

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOLOGIA MOLECULAR

**ESTUDO DA MOBILIZAÇÃO DE TRANSPOSONS ATRAVÉS DE
TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA**

MARÍNDIA DEPRÁ

Dissertação submetida ao Programa de
Pós-Graduação em Genética e Biologia
Molecular da UFRGS como requisito
parcial para obtenção do grau de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Elgion Lúcio da Silva Loreto

Co-orientadora: Prof (a). Dra. Vera Lúcia da Silva Valente

Porto Alegre, Março de 2005.

Este trabalho foi realizado no laboratório de *Drosophila* do Departamento de Genética da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e no laboratório de *Drosophila* do Departamento de Biologia da Universidade Federal de Santa Maria, com recursos da CAPES, FAPERGS, e CNPq.

AGRADECIMENTOS

Agradeço...

Ao Prof. Dr. Elgion Lúcio da Silva Loreto, pela oportunidade de iniciação científica, pela orientação constante, por ser um exemplo profissional.

À Prof. Dra. Vera Lúcia da Silva Valente, pela orientação, pelo suporte material para a realização deste trabalho, pelo incentivo e carinho dedicados durante esta etapa.

Aos colegas do eterno LabDros, que sempre fizeram deste local uma segunda casa para mim; ao Paulo Marcos Pinto, Ronaldo M. Golombieski, Lizandra J. Robe, Daniel Graichen, Adriana Ludwig, Newton Vidal e Marcos O. de Carvalho, meus grandes amigos.

À Lenira, cuja participação foi essencial à minha formação.

Aos colegas do “novo” Laboratório de *Drosophila*: Adri, Ana, Claudinha, Fabiano, Grazia, Hermes, Jonas, Juliana, Liz, Luís, Marco, Marcos, Marícia, Mônica, Ronaldo, Rosane, Sabrina e Tiago; e aos agregados: Andrés e Martín – todos vocês, de uma forma ou de outra, contribuíram para a realização deste trabalho.

Aos colegas da Imuno e da Vegetal, por estarem sempre dispostos a dar uma força necessária em muitas horas, novamente ao Andrés, à Milena e à Raquel.

Ao Daniel, Ana Arend e Raquel, importantes colegas de bancada.

À Ana Paula, Renata, Louise, Flavinha, pela amizade, parceria, compreensão, e por esse grande coleguismo.

Aos funcionários do Laboratório de *Drosophila*, Dani, Berê e Marcelo, e também à Helena, pelo grande auxílio.

Aos Professores do Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, especialmente à Prof. Sídia Callegari-Jacques, pela ajuda nas análises estatísticas, primordiais para este trabalho.

Ao Elmo e à Elen, por serem o ombro amigo de todos os momentos.

Aos meus amigos erechinenses, por me fazerem esquecer por alguns instantes das tensões inerentes a esta etapa da minha formação.

À Lú, por ser uma amiga sempre presente e disponível, mesmo estando longe.

À minha família Deprá, Floriani e Balen, pela confiança depositada, pelo amor, conforto, segurança e alegria que sempre me proporcionaram.

Ao Tiago pelo carinho, amor, paciência, compreensão, auxílio, enfim, por tudo...

E a todos que contribuíram de forma direta ou indireta para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

RESUMO	6
ABSTRACT	9
I. INTRODUÇÃO	11
I.2. ELEMENTOS TRANSPONÍVEIS	11
I.3. CLASSIFICAÇÃO DOS TES	13
I.4. DINÂMICA DOS ELEMENTOS TRANSPONÍVEIS	14
I.5. IMPLICAÇÕES EVOLUTIVAS DOS ELEMENTOS TRANSPONÍVEIS	15
I.6. MOBILIZAÇÃO DE TRANSPOSONS	17
I.7. O ELEMENTO TRANSPONÍVEL <i>HOBO</i>	19
I.8. O ELEMENTO TRANSPONÍVEL <i>PIGGYBAC</i>	23
I.9. O ELEMENTO <i>HOBO</i> EM <i>D. SIMULANS</i> E HIPERMUTABILIDADE	23
I.10. TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA ATRAVÉS DE MICROINJEÇÃO MEDIADA POR TRANSPOSONS	26
II. OBJETIVOS	29
II.1. OBJETIVO GERAL	29
II.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	29
III. MATERIAIS E MÉTODOS	30
III.1. LINHAGENS DE <i>DROSOPHILA</i> UTILIZADAS	30
III.2. MANUTENÇÃO DOS ESTOQUES	30
III.3. MICROINJEÇÃO.....	31
III.4. VETORES UTILIZADOS	31
III.5. ANÁLISE DOS INDIVÍDUOS MICROINJETADOS E DESCENDENTES	32
III.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	34
III.7. EXTRAÇÃO DE DNA	34
III.8. SONDA.....	35
III.9. SOUTHERN BLOT	36
IV. RESULTADOS	38
IV.1. ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS INDIVÍDUOS MICROINJETADOS E SEUS DESCENDENTES.....	40
IV.1.1 EMBRIÕES DE <i>DROSOPHILA SIMULANS DPP-LIKE</i> INJETADOS COM PHFL1	40
IV.1.2 EMBRIÕES DE <i>DROSOPHILA SIMULANS DPP-LIKE</i> INJETADOS COM BLUESCRIPT	44
IV.1.3 EMBRIÕES DE <i>DROSOPHILA SIMULANS WHITE</i> INJETADOS COM PHFL1	45
IV.1.4 EMBRIÕES DE <i>DROSOPHILA SIMULANS WHITE</i> INJETADOS COM BLUESCRIPT	46
IV.2. ANÁLISE ESTATÍSTICA	48
IV.3. ANÁLISE MOLECULAR	53
V. DISCUSSÃO	59
VI. CONCLUSÃO	66
VII. PERSPECTIVAS	67
VIII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	68

RESUMO

A mobilização dos elementos de transposição (TEs) está sujeita a um conjunto complexo de mecanismos regulatórios que envolvem não apenas proteínas codificadas pelos próprios transposons, mas também pela célula hospedeira. Entretanto, até o momento, se conhece pouco sobre os fatores que levam à mobilização de TEs nos genomas hospedeiros. De uma maneira geral, fatores que expõem um organismo a situações de estresse levam à mobilização de transposons. Em função disso, propomos a adaptação, a nossas condições de laboratório, de uma metodologia de transformação genética para ser utilizada como ferramenta, na tentativa de contribuir na elucidação dos mecanismos de mobilização do elemento transponível *hobo*.

Para o estabelecimento desta metodologia utilizamos como ferramentas um microscópio óptico binocular e um micromanipulador adaptado LEITZ. Neste micromanipulador foi acoplado um sistema de compressão a ar, composto por uma seringa de vidro de 20 ml e um dispositivo para infusão endovenosa (butterfly), onde é encaixada uma ponteira de micropipeta. Na ponteira, foi colada, com adesivo instantâneo, uma agulha feita a partir de capilares de vidro. O processo de microinjeção ocorreu em uma lâmina de microscopia contendo uma fita adesiva dupla-face que serve de suporte para os ovos a serem injetados. Com o auxílio de uma agulha histológica, ovos do mutante *white* de *Drosophila simulans*, previamente desidratados, foram decorionados manualmente e colocados enfileirados sobre este suporte para evitar deslocamentos durante a injeção. Posteriormente, os embriões foram imersos em “óleo de halocarbono”, e, em seguida, foi realizada a microinjeção de DNA. Para esta etapa do trabalho foram testados vários vetores de transformação, sendo mais eficaz o elemento transponível *piggyBac*, com o vetor pBac[3xp3-GFPafm], o qual possui um promotor que conduz uma forte expressão da

proteína GFP (*Green Fluorescent Protein*) em tecidos do olho de moscas adultas, o que, sob luz *laser* azul, fluoresce com uma intensa cor verde. Com este vetor conseguimos a detecção de transformantes, e a comprovação da eficiência da metodologia estabelecida.

A segunda etapa do trabalho teve como objetivo estudar a mobilização do transposon *hobo* por meio de microinjeção de DNA. Para isso foram utilizados os mutantes *white*, cuja mutação é causada pela inserção do elemento *hobo* “relic” (*hobo*^{VA}) neste gene, e *dpp-like* de *D. simulans*. Como vetor de transformação foram utilizados, independentemente, os plasmídeos pHFL1 (*hobo* canônico), e BlueScript como controle. Os adultos microinjetados sobreviventes (G₀) foram individualmente cruzados com outro da mesma linhagem, e, a partir deste cruzamento, foram estabelecidas cinco isolinhagens de cada G₀ acompanhadas até a 3^a geração. Todos os indivíduos foram analisados quanto ao fenótipo, para possíveis eventos de reversão de mutação, e alguns, analisados molecularmente por Southern Blot.

Foram observadas diversas alterações morfológicas, essencialmente nas asas, tanto em G₀ como em seus descendentes. Na linhagem *dpp-like* foram observados eventos de reversão ao fenótipo selvagem, porém, essa característica não foi transmitida à descendência, indicando ausência de mobilização do elemento *hobo*, pelo menos em células germinativas. Para o mutante *white*, nenhum processo de reversão foi observado, sendo o número de indivíduos com alteração de asas menos pronunciado. No entanto, foi possível isolar uma nova isolinhagem *dpp-like*, provavelmente fruto de uma inserção *de novo* no gene *dpp*. Na análise molecular foi detectada a mobilização do elemento *hobo* em duas isolinhagens de *dpp-like* de um total de 27 isolinhagens analisadas, sugerindo uma taxa de mobilização do *hobo* canônico de 7,4%. Entretanto, não foi possível observar a mobilização de *hobo*^{VA} através da reversão das mutações *white* e *dpp-like*. Isso mostra que

a taxa de mobilização desse elemento deve ser inferior à do *hobo* canônico, e sugere que deve haver um mecanismo de regulação de transposição em *hobo*.

ABSTRACT

Transposable elements (TEs) mobilization depends on complex regulatory mechanisms that involve not only proteins codified by the transposons themselves, but also by the host cell. However, until the present, the factors that lead to the TEs mobilization in the host genomes are not well-known. Generally, factors that expose an organism to stress conditions lead to transposon mobilization. Therefore, we propose the adaptation of a transformation methodology to our laboratorial conditions, in order to investigate the mobilization mechanism of the *hobo* transposable element.

To devise this methodology two tools were used: a binocular optic microscope and an adapted LEITZ micromanipulator. An air compression system comprising a 20 ml glass syringe and an intra-venous injection “butterfly” tube attached to a micro-pipette tip was coupled to the micromanipulator. A needle made of glass capillary tube was glued with instant adhesive to the micro-pipette tip. The micro-injection process was performed by using a microscope slide containing a double side adhesive band which served as support to the eggs to be injected. Aided by a histological needle, *white* mutant *Drosophila simulans* eggs, previously de-hydrated, were manually decorionied and lined up upon this support to avoid moving during the injection. After this step, the embryos were immersed in “halocarbon oil” and the DNA micro-injection was performed. In this part of the work several transformation vectors were tested, and the most efficient transposable element was the *piggyBac* with the pBac[3xp3-GFPafm] plasmid, which has a promoter that drives strong expression of the GFP (green fluorescent protein) in the eye-tissues of the adult flies; that fluoresce with a strong green color when exposed to blue laser light. With this

vector we achieved the detection of transformants, as well as the proofing of the efficiency of the established methodology.

The second step of the work was focused on the study of the *hobo* transposon mobilization by means of DNA microinjection. For this, *white* mutants, whose mutation is caused by the insertion of the *hobo* “relic” element (*hobo*^{VA}) in this gene, and *dpp-like* of *D. simulans*, were used. The plasmids pHFL1 (canonical *hobo*) and BlueScript (control) were independently used as transformation vectors. The micro-injected adult survivors (G₀) were individually crossed with other from the same line. From this crossing five isolines from each G₀ were obtained and observed until the 3rd generation. All individuals phenotype were analyzed in order to detect possible mutation reversion events, and some of them were molecularly analyzed by Southern Blot. Several morphological alterations were observed, essentially in the wings of the G₀ individuals as well as in their descendents. In the *dpp-like* line, events of reversion to wild phenotype were observed, however this characteristic was not transmitted to the descendents, indicating the absence of *hobo* element mobilization in the germ-line. No reversion process was observed for the *white* mutant, and the number of individuals with wings alterations was less expressive. However it was possible to insulate a new *dpp-like* isoline probably resulting of *de novo* insertion in the *dpp* gene. The molecular analysis showed the *hobo* element mobilization in two *dpp-like* isolines in a total of 27, suggesting a *hobo* canonic mobilization tax of 7.4%. Nevertheless, it was not possible to observe the *hobo*^{VA} mobilization through *white* and *dpp-like* mutation reversion, showing that the mobilization tax of this element might be inferior to the canonic *hobo* and suggesting that may exist a regulatory mechanism of *hobo* transposition.

I. INTRODUÇÃO

A metodologia de transformação genética tem se tornado uma poderosa ferramenta para os mais diversos estudos, sendo aplicável em diversas áreas da Biologia. Por exemplo, permite a análise da função de genes que se expressam em células, tecidos ou em determinados estágios de desenvolvimento e a análise evolutiva de sistemas regulatórios do desenvolvimento. Também é aplicada para melhor entender a biologia de certas pragas agrícolas ou vetores de doença, e, até, para estudar doenças e auxiliar no desenvolvimento de tratamentos e vacinas (revisão em Wimmer, 2003). Em *Drosophila*, além das muitas aplicações citadas acima, a microinjeção de DNA vem possibilitando diversos estudos acerca dos elementos transponíveis. Alguns deles tentam esclarecer aspectos da evolução dos elementos, de sua atividade e também sua mobilidade (Ladeveze *et al.*, 1998; 2001). Outros, tratam dos mecanismos que regulam os elementos transponíveis (Handler & Gomez, 1995). Em função disso, através do presente trabalho, propomos o desenvolvimento da metodologia de transformação genética, e sua utilização como ferramenta, na tentativa de elucidar o mecanismo de mobilização do elemento transponível *hobo*.

I.2. ELEMENTOS TRANSPONÍVEIS

Os elementos transponíveis (TEs) são, geralmente, definidos como sequências de DNA que possuem a capacidade de mudar de posição dentro dos genomas hospedeiros. No entanto, esta definição tem recebido algumas críticas, uma vez que diversas sequências que não possuem essa capacidade também são consideradas elementos transponíveis. Uma

definição mais precisa para diferenciar transposons de outras seqüências de DNA medianamente repetitivas destaca que os TEs: a) promovem a duplicação do sítio de inserção; b) apresentam polimorfismos de sítios de inserção; e c) apresentam variabilidade no número de cópias dentro e/ou entre espécies. Esta definição de elementos transponíveis é baseada em critérios relacionados a sua estrutura, sua dinâmica dentro e entre espécies, e sua evolução (Capy *et al.*, 1998).

Os TEs foram descobertos na década de 40, no século passado, por Bárbara McClintock. Atualmente sabe-se que estes elementos são amplamente distribuídos no genoma de bactérias, plantas e animais. Há uma grande variação de uma espécie para outra no número de cópias, na distribuição e nos tipos de TEs existentes. Estima-se que os TEs fazem parte de mais de 50% do genoma do milho, e de cerca de 10 a 15% do genoma de *Drosophila* (Kidwell & Lisch, 2000). Em seus genomas hospedeiros, os transposons são fonte de mutações espontâneas, e podem promover importantes rearranjos cromossômicos, como deleções, inversões e translocações (Capy *et al.*, 1998).

No genoma de *Drosophila melanogaster*, Kaminker *et al.* (2002) identificaram cerca de 85 famílias de elementos transponíveis já conhecidas e 8 famílias até então desconhecidas, e cerca de dois terços destes elementos apresentam-se de forma parcial. Já no genoma humano, estima-se que cerca de 43% deste seja ocupado pelas quatro maiores classes de elementos repetitivos: 1) seqüências intercaladas curtas (SINES – do inglês, *short interspersed sequences*); 2) seqüências intercaladas longas (LINES – do inglês, *long interspersed sequences*); 3) elementos com longas repetições terminais (elementos com LTR); e 4) transposons, totalizando mais de 4,3 milhões de elementos repetitivos, sendo a família *Alu* e LINE1 as mais freqüentes (Li *et al.*, 2001).

I.3. CLASSIFICAÇÃO DOS TES

A classificação dos TEs baseia-se, principalmente, no mecanismo de transposição e na organização estrutural dos elementos. Os TEs são agrupados em classes, subclasses, superfamílias, famílias e subfamílias, segundo alguns critérios. As classes são subdivididas com base no mecanismo de transposição do elemento, e as subclasses com base na estrutura molecular dos seus produtos gênicos, ou seja, presença ou ausência de domínios e assinaturas. As superfamílias se caracterizam pela existência de domínios e assinaturas similares, enquanto que as famílias agregam elementos com motivos protéicos conservados e de 30% a 50% de similaridade nas seqüências de aminoácidos (Capy *et al.*, 1998). Existe, ainda, a classificação em subfamília que requer a existência de similaridade em seqüência, e entre 50% a 70% de similaridade dos aminoácidos (Capy *et al.*, 1998).

Segundo Finnegan (1989), os TEs podem ser divididos em duas grandes classes, com base no mecanismo utilizado para a transposição, e na organização estrutural do elemento. A Classe I contém os elementos que utilizam uma transcriptase reversa para se transporem via um intermediário de RNA. Essa classe inclui os retrotransposons com LTRs (longas repetições terminais), tendo como exemplo: *gypsy*, *Ty3*, *Tf1* e *Ty1-copia*; e, inclui também, os retrotransposons sem LTRs ou retroposons, exemplificados pelas superfamílias, LINEs e SINEs. A Classe II compreende os elementos que se transpõem diretamente de DNA a DNA, são mais precisamente chamados de transposons e usam uma enzima por eles codificada, chamada transposase. Estão incluídos na classe II as superfamílias *mariner*-Tc1, ISa, ISb, *hAT*, *P*, *MuDR*, *CACTA* e *Tx*. Esses elementos de classe II podem se excisar precisamente do sítio original e se inserir em um novo local no genoma, podendo, até mesmo, reverter mutações originalmente causadas pela sua inserção.

