na ORF II, em negrito o domínio de endonuclease e em negrito pontilhado o domínio de transcriptase reversa.

A família dos retrotransposons non-LTR presentes em insetos possuem uma sequência fortemente conservada na mesma posição que o motivo MHR viral (Pardue *et al.*, 1996). Um alinhamento entre a sequência presente no motivo MHR identificado no elemento RaTART mostrou uma alta similaridade com os motivos presentes na proteína *gag* dos retroelementos HeT-A de *Drosophila melanogaster*

Drosophila virilis HeT-A gag **AAQ75089.1** e *Drosophila melanogaster* Doc gag **CAA35586.1**.

O alinhamento foi realizado utilizando o programa ClustalX 1.83 com os parâmetros padrão e a árvore filogenética gerada utilizando o método *Neighbor Joining* (NJ). A análise filogenética da proteína *pol* do elemento RaTART de *Rhynchosciara americana* mostrou um agrupamento com elementos non-LTR do clado Jockey, onde retroelementos teloméricos (TART e TAHRE) também se agrupam. Pode-se observar que o clado Jockey nesta árvore apresenta altos valores de *bootstrap*, possivelmente sugerindo que RaTART é um novo membro desse clado (Figura 59).

Figura 59 – Relação filogenética entre retrotransposons non-LTR de diferentes espécies, usando seqüências de proteína *pol*.

A proteína *gag* do elemento RaTART de *Rhynchosciara americana* se agrupou com proteínas *gag* dos retroelementos TART e HeT-A de *Drosophila virilis*. Esse grupo está claramente separado do grupo que contém os retroelementos Doc e jockey de *Drosophila melanogaster*, sugerindo que elementos teloméricos constituem um subclado do clado Jockey (Figura 60).

Figura 60 – Relação filogenética entre retrotransposons non-LTR de diferentes espécies, usando seqüências de proteína *gag*.

A principal diferença entre os elementos de retrotransposição teloméricos e outros membros da clade Jockey é simplesmente o sítio alvo da transposição.

4.12.1. Análise Genômica do Retroelemento RaTART

O experimento de Southern genômico foi feito utilizando DNA de mosca e DNA de pupa clivados com as enzimas de restrição EcoRI e HindIII (Promega/Invitrogen), como sonda utilizou-se o clone de cDNA *pol* que apresenta homologia a transcriptase reversa (Figura 61).

Figura 61 – Esquema do gene RaTART com os sítios de restrição EcoRI e HindIII e as ORF I e II. A faixa mostra a região do cDNA *pol* que foi utilizado como sonda nos experimentos de Southern Blot.

De acordo com a figura 61, que mostra o mapa de restrição do gene RaTART e o fragmento de cDNA *pol* que foi utilizado como sonda, as marcações que seriam esperadas estão presentes no Southern (Figura 62). Observa-se uma relativa abundância deste elemento no genoma de *Rhynchosciara americana*, e o padrão de distribuição com bandas repetitivas (com uma banda muito forte), indicam a presença de um elemento de repetição no genoma de *Rhynchosciara* que envolveria uma transcriptase reversa.

Figura 62 - Southern genômico utilizando como sonda o clone de cDNA *pol*, com homologia a transcriptase reversa. Raias: 1kb plus ladder (Invitrogen), 1) DNA mosca digerido com Eco RI; 2) DNA mosca digerido com Hind III; 3) DNA pupa digerido com Eco RI; 4) DNA pupa digerido com Hind III.

Um segundo tipo experimento de Southern genômico com DNAs de diferentes estágios do desenvolvimento de *Rhynchosciara americana* (1-DNA larva de 1 dia; 2-DNA larva primeiro período; 3-DNA larva segundo período; 4-DNA larva terceiro período - início de rede; 5-DNA larva quarto período – pufe B-2; 6-DNA larva quinto período – pufe C-3; 7-DNA mosca fêmea) digeridos com a enzima de restrição EcoRI (Promega) e como sonda utilizando o clone de cDNA *pol*, foi realizado (Figura 63). Os resultados mostraram um padrão de marcação constante em todos os DNAs utilizados, e os fragmentos marcados estão de acordo com o esperado pelo mapa de restrição do gene RaTART.

Figura 63 – Southern blot genômico de *Rhynchosciara americana* de diferentes estágios digeridos com a enzima de restrição EcoRI e como sonda utilizou-se cDNA com homologia a transcriptase reversa do retroelemento non-LTR RaTART: PM -1kb Plus Ladder (Invitrogen); 1) DNA larva de 1 dia; 2) DNA larva primeiro período; 3) DNA larva segundo período; 4) DNA larva terceiro período - início de rede; 5) DNA larva quarto período – pufe B-2; 6) DNA larva quinto período – pufe C-3; 7) DNA mosca fêmea.

Uma repetição deste tipo foi descrita envolvendo o retrotransposon TART (Pardue *et al.*, 1996) que atua na formação do telômero em *Drosophila* via transposições seqüenciais em conjunto com o elemento HeT-A, o único retrotransposon que não possui transcriptase reversa. Um outro elemento que também foi descrito como participante da reconstituição do telômero em *Drosophila* denominado TAHRE (*Telomere-Associated and HeT-A-Related Element*) (Abad *et al.*, 2004b). Estes elementos nunca são encontrados na eucromatina, parecem desenvolver com exatidão a função celular que lhes foi conferida, a de fazer a

manutenção na região do telômero. E é por sucessivas retrotransposições em *tandem*, seguindo sempre a mesma orientação, que se inserem nas extremidades dos cromossomos, formando um sistema de manutenção robusto e eficiente. Sem dúvida é uma vantagem evolutiva para esse sistema que conseguiu converter um DNA considerado parasita para seu próprio bem estar.

A determinação do número de cópias de elementos de retrotransposição RaTART que ocupam o genoma de *Rhynchosciara americana* foi estimada por reação quantitativa de PCR. Foi feita uma análise relativa entre o retrotransposon RaTART e o gene RaGAPDH (gliceraldeído 3-fosfodesidrogenase), que sendo um gene cópia única foi utilizado como controle.

A fórmula utilizada para o cálculo da Quantificação Relativa (QR) foi $QR = 2^{-\Delta Ct}$ e foram utilizados os valores médios de Cts, os experimentos foram feitos em quintuplicatas (Tabela 07). No entanto, para utilização dessa fórmula, os primers são avaliados quanto à eficiência e especificidade (Yun *et al.*, 2006). E ainda assim o resultado obtido é uma estimativa do que seria o valor real.

Tabela 07 - Valores de Cts para os genes RaTART e RaGAPDH de *Rhynchosciara americana*, os experimentos foram realizados em quintuplicatas e M representa o valor médio de Ct utilizado no cálculo da quantificação relativa.

Ct RaGAPDH	Ct RaTART
22,73	14,74
22,54	14,79
22,40	14,70
22,38	14,73
22,28	14,86
M 22,46	M 14,76

O resultado obtido foi de QR = 208 cópias, no entanto se considerarmos que o gene cópia única em uma célula diplóide tem duas cópias, o resultado é aproximadamente 104 cópias do retrotransposon RaTART no genoma de *Rhynchosciara americana*, isso equivale a aproximadamente 1 Mb do retroelemento cobrindo as regiões teloméricas.

A hibridização *in situ* foi feita nas glândulas salivares de *Rhynchosciara americana* e como sonda utilizou-se o elemento de retrotransposição RaTART, tanto o clone genômico quanto o cDNA *pol* que apresentaram homologia com transcriptase reversa. As imagens obtidas ao microscópio confocal de varredura a laser são apresentadas na figura 64, de um modo geral os cromossomos apresentaram marcação freqüente nas regiões distais. Na figura as setas indicam as marcações observada nas extremidades dos cromossomos politênicos A, B e C da glândula salivar de *Rhynchosciara americana*, cromossomos positivos na maioria das células.

Figura 64 – Imagens obtidas ao microscópio confocal de varredura a laser da hibridização *in situ* do elemento de retrotransposição RaTART, nos cromossomos politênicos da glândula salivar de *Rhynchosciara americana*. Os cromossomos (A, B, C e X) estão identificados, A) os cromossomos corados com iodeto de propídeo em vermelho; B) regiões positivas (verde) para a sonda do retroelemento marcada por digoxigenina-FITC; C) a junção dos dois canais. D) cromossomos B e C em maior aumento. As setas indicam as extremidades marcadas.

O retrotransposon RaTART trata-se de um possível elemento telomérico em *Rhynchosciara*; a marcação predominante nas extremidades dos cromossomos e sua homologia com elementos teloméricos, nos leva a acreditar que se trata de um elemento retrotransposon tipo TART, responsável em *Rhynchosciara* pela reconstrução do telômero.

Uma questão curiosa sobre a evolução desse tipo de retrotransposon associado à região telomérica é se esse elemento evoluiu de um típico elemento non-LTR. Se isso fosse verdade seria possível identificar elementos de retrotransposição tipo TART em outras regiões que não as regiões teloméricas ou subteloméricas. De fato, a localização nos cromossomos politênicos de *Rhynchosciara americana* do elemento de retrotransposição non-LTR RaTART em regiões da heterocromatina pode ser um indicativo que esse elemento tenha evoluído para a função de manter a estabilidade cromossômica através da sua transposição na região telomérica.

Para determinar se havia alguma expressão do retrotransposon de *R. americana* RaTART, foi realizado um Northern Blot utilizando RNA de glândula salivar de quatro estágios do desenvolvimento da *Rhynchosciara americana*: segundo período (2P – raia 1) início de rede (IR – raia 2), pufe B2 – raia 3 e pufe C3 – raia 4. Como sondas foram utilizados subclones do fago isolado denominados: RT4-2.6E com homologia à proteína *gag*, presente na ORFI destes retroelementos, e o RT4-2.0H, que apresenta homologia à transcriptase reversa, presente na ORFII destes retroelementos (Figura 65).

Figura 65 – Esquema do gene RATART indicando os subclones utilizados no experimentos de Northern Blot, RT4-2.6E que contém a ORF I e RT4-2.0H que contém ORF II.

Os RNAs foram tratados com solução de glyoxal-DMSO, como descrito em materiais e métodos, e foram utilizados 6µg de RNA por raia (Figura 66).

Figura 66 – Northern Blot com RNAs de diferentes estágios do desenvolvimento larval de *Rhynchosciara americana*: 2P – segundo período; IR – início de rede; B2 – pufe B2; C3 – pufe C3. (A) sonda RT4-2.0H homologa a transcriptase reversa ORFII e (B) sonda RT4-2.6E homóloga a proteína *gag* ORFI. A seta de cima indica tamanho aproximado do transcrito 8,4Kb e seta de baixo indica tamanho aproximado de 6,5Kb.

Os resultados na figura 66 indicam que o retroelemento RaTART apresenta-se transcricionalmente ativo e os RNAs de alto peso molecular, marcados entre 6,5 – 9,0 kb, representam provavelmente transcritos do elemento *full-length*, sugerindo que é transcrito em um único mensageiro, fato bastante observado em retroelementos tipo non-LTR.

Fato como este foi relatado em *Drosophila melanogaster*, onde os elementos de transposição teloméricos (Het-A e TART) apresentam diferentes padrões de transcrição e transcritos *full-length* (Danilevskaya *et al.*, 1999). Os transcritos *full-length* de elementos de retrotransposição servem como mRNA para tradução das proteínas *gag* e *pol* e o mesmo transcrito pode ser utilizado para a transposição em um novo sítio cromossômico.

O experimento de qRT-PCR foi realizado para determinar o nível de expressão desse retrotransposon em diferentes períodos do desenvolvimento na glândula salivar de *Rhynchosciara americana*. Como controle da expressão constitutiva foi utilizado o gene GAPDH (gliceralceído 3 - fosfato desidrogenase) e os cálculos foram realizados utilizando o método de delta-delta Ct.

Os resultados obtidos mostram que ocorre um aumento no nível de expressão do retrotransposon RaTART ao longo do desenvolvimento (Tabela 08). Esse aumento chega a 6X ao longo do desenvolvimento quando o larva atinge o estágio de pré-pupa.

Tabela 08 – A tabela mostra os estágios do desenvolvimento larval de *Rhynchosciara americana* que foram utilizados; sendo segundo período (2P), início de construção do casulo comunal (IR), período em que o pufe na região 3 do cromossomo C está em expansão (C3) e pré-pupa, e a concentração relativa do transcrito.

