
CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

JÚLIA CHAGAS PONZIO

**ESTUDO DA ORGANIZAÇÃO GENÔMICA E
LOCALIZAÇÃO CROMOSSÔMICA DO GENE *snRNA*
U1 EM PEIXES DO GÊNERO *Leporinus***

The background of the lower half of the cover is a large, abstract geometric pattern. It consists of several overlapping triangles in shades of light blue and white, creating a complex, crystalline structure.

Rio Claro
2013

JÚLIA CHAGAS PONZIO

**ESTUDO DA ORGANIZAÇÃO GENÔMICA E LOCALIZAÇÃO
CROMOSSÔMICA DO GENE *snRNA U1* EM PEIXES DO GÊNERO
*Leporinus***

Orientador: Patrícia Pasquali Parise-Maltempi

Co-orientador: Diovani Piscor

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao
Instituto de Biociências da Universidade Estadual
Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - Câmpus de Rio
Claro, para obtenção do grau de Bacharela em
Ciências Biológicas

Rio Claro

2013

574.88 Ponzio, Júlia Chagas
P819e Estudo da organização genômica e localização
 cromossômica do gene snRNA U1 em peixes do gênero
 Leporinus / Júlia Chagas Ponzio. - Rio Claro, 2013
 42 f. : il., tabs., fots.

Trabalho de conclusão de curso (bacharelado - Ciências
Biológicas) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de
Biociências de Rio Claro
Orientador: Patricia Pasquali Parise Maltempi
Coorientador: Diovani Piscor

1. Biologia molecular. 2. Citogenética. 3. Cromossomos
sexuais. 4. Evolução. I. Título.

Ficha Catalográfica elaborada pela STATI - Biblioteca da UNESP
Campus de Rio Claro/SP

Dedico a pessoa que sempre acreditou em mim e me apoiou durante os dez anos que pude conviver com ela. Queria muito que você estivesse aqui para presenciar minhas conquistas, me ajudar a levantar depois de fracassos ou me comprar aquela barra de Suflair depois do almoço, mas sei que você deve estar assistindo a tudo, onde quer que você esteja.

AGRADECIMENTOS

Pensei muito antes de escrever meus agradecimentos e espero que todos os meus amigos, familiares e colegas que, direta ou indiretamente me ajudaram durante esse último ano, sejam contemplados aqui.

Primeiramente agradeço aos meus pais, grandes responsáveis por essa conquista, já que sem o apoio, as discussões e as inúmeras conversas sobre o TCC, talvez eu não estivesse entregando esse trabalho esse ano; à minha irmã, Beatriz, pela amizade e por sempre acreditar em mim; e à toda a minha família, que é meu porto seguro e amor maior, obrigada por levantarem meu ânimo quando eu estava prestes a desistir.

À minha orientadora e amiga, Prof^ª. Dr^ª. Patricia Parise, obrigada por ouvir minhas angústias e me aconselhar durante esse último ano (e que ano!), mas principalmente, por ser uma líder que caminha ao lado do seu aluno e o orienta no que precisar.

À meu co-orientador Diovani Piscor por me ensinar um pouco do que você sabia e por me ajudar em todos os aspectos durante o desenvolvimento desse trabalho. Agradeço também à Daniela Piscor, que me ensinou nos meus primeiros dias de laboratório e continuou me auxiliando nos momentos críticos, e a todos os outros professores e alunos do Laboratório de Citogenética de Animais, bem como do Departamento de Biologia que, direta ou indiretamente, me ajudaram durante esse último ano, seja somente me dando um “Bom dia!” ao entrar no laboratório ou emprestando reagentes, ensinando técnicas, indicando artigos ou dando ideias para que esse TCC fosse possível de ser realizado. Muito obrigada!

Aos meus amigos que moram em São Paulo, sejam do Dante, da Cultura ou do Paturi, agradeço pela amizade, companheirismo e pela compreensão quando eu falava que não poderia sair com vocês, seja por causa do TCC ou qualquer outro motivo durante esses 4 anos, saibam que a distância não mudou em nada no que eu sinto por vocês.

À toda a equipe do Futsal Feminino da Unesp que se transformou num grande escape quando as preocupações vinham à tona, apesar de que, muitas vezes, elas me impediram de ir treinar.

À Bio Logus Jr. que me fez abrir a mente, a enxergar quando as oportunidades batiam na minha porta e me proporcionar a visão de que nós biólogos temos um campo de trabalho imenso que, infelizmente, muitos não sabem.

À todo o CBI 2010 pelas risadas, discussões, provas, saídas de campo e confraternizações. Sem vocês é difícil saber como teria sido minha graduação, pois conheci pessoas incríveis e fiz amigos que espero ter sempre comigo, mesmo que a distância nos

atrapalhe. Obrigada, principalmente a Fer Song que dividiu comigo as responsabilidades da CF13; de um jeito meio que sem querer acabamos nos tornando amigas e eu não podia ter escolhido pessoa melhor para compartilhar minhas angústias, minhas alegrias e minhas torções de tornozelo. Meus últimos anos de graduação não teriam sido os mesmos sem você ao meu lado para rir ou para chorar, obrigada.

À Rep. Bazzinga que, mesmo com todos os problemas, sempre estará presente nas minhas lembranças da minha graduação. Fer, obrigada por sempre estar perto nos momentos que eu mais precisei, pelas conversas sinceras e por sempre acreditar em mim. Tha e Juh, obrigada pela convivência e por todos os momentos que passamos, mesmo os mais complicados. E a todas as outras que passaram por lá, seja que somente por um breve momento: Bia, Carol, Ana e Jéssica.

À CF13, agradeço imensamente a vocês, pois, apesar de vocês não saberem, me ajudaram muito mais do que quaisquer outras pessoas durante esse 1 ano e meio de reuniões, mesinhas, churrascos, festas, formaturas e posts intermináveis no Facebook. Amnesia nenhuma me fará esquecer dos nossos momentos de “foca”, das nossas atas e muito menos da nossa querida Estrela. Tivemos muitos furacões Katrina durante nossa jornada, mas nada que com amizade e profissionalismo não fosse resolvido.

À todos os funcionários por serem cordiais e pelo apoio e zelo dado a todos nós, alunos. Agradeço também a todos os professores que tive durante esses quatro anos de graduação.

Por último, mas não menos importante, aos meus professores de Biologia e Ciências do Colégio Dante Alighieri, Eliana (*in memoriam*), Marília, Rubens, Hélika e Renato, que acompanharam essa minha evolução dentro da Ciência e fizeram com que eu me apaixonasse por ela. Renato, obrigada por ser esse professor sensacional, que faz de tudo para que o aluno entenda o conceito, e por ser esse grande amigo. Eu já te disse uma vez e direi aqui novamente: a culpa é sua! Aquela sua aula de Biotecnologia me mostrou caminhos que antes eu nem pensava em seguir, meu muito obrigada.

“Around here, however, we don't look backwards for very long. We keep moving forward, opening new doors, and doing new things, because we're curious and curiosity keeps leading us down new paths.”

Walt Disney

RESUMO

Em eucariotos os íntrons de mRNAs codificantes de proteína são retirados e os éxons são mantidos junto ao transcrito primário pela maquinaria do spliceossomo. Este consiste em um grande complexo RNA-proteína que contém mais de 200 proteínas e cinco tipos de RNAs não codificantes, metabolicamente estáveis, conhecidos como snRNAs U, que incluem U1, U2, U4, U5 e U6. Os genes snRNA U estão presentes em múltiplas cópias dispersas no genoma de diversos eucariotos e parecem apresentar comportamento semelhante aqueles dos elementos móveis exibindo pouca conservação sintênica. No presente trabalho pretendia-se estudar a organização genômica e a localização cromossômica do gene snRNA U1 em espécies de peixes do gênero *Leporinus*, que é um grupo de peixes que se configura como um modelo interessante para estudo de DNAs repetitivos e evolução genômica em peixes. Porém, após diversas tentativas não foi possível amplificar este gene e então optou-se por estudar o gene snRNA U2. O DNA genômico de diferentes espécies de *Leporinus* e de *Schizodon* (grupo próximo evolutivamente) foi amplificado utilizando primers específicos para o gene, por meio da técnica de PCR e os produtos obtidos enviados para o sequenciamento. O tamanho encontrado para essa sequência correspondeu a aproximadamente 200 pb, valor esse já encontrado para outras espécies. As sequências foram analisadas e resultados não concisos das sequências obtidas não permitiram análises subsequentes. A localização cromossômica do gene foi realizada por meio da técnica de hibridação *in situ* e as marcações foram evidenciadas em um par cromossômico submetacêntrico de tamanho médio em todas as espécies. A localização destas sequências não mostrou relação com cromossomos sexuais, presentes em algumas das espécies analisadas, mas demonstrou forte evidência de conservação do gene entre as diferentes espécies estudadas.

Palavras-chave: citogenética, cromossomos sexuais, evolução, spliceossomo, snRNA, *Leporinus*.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	10
1.1. DNA repetitivo	10
1.2. Small nuclear RNA U (snRNA U)	12
1.2.1. Estudo de snRNA U em outras espécies	16
1.3. Considerações taxonômicas e citogenéticas do gênero <i>Leporinus</i>	18
2. OBJETIVOS	22
3. MATERIAIS E MÉTODOS	23
3.1. Materiais	23
3.2. Métodos	23
3.2.1. Amplificação de DNA via Polymerase Chain Reaction (PCR)	23
3.2.2. Sequenciamento	24
3.2.3. Análise das sequências	25
3.2.4. Fluorescent <i>in situ</i> hybridization (FISH)	25
4. RESULTADOS	27
4.1. Amplificação de DNA via PCR	27
4.2. Sequenciamento	28
4.3. Fluorescent <i>in situ</i> hybridization (FISH)	28
5. DISCUSSÃO	31
6. CONCLUSÃO	35
7. REFERÊNCIAS	36

1. INTRODUÇÃO

1.1. DNA repetitivo

O genoma de eucariotos é composto por uma variedade de sequências simples, DNAs de cópia única ou com poucas cópias que constituem a maior parte dos genes funcionais, e de sequências repetitivas, caracterizadas por não serem codificantes, embora algumas sequências moderadamente repetitivas também contenham genes (LONG; DAVID, 1980). A grande diversidade de genomas encontrada em eucariotos é resultado, principalmente, das diferenças na quantidade dessas sequências repetitivas (CAVALIER-SMITH, 1985; BRENNER et al., 1993).

Os DNAs repetitivos correspondem a sequências individuais que se repetem inúmeras vezes e, por esse motivo, acabam constituindo grandes frações do genoma eucarioto, podendo constituir cerca de 90% do genoma do tabaco e de 50% do genoma humano (LANDER et al., 2001).

Essas sequências, por não apresentarem funções evidentes e não transcreverem produtos codificantes, já foram denominadas como “DNA lixo” (NOWAK, 1994) e “DNA egoísta”, uma vez que sua única função seria a perpetuação delas mesmas. Porém, conforme o desenrolar de várias pesquisas nessa área que acabaram por descobrir diversas funções dessas regiões, a ideia de “DNA lixo” começou a mudar. O envolvimento no processo de replicação do DNA (LI et al., 2001), recombinação (BIET et al., 1999), expressão gênica (LIU et al., 2001) e diferenciação de cromossomos sexuais (PARISE-MALTEMPI et al., 2007; CIOFFI; BERTOLLO; CAMACHO, 2010) são alguns dos processos que essas sequências repetitivas participam, além de estarem presentes nos centrômeros e telômeros desempenhando papel essencial na manutenção e propagação do material genético nuclear (MARTINS, 2007).

Dentre as sequências repetitivas não codificadoras estão: os DNAs repetitivos arranjados em *tandem*, compostos pelos DNAs satélites, as sequências minissatélites e microsatélites; e as sequências dispersas no genoma, compostas por transposons e retrotransposons (CHARLESWORTH; SNLEGOWSKI; STEPHAN, 1994; KIDWELL, 2002).

