CARACTERIZAÇÃO DA REGIÃO *UPSTREAM* DO GENE *CYP-19* EM *Apareiodon* sp. (CHARACIFORMES: PARODONTIDAE)

Jeniffer Dias Aguiar (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.

Genética e Genética Animal

Palavras-chave: peixes, diferenciação gonadal, co-opção molecular.

Resumo

As modificações das rotas de regulação gênica em genes do desenvolvimento geram grande impacto para a especiação e, estas podem ser influenciadas pela invasão de elementos transponíveis (TEs) em regiões regulatórias. Neste estudo foi investigado a presença de elementos repetitivos e sua co-opção para sítios de ligação para fatores de transcrição (TFBS) em regiões cis-regulatórias do gene *Cyp-19* (aromatase) de *Apareiodon* sp. A caracterização da região promotora/reguladora do gene *Cyp-19* foi realizada de forma comparativa entre machos e fêmeas de *Apareiodon* sp. e, também para esta região no genoma de referência de *Danio rerio*. Nesta análise foi possível detectar a invasão de TEs degenerados e inferir sobre a provável região promotora deste gene. As análises demonstraram que o TE DNA6 está em região do provável promotor, doando TFBS para a regulação gênica *Cyp-19* de *Apareiodon* sp.

Introdução

Parodontidae constitui um grupo de peixes Neotropicais que possui espécies sem sistemas de cromossomos sexuais heteromórficos em adição àquelas que possuem cromossomos sexuais com heterogametia (SCHEMBERGER et al., 2011), porém o mecanismo de determinação sexual nesse grupo não é compreendido. Estudos de determinação sexual em vertebrados mostraram marcadores ovarianos típicos (*FoxL2*; *Rspo1 - R-spondin1* e *aromatase*) e também marcadores testiculares típicos (*Sox-9* e *Dmrt-1*), os quais são expressos em vias mutuamente exclusivas nas gônadas (SHOEMAKER et al., 2007). O gene *Cyp-19* codifica a aromatase, uma enzima relacionada à conversão do androgênio à estrogênio (SANDRA; NORMA, 2010). A proporção destes dois hormônios é essencial para a diferenciação do ovário, sendo que suas quantidades são limitadas pela disponibilidade da aromatase (SANDRA; NORMA, 2010).

Os DNAs repetitivos são componente chave para a compreensão de mudanças evolutivas nos genomas (FESCHOTTE; PRITHAM, 2007). O conceito de co-opção molecular foi utilizado para descrever o processo onde uma sequência TE tem uma co-opção para realizar uma função diferente da original para qual ele foi selecionado e trazer benefícios para o genoma (MILLER et al., 1997). Neste aspecto, associar a caracterização de genes que auxiliam na determinação sexual e suas regiões promotoras, bem como, a composição dos DNAs repetitivos traz novas informações sobre a função destes genes e DNAs repetitivos em peixes Neotropicais.

Material e Métodos

Neste estudo, o DNA genômico de dois machos (ZZ) e de duas fêmeas (ZW) de *Apareiodon* sp. foram previamente submetidos a extração do DNA utilizando PureLink® Genomic DNA kit, os quais, foram posteriormente sequenciados na plataforma Illumina HiSeq 2000. Com a montagem, foram obtidos cerca de 40 vezes de cobertura de short-reads (43 Gb) para macho e; 45 vezes de cobertura de short-reads (51.9 Gb) para fêmea após filtragem para remoção de reads de baixa qualidade pelo software FASTX-toolkit. Contigs contendo o gene *Cyp-19* e sua região promotora foram prospectados a partir das bibliotecas genômicas de macho e fêmea de *Apareiodon* sp., utilizando-se o software BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*). A partir do alinhamento dos contigs foram construídos *primers* para a região *upstream* (~1 Kb) do gene *Cyp-19*, utilizando-se o software online Primer 3Plus (Tabela 1). O DNA de exemplares machos e fêmeas foram extraídos a partir do fígado segundo (MURRAY; THOMPSON, 1980), e posteriormente utilizado como molde em reações de PCR (*Polymerase Chain Reaction* – PCR).

