UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Instituto de Ciências Biológicas

Departamento de Genética, Ecologia e Evolução

Programa de Pós-graduação em Genética

Rafaella Ferreira Soares

EVOLUÇÃO DO GENE DA PROTEÍNA CENTROMÉRICA CENP-C EM ESPÉCIES DE *DROSOPHILA* DO GRUPO *MONTIUM*

Belo Horizonte

2022

Rafaella Ferreira Soares

EVOLUÇÃO DO GENE DA PROTEÍNA CENTROMÉRICA CENP-C EM ESPÉCIES DE *DROSOPHILA* DO GRUPO *MONTIUM*

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Genética da Universidade Federal de Minas Gerais como pré-requisito obrigatório para obtenção do título de Mestre em Genética, área de concentração Genômica e Bioinformática.

Orientador: Dr. Gustavo Campos e Silva Kuhn

Coorientador: Dr. Leonardo Barbosa Koerich

Belo Horizonte

2022

043 Soares, Rafaella Ferreira.
Evolução do gene da proteína centromérica Cenp-C em espécies de Drosophila do grupo montium [manuscrito] / Rafaella Ferreira Soares. – 2022.
70 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Dr. Gustavo Campos e Silva Kuhn. Coorientador: Dr. Leonardo Barbosa Koerich.
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Genética.

1. Genômica. 2. Centrómero. 3. Drosophila. 4. Duplicação Gênica. 5. Proteína Centromérica A. I. Kuhn, Gustavo Campos e Silva. II. Koerich, Leonardo Barbosa. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 575

Ficha catalográfica elaborada pela bibliotecária Fabiane C M Reis – CRB 6 – 2680

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Genética

ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO / TESE

ATA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO	**320/2022** **entrada**
Rafaella Ferreira Soares	**2º/2019** **CPF: 113.558.496-67**

Às quatorze horas do dia **28 de janeiro de 2022**, reuniu-se remotamente (virtualmente) a Comissão Examinadora de Dissertação, indicada pelo Colegiado do Programa, para julgar, em exame final, o trabalho intitulado: **"Evolução do gene da proteína centromérica Cenp-C em espécies de Drosophila do grupo montium"**, requisito para obtenção do grau de Mestre em **Genética.** Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, **Gustavo Campos e Silva Kuhn**, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra à candidata, para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos Examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença da candidata e do público, para julgamento e expedição de resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações:

Prof./Pesq.	Instituição	CPF	Indicação
Gustavo Campos e Silva Kuhn	UFMG	260.136.648-62	Aprovada
Leonardo Barbosa Koerich	UFMG	033.549.409-99	Aprovada
Francisco Pereira Lobo	UFMG	012.273.736-94	Aprovada
Maria Dulcetti Vibranovski	USP	076.362.867-00	Aprovada

Pelas indicações, a candidata foi considerada: **Aprovada**

O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ATA, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora.

Belo Horizonte, 28 de janeiro de 2022.

Gustavo Campos e Silva Kuhn (UFMG)

Leonardo Barbosa Koerich (UFMG)

Francisco Pereira Lobo (UFMG)

Maria Dulcetti Vibranovski (USP)

Assinatura dos membros da banca examinadora:

Documento assinado eletronicamente por **Francisco Pereira Lobo**, **Professor do Magistério Superior**, em 28/01/2022, às 17:58, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.

Documento assinado eletronicamente por **Maria Dulcetti Vibranovski**, **Usuário Externo**, em 28/01/2022, às 18:03, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.

Documento assinado eletronicamente por **Gustavo Campos e Silva Kuhn**, **Professor do Magistério Superior**, em 28/01/2022, às 18:12, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.

Documento assinado eletronicamente por **Leonardo Barbosa Koerich**, **Professor do Magistério Superior**, em 31/01/2022, às 08:53, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.

A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1217421** e o código CRC **7D6C6E55**.

Referência: Processo nº 23072.204948/2022-16 SEI nº 1217421

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Genética

FOLHA DE APROVAÇÃO

"Evolução do gene da proteína centromérica Cenp-C em espécies de Drosophila do grupo montium"

Rafaella Ferreira Soares

Dissertação aprovada pela banca examinadora constituída pelos Professores:

Gustavo Campos e Silva Kuhn
UFMG

Leonardo Barbosa Koerich
UFMG

Francisco Pereira Lobo
UFMG

Maria Dulcetti Vibranovski
USP

Belo Horizonte, 28 de janeiro de 2022.

Documento assinado eletronicamente por **Francisco Pereira Lobo**, **Professor do Magistério Superior**, em 28/01/2022, às 17:58, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.

Documento assinado eletronicamente por **Maria Dulcetti Vibranovski**, **Usuário Externo**, em 28/01/2022, às 18:03, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.

Documento assinado eletronicamente por **Gustavo Campos e Silva Kuhn**, **Professor do Magistério Superior**, em 28/01/2022, às 18:12, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.

Documento assinado eletronicamente por **Leonardo Barbosa Koerich**, **Professor do Magistério Superior**, em 31/01/2022, às 08:53, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.

A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1217442** e o código CRC **9CFC37C8**.

Referência: Processo nº 23072.204948/2022-16 SEI nº 1217442

Dedico essa dissertação a todos os professores que possibilitam a disseminação e perpetuação do conhecimento científico.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à minha família que me deu suporte financeiro e apoio emocional para manter meus estudos e que também foram em grande parte responsáveis pelo meu crescimento pessoal e profissional. E não menos importante às minhas cachorrinhas Nina e Pipoca que eu amo tanto e que sempre me fazem companhia, tornando meus dias mais leves e felizes.

Sou muito grata ao meu orientador Gustavo Kuhn que me proporcionou quase cinco anos de formação na área acadêmica e de ensinamentos que levarei para a vida. Nesse período que estive no laboratório de Citogenômica Evolutiva pude me desenvolver não só no aspecto acadêmico, mas também como pessoa. Agradeço à professora Marta Svartman pelas conversas descontraídas e por vários conselhos dados durante esse tempo no laboratório. Ao meu coorientador Leonardo Koerich, agradeço pelas valiosas sugestões para o melhor desenvolvimento da minha dissertação.

À banca examinadora por sua disposição em contribuir para o aprimoramento da minha dissertação e também para minha formação.

Agradeço a todos os funcionários da UFMG e do programa de Pós-Gradução em Genética, em especial à Tulia Marques, à Raíssa, à Vitória e à Dani que nos ajudam nos processos burocráticos.

Ao Daniel que sempre ajudou com a manutenção dos estoques e ao pessoal da limpeza por manterem os espaços da UFMG mais agradáveis.

Aos órgãos de fomento (CNPq, FAPEMIG, CAPES) por financiarem os projetos de pesquisa, em especial ao CNPq e à CAPES que possibilitaram minha permanência por meio das bolsas concedidas.

Aos meus amigos de laboratório Babau, Erick, Aninha, Pedro, Radinha, Licinha, Mi, Zé, Gui, Naiara, Lucas e Gustavinho. Sempre faço questão de dizer que foram essenciais para tornar o nosso ambiente de pesquisa mais agradável. Agradeço também, por terem sido em vários momentos professores aos quais recorri sempre que necessário. Essa galerinha também foi um dos motivos de eu ter certeza que escolhi o laboratório certo para fazer parte.

De novo ao Bráulio, Pedro e Rada agradeço pelas sugestões e discussões que contribuíram diretamente para a produção da minha dissertação.

À minha amiga Lorrayne que desde meu primeiro dia de aula da graduação esteve ao meu lado nos momentos alegres e difíceis.

À minha prima Izabela, que esteve muito presente alegrando meus dias durante esse período de pandemia que coincidiu com o meu mestrado.

A todos os professores que da pré-escola até o mestrado me permitiram, através do compartilhamento de seus conhecimentos, chegar até aqui.

Ao meu psicólogo João que nesses últimos dois anos vem cuidando da minha saúde mental e me ajudando a ter consciência dos fatores causadores de minhas inseguranças e crises de ansiedade para, então, superá-las.

À equipe do “Trem Bão é Ciência” que me faz refletir sobre a importância de devolver o conhecimento de direito à população brasileira, por meio da divulgação científica.

RESUMO

O centrômero é a região necessária para a segregação cromossômica nos eucariotos. Em animais e plantas, centrômeros funcionais se iniciam pela interação entre DNAs satélites e a proteína Cenp-A, que é uma variante da histona H3 (CenH3) exclusiva da cromatina centromérica. Uma outra proteína centromérica, a Cenp-C, se liga à Cenp-A e ao DNA centromérico (cenDNA), o que fornece a base para o recrutamento das demais proteínas do cinetócoro. Dada a importância funcional dos centrômeros, seria esperada uma alta conservação evolutiva de sua estrutura entre espécies. Porém, tanto o cenDNA como Cenp-A/Cenp-C evoluem rapidamente. De acordo com a hipótese do impulso centromérico, isso ocorre devido aos efeitos deletérios associados a expansões do cenDNA, e de seleção positiva em sítios de Cenp-A e Cenp-C que suprimem estes efeitos. Em espécies do subgênero *Drosophila* foram encontradas duplicações do gene da *Cid* (*CenH3* de *Drosophila*) (*Cid1*/*Cid6* e *Cid5*) e da *Cenp-C* (*Cenp-C1* e *Cenp-C2*). De acordo com padrões diferenciais de expressão destes genes em diferentes tecidos, foi sugerido que Cid1 interage com Cenp-C1 e Cid5 com a Cenp-C2 para função centromérica. Em espécies do grupo *montium* (subgrupo *Sophophora*), foram observadas duplicações de *Cid* (*Cid1*, *Cid3* e *Cid4*) e estes parálogos também revelaram expressão diferencial dependendo do tecido. O presente trabalho teve como objetivos principais investigar (i) se existem duplicações de Cenp-C nestas espécies e (ii) testar se existe seleção positiva em Cenp-C. Para isto, utilizamos genomas recentemente sequenciados de 23 espécies do grupo *montium.* Encontramos três novas cópias do gene da *Cenp-C,* que denominamos de *Cenp-C3*, *Cenp-C4* e *Cenp-C5*. Porém, todas as espécies possuem apenas uma cópia de *Cenp-C* no mesmo genoma, com exceção de *D. vulcana,* que possui duas (*Cenp-C1* e *Cenp-C5*). Esse resultado indica que apenas uma cópia da *Cenp-C* deve interagir com os três parálogos da *Cid* presentes nas espécies do grupo *montium*. Nossas análises mostraram que as três novas cópias se originaram de duplicações independentes de *Cenp-C1*, com posterior perda de *Cenp-C1* na maioria das espécies. Encontramos assinaturas de seleção positiva em quatro aminoácidos da Cenp-C localizados em regiões inter-motivos da Cenp-C. Embora não saibamos quais as regiões da Cenp-C fazem contato direto com o DNA, é possível que a Cenp-C esteja evoluindo sob seleção positiva para suprimir o impulso centromérico. Em conjunto, nossos resultados ajudam a entender as consequências de duplicações gênicas para a estrutura e evolução dos centrômeros.