Elementos de Classe II são encontrados tanto em procariontes quanto em eucariontes, enquanto que os retrotransposons parecem estar restritos aos eucariontes.

Outra característica importante dos TEs é que muitas famílias apresentam elementos autônomos e não-autônomos (ou defectivos). Enquanto os elementos autônomos codificam a(s) enzima(s) necessária(s) para sua própria transposição, os elementos não-autônomos perderam essa capacidade e usualmente dependem de um elemento autônomo ou de uma família que possa fornecer estas enzimas *in trans* (Kidwell & Lisch, 1997). Os elementos defectivos frequentemente exibem deleções em suas ORFs ou suas repetições terminais, as quais são necessárias para a transposição.

I.4. DINÂMICA DOS ELEMENTOS TRANSPONÍVEIS

Os elementos transponíveis detectados no genoma de uma espécie podem ter duas possíveis origens. Eles podem ser derivados de cópias presentes em uma espécie ancestral por transmissão vertical, ou podem ser oriundos de uma espécie distantemente relacionada, através de transferência horizontal (Capy *et al.*, 1998). Ainda, uma família de elementos móveis pode se originar em uma espécie *de novo* por eventos de mutação e de recombinação, que alteram ou reorganizam seqüências já presentes no genoma (Finnegan, 1985). O ciclo de vida de um elemento em qualquer linhagem filogenética pode, aparentemente, prolongar-se por muitas centenas ou milhões de anos, e pode ser considerado como uma sucessão de três fases: replicação dinâmica, inativação e degradação (revisão em Kidwell & Lisch, 1997; Brookfield, 2005).

O primeiro passo na introdução de um TE em um genoma é o estabelecimento de uma fase invasora. A partir do momento que uma seqüência se insere em um novo genoma, o número de cópias tende a aumentar, sendo o número final dependente de algumas características do genoma hospedeiro. A interação estabelecida entre elemento e genoma hospedeiro define a sobrevivência de ambos. A taxa na qual este fenômeno ocorre depende de vários fatores que regulam a transposição do elemento, como a sua capacidade de invasão, as características do genoma hospedeiro, fatores ambientais e a interação de todos esses fatores. A segunda fase da vida de um TE é caracterizada por sua inativação, e depende, em grande parte, do impacto do elemento sobre o valor adaptativo do hospedeiro. Finalmente, um estágio de senescência se estende possivelmente por milhões de anos. Neste estágio, todos os elementos autônomos são perdidos, não ocorre aumento do número de cópias, e as seqüências não-autônomas são perdidas, deletadas ou divergem (Pinsker *et al.*, 2001; Brookfield, 2005).

I.5. IMPLICAÇÕES EVOLUTIVAS DOS ELEMENTOS TRANSPONÍVEIS

Associadas à sua ubiquidade e abundância, algumas conseqüências biológicas decorrentes do modo de ação dos TEs podem ter profundas implicações evolutivas. Estes elementos são apontados como um mecanismo gerador de variabilidade, provável sistema gerador de isolamento reprodutivo e de transmissão horizontal de informação genética entre espécies (revisões em Kidwell, 1992; Cummings, 1994).

Os TEs utilizam-se de um mecanismo chamado de transposição, que nada mais é do que uma reação de recombinação que intermedia o movimento desses segmentos de

DNA entre sítios não homólogos. Uma vez que são elementos móveis, eles têm a capacidade de mudar informações genéticas do hospedeiro, alterando a estrutura dos cromossomos ou a organização dos genes (Craig, 2002).

Os tipos de variabilidades genéticas causadas pela atividade dos TEs, dependem muito da região onde se inserem. As alterações causadas incluem: 1) alterações gênicas estruturais, 2) modificação na expressão gênica, 3) rearranjos cromossômicos, 4) aumento da taxa de mutação, 5) transformação de um segmento de DNA imóvel em móvel, e até 6) a aquisição de novas funções – domesticação (revisão em Kidwell & Lisch, 2002).

Em *Drosophila*, uma série de mutações nulas no loco *white* levou à descoberta do elemento *P* como agente causal da disgenesia gonadal P-M (Rubin *et al.*, 1982). Já a inserção de *gypsy* na região regulatória 5' do gene *yellow* em *Drosophila* causou a perda de expressão desse gene em tecidos específicos (Geyer *et al.*, 1986). Múltiplas cópias de um elemento podem, também, atuar como substrato para recombinação homóloga, o que pode levar a alterações na estrutura e atividade do genoma (Craig 2002). Também em *Drosophila*, Mackay *et al.* (1992), demonstraram que a variabilidade quantitativa para o número de cerdas está relacionada ao movimento de elementos da família *P*.

Análises de vários TEs têm mostrado que suas distribuições entre espécies não seguem a filogenia das espécies hospedeiras. A distribuição de um dado TE entre várias espécies frequentemente apresenta lacunas e, algumas vezes, uma espécie mais distantemente relacionada contém o elemento, enquanto outra espécie proximamente relacionada não o possui. Além disso, elementos encontrados em espécies que pertencem a diferentes gêneros, famílias, ordens e até mesmo classes, podem ser, algumas vezes, muito similares. Estas “incongruências filogenéticas” são frequentemente devidas à transferência horizontal, hibridação entre espécies ou polimorfismo ancestral (Kidwell & Lisch, 1997).

I.6. MOBILIZAÇÃO DE TRANSPOSONS

A mobilização dos transposons está sujeita a um conjunto complexo de mecanismos regulatórios que envolvem, não apenas proteínas codificadas pelos próprios transposons, mas, também, pela célula hospedeira, além de fatores ambientais. Muitas vezes, os próprios transposons têm, em si mesmos, funções que regulam sua frequência de transposição. Parece lógico que hajam mecanismos para conter a mobilização indiscriminada dos elementos de transposição, caso contrário eles poderiam passar a inserir-se descontroladamente em diversas posições do genoma, interrompendo o funcionamento de um número cada vez maior de genes necessários à atividade da célula; ou provocando uma quantidade de rearranjos estruturais (como perdas de DNA, fusões de moléculas, inversões, duplicações e translocações) tão grande que não seria suportável. Desta forma, ao evitar um excesso de danos genéticos, os elementos transponíveis parecem buscar um equilíbrio entre a sua “sobrevivência” e a sobrevivência da célula da qual dependem. A frequência de transposição, bem como os mecanismos reguladores empregados, são muito variáveis, dependendo do elemento (ou família de elementos) em questão e das condições fisiológicas das células hospedeiras. Em algumas situações, as transposições podem ser tão, ou mais, frequentes do que 10^{-3} por organismo; em outros casos, os elementos podem permanecer imobilizados por um longo período de tempo. De um modo geral, as inserções em genes específicos ocorrem num nível comparável ao da taxa de mutações espontâneas: de 10^{-5} a 10^{-7} por organismo (Fedoroff, 2002).

Alguns TEs podem produzir muitas mutações letais, podendo causar a sua extinção, bem como a de seu hospedeiro. Sequências móveis podem sobreviver em um

genoma somente se houver um equilíbrio no qual ambos os genomas adquiram alguma vantagem genética (Capy *et al.*, 1998).

Recentemente, um grande número de evidências têm sugerido que existem vários mecanismos de silenciamento dos TEs, como regulação transcricional, competição por sítio de ligação, inibição por múltiplas cópias, formação de complexos oligoméricos e outros mecanismos globais de repressão, tais como mutações em ponto repetidamente induzidas, e o mecanismo de interferência por RNA (Castro & Carareto, 2004). Estes mecanismos parecem ter surgido como respostas adaptativas ao aumento do número de cópias dos TEs nos genomas hospedeiros (McDonald, 1998; Hurst & Werren, 2001).

Entretanto, até o momento, se conhece pouco sobre os fatores que levam à mobilização de TEs nos genomas hospedeiros. De uma maneira geral, fatores que expõem um organismo a situações de estresses, como, por exemplo, choques de temperatura, substâncias tóxicas, ou estresses provocados em células em condições de cultivos de tecidos ou de células, podem levar à mobilização de transposons. Alguns trabalhos têm demonstrado uma modificação na expressão de alguns TEs em resposta ao estresse ambiental (Strand & McDonald, 1985).

Dos mecanismos que conduzem à mobilização de TEs, o melhor caracterizado é o fenômeno conhecido como disgenesia do híbrido. A disgenesia do híbrido resulta da mobilização de certos elementos transponíveis na F₁, resultante do cruzamento entre linhagens que possuem diferentes complementos dos elementos em seus genomas.

O termo “disgenesia do híbrido” foi primeiramente descrito em *Drosophila melanogaster* e associado ao elemento transponível *P* (Kidwell & Kidwell, 1976), e foi definido como uma síndrome de traços genéticos aberrantes, induzidos em híbridos descendentes do cruzamento entre determinadas linhagens, sendo tal fenômeno associado à

mobilização de elementos transponíveis. A síndrome aparece em células germinativas da F₁ de cruzamentos entre machos da linhagem *P* (contém o elemento *P* completo e possui uma condição citoplasmática que reprime a ação do mesmo - citótipo *P*), com fêmeas da linhagem *M* (não contém o elemento *P* e possui uma condição citoplasmática favorável à transposição do mesmo - citótipo *M*). Os descendentes, freqüentemente têm fertilidade reduzida, particularmente quando seu desenvolvimento ocorre em altas temperaturas (29°C). Os indivíduos férteis apresentam outros traços disgênicos, incluindo alta freqüência de descendentes inviáveis, recombinação em machos, mutações e aberrações cromossômicas. Fenômeno similar também já foi descrito para outros elementos independentes como *I* e *hobo*, assim como, há evidências de que mais de um elemento pode induzir simultaneamente o aparecimento de disgenesia gonadal em *D. virilis* (Petrov *et al.*, 1995).

I.7. O ELEMENTO TRANSPONÍVEL *HOBO*

O elemento transponível *hobo* foi originalmente descrito por McGinnis *et al.* (1983) como uma inserção no gene *Sgs-4* de *Drosophila melanogaster* próximo da região TATA box. Essa inserção de 1273 pb de tamanho provocou a redução na expressão do gene *Sgs-4*, e levou à identificação de uma família de seqüências de DNA, de tamanho e padrão de restrição não conservados em linhagens de *Drosophila melanogaster*. Devido à similaridade na seqüência de aminoácidos do gene da transposase com o elemento *Activator (Ac)* de *Zea mays*, e *Tam3* de *Antirrhinum majus*, o elemento *hobo* de *D.*

melanogaster, foi incluído numa superfamília de transposons denominada hAT - *hobo*- *Ac-Tam3* (Calvi *et al.*, 1991).

O elemento *hobo* canônico (HFL1) é de classe II (Finnegan, 1989), possui 2959 pb de tamanho, com repetições terminais invertidas de 12 pb (Calvi *et al.*, 1991) e inclui seqüências TATA e CAAT (Galindo *et al.*, 1995). Os sítios de inserção de *hobo* são tipicamente flanqueados por uma duplicação de 8 pb na seqüência hospedeira.

O número de elementos *hobo* no genoma é variável, e, além disso, a posição de inserção do elemento também varia entre as linhagens (Blackman & Gelbart, 1989). Em relação ao padrão temporal e geográfico de distribuição do elemento *hobo*, análises das linhagens mais antigas de *D. melanogaster*, coletadas antes de 1950, sugerem que elementos *hobo* completos eram ausentes nessas linhagens, mas que eles foram recentemente introduzidos nesta espécie por transferência horizontal (Periquet *et al.*, 1989; Boussy & Daniels, 1991; Pascual & Periquet, 1991).

Outra característica importante do elemento canônico é que ele possui dois sítios de restrição para *XhoI* próximos a cada extremidade, o que facilita análises por Southern Blot. Daniels *et al.* (1990) analisaram 134 espécies utilizando esta técnica e demonstraram que, no gênero *Drosophila*, somente as espécies do subgrupo *melanogaster* e *montium* contêm elementos suficientemente conservados que permitem sua detecção. No genoma de *D. melanogaster* algumas linhagens contêm elementos *hobo* completos e/ou deletados, outras não tem nenhum (Streck *et al.*, 1986).

No genoma de *Drosophila simulans* o elemento *hobo* também pode ser encontrado nessas três formas citadas (Streck *et al.*, 1986; Daniels *et al.*, 1990). Simmons (1992) demonstrou que muitos dos elementos *hobo* completos de *D. simulans* são praticamente idênticos em seqüência de DNA ao *hobo* canônico de *D. melanogaster*,

diferindo em somente três posições das 2563 seqüenciadas (o fragmento interno gerado por *XhoI*).

Além de carregar elementos de tamanho completo e cópias menores do elemento *hobo*, *D. simulans* também carrega muitas cópias de seqüências relacionadas a *hobo*, detectadas por Southern Blot. Essas seqüências relacionadas a *hobo*, ou *hobo* “relics”, têm despertado grande interesse nos pesquisadores. A caracterização dessas seqüências pode fornecer informações valiosas sobre a origem do elemento *hobo*, sua história e dinâmica. Simmons *et al.* (1998) e Galindo *et al.* (2001) têm descrito seqüências relacionadas a *hobo* em *D. melanogaster* como sendo não-funcionais e incapazes de codificar sua própria transposase. Em *D. simulans*, uma destas seqüências relacionadas a *hobo* foi recentemente identificada por Torres *et al.* (2005), causando uma mutação *de novo* no gene *white* de *D. simulans*. Este elemento foi chamado de *hobo* “velho animado” (*hobo*^{VA}).

O elemento *hobo* parece ser o agente causal de altas taxas de rearranjos cromossômicos (Blackman *et al.*, 1987; Lim, 1988), e está relacionado com a recombinação em machos (Yannopoulos & Zacharopoulos, 1980; Yannopoulos *et al.*, 1982, 1983, 1987). Além disso, como ocorre com o elemento *P*, *hobo* também foi associado ao fenômeno conhecido como disgenesia do híbrido (Blackman *et al.*, 1987; Yannopoulos *et al.*, 1987). Segundo Pascual & Periquet (1991) as populações naturais, quando testadas para o sistema disgênico *hobo*, podem ser classificadas em: linhagens E (do inglês *empty*), que não apresentam esse elemento em seu genoma; e linhagens H, as linhagens que contêm elemento *hobo*.

A disgenesia do híbrido descrita para o elemento *hobo* (Blackman *et al.*, 1987; Yannopoulos *et al.*, 1987) é bastante similar àquela descrita para o sistema P-M, embora seja completamente independente desta e possua algumas diferenças importantes. A

primeira dessas diferenças é a incidência de mutabilidade nos cruzamentos recíprocos. Em P-M, altas taxas de mutação e esterilidade gonadal são observadas nos cruzamentos entre machos P e fêmeas M mas não nos cruzamentos recíprocos. No caso de *hobo*, altas taxas de mutabilidade e esterilidade gonadal são observadas nos cruzamentos entre machos H e fêmeas E, sendo que altos níveis de atividade não se restringem à progênie de tal cruzamento, ocorrendo também em cruzamentos inversos, embora em taxas menores, porém, apreciáveis (Blackman *et al.*, 1987; Blackman & Gelbart, 1989). Também diferente é o fato da esterilidade P-M ser mais pronunciada em altas temperaturas; o sistema H-E parece não ser influenciado por esse fator. O elemento *hobo*, além de se transpor em células germinativas, também tem mobilização somática, sendo a transposição na linhagem germinativa devida à limitação de transposase tecido-específica através do controle transcricional, mas não pelo corte de íntron, como ocorre com o elemento *P* (Calvi & Gelbart, 1994). Existem evidências de mecanismos de repressão zigótica e materna agindo na mobilização de *hobo*, em algumas linhagens (Yannopoulos *et al.*, 1987). Engels & Preston (1979) propuseram que a disgenesia gonadal (esterilidade GD), característica do sistema P-M (Kidwell & Novy, 1979) e também associada à disgenesia causada por *hobo* (Yannopoulos *et al.*, 1987), é resultante da morte celular durante os primeiros estágios de desenvolvimento da linhagem germinal em consequência dos efeitos da transposição de elementos móveis.

I.8. O ELEMENTO TRANSPONÍVEL *PIGGYBAC*

Como outros transposons, o elemento *piggyBac*, originalmente encontrado em *Trichoplusia ni* (Lepidoptera), foi identificado por sua associação com uma mutação. *piggyBac* é um transposon de classe II, tem 2,5 kb de tamanho, com repetições terminais invertidas de 13 pb e uma ORF de 2 kb, e é parte de uma subclasse de elementos que se insere exclusivamente em sítios TTAA (Cary *et al.*, 1989).

O elemento de transposição *piggyBac* tem demonstrado ser um efetivo vetor de transformação na mosca da fruta do mediterrâneo *Ceratitis capitata*, assim como em diversos outros insetos (Handler *et al.*, 1998). O uso de uma transposase não modificada, sob regulação do promotor de *piggyBac*, indicou que *piggyBac* retém sua função autônoma em *C. capitata*, uma vez que a regulação transcricional foi mantida, bem como a atividade enzimática. Esta observação traz uma nova visão, uma vez que todos outros insetos transformados com sucesso têm sido limitados a espécies de dípteros utilizando vetores isolados do mesmo ou de outro díptero.

I.9. O ELEMENTO *HOBO* EM *D. SIMULANS* E HIPERMUTABILIDADE

Em um estudo sobre elementos transponíveis em linhagens de *D. simulans* da América do Sul, Loreto *et al.* (1998_a) encontraram que o elemento *hobo* canônico deve ser uma aquisição recente no genoma das linhagens sul americanas. Este elemento parece ter invadido o genoma dessa espécie primeiramente nas populações européias, asiáticas, africanas e na América do Norte, e só depois nas populações sul americanas.

