

Mapeamento físico cromossômico e suas contribuições para a compreensão da evolução do genoma dos peixes

Chromosome physical mapping and its contribution to the fish genome evolution understanding

C. Martins¹

RESUMO

A localização cromossômica de seqüências de DNA e genes representa uma importante estratégia para a resolução de diversas questões e temas como caracterização cariotípica, rearranjos cromossômicos, estudos comparativos, genômica integrativa e evolução. Neste trabalho são reunidas e discutidas informações acerca dos avanços realizados em relação ao mapeamento físico de genes e seqüências de DNA nos cromossomos dos peixes. Uma vez que os peixes ocupam posição basal nos vertebrados, os estudos de mapeamento físico de genes permitem análises comparativas que contribuem no esclarecimento de diversos aspectos relacionados à organização e evolução do genoma dos vertebrados.

Palavras chave: cromossomos, mapeamento cromossômico, genoma, evolução

ABSTRACT

Chromosome location of DNA sequences and genes represents an important tool in the elucidation of several aspects of karyotype characterization, chromosome rearrangements, comparative studies, integrative genomics and evolution. In this work information related to physical mapping of genes and DNA sequences in the fish chromosomes are organized and discussed. Since the fishes are in a basal position in the vertebrate group, the physical genes mapping permits comparative analysis that contribute to the clarification of several aspects related to the genome organization and evolution of vertebrates.

Key words: chromosomes, chromosome mapping, genome, evolution

INTRODUÇÃO

Os peixes apresentam uma plasticidade genômica não evidenciada em qualquer outro grupo de vertebrados. O conteúdo de DNA das células haplóides pode variar de 0,39 picogramas (pg) a 248 pg entre as espécies e o seu número cromossômico pode variar de $2n=16$ a $2n=446$. A presença de polimorfismos cromossômicos como cromossomos supernumerários, poliploidia e variações estruturais, representa outra característica que se destaca no genoma deste grupo. Entre as diversas formas de análises do genoma, o mapeamento físico cromossômico de genes e seqüências de DNA representa uma ferramenta bastante útil para resolução de diversas questões e temas como caracterização cariotípica, rearranjos cromossômicos, estudos comparativos, genômica integrativa e evolução. Particularmente em relação ao genoma dos peixes, as análises de mapeamento cromossômico têm contribuído de forma significativa para o conhecimento de diversos aspectos envolvendo estrutura cromossômica, cromossomos sexuais, cromossomos supernumerários e evolução cariotípica. Embora nas últimas duas décadas uma grande soma de estudos tenha sido realizada em muitas espécies de peixes, estas análises estiveram relacionadas principalmente a caracterização cariotípica básica e poucos trabalhos foram conduzidos no campo da organização de genes e seqüências de DNA nos cromossomos. Grande parte da informação relacionada com a localização de seqüências de DNA nos cromossomos dos peixes, se refere a seqüências repetitivas de DNA como

¹ Doutor, Professor de Biologia Celular, Departamento de Morfologia, Instituto de Biociências, UNESP - Universidade Estadual Paulista, , 18618-000, Botucatu, SP, Brasil. Telephone/Fax: ++55(14)38116264, E-mail: cmartins@ibb.unesp.br

DNAs ribossomais, DNAs satélites e elementos transponíveis. Apenas alguns poucos genes cópia única ou com poucas cópias tem sido mapeados nos cromossomos deste grupo de vertebrados. Estas análises têm possibilitado novas interpretações acerca da diversidade organizacional dos cromossomos dos peixes e consequentemente da sua organização genômica.