Palavras chave: Centrômero. *Drosophila*. *Cid*. Cenp-A. CenH3. *Cenp-C*. Duplicação gênica.

ABSTRACT

The centromere is the region necessary for chromosomal segregation in eukaryotes. In animals and plants, functional centromeres are initiated by the interaction between satellite DNAs and the Cenp-A protein, a variant of histone H3 (CenH3) unique to the centromeric chromatin. Another centromeric protein, Cenp-C, binds to Cenp-A and centromeric DNA (cenDNA), providing the basis for the recruitment of other kinetochore proteins. Given the functional importance of centromeres, high evolutionary conservation of their structure among species would be expected. However, both cenDNA and Cenp-A/Cenp-C evolve rapidly. According to the centromere drive hypothesis, this is due to the deleterious effects associated with cenDNA expansions, and positive selection at Cenp-A and Cenp-C sites that suppress these effects. In species of the subgenus *Drosophila*, duplications of the gene of *Cid* (*CenH3* of *Drosophila*) (*Cid1* or *Cid6* and *Cid5*) and *Cenp-C* (*Cenp-C1* and *Cenp-C2*) were found. According to differential expression patterns of these genes in different tissues, it was suggested that Cid1 interacts with Cenp-C1 and Cid5 with Cenp-C2 for centromeric function. In the *montium* group species (subgroup Sophophora), duplications of *Cid* (*Cid1*, *Cid3*, and *Cid4*) were observed and these paralogs also revealed differential expression depending on the tissue. This work had as main objectives to investigate (i) if there are duplications of *Cenp-C* in these species and (ii) to test if there is positive selection in *Cenp-C*. For this, we used recently sequenced genomes from 23 *montium* group species. We found three new copies of the *Cenp-C* gene, which we called *Cenp-C3*, *Cenp-C4*, and *Cenp-C5*. However, all species have only one copy of *Cenp-C* in the same genome, except for D. vulcana, which has two (*Cenp-C1* and *Cenp-C5*). This result indicates that only one copy of *Cenp-C* should interact with the three Cid paralogs present in the *montium* group species. Our analyzes showed that the three new copies originated from independent duplications of *Cenp-C1*, with subsequent loss of *Cenp-C1* in most species. We found positive selection signatures in four Cenp-C amino acids located in intermediate regions of Cenp-C. Although we do not know which regions of Cenp-C make direct contact with DNA, Cenp-C may be evolving under positive selection to suppress the centromeric drive. Taken together, our results help to understand the consequences of gene duplications for the structure and evolution of centromeres.

Keywords: Centromere. *Drosophila*. *Cid*. Cenp-A. CenH3. *Cenp-C*. Gene duplication.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema do cinetócoro de *Drosophila* (Adaptado de Przewloka *et al*. 2007).....22

Figura 2. Modelo do impulso centromérico. A expansão do cenDNA em um dos cromossomos homólogos faz com que mais proteínas centroméricas e microtúbulos sejam recrutados, aumentando a transmissão desse homólogo na meiose feminina. Esse cromossomo aumenta em frequência na população e a consequência para machos é a não disjunção e infertilidade. Mutações nas proteínas centroméricas que reduzam a afinidade das mesmas pelo cenDNA restaura a paridade entre os cromossomos (Retirado de Rosin e Mellone, 2017).....24

Figura 3. Filogenia contendo algumas das espécies do subgênero *Drosophila* e do subgênero *Sophophora* ao qual pertencem os grupos *montium* e *melanogaster* (Adaptado de Teixeira *et al*.
2018).....25

Figura 4. Filogenias do grupo *montium*. A. Filogenia proposta por Conner *et al*. (2021) com base em análise Bayesiana e de máximo verossimilhança. B. Filogenia proposta por Yassin *et al*. (2016) com base em análise Bayesiana.....27

Figura 5. Hipótese de interação entre as cópias da Cid e da Cenp-C nas espécies do subgênero *Drosophila*.....28

Figura 6. Esquema representando a questão central do trabalho: quantas cópias da Cenp-C interagem com as três cópias da Cid nas espécies do grupo *montium*?.....29

Figura 7. Representação dos genes das espécies do grupo *montium*. Linhas em preto representam os íntrons. Barras coloridas representam os éxons, em que aquelas com cores iguais possuem homologia de sequência. Os éxons em amarelo, rosa escuro, rosa claro e azul turquesa correspondem as sequências retiradas das análises.....32

Figura 8. Motivos funcionais da sequência da proteína Cenp-C em Drosophila identificados por Heeger et al. (2005). N e C indicam a região C-terminal e N-terminal da proteína, respectivamente.....33

Figura 9. Filogenia das espécies de *Drosophila* do grupo *montium* (Conner *et al.* 2021). Para referência, também foram incluídas *D. melanogaster* do subgênero *Sophophora* e *D*. *virilis* do subgênero *Drosophila*, (Russo *et al*. 2013). As setas preenchidas e pontilhadas indicam respectivamente a presença e ausência dos genes que podem estar inteiros ou fragmentados. A orientação das setas indica a orientação dos genes. As linhas contínuas indicam presença de sequências intergênicas e as linhas pontilhadas indicam presença de outros genes não mostrados. As quebras das linhas indicam fragmentos não montados.....35

Figura 10. Alinhamento dos *contigs* 1, 2 e 3 com a sequência definida para o gene da *Cenp-C4* em *D. kanapiae* (DkanCenpC4). O alinhamento das sequências dos *contigs* mostra regiões idênticas (preto), divergentes (cinza) e de gaps (branco). As barras em cinza mostram sequências de íntrons inferidos pelo algoritmo *Augustus* e por alinhamento com os genes da Cenp-C das outras espécies do grupo *montium*. A barra em azul representa a região deletada de *Cenp-C4* para análises de seleção positiva e construção da árvore filogenética.....35

Figura 11. Alinhamento dos dois fragmentos do gene da *Cenp-C5* presentes em dois *contigs* (1 e 2) e da sequência definida para o gene da *Cenp-C5* em *D. vulcana* (DvulCenpC5). As barras em cinza mostram sequências de íntrons inferidos pelo algoritmo *Augustus* e por alinhamento com os genes da Cenp-C das outras espécies do grupo *montium*. A barra em azul representa a região deletada de *Cenp-C4* para análises de seleção positiva e construção da árvore filogenética.....36

Figura 12. Gráfico *Dotplot* entre *Cenp-C1* de *D. nikananu* e seus genes flanquadores contra o loco da *Cenp-C1* de *D. burlai* e seus genes flanqueadores. A região de similaridade corresponde aos genes *CG1427* e *Tim10* que flanqueiam o gene da *Cenp-C1* de *D. nikananu*. Apenas os genes *CG1427* e *Tim10* estão presentes no loco da *Cenp-C1* no genoma de *D. burlai*.....37

Figura 13. Disposição dos fragmentos do gene da *Cenp-C* de *D. burlai* e *D. punjabiensis* em relação aos 5 locos das cópias dos genes da *Cenp-C*, no cromossomo 3R de *D. triauraria*. As

setas preenchidas e pontilhadas indicam, respectivamente, a presença e ausência dos genes que podem estar inteiros ou fragmentados. A orientação das setas indica a orientação dos genes no cromossomo. O tamanho das sequências de DNA presente entre os locos está representado em preto acima das linhas contínuas. As linhas pontilhadas com setas nas extremidades (azul e verde) mostram localização dos locos indicados pela seta. A distância desses locos em relação ao gene mais próximo (*CG14655* ou *CG1427*) está representada ao lado de cada linha pontilhada com a mesma cor da linha. Abaixo de cada fragmento do gene da *Cenp-C* é mostrado seu tamanho em pares de bases.....37

Figura 14. Alinhamento dos dois fragmentos (*contigs* 1 e 2) do gene da Cenp-C1 de *D. serrata* montados por Bronski et al. (2020) e da sequência completa da Cenp-C1 presente em apenas um *contig* montado por Allen et al. (2017). As barras em cinza mostram sequências dos íntrons definidos com base em RNA-Seq. A barra em azul representa a região deletada da Cenp-C1 para análises de seleção positiva e construção da árvore filogenética.....38

Figura 15. Representação da sequência do gene da *Cenp-C1* de *D. watanabei*, *Cenp-C5* de *D. vulcana*, *Cenp-C3* de *D. pectinifera* e *Cenp-C1* de *D. leontia*. As barras em cinza mostram sequências de íntrons inferidos pelo algoritmo *Augustus* e por alinhamento com os genes da *Cenp-C* de outras espécies do grupo *montium.* As linhas pretas representam os éxons. As barras coloridas representam sequências que possuem similaridade com TEs de acordo com o banco de dados RepBase.....40

Figura 16. Motivos funcionais da sequência da proteína Cenp-C em *Drosophila*. (A) Representação dos 7 motivos funcionais identificados por Heeger et al. (2005) e do provável motivo Mis12 binding e suas respectivas posições na sequência da proteína da Cenp-C1 em *D. melanogaster*. O asterisco em preto corresponde a arginina (R1101) da Cenp-C que é idêntica em todas as proteínas. N e C indicam a região C-terminal e N-terminal da proteína, respectivamente. (B) Representação dos motivos presentes na sequência das cópias da Cenp-C, nas espécies do grupo *montium*. (C) Logo gerado pelo *MEME* do provável motivo de ligação do complexo Mis12 (Mis12 binding).....42

