CARACTERIZAÇÃO DA REGIÃO *UPSTREAM* DO GENE *Sox-9* EM *Apareiodon* sp. (CHARACIFORMES: PARODONTIDAE)

Gabriela Casani Cardoso (PIBIC/Fundação Araucária/UEPG), Viviane Nogaroto (Pesquisadora) Michelle Orane Schemberger (Pesquisadora), Marcelo Ricardo Vicari (Orientador), e-mail: vicarimr@uepg.br

Universidade Estadual de Ponta Grossa/ Departamento de Biologia Estrutural, Molecular e Genética/ Setor de Ciências Biológicas e da Saúde.

Ciências Biológicas/ Genética/ Genética Animal

Palavras-chave: Citogenômica, diferenciação gonadal, regulação gênica

Resumo

Estudos de genes de determinação do sexo são escassos em peixes Neotropicais. Parodontidae agrupa peixes Neotropicais que apresentam sistemas de cromossomos sexuais ZW ao lado de espécies sem heteromorfismo cromossômico. Neste estudo, ferramentas de biologia molecular, genômica e bioinformática básica foram utilizadas para recuperar *contigs* contendo o gene *Sox-9* — um dos genes envolvidos no processo de diferenciação sexual — dos genomas macho e fêmea de *Apareiodon* sp. (ZZ/ZW). A partir destes *contigs, primers* para a amplificação da região *upstream* do gene *Sox-9* foram desenhados. Estas sequências foram obtidas com o objetivo de verificar diferenças nas regiões promotoras entre machos e fêmeas da espécie, visando avaliar a existência de elementos transponíveis co-optados para a modificação da rota de regulação gênica. Nossos dados mostraram sequências conservadas na região *upstream* do gene *Sox-9* entre *Apareiodon* sp. e *Astyanax mexicanus*, as quais são sugeridas organizar o provável elemento promotor deste gene. Não foi visualizada a invasão de TEs nesta região de proximidade ao provável elemento promotor *Sox-9* de *Apareiodon* sp. Os dados mostrados iniciam uma busca de modificações das rotas de regulação gênica para estudos da determinação do sexo em peixes Neotropicais.

Introdução

Parodontidae detém espécies de peixes sem cromossomos sexuais heteromórficos em adição de outras com proto-cromossomos sexuais e, com sistemas de cromossomos sexuais do tipo ZZ/ZW ou ZZ/ZW_1W_2, constituindo um bom modelo de peixes Neotropicais para a compreensão da determinação sexual (SCHEMBERGER et al., 2011). Os DNAs repetitivos constituem grande porcentagem do genoma eucariótico, consistindo de sequências que podem ser idênticas ou semelhantes, que se repetem diversas vezes em tandem (lado a lado) ou dispersas (elementos transponíveis -TEs) (SUMNER, 2003). Uma sequência TE pode realizar uma função diferente da original para qual ele foi selecionado e trazer benefícios para o genoma, sendo considerado co-optado (MILLER et al., 1997). De fato, cópias de TEs truncadas podem modular a expressão gênica no genoma por providenciar novos sítios regulatórios, alternativas para sítios de "*splice*", sinais de poliadelinação, novos sítios de ligação de fatores de transcrição, bem como, regulação pós-transcricional e regulação da tradução (MARINO-RAMIREZ et al., 2005). O gene *Sox-9* (*SRY-like HMG-box containing transcription factor 9*) possui envolvimento no processo de diferenciação sexual de inúmeros organismos (SMITH et al., 2003). Assim, o estudo de caracterização da região promotora/reguladora do

gene *Sox-9* em Parodontidae é importante para detectar possíveis mutações restritas ao sexo e, associar estas mutações com a geração de novas possibilidades regulatórias atuantes na determinação sexual deste grupo de peixes.