Genes cópia única/poucas cópias

A localização cromossômica de seqüências de DNA cópia única tem sido pouco realizada em peixes devido à dificuldade na geração de sinal a partir da hibridização de sondas representadas por uma pequena seqüência de DNA e que não se encontra repetida no genoma. Mais recentemente, a utilização de BACs (Bacterial Artificial Chromosomes) contendo grandes segmentos do genoma como sonda, tem possibilitado a identificação por FISH (Fluorescence *in situ* hybridization) de genes cópia única em cromossomos de espécies de peixes (Tabela 1). Como exemplos, o gene do hormônio do crescimento (GH2-D) foi localizado nos cromossomos dos salmões *O. mykiss* e *O. kisutch* (Iturra *et al.* 2001) e o gene da tirosina quinase neurotrófica foi localizado nos cromossomos do zebrafish *Danio rerio* (Sola e Gornung 2001). Muito ainda necessita ser feito relativo à detecção de genes de cópia única em peixes e essa é sem dúvida uma das grandes perspectivas dos estudos de FISH nesses animais. A localização cromossômica desses genes será de grande importância no estabelecimento de grupos de ligação, base para a construção de mapas genéticos das espécies. A utilização de BACs como sondas permitirá relacionar dados citológicos a mapas de ligação assim como a mapas de seqüenciamento nucleotídico, permitindo integrar as diversas formas de análise do genoma.

Tabela 1: Genes cópia única mapeados nos cromossomos de espécies de peixes.

Espécies	Genes mapeados	Referência
<i>Ictalurus punctatus</i>	IgH	Zhang <i>et al.</i> 1997
<i>Onchrorhynchus mykiss</i>	GH2	Iturra <i>et al.</i> 2001
<i>Danio rerio</i>	Tirosina quinase	Sola e Gornung 2001
<i>Oryzias latipes</i>	DMY	Matsuda <i>et al.</i> 2002
<i>Oreochromis niloticus</i>	Aromatases	Harvey <i>et al.</i> 2003
<i>Fugu rubripes</i>	α e β globinas	Gillemans <i>et al.</i> 2003
<i>Notothenia coriiceps</i> , <i>Notothenia angustata</i> , <i>Trematomus hansonii</i> , <i>Trematomus pennellii</i> , <i>Chionodraco hamatus</i> , <i>Channichthys rhinoceratus</i>	α e β globinas	Pisano <i>et al.</i> 2003
<i>Trematomus bernacchii</i> , <i>T. borchgrevinkii</i> , <i>T. Eulepidotus</i> , <i>T. hansonii</i> , <i>T. Lepidorhinus</i> , <i>T. Loennbergii</i> , <i>T. Newnesi</i> , <i>T. Nicolai</i> , <i>T. Pennellii</i> , <i>T. Scotti</i> , <i>Notothenia coriiceps</i> , <i>Eleginops maclovinus</i>	IgH	Pisano <i>et al.</i> 2007

Genes ribossomais

O mapeamento físico cromossômico de genes ribossomais representou as primeiras formas de localização de segmentos de DNA nos cromossomos das espécies e ganhou grande destaque devido à facilidade de obtenção de sinais nos cromossomos. Além disso, as marcas cromossômicas obtidas podem encontrar grande aplicação nos estudos de caracterização cariotípica, detecção de variações estruturais nos cromossomos, evolução cromossômica e genômica e detecção de polimorfismos populacionais. Dentre os membros da

família codificadora dos RNAs ribossomais, os genes ribossomais 5S têm apresentado padrões de organização cromossômica que têm fornecido importantes contribuições a compreensão da dinâmica evolutiva das famílias multigênicas no genoma.