Figura 17. Alinhamento das proteínas Cenp-C das espécies do grupo *montium* mostrando a posição dos motivos proteicos identificados no presente trabalho. As barras em vermelho

representam da esquerda para a direita: Mis12 *binding*, R-rich, DH, NLS, CenH3 *binding* e Cupin. A barra azul-claro representa as sequências removidas para a construção da filogenia dos genes e teste de seleção positiva. A pequena barra em verde-escuro abaixo do motivo CenH3-binding representa o aminoácido R-1101, presente em todas as cópias de Cenp-C do grupo
montium.....43

Figura 18. Alinhamento amplificado das proteínas Cenp-C das espécies do grupo *montium* mostrando a posição dos motivos proteicos identificados no presente trabalho. As barras em vermelho representam nesta mesma ordem: Mis12 *binding*, R-rich, DH, NLS, CenH3 *binding* e Cupin. A barra azul-claro representa as sequências removidas para a construção da filogenia dos genes e teste de seleção positiva. A pequena barra em verde-escuro abaixo do motivo CenH3-binding representa o aminoácido R-1101 idêntico em todas as proteínas.....48

Figura 19. Alinhamento das proteínas codificadas pelo gene da *Cenp-C1* e *Cenp-C5* de *D. vulcana*. O alinhamento das sequências dos *contigs* mostra regiões idênticas (preto), divergentes (cinza) e de gaps (branco). A barra em azul representa a região deletada da *Cenp-C5* para construção da árvore filogenética.....48

Figura 20. Alinhamento das proteínas codificadas pelo gene da *Cenp-C1* e *Cenp-C5* de *D. vulcana*. O alinhamento das sequências mostra regiões idênticas (preto), divergentes (cinza) e de gaps (branco). As barras em cinza mostram sequências de íntrons inferidos pelo algoritmo *Augustus* e por alinhamento com os genes da *Cenp-C* das outras espécies do grupo *montium.* A barra em azul representa a região deletada da *Cenp-C5* para construção da árvore filogenética.....49

Figura 21. Árvore de máxima verossimilhança mostrando as relações filogenéticas entre as cópias do gene da *Cenp-C* nas espécies do grupo *montium*. O nome dos subgrupos e suas respectivas espécies são mostrados em cores iguais. O valor de *bootstrap* está indicado em cada nó. A escala indica o número de substituições por sítio.....50

Figura 22. Árvore de máxima verossimilhança mostrando as relações filogenéticas entre as cópias do gene da *Cenp-C* nas espécies dos subgêneros *Sophophora* e *Drosophila*. O valor

de bootstrap está indicado em cada nó. A escala indica o número de substituições por sítio.....52

Figura 23. Hipótese de origem e perda dos genes da *Cenp-C* nas espécies do grupo *montium*. Na espécie ancestral que deu origem às espécies do grupo *montium*, a *Cenp-C1* foi duplicada e inserida em um novo loco dando origem à *Cenp-C3*. Em seguida, a *Cenp-C1* foi deletada do loco ancestral. Na espécie ancestral que deu origem às espécies do subgrupo *parvula* ou dentro do subgrupo, a *Cenp-C1* e o gene *CG1427* foram duplicados e inseridos em um novo loco. Em seguida, houve a deleção da Cenp-C1 no loco ancestral e degeneração do gene CG1427 no novo loco. E por último em *D. vulcana* houve a duplicação da *Cenp-C1* que foi inserida em um segundo loco dando origem a *Cenp-C5*, ambas as cópias foram mantidas.....53

Figura 24. (A) Representação do elemento TE Harbinger-2_DRh. Setas em preto indicam TIRs e retângulo em cinza indica a sequência interna às TIRs. (B) Evento de transposição por mecanismo *cut and paste* esperado para duplicação gênica. 1. Duas cópias do TE se insere em ambos os lados da *Cenp-C1*.2. Uma das TIRs de cada TE sofre mutações impedindo a ligação da transposase. Os elementos são reconhecidos pela mesma transposase e são transpostos para um segundo loco levando a sequência interna a eles. (C) Representação dos locos da *Cenp-C1* e da *Cenp-C5* com suas sequências flanqueadoras, observados no genoma de *D. vulcana*. Pontas de seta indicam a posição 3' dos genes. Fragmentos homólogos (65 a 74% de identidade e 54 a 152pb) ao Harbinger-2_DRh indicados pelo Repbase estão em cinza e preto. Os pontilhados delimitam a região de homologia (85 a 95% de identidade e 189 a 190pb) entre as três cópias do elemento Harbinger-2_DRh-*like*. Linhas pretas e barras em bege indicam, respectivamente, sequências intergênicas e sequências com homologia (211pb e 206pb) entre os dois locos. (D) Representação do que seria esperado para os locos da *Cenp-C* de *D. vulcana*, se um elemento Harbinger-2_DRh-*like* estivesse envolvido no processo de duplicação.....56

Figura 25. Alinhamento das proteínas Cenp-C das espécies do grupo *montium* mostrando os sítios da proteína que apresentaram assinatura de seleção positiva. As barras em vermelho representam da esquerda para a direita: Mis12 *binding*, R-rich, DH, NLS, CenH3 *binding* e Cupin. A barra azul-claro representa as sequências removidas para a construção da filogenia dos genes e teste de seleção positiva. As pequenas barras em azul-escuro representam os sítios sob seleção positiva.....58

Figura 26. Alinhamento de códons da *Cenp-C* das espécies do grupo *montium* mostrando os sítios que apresentaram assinatura de seleção positiva. Cada sítio (barras em azul-escuro) é mostrado nas imagens. (1.A) Localização do primeiro sítio antes do refinamento manual do alinhamento. (1.B) Localização do primeiro sítio após refinamento manual do alinhamento. (2.A) Localização do segundo e terceiro sítios antes do refinamento manual do alinhamento. (2.B) Localização do segundo e terceiro sítios após refinamento manual do alinhamento. (3.A) Localização do quarto sítio antes do refinamento manual do alinhamento. (3.B) Localização do quarto sítio após refinamento manual do alinhamento. O refinamento manual do alinhamento foi feito conforme especificado na metodologia.....61

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Números de acesso das sequências obtidas no Genbank.....30
Tabela 2. Características gerais dos genes da *Cenp-C* das espécies do grupo *montium*.....39
Tabela 3. Sítios sob seleção positiva de acordo com o modelo de sítios-aleatórios (CodeML).....62

LISTA DE ABREVIATURAS

BEB – *Bayes Empirical Bayes*

Cal1 – *Chromosome Alignment defect 1*

CCAN – *Constitutive Centromere-Associated Network*

cDNA – DNA complementar

CDS – Sequência codificadora

CenH3 – Histona Centromérica 3

CenDNA – DNA centromérico

Cenp-A – Proteína Centromérica A

Cenp-C – Proteína Centromérica C

Cid – *Centromere Identifier*

DH – *Drosophilid Cenp-C Homolegues*

DNA – Ácido desoxirribonucleico

dN – Substituição não-sinônima

dS – Substituição sinônima

GTR+G+I – Generalised Time Reversible + Gamma + Invariable

HKY+G+I – Hasegawa-Kishino-Yano model + Gamma + Invariable

H3 – Histona 3

HJURP – *Holliday Junction Recognition Protein*

Kb – kilobases

Mif2p – *Macrophage migration inhibitory factor-like protein*

KMN – Knl1-Mis12-Ndc80

LTR – Repetição Longa Terminal

Mis12C – Complexo Mis12

mRNA – RNA mensageiro

MV – Máxima Verossimilhança

NCBI – *Basic Local Alignment Search Tool*

NLS – *Nuclear Localization Signal*

pb – pares de bases

R1101 – arginina 1101

RNA – Ácido ribonucleico

RNA-Seq – RNA Sequencing

R-rich – *Ariginine-rich*

satDNA – DNA satélite

TE – Elemento Transponível

TIR – Repetição Invertida Terminal

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 20
1.1. O DNA centromérico 20
1.2. A função das proteínas Cenp-A e Cenp-C na manutenção do centrômero 21
1.3. A hipótese do impulso centromérico 22
1.4. O gênero *Drosophila* e as espécies do grupo *montium* 24
1.5. Duplicações da Cenp-A e Cenp-C em espécies do gênero *Drosophila* 27
2. OBJETIVO 29
2.1. Objetivos específicos 29
3. METODOLOGIA 30
3.1. Identificação das cópias de *Cenp-C* no genoma das espécies de *Drosophila* 30
3.2. Árvores filogenéticas 32
3.3. Análise dos motivos da proteína Cenp-C 32
3.4. Análises de seleção positiva 33
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO 34
4.1. Descoberta de três novas cópias do gene da *Cenp-C* no grupo *montium* 34
4.2. Identificação dos motivos proteicos conservados em cópias da *Cenp-C* nas espécies do grupo *montium* 41
4.3. As duas cópias da *Cenp-C* no genoma de *D. vulcana* 48
4.4. Relações evolutivas entre as cópias da *Cenp-C* nas espécies do grupo *montium* 49
4.5. Origem das duplicações do gene da *Cenp-C* nas espécies do grupo *montium* 53
4.6. Teste de seleção positiva nas cópias de Cenp-C 57
5. CONCLUSÕES 62
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 63

1. INTRODUÇÃO

1.1. O DNA centromérico

O centrômero é o loco cromossômico responsável pela segregação dos cromossomos durante a divisão celular em eucariotos. Apesar dessa função importante, os centrômeros são altamente diversos em sequência, organização e tamanho (Talbert & Henikoff 2020). Eles podem ser: (i) pontuais, como em *Saccharomyces cerevisiae*, onde são compostos por sequências curtas e conservadas de aproximadamente 125 pb; (ii) regionais, como em plantas e animais, onde podem atingir centenas de kilobases ou (iii) dispersos ao longo de toda a extensão do cromossomo, como nos nematódeos (Malik & Henikoff 2002). Dentre esses três tipos de centrômeros, o que mais predomina entre eucariotos é o regional. Estes centrômeros são constituídos principalmente por duas classes de DNAs repetitivos: os DNAs satélites (satDNAs) e os elementos de transposição (TEs) (Plohl *et al*. 2014).