Estágio Larval	Concentração Relativa
2P	1,00
IR	1,22
C3	2,05
Pré-pupa	6,14

O experimento de RNA de interferência foi realizado para bloquear o retrotransposon non-LTR RaTART de *Rhynchosciara americana*. O RNA dupla fita foi sintetizado a partir da região codificante da ORFII do gene do retrotransposon,

ORF que codifica a transcriptase reversa (Figura 67), o dsRNA apresentou aproximadamente 800 bases e foi obtido por transcrição *in vitro* com subsequente purificação em coluna de afinidade (Figura 68). O dsRNA RaRT foi eluído em tampão osmoticamente compatível com a microinjeção nas larvas (PBS), e injetado cerca de 0,15µg de dsRNA de RaRT para o silenciamento deste gene (RNAi) em larvas de *Rhynchosciara americana* no segundo período do desenvolvimento. Como controle negativo não se injetou nada, deixando as larvas seguirem seu desenvolvimento normal, uma vez que testes com injeções de PBS já haviam mostrado que este controle é desnecessário.

Figura 67 – Mapa de restrição da região genômica da ORF II do retrotransposon RaTART, evidenciando a região que foi construída a dsRNA.

Figura 68 – dsRNA RaRT sintetizado (800pb): PM - 1 kb Plus Ladder (Invitrogen); 1) dsRNA RaRT.

Após 18 dias de experimento o grupo dsRaRT injetado começou a sintetizar o casulo comunal, enquanto as larvas do grupo controle permaneciam em segundo

período andando e comendo (Figura 69). No vigésimo dia de experimento as larvas injetadas dsRaRT já apresentavam um casulo com consistência firme, mostrando um avanço acelerado no final do desenvolvimento larval, enquanto isso não se observava qualquer alteração no grupo controle (Figura 70). Na figura 71 pode-se comparar o avanço no desenvolvimento do grupo injetado dsRaRT em relação ao grupo controle, com 21 dias de experimento.

O grupo de larvas injetadas dsRaRT completou seu desenvolvimento, tendo-se observado a metamorfose das pupas em moscas aparentemente normais, sem nenhuma alteração drástica na morfologia deste sciarídeo. Já o grupo controle somente após 35 dias de experimento começou a síntese do casulo comunal, seguindo até o final do desenvolvimento.

Figura 69 – Dezoito dias de experimento, (A) larvas injetadas dsRaRT começam a tecer o casulo e (B) grupo controle permanecem em segundo período.

Figura 70 – Vinte dias de experimento, (A) larvas injetadas dsRaRT apresentam o pupário com consistência firme e (B) grupo controle permanecem em segundo período.

Figura 71 – Vinte e um dias de experimento, (A) larva do grupo controle ainda em segundo período, (B) e (C) grupo injetado dsRaRT onde a muda já é evidente.

O silenciamento do gene de transcriptase reversa parece interferir no desenvolvimento larval, acelerando todo o desenvolvimento. A análise citológica mostra que não houve nenhum tipo de alteração morfológica no desenvolvimento dos pufes, que apesar da dsRaRT acelerar o processo da metamorfose, o desenvolvimento larval procedeu-se normalmente. A figura 72 mostra os cromossomos politênicos da glândula salivar de *Rhynchosciara americana* do grupo controle e do grupo injetado com 20 dias de experimento. O padrão de bandas dos cromossomos no grupo controle é típica de larvas jovem, referente ao segundo período do quarto estágio do desenvolvimento larval. Enquanto no grupo injetado é possível identificar pufes compatíveis com o aparente estágio de desenvolvimento larval. Estão assinaladas as principais regiões cromossômicas em que foram observados pufes nas larvas injetadas e é interessante notar que o padrão de bandas sugere que houve amplificação nos pufes de DNA, embora esta não tenha sido quantificada.

Figura 72 – Fotomicrografia dos cromossomos politênicos das glândulas salivares de larvas no 21^o. dia de experimento: A) e B) controles; C) e D) injetadas com dsRaRT, com aspecto mais desenvolvido e retiradas do casulo e E) injetadas, apresentando desenvolvimento menos acentuado (ver larvas na figura 71). Os cromossomos estão identificados pelas respectivas letras e a regiões correspondentes aos principais pufes observados estão assinaladas por traços.

4.13. Caracterização da Estrutura Molecular do Retroelemento RaR2 rDNA

Este elemento de transposição foi isolado do genoma da *Rhynchosciara americana* a partir de uma varredura em um banco genômico, construído no bacteriófago lamba Dash II (Stratagene), e utilizando como sonda um clone pRa1.4 rDNA, que contém um longo fragmento do rDNA (figura 73). Na varredura foram isolados quatro recombinantes, dos quais dois continham a inserção no gene 28S do rDNA.

Figura 73 - Esquema do recombinante pRa1.4, mostrando alguns sítios de restrição, que contém o rDNA de *Rhynchosciara americana*.

A estrutura molecular do elemento de retrotransposição foi identificada, e o elemento denominado R2Ra, uma vez que apresenta como sítio específico de inserção a região correspondente ao gene 28S do rDNA (Figura 74). O elemento caracterizado em *Rhynchosciara americana* trata-se de um retrotransposon non-LTR que *full-length* apresenta cerca de 4055 bases de comprimento, e o sítio de inserção deste elemento que é considerado altamente conservado entre os artrópodes pode ser identificado (5' TTAA/TAGC 3') (Burke *et al.*, 1999). O elemento *full-length* R2Ra de *Rhynchosciara americana* aparece maior que os elementos descritos de *D.melanogaster* e *B.coprophila* ambos com no máximo 3600 bases (Eickbush & Eickbush, 1995; Burke *et al.*, 1993), porém mais próximo em tamanho que o elemento R2Bm de *Bombyx mori* que possui 4200 bases (Burke *et al.*, 1997). Um ATG na posição 719 da ORF do retrotransposon inicia um quadro de leitura que codifica uma proteína com 1009 aminoácidos. O códon de terminação amber (TAG)

no nucleotídeo 3745 e um sinal de poliadenilação (AATAAA) na posição 3910, identificam um elemento possivelmente funcional no genoma de *Rhynchosciara americana* (Figura 75). A ORF do elemento R2Ra possui a mesma orientação da unidade de rDNA e uma vez que não foi identificado uma região promotora na ORF do elemento R2Ra, este pode ser transcrito juntamente com o gene de rDNA. As regiões UTRs do retrotransposon são longas, a 5'UTR possui 717 bases enquanto a 3'UTR apresenta-se um pouco menor com 309 bases.

Figura 74 – (a) Sítio de inserção do retrotransposon no gene 28S rDNA, (b) Esquema do rDNA com as porções 28S, 5.8S e 28S do ribossomal identificadas, e o sítio de inserção do retrotransposon R2 no gene 28S rDNA destacado, mostrando características da estrutura do elemento, com o motivo *zinc finger* na região amino-terminal (CH) e o domínio de transcriptase reversa (RT).

CCGAAAATAAGTGTAGGCGTTATTTTTTTCAGGGAAATAACCCCTCTTGTTTCGGAAATAAGGTGTGGTAA
 ACTAAAATTCGGGGGCGGCCCCGAATTTTGGTACATATTGAGAAGGGCCACATAGGATCCCGCGGGA
 TGGGTTTCCTTCAAGTGTTCCTAAAAGGCCCCCAGGGATATTTTCTGAAAATTGACTTTTGTGTTTGGCC
 ACCCTGTGTTTTTTCACCCCTCAGGGGGCCCTAAGTTTAAAAAGGTTCCGGGAAATTTACCAGCTCCGGC
 CCATTGTTTTTGAATCTTAAACTCGGTTGTGGCCCGTTTTCCTTAGGGGGGACCAGGTCTTTGGGGGG
 GAAACCTATTGGTTATTGCAAAATGGGAGGAGAAATGCCCAAAATTTTGCCCCGATAATTGTGCCGGAA
 AGCCGGTATTTGAATGAAATGGAATGCTGTAGGGGAAACATGATCCCTTTTTGGACAGTAAACCTTTAGC

← 28S rDNA ↓ 5'utr →

CTTAGGGGGAGCTATGATTAA CAAGATCCCAGCTTCCATGGAAGCAAAGAAAATGTAAGTCCCCGTAGTG
 ATAAGTGGTGAAGAGTCTTGTAATCACCGTAACCTAGGTTTCAGGTTCTGGGGATGCCATGAACCTTAGCGG
 GAGTATGGTTAGCAGATCTACCAGCTACCACTATTAATGATAATATGTAAGCCGAGTAGCGCTAAGTG
 GTGTACAGATTTGCAACCTCCGTAACCTAAGTTCTGTTTCGATGGACTAGGGGGAATCATGATTAACAAGA
 TACCAACTTACATGGAAGTTATGAAATGTAAGTCACAGTAGTGATAAGTGGTGAAGAGTCTTGTAATCAC
 CGTAACTAGGCCAGATGTAGTCAAAGCACATGTTTAGGGGGAACAAGGTTAACATTGGTAAAAGACCAAT
 GCAACCTCCGTAACCTAAACGTGAAGGCACAAAACCTAAAAGTCCAGTGGATGACAGGTGAGGTGATCAGT

GACCCAAATGTTTTAAGCTCATCATAACAACACGGTGAAAAATCCAGCATTTATTTGCCTGATTGAGTAG
CTTCCACACTATTCCAAAGCCGAACCTATCTGGGTTTTTCTTGAAAGGCCGTATAGGGCATATGTCGAGA
AATAAGTCCAAGGTGAGGTAGTGTGGCCCTGTACCCAGGGGTAAGGTACTATACGGTCGAGTGGCTCAGT
AGGCCTAACTAGCCACTGAGTCACTATAATGACTAGTTATGAGCAACTACAATGAAACAAACACGAGTGG
M S N Y N E T T T S G
TGGGGATAACCTCGGATGGCCACTCAAACCACTGGATCGCTATCCAGTGGACCAATTAACCAGCACACA
G D N P R M A T Q T T G S L S S G P I N Q H T
TGTGAACTATGTTGTAGGACATTTGGTACACGTGCCGGATTGGGACAACATGTGAGAAAAACCCATCCAA
C E L C C R T F G T R A G L G Q H V R K T H P I
TTGAGTCCAACCAAAGCATTAATGTAGAACGAAAGAAAAGAGATGGTCACCTGAAGAGATAAGACGTAT
E S N Q S I N V E R K K R R W S P E E I R R M
GGCGAATATGGAAGCCCAAGCTACCATAAACACATCAAACACTTAACTCAATACCTTGCAACTTACCTT
A N M E A Q A T I N N I K H L T Q Y L A T Y L
CCTCAAAGAACCTTTGAACGCTATTAAAGGAAGGAGAAGAGATGCTGAGTATAAAGAACCTGGTGACCGGCA
P Q R T L N A I K G R R R D A E Y K E L V T G I
TTATAGCAAATCTTCGGAGTAATTCCAGTACACAACAAACCAATCAGGTCTGTAATGAAAGTGAAATGTC
I A N L R S N S S T Q Q T N Q V C N E S E M S
ACAACGCAGTAAGATACTGCAAAGTATACGAGAAAGCGTACGTGACTTGAGAAGTAGACGTAATAAATAT
Q R S K I L Q S I R E S V R D L R S R R N K Y
GCGAAAGCATTACAAGAGCTTGGGGAAGCAGCATTTGTGCGGTAAAATGTTGAACGAAGAACAGCTAATAC
A K A L Q E L G E A A L C G K M L N E E Q L I H
ATTGTATAAAGTCAATGTTCAACACCGCTAAGTGTCCGAAAGGACCAAGATTTTCGAAAACCTGCAACCCA
C I K S M F N T A K C P K G P R F R K T A T H
CAGTGGAACAAATAAGCAACAACGGCAACAACGATATGCTAGGGTGCAGAAGTTGTACAAAATGAACCGA
S G T N K Q Q R Q Q R Y A R V Q K L Y K M N R
AAGGTTGCCGCAAAAATGGTGTTAGAAGAAACGGATAAGATAACAGATAAAAGTTACCGGACCATGATCCGA
K V A A K M V L E E T D K I Q I K L P D H D P M
TGTTCAAGTTTTGGGAAAGTGAATTTAAGGAGGGCGAAGGCATGCCGAAAGGATGCCCAAGGATCTGAA
F K F W E S E F K E G E G M P E R M P K D L K
GGAATCGCCCCGACTTAAAAGCGATATGGGATCCGGTAACTGAAGAGGAAGTTAGAAAGGCAAAAGTGGCG
E S P D L K A I W D P V T E E E V R K A K V A
AATAACACCGCGGCAGGTCTGTGGAATTCAGCCGAAATCATGGAACAGGATAAGTTTTAAATATAAGA
N N T A A G P D G I Q P K S W N R I S L K Y K T
CGTTAATATACAACCTTACTCCTGTACTATGAAAAAGTTCCACATAAGCTTAAGGTGTACGAACTGTGTT
L I Y N L L L Y Y E K V P H K L K V S R T V F
TATTCTAAGAAAAAAGATGGATCCAGTGATCCTGGTGAATTCGACCTCTTACAATATGTTTCAGTGGTC
I P K K K D G S S D P G E F R P L T I C S V V
CTTAGAGGTTTCAATAAGATCCTTGTGCAGAGGCTTGTATCCCTATATAAATATGATGAAAGGCAAACAG
L R G F N K I L V Q R L V S L Y K Y D E R Q T A
CTTATTTGCCTATAGATGGTGTGGGCACGAACATACACGTGCTTGCGGCGATACTCAATGACTCGAACAC
Y L P I D G V G T N I H V L A A I L N D S N T
AAAACCTGAGTGAACCTGCATGTAGCGCTATTGGACATTACGAAAGCATTCAATCGCCTACATCACACATCG
K L S E L H V A L L D I T K A F N R L H H T S
ATAATCAAATCCTTAGTGGAAGGGGTTCCCTTATGGATTTATTACTTTTCATCAGAAGAATGTATACGG
I I K S L V G K G F P Y G F I T F I R M Y T G G
GCTTACAAACGATGATGCAATTTGAGGGCCACTGCAAAATGACACAAGTGAACAGAGGAGTCTACCAAGG
L Q T M M Q F E G H C K M T Q V N R G V Y Q G
AGACCCCTTAAAGCGGGCCAATCTTTTGTGGCTATTGAAAAAGGCTTACAAGCTCTTGATAAGGAAGTT
D P L S G P I F L L A I E K G L Q A L D K E V
GGCTATGACATAGGGGATGTGAGAGTCAATGCAGGTGCTTACGCAGATGATACGAACTTGGTTGCAGGAA
G Y D I G D V R V N A G A Y A D D T D L V A G T
CGAGACTTGGCTTGCAAGACAACATAAACAGGTTTTCAAGTACTATTAAACAGGTTGGACTTGAGGTAA
R L G L Q D N I N R F S S T I K Q V G L E V N
TCCAAGAAAGTCAATGACATTGTCTCTGGTACCTTCGGGGGAAAGAGAAGAAATGAAAGTAGAACTGGC
P R K S M T L S L V P S G E R E E M K V E T G
AAACCTTTTCAGAGCGAACGATGTTCTCTGAAGAACTGTCAATTAATGATTTTTTGAGATACCTGGGCA
K P F R A N D V P L K E L S I N D F W R Y L G I
TAAGCTATACGAATGAAGGGCCTGAAAGACTGAGTCTTACAATAGAGCAAGATCTAGAACGCCTAACTAA
S Y T N E G P E R L S L T I E Q D L E R L T K
AGCTCCATTAAAGCCACAACAACGGATACATATGCTTAACGCATATGTAATACCTAAATATCAAGACAAA
A P L K P Q Q R I H M L N A Y V I P K Y Q D K