DNAs satélites são sequências altamente repetitivas, organizadas em *tandem* e estão geralmente presentes em grandes clusters nas regiões heterocromáticas do cromossomos (CHARLESWORTH; SNLEGOWSKI; STEPHAN, 1994; MARTINS, 2007). Podem variar de 1.000 a mais de 100.000 cópias de uma unidade repetitiva, usualmente contendo de 100 a

300 pb, os quais ocorrem em poucos *loci* do genoma e possuem menor variação interpopulacional quando comparadas à micro e minissatélites (JABS et al., 1989; WEVRICK; WILLARD, 1989).

Os minissatélites são arranjados em *tandem*, com regiões repetitivas de 10 a 100 pb dispersas em todo o genoma, se concentrando em regiões próximas aos telômeros. Já os microsatélites consistem em sequências de 2 a 4 pb, também organizadas em *tandem*. Por ambos apresentarem grande dinâmica evolutiva, essas sequências geram um alto grau de polimorfismo, associado à grande quantidade de mutações, as quais ocorrem com frequência maior que as taxas normais (JEFFREYS et al., 1994; DI RIENZO et al., 1994).

Os elementos de transposição, também chamados de “jumping genes”, por serem capazes de mudar de posição dentro do genoma, podem alterar funções de genes associados (KAZAZIAN; MORAN, 1998; BIÉMONT; VIEIRA, 2006; FERREIRA, 2011). Esse grupo pode ser dividido em duas classes principais: os transposons, que se mobilizam de maneira não replicativa, de um *locus* a outro, como uma molécula de DNA; e os retrotransposons que se deslocam de maneira replicativa via RNA intermediário (CHARLESWORTH; SNLEGOWSKI; STEPHAN, 1994; VOLFF; KÖRTING; SCHARTL, 2000; BÖHNE et al., 2008), havendo a cada ciclo de transposição, um aumento no número de cópias no genoma do hospedeiro (KIDWELL; LISCH, 2002).

Os retrotransposons, por sua vez, também podem ser divididos em dois grupos: os LTR (long terminal repeat), retrotransposons ou LINEs (*long interspersed elements*) e os non-LTR transposons ou SINEs (*short interspersed elements*). Os LINEs, apresentam longas repetições terminais em suas cadeias, podendo ser maiores que 7.000 pb, o que os diferencia dos SINEs, que não apresentam as cadeias terminais e variam em tamanho de 90 a 400 pb (DEININGER et al., 1992; VOLFF et al., 2001; BIÉMONT; VIEIRA, 2006).

Existem também sequências de DNAs repetitivos que são codificadoras e compreendem as famílias multigênicas. Essas indicam um grupo de genes com considerável similaridade estrutural e funcional, quanto ao número e organização dos pares de bases, sendo descendentes de um gene ancestral comum (NEI; ROONEY, 2005; FARAH, 2007). Esses genes podem manifestar diferentes funções, como exemplo temos os genes codificadores de proteínas histônicas, os genes RNAs ribossomais e os genes snRNA U (*small nuclear RNAs*) (CABRAL-DE-MELLO, 2011; CABRAL-DE-MELLO et al., 2012).

1.2. Small nuclear RNA U (snRNA U)

RNAs não codificantes (ncRNAs) funcionam como adaptadores que seguram e posicionam a molécula-alvo de RNA para a atividade enzimática catalisada por proteínas associadas (MATERA et al., 2007). A atividade desses ncRNAs ocorre pelo pareamento de bases e usualmente envolvem várias outras proteínas que são as unidades funcionais das ribonucleoproteínas não codificantes (ncRNPs) (HUTTENHOFER; SCHATTNER, 2006)

Os snRNAs representam um pequeno grupo de ncRNAs não poliadenilados encontrados no nucleoplasma e podem ser divididos em duas classes baseadas na sequência comum entre eles e nos cofatores proteicos. A classe Sm RNA é caracterizada pela presença de um “cap” trimetilguanosina na extremidade 5’, um “stem-loop” na extremidade 3’ e um sítio de ligação para um grupo de sete proteínas Sm (Sm site) que forma uma estrutura heteroheptamérica em anel. Essa classe é composta pelos snRNAs: U1, U2, U4, U4atac, U5, U7, U11 e U12. A outra classe, Lsm, composta por U6 e U6atac snRNAs, apresenta um “cap” monometilfosfato e um “stem-loop” 3’, terminando numa extensão de uridinas que formam o sítio de ligação (Lsm site) do anel heteroheptamérico formado por proteínas Lsm (MATERA et al., 2007; VALADKHAN, 2005; WILL; LUHRMANN, 2006; NILSEN, 2003).

Essas moléculas estão envolvidas em várias funções incluindo o *splicing* de pré-mRNAs, a formação da extremidade 3’ do mRNA de histonas, o processamento de tRNAs, a maturação de rRNAs e a síntese de DNA telomérico (SÉRAPHIN; ROSBASH, 1989; MATTAJ et al., 1993).

O processo de *splicing* ocorre em eucariotos e consiste na excisão dos íntrons da molécula precursora de RNA mensageiro (pré-mRNA) e junção dos éxons, formando assim, o mRNA ativo. A mediação desse processo é dada por um grande complexo ribonucleoproteico, o spliceossomo, formado pela interação de mais de 300 proteínas e 5 tipos de RNA metabolicamente estáveis: U1, U2, U4, U5 e U6 (MATERA et al., 2007; NILSEN, 2003; VALADKHAN, 2005; LIU; GALL, 2007).

Cada molécula de snRNA U é complexada com pelo menos sete subunidades proteicas, para formar uma snRNP (*small nuclear ribonucleoprotein*) – o cerne do spliceossomo (ALBERTS et al., 2005).

A primeira molécula a se ligar no pré-mRNA é o U1 RNP na extremidade 5’, na qual há a junção éxon-íntron, e essa ligação se dá pelo pareamento de bases (ZHANG; ROSBASH, 1999). Essa extremidade 5’ é altamente conservada e, quando ocorre polimorfismos nos íntrons e nas junções íntron-éxon, pode ocorrer uma completa ou parcial

inibição da expressão do gene, bem como a geração de diferentes sequências no mRNA (MARTINEZ et al., 2004). Dessa maneira, pode-se perceber a importância da conservação da estrutura dos snRNAs e a necessária especificidade desses, assim como das proteínas, para que se tenha uma afinidade de ligação RNA-proteína adequada. Quando essas alterações ocorrem fora das áreas funcionalmente críticas, os efeitos na formação do spliceossomo e no splicing são sutis (SIERRA-MONTES et al., 2002).

Subsequentemente a formação do spliceossomo e do pareamento U1 snRNP-pré-mRNA ocorre a ligação, por meio do pareamento de bases, entre o U2 snRNP e o branch-point (ponto de ramificação) A (devido a presença de adenosina; ou BP) do íntron, formando uma hélice entre o U2 snRNP com a sequência consenso do íntron (PARKER et al., 1987; SIERRA-MONTES; ROSBASH, 1989; SASHITAL, 2007).

Burke e colaboradores (2012) descobriram que essa ligação ao BP ocorre por um complexo U2/U6 snRNP, que também se liga ao *splice site* 5', e discutem sobre esse ser o primeiro passo do splicing. Essa associação ao pré-mRNA ocorre apenas em condições ativas de splicing, o que sugere que algum outro fator deve se ligar no pré-mRNA ou ao U2 snRNP. Esse fator pode ser componente do *Splice site* 3', já que a seleção do BP do íntron parece ser altamente determinada pela sua proximidade ao *Splice site* 3' (MANIATIS; REED, 1985; RUSKIN et al., 1985; BLACK et al., 1985).

O duplex U2-íntron serve para posicionar o BP para seu papel como “nucleófilo” durante o primeiro passo catalítico e, o complexo U2-U6 justapõe a hélice do BP com o *splice site* 5', sendo, portanto, responsável pela catálise, por meio de duas reações de transesterificação (VALADKHAN; MANLEY, 2001, 2003; PADGETT et al., 1984). Esse complexo é formado por quatro hélices, sendo uma intramolecular (U6:U6), outras três intermoleculares entre U6 e o *splice site* 5' (U6:5'SS), U2 e o BP (U2:BP), e U2 e U6 (U2:U6) (VILLA et al., 2002).

Análises das sequências dos genes snRNA U2 e U6 mostraram a alta conservação das mesmas, especialmente das sequências ACAGAG e AGC de U6 (VILLA et al., 2002). Essa alta conservação pode ser reflexo da participação de ambos na formação do complexo U2-U6 que corresponde ao coro catalítico do spliceossomo (MADHANI; GUTHRIE, 1992).

Os snRNAs U1 e U2 apresentam várias regiões de complementaridade (e.g. nucleotídeos 11 a 20 do U1 com nucleotídeos 5 a 14 de U2; a sequência de 65 a 72 em U1 com a sequência de 30 a 37 em U2), permitindo a possibilidade de uma interação desses snRNPs por meio do pareamento de bases. Uma interação U1-U2 conjuntamente com a

interação de U2 com o BP pode explicar como o *splice site 5'* e o BP se unem antes da formação do “*lariat*” (alça formada pelo íntron recém-clivado) (BLACK et al., 1985).

Os snRNAs U nem sempre apresentam as mesmas formas, podendo variar dependendo da expressão gênica durante o desenvolvimento do organismo ou do tecido o qual essas sequências se localizam. Como exemplo, formas fetais e adultas de snRNA U1 foram encontradas em camundongo (LUND et al., 1985; CHENG et al., 1997) e em *Xenopus laevis* e *Drosophila melanogaster* foram encontradas variantes de snRNA U1 em estágios embrionários e adultos (FORBES et al., 1984; LO; MOUNT, 1990). Sierra-Montes e colaboradores (2002) estudaram essas variantes do gene U1 e afirmaram que isto pode estar relacionado com uma capacidade diferenciada de ligação ao pré-mRNA e/ou splicing alternativo e diferenças nos snRNPs, bem como supressão de variantes de mutação.

A formação do spliceossomo pode ser caracterizada pela reunião ordenada dos snRNPs com o pré-mRNA (KONARSKA; SHARP, 1986; PIKIELNY et al., 1986; MANIATIS; REED, 1985) e esse complexo foi hipotetizado como sendo uma ribozima (COLLINS; GUTHRIE, 2000; BUTCHER, 2009) baseado em similaridades mecanicistas e estruturais com o grupo II de *self-splicing* íntrons (GORDON et al., 2000; KEATING, et al., 2010) e pela observação que os complexos U2/U6, sem proteínas, derivados de sequências humanas tem uma atividade catalítica residual relacionada com splicing *in vitro* (VALADKHAN; MANLEY, 2001, 2003; VALADKHAN et al., 2009).

Um importante fator para avaliar o spliceossomo como uma ribozima é o papel desempenhado pelos íons metálicos nessas moléculas (VILLA et al., 2002). Já se sabe que cátions divalentes são cruciais para o processamento do RNA (e.g., pela neutralização das cargas negativas localizadas próximas as hélices de RNA) e, Gordon *et al.* (2000) provaram que íons metálicos conferem estabilidade aos “leaving groups” durante passos do splicing. O íon Mg^{2+} tem função catalítica no spliceossomo, sendo co-fator de algumas enzimas, fazendo com que essas operem como metaloenzimas (VALADKHAN; MANLEY, 2001).