Em um outro estudo, Loreto *et al.* (1998_b) caracterizaram uma linhagem hipermutável de *D. simulans*, e, ao longo de aproximadamente 100 gerações de observação, foram isoladas sete diferentes mutações, tanto autossômicas como ligadas ao cromossomo X. O mutante espontâneo que originou esta linhagem apresentava olhos de tamanho reduzido, com malformação dos omatídeos, bem como superfície brilhosa e alteração da pigmentação (vermelho escuro). Pela semelhança com um mutante equivalente de *Drosophila melanogaster* e, depois, pela comprovação molecular, essa mutação foi identificada como ocorrendo no loco *lozenge*, situado no cromossomo X (Loreto *et al.*, 1998_b). Ao longo da manutenção dessa linhagem surgiram outros mutantes espontâneos. O segundo mutante a surgir também apresentava alterações nos olhos, sendo estes de cor rubi, caráter associado ao loco *ruby eyes*, também ligado ao cromossomo X. O terceiro mutante isolado foi um com alterações de asas, as quais se apresentavam permanentemente abertas, lembrando o fenótipo *decapentaplegic (dpp)* de *D. melanogaster*. Este mutante foi denominado *dpp-like*, e a mutação foi localizada como ocorrendo num loco autossômico do segundo cromossomo.

Com o decorrer das gerações, mais um novo mutante surgiu nesta linhagem, sendo também um mutante autossômico de asa, onde ocorrem bolhas cheias de hemolinfa, que lembram o fenótipo *blistered* descrito para *D. melanogaster*. Ainda um outro mutante, também autossômico, surgiu nessa linhagem, porém esse era um mutante homeótico, apresentando transformação das antenas em pata, e o surgimento de olhos ectópicos na extremidade dessa pata homeótica; esse mutante foi denominado *Zoinho-na-pata (Zp)*. Por duas vezes independentes, surgiu ainda mais um mutante de olho, apresentando olhos de cor branca, sendo que essa mutação, aparentemente *white*, ocorreu num loco do

cromossomo X. Um desses mutantes se mostrou estéril, enquanto o outro não, e, a partir dele, foi possível estabelecer uma linhagem *white* estável (Loreto *et al.*, 1998_b).

As propriedades biológicas da linhagem hipermutável de *D. simulans* descrita por Loreto *et al.* (1998_b) sugeriram ser um elemento transponível muito ativo o agente causal da hipermutabilidade desta linhagem. Uma vez que eventos de mutações espontâneas são eventos raros, o encontro de uma série de mutações espontâneas em uma linhagem de *D. simulans*, caracterizando um fenômeno de hipermutabilidade, é extremamente importante, e fornece uma excelente oportunidade de se estudar a relação entre seqüências de inserção de DNA repetitivo, elementos transponíveis e mutações espontâneas.

A análise molecular de um mutante *white* originado a partir desta linhagem hipermutável por Torres (2001) indicou a presença de uma inserção de aproximadamente 1,2 kb na região do 3º éxon deste gene. A clonagem e o sequenciamento desta inserção mostrou-se tratar de um elemento *hobo* “relic” (reliquia), que não pode mobilizar-se por conta própria, uma vez que a ORF da transposase possui muitas mutações sem sentido. Entretanto, como as ITRs deste elemento estão conservadas, é sugerido que este elemento *hobo* “relic” deve ter sido mobilizado por um *hobo* canônico (Torres *et al.*, 2005). Por tratar-se de um *hobo* “relic”, e, aparentemente bastante mobilizável, este elemento foi nomeado *hobo*^{VA}.

Já o loco *dpp* parece ser um sítio preferencial de inserção de *hobo*. Newfeld & Takaesu (1999) sugerem que a região do loco *dpp* é resistente à inserção do elemento *P*, mas não à inserção do elemento *hobo*. Os resultados obtidos por esses autores para a preferência de inserção no loco *dpp* também são suportados pelo trabalho de Smith *et al.* (1993), que observaram diferentes padrões de inserção dos elementos *P* e *hobo*, sendo a

inserção de *hobo* novamente localizada na região do gene *dpp*. Ao que tudo indica, o loco *dpp* é um “hot spot” para o elemento *hobo*.

I.10. TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA ATRAVÉS DE MICROINJEÇÃO MEDIADA POR TRANSPOSONS

As contribuições mútuas entre biologia do desenvolvimento e engenharia genética permitiram um rápido desenvolvimento de técnicas para a criação de animais transgênicos. Microinjeção de DNA, a primeira técnica a ser bem sucedida em mamíferos, foi primariamente aplicada em camundongos (Gordon & Ruddle, 1981) e posteriormente em várias outras espécies como coelhos, ovelhas, porcos, pássaros e peixes. Duas outras técnicas foram desenvolvidas: transgênese mediada por retrovírus (Jaenisch, 1976) e transferência gênica em células embrionárias (Gossler *et al.*, 1986).

Desde 1981, quando o termo transgênico foi primeiro usado por Gordon & Ruddle (1981), ocorreu um rápido incremento no uso de animais na engenharia genética e um aumento expressivo no número de aplicações para esta tecnologia.

Em 1982, um eficiente método foi reportado por Rubin & Spradling para integrar DNA exógeno no genoma de insetos que era estavelmente herdável como um transgene nas gerações seguintes. Este processo de transformação genética foi primeiro demonstrado em *Drosophila melanogaster*, por utilizar o elemento transponível *P* e foi subseqüentemente usado com sucesso em muitos outros experimentos.

A transformação genética *in vivo* revolucionou as pesquisas em moscas-da-fruta, que têm sido um importante organismo modelo. Entretanto, o elemento *P* parece não ser

funcional fora da família dos drosofilídeos (Handler *et al.*, 1993), porque este transposon requer um co-fator hospedeiro específico (Rio & Rubin, 1988).

Nos últimos anos, vetores utilizando outros transposons como *mariner*, *hermes* e *piggyBac*, permitiram estender esta metodologia para diferentes organismos como outros insetos (Handler, 2001), peixes (Fadool *et al.*, 1998) e galinhas (Sherman *et al.*, 1998). Isso só foi possível porque esses elementos de transposição são funcionais em uma ampla gama de animais, e não requerem co-fatores adicionais para a sua mobilização (Horn & Wimmer, 2000).

Um outro obstáculo ao uso de transposons para transformação de linhagens germinativas foi a dificuldade de se obter marcadores genéticos que permitissem facilmente e com segurança a identificação de animais transgênicos. Geralmente, marcadores para transformação espécie-específica podem ser gerados pelo isolamento de mutações visíveis na espécie de interesse, clonando o correspondente gene, e, finalmente, revertendo o fenótipo mutante pela incorporação de uma cópia selvagem deste gene por transformação. Para um grande número de espécies, porém, isto pode ser um processo trabalhoso e demorado.

Atualmente, o uso da “green fluorescent protein” (GFP), sob o controle de promotores artificiais, constitui um marcador universal que pode servir para fazer transferência gênica em algumas espécies (Berghammer *et al.*, 1999; Horn & Wimmer, 2000; Horn *et al.*, 2000; 2002). Uma restrição para o uso desta metodologia, entretanto, e principalmente para um laboratório pouco equipado, é que a metodologia requer a utilização de um micromanipulador, micro-agulhas e um sistema de microinjeção. Além disso, se o gene marcador GFP for empregado, um microscópio de epifluorescência é fundamental.

O uso da microinjeção de vetores contendo transposons também é realizado para se estudar o próprio mecanismo de transposição, a dinâmica e o controle da transposição. A partir de linhagens transgênicas de *Drosophila melanogaster*, geradas pela injeção do elemento *hobo* canônico, Ladeveze *et al.* (2001) investigaram o impacto desse elemento na re-organização global do genoma. Já Ladeveze *et al.* (1998) tentaram traçar o destino de elementos *hobo* no genoma de linhagens E transformadas com pHFL1. Ao longo de aproximadamente 105 gerações, os autores tentaram entender a dinâmica populacional e genômica desse elemento, bem como seus padrões de inserção. Em um outro estudo, Handler & Gomez (1995) testaram a mobilidade do elemento transponível *hobo* em diversas linhagens de *Drosophila melanogaster* e em diversas espécies de *Drosophila*. Por meio da metodologia de “in vivo transient assay”, monitoraram a taxa de excisão de *hobo* em embriões. Ainda, Handler & Gomez (1996), utilizando a mesma metodologia de excisão em embriões, estudaram a função do transposon *hobo* em espécies de tefritídeos tanto na presença como na ausência da transposase de *hobo*. Em função disso, no presente trabalho, propomos o desenvolvimento da metodologia de transformação genética, e sua utilização como ferramenta, na tentativa de elucidar os mecanismos envolvidos no controle e na mobilização do elemento transponível *hobo*.

II. OBJETIVOS

II.1. OBJETIVO GERAL

- Contribuir para o entendimento dos mecanismos de controle da mobilização do elemento transponível *hobo* através da transformação genética utilizando este elemento ou através do fornecimento de transposase utilizando a metodologia de microinjeção de DNA.

II.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1- Implementar no nosso laboratório a metodologia de transformação genética utilizando elementos transponíveis como vetor.

2- Testar a possibilidade de mobilização de um elemento *hobo* relíquia (elemento não autônomo) presente e causador de mutações nos genes *white* e, possivelmente em *dpp* em linhagens de *Drosophila simulans*, através da microinjeção do elemento *hobo* canônico, sendo este a fonte de transposase para esta mobilização.

3- Avaliar os efeitos fenotípicos causados pelo estresse gerado por meio do processo de microinjeção e/ou mobilização de transposons.

III. MATERIAIS E MÉTODOS

III.1. LINHAGENS DE *DROSOPHILA* UTILIZADAS

Foram utilizadas as seguintes linhagens mutantes de *Drosophila simulans*: *white* e *dpp-like*. Ambas são oriundas de uma linhagem hipermutável, associada à ação de um elemento de transposição (Loreto *et al.*, 1998_b). A mutação no gene *white* da linhagem de *D. simulans white* foi caracterizada molecularmente por Southern Blot. A clonagem e o seqüenciamento da inserção presente no gene *white* deste mutante mostrou a existência de um elemento transponível *hobo* “relic” de 1,2 kb (Torres *et al.*, 2005), denominado *hobo*^{VA}.

III.2. MANUTENÇÃO DOS ESTOQUES

Os estoques foram mantidos por cruzamento massal em câmara de temperatura constante ($17^{\circ}\text{C} \pm 1$ e 60% de umidade relativa) em meio de cultura a base de farinha de milho (Marques *et al.*, 1966).

Os embriões microinjetados sobreviventes foram mantidos a $19^{\circ}\text{C} \pm 1$ até atingirem o estágio adulto. Após esta etapa, foram transferidos para câmara de 17°C , assim como na manutenção de sua prole.

III.3. MICROINJEÇÃO

A técnica de microinjeção empregada foi baseada nos métodos descritos por Rubin & Spradling (1982) e por Fujioka *et al.* (2000), ambos para a transformação de *D. melanogaster* com o elemento *P*. O estabelecimento de modificações e adaptação a esta metodologia foram necessários, face aos equipamentos e condições disponíveis em nosso laboratório (ou, em alguns casos, a ausência deles). Estas modificações e adaptações são descritas em Deprá *et al.* (2004) (Anexo 1).

III.4. VETORES UTILIZADOS

Os vetores de transformação utilizados para a primeira etapa do trabalho estão descritos em Deprá *et al.* (2004) (Anexo 1). Para a segunda etapa do experimento o vetor de transformação utilizado foi o plasmídeo pHFL1 (Calvi *et al.*, 1991), o qual possui o elemento *hobo* completo inserido em um plasmídeo BlueScript (Figura 1). A microinjeção de um plasmídeo sem conter nenhum transposon foi empregada como controle, para verificar se o estresse causado pela manipulação e micro-injeção de DNA no embrião poderia induzir a transposição. Para isso, utilizou-se o plasmídeo BlueScript KS+.

Os plasmídeos para microinjeção nos embriões foram purificados por precipitação com polietilenoglicol (PEG) como descrito por Fujioka *et al.* (2000), e injetados numa concentração de duzentos nanogramas por microlitro (200ng/μl) cada.

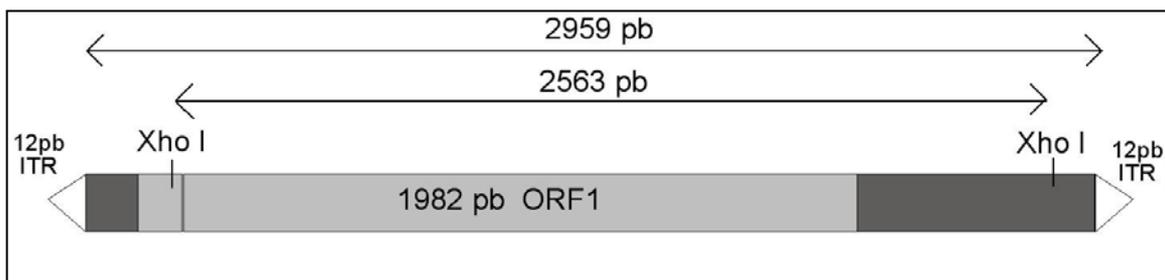


Figura 1: Representação esquemática do elemento *hobo* canônico HFL1 (Calvi *et al.*, 1991), com aproximadamente 3kb de tamanho. Estão representados os sítios de *Xho*I que geram um fragmento de $\approx 2,6$ kb.

III.5. ANÁLISE DOS INDIVÍDUOS MICROINJETADOS E DESCENDENTES

Os ovos que foram microinjetados e chegaram ao estágio adulto (G_0) de *D. simulans white* e *D. simulans dpp-like* foram individualmente cruzados com outro indivíduo da mesma linhagem. A partir da F_1 destes indivíduos, fez-se o estabelecimento de 5 isolinhagens. Cinco fêmeas de cada F_1 foram escolhidas ao acaso e individualmente separadas em tubos de meio de cultura, para dar origem a uma isolinhagem. Cada linhagem gerada a partir desta única fêmea foi mantida até a F_3 (terceira geração) e os fenótipos apresentados por todos os descendentes foram observados sob estereomicroscópio, igualmente até a F_3 . A finalidade do estabelecimento destas isolinhagens foi a de forçar o endocruzamento e, assim, ter mais chances de detectar novas mutações recessivas. Além das cinco isolinhagens, foi feito um sexto grupo de análise na forma de estoque massal (pool), gerado a partir dos indivíduos F_1 restantes, que não foram utilizados no estabelecimento das isolinhagens. Os adultos (G_0), bem como seus descendentes, foram cuidadosamente avaliados quanto à possível mobilização do elemento *hobo*, verificando-se possíveis alterações morfológicas e, até mesmo, a reversão do fenótipo mutante causadas pela injeção do elemento ou pelo próprio processo de microinjeção. A Figura 2 ilustra o

delineamento experimental utilizado neste trabalho. Após esta análise, os indivíduos que não apresentaram nenhuma alteração fenotípica foram descartados e aqueles que mostraram algum tipo de alteração no fenótipo foram cruzados, na tentativa de se estabelecer uma nova linhagem mutante a partir deles.

O número de indivíduos que apresentaram alterações morfológicas foi contabilizado nas diferentes linhagens e submetido à análise estatística.

As linhagens de *D. simulans dpp-like* injetadas com o plasmídeo pHFL1, além da análise acima, foram submetidas à análise molecular. Por meio da técnica de Southern Blot, tentou-se verificar se o número de cópias do elemento *hobo* elevou-se com a microinjeção.

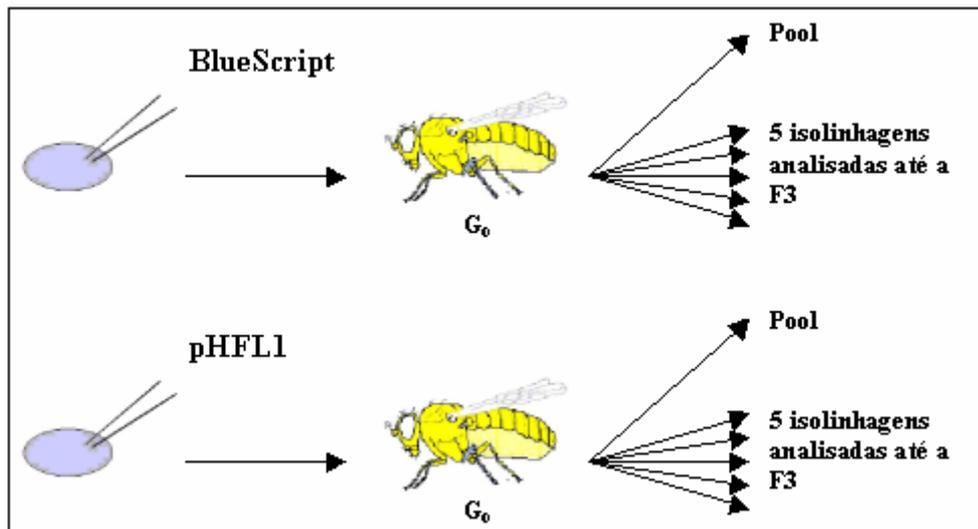


Figura 2: Delineamento experimental: i) embriões pré-celularização foram injetados com diferentes DNAs; ii) moscas adultas obtidas dos embriões microinjetados foram cruzadas com outro indivíduo da mesma linhagem; iii) toda a F₁ foi analisada fenotipicamente e se quantificou a taxa de alterações fenotípicas – atenção especial foi dada à taxa de reversão de mutações; iv) foram estabelecidas 5 isolinhagens em que se realizou a mesma análise fenotípica descrita em iii até a geração F₃; o Pool foi igualmente analisado.