Os DNAs satélites são os componentes mais comumente encontrados no centrômero da maioria dos animais e plantas estudados. Trata-se de sequências de DNA repetidas em tandem, que formam tipicamente cadeias de centenas de kilobases de comprimento (Melters *et al*. 2013). Embora a presença de satDNAs nos centrômeros seja uma característica comum a vários táxons de eucariotos, essas sequências são altamente variáveis entre espécies, podendo até ser espécie-específicas. Vários mecanismos foram propostos para explicar essa observação, como: *crossing-over* desigual, conversão gênica e amplificação via círculo rolante com subsequente reinserção. Tais mecanismos são os prováveis responsáveis pela homogeneização nucleotídica entre as cópias e pelas alterações de tamanho das cadeias de cópias em tandem (Hartley & O'Neill 2019).

Outro componente repetitivo que pode ser encontrado no centrômero são os elementos de transposição. Essas sequências são capazes de se moverem ao longo do genoma e por isso estão frequentemente dispersas. Os TEs são classificados conforme seu mecanismo de transposição, podendo ser de Classe I, os retrotransposons, quando se transpõem por intermédio de um RNA, ou de classe II, os transposons de DNA, quando se transpõem por intermédio de um DNA (Wicker *et al*. 2007). Apesar de serem caracterizados pela capacidade de se transpor, a maioria desses elementos não se move ativamente, seja devido a mutações ou silenciamento epigenético (Hartley & O'Neill 2019).

A abundante presença de satélites na maioria dos centrômeros é um indicativo de que essas sequências são importantes para a expansão e estabilização dessas regiões (Plohl *et*

al. 2008). No entanto, a formação de neocentrômeros em regiões desprovidas de DNAs repetitivos indica que essas sequências não são essenciais para os estágios iniciais de formação dos centrômeros (Henikoff *et al*. 2001). O que determina um centrômero funcional é a presença de nucleossomos contendo a histona H3 variante CenH3, o que torna a cromatina do DNA centromérico (cenDNA) distinta de outras partes do genoma (Brown & O'Neill 2014; Dalal *et al*. 2007).

1.2. A função das proteínas Cenp-A e Cenp-C na manutenção do centrômero

A grande diversidade dos centrômeros com relação a sequência de nucleotídeos torna improvável sua identificação por um fator genético universal. No entanto, esse loco é determinado epigeneticamente pela histona CenH3, também conhecida como Cenp-A. Consistente com a importância da Cenp-A na função centromérica é a sua ubiquidade nos centrômeros funcionais, presença em neocentrômeros e sua ausência em centrômeros inativos de cromossomos dicêntricos (Rosin & Mellone 2017). Além disso, a presença de Cenp-A no centrômero é o primeiro passo para a localização dos componentes do cinetócoro (Mckinley & Cheeseman 2016). O cinetócoro é um complexo multiprotéico formado nos centrômeros que fornece a estrutura necessária para que os microtúbulos se conectem aos cromossomos.

Uma segunda proteína associada à centrômeros funcionais é a Cenp-C, um dos componentes do CCAN (*constitutive centromere-associated network*), que são caracterizados por se localizarem no centrômero durante todo o ciclo celular (Maresca 2011). Em vertebrados o CCAN é composto por 16 proteínas (Maresca 2011) enquanto que em *Drosophila* e *Caenorhabditis elegans,* apenas a Cenp-C foi identificada (Liu *et al*. 2016). Essa menor complexidade dos centrômeros de *Drosophila* e *C. elegans,* quando comparado com os dos demais organismos, torna ambos excelentes modelos para compreender a evolução dos componentes centroméricos. De fato, apenas as proteínas Cid (Homóloga da Cenp-A em *Drosophila*), Cenp-C e Cal1, a chaperona que medeia a deposição da Cid na cromatina, são suficientes para a propagação da Cid no centrômero de *Drosophila* (Roure *et al*. 2019). Em humanos, por exemplo, a propagação da Cenp-A requer além da chaperona HJURP e da Cenp-C, o Complexo Mis18 que é composto por três proteínas (Mckinley & Cheeseman 2016).

Foi demonstrado que a Cenp-C se liga diretamente à Cenp-A (Carrol *et al*. 2010; Kato *et al*. 2013; Musacchio & Desai 2017; Roure *et al*. 2019) e ao DNA centromérico (Cohen *et al*. 2008; Politi *et al*. 2002; Trazzi *et al*. 2002). A Cenp-C é também responsável por se ligar ao

complexo Mis12C, um grupo de proteínas que é parte de um complexo maior, o *KMN network*, composto pelos complexos knl1, Mis12 e Ndc80. É no *KMN* que os microtúbulos se conectam aos cromossomos nas divisões celulares (Figura 1) (Maresca 2011; Przewloka & Glover 2009). A Cenp-C é, portanto, uma proteína chave na ligação entre o cinetócoro e a cromatina centromérica.

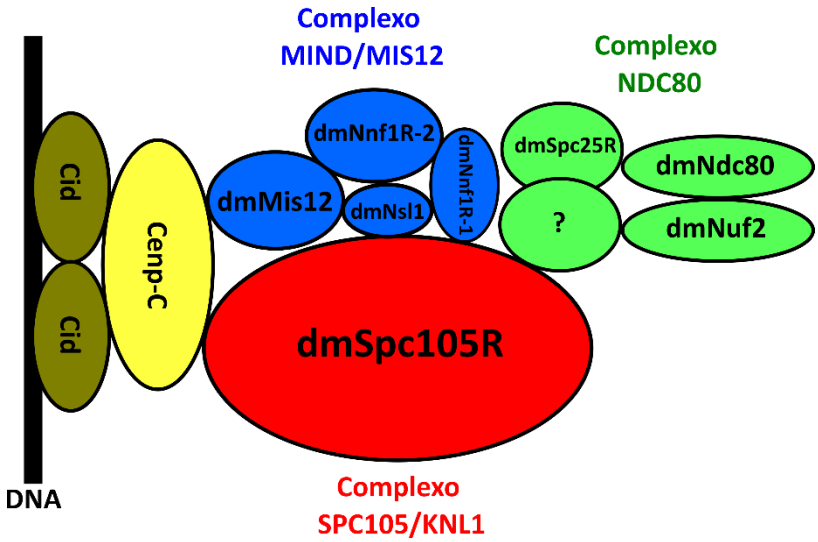


Figura 1. Esquema do cinetócoro de *Drosophila* (Adaptado de Przewloka *et al*. 2007).

Estudos mostraram que a Cenp-A e a Cenp-C são funcionalmente dependentes entre si para manutenção dos centrômeros (Erhardt *et al*. 2008; Falk *et al*. 2015; Moree *et al*. 2011; Orr & Sunkel, 2011; Westhorpe *et al*. 2015). Concordante com isso, um padrão de retenção ou perda de ambas proteínas foi observado em várias linhagens de eucariotos (Hooff *et al*. 2017). Tais achados tornam evidente o papel da Cenp-C e Cenp-A na manutenção de centrômeros funcionais.

1.3. A hipótese do impulso centromérico

O funcionamento adequado do centrômero é essencial para que ocorra a correta segregação dos cromossomos. Concordante com isso, quebras de DNA, rearranjos e aberrações estruturais em regiões centroméricas são comumente observadas em células cancerígenas e em algumas síndromes genéticas (Barra & Fachinetti 2018). Por esse motivo, se esperaria um alto grau de conservação das proteínas centroméricas, Cenp-A e Cenp-C, e do DNA centromérico entre espécies. No entanto, o que se tem observado é que ambos

evoluem rapidamente em animais e plantas (Plohl *et al*. 2008; Talbert *et al*. 2004). Um exemplo dessa rápida evolução é a sequência de nucleotídeos da Cenp-C, que apresenta menos de 5% de conservação entre filos, e que devido à essa grande divergência, pensou-se até estar ausente em *Drosophila* (Talbert *et al*. 2004). Essa maneira paradoxal pela qual o centrômero evolui (i.e. função essencial mas rápida evolução), é explicada pela hipótese do impulso centromérico ou "*centromere drive*" (Figura 2) (Dawe & Henikoff 2006; Henikoff *et al*. 2001).

Na maioria das espécies de animais e plantas, apenas um dos quatro produtos da meiose da fêmea se desenvolve em ovócito. Assim, conforme proposto pela hipótese do impulso centromérico, essa assimetria meiótica das fêmeas possibilita a competição entre cromossomos homólogos para sua inclusão no ovócito. Centrômeros contendo um DNA mais expandido poderão recrutar mais proteínas, como Cenp-A ou Cenp-C, e consequentemente mais microtúbulos. Dessa forma, os cromossomos contendo esses centrômeros expandidos serão preferencialmente transmitidos, em relação aos seus homólogos, para as próximas gerações. Entretanto, existem duas possíveis consequências negativas associadas ao impulso centromérico: (i) a transmissão de mutações deletérias ligadas a esses cromossomos na população (ii) a não disjunção dos cromossomos sexuais em machos e aumento da infertilidade. Mutações nas proteínas centroméricas (Cenp-A e Cenp-C) que reduzam sua afinidade pelo centrômero expandido ou que aumentem a sua afinidade pelo centrômero mais "fraco" poderão suprimir o impulso centromérico. A ocorrência desse processo em ciclos ao longo da evolução pode explicar o padrão atípico de evolução dos centrômeros (Dawe & Henikoff 2006; Henikoff *et al*. 2001; Malik & Bayes 2006).