Os genes snRNA U constituem um grupo classe II de genes conservados evolutivamente (BARZOTTI et al., 2003) e já foram citogeneticamente mapeados em uma variedade de eucariotos, incluindo humanos (LINDGREN et al., 1985; LUND et al., 1983), camundongos (LUND; NESBITT, 1988), quatro espécies de peixes da família Batrachoididae (ÚBEDA-MANZANARO et al., 2010), dois da família Moronidae (MERLO et al. 2010), além de *Solea senegalensis* (MANCHADO et al., 2006) e *Oreochromis niloticus* (CABRAL-DE-MELLO et al., 2012), dois crustáceos isópodes (BARZOTTI et al., 2003), bicho-da-seda (PEREIRA-SIMON et al., 2004) e algumas espécies de gafanhotos (PALACIOS-GIMENEZ

et al., 2013; BUENO et al., 2013). Esses genes apresentam, usualmente, menos de 300 nucleotídeos (LIU; GALL, 2007) e podem estar dispersos pelo genoma em múltiplas cópias ou, como alguns pesquisadores já constataram, também se podem se encontrar distribuídos em repetições em *tandem* (MARZLUFF et al., 1983; MATTAJ; ZELLER, 1983; VAN ARSDELL; WEINER, 1984; WATANABE-NAGASU et al., 1983; WISE; WEINER, 1980). Além disso, Pelliccia *et al.* (2001) evidenciaram repetições do gene 5S do RNA ribossômico (rRNA) ligadas as sequências gênicas dos snRNAs em crustáceos.

O comportamento desses genes ainda não foi totalmente elucidado. Marz *et al.* (2008) investigaram a história evolutiva de famílias do gene snRNA U1 usando dados de genomas de metazoa parcial ou completamente sequenciados e revelaram que eles se comportam como elementos móveis exibindo muito pouca conservação sintênica. Por outro lado, as análises de Cabral-de-Mello e colaboradores (2012) ao estudar o genoma de *O. niloticus* mostraram que o comportamento desses genes não é intrinsecamente semelhante ao dos elementos móveis; pelas análises de cópias dos genes U1 em *O. niloticus*, bem como de suas regiões flangeadoras, mostraram que esses genes estão frequentemente flanqueados por elementos de transposição, podendo estar envolvidos na distribuição desses genes no genoma.

Sabe-se que o genoma humano apresenta cerca de 30 cópias do gene snRNA U1 (LUND; DAHLBERG, 1984) e de 10 a 20 cópias do gene snRNA U2 (VAN ARSDELL; WEINER, 1984) por genoma haplóide, localizados nos cromossomos 1 e 17, respectivamente (SCHUL et al., 1998).

A transcrição dos genes snRNA U do spliceossomo é feita pela RNA polimerase II, com exceção do gene snRNA U6, o qual é transcrito pela enzima RNA polimerase III (SCHUL et al., 1998). De acordo com Dahlberg e Lund (1998), um snRNA U2 é transcrito a cada 2 a 4 segundos, assim como os genes U1, indicando uma grande demanda pela transcrição desses snRNAs, bem como de complexos de iniciação de transcrição, principalmente em organismos nos quais esses genes se apresentam organizados em clusters (SCHUL et al., 1998).

Em mamíferos, a transcrição desses genes é direcionada por dois elementos promotores: o PSE (*proximal sequence element*), o qual se localiza mais próximo ao gene, por volta de 50 para 60 pb antes do início da sequência, sendo fundamental para que a transcrição seja iniciada; e o DSE (*distal sequence element*), que se localiza a 220 pb após o ponto de partida (*start site*), funcionando, dessa maneira, como enhancer (SCHUL et al., 1998).

1.2.1. Estudo de snRNA U em outras espécies

O gene snRNA U2 é um dos genes altamente conservados e abundantes presentes no genoma de várias espécies animais. Lindgren *et al.* (1985) investigaram como os genes snRNA U1 e U2 se apresentavam em humanos e observaram através da técnica de hibridação cromossômica (Fluorescent *in situ* hybridization), que os genes snRNA U2 estão fortemente agrupados em *tandem* no cromossomo 17, bandas q21-q22. Por outro lado, os genes snRNA U1 estão dispersos e se localizam no cromossomo 1, banda p36, com uma distância intergênica de 44 kb.

Também em humanos, Van Arsdell e colaboradores (1984) reportaram a organização em *tandem* desses genes com cerca de 6 kb, sendo homogênea, exceto por um região hipervariável repetitiva, composta por dinucleotídeos CT, que pode ter papel na estabilidade (BAILEY et al., 1998) e/ou na evolução dessas repetições (LIAO; WEINER, 1995; LIAO, 1999).

Pavelitz *et al.* (2008) especularam que a arquitetura incomum dos promotores de snRNA U estabelece um estado transcricional permanentemente aberto, como modo de facilitar a ligação da polimerase, sendo alterado somente durante o processo de condensação da cromatina. Foi também descoberto que são necessárias pelo menos cinco unidades de repetição de U2 organizadas em *tandem* para que se possa exibir uma fragilidade metafásica *locus*-específica detectável citologicamente (BAILEY et al., 1998).

Diferentemente da abundância dos snRNAs encontrado em humanos e outros mamíferos, os genes snRNA U são encontrados em cópias únicas nas leveduras. Talvez isso se dê pelo fato de apresentarem poucos íntrons nos mRNAs, completamente o oposto dos mamíferos nos quais são encontrados múltiplos íntrons em cada mRNA, sendo esses genes tão abundantes quanto os rRNAs (PAVELITZ et al., 2008).

Esses genes também foram encontrados organizados em *tandem* em outras espécies. Os genes snRNAs N1 e N2 da espécie *Lytechinus variegatus* de ouriço-do-mar (correspondentes aos genes snRNA U1 e U2 de mamíferos) estão localizados separadamente, porém ambos são arranjados em *tandem* de, no mínimo, 30 kb, sendo a unidade de repetição de 1,4 kb para N1 e 1,1 kb para N2 (CARD et al., 1982).

Mattaj e Zeller (1983) localizaram os genes U2 organizados em *tandem* num fragmento de 831 pb, repetido de 500 a 1000 vezes no genoma de *Xenopus laevis*, e os genes U1 também são encontrados em *tandem*.

Os genes U2 também foram isolados em camundongos e foram encontrados organizados num arranjo repetitivo inverso de 3,4 kb (NOJIMA; KORNBERG, 1983). Foi então levantada a hipótese de que genes snRNA organizados em grandes arranjos em *tandem* devem existir em espécies que dependem de uma rápida embriogênese, e a demanda por grandes quantidades de snRNA durante o desenvolvimento inicial excede, em muito, a biossíntese demandada pelos adultos (VAN ARSDELL; WEINER, 1984).

Barzotti *et al.* (2003) estudaram variantes do gene snRNA U1 no genoma de *Asellus aquaticus* e *Proasellus coxalis*, dois crustáceos isópodes, usando amplificação por PCR (Polymerase Chain Reaction) e constataram que esse gene, em *A. aquaticus*, pode se apresentar na forma de quatro variantes, todas organizadas em *tandem*, com 2.542 bp, 2.200 bp, 1.646 bp e 1.842 bp, essa última coincidindo com o gene rRNA 5S. Por outro lado, em *P. coxalis*, foi encontrada uma única variante de 1.796 bp, porém em ambas as espécies o gene snRNA U1 apresenta o tamanho de 163 bp, diferindo em 28 posições do mesmo gene em humanos.

Em análises do FISH dessas espécies, o gene snRNA U1 pode ser localizado numa posição subcentromérica em dois pares cromossômicos de tamanho médio e subtelomérica em outro par de tamanho médio em *A. aquaticus* (PELLICCIA *et al.*, 2001). Além disso, quando analisado o cromossomo Y de *A. aquaticus*, presente em machos e morfologicamente diferente dos outros cromossomos, foi possível reconhecer sinais de hibridização nas áreas onde se encontra heterocromatina e regiões teloméricas. Em *P. coxalis* só foi evidenciada marcação nas regiões teloméricas de um par cromossômico (BARZOTTI *et al.*, 2003).

Essas sequências também foram estudadas em algumas espécies de gafanhotos por Palacios-Gimenez e colaboradores (2013) que analisaram espécies de três gêneros, *Chlorus*, *Eurotettix* e *Dichromattos*, para tentar elucidar melhor a evolução dos sistemas sexuais da família Melanoplinae pelo mapeamento de algumas sequências de DNA repetitivo, sendo U2 uma delas. Em *Chlorus*, as marcações foram encontradas nas regiões intersticiais de dois pares de cromossomos autossômicos (com exceção de *C. vittatus* que apresentou marcação em três pares autossômicos). Em *E. minor*, a marcação se apresenta na região intersticial de dois cromossomos autossômicos, já em *E. brevicerci*, as regiões de marcação diferiram entre cada um dos cromossomos, sendo em um intersticial e no outro pericentromérica. As sequências em *Dichromattos*, também se apresentaram em dois cromossomos autossômicos, porém na espécie *D. lilloanus*, o cromossomo neo-Y também obteve marcação.

O gene snRNA U1 também foi estudado nesse mesmo trabalho de Palacios-Gimenez *et al.* (2013) e em todas as espécies somente um cromossomo foi marcado na região distal, salvo exceção de *D. lilloanus* na qual a marcação se deu na região intersticial e de *E. minor*, que apresentou marcação em três cromossomos: na região distal de um autossomo e nas regiões intersticiais dos cromossomos neo-X e neo-Y.

O gafanhoto *Abraxis flavolineata* também foi analisado com a finalidade de entender a dinâmica dos cromossomos supranumerários por meio de marcadores citogenéticos. A sequência de snRNA U2 foi então citogeneticamente marcada em um único cluster presente na região intersticial do maior par autossômico e em quatro outros blocos no cromossomo B. Já na marcação feita com snRNA U1, somente foi encontrada uma marcação na região proximal de um par de autossomos (BUENO et al., 2013).

1.3. Considerações taxonômicas e citogenéticas do gênero *Leporinus*

O gênero *Leporinus* se insere dentro da família Anostomidae, um grupo de peixes que se configura como interessante modelo para estudos de sequências repetitivas do genoma, devido a sua estrutura cariotípica altamente conservada. A família, composta por 12 gêneros (*Abramites*, *Anostomoides*, *Anostomus*, *Gnathodolus*, *Laemolyta*, *Leporellus*, *Leporinus*, *Pseudanos*, *Rhytioidus*, *Sartor*, *Schizodon* e *Synaptolaemus*), apresenta ampla distribuição nas Américas do Sul e Central, sendo que, no Brasil, existem representantes em todas as bacias hidrográficas (GÉRY, 1977; GARAVELLO; BRITSKI, 2003).

As espécies da família normalmente apresentam o número diploide de 54 cromossomos morfologicamente identificados como meta e submetacêntricos e um sistema de NOR (*Nucleolar Organizing Region*) simples, com apenas um par portador, estando, porém, em posições e pares distintos nas diferentes espécies do grupo.

No gênero *Leporinus* é observado um sistema peculiar de heterogametia feminina que é restrito a poucas espécies do gênero (GALETTI et al., 1995). A presença de cromossomos sexuais heteromórficos foi descrita apenas para 20% (oito espécies dentre quarenta) das espécies do gênero *Leporinus*: *L. conirostris*, *L. elongatus*, *L. aff. elongatus*, *L. macrocephalus*, *L. obtusidens*, *L. reinhardti*, *L. trifasciatus* e *Leporinus* sp 2.), para as quais já foram descritos sistemas simples e múltiplos.

O sistema ZW simples predomina no grupo citado e neste caso, as fêmeas apresentam o cromossomo W grande, submetacêntrico e totalmente heterocromático. Em contraste, no cromossomo Z, presente em ambos os sexos, somente a terça parte distal do braço longo é

heterocromática. Essa grande quantidade de heterocromatina no cromossomo W sugere que este é composto quase que exclusivamente de sequências repetitivas. Em *Leporinus*, o sistema sexual ZZ/ZW apresenta um alto grau de homologia quanto ao tamanho dos cromossomos, a posição do centrômero, quantidade e distribuição de heterocromatina, o que talvez indique que esse sistema evoluiu de um mesmo par cromossômico ancestral (GALETTI et al., 1995).

