

DISTRIBUIÇÃO DO TRANSPOSON GALLUHOP NAS AVES

Nairo Farias de Farias ¹

Alice Lemos Costa ²

Natasha Ávila Bertocchi ³

Analía Del Valle Garnero ⁴

Fabiano Pimentel Torres ⁵

Ricardo José Gunski ⁶

Resumo:

Elementos transponíveis (TEs) são sequências de DNA encontradas repetidamente nos genomas, que possuem como particularidade a capacidade de mudarem de posição tanto dentro como entre genomas. Devido a sua natureza móvel, repetitiva e parasitária, são significativos para a compreensão da organização, estrutura, função e evolução dos genomas. Apesar dessa natureza repetitiva e distribuída, nas aves, poucas famílias de TEs foram descritas e o conhecimento sobre essa porção móvel nos genomas desse grupo ainda é muito insipiente, se comparado a outros. Dentre os elementos mais tipicamente encontrados nas aves, está o transposon galluhop, inicialmente identificado no genoma de *Gallus gallus*, sendo o mais representativo da sua classe - elementos que transpõem via DNA. Uma análise mais detalhada, in silico, desse transposon, revelou, dentre outras características, que o mesmo tem uma distribuição bastante restrita nas aves, sendo identificada sua presença em apenas cinco espécies dentre 60 genomas analisados, apresenta grande variabilidade no número de cópias nesses genomas e, ainda é o primeiro transposon possivelmente envolvido em transferência horizontal dentro do grupo das aves. Pressupondo uma distribuição possivelmente mais ampla, objetivamos avaliar a presença e distribuição dos elementos galluhop em aves de diferentes famílias, contribuindo para o conhecimento sobre a essa porção repetitiva e móvel desses genomas. As coletas dos espécimes de aves de diferentes famílias ocorreram no Estado do Rio Grande do Sul, Brasil e a captura dos espécimes foi realizada conforme licença do SISBIO e aprovação pelo CEUA da UNIPAMPA. Após as extrações dos DNAs genômicos, para determinar a presença ou a ausência do elemento galluhop nas aves amostradas, foram utilizadas diferentes técnicas de abordagens in vitro, como amplificações por PCR, hibridizações por dot blot e Southern blot. Nas amplificações por PCR, das 29 espécies analisadas, obteve-se amplificação de fragmento de tamanho esperado para o elemento em 12 espécies. Nas hibridizações por dot blot, das 12 espécies analisadas, 8 apresentaram sinal de hibridização, indicando a presença do elemento nesses genomas. No total, em 18 espécies diferentes foi detectada a presença de galluhop. Comparando as abordagens in vitro deste trabalho com as abordagens in silico descritas na literatura, podemos inferir que a distribuição do transposon galluhop nas aves parece ser maior do que aquele encontrado pelas análises dos genomas sequenciados. Isso pode ser explicado pelo fato de que a maioria das espécies de aves ainda não têm seus genomas sequenciados, considerando a grande diversidade de populações e espécies que temos na natureza.

Palavras-chave: Aves, elementos transponíveis, galluhop.

Modalidade de Participação: Iniciação Científica

DISTRIBUIÇÃO DO TRANSPOSON GALLUHOP NAS AVES

¹ Aluno de graduação. nairoty@gmail.com. Autor principal

² Discente. alicelemoscosta14bio@gmail.com. Co-autor

³ Discente pós-graduação.. bertocchinatasha@gmail.com. Co-autor

⁴ Docente.. analiagarnero@yahoo.com.br. Co-autor

⁵ Docente. fabianotorres@unipampa.edu.br. Orientador

⁶ Docente.. rgunski@yahoo.com.br. Co-orientador

DISTRIBUIÇÃO DO TRANSPOSON *GALLUHOP* NAS AVES

1 INTRODUÇÃO

Os elementos transponíveis (TEs - do inglês Transposable Elements) são sequências de DNA encontradas repetidamente nos genomas, que possuem como particularidade a capacidade de mudarem de posição tanto dentro como entre genomas. Essa característica - a mobilização - revolucionou o conhecimento sobre o que, atualmente, denomina-se genoma e o seu funcionamento dentro das células (CARARETO, C.M.A, *et al.*, 2015).