III.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi empregada para determinar se o número de alterações observadas entre as diferentes linhagens injetadas, resultou da ação do elemento *hobo*. Para isso, optou-se por utilizar a “Análise de variância para dados repetidos”, sendo as repetições representadas pelas cinco isolinhagens estabelecidas no trabalho, resultantes da mesma fêmea genitora. Os fatores de efeitos principais empregados no teste foram: a) tipo de tratamento (injeção com pHFL1 ou injeção com BlueScript), b) linhagem (*D. simulans white* ou *dpp-like*), e c) isolinhagem como medida repetida. Para os dados do “pool” foi utilizada “Análise de variância”. Estes métodos de análise de variância comparam todas as médias encontradas em um único teste, com o objetivo de identificar a existência de ao menos uma diferença entre grupos, se alguma existir (Callegari-Jacques, 2003). Os testes foram realizados por meio do programa “SPSS for Windows” Versão 10 (Copyright© SPSS Inc., 1989-1999).

III.7. EXTRAÇÃO DE DNA

Para análise molecular dos indivíduos da linhagem *dpp-like* microinjetados com pHFL1, optou-se por fazer extração de DNA das moscas da terceira geração (F₃).

Aproximadamente 70 moscas foram maceradas em nitrogênio líquido dentro de um tubo de microcentrífuga de 1,5 ml. Ao homogeneizado foi acrescentado 750 µl de tampão de lise, composto por: Tris-HCl 0,1M, EDTA 0,1M, SDS 1% e NaCl 0,06M. A amostra foi incubada em banho-maria por 1 hora a 65°C. A extração de proteínas e lipídeos

foi realizada com solventes orgânicos da seguinte forma: acrescentou-se um volume de fenol equilibrado pH 8,0 e agitou-se por 10 min, lentamente. Centrifugou-se por 10 min a 13000 rpm. O sobrenadante foi passado do tubo original para um novo tubo e repetiu-se o procedimento com um volume de fenol-clorofórmio. Mais uma vez, o sobrenadante também foi retirado após a centrifugação e submetido a uma nova etapa nas mesmas condições que a primeira, agora apenas com clorofórmio. A precipitação do DNA foi realizada retirando-se, novamente, o sobrenadante e acrescentando-se 20% do volume inicial de NaCl 1M e 2 volumes de álcool etílico absoluto. Após, centrifugou-se por 15 min para precipitar o DNA. O líquido sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado por 3 vezes com álcool etílico 70%. O DNA foi colocado para secar em estufa a 37°C e, após, acrescentou-se 20 µl de TE para a suspensão. O DNA foi, então, submetido a um tratamento com RNase por 1 hora, em banho-maria à temperatura de 37°C. Após esta etapa foi quantificado por comparação com o DNA de fago lambda (GIBCO/BRL) em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídeo, e testado com enzima de restrição para avaliação de sua qualidade, antes de ser utilizado no trabalho. Quando necessário, o DNA foi re-submetido à etapa de fenol-clorofórmio, seguida por clorofórmio e as etapas subsequentes, até atingir a pureza desejada.

III.8. SONDA

Como sonda empregamos o elemento *hobo* canônico obtido a partir do plasmídeo pHFL1. Este vetor foi clivado com a enzima de restrição *XhoI*, que libera o elemento *hobo* praticamente inteiro – aproximadamente 2,6 kb. O produto da reação de clivagem foi

separado em gel de agarose 0,8%, e o fragmento de tamanho esperado foi isolado e retirado do gel, utilizando-se um bisturi estéril. Após, foi purificado com a utilização do “Kit” GFXTM PCR DNA and Gel Band Purification® (Amersham Pharmacia Biotech), conforme recomendações do fabricante.

III.9. SOUTHERN BLOT

Para verificar se o número de cópias de *hobo* canônico sofreu aumento nas linhagens microinjetadas, foi realizada a análise por Southern Blot.

Aproximadamente sete microgramas (7µg) de DNA foram clivadas com a enzima de restrição *XhoI*, de acordo com as condições recomendadas pelo fabricante. Os fragmentos produzidos foram fracionados em gel de agarose 0,8%, e transferidos por capilaridade para uma membrana Hybond N+ (Amersham Pharmacia Biotech). A marcação da sonda e a hibridação foram realizadas com o “kit” para marcação e detecção de ácidos nucleicos Gene Images® (Amersham Pharmacia Biotech), conforme especificações do fabricante. As membranas foram hibridadas com sonda marcada pelo método de “random primer” a uma temperatura de 60°C em uma solução contendo 0,1% SDS, 5% sulfato de dextran e líquido bloqueador diluído 20 vezes em 5x SSC. A membrana foi lavada duas vezes a 60°C, primeiramente com 1x SSC e 0,1% SDS, e após com 0,5x SSC e 0,1% SDS, em ambos os casos, agitando-se por 15 minutos. Para a detecção, foi utilizado o “kit” CPD-Star (Amersham Pharmacia Biotech). O tamanho molecular (em kb) dos fragmentos detectados foi determinado usando os fragmentos do marcador de peso molecular 1kb Plus DNA ladder (GIBCO/BRL) como controle e o

programa “Seqaid II”, Versão 3.81 (1989. Molecular Genetics Laboratory Center for Basic Cancer Research Kansas State. University Manhattan KS USA 66506).

A intensidade do sinal no Southern Blot foi analisada e quantificada com auxílio do programa “LabImage[®] Gel Analysis and Documentation System” Versão 2.71 (Copyright[©] 1999-2001 Kapelan GmbH). As bandas obtidas foram comparadas entre linhagens *dpp-like* microinjetadas com pHFL1 e linhagens *dpp-like* não injetadas.

IV. RESULTADOS

Depois de estabelecido um protocolo de transformação genética adequado às nossas condições laboratoriais, as primeiras injeções foram realizadas. Inicialmente, utilizamos o gene repórter GFP (Green Fluorescent Protein) para identificação da transformação genética, como pode ser visto no Anexo 1. Após confirmar a eficiência da técnica de transformação genética empregando elementos transponíveis como vetor, e estando esta funcionando adequadamente em nosso laboratório, alcançamos plenamente o primeiro objetivo específico do nosso trabalho. Posteriormente, passamos à segunda fase do experimento. Nessa etapa, objetivamos verificar a possibilidade de mobilização de um elemento *hobo* relíquia, não autônomo (*hobo*^{VA}), caracterizado por Torres *et al.* (2005), através de microinjeção de elemento *hobo* canônico, capaz de fornecer a transposase para mobilização do elemento relíquia. Embriões de *D. simulans*, mutantes *white* e *dpp-like*, foram independentemente injetados com os plasmídeos pHFL1 e pBlueScript, totalizando 620 embriões injetados em cada grupo. Para fins didáticos, cada grupo de embriões injetados foi designado da seguinte forma: H.DPP, os indivíduos da linhagem *dpp-like* injetados com pHFL1 (*hobo*); B.DPP, os indivíduos da linhagem *dpp-like* injetados com o plasmídeo BlueScript; H.W, os indivíduos da linhagem *white* injetados com pHFL1; e B.W, os indivíduos da linhagem *white* injetados com BlueScript. Como pode ser visto na Tabela 1, um número variável de G₀ (indivíduos microinjetados sobreviventes) foi obtido.

Tabela 1: Número de embriões de *D. simulans white* (W) e *dpp-like* (DPP) microinjetados com os plasmídeos pHFL1 (H) e BlueScript (B), e de adultos sobreviventes.

Grupos	N ⁰ de embriões injetados	G ₀	G ₀ Férteis
H.DPP	620	38 (6,1%)	34 (5,4%)
B.DPP	620	20 (3,2%)	10 (1,6%)
H.W	620	22 (3,5%)	16 (2,5%)
B.W	620	20 (3,2%)	11 (1,7%)

G₀: indivíduos microinjetados sobreviventes. G₀ Férteis: adultos injetados que deixaram F₁

Na linhagem *dpp-like*, de um total de 620 embriões injetados com pHFL1, 38 chegaram ao estágio de mosca adulta, e destes, 34 deixaram prole. Dos embriões desta linhagem injetados com BlueScript, 20 chegaram ao estágio de mosca adulta e 10 deixaram prole. Na linhagem *white*, dos 620 embriões injetados com pHFL1, 22 sobreviveram e desses, 16 mostraram-se férteis. Na injeção do plasmídeo controle BlueScript na linhagem *white*, 20 indivíduos sobreviveram e 11 deixaram prole.

Esta variabilidade no número de G₀ e G₀ férteis obtidas nos diferentes grupos experimentais pode ser explicada, em parte, pelas diferentes temperaturas a que foram submetidos os embriões durante todo o processo de microinjeção. As diversas etapas do processo, como decoronamento, desidratação e até mesmo a injeção, foram realizadas à temperatura ambiente, e cada uma delas pode estar sujeita a oscilações de temperatura. O experimento foi realizado em diferentes épocas do ano, o que implica uma variação da temperatura média diária devido às alterações climáticas nas diferentes estações do ano. Ainda, a diferença intrínseca entre linhagens pode ter sido outro fator determinante na relação entre número de indivíduos injetados e número de sobreviventes. Em futuros

experimentos trataremos de realizar estas etapas em ambiente com temperatura controlada (25°C).

IV.1. ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS INDIVÍDUOS MICROINJETADOS E SEUS DESCENDENTES

IV.1.1 EMBRIÕES DE *DROSOPHILA SIMULANS DPP-LIKE* INJETADOS COM pHFL1

As moscas adultas (G_0) resultantes de embriões de *Drosophila simulans* mutantes *dpp-like* injetados com o plasmídeo pHFL1 apresentaram diversas alterações morfológicas, sendo predominante a alteração de asas. As mesmas, que originalmente apresentavam-se abertas, mostraram-se fechadas, em um aparente processo de reversão da mutação.

Dentre os indivíduos que apresentaram alterações, podemos constatar diversos padrões de modificação do fenótipo original, tanto entre os indivíduos G_0 como nos descendentes destes indivíduos. A alteração mais freqüentemente observada foi “aparente” reversão ao fenótipo normal; onde encontramos três moscas G_0 , resultantes da injeção direta de pHFL1 no estágio de embrião, com asas fechadas (os indivíduos H.DPP-2, H.DPP-4, H.DPP-24). Também foram observados dois indivíduos G_0 com uma das asas abertas e outra fechada. Estas alterações podem ser vistas na Figura 3.

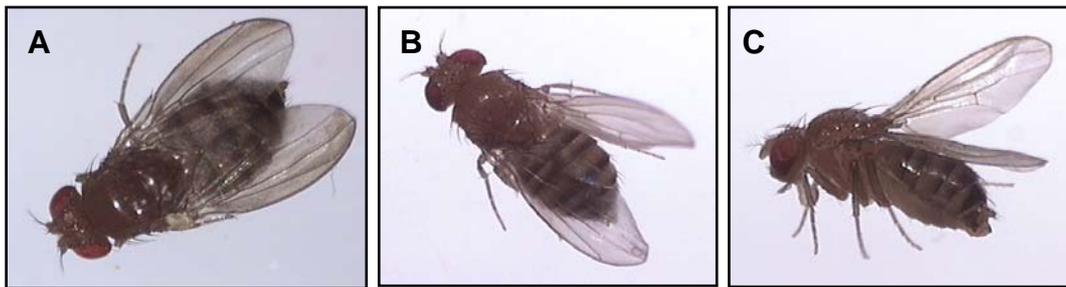


Figura 3: Alterações encontradas em indivíduos G_0 microinjetados com pHFL1. Indivíduos com fenótipo revertente (A) e com uma das asas abertas e outra fechada (B e C).

Além das alterações em asas observadas acima, um outro indivíduo G_0 apresentou malformação de antenas e omatídeos (indivíduo H.DPP-13), como pode ser observado na Figura 4.

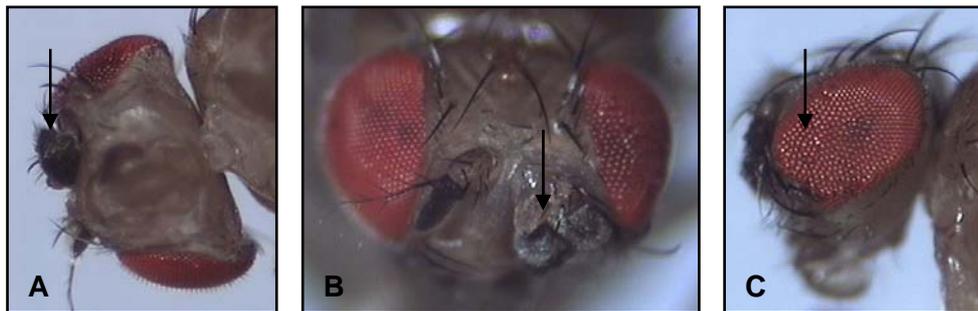


Figura 4: Indivíduo com malformação de antenas e omatídeos. As setas indicam onde ocorreu alteração de antena (A e B), e omatídeos (C).

Dentre os descendentes dos indivíduos injetados, também foram observadas diversas alterações, que ocorreram essencialmente nas asas. As mesmas apresentavam-se fechadas, como demonstrado na Figura 3 (A), e o número de indivíduos que apresentaram esta “reversão”, nas diferentes isolinhagens, está demonstrado no Quadro 1.

Quadro 1: Número de indivíduos que apresentaram asas “normais” em diferentes linhagens de *D. simulans dpp-like* injetadas com *hobo*.

	POOL	Iso.X.1	Iso.X.2	Iso.X.3	Iso.X.4	Iso.X.5
HDPP-1	4	3	5	1		
HDPP-2	4				1	
HDPP-3	14	1	3	3	2	3
HDPP-4	5		1	1	2	3
HDPP-5	8				1	2
HDPP-6	6	3		3	1	3
HDPP-7	11	2	1	1	4	2
HDPP-8	11		4	4	2	5
HDPP-9	5	5	2		1	3
HDPP-10	13	1	7		3	5
HDPP-11	3	2				1
HDPP-12	1		1		2	
HDPP-13	8	5	3	2	3	2
HDPP-14	3		4		3	
HDPP-15	4	4	2	8	1	6
HDPP-16	6	1	1		1	
HDPP-17	4	2	1	5	3	3
HDPP-18	3	1				
HDPP-19	3			2		
HDPP-20	7		2	2	1	2
HDPP-21	6		3	1	1	3
HDPP-22	6	2	4	6		
HDPP-23	3	2	1		1	2
HDPP-24	5		1	3		
HDPP-25			1			
HDPP-26	4			3	1	
HDPP-27	4			1		
HDPP-28		1		1		
HDPP-29	4			3		1
HDPP-30	2	1	2	1		
HDPP-31	8	3	1		2	3
HDPP-32	2	1	1	1		
HDPP-33	3	1				4
HDPP-34	5					1

Além destas alterações, outras modificações nas asas também foram observadas nos descendentes de H.DPP. Como demonstrado na Figura 5, alguns indivíduos apresentaram redução em uma das asas.



Figura 5: Alterações de asas observadas nos descendentes de H.DPP. Vista superior (A) e vista lateral (B) do mesmo indivíduo.

Cabe salientar que todos os indivíduos que apresentaram algum tipo de alteração morfológica foram cruzados com outro da mesma linhagem, na tentativa de se estabelecer uma nova linhagem mutante. E, em todos os cruzamentos, a prole resultante apresentou o fenótipo normal da linhagem, com asas abertas de tamanho normal. Nos cruzamentos dos indivíduos que apresentaram uma aparente reversão do fenótipo *dpp-like*, o resultado foi o mesmo; as proles geradas apresentavam o fenótipo original da linhagem *dpp-like*, com asas abertas. Conseqüentemente não foi possível estabelecer nenhuma linhagem revertente, uma vez que a característica “reversão” não foi reproduzível, só se manifestou em alguns indivíduos que não a transmitiram a seus descendentes.

IV.1.2 EMBRIÕES DE *DROSOPHILA SIMULANS* DPP-LIKE INJETADOS COM BLUESCRIPT

Os adultos G₀, resultantes de embriões de *Drosophila simulans* mutantes *dpp-like* injetados com o plasmídeo BlueScript apresentaram poucas alterações morfológicas. Com exceção do indivíduo B.DPP-2, que apresentou uma das asas malformada (Figura 6), todos outros G₀ eram normais quanto às características fenotípicas.



Figura 6: Indivíduo G₀ com uma das asas malformadas. A seta indica um vestígio da asa direita.

No entanto, dentre os descendentes dos embriões injetados com BlueScript, o número de indivíduos com alterações foi mais pronunciado do que nos G₀. Houve um número variável de moscas que apresentaram a característica de aparente reversão ao fenótipo mutante (asas fechadas). Estes indivíduos estão contabilizados no Quadro 2.

Quadro 2: Número de indivíduos que apresentaram asas “normais” em diferentes linhagens de *D. simulans dpp-like* injetadas com BlueScript.

	POOL	Iso.X.1	Iso.X.2	Iso.X.3	Iso.X.4	Iso.X.5
BDPP-1	1		1	1		
BDPP-2	2	2		3	2	2
BDPP-3	1				1	2
BDPP-4	4	1	4	1	3	2
BDPP-5						
BDPP-6				1	5	
BDPP-7			1		1	2
BDPP-8	5			1		1
BDPP-9	11	2	2	3	1	1
BDPP-10	6			2	4	1

Assim como na linhagem *dpp-like* injetada com pHFL1, os indivíduos que apresentaram alterações foram cruzados com outro da mesma linhagem para o estabelecimento de uma nova linhagem mutante. E, mais uma vez, não foi possível estabelecer nenhuma linhagem revertente, uma vez que os indivíduos gerados apresentaram o fenótipo normal da linhagem.

IV.1.3 EMBRIÕES DE *DROSOPHILA SIMULANS WHITE* INJETADOS COM PHFL1

Os adultos gerados a partir dos embriões de *Drosophila simulans* mutantes *white* injetados com o plasmídeo pHFL1, diferentemente dos descritos anteriormente (*dpp-like*), apresentaram poucas alterações fenotípicas. Nesta linhagem, todos os indivíduos G₀ mostraram-se normais fenotipicamente (com fenótipo *white*), bem como, nenhuma reversão da mutação do loco *white* foi observada. Apenas alguns descendentes dos indivíduos G₀ apresentaram alterações de asas, mas, neste caso, as asas apresentavam-se

abertas, lembrando o fenótipo *dpp-like*. O número de indivíduos portando esta alteração está demonstrado no Quadro 3.