Contudo, novos sistemas sexuais, diferentes do típico ZZ/ZW encontrado para sete espécies do gênero, vêm sendo descritos nos últimos anos. Vênere e colaboradores (2004) descreveram a presença de um novo mecanismo sexual para *Leporinus* sp. 2 a partir de observações dos resultados do bandamento C. Foi verificada a presença de um bloco de heterocromatina ocupando mais de 50% do braço curto de um dos cromossomos do primeiro par metacêntrico das fêmeas, o que não é observado nos machos.

Recentemente Parise-Maltempi *et al.* (2007) atribuíram este heteromorfismo de heterocromatina a um provável sistema sexual do tipo múltiplo para *L. elongatus*, que envolve a presença de um grande cromossomo W₁, cujo braço longo é quase que completamente heterocromático, e outros três cromossomos (Z₁, Z₂ e W₂) submetacêntricos distinguidos pela presença de sequências de DNA repetitivo específicas desses cromossomos.

Em virtude dessas características, e com o acesso mais facilitado às técnicas refinadas de estudos dos cromossomos, grandes esforços têm sido aplicados no sentido de estudar a origem e evolução do sistema sexual que é tão peculiar entre as espécies de *Leporinus* (NAKAYAMA et al., 1994; KOEHLER et al., 1997; VENERE et al., 2004; PARISE-MALTEMPI et al., 2007, MARRETA et al. 2012; SILVA et al. 2012). Estes estudos baseiam-se no isolamento e análise de sequências de DNAs repetitivos, bem como sua localização nos cromossomos através de experimentos de hibridação *in situ*. O mapeamento cromossômico dessas frações do genoma, principalmente aquelas provenientes de espécies como *L. elongatus*, *L. obtusidens* e *L. macrocephalus*, têm mostrado íntima relação com os cromossomos sexuais, ricos em bandas heterocromáticas.

Dentre os estudos que detalham a organização cromossômica utilizando técnicas que permitem analisar regiões moleculares específicas dos cromossomos do grupo *Leporinus*, destaca-se o artigo de Parise-Maltempi e colaboradores (2007) que isolaram do genoma de *L. elongatus* um elemento repetitivo de aproximadamente 650pb denominado LeSpeI. Utilizando a técnica de hibridação *in situ* com sondas destas sequências em indivíduos da mesma espécie, estes mesmos autores observaram sua similaridade com os cromossomos sexuais e utilizaram estes dados para confirmar a hipótese de um possível sistema sexual múltiplo do tipo Z₁Z₁Z₂Z₂/Z₁W₁Z₂W₂ sugerindo que a espécie ainda está em processo evolutivo de

diferenciação sexual. Estas mesmas sequências foram úteis na discriminação de híbridos específicos de *L. macrocephalus* e *L. elongatus* em sistemas de piscicultura (HASHIMOTO et al., 2009).

Outras sequências repetitivas interessantes do ponto de vista evolutivo foram também descritas para espécies do gênero *Leporinus*. Dentre elas uma sequência associada às regiões organizadoras do nucléolo (SILVA et al., 2013) e outra que em experimentos de hibridação *in situ* mostrou-se distribuída por todos os cromossomos, exceto naqueles relacionados ao sistema de cromossomos sexuais e tem características de um retrotransposon (SILVA et al., 2012).

Silva et al. (2012) identificaram um novo elemento repetitivo de *L. elongatus*, LeSpeII, cuja localização cromossômica foi investigada em quatro espécies de Anostomidae para que uma possível elucidação da associação de sequências repetitivas na diversificação do genoma de Anostomidae, principalmente na diferenciação de cromossomos sexuais. As marcações se encontraram dispersas por todos os cromossomos, com maior concentração nas porções terminais, exceto nos cromossomos sexuais de *L. elongatus* que não apresentam marcações. Nenhuma indicação de especificidade sexual dessa sequência foi encontrada nas outras espécies (*L. macrocephalus*, *L. obtusidens*, *L. friderici*, *L. striatus*, *L. lacustris*, *S. borelli* e *S. isognathus*), todas apresentando um sinal disperso por todos os cromossomos.

Essa distribuição dispersa encontrada para LeSpeII é equivalente com a organização genômica de todos os LINEs já analisados, porém difere da distribuição de outros elementos repetitivos já estudados em Anostomidae (SILVA et al., 2012). É possível reconhecer que essas sequências repetitivas são realmente importantes para a organização estrutural e funcional do genoma e, por isso, estudá-las significa conhecer, além da organização genômica, a dinâmica com que essas sequências têm evoluído nos organismos. Sequências de DNA repetitivo parecem ser, portanto, bons marcadores para estudos evolutivos, identificação de rearranjos cromossômicos e identificação de diferenças entre machos e fêmeas, entre outras aplicações.

Sendo assim, para termos um maior entendimento da organização estrutural e funcional do genoma de peixes, outras sequências repetitivas devem ser isoladas e caracterizadas no gênero, para que, dessa maneira, se consiga um avanço promissor em direção a compressão da evolução desse grupo, bem como de vertebrados, em particular no que se refere à heterocromatina e cromossomos sexuais.

No presente trabalho foi estudada a organização genômica e a localização cromossômica do gene snRNA U2, da mesma família multigênica do gene snRNA U1, em

espécies de peixes do gênero *Leporinus*, que é um grupo de peixes que se configura como um modelo interessante para estudo de DNAs repetitivos, cromossomos sexuais e evolução genômica em peixes, principalmente por possuir numerosos segmentos de heterocromatina e um sistema peculiar de heterogametia feminina restrito a poucas espécies do gênero (SILVA et al., 2012).

2. OBJETIVOS

O presente trabalho teve como objetivo entender a organização genômica e a localização cromossômica do gene snRNA U2 em espécies de peixes do gênero *Leporinus*, assim como espécies de grupos próximos (*Schizodon isognathus* e *S. borelli*), na tentativa de contribuir para o maior entendimento da evolução dos cromossomos e analisar se existe alguma relação deste gene com a presença ou ausência de cromossomos sexuais deste grupo de peixes.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Materiais

Foram utilizadas preparações citogenéticas e DNA genômico de quatro espécies do gênero *Leporinus*: *L. elongatus* (VALENCIENNES, 1849), *L. striatus* (KNER, 1858), *L. friederici* (BLOCH, 1794) e *L. macrocephalus* (GARAVELLO; BRITISKI, 1988) e duas espécies do gênero *Schizodon*: *S. borelli* e *S. isognathus*. O material utilizado foi coletado em diferentes rios do estado de São Paulo e Mato Grosso e estavam disponíveis na coleção de tecidos e preparações citogenéticas já existentes no Laboratório de Citogenética do Departamento de Biologia (Instituto de Biociências, UNESP - Rio Claro).

A obtenção de cromossomos mitóticos foi realizada previamente pela técnica descrita Foresti e colaboradores (1993). O DNA extraído foi a partir do fígado dos indivíduos fixados em etanol 100%, seguindo o protocolo apresentado por Sambrook e Russel (2001).

3.2. Métodos

3.2.1. Amplificação de DNA via Polymerase Chain Reaction (PCR)

Para amplificação do gene U2 foram utilizados os seguintes primers desenhados por Bueno e colaboradores (2013) U2F (59-ATC GCT TCT CGG CCT TAT G-39) e U2R (59-TCC CGG CGG TAC TGC AAT A-39).

A amplificação foi feita seguindo o protocolo descrito abaixo:

Soluções	Volume
H ₂ O Mili Q (autoclavada)	31 μ L
Tampão (<i>PCR Buffer - Invitrogen</i>)	5 μ L
MgCl ₂ (50 mM – <i>Invitrogen</i>)	2 μ L
dATP (2 mM)	1 μ L
dTTP (2 mM)	1 μ L
dCTP (2 mM)	1 μ L
dGTP (2 mM)	1 μ L
<i>Primer F</i> (10 ng)	1 μ L
<i>Primer R</i> (10 ng)	1 μ L
DNA	1 μ L
Taq polimerase (<i>Invitrogen</i>)	0,5 μ L
Volume final	45,5 μ L

A reação de PCR seguiu as condições gerais de desnaturação inicial a 94°C durante 5 minutos, 30 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento a 55°C por 30 segundos, elongação a 72°C por 5 minutos, e extensão final a 72°C durante 5 minutos, com temperatura de manutenção a 4°C.

A verificação dos resultados foi feita utilizando 1 μ L de produto de PCR e 1 μ L de tampão de corrida *Blue Juice*, aplicados em gel de agarose 1,0% corado com Gel Red. Em seguida o gel foi visualizado em transiluminador de luz ultravioleta, para que fosse possível verificar a quantidade, bem como o tamanho dos fragmentos amplificados, fazendo para isso o uso do marcador de peso molecular de 1Kb, da Ludwig Biotec.

Foram amplificadas amostras de 2 indivíduos de *L. elongatus*, 1 indivíduo de *L. striatus*, 3 indivíduos de *L. lacustris*, 2 indivíduos de *L. macrocephalus*, 3 indivíduos de *L. friederici* e 1 indivíduo de *S. borelli*, de acordo com a disponibilidade das amostras no laboratório. Não foram encontradas amostras de *S. isognathus* para a realização da PCR.

3.2.2. Sequenciamento

Para o sequenciamento dos produtos de PCR, as amostras foram purificadas por meio do tratamento com a enzima ExoSAP-IT (GE Healthcare™), utilizando-se 10 μ L de produto

de PCR, 2 μ L ExoSAP-IT e 2 μ L H₂O. A reação foi realizada em um ciclo de 60 minutos a 37°C seguido por um ciclo de 15 minutos a 80 °C em termociclador.

As amostras amplificadas foram enviadas para o sequenciamento na Macrogen Inc. em Seoul, Coreia do Sul, empresa que realiza serviço de sequenciamento terceirizado.

3.2.3. Análise das sequências

As sequências foram analisadas com o uso do programa BioEdit (HALL, 1999). As extremidades de baixa qualidade foram retiradas e as bases não identificadas foram substituídas. Porém, mesmo com essas alterações, as sequências não se apresentaram concisas para o uso no presente trabalho.

3.2.4. Fluorescent *in situ* hybridization (FISH)

A técnica de FISH descrita inicialmente por Pinkel *et al.* (1986), com modificações sugeridas por Silva e colaboradores (2012) foi realizada com marcação das sondas por PCR com digoxigenina-11-dUTP seguindo o protocolo abaixo:

Soluções	Volume
H ₂ O Mili Q (autoclavada)	16 μ L
Tampão (PCR Buffer - <i>Invitrogen</i>)	2,5 μ L
MgCl ₂ (50 mM – <i>Invitrogen</i>)	0,25 μ L
dATP (2 mM)	0,5 μ L
dTTP (2 mM)	0,35 μ L
dCTP (2 mM)	0,5 μ L
dGTP (2 mM)	0,5 μ L
Digoxigenin-11-dUTP (1 mM – <i>Roche</i>)	0,3 μ L
Primer F (10 ng)	1 μ L
Primer R (10 ng)	1 μ L
Produto de PCR	2 μ L
Taq polimerase (<i>Invitrogen</i>)	0,1 μ L
Volume final	25 μ L

A reação de PCR seguiu as condições gerais de desnaturação inicial a 94°C durante 5 minutos, 30 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento a 55°C por 30 segundos, elongação a 72°C por 5 minutos, e extensão final a 72°C durante 5 minutos, com temperatura de manutenção a 4°C. Foi feita verificação em gel de agarose 1,0% da mesma maneira já descrita anteriormente.

As lâminas foram então incubadas em 100 μ L de solução de RNase (0,4% RNase/2xSSC) a 37°C por uma hora em câmara úmida e lavadas três vezes por 5 minutos em 2xSSC. Em seguida, as lâminas foram passadas em série alcoólica (a temperatura ambiente) 70, 90 e 100% por 5 minutos e secas também a temperatura ambiente.