CTTGTCTTGAGTAAAACACGGCAAAAGGGCTGAAGCGAACAGATAGGCAGATAAGGCAATATGTAAGAC
 L V L S K T T A K G L K R T D R Q I R Q Y V R R
 GATGGCTAAAGTTACCACATGATGTTCCAATTGCATATTTGCATGCACCAGTTAAATCTGGTGGCCTAAA
 W L K L P H D V P I A Y L H A P V K S G G L N
 CATTCCATGCTTGCAATACTGGATAACCATTACTTAGAGTAAACAGAGTCAATAAGATTACAGAAAAGTCAA
 I P C L Q Y W I P L L R V N R V N K I T E S Q
 CGCAGTGTACTTGCAGCGGTTGGTAAAAACAGCCCTGCTAACGTCAACTGTTTATAAATGTAATCAGTCTC
 R S V L A A V G K T A L L T S T V Y K C N Q S L
 TAGCAACATTGGGTGGAAACCCAACAATGCTTGCATATCGAACGTATTGGGAAAAAGAGCTATATGCAAA
 A T L G G N P T M L A Y R T Y W E K E L Y A K
 GGTTCGATGGGAAAGACCTACAAAATGCGCGGGATGATAAGGCTTCGACGAGGTGGAATGGCATGTTGCAT
 V D G K D L Q N A R D D K A S T R W N G M L H
 AGTGACATTAGTGGAGAAGACTATTTGAATTATCATAAGCTTCGAACAAATAGTGTACCCACTAAAGTAA
 S D I S G E D Y L N Y H K L R T N S V P T K V R
 GAACGGCAAGAGGACGTCCTCAAAAGGAAACGCTTTCGAGAGGTGGTTGTAAAAGCACGGAAACGCTGCA
 T A R G R P Q K E T S C R G G C K S T E T L Q
 ACATGTAGTTCAGCAGTGTGCATAGAACACATGGGGGAAGAACTCTAAGACATGACAGGATTGTGGGTCTT
H V V Q Q C H R T H G G R T L R H D R I V G L
 CTCCAACATGAACTACGCCGAGACTATAATGTCTTAGCTAAACAAGAACTAAAAACGGGCATAGGGTTGC
 L Q H E L R R D Y N V L A K Q E L K T G I G L R
 GCAAACCGGATTAGTTCTTATAAAAAGATGACACTGCACACATCGTTGACGTGCAAGTCGCAAGGTGTAG
K P D L V L I K D D T A H I V D V Q V A R C S
 TAAACTGAATGAAAAGCCATGTAAGGAAGCGATCCAAATACGACAAGAAAGAAATAGAGGTAGAAGTAAAA
 K L N E S H V R K R S K Y D K K E I E V E V K
 AGTAGATATCGTGTAAGTAAGGTGATGTATGAAGCTTGCACGATATCATACAAAGGTATTTGGGAATTGC
 S R Y R V S K V M Y E A C T I S Y K G I W E L Q
 AGAGCGTGATGAGCATGAGAAGACTTGGAGTAAGTGAATACTGTCTTTTCAAGATTGTCACATCAACACT
 S V M S M R R L G V S E Y C L F K I V T S T L
 AAGAGAACATGGCTTTGTTGGAAACGGTTCAATATGATCACTAGTGTTCGATCATAGAAATGTGTGCCGA
 R G T W L C W K R F N M I T S V R S *
 TAAGGTGTGAATAGAAGGTTTACCAAGAGGAGACCTAGTTTGGACCTCAGAAATGGGGTCATAGGAGT
 GATAGGTTGTAAAGCCGTTGGGGAATCCGGCTACACATGGTATCTCAGGAGCCATTTCATGCGCTGATCTC
 ATTAAGGCGTAATAAACTGTGAAACAGATCCTGATAATGCCGTGCTACCAAATGATGTAACGAGGCGGAA
 ATAAATTAATCTGGGGCGTTCTGCGGAATGACTACTAAATATAGCGATGCTATATATACAAACGACTGA
 3'utr ↓ 28S rDNA
 TGGTAACACCGGCCTTATAGCCAAATGCCTCGTCATCTAATTAGTGACGCGCATGAATGGATTAAACGAGA
 TTCCTACTGTCCCTATCTACTATCTAGCGAAACCACAGCCAAGGGAACGGGCTTGGAAATAATTAGCGGGG
 AAAGAAGACCCCTGTTGAGCTTGACTCTAGTCTGGCACTGTAAGGAGACATAAGGGGTGTAGCATAAGTGG
 GACATGTACACTTTTCGGTGCATATCAACAATGAAATACCACTACCCTTATTGTTTCCTTACTTACTTGA
 TTAAGGAGAAAGTAGTATTATTTTCTTAGCCTTTAGTGGAAGCCCAATTCCTTTGAAGTATTTTTTGGTTA
 TGGGTTTTTAATAACACTTCTATGTCAAAAAATCAGAGGTTTTTGGTATAGTACACGAAAGGTTCCAAATC
 GAAA

Figura 75 – Sequência de nucleotídeos com a tradução consenso do retroelemento R2Ra de *Rhynchosciara americana*, mostrando os prováveis sítios de inserção no 28S rDNA e motivos conservados. Motivo CCHH aminoácidos duplo sublinhado e motivo de ligação DNA c-myb pontilhado, em netrito itálico o domínio de transcriptase reversa. E na porção carboxi-terminal o motivo CCHC pontilhado longo e motivo conservado KPDLV pintado em cinza.

Na região amino-terminal alguns motivos de seqüências conservadas podem ser identificados. Um motivo Cys₂-His₂ (CCHH) tipo *zinc finger* está presente com a estrutura geral de Cys-X₂-Cys-X₁₁-His-X₄-His (apresentado na figura 75) foi identificado utilizando como ferramenta de análise o web programa ScanProsite

(<http://ca.expasy.org/tools/scanprosite/>). Esse motivo foi originalmente identificado no fator de transcrição TFIIIA e é o motivo de ligação ao DNA mais encontrado nas proteínas de eucariotos. Os resíduos conservados de Cys e His estão coordenados com um íon de zinco, enquanto três resíduos hidrofóbicos formam um core próximo do complexo metálico. O *zinc finger* formado liga-se a cavidade maior da dupla hélice de DNA fazendo o primeiro contato com a hélice nos resíduos das posições -1, 3 e 6 (Figura 76). Uma vez que todos os elementos R2 reconhecem e clivam no gene 28S rDNA, seria de se esperar que esses resíduos fossem altamente conservados. Foi o que Burke e colaboradores (1999) mostraram em seu trabalho, quando definiram que o motivo CCHH do retroelemento R2 contém uma Thr (Treonina) ou Ser (Serina) na posição -1, uma Gly (Glicina) na posição 3 e na posição 6 pode ser encontrado Val (Valina) ou Leu (Leucina). O elemento R2Ra de *Rhynchosciara americana* mostrou-se altamente conservado nas posições -1 e 3, no entanto na posição 6 o resíduo encontrado em R2Ra foi Gln (Glutamina) que embora não tenha sido consenso, também é encontrado em outros artrópodes, como caranguejo ferradura (*Limulus polyphemus*) e Jewel Wasp B (*Nasonia vitripennis*).

Ainda na região amino-terminal é possível identificar um outro motivo também bastante conservado entre esse tipo de elemento de retrotransposição, denominado de motivo de ligação DNA c-myb. Os motivos de ligação c-myb possuem em média 50 aminoácidos e contém na sua estrutura três domínios de α -hélices com a terceira hélice inserida na cavidade maior do DNA. A porção amino-terminal da proteína do retrotransposon R2 revela similaridade na sequência das regiões correspondentes ao início do primeiro e terceiro domínios de α -hélices do motivo c-myb. No elemento R2Ra de *Rhynchosciara americana*, esse domínio apresentou cerca de 44 aminoácidos (Figura 76).

	1		2
R2Ra	PVTEEEVRKAKVANNTAAGPDGI.....IYNLLLYEKKVPHKLKVSRTVFIPKKKDGSSDPGEFRPLTICSVVLRGFNKILVQRL		
R2Bm	PISEVEEIKASRFDWRTSPGPDGI.(15).MFNAWMARGEIPEILQCRTVFVP-KVERPGGPGEYRPISIASIPLRHFHSILARRL		
R2Bc	PVSLIEIKSARASNEKGAGPDGV.....LYNLFVFFYGRVPSPKGSRTVFTP-KIEGGPDGVRPLSICSVLLREFNKILARRF		

	3	4	5	6
R2Ra	QTAYLPIDGV.....LDITTKAFNRLHH.(42).NRGVYQGDPLSGPIFLLAIEKGLQ.....AYADDTDLVA.....			
R2Bm	.(09).QRGFICADGT.(25).LDFAKAFDTSVSH.(43).GRGVRQGDPLSPILENVVMIDLILA.(18).AYADDLVLLA.(20).			
R2Bc	QTAYLPIDGV.....LDLVKAFNSVYH.(42).LAGVYQGDPLSGPLFTLAYEKALR.....AYSDDGLLLA.....			

	7	8
R2Ra	GLEVNPRK.....RYLGIISY	
R2Bm	GLRLNCRK.(39).RYLGVDI	
R2Bc	GLRINSRK.....KYLGVVY	

Figura 78 – Comparação das seqüências de aminoácidos de segmentos do domínio de transcriptase reversa dos elementos: R2Ra de *Rhynchosciara americana*, R2Bm de *Bombyx mori* e R2Bc de *Bradysia cophophila*. Os números entre parênteses indicam o número de aminoácidos omitidos entre um segmento e outro.