Quadro 3: Número de indivíduos que apresentaram asas abertas em diferentes linhagens de *D. simulans white* injetadas com *hobo*.

	POOL	Iso.X.1	Iso.X.2	Iso.X.3	Iso.X.4	Iso.X.5
HW-1			1			
HW-2					2	
HW-3	3	4	1			
HW-4			1			
HW-5	2					
HW-6						
HW-7				3	1	
HW-8						
HW-9				1	1	
HW-10						
HW-11	1					
HW-12						
HW-13					1	
HW-14						
HW-15						
HW-16						

Os indivíduos que apresentaram esta alteração foram cruzados, e diferentemente do que ocorreu com a linhagem *dpp-like*, a prole resultante apresentou a característica de asas alteradas. Neste caso, foi possível estabelecer uma nova linhagem de *D. simulans white* com fenótipo aparentemente *dpp-like*.

IV.1.4 EMBRIÕES DE *DROSOPHILA SIMULANS WHITE* INJETADOS COM BLUESCRIPT

Os adultos gerados a partir de embriões de *Drosophila simulans* mutantes *white* injetados com o plasmídeo BlueScript, assim como os injetados com pHFL1, quase não apresentaram alterações fenotípicas. E, da mesma forma, somente alguns descendentes dos

indivíduos G_0 apresentaram alterações de asas, as quais, apresentavam-se abertas, lembrando o fenótipo *dpp-like*. O número de indivíduos portando esta alteração está demonstrado no Quadro 4.

Quadro 4: Número de indivíduos que apresentaram asas abertas em diferentes linhagens de *D. simulans white* injetadas com BlueScript.

	POOL	Iso.X.1	Iso.X.2	Iso.X.3	Iso.X.4	Iso.X.5
BW-1	1					
BW-2	1				1	
BW-3	1					
BW-4	3					
BW-5	1					
BW-6		1				
BW-7						
BW-8						
BW-9						
BW-10	1					
BW-11						

IV.2. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para determinar se o número de alterações observadas entre as diferentes isolinhagens injetadas resultou da ação do elemento *hobo*, foi realizada uma “Análise de variância para dados repetidos”. As alterações utilizadas incluem os valores dos Quadros 1, 2, 3 e 4, ou seja, a variação no padrão normal de asas, nas linhagens de *D. simulans white* e de *D. simulans dpp-like*, injetadas com pHFL1 e BlueScript. Com esse objetivo, os dados das isolinhagens foram agrupados em uma tabela única e foi realizada a comparação dos quatro grupos experimentais com relação à variável quantitativa alteração ou não- alteração. Para os dados do “pool” foi utilizado o teste de “Análise de variância univariada”, onde o número de alterações encontrado também foi agrupado em uma tabela única. Nos dois testes utilizados foi empregada uma transformação de dados (para detalhes ver Zar, 1999: p. 275), que consistiu em extrair a raiz quadrada de todos os valores e somar três oitavos ($\text{SQRT}(x + 3/8)$). Esta transformação é necessária quando os dados são muito heterogêneos e não se aproximam de uma distribuição normal, condição necessária para o emprego desses testes. A Figura 7 representa o número médio de indivíduos com alteração de asas observados nos diferentes tratamentos (neste caso, tratamentos referem-se aos diferentes plasmídeos injetados).

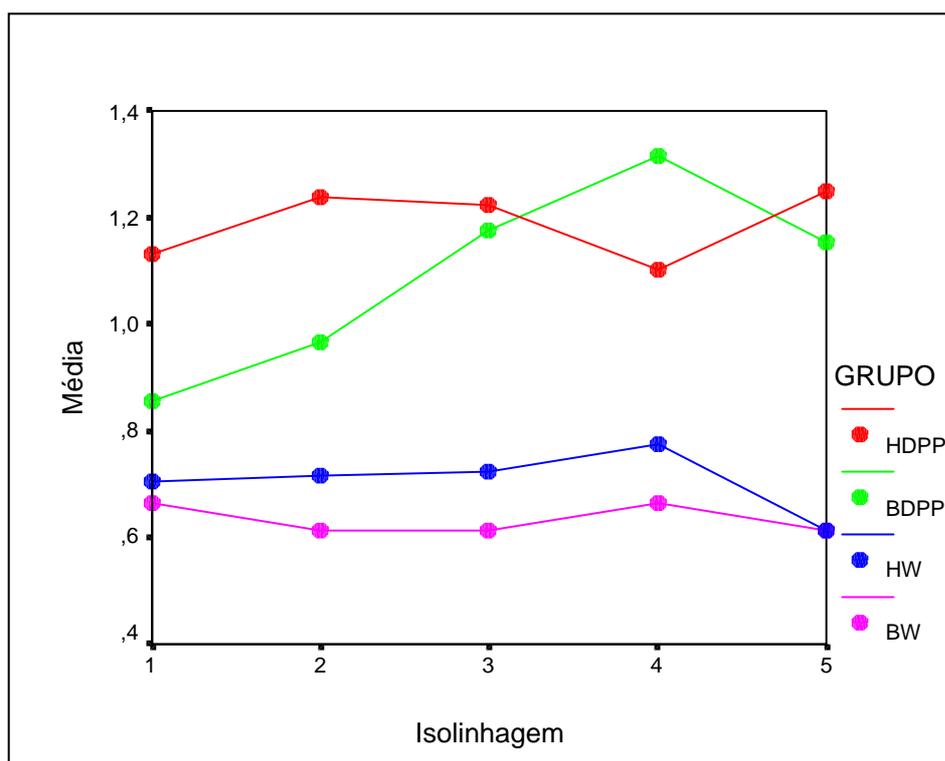


Figura 7: Número médio de indivíduos com alteração de asas observados nos diferentes grupos de indivíduos injetados. Esses dados foram transformados de forma que representam: $\sqrt{\text{do n}^\circ \text{ de indivíduos alterados} + 3/8}$. Os grupos referem-se aos plasmídeos injetados nas linhagens white e dpp-like e estão representados por diferentes cores.

O número médio de alterações observadas entre a linhagem *dpp-like* é visivelmente mais elevado que na linhagem *white*. Porém, as médias dentro desta linhagem variam muito, com o grupo controle, em certo instante, ultrapassando a média de alterações encontradas nos indivíduos injetados com *hobo*. Já na linhagem *white*, o número de alterações observado no grupo controle é menor, apenas se igualando ao grupo teste em determinada situação.

No “pool” (Figura 8), também se observa um número médio de alterações maior na linhagem *dpp-like*, com o controle apresentando um menor número de alterações que o

grupo teste. Já na linhagem *white*, que apresenta um número de alterações reduzido, o valor médio de moscas alteradas no grupo controle, é maior do que no grupo teste.

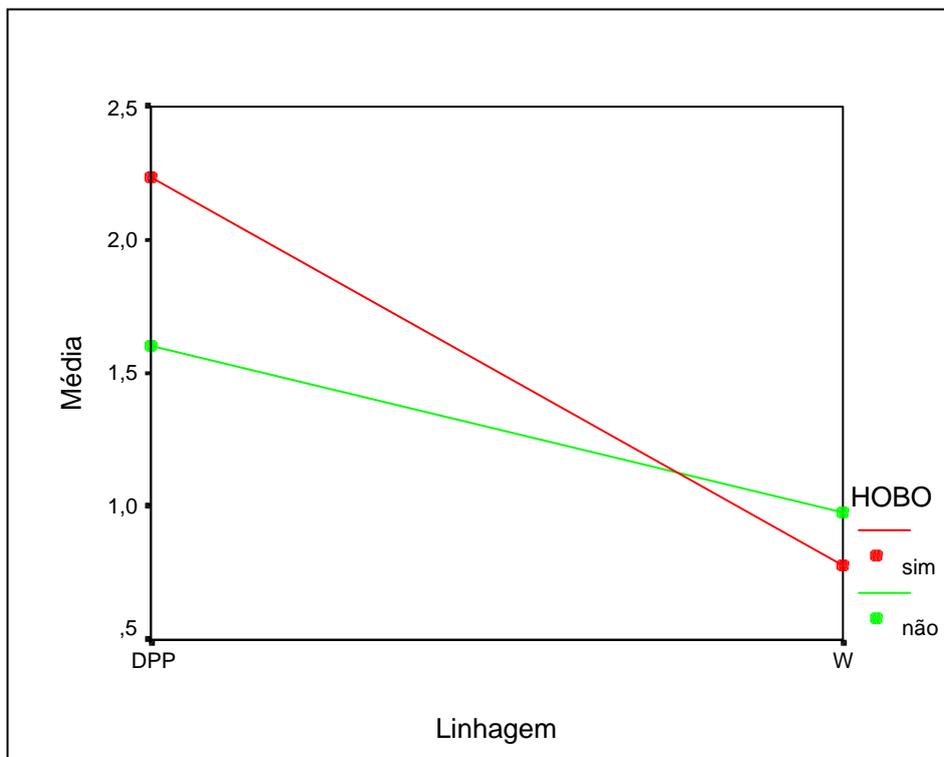


Figura 8: Número médio de indivíduos com alteração de asas observados no “pool”, com os diferentes tratamentos. Esses dados foram transformados de forma que representam: $\sqrt{\text{do n}^\circ \text{ de indivíduos alterados} + 3/8}$. Os tratamentos se referem a injeção com pHFL1 (HOBO sim) ou com BlueScript (HOBO não).

Para a análise de variância, foi investigada a existência de interação entre os fatores - o quanto o efeito de uma variável depende da outra - bem como o efeito dos fatores individualmente. O nível de confiança utilizado foi de 95%. Na Tabela 2 estão representados os resultados da análise de variância para os dados obtidos a partir das isolinhagens. Como pode ser observado, no nível de significância de 5% ($\alpha = 0,05$) não há interação entre linhagens e tratamentos, o efeito da injeção com pHFL1 ou com BlueScript independe da linhagem que sofreu microinjeção (*dpp-like* ou *white*), pois o nível de

significância obtido é maior do que o estabelecido ($P > 0,05$). Em relação às linhagens, foi observada uma diferença entre elas ($P < 0,05$). Em relação ao tratamento, injeção com *hobo* ou injeção controle, também não há diferença estatisticamente significativa ($P > 0,05$). Esta diferença encontrada entre linhagens pode ser confirmada pelo número médio de alterações observado, onde a linhagem *dpp-like* apresenta média mais pronunciada do que *white*, mas como não há efeito do tratamento, esta diferença não depende do vetor injetado.

Tabela 2: Análise de variância para dados repetidos: ISOLINHAGENS.

Fonte	SQ	GL	QM	F	Sig.
Linhagem* Hobo	9.320E-03	1	9.320E-03	.022	.883
Linhagem	15.669	1	15.669	36.595	.000
Hobo	.517	1	.517	1.208	.276
Erro	28.688	67	.428		

SQ: Somas dos quadrados
 GL: Graus de liberdade
 QM: Quadrado médio

Na tabela 3, estão representados os resultados da análise de variância para os dados obtidos a partir dos “pools”. Ao nível de significância de 5% ($\alpha = 0,05$), observa-se que existe diferença entre linhagens, e, mais uma vez, não há diferença entre tratamentos – não há efeito do elemento *hobo* no número de indivíduos alterados. No entanto, nesta análise, observou-se que há interação entre linhagem e tratamento ($P < 0,05$). Ou seja, o número de indivíduos que apresentam alterações nas asas difere entre as linhagens, e essa diferença depende do vetor injetado. Embora não tenha sido detectado efeito do elemento *hobo*, a variável “linhagem” é dependente da variável “tratamento”. Isso sugere que aumentando a amostra pode ser possível encontrar efeito de *hobo*.

Tabela 3: Análise de variância para dados do POOL.

Fonte	SQ	GL	QM	F	Sig.
Linhagem* Hobo	2.446	1	2.446	5.604	.021
Linhagem	15.316	1	15.316	35.088	.000
Hobo	.681	1	.681	1.561	.216
Erro	29.245	67	.436		

SQ: Somas dos quadrados

GL: Graus de liberdade

QM: Quadrado médio

IV.3. ANÁLISE MOLECULAR

As diferentes isolinhagens estabelecidas foram analisadas por Southern Blot, para verificar se houve aumento do número de cópias do elemento *hobo*, pois isso significaria que a mobilização do elemento ocorreu por meio do plasmídeo HFL1 injetado. Para esta análise foi utilizada somente a linhagem *dpp-like* microinjetada com pHFL1. A linhagem *white* não foi utilizada neste experimento porque o número de cópias do elemento canônico presente em seu genoma é mais elevado, dificultando assim, a detecção de novas cópias.

As bandas do Southern foram quantificadas com auxílio do programa LabImage[®], e a intensidade do sinal foi comparada com o sinal obtido para hibridização com DNA da linhagem *dpp-like* não-injetada. Na Figura 9, podemos observar que o número de cópias do elemento *hobo* não sofreu alteração na maioria das diferentes isolinhagens testadas, quando comparadas com a linhagem controle (*dpp-like* não injetada). Entretanto, na coluna 10, que corresponde à isolinhagem H.DPP-23.4, observamos uma segunda banda de aproximadamente 2 kb (estimado pelo programa Sequaid), que não era esperada e não está presente no grupo controle (linha 1). Ao que tudo indica, na linhagem H.DPP-23.4, houve mobilização do elemento *hobo*, gerando um fragmento provavelmente com alguma região deletada, uma vez que este é de tamanho inferior ao esperado na clivagem com *XhoI*.

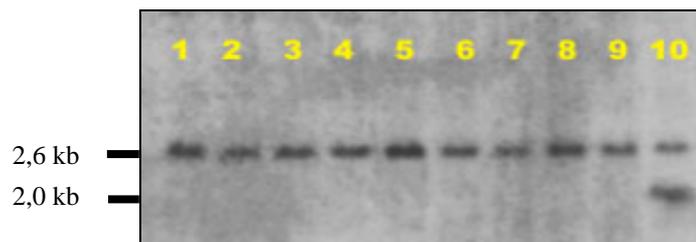


Figura 9: Southern Blot de diferentes isolinhagens de *dpp-like*, injetadas com pHFL1. As isolinhagens testadas foram: 1) *dpp-like* – controle, 2) 16.1, 3) 25.1, 4) 1.2, 5) 17.3, 6) 4.3, 7) 24.4, 8) 6.5, 9) 5.3, 10) 23.4

Adicionalmente, a intensidade das bandas obtidas nas hibridizações com sonda de *hobo*, estimada pelo programa LabImage, foi comparada com os valores obtidos a partir da foto do gel com as clivagens de DNA genômico utilizado no Southern Blot, na altura correspondente à região do sinal de hibridização observado no Southern. Esse procedimento foi utilizado para evitar qualquer erro de quantificação da intensidade do sinal, que poderia ser super ou sub-estimado em função da quantificação de DNA ter sido feita por comparação visual. Nas tabelas 4, 5 e 6 estão demonstrados os valores obtidos a partir das Figuras 9, 10 e 11 respectivamente para as mesmas isolinhagens, da quantificação do sinal de Southern Blot e do DNA presente no gel utilizado nesta técnica.

Tabela 4: Quantificação do sinal de Southern Blot e do DNA presente no gel utilizado na técnica.

Isolinagem	Quant. South. Banda 1	Banda 2	Quant. Gel	Diferença
Controle	1		1	0
16.1	0,981		0,942	0,039
25.1	1,023		0,972	0,051
1.2	1,1		0,925	0,175
17.3	1,17		0,99	0,18
4.3	0,988		0,964	0,024
24.4	0,947		1,041	-0,094
6.5	0,975		1,194	-0,219
5.3	0,968		1,242	-0,274
23.4	0,987	0,902	1,184	-0,197

Quant. South.: valores obtidos a partir da intensidade da banda do Southern.

Quant. Gel: valores obtidos a partir quantidade de DNA presente no gel

Diferença: valor obtido pela subtração dos dois valores (Quant. South - Quant. Gel).

Os valores resultantes da diferença (Quant. South - Quant. Gel) são relativamente baixos, próximos de zero, confirmando a igualdade na intensidade de sinal entre linhagens e controle. Sendo assim, no ensaio de Southern Blot mostrado na Figura 9, podemos inferir que houve apenas um evento de mobilização, já que, nas diferentes linhagens, a intensidade do sinal não foi alterada.

Entretanto, na Tabela 5, para a isolinhagem H.DPP-29.1 (correspondente à terceira amostra de DNA genômico do Southern mostrado na Figura 10) a relação Sinal Southern/Sinal DNA é aproximadamente 1. Isto pode ser um indício de que ocorreu mobilização do elemento *hobo*, e de que o número de cópias do elemento *hobo* canônico dobrou nesta isolinhagem.

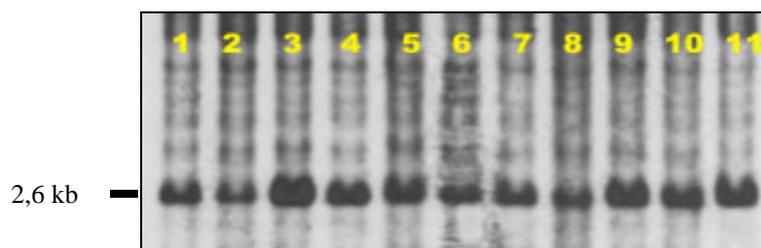


Figura 10: Southern Blot de diferentes isolinhagens de *dpp-like*, injetadas com pHFL1. As isolinhagens testadas foram: 1) *dpp-like* – controle, 2) 35.5, 3) 29.1, 4) 11.4, 5) 18.3, 6) 30.1, 7) 1.4, 8) 37.3, 9) 22.1, 10) 26.5, 11) 31.1

A linhagem H.DPP-37.3 (representada na coluna 8 da Figura 10) também apresentou uma diferença expressiva, como demonstrado na Tabela 5, porém, neste caso, a diferença pode ser atribuída à qualidade do DNA utilizado. Conforme pode ser observado na Figura 11, houve uma digestão excessiva do DNA da isolinhagem H.DPP-37.3. O que se reflete na quantificação do gel que apresentou um valor duas vezes maior que a intensidade do sinal observada no Southern Blot.