São constituintes importantes e significativos dos genomas da maioria dos organismos, alcançando uma proporção em torno de 15% para insetos, 40% em mamíferos, incluindo humanos com 45% de seus genomas constituídos por esses elementos, até em torno de mais de 60% do genoma de plantas, como o milho (CARARETO, C.M.A, *et al.*, 2015). A transposição e a dispersão dos TEs podem trazer uma série de consequências para os genomas onde habitam, dependendo do local para onde se movem ou se encontram, podendo causar alterações na estrutura dos genes, alterações no seu funcionamento, aumento ou diminuição da sua expressão, causar mutações, rearranjos cromossômicos, doenças e, ainda, promover variabilidade genética aos genomas ou serem domesticados pelos mesmos (AZIZ, R. K. *et al.*, 2010). Devido a sua natureza móvel, repetitiva e parasitária, são significativos para a compreensão da organização, estrutura, função e evolução dos genomas. Apesar dessa natureza repetitiva e distribuída, nas aves, poucas famílias de TEs foram descritas e o conhecimento sobre essa porção móvel nos genomas desse grupo ainda é muito insipiente, se comparado a outros grupos. Estudos de sequenciamentos genômicos recentes vêm revelando que, além do genoma mais compactado, quando comparado a mamíferos, por exemplo, as aves possuem também uma menor proporção de sequências repetitivas no genoma, incluindo baixa densidade de elementos transponíveis, podendo ir de 4% a 10%, enquanto em outros grupos essa proporção é significativamente maior (RUBIN, C. J. *et al.*, 2010).

Devido a sua grande diversidade estrutural, TEs são classificados de forma hierárquica em classes, subclasses, ordens, superfamílias, famílias e subfamílias, de acordo com suas características estruturais. Com base no seu modo de transposição os TEs são classificados em dois grandes grupos (classes): retrotransposons (Classe I), usam um intermediário de RNA; e transposons (Classe II) se transpõem diretamente via DNA (CARARETO, C.M.A, *et al.*, 2015).

Poucas famílias de TEs foram descritas em aves, dentre estas, as mais encontradas são as do retrotransposon *CR1* (*ChickenRepeat1*) e a do transposon *galluhop* (WRIGHT, N.A., *et al.* 2014; BÖHNE, A., *et al.* 2008; WALLAU, G. L. *et al.* 2011). Ambas foram identificadas inicialmente no genoma de *Gallus gallus* e são as mais representativas das suas classes de TEs nesse genoma. O transposon *galluhop* foi analisado em detalhes por Bertocchi *et al.*, (2017), por meio de abordagens *in silico* (BERTOCCHI, N.A., *et al.* 2017), e mostrou algumas características peculiares como: a) uma distribuição bastante restrita nas aves, sendo identificada sua presença em apenas cinco espécies dentre 60 genomas analisados pelos autores; b) pertence a uma subfamília diferente das anteriormente descritas na literatura; c) apresenta grande variabilidade no número de cópias nos genomas onde foi identificado; e d) é o primeiro transposon possivelmente envolvido em transferência horizontal dentro do grupo das aves.

Pressupondo que a distribuição do transposon *galluhop* possa ser bem mais ampla do que a revelada por abordagens *in silico* e que a detecção, isolamento, distribuição, identificação, localização, variabilidade estrutural e funcional, bem como as relações e implicações evolutivas dos TEs nos genomas, podem ser estudadas por meio de técnicas

moleculares clássicas/convencionais *in vitro*, aliadas às ferramentas de análise *in silico*, o presente trabalho tem como objetivos: i) avaliar a presença e distribuição dos elementos *galluhop* em aves de diferentes famílias; ii) caracterizar estrutural e funcionalmente as cópias de *galluhop* encontradas e inferir suas relações de similaridade e filogenéticas. Com isso, objetivamos também, contribuir para o conhecimento sobre a porção repetitiva e móvel (TEs) dos genomas das aves.

