# CONFIRMAÇÃO DA REGIÃO PROMOTORA E A MONTANTE DO GENE *DMRT1* DE *Apareiodon* sp. (CHARACIFORMES: PARODONTIDAE)

Amanda Piveta Schnepper (PIBIC/Cnpq/UEPG), Viviane Nogaroto (Pesquisadora) Michelle Orane Schemberger (Pesquisadora), Marcelo Ricardo Vicari (Orientador), e-mail: vicarimr@yahoo.com.br

Universidade Estadual de Ponta Grossa/Departamento de Biologia Estrutural, Molecular e Genética

**Ciências Biológicas/ Genética/ Genética Animal**

**Palavras-chave:** Determinação sexual, região promotora, elementos transponíveis

**Resumo**

O gene *Dmrt1* tem sido estudado como um forte candidato a participante na diferenciação sexual. Entretanto não existem estudos da atuação e cascata gênica a qual pertence esse gene em *Apareiodon* sp. (ZZ/ZW). Sabe-se que elementos transponíveis (TEs) podem atuar na regulação e na expressão gênica a partir da sua inserção, carregando sítios de ligação aos fatores de transcrição ou provocando mutações nestes sítios, na região promotora dos genes. Neste estudo foi caracterizada a região promotora do gene *Dmrt1* de macho e fêmea quanto a inserção de TEs e sítios de ligação por fatores de transcrição (TFBS). A partir da análise das sequências obtidas foi possível localizar diversos TEs. Os TEs Gypsy em macho e ENSPM em fêmea apresentaram o sítio de ligação TATA box em seu interior, indicando um processo de exaptação molecular do elemento transponível para a geração de TFBS e regulação da expressão do *Dmrt1*.

## Introdução

A família Parodontidae apresenta um número diploide (2n) conservado de 54 cromossomos e, neste grupo, há espécies sem sistema de cromossomos sexuais heteromórficos, espécies com proto-cromossomos sexuais e outras com sistema de cromossomos sexuais simples ZZ/ZW ou múltiplo ZZ/$W_1W_2$ (SCHEMBERGER et al., 2011). No entanto, a determinação sexual é pouco compreendida neste grupo.

O controle e a coordenação da expressão gênica em eucariotos dependem de redes regulatórias transcricionais e pós-transcricionais. Do ponto de vista evolutivo as inovações e as mudanças em determinadas ligações funcionais das redes regulatórias devem ocorrer no nível do DNA, por alteração de sequências cis-regulatórias, definidas como sítios de ligação para fatores de transcrição – TFBS - (MERTZ et al., 1992). Atualmente tem sido atribuído aos TEs um importante papel na geração de novos sítios de controle da regulação gênica (FESCHOTTE, 2008). Análises de bioinformática em escala genômica tem demonstrado que inúmeros promotores gênicos, sítios variantes de *splicing* e sinais de poliadenilação são derivados dos elementos transponíveis (MARINO-RAMIREZ; JORDAN, 2006).

O gene *Dmrt1* (*Doublesex and Mab-3 Related Transcription factor 1*) codifica um domínio de ligação ao DNA que pertence para a família gênica que contém o domínio DM (*Doublesex* e *Mab-3*), o qual está envolvido na determinação sexual e diferenciação de variados organismos (RAYMOND et al., 1998). O peixe medaka (*Oryzias latipes*), que apresenta determinação sexual XX/XY apresentou uma cópia

duplicada do gene *Dmrt1* no cromossomo Y, que foi denominada *DmY* (MATSUDA et al., 2002). Mais tarde, foi demonstrado que o gene *DmY* de medaka possui inserção de elementos transponíveis na região promotora que doaram importantes TFBS, capazes de atuar na regulação da atividade gênica para determinação sexual (HERPIN et al., 2010). Neste estudo foi avaliado a região promotora do gene *Dmrt1* para associar à provável rota do desenvolvimento testicular de *Apareiodon* sp.

**Material e Métodos**

Foram utilizados DNA de 1 macho e 1 fêmea de *Apareiodon* sp. para a amplificação de diferentes regiões à montante do gene *Dmrt1*, as quais, foram sequenciadas por método de Sanger e comparadas com as mesmas regiões dos genomas de macho (22 vezes de cobertura) e fêmea (25 vezes de cobertura) da mesma espécie, sequenciados por Illumina HiSeq 2000 e montados por software Velvet. Os tecidos dos exemplares de *Apareiodon* sp. e os resultados do sequenciamento genômico foram obtidos do banco de amostras do Laboratório de Biologia Cromossômica: Estrutura & Função da UEPG. Os procedimentos de uso e bem-estar em pesquisa envolvendo animais foram aprovados no Comitê de Ética no Uso de Animais em Pesquisa da UEPG (CEUA 29/2016). A extração do DNA genômico foi realizada a partir de tecidos do animal (fígado e músculo) a partir do protocolo descrito por Doyle e Doyle (1990).