Tabela 5: Quantificação do sinal de Southern Blot e do DNA presente no gel utilizado na técnica.

Isolinhagem	Quant. South. Banda 1	Quant. Gel	Diferença
Controle	1	1	0
35.5	1	1	0
29.1	1,978	1,024	0,954
11.4	1,241	0,985	0,256
18.3	1,15	1,139	0,011
30.1	1,004	0,925	0,079
1.4	0,944	0,957	-0,013
37.3	0,85	1,804	-0,954
22.1	1,42	1,365	0,055
26.5	1,365	1,274	0,091
31.1	1,41	1,185	0,225

Quant. South.: valores obtidos a partir da intensidade da banda do Southern.

Quant. Gel: valores obtidos a partir quantidade de DNA presente no gel

Diferença: valor obtido pela subtração dos dois valores (Quant. South - Quant. Gel).

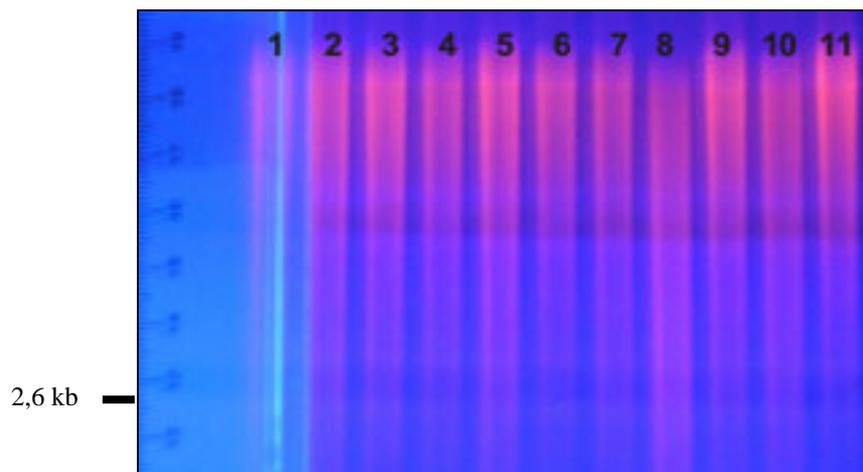


Figura 11: Foto do gel utilizado no Southern Blot de diferentes isolinhagens de *dpp-like*, injetadas com pHFL1. As isolinhagens testadas foram: 1) *dpp-like* – controle, 2) 35.5, 3) 29.1, 4) 11.4, 5) 18.3, 6) 30.1, 7) 1.4, 8) 37.3, 9) 22.1, 10) 26.5, 11) 31.1

A Figura 12 representa os dados obtidos a partir de outra análise por Southern Blot com diferentes isolinhagens. Os valores obtidos na quantificação estão demonstrados na Tabela 6.

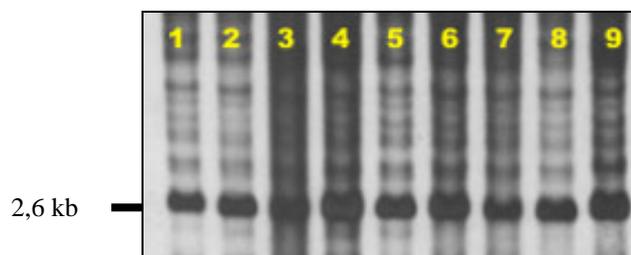


Figura 12: Southern Blot de diferentes isolinhagens de *dpp-like*, injetadas com pHFL1. As isolinhagens testadas foram: 1) *dpp-like* – controle, 2) 7.1, 3) 15.1, 4) 3.2, 5) 21.3, 6) 13.5, 7) 12.5, 8) 8.3, 9) 14.3

Tabela 6: Quantificação do sinal de Southern Blot e do DNA presente no gel utilizado na técnica.

Isolinhagem	Quant. South.	Quant. Gel	Diferença
Controle	1	1	0
7.1	1,172	1,023	0,149
15.1	1,402	1,733	-0,331
3.2	1,598	1,705	-0,107
21.3	1,219	1,205	0,014
13.5	1,492	1,62	-0,128
12.5	1,023	1,316	-0,293
8.3	1,093	1,065	0,028
14.3	1,494	1,544	-0,05

Quant. South.: valores obtidos a partir da intensidade da banda do Southern.

Quant. Gel: valores obtidos a partir quantidade de DNA presente no gel

Diferença: valor obtido pela subtração dos dois valores (Quant. South - Quant. Gel).

Como pode ser visto algumas isolinhagens apresentaram um sinal mais forte que o controle, porém, quando comparados com a quantificação do gel, o sinal praticamente se iguala ao do controle. As diferenças são pouco relevantes, indicando que não houve aumento pronunciado da intensidade de sinal, conseqüentemente, nestas isolinhagens, não houve mobilização do elemento *hobo*.

Há indícios de mobilização de *hobo* apenas nas isolinhagens H.DPP-29.1 e H.DPP-23.4, de um total de 27 isolinhagens analisadas pela técnica de Southern Blot. Assim, aparentemente, temos um total de dois eventos de mobilização de *hobo* em um total de 27 isolinhagens analisadas, o que perfaz uma taxa de 7,4%, sendo este um valor não desprezível de mobilização.

V. DISCUSSÃO

Para desenvolver este trabalho foi necessário o estabelecimento de uma metodologia que se adequasse às nossas condições de laboratório, principalmente quanto à disponibilidade de equipamentos e de recursos. Em Deprá *et al.* (2004), uma metodologia de baixo custo para transformação genética de *Drosophila* foi estabelecida. Esse método difere das técnicas até então empregadas (Rubin & Spradling, 1982; Fujioka *et al.*, 2000), pela utilização de um sistema de microinjeção (micromanipulador) não convencional, constituído da parte mecânica de um microscópio. Em adição, um equipamento de epifluorescência para detectar transformantes de GFP, igualmente de baixo custo, também foi estabelecido.

O desenvolvimento de modificações e a adaptação de metodologias de investigação científica são, algumas vezes, necessários em países em desenvolvimento como o Brasil, onde os recursos para pesquisa são escassos. Dessa maneira, esse tipo de estratégia torna possível a aplicação de técnicas até então restritas aos grandes centros de pesquisa, os quais possuem maior disponibilidade de equipamentos e recursos.

Essa metodologia configurou-se numa importante ferramenta para a investigação do mecanismo de mobilização do elemento transponível *hobo*. A partir dela, foi possível realizar a microinjeção do elemento canônico pHFL1 nas linhagens de *D. simulans white* e *dpp-like*, contribuindo para um melhor entendimento do modo de ação desse elemento nos genomas hospedeiros.

Torres *et al.* (2005) descrevem que o elemento *hobo*^{VA} é mobilizável em *Drosophila simulans*, e sugerem que o elemento *hobo* canônico é o principal candidato a

fornecer a enzima para esta mobilização. Em função disso, pensamos em testar esta hipótese fornecendo, por microinjeção, o elemento *hobo* canônico.

Uma vez que a técnica de microinjeção evita qualquer contaminação, seja por outro elemento transponível ou por informação genômica, quaisquer novas propriedades adquiridas pelo genoma hospedeiro devem resultar do elemento introduzido. Conseqüentemente, com a injeção do plasmídeo pHFL1, esperávamos a reversão da mutação causada por *hobo*^{VA} no loco *white*, bem como a reversão da mutação, também causada por *hobo*, no loco *dpp*. No entanto, não observamos este fato, ou seja, nenhum processo de reversão dessas mutações foi observado.

O que pode justificar, pelo menos em parte, a ausência de mobilização/reversão é o tamanho amostral utilizado no trabalho. Ladeveze *et al.* (1998), em um estudo sobre o padrão de transmissão do elemento *hobo*, injetaram o mesmo plasmídeo utilizado neste trabalho em aproximadamente 1000 embriões de *Drosophila melanogaster* de uma linhagem suscetível à mobilização por *hobo* e obtiveram 30 linhagens independentes das quais 6 eram *hobo*-positivas. Em outro trabalho similar, Ladeveze *et al.* (2001), com o mesmo número de embriões injetados, obtiveram 7 linhagens positivas para a presença do elemento *hobo*. Em nosso trabalho, apenas os embriões de *dpp-like* injetadas com pHFL1, atingiram o tamanho amostral de 34 indivíduos G₀ férteis. Para os embriões de *dpp-like* injetados com BlueScript, o número de G₀ férteis ficou em 10 indivíduos, menos da metade do grupo teste. Nos embriões de *white*, a mesma situação se repetiu, 16 indivíduos G₀ férteis injetados com pHFL1 e 11 G₀ férteis injetados com BlueScript. Com exceção de H.DPP, todos os outros grupos amostrais tiveram um tamanho amostral muito reduzido, o que possivelmente está se refletindo na não-detecção de uma possível mobilização do

elemento *hobo* nos diferentes grupos. Além disso, a discrepância entre tamanho de amostras pode estar influenciando nossas análises estatísticas.

Em adição, alguns autores relatam um processo inverso ao esperado, onde a microinjeção de pHFL1 pode causar a inibição da transposição por *hobo*. Handler & Gomez (1995) observaram em diversas espécies de drosofilídeos que um sistema hábil a mobilizar cruzadamente o elemento *hobo* existe em aparentemente todas elas. Entretanto, esses sistemas de mobilização cruzada podem interagir negativamente com *hobo* e impedir sua mobilidade. Ainda, Handler & Gomez (1996) observaram que, em contraste ao elemento *P*, a excisão de *hobo* não é restrita a espécies de drosofilídeos, e a presença da transposase não é requerida para o movimento de *hobo*. Resultados similares também foram reportados para excisão de *hobo* em *Musca domestica* (Atkinson *et al.*, 1993). Ambos estudos observaram que para algumas espécies, a frequência de eventos de excisão de *hobo* detectáveis diminui na presença de uma fonte exógena de transposase, possivelmente devido à interação negativa com elementos relacionados a *hobo*. Em *Drosophila virilis*, a qual é distantemente relacionada de *D. melanogaster*, a excisão ocorre em taxas similares, tanto na presença como na ausência de transposase, no entanto, a excisão precisa só foi observada na presença da transposase de *hobo*. Esse efeito negativo de *hobo* parece resultar da inibição da função da transposase ou de uma atividade alterada, causando a perda de especificidade de sítio de excisão. Fatores celulares específicos do hospedeiro também podem influenciar a excisão.

No mesmo estudo, Handler & Gomez (1996) reportam para o fato de que todas as espécies de tefritídeos testadas suportam a excisão ou deleção de *hobo*, ambos na presença ou ausência de transposase, indicando um estado permissivo para a mobilidade de *hobo* e a existência de um sistema endógeno capaz de mobilizá-lo.

Considerando os resultados descritos anteriormente, podemos observar que a injeção do plasmídeo contendo o gene para transposase de *hobo* parece não ter mobilizado o elemento *hobo*^{VA}, ao menos nas células germinativas. Apesar de terem sido observadas diversas alterações morfológicas em indivíduos G₀ e em seus descendentes, estas alterações não se mantiveram nas gerações seguintes, não sendo possível o estabelecimento de nenhuma linhagem revertente. Isso nos faz crer que, se houve mobilização do elemento *hobo*, esta mobilização ocorreu estritamente nas células somáticas dos indivíduos, ou ainda é de origem epigenética. O mesmo poderia estar acontecendo nos indivíduos que apresentaram outras alterações morfológicas, que da mesma forma, não foram transmitidas para os descendentes.

Para *hobo*, evidências genéticas indicam que, similarmente ao elemento *P*, a atividade de transposase é limitada à linhagem germinativa, mas diferentemente de *P*, é devida à regulação transcricional e não ao “splicing” tecido específico de íntron (Calvi & Gelbart, 1994). No entanto, os dados de Handler & Gomez (1995, 1996) indicam que *hobo* pode ser funcional, tanto em tecidos somáticos como na linhagem germinativa e que a função somática de *hobo* pode ocorrer durante os primeiros estágios de desenvolvimento. Em função disso, o que estamos observando pode ser um indício de mobilização somática do elemento *hobo*. Uma vez que a análise estatística não indicou efeito de *hobo* sobre o número de indivíduos alterados, parece que algum outro fator está atuando nesses genomas hospedeiros.

Outra explicação para o grande número de alterações não-herdáveis encontradas é que elas podem ser fruto do próprio processo de microinjeção. As etapas de decoroniamento, dessecação e até a injeção podem significar uma fonte de estresses ao embrião, e podem interferir no processo de desenvolvimento destes. Ainda, se

compararmos o número de indivíduos injetados que chegaram à fase adulta com o número de embriões injetados, observa-se que a maior parte dos ovos teve seu desenvolvimento comprometido por algum ou alguns fatores. O processo de microinjeção pode ser um dos fatores responsáveis pela mortalidade dos embriões. Sendo assim, as alterações observadas em muitos indivíduos podem ter sido geradas por influência do estresse imposto aos embriões nos estágios iniciais de desenvolvimento.

As análises por Southern Blot sugerem a ocorrência de dois eventos de mobilização do elemento *hobo*. Considerando o número total de isolinhagens estabelecidas, esperávamos encontrar um número maior de mobilizações, uma vez que a transposase foi fornecida por meio do plasmídeo pHFL1. Blackman *et al.* (1987) obtiveram uma frequência de transformação de 25% utilizando uma construção de *hobo* contendo uma inserção do gene *rosy*, microinjetado em linhagens E de *Drosophila melanogaster*. Já Gomez & Handler (1997) observaram uma taxa de transformação de aproximadamente 1% em *D. virilis*, corroborada com a taxa de 0,5% observada por Lozovskaya *et al.* (1996). Os autores sugerem que a diminuição no nível de transformação com *hobo* é devida ao fato de *D. virilis* ser uma espécie distantemente relacionada a *D. melanogaster*. Como este não é o caso de *D. simulans*, acreditamos que algum outro fator está influenciando na mobilidade do elemento *hobo* na linhagem *dpp-like* injetada, possivelmente um processo de regulação associado ao fato dessa linhagem não ser E, e possuir cópias de *hobo* em seu genoma.

Para a linhagem *white*, esperávamos que o *hobo*^{VA} fosse mobilizado pelo *hobo* canônico, mas não foi o que observamos, uma vez que não houve reversão de nenhum fenótipo mutante. Porém, ao contrário da linhagem *dpp-like*, um número muito menor de alterações foi observado dentre as isolinhagens. Isto sugere que deve haver um mecanismo de regulação de transposição agindo em *hobo*, e que este mecanismo pode ser dependente

do número de cópias presente no genoma da espécie hospedeira. Torres (dados não publicados) estabeleceu que o genoma de *D. simulans white* contém um maior número de elementos *hobo* do que *D. simulans dpp-like*. Porém, ainda se sabe pouco sobre os mecanismos que regulam o elemento *hobo*.

Castro & Carareto (2004), em um trabalho de revisão, apontam vários mecanismos que regulam a transposição do elemento *P*. Dentre eles está o mecanismo de regulação transcricional, no qual uma proteína de 66kDa, que conhecidamente é um regulador negativo da transposição tanto em tecidos somáticos como germinativos, é produzida. Essa proteína resulta da retenção do 3^o íntron em tecidos somáticos, os quais possuem um códon de terminação que a faz ser traduzida sem incluir a informação do terceiro éxon. Tanto o repressor de 66kDa como outras proteínas (KP, por exemplo) podem se ligar ao DNA e impedir o acesso da transposase do elemento *P* a esses locais. Elas também podem regular a transposição por alterar a atividade de proteínas requeridas para o processo de transposição. Alternativamente, as proteínas podem interagir diretamente com a transposase, formando um complexo incapaz de se ligar ao DNA do elemento *P*. Outro mecanismo proposto sugere que elementos *P* não autônomos podem reprimir a mobilidade do elemento *P*, ligando-se à transposase disponível e, conseqüentemente, diminuindo a concentração de transposase disponível para interação com elementos *P* funcionais. Já no modelo de inativação por multímeros, a proteína repressora forma um multímero inativo também com a transposase ou proteínas do hospedeiro requeridas para transposição. Ainda, um mecanismo de regulação por repressão de RNA anti-senso tem sido sugerido. Uma vez formadas, as moléculas anti-senso podem se ligar a moléculas de RNA senso produzidas por elementos *P* completos e bloquear seu

processamento e/ou tradução, ou ainda, podem causar sua degradação por meio de RNAses.

VI. CONCLUSÃO

A partir dos dados obtidos neste trabalho foi possível concluir que:

I) A metodologia de microinjeção desenvolvida é eficiente, uma vez que a taxa de transformação foi de 12,5%.

II) A injeção com plasmídeo contendo o gene para transposase de *hobo* não mobilizou o elemento *hobo*^{VA} em células germinativas na amostra estudada.

III) Observaram-se alterações morfológicas em indivíduos G₀ e em seus descendentes. Porém, estas alterações não se mantiveram nas gerações seguintes, sendo, portanto, uma indicação de alteração genética em células somáticas, ou alteração de origem epigenética.

IV) Essas alterações foram significativamente maiores na população *dpp-like*, mas não diferiram entre os tratamentos (injeção de *hobo* ou BlueScript).

V) Ocorreu mobilização do elemento *hobo* em linhagens de *D. simulans dpp-like*.

VI) Deve haver algum mecanismo regulando *hobo*, o qual parece ser dependente do genoma hospedeiro.

VII. PERSPECTIVAS

Para uma melhor análise dos efeitos da microinjeção sobre os embriões injetados realizaremos todos os passos descritos na metodologia de microinjeção de DNA sob temperatura controlada. Ainda, estabeleceremos mais um grupo controle, onde os embriões passarão por todos os procedimentos da técnica, com exceção da etapa de microinjeção. Com isso devemos verificar se as alterações observadas são fruto da variação de temperatura, da microinjeção, ou de outra forma de estresse.