2 METODOLOGIA

As coletas dos espécimes de aves de diferentes famílias ocorreram no Estado do Rio Grande do Sul, Brasil conforme a tabela 1. A captura dos espécimes foi realizada com redes ornitológicas (de neblina) conforme licença do SISBIO, registro 44173-3 e aprovação pelo Comitê de Ética no Uso de Animais em Pesquisa (CEUA) da Universidade Federal do Pampa, número 010/2018, nos municípios de São Gabriel, Dom Pedrito, Santa Maria e Porto Vera Cruz.

Extrações de DNAs genômicos - as amostras de sangue e tecidos coletadas foram armazenadas segundo o protocolo de Lahiri & Nurnberger (1991). O DNA genômico foi extraído seguindo o método de fenol-clorofórmio (SASSI *et al.*, 2005) e quantificado em espectrofotômetro NanoVue (GE Healthcare Life Sciences). Alternativamente, como método menos invasivo, prático e de baixo custo, também foi utilizada a extração de DNA de pena, pelo método de lise alcalina rápida (RUDBEK, L & DISSING, J., 1998).

Hibridizações de DNA - para a hibridização por *dot blot*, as amostras de DNA genômico (2 µg) foram desnaturadas, transferidas para uma membrana de nylon (Hybond-N+; GE Healthcare Biosciences) e fixadas a 80°C por duas horas.

Para hibridizações por *Southern blot*, os fragmentos amplificados de *galluhop* nas espécies analisadas foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1% e, após tratamentos do gel (desnaturação e neutralização), as amostras foram transferidas para uma membrana de nylon (Hybond-N+; GE Healthcare Biosciences) e fixadas a 80°C por duas horas.

Para marcação da sonda e detecção foram utilizados os kits de marcação e detecção AlkPhos Direct Labelling and Detection System com CDP-Star (GE Healthcare), seguindo as recomendações do fornecedor. As hibridizações foram permitidas ocorrerem lentamente em forno de hibridização, overnight, a 55°C. As lavagens de estringência foram desenvolvidas, primeiramente, a 55°C e, após, à temperatura ambiente, com agitação constante. Para a detecção da hibridização, foi utilizado o kit de detecção acima referido e revelação em filme de autoradiografia, com exposições de uma hora e overnight para o *dot blot*; e um e cinco minutos para o *Southern blot*.

Preparação da sonda de *galluhop* - para obtenção da sonda, foi amplificado, por PCR, um fragmento interno de 572pb do elemento *galluhop* de *G. gallus*, utilizando os iniciadores Ghop-A (5'CACAGCTGTCACACCACAAA3') e Ghop-S (5'AGTGTGCTCCATGGTCTTCA3') desenhados por Bertocchi *et al.*, (2017). Foram utilizadas aproximadamente 50ng de DNA para uma reação de 50µl contendo 1U de Taq Polimerase (Invitrogen), 5µl de tampão 10X fornecido pelo fabricante, 10mM de cada nucleotídeo, 10 pmol de cada primer e 1,5 mM de MgCl₂. As condições de amplificação foram: 97°C por 5 minutos, seguida de 35 ciclos de 95°C por 30 segundos, 55°C por 30 segundos e 72°C por 40 segundos, com uma extensão final de 5 minutos a 72°C. O fragmento amplificado foi separado por eletroforese em gel de agarose 1%, corado com GelRed e visualizado em transiluminador de luz UV. Após, esse fragmento foi purificado com o kit de purificação de produto de PCR PureLink Quick Gel Extraction & PCR Purification Combo Kit (Invitrogen).

Sequenciamento das amostras - os produtos da PCR de *galluhop* purificado de *G. gallus* bem como das espécies *Tolmomyias sulphurens*, *Turdus rufiventris*, *Meleagris gallopavo*, *Coturnix coturnix japonica* e *Synallaxis frontalis* foram sequenciados seguindo as recomendações do serviço de sequenciamento da MacroGen Inc. (Korea). As sequências com qualidade foram submetidas ao BLASTn para confirmação da identidade do elemento *galluhop*, e utilizadas para as análises *in silico*, como busca por ORFs, domínios proteicos e alinhamentos.

Tabela 1 – Locais de coletas, famílias, espécies e análises de PCR e hibridizações.