Para a desnaturação dos cromossomos, as lâminas foram deixadas por 5 minutos (para *Leporinus*) e 2 minutos (para *Schizodon*) em solução de formamida 70% em 2xSSC a 70°C. Cada lâmina foi então desidratada em série alcóolica (gelada a -20°C) a 70, 90 e 100% por 5 minutos e secas a temperatura ambiente.

A solução de hibridação (6 μ L de sonda marcada, 15 μ L de formamida, 3 μ L de 20xSSC e 6 μ L de sulfato de dextran para cada lâmina) foi desnaturada em termociclador a 95°C por 10 minutos, sendo 37°C a temperatura de manutenção.

As lâminas foram montadas com 30 μ L dessa solução, cobertas com lamínulas e mantidas a 37°C *overnight* (36 horas) em câmara úmida. Após isso, as lamínulas foram retiradas e as lâminas lavadas duas vezes por 5 minutos em solução de estringência (50% formamida, 50% 2xSSC) a 42°C. Em seguida, foram transferidas para 4xT em temperatura ambiente por 5 minutos.

Cada lâmina foi então incubada com 30 μ L de anticorpo anti-digoxigenina-rodamina (4 μ L de anti-digoxigenina-rodamina e 26 μ L de 4xT) durante 30 minutos em câmara úmida e escura a 37°C e em seguida enxaguadas, rapidamente, em 2xSSC a temperatura ambiente. As lâminas foram então lavadas duas vezes em 4xT por 5 minutos a 42°C e passadas, rapidamente, em 2xSSC a temperatura ambiente.

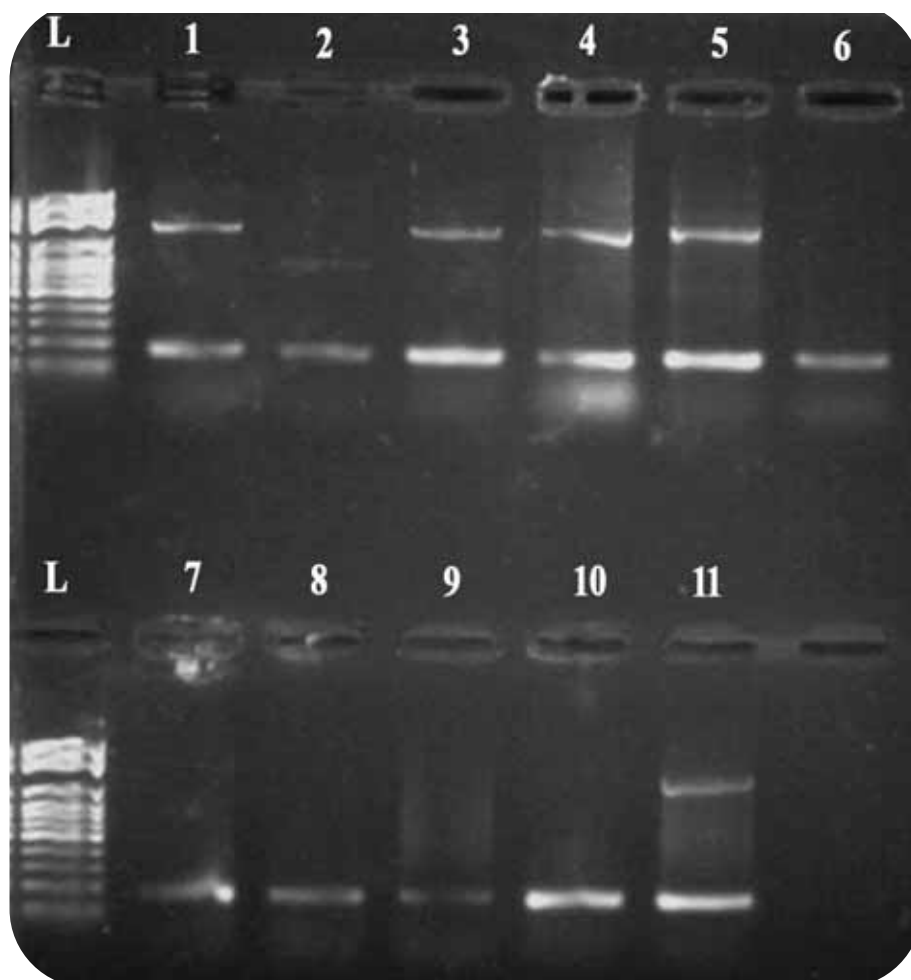
Para a montagem das lâminas foram colocados 10 μ L de solução DAPI + antifading (*Vectashield*), cobertas com lamínulas e armazenadas em geladeira no escuro.

4. RESULTADOS

4.1. Amplificação de DNA via PCR

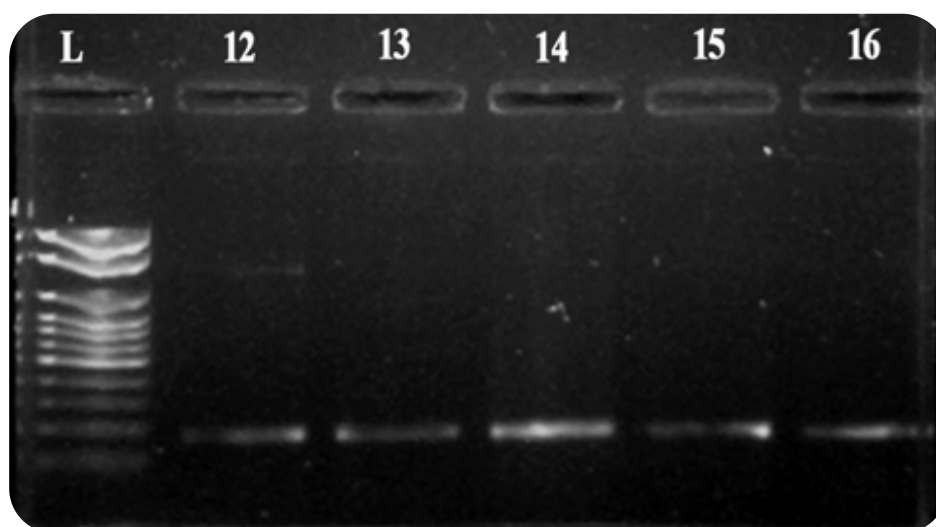
O DNA genômico das espécies *L. elongatus*, *L. striatus*, *L. friderici*, *L. macrocephalus*, *L. lacustris* e *S. borelli* foram submetidas ao teste de PCR. Foram obtidas sequências com, aproximadamente, 200 pb, para todos os indivíduos analisados como mostram as figuras 1 e 2.

Figura 1 - Gel de agarose com os produtos de amplificação do gene snRNA U2 em diferentes espécies. (L) – Ladder de 1Kb; (1 e 2) *L. lacustris*; (3) *L. friderici*; (4) *L. elongatus*; (5 e 6) *L. macrocephalus*; (7) *L. elongatus*; (8 e 9) *L. friderici*; (10) *L. lacustris*; (11) *L. striatus*.



Fonte – Dados da pesquisa

Figura 2 - Gel de agarose com os produtos de amplificação do gene snRNA U2 para (12) *L. lacustris*, (13 e 14) *L. friderici*, (15) *L. lacustris* e (16) *S. borelli*; (L) - Ladder de 1Kb.



Fonte - Dados da pesquisa

4.2. Sequenciamento

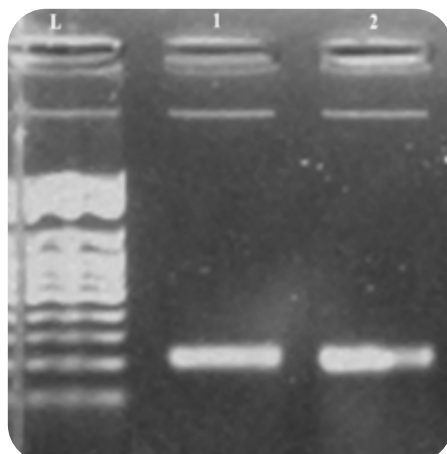
O sequenciamento das amostras não ocorreu da maneira esperada, tendo problemas para a visualização clara e objetiva dos picos dos nucleotídeos das sequências obtidas e, conseqüentemente gerou sequências ruins. Dessa maneira, esses resultados não foram levados em consideração durante o desenvolvimento desse trabalho.

4.3. Fluorescent in situ hybridization (FISH)

O produto obtido a partir da amplificação foi submetido à marcação via PCR e bandas com aproximadamente 200 pb foram visualizadas em gel de agarose (Figura 3).

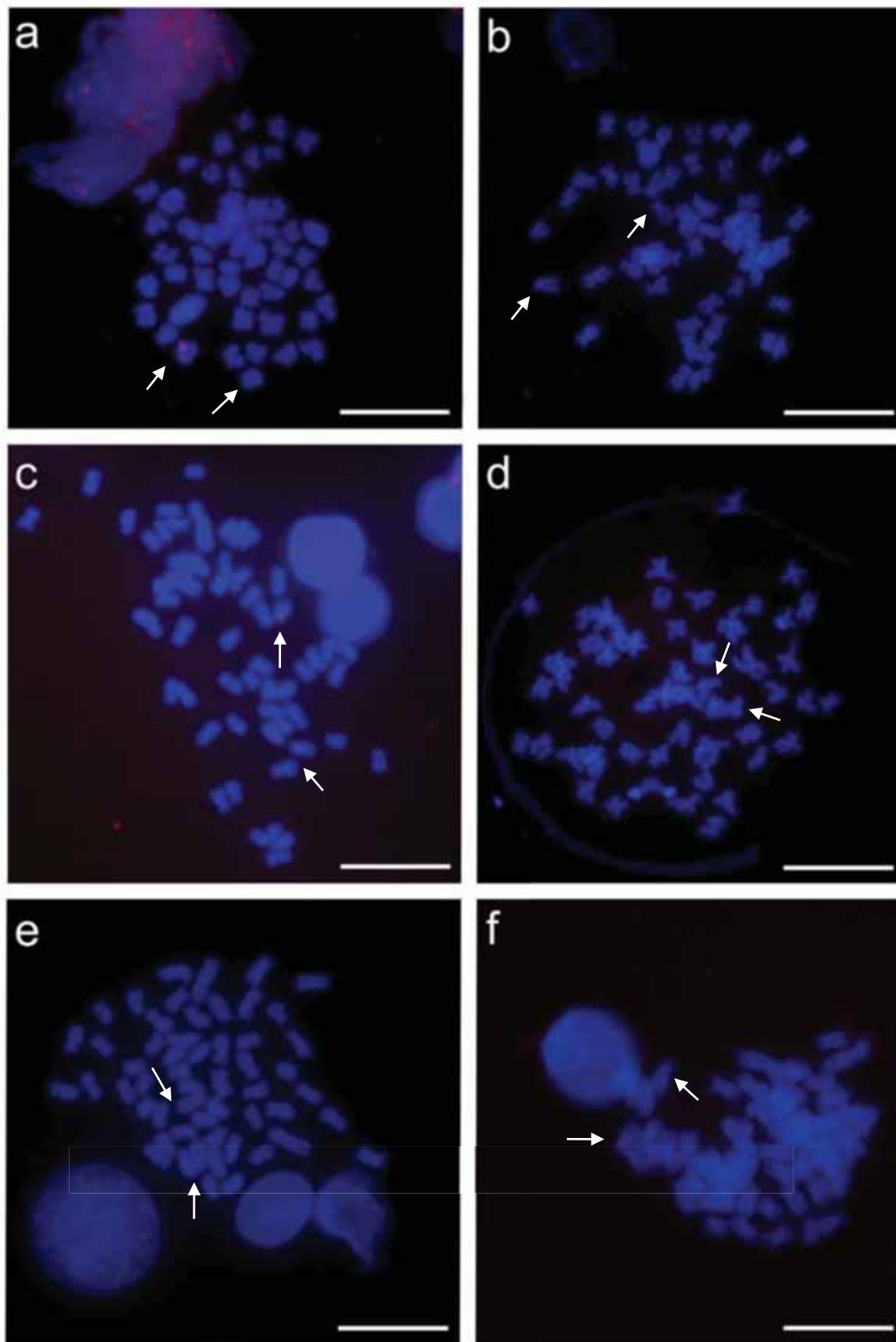
Os resultados gerados na hibridação *in situ* fluorescente mostrou que o gene snRNA U2 está localizado em um par cromossômico do tipo submetacêntrico de tamanho médio na região pericentromérica de todas as espécies analisadas como pode ser observado na figura 4.