Ainda, na porção carboxi-terminal seguindo o domínio de RT existe um segundo motivo tão conservado quanto o primeiro, um motivo Cys-His com estrutura geral de Cys-X₃-Cys-X₇-His-X₄-Cys (CCHC). E nessa região é possível também observar uma seqüência altamente conservada KPDLV, provavelmente responsável por compor o domínio de endonuclease, juntamente com o motivo CCHC (Figura 79). A atividade de endonuclease deste domínio foi proposto através de experimentos feitos com o elemento R2 do bicho da seda, mutado nessa seqüência KPDLV. Esta proteína mutada perdeu sua habilidade de clivar seu sítio alvo, o 28S rDNA, mas não afetou sua habilidade de se ligar ao DNA (Burke *et al.*, 1999).

C	R	G	G	C	K	S	T	E	T	L	Q	H	V	V	Q	Q	C	...	//	...	K	P	D	L	V
C				C								H					C								

Figura 79 – Motivos conservados da seqüência de aminoácidos da região carboxi-terminal do elemento R2Ra de *Rhynchosciara americana*.

Todos os conhecidos elementos de retrotransposição R2 apresentam idênticos sítios de inserção. Entretanto, apenas a junção 3' é altamente conservada, uma vez que esta é determinada pela quebra inicial no gene 28S, mostrando que o domínio de endonuclease atua de forma idêntica entre os artrópodes (Figura 80a) enquanto a junção 5' é sujeita a deleções, duplicações e inserções de nucleotídeos. No elemento R2Ra foi observado que na junção 5' houve a deleção de dois nucleotídeos (GG), como também foi observado no elemento R2 de *Bombyx mori* (Burke *et al.*, 1987) (Figura 80b).

(a)

	R2 3'end	28S rDNA
R2 <i>Ramericana</i>	GTAACACCGGCCTTAT	TAGCCAAATGCC
R2 <i>Bmori</i>	ATCCGGCGATGAAAA	TAGCCAAATGCC
R2 <i>Dmelan</i>	AAAAAAAAAAAAAAAA	TAGCCAAATGCC
R2 <i>fungusGnat</i>	CATCAACCTGGCTACT	TAGCCAAATGCC

(b)

Figura 80 – Seqüências de junções do retroelemento R2Ra de *Rhynchosciara americana*. (a) Seqüência junção 3' de R2Ra em comparação com outros elementos. (b) Seqüência junção 5' do elemento R2Ra, mostrando que ocorreu a deleção de dois nucleotídeos GG.

A figura 81 mostra a seqüência em aminoácidos do elemento R2Ra de *Rhynchosciara americana* e os retroelementos R2 de *Bombyx mori* e de *Bradysia coprophila*. Uma comparação entre estes elementos mostra 30% e 40% identidade e 52% e 61% de substituições conservativas com *Bradysia coprophila* e *Bombyx mori*, respectivamente.

<i>R.americana</i> R2	-----	1
<i>Bombyx mori</i> R2	MMASTALSLMGRCPNDGCTRGKHVTAAPMDGPRGPSSLAGTFGWGLAIPAGEPCGRVCSPATVGFPPVAK	70
<i>B.coprophila</i> R2	-----	1
<i>R.americana</i> R2	-----MSNYNETTTSGGDNPMTATQTGSLSSGPINQHTCELCRTFGTRAGLGQHVRRKTHPIESN	61
<i>Bombyx mori</i> R2	KSNKENRPEASGLPLESERTGDNPITVRGSAGADVPVGDAPGWTCQFCERTFSTNRGLGVHKRRRHPVETN	140
<i>B.coprophila</i> R2	-----	1
<i>R.americana</i> R2	QSINVERKKRRWSPEEIRRMANMEAQATINNIIKHLTQYLATYLP--QRTLNAIKGRRRDAEYKELVTGII	129
<i>Bombyx mori</i> R2	TDAAPMMVKRRWHGEEIDLLARTEARLLAERGQCSGGDLFGALPGFGRGLEAIKQRRREPFRALVQAHL	210
<i>B.coprophila</i> R2	-----	1
<i>R.americana</i> R2	AN-----LRNSSTQQTNQVCNESEMSORSKILOSIRESVRDLR--SRNKYAKALQELGEAAL	186
<i>Bombyx mori</i> R2	AR-----FGSQPGPSSG-GCSAEPDFRASGAEAGEERCAEDA--AAYDPSAVGQMSDPAARV	266
<i>B.coprophila</i> R2	-----VSVPPTSYRDRIMNALEESMIDVD--AIRGSSARELVEICKVAL	42
<i>R.americana</i> R2	CGKMLN-EEQLIHCIKSMFNTAKCPKGPFRKRTATHSG--TNKQORQRYARVOKLYKMNKRVAAKVMLE	253
<i>Bombyx mori</i> R2	LSLELEGAGRRRAACRAMRPKTAGFRNDLHDDRTASAHK--TSRQKRRAEYARVQELYKKCRSRAAEVTD	334
<i>B.coprophila</i> R2	LNQPMQ-EGRIMSWLSDRFPDTPKPKGPIYSKTTIVHG--TNKQKRKQRYALVQSLYKKDISAAARVVDL	109
<i>R.americana</i> R2	-ETDKIQIKLPDHPDMFKFWESEFKEGEGMPERMPKDLK-----ESPDLKAIWDPVTEEEVRKAKVANN	316
<i>Bombyx mori</i> R2	GACGGVGHSLSEEMETIYWRPILERVSDAPGPTPEALHALGRAEWHGGNRYDTQLWKPISVEEIKASRFDWR	404
<i>B.coprophila</i> R2	-ENDKIATKIPPVRRMFDTWKDVFAATGGSAATNINRAP-----PAPHMETLWDPVSLIEIKSARASNE	172
<i>R.americana</i> R2	TAAGPDGTOPKSWNRISLKYKTLIYNLLIYEEKVPHKLKVSRTVFIPKKKGSSDPGEFRPLTICSVVLR	386
<i>Bombyx mori</i> R2	TSPGPDGIRSGQWRAVPVHLKAEMFNAMMARGEIPEILQCRTVFVP-KVERPGPGGEYRPIISIASIPLR	473
<i>B.coprophila</i> R2	KGAGPDGVTPRSWNALDDRYKRLLYNIFVFYGRVPSPIKGSRTVFIP-KIEGGPDGPVFRPLSICSIVILR	241
<i>R.americana</i> R2	GFNKILVQRLVSLYKYDERQTAYLPIDGVGTNIHVLAAILNDSNTKLSELHVALDITKAFNRLHHTSI	456
<i>Bombyx mori</i> R2	HFSILARRLLACPPDARQGFICADGTLENSAVLDAVLGDSRKKLRCHVAVLDFAKAFDTSVHEATV	543
<i>B.coprophila</i> R2	EFNKILARRFVSCYTYDERQTAYLPIDGVGINVSMLTATIAEAKRLRKELHIALDLVKAFNSVYHSALI	311
<i>R.americana</i> R2	KSLVKGGFPGFTIFIRMYTGLQTMQFEGHCK-MTQVNRGVYQGDPLSGPIFLLAIEKGLQALDKEVG	525
<i>Bombyx mori</i> R2	ELLRLRGMPQFCGYIAHLYDTASTTLAVNNEMSSPVKVGRGVQGDPLSPILFNVMDLILASLPERVG	613
<i>B.coprophila</i> R2	DAITEAGCPGVDYIADMYNNVITEMQFEGKCE-LASTLAGVYQGDPLSGPLFTLAYEKALRALNNEGR	380
<i>R.americana</i> R2	YDIGDVRVNAGAYADDTDLVAGTRLGLODNINRESSTIKOVGLEVNPRKSMTSLVSPSGEREEMKVETCK	595
<i>Bombyx mori</i> R2	YRLEMELVSALAYADDLLVLAGSKVGMQESISAVDCVGRMGRLNCRKSAVLSTIPDGHRRKHHYLTET	683
<i>B.coprophila</i> R2	FDIADVRVNASAYSDDGLLAMVILGLQHNLDFGETLAKIGLRINSRKSKTSLVSPSGREKKMKIVSNR	450
<i>R.americana</i> R2	PFRANDVPLKELSINDFWRYLGSYTYNEGPE--RLSLTIEQDLERLTAKPLKPQQRHMLNAYVIPKYQD	663
<i>Bombyx mori</i> R2	TENNIGGKPLROVSCVERWRYLGVDFEASGCV--TLEHSISSALNNISRAPLKPQQRLETLRAHLIPRFOH	751
<i>B.coprophila</i> R2	RLLLKASELKPLTISDLWKYLGVVYTTSGPE--VAKVSMDDDL SKLTKGPKLPQQRHMLKTFVIPKHLN	518
<i>R.americana</i> R2	KLVLSKTTAKGLKRTDRQIRQYVRRWLKLPHDVPITAYLHAPVKSGLNIPCLQYWIPLLVRNVNKKITES	733
<i>Bombyx mori</i> R2	GFVLGNISSDRRLRMLDVQIRKAVQWLRLPADVPKAYYHAAVQDGLAIPSVRATIPDLIVRRFGGLDSS	821
<i>B.coprophila</i> R2	RLVLSRTTATGLCKMDLIRKYVRRWLRLPGDVPVAFIYAPVKAAGKGIPCLKQWIPLMRFLRLNKAKRIT	588
<i>R.americana</i> R2	QRSVLAAGVKTALLTSTVYKCNOSLATLG--GNPTML-AYRTYWEKELYAKVDGKDLQNAARDKASTRW	800
<i>Bombyx mori</i> R2	PWSVARAAASDKIRKKLRWAWQLRRFSRVDSTTQRPVRLFWREHLHASVDGRELRESTRTPSTKWI	891
<i>B.coprophila</i> R2	GGDRIAAVLNCQLYASISHSCKTGPVSVGLWRSTNTG-GLSAYWRRILGMDGKDLKSAQNHSATSFN	657
<i>R.americana</i> R2	GMLHSDISGEDYLNHYKLRNTSVPTKVRTARGP---QKETSRCRGCKSTETLQHVQQCHRTHGGRTLR	867
<i>Bombyx mori</i> R2	RERCAQITGRDFVQFVHTHINALPSRIRGSRGRGGGESSLTCRAGCKVRETTAHILQQCHRTHGGRTLR	961
<i>B.coprophila</i> R2	SIRMDISGEDYTHYNQLRNTSVPTKRRTARGP---NKPTACRAGCDKLRLQHDIQGCIRSQGGLVQR	724
<i>R.americana</i> R2	HDRIVGLLQHELR-RDYNVLAKQELKTGILGRKPDVLIKDDTAHIVDVQVARSK-LNESHVRKRSKY-	934
<i>Bombyx mori</i> R2	HNKILVSFAKAMEENKWTVELEPRLRTSVGLRKPDIIASRDGVGVIVDVQVVSQQRSLDELHREKRKNYG	1031
<i>B.coprophila</i> R2	HDRVVDLLFDECETKGYAAEKVVHLRTSEELWPKDVLVKKNGRVVVVDQVQVQCGR-LSSDHRVVKVSKYR	793
<i>R.americana</i> R2	DKKEIEVEVKRSY---RVSKVMYEACTISYKGIWELQSVMSMR-RLGVSEYCLFKIVTSTLRGTWLCWKR	999
<i>Bombyx mori</i> R2	NHGELVELVAGRLGLPKAEFCVRATSCITISWRGVWSLTYSKELRSITIGLREPTLQIVPILALRGSHNNWTR	1101
<i>B.coprophila</i> R2	DDPELADVIREKY---AVQEVTFEACTISYKGIWSKNSVEGLQ-KLGISNYCLFKIVTSVLRGSWLNWVR	859
<i>R.americana</i> R2	FNMITSVRS----	1009
<i>Bombyx mori</i> R2	FNQMTSVMGGGVG	1114
<i>B.coprophila</i> R2	FNNVITVYVHW---	869

Figura 81 - Comparação das seqüências, em aminoácidos, da ORF do retrotransposon R2Ra non-LTR de *Rhynchosciara americana* (*R.americana*), *Bombyx mori* e *Bradysia coprophila* (*B.coprophila*): aminoácidos idênticos em cinza e substituições conservativas em preto.