A localização cromossômica de genes RNAr 5S já foi descrita para mais de 60 espécies de peixes, incluindo representantes das ordens Acipenseriformes, Anguilliformes, Cypriniformes, Characiformes, Salmoniformes, Perciformes e Tetraodontiformes (para revisão, Martins e Wasko 2004). Estudos envolvendo peixes characiformes do gênero *Leporinus* mostraram padrões particulares de organização para os genes ribossomais 5S com a presença de distintas classes destes genes em um mesmo genoma (Martins e Galetti 2001). Padrões semelhantes de organização genômica foram posteriormente descritos para diversas outras espécies de peixes, mostrando que tal condição poderia representar uma característica geral para os peixes. Para diversas espécies do gênero *Leporinus* foram detectadas duas classes de repetições denominadas de DNAr 5S tipo I e DNAr 5S tipo II que estavam localizadas em diferentes cromossomos (Figura 1). As repetições do DNAr 5S do tipo I apresentavam 896 pares de bases (pb) incluindo 120 pb codificantes do gene RNAr 5S e o restante equivalendo a DNA espaçador. Por outro lado, as repetições do DNAr 5S do tipo II apresentavam 220 pb incluindo 120 pb codificantes do gene RNAr 5S e o restante equivalendo a DNA espaçador. A hibridação cromossômica mostrou que o DNAr 5S do tipo I é representado por um número reduzido de cópias enquanto o DNAr 5S do tipo II é representado por um grande número de cópias. Os resultados obtidos para o gênero *Leporinus* sugerem a ocorrência de homogeneização nas repetições presentes em um mesmo cluster que podem divergir grandemente em relação às repetições presentes em outros clusters. A organização das diferentes classes de DNAr 5S em diferentes cromossomos reforça a idéia de que diferentes sítios cromossômicos de DNA ribossomal possuam diferentes tipos de unidades repetitivas, governadas por mecanismos evolutivos independentes.

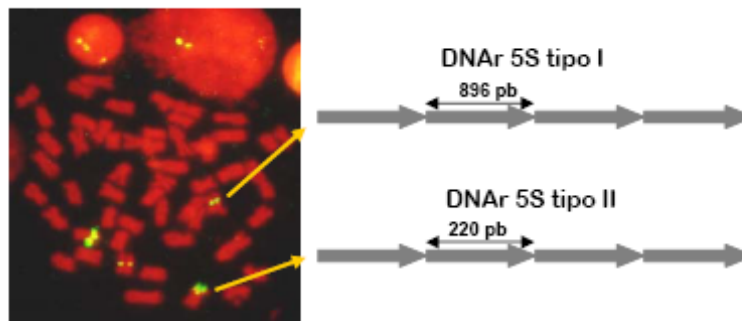


Figura 1: Distribuição dos sítios cromossômicos e organização das repetições de DNAr 5S no genoma do peixe *Leporinus elongatus*.

DNAs repetitivos

Em relação à organização cromossômica, uma das frações mais estudadas de seqüências repetitivas equivale aos DNAs satélites. Esta classe de DNAs repetitivos está organizada em grandes clusters localizados preferencialmente na região centromérica e telomérica da maioria dos cromossomos e representam o principal componente das heterocromatinas nos peixes. Uma atenção particular tem sido direcionada às seqüências repetitivas presentes

nos cromossomos sexuais. DNAs satélite têm sido isolados e mapeados nos cromossomos sexuais de diversas espécies, incluindo *Leporinus elongatus* (Nakayama *et al.* 1994), *Chiondraco hamatus* (Capriglione *et al.* 1994), *Poecilia reticulata* (Nanda *et al.* 1990) e *Oncorhynchus tshawytscha* (Stein *et al.* 2001). Repetições curtas tipo-satélites (minissatélites e microssatélites) também têm sido mapeadas nos cromossomos de diversas espécies de peixes. Os microssatélites estão localizados essencialmente nas regiões heterocromáticas (telômeros, centrômeros e cromossomos sexuais) do genoma dos peixes. Estudos de DNAs satélites tem se mostrado úteis no esclarecimento de uma miríade de questões que norteiam a citogenética de peixes, incluindo estrutura centromérica e origem e evolução dos cromossomos sexuais e supernumerários. Os DNAs satélites podem encontrar ainda aplicação no mapeamento físico do genoma contribuindo para a identificação de marcadores de significativa importância para a biologia básica e aplicada das espécies de peixes.