Figura 3 - Gel de agarose demonstrando a marcação feita com digoxigenina-11-dUTP em indivíduos de *L. macrocephalus* (1 e 2); (L) - Ladder de 1Kb.



Fonte: Dados da pesquisa

Figura 4 - Localização do gene snRNA U2 em cromossomos de (a) *L. elongatus*, (b) *L. macrocephalus*, (c) *L. friderici*, (d) *L. striatus*, (e) *S. borelli* e (f) *S. isognathus*. Em azul os cromossomos corados com DAPI. As flechas indicam os cromossomos marcados. Barra = 10 μ m.



Fonte: Dados da pesquisa

5. DISCUSSÃO

O tamanho dos fragmentos obtidos no presente trabalho foi de, aproximadamente, 200 pb o que parece ser semelhante ao encontrado para o mesmo gene no genoma humano, que mostra uma região codificante de 188 pb (VAN ARSDELL; WEINER, 1984) e um espaçador de tamanho variável, que apresenta diferentes tamanhos dependendo de cada espécie (MERLO et al., 2010). Já nas espécies de peixes *Dicentrarchus labrax* e *D. punctatus* foram encontradas sequências com 1.057-1.089 pb e 1.083-1.084 pb, respectivamente (MERLO, et al., 2010). A levedura *Saccharomyces cerevisiae* apresenta essa sequência com cerca de 1.175 pb (ARES, 1986; SHUSTER; GUTHRIE, 1988). Em *Xenopus laevis*, o gene é organizado em *tandem*, tendo a unidade de repetição 871 pb (MATTAJ; ZELLER, 1983).

Apesar desses resultados serem um tanto discrepantes, *D. labrax* e *D. punctatus* apresentam 189 pb de homologia com todas as outras sequências desse gene presentes no banco de dados do NCBI (MERLO et al., 2010); já *S. cerevisiae* apresenta somente 120 nucleotídeos de similaridade com a mesma sequência de mamíferos (ARES, 1986).

Os genes snRNA U1 e U2 foram amplamente estudados em humanos por Lindgren *et al.* (1985) e foi constatada a localização de U2, fortemente agrupada em *tandem*, no braço longo, bandas de 21 a 22, do par cromossômico 17. Por outro lado, os genes U1 parecem estar mais dispersos e localizam-se na banda 36 do braço curto do par cromossômico 1, tendo uma distância intergênica de 44 kb.

A organização genômica dos genes snRNA U pouco foi estudada em peixes, e os genes U2 só foram citogeneticamente mapeados em seis espécies pertencentes as famílias Batrachoididae e Moronidae (ÚBEDA-MANZANARO et al., 2010; MERLO et al., 2010).

Por meio da hibridação *in situ* fluorescente foi possível observar que, em todas as espécie estudadas neste trabalho, o gene snRNA U2 é encontrado na região pericentromérica do braço curto de um par cromossômico submetacêntrico de tamanho médio e não foi evidenciada qualquer relação deste gene com a presença ou ausência de cromossomos sexuais. Merlo e colaboradores (2010) mapearam citogeneticamente o gene snRNA U2 em duas espécies de peixes da família Moronidae, *D. labrax* e *D. punctatus*, e foi observada uma distribuição similar a obtida no presente trabalho na questão de apresentar somente um par cromossômico marcado, sendo ele acrocêntrico, porém a posição desta marcação é diferente da encontrada para o grupo dos anostomídeos estudados, uma vez que para as duas espécies de Moronidae elas se localizaram na região telomérica do braço longo.

Em outro estudo com peixes da família Batrachoididae, realizado por Úbeda-Manzanaro *et al.* (2010), as quatro espécies que foram analisadas apresentaram distribuições um tanto diferentes. Apesar de todas as espécies observadas (*Amphichthys cryptocentrus*, *Porichthys plectrodon*, *Batrachoides manglae* e *Thalassophryne maculosa*) mostrarem distribuição dispersa da sequência U2 pela maioria dos cromossomos, em *B. manglae* pôde ser observado um maior grau de clusterização na região subtelomética em um único par de tamanho grande. Além disso, em *T. maculosa* a sequência não apresenta um grau de dispersão tão grande quanto nas outras espécies e sinais fortes de hibridação foram encontrados na região mediana do braço longo de um único par de tamanho médio, o que talvez possa indicar uma maior tendência de acúmulo do gene snRNA U2 em um par específico durante a história evolutiva dessa família de peixes. Essa tendência de acúmulo em um único par também foi percebida por Merlo *et al.* (2008) ao estudar o gene snRNA U2 em *H. didactylus*.

Úbeda-Manzanaro *et al.* (2010) descreveram uma co-localização dos genes snRNA U2 com os genes ribossomais 18S e 5S, principalmente em *T. maculosa*. Essa organização também foi observada em estudos do gene snRNA U1 em dois crustáceos (*Asellus aquaticus* e *Proasellus coxalis*) e nos peixes *Solea senegalensis* e *Oreochromis niloticus* (PELLICCIA *et al.*, 2001; BARZOTTI *et al.*, 2003; MANCHADO *et al.*, 2006; CABRAL-DE-MELLO *et al.*, 2012). Ao comparar essas duas famílias multigênicas, rDNA e snDNA U, os últimos parecem ser mais estáveis, podendo refletir na existência de forças evolutivas distintas atuando na clusterização e na distribuição dessas famílias, como foi observado para os peixes ciclídeos (CABRAL-DE-MELLO *et al.*, 2012).

Os genes snRNA_U também foram citogeneticamente mapeados em algumas espécies de invertebrados. Palacios-Gimenez e colaboradores (2013) encontraram clusters desses genes nas regiões intersticiais em dois pares de cromossomos autossômicos (com exceção de *Chlorus vittatus* que apresentou marcação em três pares autossômicos) durante estudos de algumas espécies de gafanhotos do gênero *Chlorus*. Outros gêneros também foram analisados e em *Eurotettix* e *Dichromattos*, as sequências foram encontradas em dois cromossomos autossômicos. Já na espécie *D. lilloanus*, o braço YL, que apresenta homologia com o braço XR (braço autossômico do cromossomo sexual neo-X que apresenta homologia com o braço do cromossomo neo-Y), também obteve marcação, indicando uma possível relação com cromossomos sexuais.

Bueno *et al.* (2013) analisaram o gene snRNA U2 no gafanhoto *Abracris flavolineata* e encontraram um único cluster presente na região intersticial do maior par

autossômico. Além disso, quatro outros blocos aparecem marcados, sendo dois simetricamente em cada braço, no cromossomo B.

Em estudos com snRNA U1, pertencente a essa mesma família multigênica, em peixes ciclídeos por Cabral-de-Mello e colaboradores (2012) obteve-se resultado similar ao encontrado no presente trabalho. Todas as 14 espécies analisadas apresentaram marcações em um único par homólogo nas posições terminal, intersticial ou proximal. Além disso, foi evidenciado que, nas espécies africanas, diferentemente das sul-americanas, os clusters de snRNA U1 foram encontradas exclusivamente na posição terminal do braço longo de um par subtelo/acrocêntrico, com exceção de uma única espécie *Etroplus maculatus* na qual houve marcação na posição intersticial.

Nas espécies da América do Sul examinadas foram observados padrões mais variáveis em relação à posição específica do marcador estudado e da morfologia dos cromossomos onde os genes estão localizados. As espécies *Retroculus lapidifer*, *C. kelberi*, *Biotodoma cupido*, *Aequidens tetramerus*, *Heros efasciatus*, *Geophagus brasiliensis*, *G. proximus* e *Satanoperca jurupari* apresentaram marcações nos braços longos de um par subtelo/acrocêntrico, sendo os clusters localizados terminalmente nas primeiras cinco espécies, intersticialmente em *G. brasiliensis* e proximalmente nas outras duas espécies restantes. Além dessas espécies, *Astronotus ocellatus* e *Mesonauta festivus*, mostraram marcações nas posições terminais de um par meta/submetacêntrico, porém no braço longo em *A. ocellatus* e no braço curto em *M. festivus* (CABRAL-DE-MELLO et al., 2012).

Pelliccia et al. (2001) encontraram, em *A. aquaticus* e *P. coxalis*, dois crustáceos isópodes, os genes U1 posicionados sub-centromericamente em dois pares cromossômicos de tamanho médio e sub-telomericamente em outro par de tamanho médio, além de ter sido reconhecido sinais de hibridação em áreas teloméricas e heterocromáticas dos cromossomos Y presentes em machos (BARZOTTI et al., 2003).

Os resultados obtidos por Cabral-de-Mello et al. (2012) indicam uma alta conservação desse gene nas espécies analisadas, apesar das variações encontradas quanto à posição cromossômica do mesmo nas espécies sul-americanas. Essa constatação também pode ser ampliada para o presente trabalho, uma vez que o gene snRNA U2 se apresentou na mesma posição em todas as espécies estudadas.

Além da co-localização encontrada dos genes ribossomais com os genes snRNA U (PELLICCIA et al., 2001; BARZOTTI et al., 2003; MANCHADO et al., 2006; CABRAL-DE-MELLO et al., 2012), Cabral-de-Mello et al. (2012) encontraram elementos transponíveis localizados nas regiões flangeadoras do gene snRNA U1, e foi revelado que eles podem

estar envolvidos com a distribuição dessas sequências pelo genoma, porém a geração de grandes snRNA clusters é prejudicada.

Um importante fator encontrado nessas sequências de snRNA U é a alta conservação que elas apresentam. Cabral-de-Mello *et al.* (2012) identificaram uma similaridade de 91,6%, com 73,3% de sítios idênticos entre o gene snRNA U1 em humanos e em *O. niloticus*, ambos com 164 pb. Mattaj e Zeller (1983) encontraram uma homologia de 94% entre o gene snRNA U2 em ratos e em *Xenopus*. Apesar disso, o número e a organização das mesmas são bem variáveis entre as espécies, refletindo ampla variação dos níveis de snRNA U2, assim como diversas estratégias de conservação dentre cada membro dessa família multigênica (MATERA *et al.*, 1990).

Em *D. lilloanus*, a presença desse gene no cromossomo neo-Y demonstrou a diversificação desse cromossomo com relação a outra espécie congênere, *D. schrottkyi* (PALACIOS-GIMENEZ *et al.*, 2013). Cabral-de-Mello *et al.* (2012) evidenciaram que o gene snRNA U1 pode ser considerado como um novo e útil marcador molecular para estudos citogenéticos, o que está também sendo evidenciado para o grupo dos *Leporinus*. Os resultados obtidos por Úbeda-Manzanaro *et al.* (2010) com os genes snRNA U2 em espécies da família Batrachoididae também mostraram que essa sequência pode ser considerada um marcador citogenético útil para estudos de filogenia.

6. CONCLUSÃO

Sabe-se que o gênero *Leporinus* se configura como um modelo no estudo dos cromossomos sexuais em peixes, e que os DNAs repetitivos podem fornecer informações valiosas tanto no sentido genômico como filogenético. Embora a maioria das sequências repetitivas estudadas até o momento no grupo dos *Leporinus* mostre forte relação e divida o grupo em dois (aquele das espécies que possuem cromossomos sexuais e aquele das que não os possuem), a sequência U2 não mostrou distribuição diferenciada entre os cromossomos das diferentes espécies analisadas. Assim, é notável que a localização das sequências U2 em cromossomos morfologicamente semelhantes de *Leporinus* e *Schizodon* seja conservada para estes dois gêneros tão próximos, sugerindo que forças evolutivas similares possam ter atuado sobre essas sequências durante o processo de diferenciação dos dois grupos.