Tabela 1: *Primers* construídos para a amplificação da região *upstream* (~ 1 Kb) do gene *Cyp-19* e suas respectivas temperaturas de anelamento.

Primers	**Sequências (5´ → 3´)**	**Temperatura de emparelhamento**	
		♂	♀
Promotor 1 fw/rv	5'GGACAAGCTAGGCAGAATGC-3'/ 5'-TCAGCAGCAGAATCAGCAGT-3'	60 °C	58 °C
Promotor 2 fw/rv	5'-CCTAGGTGTCTGTCGTTAGTCTG-3'/ 5'-TGTCAAAAACACAATTCCAGTT-3'	62 °C	62 °C

As reações de PCR com os dois conjuntos de *primers* foram realizadas com os seguintes componentes: 20 ng de DNA genômico, 1x tampão de reação, 2,5 mM $MgCl_2$, 200 mM dNTPs, 10 μM *primer* fw e rv e 2,5 U unidade de *Taq* DNA Polimerase. O termociclador foi programado de acordo com as seguintes condições: 95 ºC 5 min; 35 ciclos: 94 ºC 1 min, temperatura de emparelhamento variável - 45 seg, 72 ºC 2 min; além de extensão final de 72 ºC por 7 min.

Posteriormente, as sequências nucleotídicas obtidas foram primeiramente submetidas a buscas online BLASTn através do National Center for Biotechnology Information (NCBI). As sequências foram então alinhadas às sequências destas regiões genômicas de macho e fêmea dos respectivos genes para a obtenção do consenso utilizando o programa Geneious 4.8.5. A sequência consenso foi utilizada para a busca de elementos transponíveis no banco de dados online CENSOR, e por sítios TFBS – *transcription fator binding sites* - na plataforma Conreal (Conserved Regulatory Elements Anchored Alingment). Os prováveis sítios de sobreposição (onde a mesma região do DNA apresenta similaridade com elementos transponíveis e TFBS) foram identificados para avaliação da co-opção molecular e inferência de região promotora.

Resultados e Discussão

A amplificação da região *upstream* do gene *Cyp-19* obteve sucesso em diferentes temperaturas de emparelhamento (Figura 1). Após eletroforese em gel de agarose 1% foi observada a amplificação de um fragmento de DNA de aproximadamente 1000 pb com os *primers* da região do *promotor 1* (temperatura de 60 ºC para macho e, 58 ºC para fêmea). Uma banda em torno de 1500 pb foi

observada ao utilizar-se os *primers* para o *promotor 2* (temperatura de 62 ºC para ambos os sexos).

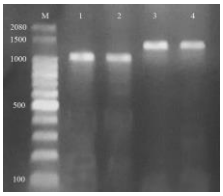


Figura 1. Gel de agarose 1% evidenciando os fragmentos de DNA da região *upstream* do gene *Cyp-19* amplificados com dois conjuntos de *primers* em suas temperaturas ótimas de emparelhamento. (M): Marcador de peso molecular 100 pb; (1): *primer Promotor 1*, a partir de DNA de macho; (2): *primer Promotor 1*, a partir de DNA de fêmea; (3): *primer Promotor 2*, a partir de DNA de macho; (4): *primer Promotor 2*, a partir de DNA de fêmea.

As bandas das regiões *Promotor 1* e *2* foram submetidas ao sequenciamento nucleotídico para validação das sequências. Em paralelo, as regiões *uspstream* do gene *Cyp-19* alinhadas para os dados do genoma macho e fêmea, quando submetidas a busca de TFBS, demonstraram duas prováveis regiões TATA box: uma a aproximadamente 1180 pb *upstream* ao início da ORF da aromatase e, a segunda a aproximadamente 640 pb *upstream* ao início da ORF da aromatase (Figura 2). Esta mesma análise demonstrou que as posições 836 – 984 pb são enriquecidas de TFBS (Sox-5, SP1, AP1, Hoxa-3, Sry, Sox-9, delta EF1 e Pbx1). Estes dados sugerem esse segmento como provável região regulatória do *Cyp-19* de *Apareiodon* sp. Quando esta análise foi realizada comparando à região *upstream* do *Cyp-19* de *Danio rerio*, poucas regiões de similaridade foram visualizadas. Regiões regulatórias dos genes podem modificar drasticamente em similaridade de sequências, principalmente quando comparados organismos filogeneticamente distantes (GRAHAM et al., 2003), fato que pode auxiliar na compreensão da pouca similaridade obtida nesta região entre *Apareiodon* sp. e *D. rerio*.