Material e Métodos

Foi utilizada a espécie *Apareiodon* sp. para a avaliação da região *upstream* do gene *Sox-9*. O material biológico foi disponibilizado pelo Laboratório de Biologia Cromossômica: Estrutura & Função da Universidade Estadual de Ponta Grossa. O DNA genômico de machos e fêmeas foram previamente submetidos à extração a partir do fígado e posteriormente sequenciados em plataforma Illumina Hi-Seq. Com a montagem genômica, foram obtidos cerca de 40 vezes de cobertura de short-reads (43 Gb) para macho e; 45 vezes (51.9 Gb) para fêmea. Para este estudo, os contigs contendo o gene *Sox-9* e sua região promotora foram prospectados a partir das bibliotecas genômicas de *Apareiodon* sp. utilizando-se o software BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*). A partir do alinhamento dos contigs, foram construídos três conjuntos de *primers*, utilizando-se o software Primer 3Plus para a amplificação da região *upstream* do gene *Sox-9*. Verificada a melhor temperatura de emparelhamento, os mesmos foram utilizados em reações de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) como a seguir: 20 ng DNA genômico, 1x tampão de reação, 2,5 mM $MgCl_2$, 200 mM dNTPs, 10 μM *primer forward*+reverse, 1 U Taq DNA Polimerase. O programa da reação em termociclador foi: 95 ^{o}C 5 min; 35 ciclos: 94 ^{o}C 1 min, temperatura de emparelhamento variável - 45 seg, 72 ^{o}C 2 min; além de extensão final de 72 ^{o}C por 7 min. Essas sequências foram purificadas e encaminhadas ao sequenciamento de DNA, o qual foi realizado utilizando o kit “DYEnamicTM” e sequenciar ABI. As sequências nucleotídicas obtidas foram submetidas a buscas através do National Center for Biotechnology Information (NCBI) e, posteriormente, foram alinhadas para a obtenção das sequências consenso utilizando o programa Geneious 4.8.5. As sequências consenso foram utilizadas para a busca de elementos transponíveis no banco de dados online CENSOR, girinst e por sítios TFBS (*transcription factor binding sites*) na plataforma Conreal. Os prováveis sítios de sobreposição foram prospectados para avaliação da co-opção molecular e inferência de região promotora.

Resultados e Discussão

Os produtos da amplificação da região *upstream* do gene *Sox-9* de *Apareiodon* sp. foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 1%, onde foi possível evidenciar a amplificação de fragmentos de DNA (Figura 1).

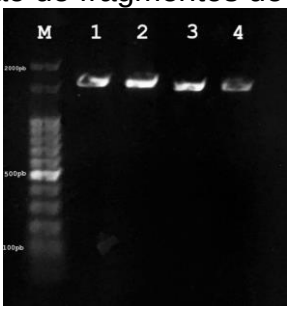


Figura 1. Eletroforese em gel de agarose 1%, evidenciando a amplificação de fragmentos de DNA de aproximadamente 1500 pb. M=marcador de peso molecular 100 pb;1= *primer Promoter 2*, a partir de macho;1= *primer Promoter 2*, a partir de fêmea; 3=*primer Promoter 3*, a partir de macho;4= *primer Promoter 3*, a partir de fêmea.

A região *uspstream* do gene *Sox-9* de *Apareiodon* sp. em macho e fêmea foram alinhadas à mesma região genômica de *Astyanax mexicanus* (genoma de

referência), onde demonstraram uma região conservada a aproximadamente 1900 pb *upstream* distante da *open reading frame* (ORF) do *Sox-9* de *Apareiodon* sp. (Figura 2). Essa região apresentou CAAT box e TATA box em distância responsiva em adição a inúmeros TFBS (Figura 2).

Entre os principais sítios que ocorrem conservados no provável elemento promotor do *Sox-9* de *Apareiodon* sp. podem ser destacados os TFBS: Sry Sox9 derivado, GATA 1, GATA 2, GATA 3, p300, Pax-4, entre inúmeros outros (Figura 2). O fato do TFBS SRY Sox9 derivado ser visualizado no promotor do *Sox-9* de *Apareiodon* sp. indica que este gene realiza uma provável auto regulação, da mesma forma que foi observado para o gene *Dmy* de medaka, onde o produto DMRT1 é capaz de regular sua atividade (HERPIN et al., 2010). Já os fatores de transcrição da família GATA foram descritos participar do desenvolvimento gonadal e dimorfismo sexual de ratos, onde foram visualizados nas gônadas, com expressão a partir das células de Sertoli nos testículos e, nos ovários, a partir das células granulosas (VIGER et al., 1998).