As regiões genômicas do *locus Dmrt1* de macho e fêmea conservadas e adjacentes às regiões diferenciais foram alinhadas e utilizadas para construção de quatro conjunto de primers para a amplificação por PCR da região regulatória do gene *Dmrt1* de *Apareiodon* sp. A reação de PCR consistiu de 100 ηg de DNA genômico, 1x tampão de reação (tampão *Taq* polimerase 1X = 2 mM $MgCl_2$), 200 μM dNTP, 40 μM primers e 1 unidade de *Taq* DNA polimerase, de acordo com as seguintes condições: 94ºC por 3 min, 35 ciclos de três passos: 94ºC por 50s, temperatura de anelamento por 1 min – sendo para o 1º e 3º conjuntos de primers T= 59,2ºC e para o 2º e 4º conjunto de primers T= 56ºC - e 72ºC por 1 min; além de extensão final de 72ºC por 5 min.

O sequenciamento nucleotídico dos produtos das amplificações das regiões a montante do gene *Dmrt1* foram realizadas utilizando o kit "DYEnamicTM ET Terminator Cycle Sequencing" (Amersham Biosciences). As sequências nucleotídicas obtidas foram primeiramente submetidas a buscas online BLASTn (ALTSCHUL et al., 1990) através do National Center for Biotechnology Information (NCBI) (USA), "website" (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/) para confirmação de sua identidade gênica. Posteriormente, elas foram alinhadas com as sequências disponíveis dos genomas macho e fêmea de *Apareiodon* sp. usando o programa Geneious 4.8.5. As regiões promotoras caracterizadas foram utilizadas para a busca de elementos transponíveis no banco de dados online CENSOR, girinst (http://www.girinst.org/censor/index.php) e por sítios promotor e TFBS nas plataformas Gene Promoter Miner (http://gpminer.mbc.nctu.edu.tw/index.php) Jasper (http://jaspar.genereg.net/) e Softberry (http://www.softberry.com/berry.phtml?topic=promoter). As regiões à montante do gene *Dmrt1* também foram alinhadas com as mesmas regiões genômicas de outras espécies de peixes na plataforma online Genomicus (http://www.genomicus.biologie.ens.fr/genomicus-89.01/cgi-bin/search.pl) para a detecção de genes próximos ao *Dmrt1*. As sequências promotoras macho e fêmea

do *Dmrt1* foram analisadas para a possibilidade de rotas diferenciais da expressão gênica.

**Resultados e Discussão**

A partir do sequenciamento e do alinhamento dos produtos obtidos com a mesma região disponível dos genomas montados foi possível localizar uma região de ~6000 pb *upstream* ao gene *Dmrt1* nos genomas de macho e fêmea de *Apareiodon* sp. Até o momento, somente as posições -1 à -1362 e -5131 à -6631 foram confirmadas por sequenciamento Sanger (Figuras 1 e 2). Entre as sequências -1 à -1362 do gene *Dmrt1* foram obtidas sequências como identidade ao sítio TATA box e, dois prováveis CCAAT box. Entretanto os sítios mais próximos ao exon 1 (entre -1 à -420) são os mais prováveis para a ligação da RNA polimerase II (Figura 1). Os TEs detectados na região promotora foram os retrotransposons Gypsy (regiões: -6575 à -6606; -385 à -455); L2-2B_SSa (regiões: -742 à -802; -1025 à -2242); HAL1-1B_Cja (região: -887 à -968). Já os transposons de DNA detectados foram ENSPM-6_DR (região: -388 à -444) e Tc1-Mariner (região: -6027 à -6548).

Sítios de ligação para o fator de transcrição GATA4 foram mapeados na região *upstream* ao gene (Figura 1). Na comparação da região promotora de macho e fêmea foram encontrados SNPs (polimorfismo de nucleotídeo único) e uma região adicional de 6 nucleotídeos em fêmea (-397 à -403). Outra importante caracterização foi a presença parcial do gene *Kank1* na posição -5153 à -5730 *upstream* ao gene *Dmrt1*. A localização do gene *Kank1 upstream* ao gene *Dmrt1* quando analisado outros genomas de peixes demonstra a conservação deste grupo de ligação em Teleostei e sinaliza para o fim desta região intergênica em *Apareiodon* sp.

Neste estudo, evidências de exaptação molecular foram observadas pela presença dos sítios TATA box na região interna dos elementos Gypsy e L2-2B_SSA. Sabe-se que os TEs apresentam contribuições na regulação de genes, por este motivo, a presença de TEs distintos, juntamente com a inserção de um sítio TATA box, pode indicar especificidades na expressão do gene *Dmrt1* (MERTZ et al., 1992). Além disso, o fato de estes TEs terem sido mantidos no genoma, mostra que estas inserções participaram da evolução deste gene, possivelmente adquirindo funções de novos sítios regulatórios, o que alterou a regulação do gene *Dmrt1*, como demonstrado em outros organismos (HERPIN et al., 2010). Desta forma, a co-opção molecular de cópias TEs degeneradas no promotor deste gene pode ter sido determinante para a diferença de expressão deste gene em machos e fêmeas, evidenciando a importância do estudo dos TEs para o entendimento da cadeia regulatória da diferenciação sexual em peixes.