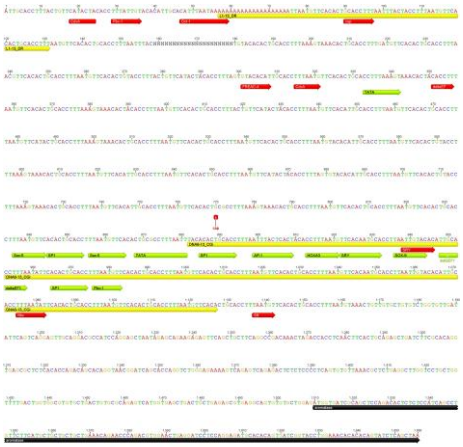


Figura 2. Sequência *upstream* do gene *Cyp-19* de *Apareiodon* sp. gerada a partir do alinhamento entre essas regiões genômicas de macho e fêmea. Em preto, início da ORF aromatase (posição 1510 - 1656 da figura). Em amarelo, destaque para as regiões de similaridade aos TEs L1 (posição 57 a 132 da figura) e, ao DNA6 Transposon (posição 883 - 1127 da figura). Em vermelho, diferentes TFBS obtidos a partir de sequências conservadas desta região entre *Apareiodon* sp. e *Danio rerio*. Em verde, diferentes TFBS obtidos a partir do alinhamento desta região dos genomas macho e fêmea.

A região *upstream* ao gene da aromatase também foi submetida a busca de similaridade à TEs, onde foi constatada a similaridade ao DNA6 Transposon na região *upstream* a ORF 382 a 627 e, ao retrotransposon L1 entre as posições *upstream* 1453 a 1378. A região de similaridade ao DNA6 Transposon engloba parte

do provável elemento promotor do *Cyp-19* de *Apareiodon* sp. As modificações das rotas de regulação gênica podem ser fortemente influenciadas pela invasão e degeneração de TEs nos genomas, principalmente em regiões cis regulatórias (FESCHOTTE; PRITHAM, 2007). No peixe medaka, foi visualizado a invasão de dois TEs degenerados doando TFBS para a regulação gênica *Dmy* (gene determinante do sexo nesta espécie), os quais mudaram drasticamente a expressão *Dmy* em machos (HERPIN et al., 2010). Embora análises mais aprofundadas possam ser requeridas é provável que a invasão do DNA6 Transposon na região cis-regulatória do *Cyp-19* de *Apareiodon* sp. atuou na modificação da regulação da atividade genética deste gene.

Conclusão

Os dados obtidos demonstraram uma provável doação de TFBS pela invasão do DNA6 transposon no elemento promotor do gene *Cyp-19* de *Apareiodon* sp. Análises de expressão gênica comparativa entre machos e fêmeas, a caracterização da ORF e da sequência de aminoácidos podem auxiliar na compreensão da estrutura molecular deste gene em *Apareiodon*, e testar a co-opção dos TEs para a sua modulação da expressão gênica.

Agradecimentos

Agradecemos ao Ministério do Meio Ambiente/Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (MMA/ICMBio/SISBIO No. 15117); ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq); Secretaria de Ciência e Tecnologia do Estado do Paraná (SETI), 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

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

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.

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

MURRAY, M. G.; THOMPSON, W. F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. **Nucleic Acids Research**, v. 8(19), p. 4321-4326, 1980.

SANDRA, G.; NORMA, M. Sexual determination and differentiation in teleost fish. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, v. 20, p. 101–121, 2010.

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.

SHOEMAKER, C.; QUEEN, J.; CREWS, D. Response of candidate sex-determining genes to changes in temperature reveals their involvement in the molecular network underlying temperature-dependent sex determination. **Molecular Endocrinology**, v. 21, p. 2750–2763, 2007.