A análise filogenética do elemento R2Ra foi feita utilizando a sequência de aminoácido de diferentes elementos de retrotransposição non-LTR de diferentes espécies. O alinhamento foi gerado usando o programa ClustalX 1.83 com os parâmetros padrão e a árvore filogenética gerada utilizando o método Neighbor Joining (NJ), as seqüências dos elementos usados foram adquiridas no GenBank e os *accession numbers* são: *Bradysia coprophila* R2 **AAA29814.1**; *Bombyx mori* R2 **AAB59214.1**; *Nasonia vitripennis* R2 **AAC34927.1**; *Drosophila melanogaster* R2 **CAA36225.1**; *Drosophila mercatorum* R2 **AAB94032.1**; *Forficula auricularia* R2 **AAC34906.1**; *Drosophila melanogaster* gypsy **ABI48306.1**; *Drosophila melanogaster* micropia **CAA32198.1**; *Drosophila melanogaster* TART **AAT12845.1**; *Drosophila melanogaster* TAHRE **CAD65871.1**; *Drosophila melanogaster* jockey **AAA28675.1** e *Drosophila melanogaster* I factor **AAA70222.2**.

A árvore filogenética apresentada na figura 82 mostra que o elemento identificado em *Rhynchosciara americana* pertence ao mesmo clado dos retroelementos tipo II de outras espécies, a análise é suportada pelos valores de *bootstrap* e identidade e similaridade entre os elementos da sua clade irmã.

Figura 82 – Análise filogenética do elemento de retrotransposição R2Ra identificado em *Rhynchosciara americana*, com diferentes retroelementos de diferentes espécies.

4.13.1. Análise Genômica do Retroelemento RaR2

Os experimentos de Southern Blot foram realizados utilizando DNA de moscas fêmeas de *Rhynchosciara americana* e como sonda o clone pRa1.4 de rDNA de *Rhynchosciara americana* que apresenta um longo fragmento do rDNA, com os ribossomais 18S, 5.8S e 28S (ver Figura 73).

O resultado do Southern Blot é mostrado na figura 83. São observadas três bandas marcadas correspondentes a 9,5kb, 7,5kb e 5,5kb, quando o DNA é digerido com a enzima de restrição EcoRI, o que pode ser explicado pelo mapa de restrição da região do rDNA definido por Zaha *et al.* (1982). Estes autores fizeram a caracterização da unidade ribossomal de *Rhynchosciara americana* e observaram que esta era formada por dois tipos de repetição (Figura 84). O esquema apresentado mostra os fragmentos do rDNA, onde o clone pRa1.4 aparece como uma repetição usual enquanto que os clones pRa 5.18 e pRa 23.84 apresentam uma inserção no gene 28S do rDNA. O inserto que a unidade ribossomal apresentava era o retrotransposon R2 que na época passou despercebido, os autores acreditavam apenas que poderia ser uma unidade diferente de rDNA, pela falta de ferramentas que permitissem sua melhor caracterização.

Figura 83 – Southern Blot utilizando como sonda um clone de rDNA, e DNA de mosca de *Rhynchosciara americana*: PM – 1Kb Plus Ladder (Invitrogen); 1) 1 μ g DNA sem digerir; 2) 8 μ g DNA digerido EcoRI (Promega); 3) 8 μ g DNA digerido HindIII (Invitrogen).

Figura 84 – Mapa de restrição do fragmento clonado de rDNA, (A) fragmento do rDNA clonado pRa1.4 que não apresenta inserção do retrotransposon RaR2 e (B) fragmentos do rDNA clonados pRa 5.18 e pRa23.84 que carregam o retrotransposon RaR2. Enzimas de restrição: E – EcoRI; P – PstI; Bg – BglII e H – HindIII (Zaha *et al*, 1982).

O clone utilizado como sonda foi o pRa1.4 que contém toda a unidade ribossomal, logo seria esperado marcações nas regiões 9,5kb, 7,5kb e 5,5kb, uma vez que os fragmentos 7,5kb e 5,5kb correspondem a unidade ribossomal com o inserto do retrotransposon R2. Portanto esta marcação no Southern confirma a existência de um elemento de retrotransposição inserido no rDNA.

Um segundo Southern foi realizado e como sonda foi utilizado um clone com fragmento de cerca de 1.4 kb do retrotransposon RaR2 (Figura 85).

Figura 85 – Esquema do elemento R2Ra de *Rhynchosciara americana*.

O resultado do experimento de Southern blot apresentado na figura 86, está de acordo com a posição da sonda de R2Ra utilizada, os fragmentos marcados no experimento mais uma vez concordam com o mapa de restrição apresentado

anteriormente. O fragmento de 7.5kb marcado (raia 1) quando o DNA foi digerido com a enzima de restrição EcoRI corresponde ao fragmento pRa23.84, enquanto que a marcação de 1.4kb (raia 2) corresponde exatamente a sonda utilizada no experimento.

Figura 86 – Southern Blot utilizando como sonda um fragmento de 1400 bases de rDNA, e DNA de mosca de *Rhynchosciara americana*: PM – 1Kb Plus Ladder (Invitrogen); 1) 8µg DNA digerido EcoRI (Promega); 2) 8µg DNA digerido HindIII (Invitrogen).

Ainda é curioso notar nos experimentos de Southern Blot, que *Rhynchosciara americana* provavelmente não apresenta o retroelemento denominado R1 que também possui como sítio de inserção o gene 28S rDNA. Isso porque não foi observado marcação no Southern que inferisse a existência de um segundo retrotransposon nessa região.

A determinação do número de cópias de elementos de retrotransposição R2Ra que ocupam a unidade de transcrição do gene 28S no rDNA foi determinada por reação de PCR em tempo real. Foi feita uma análise relativa entre o retrotransposon R2Ra e a unidade do gene 18S rDNA. Dessa forma foi possível estimar quantas vezes mais cópias havia do gene 18S em comparação ao elemento móvel, sendo o número de unidades de repetição rDNA conhecida como 100

repetições por conteúdo haplóide de DNA fica fácil estimar quantos elementos de retrotransposon ocupariam do gene 28S rDNA (Gambarini & Meneghini, 1972).

Figura 87 - qPCR amplificação. O gráfico mostra o valor médio de Ct utilizado nos cálculos, assim como a linha base (Threshold).

A fórmula utilizada para o cálculo da Quantificação Relativa (QR) foi $QR = 2^{-\Delta Ct}$ e foram utilizados os valores médios de Ct apresentados na figura 87, os experimentos foram feitos em triplicatas (Tabela 09). No entanto, para utilização dessa fórmula, os primers são avaliados quanto a eficiência e especificidade (Yun *et al.*, 2006).

Tabela 09 - Valores de Cts para os genes 18S e R2Ra de *Rhynchosciara americana*, os experimentos foram realizados em triplicatas.

Ct 18S	Ct R2Ra
16,54	18,12
16,65	18,09
16,70	18,15

O resultado do cálculo da quantificação relativa foi de 2,81, o que significa

que o gene 18S rDNA está 2,81 vezes mais representado no genoma de *Rhynchosciara americana* que o retrotransposon R2Ra. Dessa forma, a porcentagem do gene 18S rDNA que apresenta a inserção do retrotransposon R2Ra é de 35,6%. Ou seja, existem aproximadamente 36 cópias do retroelemento R2Ra ocupando o gene 18S rDNA no genoma de *Rhynchosciara americana*.

A presença do retrotransposon R2 em aproximadamente 36% das unidades de rDNA de *Rhynchosciara americana* poderia ser resultado de repetidas transposições em um curto período de tempo, ou que o elemento de retrotransposição R2Ra é um ancião ainda ativo no genoma de *Rhynchosciara americana*.

O número de cópias observado para o retrotransposon R2Ra está de acordo com o que foi descrito para outros organismos. Em *Drosophila* o número de inserções chega a 30% do número de repetições rDNA, enquanto que em *Bombyx* esse número corresponde a 25 cópias do elemento R2 (Jakubczak *et al.*, 1992; Burke *et al.*, 1997). Como a inserção do retrotransposon no 28S rDNA inativa a transcrição de toda a unidade do gene ribossomal, não seria impossível de se imaginar que tal elemento tivesse um papel funcional na regulação da transcrição do gene.

A localização cromossômica do retroelemento R2Ra foi feita por hibridização *in situ* nos cromossomos politênicos da glândula salivar da *Rhynchosciara americana*. A figura 88 mostra a imagens obtida ao microscópio confocal de varredura à laser.

O elemento de retrotransposição R2Ra apresentou uma forte marcação na região X12, onde está localizada a principal região organizadora de nucléolo,

confirmando que este elemento realmente interage com o rDNA. Também se observou marcações nas regiões da heterocromatina centromérica dos cromossomos C e B. Essas marcações se apresentaram constantes nos vários experimentos realizados, mostrando que não pode ter sido um evento de arraste de material da região cromocêntrica no momento do squash em consequência da associação destas regiões cromossômicas em um cromocentro. Pode-se ainda observar que os padrões de marcação são diferentes nos três cromossomos sendo sempre mais fraca no cromossomo B e ausente no A. Aparentemente somente não se detectou nenhuma marcação com a sonda do retroelemento R2Ra no cromossomo A.

A ligação desses elementos de retrotransposição na unidade de rDNA foi confirmada não só pela estrutura molecular mas também agora pela localização cromossômica. Esse tipo de retrotransposon apresenta um sítio específico de inserção que encontra-se bem conservado entre os mais diferentes artrópodes, parece ser o responsável pela inativação de parte das unidades de repetição do rDNA e por alguns milhões de anos povoam essas regiões. Esse elemento pode já ter adquirido algum papel fundamental no processo celular, como por exemplo no controle da atividade gênica, uma vez que é conhecido de outros sistemas que unidades de rDNA que apresentam o retrotransposon inserido são bem pouco transcritos.

Figura 88 – Imagens obtidas ao microscópio confocal de varredura a laser da hibridização *in situ* do elemento de retrotransposição R2Ra, nos cromossomos politênicos da glândula salivar de *Rhynchosciara americana*. Os cromossomos (A, B, C e X) estão identificados. A) As regiões heterocromáticas dos cromossomos B, C e X estão justapostas e enquadradas pela linha branca B) ampliação desta região; C) e D) mostra em maior aumento os cromossomos B, C e X e sem padrão de marcação nas regiões da heterocromatina centromérica. Cromossomos corados por iodeto de propídio em vermelho e sonda em verde (FITC).

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS E CONCLUSÕES

Os elementos de transposição podem ser autônomos ou defectivos com respeito a sua própria transposição, os elementos defectivos freqüentemente exibem deleções nas ORFs ou nas seqüências *repeats* terminais necessárias para sua transposição. Os elementos autônomos são capazes de mover elementos não funcionais, desde que do mesmo tipo, portanto, basta um elemento funcional para ocorrer o evento de transposição. A inexistência de um elemento autônomo no genoma de *Rhynchosciara* provavelmente levaria estes elementos não funcionais ao desaparecimento por sucessivas mutações e ao mesmo tempo ao seu confinamento nas regiões heterocromáticas.

A possibilidade de identificar uma ORF para a transposase a partir de múltiplas cópias não funcionais seria um indicativo de que o ancestral do elemento *Ramar1* poderia ter sido uma transposase hiperativa. A história evolutiva dos elementos *mariners* tem sido descrita com os seguintes passos: invasão por transferência horizontal, imediata proliferação e inativação vertical (Lohe *et al.*, 1995; Hartl *et al.*, 1997). E estes elementos inativados acumulariam mutações por muitas gerações, originando então o elemento não funcional.

O esquema abaixo mostra em que ponto os elementos *Ramar1*, *Ramar2*, *Ramar3* e *Ramar4* se encontram no ciclo de vida de um elemento *mariner*, apesar destes elementos atualmente se apresentarem inativos no genoma de *Rhynchosciara americana*, é evidente que representam elementos de transposição diferentes que foram herdados em períodos diferentes ou apenas seguiram destinos diferenciados. A diferença no número de cópias e distribuição podem ser interpretadas como sendo uma manifestação de diferentes estágios na história evolutiva dos elementos *mariner*.

Tanto os elementos parciais *Ramar2*, *Ramar3* e *Ramar4* quanto o elemento *full-length Ramar1* de *Rhynchosciara americana* seqüenciados apresentaram-se inativos, com múltiplos códons de terminação ou mutação no frame de leitura, indicando que estes elementos têm acumulado mutações no processo de transferencia vertical (Lampe *et al.*, 1996). Estas mutações indicam que estes eventos de transposição dos elementos das diferentes subfamílias: *mauritiana*, *mellifera* e *irritans* não são recentes em *Rhynchosciara americana*.

A identificação de um elemento tipo *mariner* no gênero *Rhynchosciara*, pode ser um indicativo que estes elementos povoam o genoma de *Rhynchosciara* a muitos anos, e no entanto esses elementos ainda representam um enigma na história evolutiva desse organismo. Uma questão simples seria se a espécie hospedeira seria meramente uma observadora passiva da frenética atividade do DNA parasita ou haveria uma interação para benefício mútuo?