Uma vez que a transposase é fornecida, elementos relacionados a *hobo*, como *hobo*^{VA}, podem ser mobilizados. A fim de confirmar ou não a ausência de mobilização do elemento *hobo*, até então detectada em *white*, aumentaremos o tamanho amostral dos embriões de *D. simulans white* injetados.

Realizaremos o “in vivo transient total excision assay” para detectar a mobilidade, ou não, do elemento *hobo* em embriões de *D. simulans*. Este procedimento já vem sendo testado com resultados animadores.

VIII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Atkinson** PW, Warren WD and O'Brochta DA (1993) The *hobo* transposable element of *Drosophila* can be cross-mobilized in house-flies and excises like the *Ac* element of maize. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 90: 9693-9697.
- Berghammer** AJ, Klingler M and Wimmer EA (1999) A universal marker for transgenic insects. Nature 402: 370-371.
- Blackman** RK and Gelbart WM (1989) *hobo* elements in *Drosophila melanogaster*. In: Berg, D. E.; Howe, M. M. (ed) Mobile DNA: 523-529. American Society for Microbiology, Washington, D. C.
- Blackman** RK, Grimaila R, Koehler MMD and Gelbart WM (1987) Mobilization of *hobo* elements residing withing the *decapentaplegic* gene complex: suggestion of a new hybrid dysgenesis system in *Drosophila melanogaster*. Cell 49: 497-505.
- Boussy** IA and Daniels SB (1991) *hobo* transposable elements in *Drosophila melanogaster* and *D. simulans*. Genet. Res. 58: 27-34.
- Brookfield** JF (2005) The ecology of the genome – mobile DNA elements and their hosts. Nat. Rev. Genet. 6: 128-136.
- Callegari-Jacques** SM (2003) Bioestatística: princípios e aplicações. Artmed. Porto Alegre, 255pp.
- Calvi** BR and Gelbart WM (1994) The basis for germline specificity of *hobo* transposable element in *Drosophila melanogaster*. EMBO J. 13: 1636-1644.
- Calvi** BR, Hong TJ, Findley SD and Gelbart WM (1991) Evidence for a common evolutionary origin of inverted repeat transposons in *Drosophila* and plants: *hobo*, *Activator* and *Tam3*. Cell 66: 465-471.
- Capy** P, Bazin C, Higuët D and Langin T (1998) Dynamics and Evolution of Transposable Elements. 1st. France: Landes Bioscience 197p.
- Cary** LC, Goebel M, Corsaro HH, Wang HH, Rosen E and Fraser MJ (1989) Transposon mutagenesis of baculoviruses: analysis of *Trichoplusia ni* transposon IFP2 inserions within the FP-Locus of nuclear polyhedrosis viruses. Virology 161: 8-17.
- Castro** JP and Carareto CMA (2004) *Drosophila melanogaster* *P* transposable elements: mechanisms of transposition and regulation. Genetica 121: 107-118.
- Craig** N (2002) Mobile DNA: an introduction. In: Craig N, Craigie R, Gellert M, Lambowitz AM. (ed) Mobile DNA II. ASM Press, Washington, DC, pp 3-11.

- Cummings** MP (1994) Transmission patterns of eukaryotic transposable elements: arguments for and against horizontal transfer. *Trends in Genetics and Evolution* 9: 141-145.
- Daniels** SB, Chovnick A and Boussy IA (1990). Distribution of *hobo* transposable elements in the genus *Drosophila*. *Mol. Biol. Evol.* 7: 589-606.
- Deprá** M, Sepel LN and Loreto EL (2004) A low-cost apparatus for transforming *Drosophila* and detecting green fluorescent protein (GFP) genetic markers. *Genet. Mol. Biol.* 27: 70-73.
- Dove** A (2002) Fluorescence Microscopy on a Microbudget. *The Scientist*, 16:47-48.
- Engels** WR and Preston CR (1979) Hybrid dysgenesis in *Drosophila melanogaster*: the biology of female and male sterility. *Genetics* 92: 161-174.
- Fadool** JM, Hartl DL and Dowling JE (1998) Transposition of the *mariner* element from *Drosophila mauritiana* in zebrafish. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 95:5182-5186.
- Fedoroff** N (2002) Control of a mobile DNA. In: Craig N, Craigie R, Gellert M, Lambowitz AM. (ed) *Mobile DNA II*. ASM Press, Washington, DC, pp 997-1007.
- Felts** K, Rogers B, Chen K, Ji H, Sorge J and Vaillancourt P (2000) Recombinant *Renilla reniformis* GFP displays low toxicity. *Strategies* 13: 85-87.
- Finnegan** DJ (1985) Transposable elements in eukaryotes. *Int. Ver. Cytol.* 93: 281-326.
- Finnegan** DJ (1989) Eukaryotic transposable elements and genome evolution. *Trends Genet.* 5: 103-107.
- Fujioka** M, Jaynes JB, Bejsovec A and Weir M (2000) Production of transgenic *Drosophila*. *Methods Mol. Biol.* 136:353-363.
- Galindo** MI, Bigot Y, Sánchez MD, Periquet G and Pascual L (2001) Sequences homologous to the *hobo* transposable element in E strains of *Drosophila melanogaster*. *Mol. Biol. Evol.* 18: 1532-1539.
- Galindo** MI, Ladeveze V, Lemeunier F, Kalmes R, Pèriquet G and Pascual L (1995) Spread of the autonomous transposable element *hobo* in the genome of *Drosophila melanogaster*. *Mol. Biol. Evol.* 12: 723-734.
- Geyer** PK, Spana C and Corces VG (1986) On the molecular mechanism of *gypsy*-induced mutations at the *yellow* locus of *Drosophila melanogaster*. *EMBO J.* 5: 2657-62.

- Gomez SP and Handler AM (1997)** A *Drosophila melanogaster* *hobo-white*⁺ vector mediates low frequency gene transfer in *D. virilis* with full interspecific *white*⁺ complementation. *Insect Mol. Biol.* 6(2): 165-171.
- Gordon JW and Ruddle FH (1981)**. Integration and stable germ line transformation of genes injected into mouse pronuclei. *Science* 214:1244-1246.
- Gossler A, Doetschman T, Kom R, Serfling E and Kemler R (1986)**. Transgenesis by means of blastocyst-derived embryonic stem cell line. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 83:9065-9069.
- Handler AM (2001)** A current perspective on insect gene transformation. *Insect Biochem Mol Biol.* 31:111-128.
- Handler AM (2002)** Use of the *piggyBac* transposon for germ-line transformation of insects. *Insect Biochem Mol Biol.* 32:1211-1220.
- Handler AM and Gomez SP (1995)** The *hobo* transposable elements has transposase-dependent and –independent excision activity in drosophilid species. *Mol Gen Genet* 247: 399-408.
- Handler AM and Gomez SP (1996)** The *hobo* transposable element excises and has related elements in tephritid species. *Genetics* 143: 1339-1347.
- Handler AM and Harrell RA (1999)** Germline transformation of *Drosophila melanogaster* with the *piggyBac* transposon vector. *Insect Mol Biol.* 8: 449-457.
- Handler AM, Gomez SP and O`Brochta DA (1993)** A functional analysis of the *P*-element gene-transfer vector in insects. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 22: 373-384.
- Handler AM, McCombs SD, Fraser MJ and Saul SH (1998)** The lepidopteran transposon vector, *piggyBac*, mediates germline transformation in the Mediterranean fruitfly. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 95: 7520-7525.
- Horn C and Wimmer EA (2000)** A versatile vector set for animal transgenesis. *Dev. Genes Evol.* 210: 630-637.
- Horn C, Jaunich B and Wimmer EA (2000)** Highly sensitive, fluorescent transformation marker for *Drosophila* transgenesis. *Dev. Genes Evol.* 210: 623-629.
- Horn C, Bernhard GM, Schmid FS and Wimmer EA (2002)** Fluorescent transformation markers for insect transgenesis. *Insect Biochem Mol Biol.* 32:1221-1235.
- Hurst GDD and Werren JH (2001)** The role of selfish genetic elements in eukaryotic evolution. *Nat. Rev. Genet.* 2: 597-606.

- Jaenisch R** (1976) Germ line integration and Mendelian transmission of the exogenous Moloney leukemia virus. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 73:1260-1264.
- Kaminker JS**, Bergman CM, Kronmiller B, Carlson J, Svirskas R, Patel S, Wheeler DA, Lewis SE, Rubin GM, Ashburner M and Celniker SE (2002) The transposable elements of the *Drosophila melanogaster* euchromatin: a genomics perspective. *Genome Biology* 3: 1-20.
- Karess RE** and Rubin GM (1984) Analysis of *P* transposable element functions in *Drosophila*. *Cell*. 38:135-46.
- Kimura K** and Kidwell MG (1994) Differences in *P* element population dynamics between the sibling species *Drosophila melanogaster* and *Drosophila simulans*. *Genet. Res.* 63: 27-38.
- Kidwell MG** (1992) Horizontal transfer of *P* elements and other short inverted repeat transposons. *Genetica* 86: 275-286.
- Kidwell MG** and Kidwell JF (1976) Selection for male recombination in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 84: 333-351.
- Kidwell MG** and Novy JB (1979) Hybrid dysgenesis in *Drosophila melanogaster*: sterility resulting from gonadal dysgenesis in the P-M system. *Genetics* 92: 1127-1140.
- Kidwell MG** and Lisch DR (1997) Transposable elements as sources of variation in animals and plants. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 94: 7704-7711.
- Kidwell MG** and Lisch DR (2000) Transposable elements and host genome evolution. *TREE* 15: 95-99.
- Kidwell MG** and Lisch DR (2002) Transposable elements as sources of genomic variation In: Craig N, Craigie R, Gellert M, Lambowitz AM. (ed) *Mobile DNA II*. ASM Press, Washington, DC, pp 59-90.
- Klinakis AG**, Loukeris TG, Pavlopoulos A and Savakis C (2000) Mobility assays confirm the broad host-range activity of the *minos* transposable element and validate new transformation tools. *Insect Mol Biol.* 9: 269-275.
- Ladeveze V**, Galindo I, Chaminade N, Pascual L, Periquet G and Lemeunier F (1998) Transmission pattern of *hobo* transposable element in transgenic lines of *Drosophila melanogaster*. *Genet. Res.* 71: 97-107.

- Ladeveze V**, Aulard S, Chaminade N, Biemont C, Periquet G and Lemeunier F (2001) Dynamics of the *hobo* transposable element in transgenic lines of *Drosophila melanogaster*. *Genet. Res.* 77: 135-142.
- Li W**, Gu Z, Wang H and Nekrutenko A (2001) Evolutionary analyses of the human genome. *Nature* 409: 847-849.
- Lim JK** (1988) Intracromosomal rearrangements mediated by *hobo* transposons in *Drosophila melanogaster*. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 85: 9153-9157.
- Loreto ELS**, Zaha A and Valente VLS (1998_a) Transposable elements in South American populations of *Drosophila simulans*. *Genet. Sel. Evol.* 30(2): 171-180.
- Loreto ELS**, Zaha A, Nichols C, Pollock JA and Valente VLS (1998_b) Characterization of a hypermutable strain of *Drosophila simulans*. *Cell. Mol. Life Sci.* 54: 1283-1290.
- Lozovskaya ER**, Nurminsky DI, Hartl DL and Sullivan DT (1996) Germline transformation of *Drosophila virilis* mediated by the transposable element *hobo*. *Genetics* 142: 173-177.
- Mackay TF**, Lyman RF and Jackson MS (1992) Effects of *P* element insertions on quantitative traits in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 130: 315-332.
- Marques EK**, Napp M, Winge H, Cordeiro AR (1966) A corn meal, soybean flour, wheat germ médium for *Drosophila*. *D.I.S.* 41: 187.
- McDonald JF** (1998) Transposable elements, gene silencing and macroevolution. *TREE* 13: 94-95.
- McGinnis W**, Shermoen AW and Beckendorf SK (1983) A transposable element insert just 5' to *Drosophila* glue protein gene alters gene expression and chromatin structure. *Cell* 34: 75-84.
- Newfeld SJ** and Takaesu NT (1999) Local transposition of a *hobo* element within the *decapentaplegic* locus of *Drosophila*. *Genetics* 151: 177-187.
- Pascual L** and Périquet G (1991) Distribution of *hobo* transposable elements in natural populations of *Drosophila melanogaster*. *Mol. Biol. Evol.* 8: 282-296.
- Périquet G**, Hamelin MH, Bigot I and Lepissier A (1989) Geographical and historical patterns of distribution of *hobo* elements in *Drosophila melanogaster* populations. *J. Mol. Evol.* 2: 223-229.

- Petrov DA, Schutzman JL, Martl D and Lozovskaya ER (1995)** Diverse transposable elements are mobilized in hybrid dysgenesis in *Drosophila virilis*. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 85: 6052-6056.
- Pinsker W, Haring E, Hagemann S and Miller WJ (2001)** The evolutionary life history of *P* transposons: from horizontal invaders to domesticated neogenes. Chromosoma 110: 148-158.
- Rio DC and Rubin GM (1988)** Identification and purification of a *Drosophila* protein that binds to the terminal 31-base-pair inverted repeats of the *P* transposable element. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 85: 8929-8933.
- Rubin GM and Spradling AC (1982)** Genetic transformation of *Drosophila white* transposable element vectors. Science 218: 348-353.
- Rubin GM, Kidwell MG and Bingham PM (1982)** The molecular basis of *Drosophila melanogaster* hybrid dysgenesis: The nature of induced mutations. Cell 29: 987-994.
- Sherman A, Dawson A, Mather C, Gilhooley H, Li Y, Mitchell R, Finnegan D and Sang H (1998)** Transposition of the *Drosophila* element *mariner* into the chicken germ line. Nature biotechnology 16:1050-1053.
- Simmons GM (1992)** Horizontal transfer of *hobo* transposable elements within the *Drosophila melanogaster* species complex: evidence from DNA sequencing. Mol. Biol. Evol. 9:1050-1060.
- Simmons GM, Plummer D, Simon A, Boussy IA, Frantsve J and Itoh M (1998)** Horizontal and vertical transmission of *hobo*-related sequences between *Drosophila melanogaster* and *Drosophila simulans*, pp. 285-294 In Horizontal Gene Transfer, edited by M. Syvanen & C.I. Kado. Chapman & Hall, New York.
- Smith D, Wohlgemuth J, Calvi BR, Franklin I and Gelbart WM (1993)** *hobo* enhancer trapping mutagenesis in *Drosophila* reveals an insertion specificity different from *P* element. Genetics 135: 1063-1076.
- Strand DJ and McDonald JF (1985)** *Copia* is transcriptionally responsive to environmental stress. Nucleic Acids Res 13: 4401-4410.
- Streck RD, MacGaffey JE and Beckendorf SK (1986)** The structure of *hobo* transposable elements and their insertion sites. EMBO J. 5: 3615-3623.

- Torres FP** (2001) Caracterização molecular de um mutante *white* de *Drosophila simulans*.
Dissertação de mestrado. PPG Genética e Biologia Molecular UFRGS, Porto Alegre, RS.
- Torres FP, Fonte LF, Valente VLS and Loreto ELS** (2005) Mobilization of a *hobo*-related sequence in the genome of *Drosophila simulans*. *Genetica* (aceito para publicação).
- Wimmer EA** (2003) Applications of insect transgenesis. *Nat. Rev. Gen.* 4: 225-232.
- Yannopoulos G and Zacharopoulos A** (1980) Studies on the chromosomal rearrangements induced by the male recombination factor 31.1 MRF in *Drosophila melanogaster*. *Mutat. Res.* 73: 81-92.
- Yannopoulos G, Zacharopoulos A and Stamatis N** (1982) Unstable chromosome rearrangements associated with male recombination in *Drosophila melanogaster*. *Mutat. Res.* 96: 41-51.
- Yannopoulos G, Stamatis N, Zacharopoulos A and Pelecanos M** (1983) Site-specific breaks induced by the male recombination factor 23.5 MRF in *Drosophila melanogaster*. *Mutat. Res.* 108: 185-202.
- Yannopoulos G, Stamatis N, Monastiriotti M, Hatzopoulos P and Louis C** (1987) *hobo* is responsible for the induction of hybrid dysgenesis by strains of *Drosophila melanogaster* bearing the male recombination factor 23.5 MRF. *Cell* 49: 487-495.
- Zar J** (1999) Biostatistical analysis. 4. ed. Upper Saddle River – NJ: Prentice-Hall.



A low-cost apparatus for transforming *Drosophila* and detecting green fluorescent protein (GFP) genetic markers

Maríndia Deprá¹, Lenira Maria Nunes Sepel² and Élgion Lucio da Silva Loreto²

¹Universidade Federal do Rio Grande do Sul, PPG Genética e Biologia Molecular, Porto Alegre, RS, Brazil.

²Universidade Federal de Santa Maria, Departamento de Biologia, Santa Maria, RS, Brazil.

Abstract

We describe the transformation of *white* mutant *Drosophila simulans* with a *piggyBac* transposon vector and a green fluorescent marker (GFP) and show how to construct inexpensive micro-manipulation and epifluorescence equipment for use in transposon-mediated germ-line transformation. Although the number of G₀ adult flies (16) obtained in relation to the number of injected eggs was very low (12.5%) it was comparable to the proportion described by other authors and can be considered as a good rate of transformation.

Key words: transgenic *Drosophila*, *piggyBac*, GFP, transposable elements.