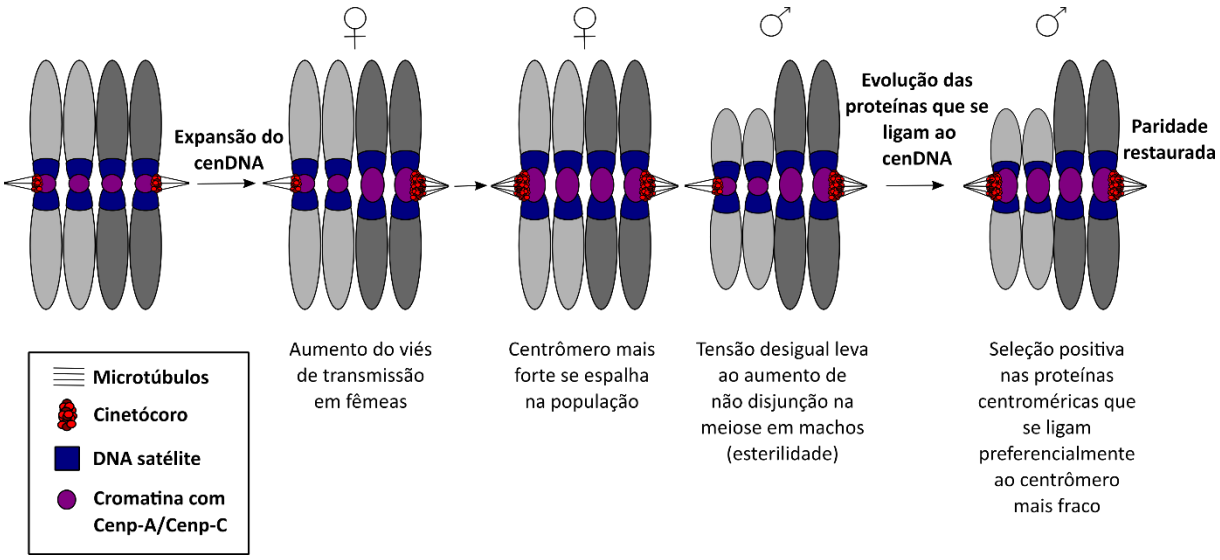


Figura 2. Modelo do impulso centromérico. A expansão do cenDNA em um dos cromossomos homólogos faz com que mais proteínas centroméricas e microtúbulos sejam recrutados, aumentando a transmissão desse homólogo na meiose feminina. Esse cromossomo aumenta em frequência na

população e a consequência para machos é a não disjunção e infertilidade. Mutações nas proteínas centroméricas que reduzam a afinidade das mesmas pelo cenDNA restaura a paridade entre os cromossomos (Adaptado de Rosin & Mellone 2017).

De acordo com o previsto pela hipótese do impulso centromérico, tanto em *Drosophila* como em *Arabidopisis* foi detectada seleção positiva em regiões da Cenp-A preditas como locais de contato com o DNA do centrômero (Cooper & Henikoff 2004; Malik & Henikoff 2001; Malik *et al*. 2002). Por outro lado, em gramíneas e mamíferos, é na Cenp-C, e não na Cenp-A, onde evidências de seleção positiva foram encontradas. Em mamíferos, regiões sob seleção positiva na Cenp-C incluem aquelas em contato com o DNA centromérico. Já em leveduras, a proteína Mif2p (homóloga à Cenp-C) evolui sob seleção negativa. No entanto, esse é um resultado esperado conforme a hipótese do impulso centromérico, já que leveduras possuem centrômeros com sequência conservada e meiose feminina simétrica (Talbert 2004).

1.4. O gênero *Drosophila* e as espécies do grupo *montium*

O gênero *Drosophila* é composto por pequenas moscas, também conhecidas como moscas das frutas, pertences à ordem Diptera e à família Drosophilidae (Hales *et al*. 2015). Esse grupo é composto por mais de 1.600 espécies de *Drosophila* (O'Grady & Desalle 2018). Foi sugerido que o gênero *Drosophila* seja parafilético em relação a vários gêneros, e por isso, as relações filogenéticas entre as espécies do grupo se encontram em debate entre os taxonomistas (O'Grady & Desalle 2018).

O gênero *Drosophila* apresenta uma extensa literatura em diversas áreas da genética (Markow & O'Grady 2006). De fato, é enorme a lista de trabalhos feitos em *Drosophila* que serviram e continuam servindo como base para um melhor entendimento da genética como um todo (Ashburner & Bergman 2005; Griffths *et al*. 2000; Powel 1997). Atualmente, o gênero *Drosophila* contém genomas sequenciados e montados de mais de 120 espécies, de acordo com o *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) (*https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/browse/#!/overview/drosophila*). Esta vasta quantidade de genomas disponíveis possibilita uma enorme quantidade de estudos sobre a evolução de genes e genomas.

Dentre os subgêneros pertencentes ao gênero *Drosophila*, estão os subgêneros *Drosophila* e *Sophophora,* que concentram a maioria das espécies de drosofilídeos estudada no contexto da evolução do centrômero (Kursel & Malik 2017; Malik & Henikiff 2001; Malik *et*

al. 2002; Roure *et al*. 2019; Teixeira *et al*. 2018). Estima-se que esses subgêneros se divergiram entre 40-62.9 milhões de anos atrás (Russo *et al*. 1995; Tamura *et al*. 2004).

O subgênero *Sophophora* possui 344 espécies (O'Grady & Desalle 2018) divididas em 10 grupos (Yassin 2013). O maior deles é o grupo *montium*, composto por 94 espécies oriundas da Ásia, Australásia e África (Yassin 2018). Inicialmente, esse clado foi considerado como sendo um subgrupo dentro do grupo *melanogaster.* Posteriormente, foi elevado ao nível de grupo dentro do subgênero *Sophophora* (Figura 3) (Da Lage *et al*. 2007).

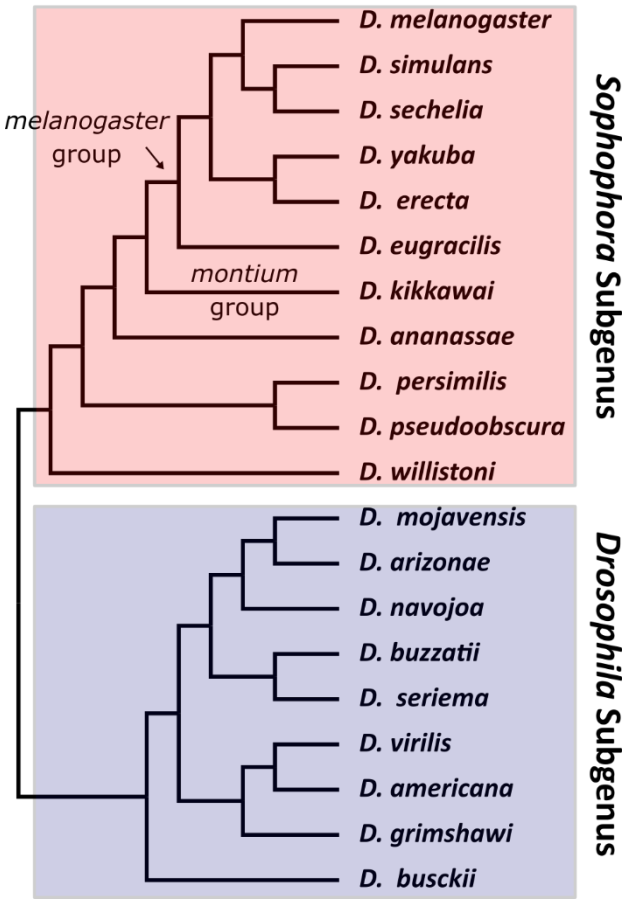


Figura 3. Filogenia contendo algumas das espécies do subgênero *Drosophila* e do subgênero *Sophophora* ao qual pertencem os grupos *montium* e *melanogaster* (Adaptado de Teixeira *et al*. 2018).

Com base em dados corológicos e morfológicos (genitália e pigmentação abdominal de machos), as espécies do grupo *montium* foram subdivididas em sete subgrupos (Yassin 2018): *montium*, *parvula*, *orosa*, *kikkawai*, *serrata*, *punjabiensis* e *seguyi*. Duas filogenias recentes propostas para as espécies do grupo *montium* confirmam a monofilia de todos os subgrupos, mas divergem quanto as relações filogenéticas entre os subgrupos (Conner *et al*. 2021; Yassin *et al*. 2016) (Figura 4). Enquanto Yassin *et al*. (2016) consideram o grupo *parvula*

como o mais basal da filogenia, em Conner *et al*. (2021) essa posição é ocupada pelo grupo *montium*. Além disso, na filogenia de Conner *et al*. (2021) o subgrupo *kikkawai* forma um grupo irmão do clado formado pelos subgrupos *serrata*, *punjabiensis* e *seguyi*. Já em Yassin *et al*. (2016), o grupo *punjabiensis* é o grupo irmão do clado formado pelos subgrupos *serrata*, *kikkawai* e *seguyi.* Outro ponto importante de ser ressaltado é que o estudo de Conner *et al*. (2021) produziu duas árvores que se diferem quanto ao posicionamento do subgrupo *punjabiensis*. Na primeira, este subgrupo é irmão do subgrupo *seguyi*, já na segunda o grupo *punjabiensis* é o grupo irmão do clado formado pelos subgrupos *serrata* e *seguyi*.

A filogenia de Conner *et al*. (2021) foi construída a partir de 60 genes ortólogos e 42 espécies, contrastando com a de Yassin *et al*. (2016) que utilizou 44 espécies, mas apenas três genes nucleares e um mitocondrial. Embora haja discrepâncias quanto a relação dos subgrupos dentro do grupo *montium*, não há dúvidas quanto a sua monofilia (Da Lage *et al*. 2007; Finet *et al*. 2021; Russo *et al*. 2013; Yang *et al*. 2012). Por isso, o grupo *montium* é considerado um ótimo modelo para estudos de evolução.