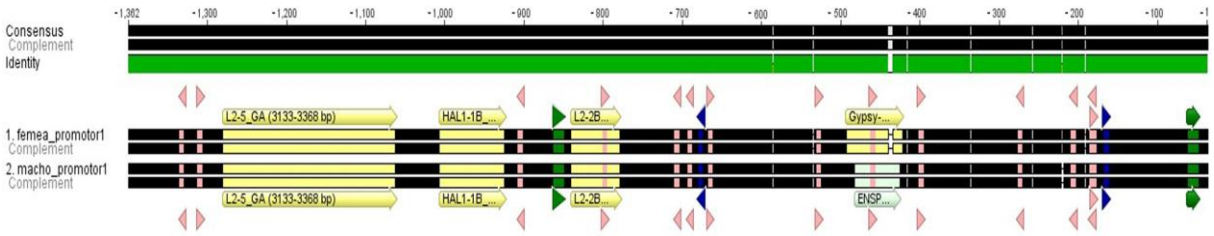



**Figura 1:** Alinhamento utilizando o algoritmo Muscle da região promotora (-1 à -1362) de macho e fêmea de Parodontidae. Há a presença de vários sítios TATA box (vermelho), 2 sítios CCAAT box (azul) e sítio de ligação para proteína GATA4 (verde). Foram também detectados os retrotransposons (amarelo) L2, HAL1 e Gypsy e o transposon de DNA (azul claro) ENSPM, sendo que na região interna de Gypsy, L2 e ENSPM há a presença de sítio TATA box.

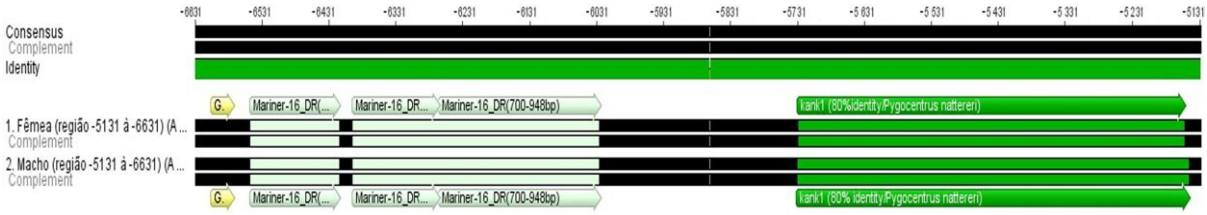



**Figura 2:** Alinhamento utilizando o algoritmo Muscle da região upstream -5131 à -6631pb ao gene *Dmrt1* de macho e fêmea de Parodontidae. Foram detectados o retrotransposon (amarelo) Gypsy e o transposon de DNA (azul claro) Mariner, e também a sequência parcial do gene KanK1 (verde escuro).

## Conclusão

A região promotora do gene *Dmrt1* está invadida por elementos transponíveis degenerados. A detecção da co-opção molecular de TEs para formação de TFBS restritos a um sexo na região regulatória do gene *Dmrt1* de *Apareiodon* sp., ainda em avaliação nesta pesquisa, podem contribuir no entendimento da expressão gênica diferencial testicular e ovariana que ocorre para este gene em peixes.

## Agradecimentos

Ministério do Meio Ambiente/Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (MMA/ICMBio/SISBIO No. 15117) pela autorização de captura de exemplares de peixes na natureza. O estudo foi financiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Secretaria de Ciência e Tecnologia do Estado do Paraná (SETI) e Fundação Araucária de Apoio ao Desenvolvimento Científico do Estado do Paraná (Fundação Araucária).

## Referências

FESCHOTTE, C. Transposable elements and the evolution of regulatory networks. **Nature Reviews Genetics** v. 9, p. 397–405, 2008.

HERPIN, A et al. Transcriptional Rewiring of the Sex Determining dmrt1 Gene Duplicate by Transposable Elements. **PLoS Genetics** v. 6, p. e1000844, 2010.

LEI, N.; HECKERT, L.L.; Gata4 Regulates Testis Expression of Dmrt1. **Molecular and Cellular Biology** v. 24, p. 377-388, 2004.

MARINO-RAMIREZ, L; JORDAN, IK. Transposable element derived DNaseI hypersensitive sites in the human genome. **Biology Direct** v. 1, p. 20, 2006.

MATSUDA, M. et al. DMY is a Y specific DM-gene required for male development in the medaka fish. **Nature** v. 417, p. 559–563, 2002.

MERTZ, J.E.; KRAUS, R.J.; WILEY, S.R. Functional binding of the "TATA" box binding component of transcription factor TFIID to the -30 region of TATAless promoters. **PNAS USA Biochemistry** v. 89, p. 5815-5818, 1992.

RAYMOND, C.S.; SHAMU, C.E.; SHEN, M.M.; SEIFERT, K.J.; HIRSCH, B.; HODGKIN, J.; ZARKOWER, D. Evidence for evolutionary conservation of sex-determining genes. **Nature** v. 391, p. 691–695, 1998.

SCHEMBERGER, M.O. et al. Differentiation of repetitive DNA sites and sex chromosome systems reveal closely related group in Parodontidae (Actinopterygii: Characiformes). **Genetica** v. 139, p. 1499–1508, 2011.