Código de Coleta	Família	Espécie	PCR	Dot blot	Southern blot
PVC	Caprimulgidae	<i>Hydropsalis brasiliana</i>	-	*	*
PVC		<i>Nyctibius griseus</i>	-	*	*
SM	Columbidae	<i>Leptotila rufaxilla</i>	-	*	*
SM		<i>Columbina picui</i>	*	+	*
SM		<i>Zenaida auriculata</i>	-	*	*
SG	Furnariidae	<i>Synallaxis frontalis</i>	+	-	*
DP		<i>Syndactyla rufosuperciliata</i>	+	*	+
PVC	Icteridae	<i>Ageloides badius</i>	+	*	*
SG	Parulidae	<i>Basileuterus leucoblepharus</i>	-	-	*
SG		<i>Parula pitiayumi</i>	-	*	*
DP	Passerellidae	<i>Zonotrichia capensis</i>	+	*	*
DP	Picidae	<i>Colaptes melanolaemus</i>	+	*	*
PVC		<i>Colaptes campestris</i>	-	*	*
SM		<i>Piculus aurulentus</i>	-	+	*
SM		<i>Picoides mixtus</i>	-	*	*
DP		<i>Picumnus nebulosus</i>	-	*	*
PVC		<i>Veniliornes spilogaster</i>	+	*	*
SG	Poliophtidae	<i>Poliophtila dumiola</i>	-	*	*
SM	Rhynchocyclidae	<i>Tolmomyias sulphurens</i>	+	+	*
PVC	Strigidae	<i>Athene cunicularia</i>	+	*	*
SG	Turdidae	<i>Turdus rufiventris</i>	+	*	*
DP	Thraupidae	<i>Poospiza nigrorufa</i>	+	*	+
DP		<i>Saltator aurantirostris</i>	+	*	+
PVC		<i>Saltator coerulescens</i>	-	*	*
SM	Trogonidae	<i>Lanio cucullatus</i>	*	+	*
SM		<i>Trogon surrucura</i>	+	+	*
DP	Trochilidae	<i>Hylocharis chrisura</i>	-	*	*
DP	Tyrannidae	<i>Pitangus sulphuratus</i>	*	-	*
DP		<i>Euscarthmus meloryphus</i>	*	+	*
SG	Anatidae	<i>Anser cygnoides</i>	-	-	*
SG	Phasianidae	<i>Coturnix coturnix japonica</i>	+	+	*
SG		<i>Gallus gallus</i>	+	+	+
SG		<i>Meleagris gallopavo</i>	+	+	+

DP = Dom Pedrito, SG = São Gabriel, SM = Santa Maria, PVC = Porto Vera Cruz

+ = Presença, - = Ausência, * = Não analisado

Fonte: Farias *et al.* 2018.

3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Os resultados obtidos sobre a presença/ausência do elemento *galluhop* em diferentes espécies de aves amostradas nesse trabalho, por meio de diferentes abordagens *in vitro*, como amplificação por PCR, hibridizações por *dot blot* e *Southern blot*, estão resumidos na tabela 1.

Nas amplificações por PCR, das 29 espécies analisadas, obteve-se amplificação de fragmento de tamanho esperado para o elemento em 12 espécies. Nas hibridizações por *dot blot*, das 12 espécies analisadas, 8 apresentaram sinal de hibridização, indicando a presença do elemento nesses genomas. Cabe destacar que duas dessas espécies são consideradas controle positivo para a presença do elemento. Numa abordagem por *Southern blot* dos produtos de *galluhop* amplificados nas outras espécies, foi reforçada a presença do elemento em três espécies que apresentaram amplificação por PCR, comprovada pelos sinais de hibridização. Comparando as abordagens *in vitro* com as abordagens *in silico* de Bertocchi *et al.*, (2017), podemos inferir que a distribuição do transposon *galluhop* nas aves parece ser muito maior do que aquele encontrado pelas análises dos genomas sequenciados. Isso pode ser explicado pelo fato de que a maioria das espécies de aves ainda não têm seus genomas sequenciados, considerando a grande diversidade de populações e espécies que temos na natureza. E, ainda, abordagens tradicionalmente utilizadas para estudar elementos transponíveis como hibridizações e amplificações por PCR, parecem ser mais sensíveis a novas detecções, quando comparadas às ferramentas de alinhamentos nos genomas sequenciados, como BLAST.