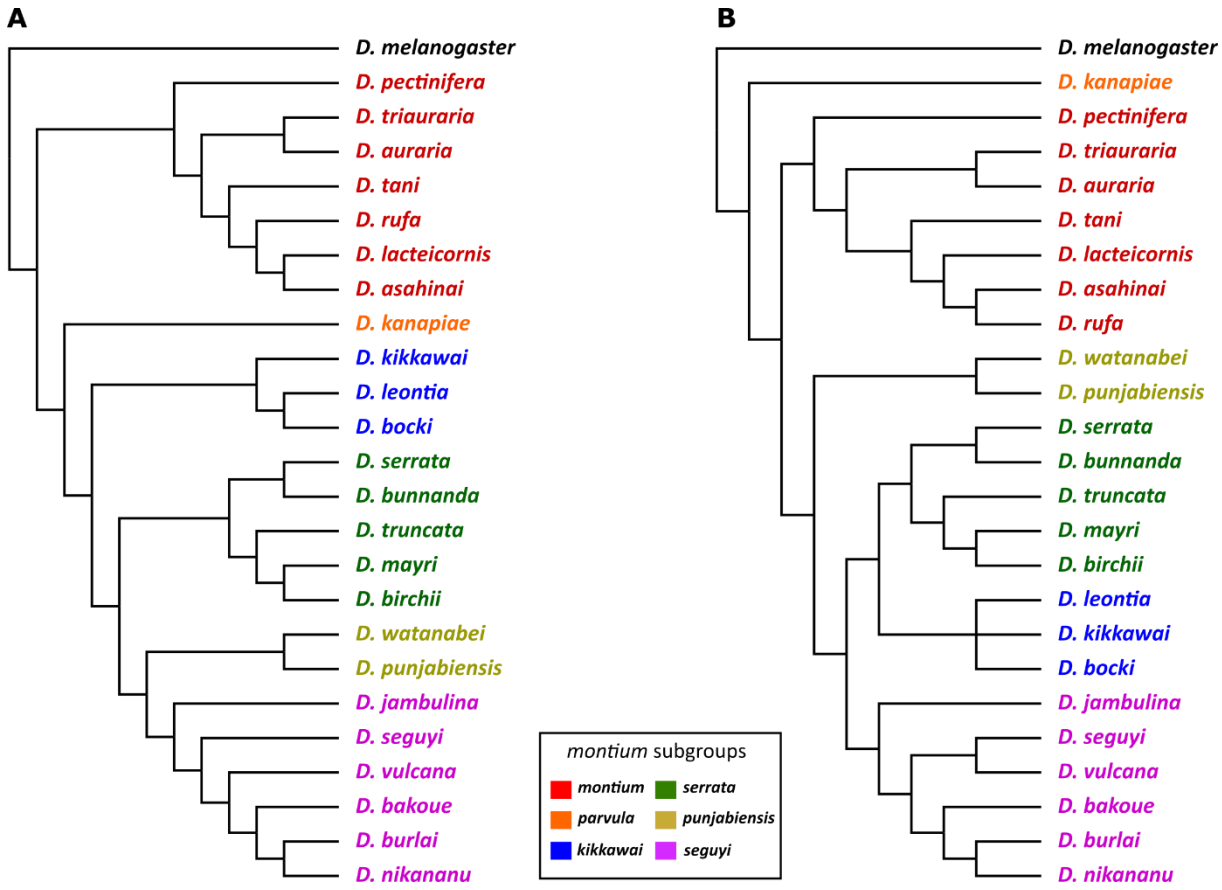


Figura 4. Filogenias do grupo *montium*. A. Filogenia proposta por Conner *et al*. (2021) com base em análise Bayesiana e de máximo verossimilhança. B. Filogenia proposta por Yassin *et al*. (2016) com base em análise Bayesiana.

1.5. Duplicações da Cenp-A e Cenp-C em espécies do gênero *Drosophila*

A homologia entre genes pode se dar por sua origem a partir de um único gene ancestral pela especiação, os chamados genes ortólogos, ou por duplicação gênica, os chamados genes parálogos (Koonin 2005). Genes oriundos de duplicações podem ter quatro destinos ao longo da evolução. O mais comum é a pseudogenização ou eliminação de uma das cópias. Outra possibilidade é a neofuncionalização, um processo mais raro por depender de mutações adaptativas que resultarão em uma nova função para uma das cópias. Uma terceira possibilidade é que o relaxamento da seleção negativa sob os parálogos pode levar à rápida evolução de ambos e à divisão de diferentes funções do gene ancestral entre as cópias, processo denominado de subfuncionalização (Koonin 2005; Rastogi & Liberles 2005). E por último, a retenção de genes duplicados pode ser, às vezes, benéfica por implicar em maiores quantidades de proteína como produto. Nesse caso, esses genes podem ser mantidos por seleção negativa (Zhang 2003).

Duplicações do gene da *Cid* foram identificadas em espécies do gênero *Drosophila* (Kursel & Malik 2017). Essas duplicações estão presentes em *D. eugracilis* do grupo *melanogaster* (*Cid1* e *Cid2*) e nas espécies do grupo *montium* (*Cid1*, *Cid3* e *Cid4*) pertencentes ao subgênero *Sophophora*. Duplicações também foram observadas em espécies do subgênero *Drosophila* (*Cid1* e *Cid5*). Nesse estudo, os parálogos *Cid1*, *Cid3*, *Cid4* e *Cid5* foram expressos em cultura de tecidos e todos eles se localizaram no centrômero, em suas respectivas espécies. Foi demonstrado que a *Cid3* e a *Cid5* apresentam expressão restrita à linhagem germinativa do macho. Por outro lado, a *Cid1* e a *Cid4* são expressas tanto na linhagem germinativa quanto na linhagem somática. Além disso, nas espécies do grupo *montium*, a *Cid3* evolui sob seleção positiva em domínios de possíveis contato com o DNA centromérico. Porém, não foram encontradas evidências de seleção positiva para a *Cid5*. Foi levantada a hipótese de que a *Cid3* e, possivelmente, a *Cid5* podem estar atuando como supressores do impulso centromérico na linhagem germinativa do macho (Kursel & Malik 2017).

Recentemente, nosso grupo descreveu em espécies do subgênero *Drosophila* uma nova duplicação da *Cid* (*Cid6*) e também duplicações da *Cenp-C* (*Cenp-C1* e *Cenp-C2*) (Teixeira *et al*. 2018). Em todas as espécies estudadas duas cópias da *Cid* estão presentes (*Cid1* com Cid5 ou *Cid6* com *Cid5*). Essas duplicações da *Cid* e *Cenp-C* vêm sendo mantidas há pelo menos 50 milhões de anos nas espécies do subgênero *Drosophila*. Nessas espécies, as duplicações da *Cenp-C* apresentam perfis alternados de retenção de motivos proteicos,

possivelmente indicando subfuncionalização. Porém, ambos os parálogos mantém motivos essenciais para localização e função centromérica.

Teixeira *et al*. (2018) relataram que a *Cid6,* que substitui funcionalmente a *Cid1* em algumas espécies, estava expressa em todas as fases do desenvolvimento (embriões, larvas, pupas, adultos machos e adultos fêmeas) analisadas. Já a *Cid5* estava expressa apenas em machos adultos e pupas (que provavelmente darão origem a machos). A *Cid1* foi analisada quanto ao nível de expressão em testículos e se mostrou praticamente silenciada, enquanto que a *Cid5* apresentou altos níveis de expressão. Ao contrário dos parálogos de *Cid*, a *Cenp-C1* e *Cenp-C2* mostraram expressão em quase todas as fases do desenvolvimento, com exceção de larvas. Porém, a *Cenp-C1* foi mais expressa em fêmeas e embriões do que *Cenp-C2*, e esta última mais expressa em adultos machos e pupas do que *Cenp-C1*. Em testículos a expressão de *Cenp-C2* também foi estatisticamente mais alta do que a de *Cenp-C1*. Devido à essas observações, foi sugerido que Cenp-C2 interage com Cid5 e Cenp-C1 interage com Cid1/Cid6 para função centromérica (Figura 5) (Teixeira *et al*. 2018).

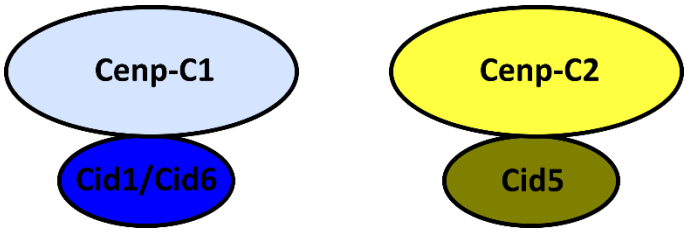


Figura 5. Hipótese de interação entre as cópias da Cid e da Cenp-C nas espécies do subgênero *Drosophila* de acordo com Teixeira *et al*. (2018).

A hipótese da interação entre as cópias da Cid e da Cenp-C em espécies do subgênero *Drosophila* levantou a questão de quantas cópias da Cenp-C estariam interagindo com as três cópias da Cid nas espécies do grupo *montium* (Figura 6). Nesse grupo, a única espécie do grupo *montium* estudada, *D. kikkawai*, revelou possuir apenas uma única cópia da *Cenp-C* (Teixeira *et al*. 2018). Por isso, o presente trabalho buscou realizar um estudo mais completo sobre a evolução do gene da *Cenp-C* nas espécies do grupo *montium*, beneficiado pelo recente sequenciamento dos genomas de 23 espécies deste grupo (Bronski *et al*. 2020). A análise da *Cenp-C* em um número maior de espécies poderá ajudar na compreensão da evolução da proteína Cenp-C e consequentemente da evolução do centrômero em *Drosophila* e em outros organismos.

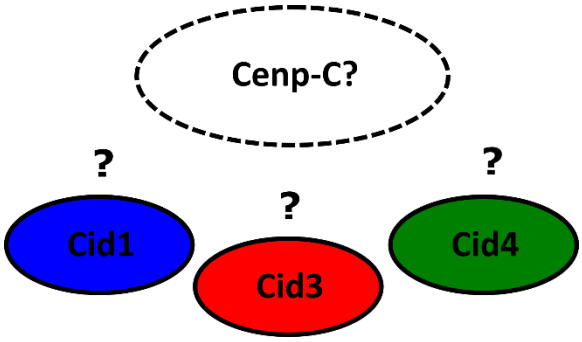


Figura 6. Esquema representando uma questão central do presente trabalho: quantas cópias da Cenp-C interagem com as três cópias da Cid encontradas nas espécies do grupo *montium*?

2. OBJETIVO

Investigar a evolução do gene da proteína centromérica *Cenp-C* em espécies de *Drosophila* do grupo *montium.* Em especial, queremos investigar se existem duplicações de Cenp-C nestas espécies que possam interagir funcionalmente com as duplicações de Cid já relatadas nestas espécies e se existem assinaturas de seleção positiva atuando em *Cenp-C*.