7. REFERÊNCIAS

- ARES, M., Jr. U2 RNA from yeast is unexpectedly large and contains homology to vertebrate U4, U5, and U6 small nuclear RNAs. *Cell* 47: 49-59, 1986..
- BAILEY, A. D.; PAVELITZ, T.; WEINER, A. M. The microsatellite sequence (CT)_n - (GA)_n promotes stable chromosomal integration of large *tandem* arrays of functional human U2 small nuclear RNA genes. *Molecular Cellular Biology*, v. 18, p. 2262–2271, 1998.
- BARZOTTI, R.; PELLICCIA, F.; ROCCHI, A. Identification and characterization of the U1 small nuclear RNA genes from two crustacean isopod species. *Chromosome Research*, v. 11, p. 365-373, 2003.
- BIÉMONT, C.; VIEIRA, C. Genetics: Junk DNA as an evolutionary force. *Nature*, v. 443, p. 521-524, 2006.
- BLACK, D. L.; CHABOT, B.; STEITZ, J. A. U2 as well U1 Small Nuclear Ribonucleoproteins Are Involved in Premessenger RNA Splicing. *Cell*, v. 42, p. 737-750, 1985.
- BOHNE, A.; BRUNET, F.; GALIANA-ARNOUX, D.; SCHULTHEIS, C.; VOLFF, J-N. Transposable elements as drivers of genomic and biological diversity in vertebrates. *Chromosome Research*, v. 16, p. 203-215, 2008.
- BRENNER, S.; ELGAR, G.; SANDFORD, R.; MACRAE, A.; VENKATESH, B.; APARICIO, S. Characterization of the pufferfish (*Fugu*) genome as a compact model vertebrate genome. *Nature*, v. 366, p. 265-268, 1993.
- BUENO, D.; PALACIOS-GIMENEZ, O.; CABRAL-DE-MELLO, D. C. Chromosomal Mapping of Repetitive DNAs in the Grasshopper *Abraxis flavolineata* Reveal Possible Ancestry of the B Chromosome and H3 Histone Spreading. *Plos One*, v. 8, n. 6, 2013.
- BUTCHER, S. E. The spliceosome as ribozyme hypothesis takes a second step. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, v. 106, p. 12211–12212, 2009.
- CABRAL-DE-MELLO, D. C. **Organização cromossômica de elementos repetitivos de DNA em representantes da subfamília Scarabaeninae (Coleoptera: Scarabaeidae)**. Tese (Doutorado em Genética). Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 202 p., 2011.
- CABRAL-DE-MELLO; D. C.; VALENTE; G. T.; NAKAJIMA, R. T.; MARTINS, C. Genomic organizations and comparative chromosome mapping of the U1 snRNA gene in cichlid fish, with an emphasis in *Oreochromis niloticus*. *Chromosome Research*, v. 20, p. 279-292, 2012.
- CARD, C. O.; MORRIS, G. F.; BROWN, D. T.; MARZLUFF, W. F. Sea urchin small nuclear RNA genes are organized in distinct tandemly repeated units. *Nucleic Acids Research*, v. 10, p. 7677-7688, 1982.
- CAVALIER-SMITH, T. **The evolution of genome size**. Wiley, New Yor, 1985.

CHARLESWORTH, B.; SNLEGOWSKI, P.; STEPHAN, W. The evolutionary dynamics of repetitive DNA in eukaryotes. **Nature**, v. 371, p. 215-220, 1994.

CHENG, Y.; LUND, E.; KAHAN, B. W.; DAHLBERG, J. E. Control of mouse U1 snRNA gene expression. During in vitro differentiation of mouse embryonic stem cells. **Nucleic Acids Research**, v. 25, p. 2197-2204, 1997.

CIOFFI, M. B.; BERTOLLO, L. A.; CAMACHO, J. P. M. Repetitive DNAs and differentiation on sex chromosomes in Neotropical fishes. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 9, p. 188-194, 2010.

COLLINS, C. A.; GUTHRIE, C. The question remains: Is the spliceosome a ribozyme? **Nature Structural Biology**, v. 7, p. 850-854, 2000.

DAHLBERG, J. E.; LUND, E. The genes and transcription of the major small nuclear RNAs. In: BIRNSTIEL, M. L. **Small Nuclear Ribonucleoprotein Particles**. New York: Springer-Verlag, 1988. p. 38-70.

DEININGER, P. L.; BATZER, M. A.; HUTCHINSON, C.; EDGELL, M. H. Master genes in mammalian repetitive DNA amplification. **TRENDS in Genetics**, v. 8, p. 307-311, 1992.

DI RIENZO, A.; PETERSON, A. C.; GARZA, J. C.; VALDES, A. M.; SLATKIN, M.; FREIMER, N. B. Mutational processes of simple-sequence repeat loci in human populations. **Proceeding of the National Academy of Sciences USA**, v. 91, p. 3166-3170, 1994.

FARAH, S. B. Decifrando o genoma humano. In: **DNA Segredos e Mistérios**. 2007

FERREIRA, D. C.; OLIVEIRA, C.; FORESTI, F. A new dispersal element in the genome of the catfish *Hisonotus leucofrenatus* (Teleostei: Siluriformes: Hypoptopomatinae). **Mobile Genetic Elements**, v. 1, n. 2, p. 103-106, 2011b.

FERREIRA, D. C.; OLIVEIRA, C.; FOREST, F. Chromosome mapping of retrotransposable elements Rex 1 and Rex 3 in three fish species in the subfamily Hypoptopomatinae (Teleostei, Siluriformes, Loricariidae). **Cytogenetic and Genome Research**, v. 132, p. 64-70, 2011a.

FERREIRA, D. C.; PORTO-FORESTI, F.; OLIVEIRA, C.; FORESTI, F. Transposable elements as a potential source for understanding the fish genome. **Mobile Genetic Elements**, v. 1, n. 2, p. 112-117, 2011c.

FORBES, D. J.; KIRSCHNER, M. W.; CAPUT, D.; DAHLBERG, J. E.; LUND, E. Differential expression of multiple U1 small nuclear RNAs in oocytes and embryos of *Xenopus laevis*. **Cell**, v. 38, p. 681-689, 1984.

FORESTI, F.; OLIVEIRA, C.; ALMEIDA-TOLEDO, L. F. A method for chromosome preparations from large specimens of fishes using in vitro short treatment with colchicine. **Experientia**, v. 49, p. 810-813, 1993.

GALETTI, P. M.; LIMA, N. R. W.; VÊNERE, P. C. A monophyletic ZW sex chromosome system in Leporinus (Anostomidae, Characiformes). **Cytologia**, v. 60, p. 375-382, 1995.

GARAVELLO, J. C.; BRITSKY, H. A. Family Anostomidae. In REIS, R. S.; KULLANDER, C. J.; FERREARIS JR (Org): **Check List of the Freshwater Fishes of South and Central America**. 1^a ed. Porto Alegre: Editora da PUCRS, 2003.

GÉRY, J. **Characoids of the world**. T.F.H. Publications, Inc. 672 p. 1977.

GORDON, P. M.; SONTHEIMER, E. J.; PICCIRILLI, J. A. Metal ion catalysis during the exon-ligation step of nuclear pre-mRNA splicing: extending the parallels between the spliceosome and group II introns. **RNA**, v. 6, p. 199-205, 2000.

HASHIMOTO, D. T.; PARISE-MALTEMPI, P. P.; LAUDICINA, A.; BORTOLOZZI, J.; SENHORINI, J. A.; FORESTI, F.; PORTO-FORESTI, F. Repetitive DNA probe linked to sex chromosomes in hybrids between Neotropical fish *Leporinus macrocephalus* and *Leporinus elongatus* (Characiformes, Anostomidae). **Cytogenetics and Genome Research**, v. 124, p. 151-157. 2009.

HUTTENHOFER, A.; SCHATTNER, P.; POLACEK, N. Non-coding RNAs: hope or hype? **Trends Genetics**, v. 21, p. 289-297, 2006.

JABS, E. W.; GOBLE, C. A.; CUTTING, G. R. Macromolecular organization of human centromeric regions reveals high-frequency, polymorphic macro DNA repeats. **Proceeding of the National Academy of Sciences USA**, v. 86, p. 201-206, 1989.

JEFFREYS, A. J.; TAMAKI, K.; MACLEOD, A.; MONCKTON, D. G.; NEIL, D. L.; ARMOUR, J. A. L. Complex gene conversion events in germline mutation at human minisatellites. **Nature Genetics**, v. 19, p. 136-145, 1994.

KAZAZIAN, H. H.; MORAN, J. V. The impact of L1 retrotransposons on the human genome. **Nature Genetics**, v. 19, p. 49-63, 2002.

KEATING, K. S.; TOOR, N.; PERLMAN, P. S.; PYLE, A. M. A structural analysis of the group II intron active site and implications for the spliceosome. **RNA**, v. 16, p. 1-9, 2010.

KIDWELL, M. G. Transposable elements and the evolution of the genome size in eukaryotes. **Genetica**, v. 115, p. 49-63, 2002.

KIDWELL, M.; LISCH, D. **Transposable elements as sources of genomic variation**. Mobile DNA II, Cap. 4, pp. 59-90, 2002.

KONARSKA, M. M.; SHARP, P. A. Electrophoretic separation of complexes involved in the splicing of precursors to mRNAs. **Cell**, v. 46, p. 845-855, 1986.

LANDER, E. S. et al., INTERNATIONAL HUMAN GENOME SEQUENCING CONSORTIUM. Initial sequencing and analysis of the human genome. **Nature**, v. 409, p. 860-921, 2001.

LIAO, D. Concerted evolution: molecular mechanism and biological implications. **American Journal of Human Genetics**, v. 64, p. 24-30, 1999.

LIAO, D.; WEINER, A. M. Concerted evolution of the tandemly repeated genes encoding primate U2 small nuclear RNA (the RNU2 locus) does not prevent rapid diversification of the

(CT)_n - (GA)_n microsatellite embedded within the U2 repeat unit. **Genomics**, v. 30, p. 583–593, 1995.

LINDGREN, V.; ARES, M.; WEINER, A. M.; FRANCKE, U. Human genes for U2 small nuclear RNA map to a major adenovirus 12 modification site on chromosome 17. **Nature**, v. 314, p. 115-116, 1985.

LIU, J-L.; GALL, J. G. U bodies are cytoplasmic structures that contain uridine-rich small nuclear ribonucleoproteins and associate with P bodies. **PNAS**, v. 104, p. 11655-11659, 2007.

LIU, Z.; LI, P.; KOCABAS, A.; KARSI, A.; JU, Z. Microsatellite containing genes from the channel catfish brain: evidence of trinucleotide repeat expansion in the coding region of nucleotide excision repair gene RAD23B. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 289, p. 317-324, 2001.

LONG, E. O.; DAVID, I. D. Repeated genes in eukaryotes. **Annual Review of Biochemistry**, v. 49, p. 727-764, 1980.

LO, P. C.; MOUNT, S. M. Drosophila melanogaster genes for U1 snRNA variants and their expression development. **Nucleic Acids Research**, v. 18, p. 6971-6979, 1990.

LUND, E.; BOSTOCK, C.; ROBERTSON, M.; CHRISTIE, S.; MITCHEN, J. L., DAHLBERG, J. E. U1 small nuclear RNA genes are located on human chromosome 1 and are expressed in mouse-human hybrid cells. **Molecular Cellular Biology**, v.3, p. 2211-2220, 1983.

LUND, E.; DAHLBERG, J. E. True genes for human U1 small nuclear RNA. Copy number, polymorphism, and methylation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 259, p. 2013–2021, 1984.