Os resultados adquiridos representam o princípio para o entendimento da dinâmica dos elementos *mariner* e da sua distribuição no genoma de *R.americana*. Contribui não só com evidências destes elementos no genoma de *R.americana*, mas também da sua presença em outras espécies relacionadas. No entanto, a identificação e caracterização de um elemento funcional para possível utilização como vetor de transformação ainda se apresenta como um desafio no sistema de estudo. Embora não foi possível ter uma evidência direta que o retroelemento RaTART esteja envolvido na manutenção do telômero em *Rhynchosciara americana*, é possível que este elemento participe dessa atividade. Uma estrutura proposta para a extremidade dos cromossomos de *Rhynchosciara* pode ser feita com base em estudos anteriores, onde uma sequência satélite associada ao telômero (TAS) que apresentou 414 pares bases foi localizada por hibridização *in situ* nas extremidades dos cromossomos politênicos da glândula salivar de *Rhynchosciara americana*. Essa sequência está organizada em tandem e caracterizada como formadora da região subtelomérica nesse sistema (Madalena & Gorab, 2005). Dessa forma, a formação da região telomérica em *Rhynchosciara* pode ser um paralelo do que foi descrito em *Drosophila virilis*. Quando inicialmente acreditava-se que esta espécie não fazia reconstituição telomérica por transposons apenas por recombinação de sequências satélites (Biessmann *et al.*, 2000). E posteriormente, foi descrito nesse sistema um retrotransposon non-LTR tipo TART, que estaria envolvida na manutenção das extremidades dos cromossomos, esse elemento apresenta significativa similaridade em aminoácidos com o elemento TART de *Drosophila melanogaster*, assim como algumas características particulares (Casacuberta & Pardue, 2003). O que portanto, por muito tempo, acreditou-se ser um evento recente de adaptação na elongação da região telomérica do cromossomo

por elementos de retrotransposição, parece ter sido um mecanismo que ocorreu a 60 milhões de anos, quando houve a separação do gênero *Drosophila*.

No entanto, pode ainda existir, assim como em *Drosophila melanogaster* onde dois retrotransposons non-LTR são os responsáveis pela reconstituição das regiões teloméricas, um outro elemento ainda desconhecido, que juntamente com o retrotransposon non-LTR RaTART descrito nesse projeto, participe da manutenção das extremidades dos cromossomos no sciarideo *Rhynchosciara americana*.

Os resultados obtidos indicam que RaTART pode tratar-se do primeiro elemento de retrotransposição com função definida na heterocromatina descrito em *Rhynchosciara americana*. Este elemento possivelmente, assim como em *Drosophila*, pode estar participando da reconstituição do telômero, onde o transcrito inteiro serviria de molde para a transcriptase reversa que codifica.

O elemento de retrotransposon R2Ra que apresenta sítio específico de inserção no gene 28S rDNA, foi identificado e caracterizado em *Rhynchosciara americana*. Esse tipo de elemento está amplamente distribuído entre os artrópodes e possivelmente tem invadido diferentes organismos ao longo de milhões de anos, através de um mecanismo de transferência vertical.

No entanto um outro elemento de retrotransposição denominado R1 que também possui como característica a inserção no rDNA, não está presente no genoma de *Rhynchosciara americana*. Já foi descrito que estes elementos R1 e R2

podem ocupar até a mesma unidade de rDNA, pois apesar de se inserirem no gene 28S apresentam sítios distintos de inserção. Entretanto através dos experimentos de Southern Blot não se identificou a presença deste outro retrotransposon.

O *locus* ribossômico tem algumas propriedades que parecem ser apropriadas para a evolução sítio específica de um elemento móvel. Primeiramente, uma vez que essa unidade de repetição rDNA é transcrito essencialmente em todos os tecidos, a acessibilidade do sítio alvo tanto para inserção quanto para transcrição é altamente favorável, a ausência de um promotor nesse retroelemento faz com que este provavelmente utilize o promotor do rDNA. Por outro lado, como a unidade de rDNA é repetida várias vezes, em *Rhynchosciara americana*, o número de cópias do rDNA foi determinada em 100 repetições, o elemento móvel sítio específico apresenta a vantagem de ter múltiplos sítios de inserção, e aparentemente uma fração significativa desses sítios podem estar ocupados por elementos móveis. E finalmente, uma vez que a seqüência de DNA dos genes ribossomais é evolutivamente conservada, a transmissão de elementos móveis sítio específicos poderia eventualmente ter ocorrido entre diferentes espécies.

Os esforços para um melhor entendimento do papel dos elementos móveis no genoma de *Rhynchosciara americana*, ou de diferentes organismos, ainda se deparam com questões evolutivas e de funções biológicas. Novas perspectivas apresentam estes elementos como tendo uma significativa influência na evolução dos genoma, particularmente pelo controle da atividade gênica. Toda a informação necessária para sua transposição está contida no próprio elemento. Justamente por serem elementos independentes do organismo hospedeiro, por muito tempo foram considerados vilões, mas não é por menos, pois podem se inserir em genes regulatórios, interromper ORFs ou provocar rearranjos cromossômicos. Muitos

atualmente são inativos, no entanto, foram considerados por muito tempo prejudiciais a seus anfitriões (Biémont & Vieira, 2006).

Contudo, o elemento de transposição nem sempre tem efeito danoso, por exemplo, sua atividade mutacional pode contribuir para a diversidade genética do organismo. Além disso, alguns destes elementos foram domesticados pelo genoma hospedeiro, evoluíram para atuarem como genes regulatórios ou desenvolveram alguma função celular em benefício do organismo, e quem sabe, em benefício próprio de permanecer funcional.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABAD, J. P.; DE PABLOS, B.; OSOEGAWA, K.; DE JONG, P. J.; MARTIN-GALLARDO, A.; VILLASANTE, A., Genomic analysis of *Drosophila melanogaster* telomeres: full-length copies of HeT-A and TART elements at telomeres, **Mol. Biol. Evol.**, v.21, n.9, p.1613-1619, 2004a.
- ABAD, J. P.; PABLOS, B.; OSOEGAWA, K.; JONG, P. J.; MARTÍN-GALLARDO, A.; VILLASANTE, A., TAHRE, a Novel Telomeric Retrotransposon from *Drosophila melanogaster*, Reveals the Origin of *Drosophila* Telomeres, **Mol. Biol. Evol.**, v.21, n.9, p.1620-1624, 2004b.
- AUGÉ-GOUILLOU, C.; BRILLET, B.; GERMON, S.; HAMELIN, M. H.; BIGOT, Y., *Mariner Mos1* Transposase Dimerizes Prior to ITR Binding, **J. Mol. Biol.**, v.351, n.1 p.117-130, 2005.
- AUGÉ-GOUILLOU, C.; HAMELIN, M. H.; DEMATTI, M. V.; PERIQUET, G.; BIGOT, Y., The ITR binding domain of the *Mariner Mos-1* transposase, **Mol. Genet. Genomics**, v.265, p.58-65, 2001.
- AUGÉ-GOUILLOU, C.; NOTARESCHI-LEROY, H.; ABAD, P.; PERIQUET, G.; BIGOT, Y., Phylogenetic analysis of the functional domains of *mariner*-like element (MLE) transposases, **Mol. Gen. Genet.**, v.264, p.506-513, 2000.
- BEERMANN, W., Chromosome constancy and specific modifications of the chromosome structure in development and organ differentiation of *Chironomus tentans*, **Chromosoma**, v.5, n.2, 1952.
- BEREZIKOV, E.; BUCHETON A, BUSSEAU, I., A search for reverse transcriptase-coding sequences reveals new non-LTR retrotransposons in the genome of *Drosophila melanogaster*, **Genome Biol.**, v.1, n.6, 2000.
- BERGHAMMER, I.; MESELSON, M., Genetic techniques: a universal marker for transgenic insects, **Nature**, v.402, p.370-371, 1999.
- BESSEREAU, J. L.; WRIGHT, A.; WILLIAMS, D. C.; SCHUSKE, K.; DAVIS, M. W.; JORGENSEN, E. M., Mobilization of a *Drosophila* transposon in the *Caenorhabditis elegans* germ line, **Nature**, v.413, p.70-74, 2001.
- BIÉMONT, C.; VIEIRA, C., Junk DNA as an evolutionary force, **Nature**, v.443, p.521-524, 2006.
- BIESSMANN, H.; ZUROVCOVA, M.; YAO, J.G.; LOZOVSKAYA, E.; WALTER, M. F., A telomeric satellite in *Drosophila virilis* and its sibling species, **Chromosoma**, v.109, n.6, p.372-80, 2000.
- BIGOT, Y.; BRILLET, B.; AUGÉ-GOUILLOU, C., Conservation of Palindromic and Mirror Motifs within Inverted Terminal Repeats of *mariner*-like Elements, **J. Mol. Biol.**, v.351, n.1, p.108-116, 2005.
- BINGHAM, P. M.; LEVIS, R.; RUBIN G. M., Cloning of DNA sequences from the white locus of *Drosophila megalogaster* by a novel and general method, **Cell**, v.25, p.695-704, 1984.
- BREUER, M. E., Revision of the genus *Rhynchosciara Rubsaamen* (Diptera, Sciaridae) in neotropical region; **Arq. Zool.**, v.17, n.4, p.167-198, 1969.

BREUER, M. E.; PAVAN, C., Behavior of polytene chromosomes of *Rhynchosciara angelae* at different stages of larval development, **Chromosoma**, v.7, p.371–386, 1955.

BURKE, W. D.; MALIK, H. S.; JONES, J. P.; EICKBUSH, T. H., The domain structure and retrotransposition mechanism of R2 elements are conserved throughout arthropods, **Mol. Biol. Evol.**, v.16, n.4, p.502-511, 1999.

BURKE, W.D.; EICKBUSH, D.G.; XIONG, Y.; JAKUBCZAK, J.; EICKBUSH, T.H., Sequence relationship of retrotransposable elements R1 and R2 within and between divergent insect species, **Mol. Biol. Evol.**, v.10, n.1, p.163-185, 1993.

BURKE, W. D.; CALALANG, C. C.; EICKBUSH, T. H., 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.**, v.7, n.6, p2221-2230, 1987.

CAPY, P.; VITALIS, R.; LANGIN, T.; HIGUET, D.; BAZIN, C., Relationships between transposable elements based upon the integrase-transposase domains: is there a common ancestor?, **J. Mol. Evol.**, v.42,n.3, p.359-368, 1996.

CASACUBERTA, E.; PARDUE, M. L., HeT-A and TART, two *Drosophila* retrotransposons with a bona fide role in chromosome structure for more than 60 million years, **Cytogenet Genome Res.**, v.110, n.1-4, p152-159, 2005.

CASACUBERTA, E.; PARDUE, M. L., Het-A elements in *Drosophila virilis*: Retrotransposon telomeres are conserved across the *Drosophila* genus, **PNAS**, v.100, n.24, p.14091-14096, 2003a.

CASACUBERTA, E.; PARDUE, M. L., Transposon telomeres are widely distributed in the *Drosophila* genus: TART elements in the *virilis* group, **PNAS**, v.100, n.6, p.3363-3368, 2003b.

CASACUBERTA, E.; PARDUE, M. L., Coevolution of the telomeric retrotransposons across *Drosophila* species, **Genetics**, v.161, n.3, p.1113-1124, 2002.

CHRISTENSEN, S. M.; BIBILLO, A.; EICKBUSH, T. H., Role of the *Bombyx mori* R2 element N-terminal domain in the target-primed reverse transcription (TPRT) reaction, **Nucleic Acids Res.**, v.33, n.20, p.6461-6468, 2005.

COATES, C. J.; JASINSKIENE, N.; MORGAN, D.; TOSI, L. R.; BEVERLY, S. M.; JAMES, A. A., Purified *mariner* (*Mos1*) transposase catalyzes the integration of marked elements into the germ-line of yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*, **Insect Biochem. Mol. Biol.**, v.30, n.11, p.1003-1008, 2000.

CRAIG, N. L., Unity in transposition reactions, **Science**, v.270, p.253-254, 1995.

DANILEVSKAYA, O. N.; TRAVERSE, K. L.; HOGAN, N. C.; DEBARYSHE, P. G.; PARDUE, M. L., The Two *Drosophila* Telomeric Transposable Elements Have Very Different Patterns of Transcription, **Molecular and Cellular Biology**, v.19, n.1, p.873-881, 1999.