Uma outra classe de seqüências repetitivas exploradas como marcadores citogenéticos são os transposons. O genoma dos peixes contém todos os tipos de elementos transponíveis e alguns deles já foram mapeados nos cromossomos dos peixes. Dentre as espécies analisadas podemos destacar *Tetraodon nigroviridis* (Fischer *et al.* 2000), *Oreochromis niloticus* (Oliveira *et al.* 1999), *Alburnus alburnus* (Ziegler *et al.* 2003) e peixes nototenoídeos da Antártica (Ozouf-Costaz *et al.* 2004). Os elementos transponíveis estão compartimentalizados em heterocromatinas e não estão distribuídos aleatoriamente ao longo do genoma.

As seqüências repetitivas, de uma forma geral, estão organizadas preferencialmente na região centromérica e telomérica da maioria dos cromossomos e também nos cromossomos sexuais. Isso foi observado nos cromossomos da tilápia do Nilo *O. niloticus* através do mapeamento de DNA Cot1 (DNA genômico enriquecido com seqüências altamente repetitivas) e BACs ricos em seqüências repetitivas como DNAs satélites e transposons (Ferreira e Martins, *in press*) (Figura 2). As seqüências repetitivas hibridam preferencialmente nas regiões centroméricas, teloméricas e nos cromossomos sexuais X e Y desta espécie.

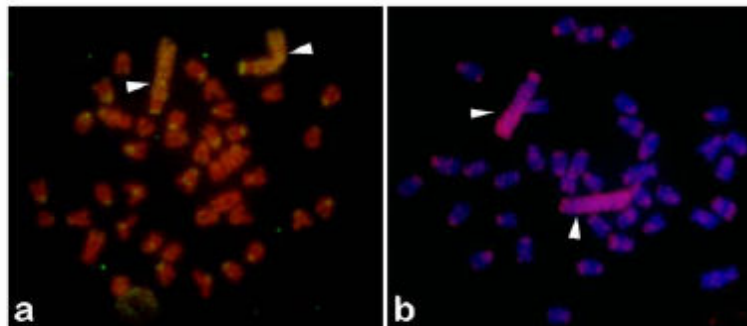


Figura 2: Distribuição de seqüências repetitivas de DNA nos cromossomos da tilápia do Nilo *O. niloticus* identificadas através da hibridação de BAC enriquecido com seqüências repetitivas (a) e de DNA Cot1 (b). Os cromossomos sexuais X e Y encontram-se destacados por setas.

CONCLUSÃO

A constante presença de seqüências repetitivas nos cromossomos sexuais dos peixes indica que estas seqüências têm apresentado um papel importante na diferenciação e evolução dos cromossomos sexuais nas espécies que os possuem.

AGRADECIMENTOS

O autor agradece à FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) e CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) pelo apoio financeiro recebido.