LUND, E.; KAHAN, B.; DAHLBERG, J. E. Differential control of the U1 small nuclear RNA expression. During mouse development, **Science**, v. 229, p. 1271-1274, 1985.

LUND, E.; NESBITT, M. N. The embryonic and adult mouse U1 snRNA genes map to different chromosomal loci. **Som Cell Mol Genet**, v. 14, p. 143-148, 1988.

MADHANI, H. D.; GUTHRIE, C. A novel base-pairing interaction between U2 and U6 snRNAs suggests a mechanism for the catalytic activation of the spliceosome. **Cell**, v. 71, p. 803-817, 1992.

MANCHADO, M.; ZUASTI, E.; CROSS, I.; MERLO, A.; INFANTE, C.; REBORDINOS, L. Molecular characterization and chromosomal mapping of the 5S rRNA gene in *Solea senegalensis*: a new linkage to the U1, U2, and U5 small nuclear RNA genes. **Genome**, v. 49, p. 79–86, 2006.

MANIATIS, T.; REED, R. Intron sequences involved in lariat formation during pre-mRNA splicing. **Cell Press**, v. 41, n. 1, p. 95-105, 1985.

MARTINEZ, L.; ALMAGRO, J. C.; COLL, J. L.; HERRERA, R. J. Sequence variability in the Fibroin-H intron of domesticated and wild silk moth. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 34, n.4, p. 343-352, 2004.

- MARTINS, C. Chromosomes and repetitive DNAs: a contribution to the knowledge of fish genome. In: PISANO, E.; OZOUF-COSTAZ, C.; FORESTI, F.; KAPOOR, B. G. (eds). **Fish Cytogenetics**, p. 421-453. Science Publisher Inc., Einfield, 2007.
- MARZLUFF, W. F.; BROWN, D. T.; LOBO, S.; WANG, S. Isolation and characterization of two mouse U1b small nuclear RNA genes. **Nucleic Acids Research**, v. 11, p. 6255-6270, 1983.
- MARZ, M.; KIRSTEN, T.; STADLER, P. F. Evolution of spliceosomal snRNA genes in metazoan animals. **Journal of Molecular Evolution**, v. 7, p. 594-607, 2008.
- MATERA, A. G.; TERNS, R. M.; TERNS, M. P. Non-coding RNAs: lessons from the small nuclear and small nucleolar RNAs. **Molecular Cell Biology**, v. 8, p. 209-220, 2007.
- MATERA, A. G.; WEINER, A. M.; SCHMID, C. W. Structure and evolution of the U2 small nuclear RNA multigene family in primates: gene amplification under natural selection? **Molecular Cell Biology**, v. 10, p. 5876-5882, 1990.
- MATTAJ, I. W.; TOLLERVEY, D.; SÉRAPHIN, B. Small nuclear RNAs in messenger RNA and ribosomal RNA processing. **FASEB J.**, v. 7, p. 47-53, 1993.
- MATTAJ, I. W.; ZELLER, R. *Xenopus laevis* U2 snRNA genes: tandemly repeated transcription units sharing 5' and 3' flanking homology with other RNA polymerase II transcribed genes. **EMBO Journal**, v. 2, p. 1883-1891, 1983.
- MERLO, A.; CROSS, I.; PALAZÓN, J. L.; SARASQUETE, C.; REBORDINOS, L. Chromosomal mapping of the major and minor ribosomal genes, (GATA)_n and (TTAGGG)_n by one-color and double-color FISH in toadfish *Halobatrachus didactylus* (Teleostei: Batrachoididae). **Genetica**, v. 131, p. 195-200, 2007.
- MERLO, M. A.; CROSS, I.; CHAIRI, H.; MANCHADO, M.; REBORDINOS, L. Analysis of three multigene families as useful tools in species characterization of two closely-related species, *Dicentrarchus labrax*, *Dicentrarchus punctatus* and their hybrids. **Genes and Genetic System**, v. 85, p. 341-349, 2010.
- NEI, M.; ROONEY, A. P. Concerted and birth-and-death evolution of multigene families. **Annual Review of Genetics**, v.39, p. 121-152, 2005.
- NILSEN, T. W. The spliceosome: the most complex macromolecular machine in the cell? **Bioessays**, v. 25, p. 1147-1149, 2003.
- NOJIMA, H.; KORNBERG, R. D. Genes and pseudogenes for mouse U1 and U2 small nuclear RNAs. **Journal of Biological Chemistry**, v. 258, p. 8151-8155, 1983.
- NOWAK, R. Mining treasures from "junk DNA". **Science**, v. 263, p. 608-610, 1994.
- PADGETT, R. A.; KONARSKA, M. M.; GRABOWSKI, P. J.; HARDY, S. F.; SHARP, P. A. Lariat RNAs as intermediates and products in the splicing of Messenger RNA precursors. **Science**, p.225, p. 898-903, 1984.

PALACIOS-GIMENEZ, O. M.; CASTILLO, E. R.; MARTÍ, D. A.; CABRAL-DE-MELLO, D. C. Tracking the evolution of sex chromosome systems in Melapoplinae grasshoppers through chromosomal mapping of repetitive DNA sequences. **BMC Evolutionary Biology**, v. 13, p. 167, 2013.

PARISE-MALTEMPI, P. P.; MARTINS, C.; OLIVEIRA, C.; FORESTI, F. Identification of a new repetitive element in the sex chromosomes of *Leporinus elongatus* (Teleostei: Characiformes: Anostomidae): new insights for the sex chromosome in *Leporinus*. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 116, p. 218-223, 2007.

PARKER, R.; SICILIANO, P. G.; GUTHRIE, C. Recognition of the TACTAAC box during mRNA splicing in yeast involves base pairing to the UP-like snRNA, **Cell**, v. 49, p. 229-239, 1987.

PELLICCIA, F.; BARZOTTI, R.; BUCCIARELLI, E.; ROCCHI, A. 5S ribosomal and U1 small nuclear RNA genes: a new linkage type in the genome of a crustacean that has three different tandemly repeated units containing 5S ribosomal DNA sequences. **Genome**, v. 44, p. 331-335, 2001.

PEREIRA-SIMON, S.; SIERRA-MONTES, J. M.; AYESH, K.; MARTINEZ, L.; SOCORRO, A; HERRERA, R. J. Variants of U1 small nuclear RNA assemble into spliceosomal complexes. **Insect Molecular Biology**, v. 13, p. 189-194, 2004.

PIKIELNY, C. W.; RYMOND, B. C.; ROSBASH, M. Electrophoresis of ribonucleoproteins reveals an ordered assembly pathway of yeast splicing complexes. **Nature**, v. 324, p. 341-345, 1986.

RUSKIN, B.; GREENE, J. M.; GREEN, M. R. Cryptic branch point activation allows accurate in vitro splicing of human β -globin intron mutants. **Cell**, v. 41, p. 833-844, 1985;

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D. W. In: _____. **Molecular cloning**; A laboratory manual. 3^a ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.

SASHITAL, D. G.; VENDITTI, V.; ANGERS, C. G., et al. **RNA**, v. 13, p. 328-338, 2007.

SÉRAPHIN, B.; ROSBASH, M. Mutational analysis of the interactions between U1 small nuclear RNA and pre-mRNA of yeast. **Gene**, v. 82, p. 145-151, 1989.

SHUSTER, E. O.; GUTHRIE, C. Two conserved domains of yeast U2 snRNA are separated by 945 nonessential nucleotides. **Cell**, v. 55, p. 41-48, 1988.

SIERRA-MONTES, J. M.; PEREIRA-SIMON, S.; FREUND, A. V.; RUIZ, L. M.; SZMULEWICS, M. N.; HERRERA, R. J. A diversity of U1 small nuclear RNAs in the silk moth *Bombyx mori*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 33, p. 29-39, 2003.

SILVA, E. L.; BUSSO, A. F.; PARISE-MALTEMPI, P. P. Characterization and genome organization of a repetitive elemento associated with the nucleolus organizer region in *Leporinus elongatus* (Anostomidae: Characiformes). **Cytogenetics and Genome Research**, v. 139, p. 22-28, 2013.

ÚBEDA-MANZANARO, M.; MERLO, M. A.; PALAZÓN, J. L.; CROSS, I.; SARASQUETE, C.; REBORDINOS, L. Chromosomal mapping of the major and minor ribosomal genes, (GATA)_n and U2 snRNA gene by double-colour FISH in species of the Batrachoididae family. **Genetica**, v. 138, p. 787-794, 2010.

VALADKHAN, S.; MANLEY, J. L. Characterization of the catalytic activity of U2 and U6 snRNAs. **RNA**, v. 9, p. 892-904, 2003.

VALADKHAN, S.; MANLEY, J. L. Splicing-related catalysis by protein-free snRNAs. **Nature**, v. 413, p. 701-707, 2001

VALADKHAN, S.; MOHAMMADI, A.; JALADAT, Y.; GEISLER, S. Protein-free small nuclear RNAs catalyze a two-step splicing reaction. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 106, p. 11901–11906, 2009.

VALADKHAN, S. snRNAs as the catalysis of pre-mRNA splicing. *Curr. Op. Chem. Biol.*, v. 9, p. 603-608, 2005.

VAN ARSDELL, S. W.; WEINER, A. M. Human genes for U2 small nuclear RNA are tandemly repeated. **Mol Cell Biol**, v. 4, n. 3, p. 492-499, 1984.

VILLA, T.; PLEISS, J. A.; GUTHRIE, C. Spliceosomal snRNAs: Mg²⁺ Dependent Chemistry at the Catalytic Core? **Cell**, v. 109, p. 149-152, 2002.

VOLFF, J-N.; KORTING, C.; SCHARTL, M. Multiple lineages of the non-LTR retrotransposon Rex1 with varying success in invading fish genomes. **Molecular Biology and Evolution**, v. 17, n. 11, p. 1673-1684, 2000.

VOLFF, J-N.; BOUNEAU, L. M.; OZOUF-COSTAZ, C.; FISCHER, C. Diversity of retrotransposable elements in compact pufferfish genomes. **TRENDS in Genetics**, v. 19, n. 12, p. 674-678, 2003.

WATANABE-NAGASU, N. Y; ITOH, T.; TANI, T.; OKANO, K.; KOGA, N.; OKADA, N.; OHSHIMA, Y. Structural analysis of gene *loci* for rat U1 small nuclear RNA. **Nucleic Acids Research**, v. 11, p. 1791-1801, 1983.

WEVRICK, R.; WILLARD, H. F. Long-range organization of the tandem arrays of alpha satellite DNA at the centromeres of human chromosomes: high-frequency array-length polymorphism and meiotic stability. **Proceeding of the National Academy of Sciences USA**, v. 86, p. 9394-9398, 1989.

WILL, C. L.; LUHRMANN, R. **In the RNA World**, 3^a ed. (eds GESTELAND, R. F.; CECH, T. R.; ATKINS, A. J.). Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, 2006, p. 369-400.

WISE, J. A.; WEINER, A. M. *Dictyostelium* small nuclear RNA D2 is homologous to rat nucleolar RNA U3 and is encoded by a dispersed multigene family. **Cell**, v. 22, p. 109-118, 1980.

ZHANG, D.; ROSBASH, M. Identification of eight proteins that cross-link to pre-mRNA in the yeast commitment complex. **Genes Dev.**, v. 13, p. 581-592, 1999.

JÚLIA CHAGAS PONZIO

**ESTUDO DA ORGANIZAÇÃO GENÔMICA E LOCALIZAÇÃO
CROMOSSÔMICA DO GENE snRNA U1 EM PEIXES DO GÊNERO
*Leporinus***

Orientadora: Patricia Pasquali Parise Maltempi

Co-orientador: Diovani Piscor

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao
Instituto de Biociências da Universidade Estadual
Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - Campus de Rio
Claro, para obtenção do grau de Bacharela em
Ciências Biológicas

Rio Claro

2013