DANILEVSKAYA, O. N.; LOWENHAUPT, K.; PARDUE, M. L., Conserved subfamilies of the *Drosophila* HeT-A telomere-specific retrotransposon, **Genetics**, v.148, n.1, p.233-242, 1998.

DANILEVSKAYA, O. N.; SLOT, F.; TRAVERSE, K. L.; HOGAN, N. C.; PARDUE, M. L.,

Drosophila telomere transposon HeT-A produces a transcript with tightly bound protein, **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.91, n.14, p.6679-6682, 1994.

DIEZ, J. L.; VILARINO, V. R.; MEDINA, F. J.; MORCILLO, G., Nucleolar localization of a reverse transcriptase related to telomere maintenance in *Chironomus* (Diptera), **Histochem Cell Biol.**, v.126, n.4, p.445-452, 2006.

DOAK, T. G.; DOERDER, F. P.; JAHN, C. L.; HERRICK, G., A proposed superfamily of transposase genes: transposon-like elements in ciliated protozoa and a common "D,35E" motif, **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.91, p.942-946, 1994.

DREYFUS, A.; NONATO, E.; BREUER, M. E.; PAVAN, C., Cromossomos politênicos em vários órgãos de *Rhynchosciara angelae*, **Rev. Brasil. Biol.** v.11, p.439-450, 1951.

EICKBUSH, D.G., EICKBUSH, T.H., Vertical transmission of the retrotransposable elements R1 and R2 during the evolution of the *Drosophila melanogaster* species subgroup, **Genetics**, v.139, n.2, p.671-684, 1995.

EICKBUSH, D. G.; LUAN, D. D.; EICKBUSH, T. H., Integration of *Bombyx mori* R2 sequences into the 28S ribosomal RNA genes of *Drosophila melanogaster*, **Mol. Cell Biol.**, v.20, n.1, p.213-223, 2000.

EWING, B. GREEN, P., Base-calling of automated sequencer traces using phred, 2. Error probabilities, **Genome Res.**, v.8, p.186–194, 1998.

EWING, B.; HILLIER, L. D.; WENDL, M. C.; GREEN, P., Basecalling of automated sequencer traces using phred, 1. Accuracy assessment, **Genome Res.**, v.8, p.175–185, 1998.

FORTUNATI, D.; JUNAKOVIC, N., Evidence for genomic regulation of the telomeric activity in *Drosophila melanogaster*, **Genetica**, v.107, n.1-3, p.95-102, 1999.

FRYDMAN, H. M.; CADAVID, E. O.; YOKOZAWA, J.; SILVA, F. H.; NAVARRO-CATTAPAN, L. D.; SANTELLI, R. V.; JACOBS, L. M.; GRAESSMANN, A.; GRAESSMANN, M.; STOCKER, A. J.; LARA, F. J. S., Molecular characterization of the C-8 DNA puff gene of *Rhynchosciara americana*, **J. Mol. Biol.**, v.233, p.799-803, 1993.

FUJIWARA, H.; OSANAI, M.; MATSUMOTO, T.; KOJIMA, K. K., Telomere-specific non-LTR retrotransposons and telomere maintenance in the silkworm, *Bombyx mori*, **Chromosome Res.**, v.13, n.5, p.455-467, 2005.

FUJIWARA, H.; OGURA, T.; TAKADA, N.; MIYAJIMA, N.; ISHIKAWA, H.; MAEKAWA, H., Introns and their flanking sequences of *Bombyx mori* rDNA, **Nucleic Acids Res.**, v.12, n.17, p.6861-6869, 1984.

GAMBARINI, A. G.; MENEHINI, R., Ribosomal RNA genes in salivary gland and ovary of *Rhynchosclara angelae*, **J. Cell Biol.**, v.54, n.2, p.421-426, 1972.

GEORGE, J. A.; DEBARYSHE, P. G.; TRAVERSE, K. L.; CELNIKER, S. E.; PARDUE, M. L., Genomic organization of the *Drosophila* telomere retrotransposable elements, **Genome Res.**, v.16, n.10, p.1231-1240, 2006.

GERARD, G. F.; MILLER, K., Comparison of Glyoxal and Formaldehyde Gels for sizing rRNAs, **Focus**, v.19, n.1, p.17-18, 1997.

GLOVER, D. M.; ZAHA, A.; STOCKER, A. J.; SANTELLI, R. V.; PUEYO, M. T.; TOLEDO, S. M.; LARA, F. J. S.; Gene amplification in *Rhynchosciara* salivary gland chromossomes., **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.79, p.2947-2951, 1981.

GLOVER, D. M.; HOGNESS, D. S., A novel arrangement of the 18S and 28S sequences in a repeating unit of *Drosophila melanogaster* rDNA., **Cell**, v.10, n.2, p.167-176, 1977.

GORAB, E., Reverse transcriptase-related proteins in telomeres and in certain chromosomal loci of *Rhynchosciara* (Diptera: Sciaridae), **Chromosoma**, v.111, n.7, p.445-454, 2003.

GORDON, D.; ABAJIAN, C.; GREEN, P., Consedi a graphical tool for sequence finishing. **Genome Res.**, v.8, p.195–202, 1998.

GREEN, C. L.; FROMMER, M., The genome of the Queensland fruit fly *Bactrocera tryoni* contains multiple representatives of the *mariner* family of transposable elements, **Insect Molecular Biology**, v.10, n.4, p.371-386, 2001.

GUEVARA, M.; BASILE, R., DNA and RNA puffs in *Rhynchosciara*, *Caryologia*, v.26, n.2, p.275-295, 1973.

HALAIMIA-TOUMI, N.; CASSE, N.; DEMATTEI, M. V.; RENAULT, S.; PRADIER, E.; BIGOT, Y.; LAULIER, M., The GC-Rich Transposon *Bytmar1* from the Deep-Sea Hydrothermal Crab, *Bythograea thermydron*, May Encode Three Transposase Isoforms from a Single ORF, **J. Mol. Evol.**, v.59, p.747-760, 2004.

HARTL, D. L.; LOHE, A. R.; LOZOVSKAYA, E. R., Regulation of the transposable element *mariner*, **Genetica**, v.100, n.1-3, p.177-184, 1997.

JACOBSON, J. W.; MEDHORA, M. M.; HARTL, D. L., Molecular structure of a somatically unstable transposable element in *Drosophila*, **Proc. Nat. Acad. Sci. USA**, v.83, p.8684-8688, 1996.

JAKUBCZAK, J. L.; ZENNI, M. K.; WOODRUFF, R. C.; EICKBUSH, T. H., Turnover of R1 (type I) and R2 (type II) retrotransposable elements in the ribosomal DNA of *Drosophila melanogaster*, **Genetics**, v.131, n.1, p.129-142, 1992.

JAMRICH, M.; MILLER, O.L.JR, The rare transcripts of interrupted rRNA genes in *Drosophila melanogaster* are processed or degraded during synthesis, **EMBO J.**, v.3, n.7, p.1541-1545, 1984.

JARVIK, T.; LARK, K.G., Characterization of Soymar1, a Mariner Element in Soybean, **Genetics**, v.149, p.1569-1574, 1998.

KAMINKER, J. S.; BERGMAN, C. M.; KRONMILLER, B.; CARLSON, J.; SVIRSKAS, R.; PATEL, S.; FRISE, E.; WHEELER, D. A.; LEWIS, S. E.; RUBIN, G. M.; ASHBURNER, M.; CELNIKER, S. E., The transposable elements of *Drosophila melanogaster* euchromatin: a genomics perspective, **Genome Biology**, v.3, n.12, p.84.1-84.20, 2002.

KOJIMA, K. K.; FUJIWARA, H., Long-term inheritance of the 28S rDNA-specific retrotransposon R2, **Mol. Biol. Evol.**, v.22, n.11, p.2157-2165, 2005.

KOJIMA, K. K.; FUJIWARA, H., Evolution of target specificity in R1 clade non-LTR retrotransposons, **Mol. Biol. Evol.**, v.20, n.3, p.351-361, 2003.

KUMARESAN, G.; MATHAVAN, S., Molecular diversity and phylogenetic analysis of *mariner*-

like transposons in the genome of the silkworm *Bombyx mori*, **Insect Molecular Biology**, v.13, n.3, p.259-271, 2004.

LAMPE, D. J.; WITHERSPOON, D. J.; SOTO-ADAMES, F. N.; ROBERTSON, H. M., Recent Horizontal Transfer of *Mellifera* Subfamily *Mariner* Transposons into Insect Lineages Representing Four Different Orders Shows that Selection Acts Only During Horizontal Transfer, **Mol. Biol. Evol.**, v.20, n.4, p.554-562, 2003.

LAMPE, D. J.; WALDEN, K. K. O.; ROBERTSON, H. M., Loss of Transposase-DNA Interaction May Underline the Divergence of *mariner* Family Transposase Elements and the Ability of More than One *mariner* to Occupy the Same Genome, **Mol. Biol. Evol.**, v.18, n.6, p.954-961, 2001.

LAMPE, D. J.; AKERLEY, B. J.; RUBIN, E. J.; MEKALANOS, J. J.; ROBERTSON, H. M., Hyperactive transposase mutants of the *Himar 1 mariner* transposon, **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.96, p.11428-11433, 1999.

LAMPE, D. J.; CHURCHILL, M. E. A.; ROBERTSON, H. M., A purified *mariner* transposase is sufficient to mediate transposition *in vitro*, **The EMBO Journal**, v.15, n.9, p.5470-5479, 1996.

LARA, F. J. S.; TAMAKI, H.; PAVAN, C., Laboratory culture of *Rhynchosciara angelae*. **Am. Nature**, v.99, p.189-191, 1965.

LEROY, H.; CASTAGNONE-SERENO, P.; RENAULT, S.; AUGÉ-GOUILLOU, C.; BIGOT, Y.; ABAD, P., Characterization of *Mcmar1*, a *mariner*-like element with large inverter terminal repeats (ITRs) from the phytoparasitic nematode *Meloidogyne chitwoodi*, **Gene**, v.304, p.35-41, 2003.

LEVIS, R. W.; GANESAN, R.; HOUTCHENS, K. TOLAR, L. A.; SHEEN, F. M., Transposons in place of telomeric repeats at a *Drosophila* telomere, **Cell**, v.75, n.6, p.1083-1093, 1993.

LOHE, A. R.; DE AGUIAR, D.; HARTL, D. L., Mutations in the *mariner* transposase: the D,D(35)E consensus sequence is nonfunctional, **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.94, n.4, p.1293-1297, 1997.

LOHE, A. R.; MORIYAME, E. N.; LIDHOLM, D. A.; HARTL, D. L., Horizontal Transmission, Vertical Inactivation, and Stochastic Loss of *Mariner*-like Transposable Elements, **Mol. Biol. Evol.**, v.12, n.1, p.62-72, 1995.

LOPEZ, C. C.; RODRIGUEZ, E.; DIEZ, J. L.; EDSTROM, J.; MORCILLO, G., Histochemical localization of reverse transcriptase in polytene chromosomes of chironomids, **Chromosoma**, v.108, n.5, p.302-307, 1999.

MACHADO-SANTELLI, G. M.; BASILE, R., DNA replication and DNA puffs in salivary chromosomes of *Rhynchosciara*, **Ciência e Cultura**, v.27, n.2, p.167-174, 1975.

MADALENA, C. R.; GORAB, E., A chromosome end satellite of *Rhynchosciara americana* (Diptera: Sciaridae) resembling nematoceran telomeric repeats, **Insect Mol. Biol.**, v.14, n.3, p.255-262, 2005.

MANDRIOLI, M., Identification and chromosomal localization of *mariner*-like elements in the cabbage moth *Mamestra brassicae* (Lepidoptera), **Chromosome Research**, v.11, p.319-322, 2003.

MANIATS, T.; FRITSCH, E. F.; SAMBROOK, J., **Molecular Cloning: A laboratory manual**, 3^o edição.

MARTÍNEZ-GUITARTE, J.L.; DÍEZ, J.L.; MORCILLO, G. Complex repetitive sequences in Chironomus telomeres: Its role in telomeric function and in the cellular stress response. Recent Devel. **Nucleic Acids Res.**, v. 1, p. 151-165, 2004.

MARUYAMA, K.; HARTL, D. L., Evidence for interspecific transfer of the transposable element *mariner* between *Drosophila* and *Zaprionus*, **J. Mol. Evol.**, v.33, n.6, p.514-524, 1991.

MASON, J. M.; KONEV, A. Y.; BIESSMANN, H., Telomeric position effect in *drosophila melanogaster* reflects a telomere length control mechanism, **Genetica**, v.117, n.2-3, p.319-325, 2003.