BIBLIOGRAFIA

- Capriglione, T; Morescalchi, A; Olmo, E; Rocco, L; Stingo, L; Manzo, S. 1994. Satellite DNAs heterocromatin and sex chromosomes in *Channodraco hamatus* (Channichthyidae, Perciformes). *Polar Biol* 14:285-290.
- Ferreira, I.A; Martins, C. 2007. Physical chromosome mapping of repetitive DNA sequences in Nile tilapia *Oreochromis niloticus*: evidences for a differential distribution of repetitive elements in the sex chromosomes. *Micron* (in press).
- Fischer, C; Ozouf-Costaz, C; Crollius, HR; Dasilva, C; Jaillon, O; Bouneau, L; Bonillo, C; Weissenbach, J; Bernot, A. 2000. Karyotype and chromosomal location of characteristic tandem repeats in the pufferfish *Tetraodon nigroviridis*. *Cytogenet Cell Genet.*, 88:50-55.
- Gillemans, N; McMorrow, T; Tewari, R; Wai, A.W; Burgdorf, C; Drabek, D; Ventress, N; Langeveld, A; Higgs, D; Tan-Un, K; Grosveld, F; Philipsen, S. 2003. Functional and comparative analysis of globin loci in pufferfish and humans. *Blood*, 101: 2842-2849.
- Harvey, S.C; Kwon, J.Y; Penman, D.J. 2003. Physical mapping of the brain and ovarian aromatase genes in the Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus*, by fluorescence in situ hybridization. *Animal Genet.*, 34: 62-64.
- Iturra, P; Lam, N; Fuente, M; Vergara, N; Medrano, J.F. 2001. Characterization of sex chromosomes in rainbow trout and coho salmon using fluorescence *in situ* hybridization (FISH). *Genetica*, 111:125-131.
- Martins, C; Wasko, A.P. 2004. Organization and evolution of 5S ribosomal DNA in the fish genome. In Williams CR (ed) *Focus on Genome Research*. Nova Science Publishers, Hauppauge, NY, pp 289-318.
- Martins, C; Galetti Jr, P.M. 2001. Organization of 5S rDNA in species of the fish *Leporinus*: two different genomic locations are characterized by distinct nontranscribed spacers. *Genome*, 44:903-910.
- Matsuda, M; Nagahama, Y; Shinomiya, A; et al. 2002. DMY is a Y-specific DM-domain gene required for male development in the medaka fish. *Nature*, 417: 559-563.
- Nakayama, I; Foresti, F; Tewari, R; Scharl, M; Chourrout, D. 1994. Sex chromosome polymorphism and heterogametic males revealed by two cloned DNA probes in the ZW/ZZ fish *Leporinus elongatus*. *Chromosoma*, 103:31-39.
- Nanda, I; Feichtinger, W; Schmid, M; Schroder, J.H; Zischler, H; Epplen, J.T. 1990. Simple repetitive sequences are associated with the differentiation of the sex chromosomes in the guppy fish. *J Mol Evol* 30:456-462.
- Oliveira, C; Chew, J.S.K; Porto-Foresti, F; Dobson, M; Wright, J.M. 1999. A LINE2 repetitive element from the cichlid fish, *Oreochromis niloticus*: Sequence analysis and chromosomal distribution. *Chromosoma*, 108:457-468.
- Ozouf-Costaz, C; Brandt, J; Karting, C; Pisano, E; Bonillo, C; Coutanceau, J.P; Volff, J.N. 2004. Genome dynamics and chromosomal localization of the non-LTR retrotransposons Rex1 and Rex3 in Antarctic fish. *Antarctic Science*, 16: 51-57.
- Pisano, E; Cocca, E; Mazzei, F; Ghigliotti, L; Prisco, G; Detrich III, H.W; Ozouf-Costaz, C. 2003. Mapping of α - and β -globin genes on Antarctic fish chromosomes by fluorescence *in-situ* hybridization. *Chromosome Res.*, 11: 633-640.
- Pisano, E; Coscia, M.R; Mazzei, F; Ghigliotti, L; Coutanceau, P; Ozouf-Costaz, C; Oreste, U. 2007. Cytogenetic mapping of immunoglobulin heavy chain genes in Antarctic fish. *Genetica*, 130: 9-17.
- Sola, L; Gornung, E. 2001. Classical and molecular cytogenetics of the zebrafish, *Danio rerio* (Cyprinidae, Cypriniformes): an overview. *Genetica*, 111:397-412.
- Stein J, Phillips RB, Devlin RH (2001). Identification of the Y chromosome in chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). *Cytogenet Cell Genet.*, 92:108-110.
- Zhang, Q; Cooper, RK; Riersch, T.R. 1997. Detection of a single-locus gene on channel catfish chromosomes by *In-Situ* polymerase chain reaction. *Comp Biochem Physiol.*, 118B: 793-796.
- Ziegler, C.G; Lamatsch, D.K; Steinlein, C; Engel, W; Scharl, M; Schmid, M. 2003. The giant B chromosome of the cyprinid fish *Alburnus alburnus* harbours a retrotransposon-derived repetitive DNA sequence. *Chromosome Res.*, 11: 23-35.