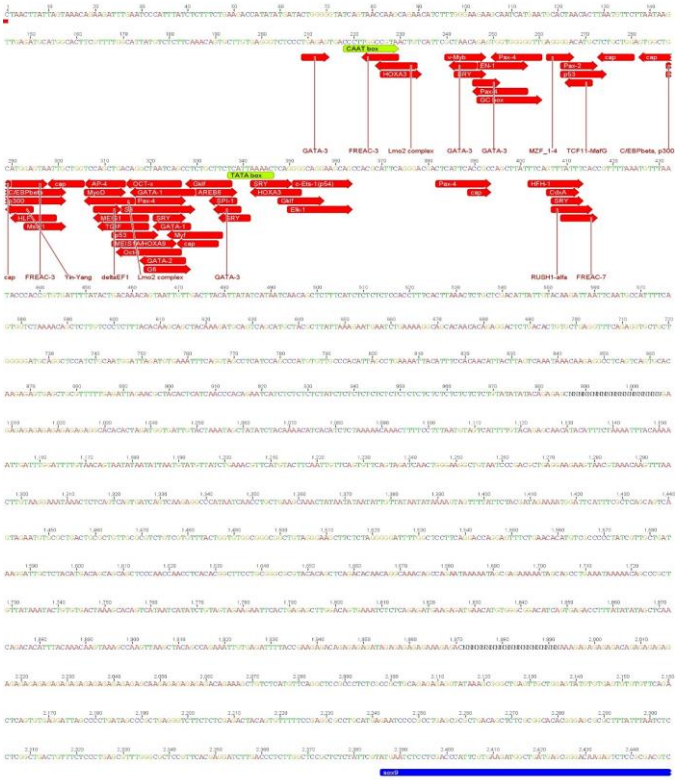


Figura 2. Sequência *upstream* do gene *Sox-9* de *Apareiodon* sp. gerada a partir do alinhamento entre essas regiões genômicas de macho e fêmea em comparação a essa mesma região de *Astyanax mexicanus* (genoma referência). Em verde, destaque para as regiões CAAT box e TATA box conservadas. início da ORF *Sox-9* (posição 2386 da figura). Em vermelho, elementos não exônicos conservados entre *Apareiodon* sp. e *Astyanax mexicanus* e sua similaridade aos diferentes TFBS que atuam na regulação da atividade gênica.

Com a visualização de inúmeros TFBS para fatores de transcrição GATA no promotor *Sox-9* de *Apareiodon* sp. e, conhecendo que este gene tem função na cascata de diferenciação sexual e na formação das gônadas é provável que a família de fator de transcrição GATA atue na regulação *Sox-9.* Embora as regiões regulatórias dos genes não apresentem alta similaridade de sequências (GRAHAM et al., 2003), a comparação da região *upstream* do *Sox-9* de *Apareiodon* sp. ao de *Astyanax mexicanus* mostrou uma alta similaridade em inúmeros segmentos do DNA. Essa similaridade das sequências indica a conservação deste segmento para a função promotor e regulador do *Sox-9* nestas duas espécies de peixes.

As mutações restritas a um sexo são passos essenciais na origem de sistemas de determinação do sexo. É conhecido que a invasão de regiões promotoras por elementos transponíveis pode alterar rotas de regulação gênica pré-estabelecidas. Neste contexto, avaliar a presença de elementos transponíveis restritos a um sexo em regiões regulatórias de genes de diferenciação gonadal e, sua associação com a geração de TFBS podem auxiliar no entendimento da atuação de determinados genes na cascata gênica de determinação sexual. Neste estudo foi verificado que a região promotora do gene *Sox-9* não sofreu invasão de elementos transponíveis que possam estar co-optados para a função regulatória.

Conclusão

Os dados obtidos demonstraram que a região *upstream* do gene *Sox-9* de *Apareiodon* sp. não tem invasão de TES. Ainda, a comparação deste segmento genômico de *Apareiodon* sp. à *Astyanax mexicanus* demonstrou uma alta similaridade de sequências não exônicas conservadas, para as quais é possível inferir a localização do provável elemento promotor *Sox-9* de *Apareiodon* sp. A verificação de numerosos TFBS relacionados para ligação de fatores de transcrição que atuam na determinação sexual de outros vertebrados reforçam a proposição para este segmento atuar na regulação do gene *Sox-9* de *Apareiodon* sp.

Agradecimentos

Ao Ministério do Meio Ambiente/Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (MMA/ICMBio/SISBIO No. 15117) pela autorização de captura de exemplares 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) e Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

Referências

GRAHAM, P.; PENN, J.K.; SCHEDL, P. Masters change, slaves remain. **Bioessays** v. 25, p. 1–4, 2003.

HERPIN, A.; BRAASCH, I.; KRAEUSSLING, M.; SCHMIDT, C.; THOMA, E.C.; NAKAMURA, S.; TANAKA, M.; SCHARTL, M. Transcriptional Rewiring of the Sex Determining dmrt1 Gene Duplicate by Transposable Elements. **PLoS Genetics**, v. 6, p. e1000844, 2010.

MARINO-RAMIREZ, L. et al. Transposable elements donate lineage-specific regulatory sequences to host genomes. **Cytogenetics and Genome Research**, v. 110, p. 333–341, 2005.

MILLER, W.J.; MCDONALD, J.F.; PINSKER, W. Molecular domestication of mobile elements. **Genetica**, v. 100, p. 261–270, 1997.

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.

SMITH, C.A.; KARTZ, M.; SINCLAIR, A.H. DMRT1 upregulated in the gonads during female-to-male sex reversal in ZW chicken. **Biology Reproduction**, v. 260, p. 560-570, 2003.

SUMNER, A.T. **Chromosomes - Organization and Function**. Oxford: Blackwell Publishing, 287p., 2003.

VIGER, R.S.; MERTINEIT, C.; TRASLER, J.M.; NEMER, M. Transcription factor GATA 4 is expressed in a sexually dimorphic pattern during mouse gonadal development and is a potent activator of the MIS promoter. **Development**, v. 125, p. 2665–2675, 1998.