2.1. Objetivos específicos

2.1.1. Identificar o gene da proteína centromérica *Cenp-C* nas espécies do grupo *montium*.

2.1.2. Investigar se existem duplicações de *Cenp-C* nas espécies estudadas.

2.1.3. Identificar e caracterizar motivos proteicos conservados da proteína *Cenp-C* nas espécies do grupo *montium*.

2.1.4. Analisar as relações evolutivas entre as cópias de *Cenp-C* encontradas.

2.1.5. Identificar quais foram os mecanismos envolvidos nas duplicações da *Cenp-C*.

2.1.6. Testar se existe seleção positiva atuando na *Cenp-C*.

3. METODOLOGIA

3.1. Identificação das cópias de *Cenp-C* no genoma das espécies de *Drosophila*

Foi feita uma busca por tblastn utilizando a proteína Cenp-C de *D. melanogaster* para obtenção, no banco de dados do NCBI, de mRNAs da *Cenp-C* nas espécies do gênero *Drosophila*. As sequências das proteínas codificadas pelos mRNAs retornados eram utilizadas para fazer a busca dos genes de *Cenp-C* no genoma da respectiva espécie. Essas sequências também foram utilizadas para busca em espécies sem mRNA disponível, de acordo com a proximidade filogenética (Tabela 1).

Para determinar a região codificante do gene da *Cenp-C,* foi utilizado o algoritmo preditor de gene *Augustus* (Stanke & Morgenstern 2005). A sequência codificante da *Cenp-C* retornada pelo *Augustus* era validada com mRNA ou RNA-Seq. Essa validação só foi possível para três espécies do grupo *montium* (*D. serrata*, *D. kikkawai* e *D. triauraria*) em que sequências de mRNA ou reads de RNA-Seq estavam disponíveis (Tabela 1). Por isso, regiões com discordância quanto a presença de éxons, entre espécies do grupo *montium*, foram eliminadas de análises de seleção positiva e para construção de árvores filogenéticas (

Figura ***7***). O genoma de *D. melanogaster***,** que contém o maior número de genes anotados em *Drosophila***,** foi utilizado como referência para inferências de sintenia. Isso foi feito através da análise da presença ou não dos genes flanqueadores da *Cenp-C* esperados.

Tabela 1. Números de acesso das sequências obtidas no Genbank

Gene	ID do scaffold Genbank ou reads do genoma	ID do mRNA ou RNAseq do Genbank
D. pectinifera Cenp-C3	VNKC01003598.1	Indisponível
D. triauraria Cenp-C3	JABJVT010000005.1	SRR11780982
D. auraria Cenp-C3	VNJW01009994.1	Indisponível
D. tani Cenp-C3	VNJO01011109.1	Indisponível
D. rufa Cenp-C3	VNKH01000388.1	Indisponível
D. lateicornis Cenp-C3	VNKF01009708.1	Indisponível
D. asahinai Cenp-C3	VNJZ01004887.1	Indisponível
D. kanapiae Cenp-C4	VNJM01000860.1/ VNJM01001987.1	Indisponível
D. kikkawai Cenp-C1	AFFH02006098.1	XM_017182092.1
D. leontia Cenp-C1	VNKB01009439.1	Indisponível
D. bocki Cenp-C1	VNJY01005756.1	Indisponível
D. serrata Cenp-C1	MTTC01001254.1	XM_020957133.1
D. bunnanda Cenp-C1	VNKE01001283.1	Indisponível

D. truncata Cenp-C1	VNJQ01004447.1	Indisponível
D. mayri Cenp-C1	VNJN01008118.1	Indisponível
D. birchii Cenp-C1	VNKA01006487.1	Indisponível
D. watanabei Cenp-C1	VNJS01015544.1	Indisponível
D. punjabiensis Cenp-C1	VNJR01008397.1	Indisponível
D. jambulina Cenp-C1	VNJX01008392.1	Indisponível
D. seguyi Cenp-C1	VNJU01009249.1	Indisponível
D. vulcana Cenp-C1	VNJP01006877.1	Indisponível
D. vulcana Cenp-C5	VNJP01005529.1/ VNJP01004469.1	Indisponível
D. bakoue Cenp-C1	VNJL01004438.1	Indisponível
D. nikananu Cenp-C1	VNJV01009586.1	Indisponível
D. melanogaster Cenp-C1	NT_033777.3	NM_169228.3
D. simulnas Cenp-C1	NIFY01000004.1	XM_016174981.1
D. secheilia Cenp-C1	NIFZ01000004.1	XM_032720766.1
D. yakuba Cenp-C1	JAEDAC010000005.1	XM_002096785.2
D. erecta Cenp-C1	QMER02000001.1	XM_026983729.1
D. eugracilis Cenp-C1	AFPQ02005741.1	SRR346729
D. ananassae Cenp-C1	JACRYV010000154.1	XM_001955206.3
D. persimilis Cenp-C1	QMET02000001.1	XM_026986294.1
D. pseudoobscura Cenp-C1	WVEN01000001.1	XM_015182067.2
D. willistoni Cenp-C1	AAQB01009414.1	XM_023180684.1
D. mojavensis Cenp-C1	CH933806.1	SRR6968126
D. mojavensis Cenp-C2	CH933806.1	SRR6968126
D. arizonae Cenp-C1	SRR2070760	SRR2509638
D. arizonae Cenp-C2	SRR2070760	SRR2509638
D. navojoa Cenp-C1	LSRL02000055.1	-
D. navojoa Cenp-C2	LSRL02000228.1	XM_018113591.2
D. buzzatii Cenp-C1	https://dbuz.uab.cat/blast.php *D. buzzatii* Freeze 1 Scaffolds	SRR5145562/ SRR5145563
D. buzzatii Cenp-C2	https://dbuz.uab.cat/blast.php *D. buzzatii* Freeze 1 Scaffolds	SRR5145562/ SRR5145563
D. seriema Cenp-C1	ERR1976657	-
D. seriema Cenp-C2	ERR1976657	-
D. virilis Cenp-C1	QMEO02000199.1	XM_002056576.3
D. virilis Cenp-C2	QMEO02000199.1	XM_002056451.3
D. americana Cenp-C1	UEJX01001328.1	SRR5279019
D. americana Cenp-C2	UEJX01001683.1	SRR5279019
D. grimshawi Cenp-C1	AAPT01020190.1	XM_001994049.2
D. grimshawi Cenp-C2	AAPT01019320.1	XM_001989754.3
D. busckii Cenp-C1	DULD01000002.1	XM_017991761.1
D. busckii Cenp-C2	DULD01000002.1	XM_017992885.2
Phortica variegata	JXPM01003917.1	SRR1738675

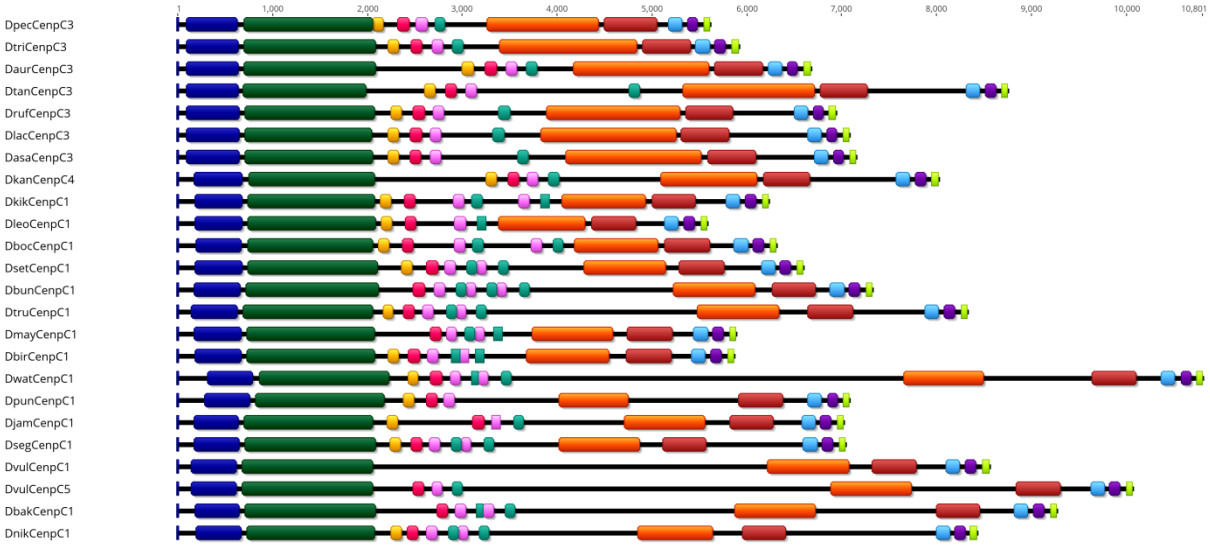


Figura 7. Representação dos genes das espécies do grupo *montium*. Linhas em preto representam os íntrons. Barras coloridas representam os éxons, em que aquelas com cores iguais possuem homologia de sequência. Os éxons em amarelo, rosa escuro, rosa claro e azul turquesa correspondem às sequências retiradas das análises.

3.2. Árvores filogenéticas

Os códons da *Cenp-C* das espécies de *Drosophila* foram alinhados pelo algoritmo *MUSCLE* implementado no software *Geneious* e o alinhamento resultante foi refinado manualmente quando necessário. As árvores filogenéticas foram construídas pelo método de máxima verossimilhança (MV), implementado no software *MEGAX (Kumar et al*. 2018). Foi utilizado o modelo de substituição de nucleotídeos GTR+G+I e número de réplicas de *bootstrap* de 1000.

3.3. Análise dos motivos da proteína Cenp-C

Sete motivos na Cenp-C de *D. melanogaster* (Figura 8), caracterizados por Heeger *et al*. (2005), foram utilizados para busca em espécies de *Drosophila* do grupo *montium*. Para isso, as sequências dos aminoácidos da Cenp-C1 de *D. melanogaster* e de mais 9 espécies do grupo *melanogaster* foram alinhadas pelo algoritmo *MUSCLE* implementado no software *Geneious*. As regiões das sequências correspondentes a cada motivo de *D. melanogaster* no alinhamento foram identificadas e extraídas. Para garantir que só motivos conservados seriam utilizados na análise, foram considerados apenas aqueles com identidade mínima de 60%, quando comparado com o mesmo motivo de todas as outras espécies do grupo *melanogaster*. O algoritmo gerador de motivos *MEME* (Bailey *et al*. 2015) foi utilizado para produzir uma matriz que indica a possibilidade de cada aminoácido no motivo. As sequências apresentando deleções ou inserções foram retiradas da análise, pois essas características não são consideradas pelo *MEME*. A matriz de possibilidades foi necessária para a busca dos motivos, nas espécies do grupo *montium*, através do algoritmo *MAST* (Bailey & Gribskov 1998). Só foram considerados os motivos que apresentassem *p*-value < 10^{-6}. As sequências retornadas pelo *MAST* foram utilizadas em conjunto com as sequências da primeira busca para produzir

uma matriz de possibilidades e iniciar novas buscas. Novamente, apenas sequências com *p*-value < 10^{-6}, foram consideradas.