MASON, J. M.; HAOUDI, A.; KONEV, A. Y.; KURENOVA, E. WALTER, M. F.; BIESSMANN, H., Control of telomere elongation and telomeric silencing in *Drosophila melanogaster*, **Genetica**, v.109, n.1-2, p.61-70, 2000.

MCEACHERN, M. J.; KRAUSKOPF, A.; BLACKBURN, E. H., Telomeres and their control, **Annu. Rev. Genet.**, v.34, p.331-358, 2000.

MEDHORA, M.; MARUYAMA, K.; HARTL, D. L., Molecular and functional analysis of the *mariner* mutator element Mos1 in *Drosophila*, **Genetics**, v.128, p.311-318, 1991.

MELNIKOVA, L.; GEORGIEV, P., *Drosophila* telomeres: the non-telomerase alternative, **Chromosome Res.**, v.13, n.5, p.431-441, 2005.

MOREIRA, L. A; EDWARDS, M. J.; ADHAMI, F.; JAASINSKIENE, N.; JAMES, A. A.; JACOBS-LORENA, M., Robust gut-specific gene expression in transgenic *Aedes aegypti* mosquitoes, **Proc. Nat. Acad. Sci. USA**, v.97, n.20, p.10895-10898, 2000.

MUKABAYIRE, O.; BESANSKY, N. J., Distribution of *T1*, *Q*, *Pegasus* and *mariner* transposable elements of the polytene chromosomes of PEST, a standard strain of *Anopheles gambiae*, **Chromosoma**, v.104, p.585-595, 1996.

NONATO, E.; PAVAN, C., A new species of *Rhynchosciara Rubsaamen*, 1894 (Diptera, Mycetophilidae). **Rev. Brasil Biol.**, v.11, p.435-437, 1951.

OKAZAKI, S.; ISHIKAWA, H.; FUJIWARA, H., Structural Analysis of TRAS1, a Novel Family of Telomeric Repeat-Associated Retrotransposons in the Silkworm, *Bombyx mori*, **Molecular and Cellular Biology**, v.15, n.8, p.4545-4552, 1995.

OKAZAKI, S.; TSUCHIDA, K.; MAEKAWA, H.; ISHIKAWA, H.; FUJIWARA, H., Identification of a pentanucleotide telomeric sequence, (TTAGG)_n, in the silkworm *Bombyx mori* and in other insects, **Mol. Cell Biol.**, v.13, n.3, p.1424-1432, 1993.

PARDUE, M. L.; DEBARYSHE, P. G., Retrotransposons provide an evolutionarily robust non-telomerase mechanism to maintain telomeres, **Annu. Rev. Genet.**, v.37, p.485-511, 2003.

PARDUE, M. L.; DEBARYSHE, P. G.; *Drosophila* telomere transposons: genetically active elements in heterochromatin, **Genetica**, v.109, n.1-2, p.45-52, 2000.

PARDUE, M. L.; DEBARYSHE, P.; G., *Drosophila* telomeres: two transposable elements with

important roles in chromosomes, **Genetica**, v.107, n.1-3, p.189-196, 1999.

PARDUE, M. L.; DANILEVSKAYA, O. N.; TRAVERSE, K. L.; LOWENHAUPT, K., Evolutionary links between telomeres and transposable elements, **Genetica**, v.100, n.1-3, p.73-84, 1997.

PARDUE, M. L.; DANILEVSKAYA, O. N.; LOWENHAUPT, K.; SLOT, F.; TRAVERSE, K. L., *Drosophila* telomeres: new views on chromosome evolution, **TIG**, v.12, n.2, p.48-52, 1996.

PAVAN, C.; Nucleic Acid Metabolism in Polytene Chromosomes and the Problem of Differentiation. **Brookhaven Symposia in Biology**, v.18, p.222-241, 1965.

PENALVA, L. O. F.; YOKOZAWA, J.; STOCKER, A. J.; SOARES, M. A. M.; GRAESSMANN, M.; ORLANDO, T. C.; WINTER, C. E.; BOTELLA, L. M.; GRAESSMANN, A.; LARA, F. J. S.; Molecular characterization of the C-3 DNA puff gene of *Rhynchosciara americana*, **Gene**, v.193, p.163-172, 1997.

PIETROKOVSKI, S.; HENIKOFF, S., A helix-turn-helix DNA-binding motif predicted for transposases of DNA transposons, **Mol. Gen. Genet.**, v.254, p.689-695, 1997.

PLASTERK, R. H. A.; IZSVÁK, Z.; IVICS, Z., Resident aliens: the Tc1/ *mariner* superfamily of transposable elements, **TIG**, v.15, n.8, p.326-332, 1999.

PRASAD, M. D.; NAGARAJU, J., A comparative phylogenetic analysis of full-length *mariner* elements isolated from Indian tasar silkworm, *Antheraea mylitta* (Lepidoptera: saturniidae), **J. Biosci.**, v.28, n.4, p.443-453, 2003.

RASHKOVA, S.; ATHANASIADIS, A.; PARDUE, M. L., Intracellular targeting of Gag proteins of the *Drosophila* telomeric retrotransposons, **J. Virol.**, v.77, n.11, p.6376-6384, 2003.

RASHKOVA, S.; KARAM, S. E.; KELLUM, R.; PARDUE, M. L., Gag proteins of the two *Drosophila* telomeric retrotransposons are targeted to chromosome ends, **The Journal of Cell Biology**, v.159, n.3, p.397-402, 2002a.

RASHKOVA, S.; KARAM, S. E.; PARDUE, M. L., Element-specific localization of *Drosophila* retrotransposon Gag proteins occurs in both nucleus and cytoplasm, **PNAS**, v.99, n.6, p.3621-3626, 2002b.

REZENDE-TEIXEIRA, P.; ANDRADE, A.; SIVIERO, F.; SANTELLI, R. V., A shortcut in phage screening technique, **Genetics and Molecular Biology**, v.28, n.1, p.150-151, 2005.

ROBERTSON, H. M.; WALDEN, K. K. O., *Bmmar6*, a second mori subfamily *mariner* transposon from the silkworm moth *Bombyx mori*, **Insect Molecular Biology**, v.12, n.2, p.167-171, 2003.

ROBERTSON, H. M.; MARTOS, R., Molecular evolution of the second ancient human *mariner* transposon, Hsmar2, illustrates patterns of neutral evolution in the human genome lineage, **Gene**, v.205, n.1-2, p.219-228, 1997.

ROBERTSON, H. M.; ZUMPANO, K. L., Molecular evolution of an ancient *mariner* transposon, Hsmar1, in the human genome, **Gene**, v.205, n.1-2, p.203-217, 1997.

ROBERTSON, H. M.; ASPLUND, M. L., *Bmmar1*: a Basal Lineage of the *Mariner* Family of Transposable Elements in the Silkworm Moth, *Bombyx mori*, **Insect Biochem Molec Biol**, v.26, n.8-9, p.945-954, 1996.

ROBERTSON, H. M.; LAMPE, D. J., Recent Horizontal Transfer of s *mariner* Transposable Element among and between Diptera and Neuroptera, **Mol. Biol. Evol.**, v.12, n.5, p.850-862, 1995.

ROBERTSON, H. M.; MACLEOD, E. G., Five major subfamilies of mariner transposable elements in insects, including the Mediterranean fruit fly, and related arthropods, **Insect Mol. Biol.**, v.2, n.3, p.125-139, 1993.

ROBERTSON, H. M., The *mariner* transposable element is widespread in insects, **Nature**, v.362, p.241-245, 1993.

RUBIN, G. M.; SPRADLING, A. C., Genetic transformation of *Drosophila* with transposable Element Vectors, **Science**, v.218, p.341-347, 1982.

RUSSELL, V. W.; SHUKLE, R. H., Molecular and cytological analysis of a mariner transposon from *Hessian* fly, **J. Hered**, v.88, n.1, p.72-76, 1997.

SAHARA, K.; MAREC, F.; TRAUT, W., TTAGG telomeric repeats in chromosomes of some insects and other arthropods, **Chromosome Res.**, v.7, n.6, p.449-460, 1999.

SANTELLI, R. V.; SIVIERO, F.; MACHADO-SANTELLI, G. M.; LARA, F. J. S.; STOCKER, A. J., Molecular characterization of the B-2 DNA puff gene of *Rhynchosciara americana*, **Chromosoma**, v.113, p.167-176, 2004.

SANTELLI, R. V.; NAVARRO-CATTAPAN, L. D., A simplified CsCl protocol for lambda DNA purification: no enzymatic treatment/one phenol extraction, **Genetics and Molecular Biology**, v.23, n.1, p.65-66, 2000.

SASAKI, T.; FUJIWARA, H., Detection and distribution patterns of telomerase activity in insects, **Eur. J. Biochem.**, v.267, n.10, p.3025-3031, 2000.

SIVIERO, F.; REZENDE-TEIXEIRA, P.; ANDRADE, A.; MACHADO-SANTELLI, G. M.; SANTELLI, R. V., Analysis of expressed sequence tags from *Rhynchosciara americana* salivary glands, **Insect Mol. Biol.**, v.15, p.109-118, 2006.

SPRADLING, A. C.; RUBIN, G. M., Transposition of cloned P Element into *Drosophila* Germ Line Chromosomes, **Science**, v.218, p.341-347, 1982.

TERRA, W. R.; DE BIANCHI, A. G.; GAMBARINI, A. G.; LARA, F. J. S., Haemolymph Amino Acids and Related Compounds During Cocoon Production by the Larvae of the Fly *Rhynchosciara americana*, **J. Insect Physiology**, v.19, p.2097-2106, 1973.

VAN LUENEN, H. G.; COLLOMS, S. D.; PLASTERK, R. H., The mechanism of transposition of Tc3 in *C.elegans*, **Cell**, v.79, p.293-301, 1994.

WANG, W.; SWEVERS, L.; IATROU, K., *Mariner* (*Mos1*) transposase and genomic integration of foreign gene sequences in *Bombyx mori* cells, **Insect Molecular Biology**, v.9, n.2, p.145-155, 2000.

WIEDEMANN, C. R. W., "Diptera exotica", 244pp, 1 fig., 2 pls. Kiliae [=Kiel], 1821.

WINTER, C. E.; BIANCHI, A. G.; TERRA, W. R.; LARA, F. J. S., The giant DNA puffs of *Rhynchosciara americana* code for polypeptides of the salivary gland secretion, **J. Insect Physiol.**, v.23, p.1455-59, 1977.

XIONG, Y.; BURKE, W. D.; JAKUBCZAK, J. L.; EICKBUSH, T. H., Ribosomal DNA insertion elements R1Bm and R2Bm can transpose in a sequence specific manner to locations outside the 28S genes, **Nucleic Acids Res.**, v.16, n.22, p.10561-10573, 1988.

YE, J.; EICKBUSH, T. H., Chromatin structure and transcription of the R1- and R2-inserted rRNA genes of *Drosophila melanogaster*., **Mol. Cell Biol.**, v.26, n.23, p.8781-8790, 2006.

YOSHIYAMA, M.; HONDA, H.; SHONO, T.; KIMURA, K., Survey of *mariner*-like elements in the housefly, *Musca domestica*, **Genetica**, v.108, p.81-86, 2000.

YUN, J. J.; HEISLER, L. E.; HWANG, I. I.; WILKINS, O.; LAU, S. K.; HYRCZA, M.; JAYABALASINGHAM, B.; JIN, J.; MCLAURIN, J.; TSAO, M. S.; DER, S. D., Genomic DNA functions as a universal external standard in quantitative real-time PCR, **Nucleic Acids Res.**, v.34, n.12, p.e85, 2006. Erratum in: *Nucleic Acids Res.*, v.34, n.22, p.6718, 2006.

ZAHA, A.; LEONCINI, O.; HOLLENBERG, C. P.; LARA, F. J., Cloning and characterization of the ribosomal RNA genes of *Rhynchosciara americana*, **Chromosoma**, v.87, n.1, p.103-16, 1982.

ZAKHARKIN, S. O.; WILLIS, R. L.; LITVINOVA, O. V.; JINWAL, U. K.; HEADLEY, V. V.; BENES, H., Identification of two *mariner*-like elements in the genome of the mosquito *Ochlerotatus atropalpus*, **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v.34, p.377-386, 2004.

ZHANG, X.; EICKBUSH, T. H., Characterization of active R2 retrotransposition in the rDNA locus of *Drosophila simulans*, **Genetics**, v.170, n.1, p.195-205, 2005.