Received: April 24, 2003; Accepted: October 12, 2003

Introduction

Transposon-mediated germ-line transformations have been the approach most extensively used to obtain transgenic insects and other animals (Handler, 2001). In this approach a DNA transposon is used in a binary vector/helper system that allows the precise and stable insertion of any desirable DNA sequence into the target genome. Although *P*-element transformation has been a routine technique for *Drosophila* researchers for more than twenty years (Rubin and Spradling, 1982), transposon-mediated germ-line transformations were restricted to this model organism because the *P* transposon is inactive in non-drosophilids (Rio and Rubin, 1988). More recently, this methodology has been extended to other insects (Klinakis *et al.*, 2000; Handler, 2001), fish (Fadool *et al.*, 1998) and chickens (Shermann *et al.*, 1998) due to the use of vectors containing various other transposons (*e.g. mariner, hermes, minos* and *piggyBac*) which are functional in a wide range of animals and require no additional cofactors for mobilization (Horn and Wimmer, 2000).

Until a few years ago, another obstacle to the use of transposon-mediated germ-line transformation was the difficulty in obtaining marker genes that permit easier and more reliable identification of transgenic animals. In general, a species-specific transformation marker can be generated by isolating visible mutations in the species of interest, cloning the corresponding gene and rescuing the mutant phenotype by the incorporation of a wild copy of this gene by transformation. However, this process is very laborious

for many species and often delays the development of new procedures. A universal marker that can be used to show gene transfer in any species is the green fluorescent protein (GFP) under the control of artificial promoters, this marker now being widely used in various species (Berghammer *et al.*, 1999; Horn and Wimmer, 2000; Horn *et al.*, 2000; 2002).

An additional restriction to the wide use of transposon-mediated germ-line transformation is the need for a micro-manipulator, micro-needles, micro-injection systems and, when the GFP marker is employed, a stereomicroscope equipped for epifluorescence. In this note we describe the transformation of *Drosophila simulans* with a GFP marker and show how to construct inexpensive micro-manipulation and epifluorescence equipment.

Material and Methods

Flies and the preparation of embryos

The *white* mutant strain (Torres, 2001) of *Drosophila simulans* was used as recipient for the marker. About 200 adult flies were transferred to a 300 mL empty bottle which was inverted over a petri dish containing banana medium consisting of 20% (w/v) banana, 1.5% (w/v) agar and sufficient food coloring to facilitate picking up of the eggs. After 30 min this first plate was removed and discarded because many of the embryos were old and partially developed at the time of laying, the bottle being placed on a second plate of the same medium for a further 30 min to allow the flies to deposit fresh embryos. Fine-tipped forceps were used to dechorionated the embryos by rolling them on double-sided

adhesive tape before transferring them to a slide where they were lightly fixed onto double-sided adhesive tape and desiccated over CaCl_2 for 2-5 min. To protect the eggs being from complete desiccation we covered them with halocarbon oil 700 (Sigma), Nujol mineral oil (liquid paraffin oil, available locally from pharmacies) also being tested as a cheaper alternative to halocarbon oil. After desiccation, the slide and embryos were transferred to a microscope for micro-injection by the method of Fujioka *et al.* (2000).

Plasmids

We used the pBac [3xp3-EGFPafm] (Horn and Wimmer, 2000) plasmid, containing the *piggyBac* transposon inverted terminal repeats (ITRs) and the GFP gene marker under the control of an artificial promoter containing three Pax-6 homo-dimer binding sites. This promoter drives strong expression of the GFP protein in the eye-tissues of larva, pupa and adult flies. The *piggyBac* transposase helper-plasmid used was the pBΔSac helper-plasmid with its 5' terminus deleted (Handler and Harrell, 1999).

Another plasmid set was used to investigate possible GFP toxicity in *D. simulans*, this set consisting of a *P* ele-

ment pCASPER construct, containing the mini-*white* gene along with the $\text{p}\pi 25.5$ plasmid containing the *P* element transposase gene (Karess and Rubin, 1984). All the plasmids were prepared using the PEG protocol (Fujioka *et al.*, 2000).

Injection procedure

To inject the DNA the embryos were lined up on slides and a micro-manipulator used to place a needle precisely at the posterior of the embryo. During injection, embryos need to be pushed against the needle, and it is better to do this by moving the microscope stage rather than the micro-manipulator controls. Since not all laboratories have access to a micro-manipulator we designed a micro-manipulation apparatus that uses the mechanical stage control of an old microscope. In our apparatus the stage verniers, control screws, slide holder and retaining clip are fixed onto a plate attached to a Leitz stereo-microscope lamp-support in such a way that the plate can move vertically and horizontally, this plate serving as a support for the embryo-injection needle (Figure 1).

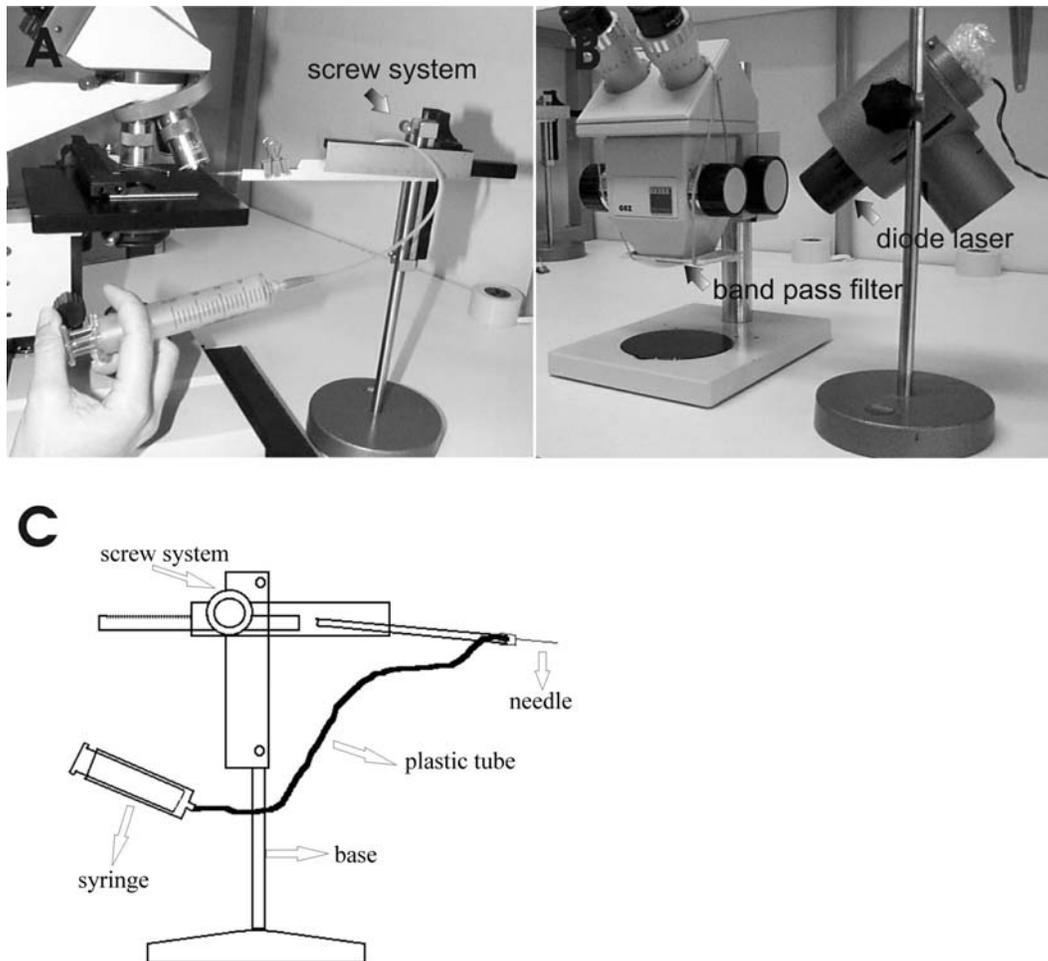


Figure 1 - A: Micro-manipulation apparatus based on a mechanical microscope stage. B: Stereo-microscope with a band-pass filter added to the objective lens and a laser diode. C: Diagram of the main parts of the micro-manipulation apparatus.

We tested several different micro-injection systems employing micropipettes and syringes of various volumes attached to polyethylene tubes filled with paraffin oil, water or air and found that the simplest and most efficient system consisted of a 20 mL glass syringe attached to an intravenous injection 'butterfly' tube with a yellow micro-pipette tip glued to its free end to serve as a needle-holder (Figure 1). Needles were made from 0.2 mm internal diameter capillary tubes (Hyalotech laboratory, Chemistry Department, Federal University of Santa Maria, Santa Maria-RS, Brazil) by hand-pulling these capillaries over the flame of an alcohol lamp to produce capillaries so thin that they were invisible to the naked eye, a microscope being used to visualize the capillaries in order to break them with a shape scalpel and form fine needle-ends. The finest needles were glued with cyanoacrylic instant adhesive (SuperBonder®) onto a 10 µL micro-pipette tip, this arrangement allowing faster and easier needle replacement.

This apparatus was used to inject the embryos with ultra-pure water to which had been added 200 ng/µL of each vector and helper plasmid.

Epifluorescence microscopy

The excitation wavelength of GFP is between 480 ± 40 nm, detection of GFP normally requiring a microscope fitted with expensive high-voltage epifluorescence equipment. In our experiments we tested two different light sources, one consisting of inexpensive violet light-emitting diodes (LEDs, obtainable from electronic component stores) fed with a cheap power supply (Dove, 2002) and the other made from laser diodes (405 nm, 5 mW maximum output). For both systems we used a 510 nm emission band-pass filter attached to the objective lens of a Zeiss stereo-microscope (Figure 1-B). The observations were done in a darkroom with the operator wearing UV-blocking safety glasses.

Results and Discussion

Our results show that it was indeed possible to transform flies with GFP using the low-cost micro-injection and epifluorescence equipment described above. Although the

number of adult flies obtained in relation to the number of injected eggs was low (Table 1), it was comparable to the proportion previously described by Horn *et al.* (2000 and 2002).

Transformation frequency is normally reported as the percentage of transformed flies in relation to fertile adults in the G_0 generation. Working with various insects, Handler (2002) reported *piggyBac* transformation frequencies ranging from about 1-2% to more than 40% for fertile G_0 members. We found two transformed flies out of a total of 16 G_0 adult flies (12.5%), which can be considered a good rate of transformation.

Felts *et al.* (2000) and Handler (2002) reported that GFP expression can be toxic to some insects, which may account for the low production of larvae and G_0 flies with the GFP construct as compared to larvae and G_0 flies containing the mini-*white* plasmid construct (Table 1).

Transformed flies were not obtained with the pCASPER construct (a *P* element combined with a mini-*white* gene), which may have been due to the fact that only a few eggs were injected with this combination and that the *P* element is not so efficient at transforming *D. simulans* (Kimura and Kidwell 1994).

Although mineral oil is cheaper and easier to obtain, halocarbon oil appeared to be more effective than mineral oil at protecting eggs from desiccation, in one case six times more larvae being obtained using halocarbon oil (Table 1).

Although LEDs permitted separation of transformed flies from untransformed flies the quality of the images was not as high as when laser diodes were used, laser diodes being highly efficient at producing good visualization of fluorescent eyes (Figure 2) and justifying the extra cost involved in purchasing these diodes.

In the near future more and more transposon-mediated germ-line transformations will be used to obtain transgenic insects and other animals for both academic and applied research. In this note we have described some procedures that permit laboratories that do not have the resources to buy commercial micro-manipulators and epifluorescence equipment to use transposon-mediated germ-line transformation technology in their research programs.

Table 1 - Number and frequency of injected eggs and other developmental stages of *Drosophila simulans* injected with *piggyBac* and *P* element plasmids.

<i>Drosophila simulans</i>	<i>PiggyBac</i> - GFP plasmids		<i>P</i> element - <i>white</i> plasmids			
	Halocarbon oil		Halocarbon oil		Mineral oil	
	Number	%	Number	%	Number	%
Injected eggs	1680	100	30	100	126	100
Larvae	36	2.14	12	40	9	7.14
Pupae	31	1.85	9	30	2	1.59
G_0 adult flies	16	0.95	4	13.3	2	1.59
Transformed adult flies	2	0.12	0	-	0	-

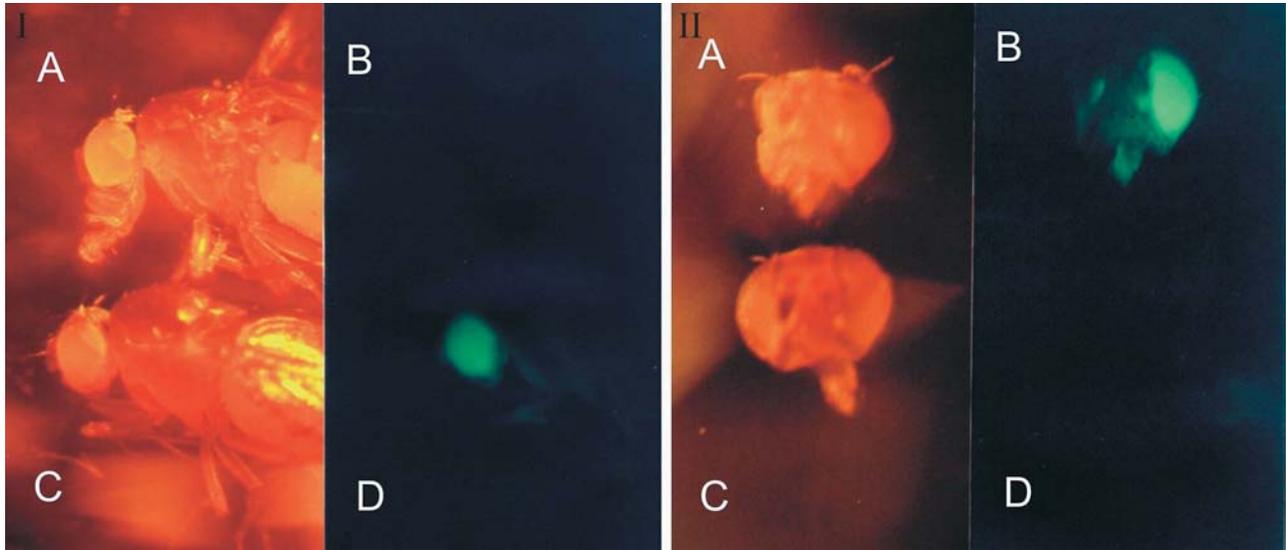


Figure 2 - Stereo-photomicrographs of *Drosophila simulans*. In the first part of the figure (I) the top fly (A and B) is untransformed and the bottom fly (C and D) is *piggyBac* GFP transformed. In the second part of the figure (II) the top fly is transformed and the bottom fly is a control. Columns A and C show flies illuminated with white light while columns B and D show flies illuminated with UV light.

Acknowledgments

This work was supported by grants from FAPERGS (numbers 01/0927.4 and 00513957) and FIPE-UFSM (number 10100). We thank ISBiothec Ltda (Porto Alegre, RS) for providing laser diodes and filters, Dr. Tarso Kist (Department of Biophysics -UFRGS) for help regarding the fluorescence detection systems, Dr. Neri Paniz (Hyalotechnique laboratory, UFSM) for providing the capillaries. The *pBac* plasmid and *pBΔSac* helper-plasmid were kindly provided by Dr. Ernest Wimmer (Universität Bayreuth, Germany).

References

- Berghammer AJ, Klingler M and Wimmer EA (1999) A universal marker for transgenic insects. *Nature* 402:370-371.
- Dove, A (2002) Fluorescence Microscopy on a microbudget. *The Scientist* 16:47-48.
- Fadool JM, Hartl DL and Dowling JE (1998) Transposition of the *mariner* element from *Drosophila mauritiana* in zebrafish. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:5182-5186.
- Felts K, Rogers B, Chen K, Ji H, Sorge J and Vaillancourt P (2000) Recombinant *Renilla reniformis* GFP displays low toxicity. *Strategies* 13:85-87.
- Fujioka M, Jaynes JB, Bejsovec A and Weir M (2000) Production of transgenic *Drosophila*. *Methods in Molecular Biology* 136:353-363.
- Handler AM (2002) Use of the *piggyBac* transposon for germ-line transformation of insects. *Insect Biochem Mol Biol* 32:1211-1220.
- Handler AM (2001) A current perspective on insect gene transformation. *Insect Biochem Mol Biol* 31:111-128.
- Handler AM and Harrell RA (1999) Germline transformation of *Drosophila melanogaster* with the *piggyBac* transposon vector. *Insect Mol Biol* 8:449-457.
- Horn C, Jaunich B and Wimmer EA (2000) Highly sensitive, fluorescent transformation marker for *Drosophila* transgenesis. *Dev Genes Evol* 210:623-629.
- Horn C and Wimmer EA (2000) A versatile vector set for animal transgenesis. *Dev Genes Evol* 210:630-637.
- Horn C, Bernhard GM, Schmid FS and Wimmer EA (2002) Fluorescent transformation markers for insect transgenesis. *Insect Biochem Mol Biol* 32:1221-1235.
- Karess RE and Rubin GM (1984) Analysis of *P* transposable element functions in *Drosophila*. *Cell* 38:135-46.
- Kimura K and Kidwell MG (1994) Differences in *P* element population dynamics between the sibling species *Drosophila melanogaster* and *Drosophila simulans*. *Genet Res* 63:27-38.
- Klinakis AG, Loukeris TG, Pavlopoulos A and Savakis C (2000) Mobility assays confirm the broad host-range activity of the *Minos* transposable element and validate new transformation tools. *Insect Mol Biol* 9:269-275.
- Rio DC and Rubin GM (1988) Identification and purification of a *Drosophila* protein that binds to the terminal 31-base-pair inverted repeats of the *P* transposable element. *Proc Natl Acad Sci USA* 85:8929-33.
- Rubin GM and Spradling AC (1982) Genetic transformation of *Drosophila* with transposable element vectors. *Science* 218:348-353.
- Sherman A, Dawson A, Mather C and Finnegan D (1998) Transposition of the *Drosophila* element *mariner* into the chicken germ-line. *Nature Biotech* 16:1050-1053.
- Torres FP (2001) Caracterização molecular de um mutante *white* de *Drosophila simulans*. Dissertação de mestrado, PPG Genética e Biologia Molecular UFRGS, Porto Alegre.

Editor: Louis Bernard Claczko