Quanto aos resultados de sequenciamento, apesar de os produtos amplificados passarem por uma etapa de purificação das bandas do gel, as leituras se mostraram com qualidade apenas para duas das seis amostras analisadas. Essas duas sequências foram de fragmentos amplificados de *Tolmomyias sulphurescens* e *Turdus rufiventris*. A busca por similaridade nos bancos de dados mostrou alinhamento, com mais de 70% de identidade, da sequência genômica de *Apteryx australis mantelli*, uma espécie de ave da Nova Zelândia cujo genoma foi sequenciado. Análises das sequências buscando identificação por ORFs no ORFinder, e por domínios conservados no Conserved Domain do NCBI, não retornou nenhum resultado significativo. Por se tratar de elemento transponível, cuja variabilidade do número de cópias pode ser bem maior do que a observada, acreditamos que para a melhoria da qualidade das leituras do sequenciamento, os produtos amplificados devam ser clonados para posterior sequenciamento. Assim, além de garantir a qualidade das leituras, também conheceremos mais sobre a variabilidade de cópias nessas espécies analisadas.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A partir das análises dos resultados obtidos até o momento, podemos concluir que a distribuição do transposon *galluhop* nos genomas das aves é mais ampla do que a descrita na literatura. Para se chegar a tal conclusão, a sensibilidade das técnicas utilizadas *in vitro* para detecção, isolamento e identificação foi de fundamental importância nesse trabalho.

Como perspectivas pretendemos clonar os fragmentos amplificados para obtenção de maior qualidade nos sequenciamentos e, conseqüentemente, análises mais detalhadas sobre a estrutura, integridade e similaridade desses elementos poderão ser desenvolvidas.

REFERÊNCIAS

- AZIZ, R. K.; BREITBART, M.; EDWARDS, R. A. Transposases are the most abundant, most ubiquitous genes in nature. **Nucleic Acids Research**. 38 (13): 4207-4217. 2010.
- BERTOCCHI, N.A., TORRES, F.P.T., GARNERO, A., GUNSKI, R.J., WALLAU, G.L. Evolutionary history of the mariner element *galluhop* in avian genomes. **Mobile DNA**. 8: 11. 2017.
- BÖHNE, A., BRUNET, F.; GALIANA A., DELPHINE S.; C.; VOLFF, J. Transposable elements as drivers of genomic and biological diversity in vertebrates. **Chromossome Research**. 16(1):203-15 2008.
- CARARETO, C.M.A, MONTEIRO-VITORELLO, C.B. & VAN SLUYS, MA (Organizadoras). **Elementos de Transposição - Diversidade, evolução, aplicações e impacto nos genomas dos seres vivos**. Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Genética/Editora FIOCRUZ, 2015.
- LAHIRI, D.K. & NURNBERGER, J.I.JR. A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. **Nucleic Acids Research**. v19 (19): 5444 1991.
- RUBIN, C. J. *et al.* Whole-genome resequencing reveals loci under selection during chicken domestication. **Nature**. 464, 587–591. 2010.
- RUDBEK, L & DISSING, J. Rapid simple alkaline extraction of human genomic DNA from whole blood, buccal epithelial cells, semem and forensic stains for PCR. **Biotechniques**. 25(4):588-90. 1998.
- SASSI AK, HERÉDIA F, LORETO EL, *et al.* Transposable elements *P* and *gypsy* in natural populations of *Drosophila willistoni*. **Genetics and Molecular Biology**. v28 (4). 2005.
- WALLAU, G. L. *et al.* The evolutionary history of mariner-like elements in Neotropical drosophilids. **Genetica**. 139(3):327-38. 2011.
- WRIGHT, N.A., GREGORY T.R, WITT, C.C. Metabolic ‘engines’ of flight drive genome size reduction in birds. **Proceedings Biological Sciences**. v.281 (1779). 2014.