Figura 8. Motivos funcionais da sequência da proteína Cenp-C em *Drosophila* identificados por Heeger *et al*. (2005). N e C indicam a região N-terminal e C-terminal da proteína, respectivamente.

3.4. Análises de seleção positiva

A razão entre substituições não-sinônimas e substituições sinônimas (dN/dS) ou omega (ω) permite inferir de que maneira um gene codificador de proteína evolui. Um valor de ω maior que 1 indica que o gene evoluí sob seleção positiva, um valor de ω igual a 1 indica que o gene evolui de maneira neutra e, por último, um valor de ω menor que 1 indica que o gene evoluí sob seleção negativa.

Para determinar se as cópias de *Cenp-C* evoluem sob seleção positiva, foi utilizado o modelo NSsites implementado no programa CodeML do pacote de programas *PAMLX* versão 1.3.1 (Xu & Yang, 2013). Dos modelos utilizados, em três (M1a, M7 e M8a) a razão entre substituições não-sinônimas e substituições sinônimas (dN/dS) não pode exceder 1 enquanto que em dois (M2a e M8) dN/dS é igual ou maior que 1. A análise de seleção positiva é feita comparando os modelos M1a e M2a, M7 e M8 e M8a e M8, sendo o primeiro par de modelos considerado o mais estringente. Sítios sob seleção positiva foram inferidos quando o teste da razão de verossimilhança era significativo e a probabilidade a posteriori BEB (*Bayes Empirical Bayes*) era maior que 80%.

O programa CodeML considera *gaps* como um dado inexistente para os cálculos estatísticos. Por isso foi feito um alinhamento de códons pelo algoritmo *MUSCLE* implementado no software *Geneious* e apenas os sítios em que até duas sequências apresentavam *gaps* foram mantidos. O alinhamento foi refinado manualmente e as regiões fracamente alinhadas foram deletadas. A árvore filogenética foi construída pelo método de máxima verossimilhança (MV), implementado no software *MEGAX* (Kumar *et al*. 2018). Foi utilizado o modelo de substituição de nucleotídeos HKY+G+I e número de réplicas de *bootstrap* de 1000. A árvore e o alinhamento foram utilizados como *input* no programa CodeML para o teste do modelo NSsites.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Descoberta de três novas cópias do gene da *Cenp-C* no grupo *montium*

Inicialmente, o gene da *Cenp-C* foi estudado em espécies do subgênero *Sophophora*, onde apenas uma cópia (*Cenp-C1*) foi encontrada e em espécies do subgênero *Drosophila*, onde duas cópias (*Cenp-C1* e *Cenp-C2*) foram encontradas (Teixeira *et al*. 2018). No primeiro subgrupo, a *Cenp-C1* está sempre flanqueada pelo gene *5-HT2B*, enquanto que no segundo subgrupo, a *Cenp-C1* está flanqueada pelos genes *CG1427* e *5-HT2B* e a *Cenp-C2* está flanqueada pelos genes *CLS* e *RpL27* (Figura 9) (Teixeira *et al*. 2018).

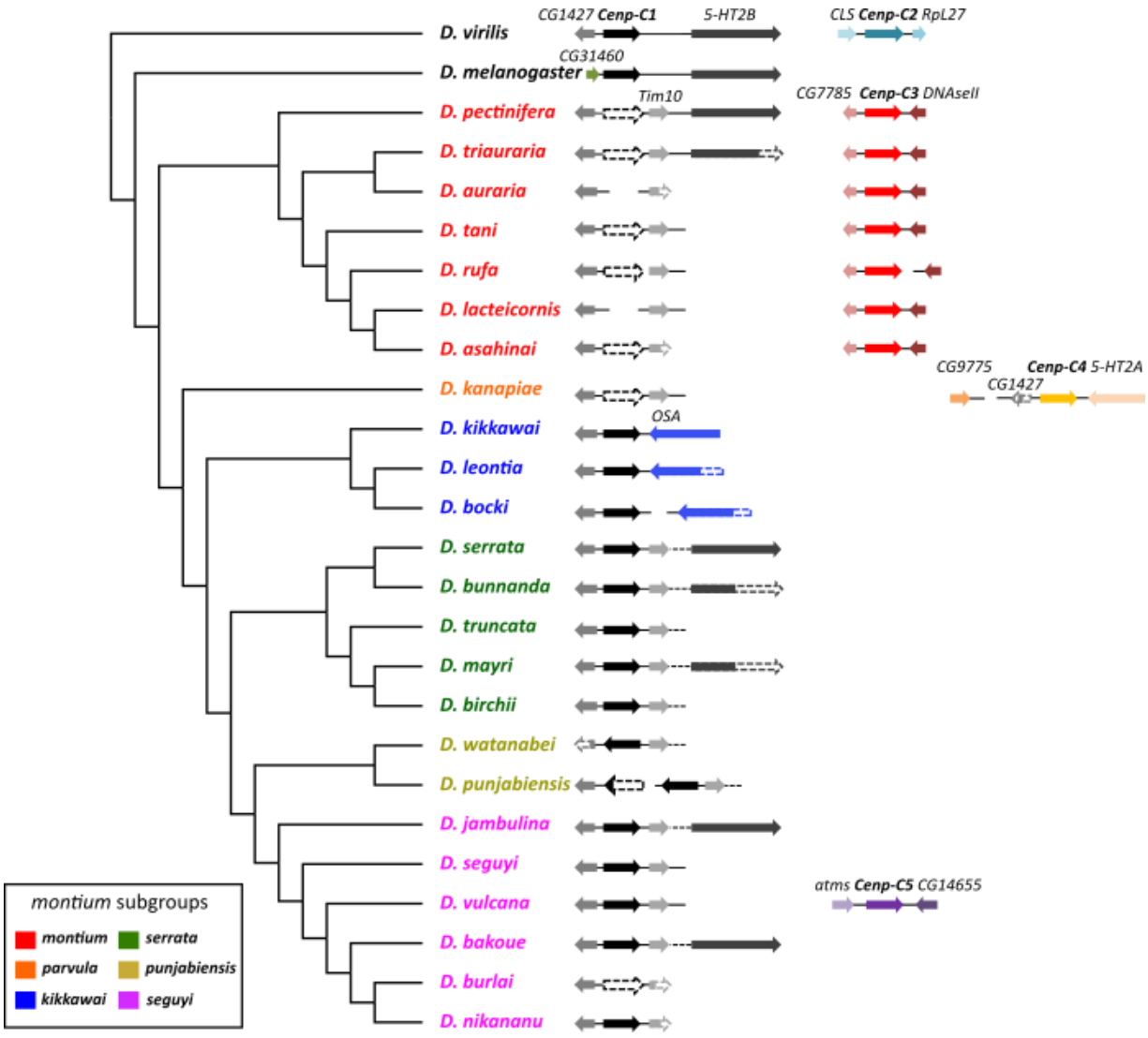


Figura 9. Filogenia das espécies de *Drosophila* do grupo *montium* (Conner *et al.* 2021). Para referência, também foram incluídas *D. melanogaster* do subgênero *Sophophora* e *D*. *virilis* do subgênero *Drosophila*, (Russo *et al*. 2013). As setas preenchidas e pontilhadas indicam respectivamente a presença e ausência dos genes que podem estar inteiros ou fragmentados. A orientação das setas indica a orientação dos genes. As linhas contínuas indicam presença de sequências intergênicas e as linhas pontilhadas indicam presença de outros genes não mostrados. As quebras das linhas indicam fragmentos não montados.

No presente trabalho, encontramos apenas uma cópia do gene *Cenp-C, Cenp-C1,* nas espécies dos subgrupos *kikkawai*, *serrata*, *punjabiensis* e *seguyi*, com exceção de *D. burlai* e *D. vulcana* (Figura 9). Nestes subgrupos, *Cenp-C1* encontra-se na maioria das vezes flanqueado pelos genes *CG1427* (como nas espécies do subgênero *Drosophila*) e *Tim10*. Mas nas espécies do subgrupo *kikkawai*, a *Cenp-C1* é flanqueada pelo gene *OSA* ao invés do *Tim10*. Como esperado, por pertenceram ao subgênero *Sophophora*, em algumas espécies do grupo *montium* o gene *5-HT2B* também foi encontrado próximo ao loco da *Cenp-C1*. Porém, a maioria dos *contigs* analisados não possuía tamanho suficiente para cobrir a localização de *5-HT2B* (Figura 9). Supreendentemente, nas duas espécies do subgrupo *punjabiensis* analisadas, a *Cenp-C1* se encontra em orientação invertida no loco. A causa desta inversão ainda deverá ser melhor investigada.

No subgrupo *montium,* encontramos uma nova cópia da *Cenp-C*, exclusiva deste subgrupo, encontrada em um loco flanqueado pelos genes *CG7785* e *DNAseII*. Denominamos está cópia de *Cenp-C3* (Figura 9). Neste subgrupo apenas a *Cenp-C3* foi encontrada.

Na única espécie analisada do subgrupo *parvula*, a *D. kanapie*, encontramos apenas uma cópia de *Cenp-C*. Trata-se de uma segunda nova duplicação da *Cenp-C,* que denominamos de *Cenp-C4*. Essa cópia se encontra dividida entre dois *contigs*, o *contig*1 (19.247 pb) e o *contig*2 (4.803 pb), que apresentam uma região de sobreposição de 1.120 pb e com 100% de identidade (Figura 10). Os pontos de quebra desses dois *contigs* correspondem a regiões de íntrons. Uma das extremidades de um terceiro *contig*, o *contig*3 (46.164pb), possui sobreposição de 91% de identidade com a porção final do *contig*2 (1372 pb), onde se encontra o fim da sequência da *Cenp-C4* (Figura 10). Como o *contig*3 apresenta em sua extremidade o fragmento do gene da *Cenp-C4* flanqueado pelo gene *5-HT2A* na posição 3' deduziu-se, com base em sintenia com outras espécies, que o gene da *Cenp-C4* se encontra flanqueado pelos genes *CG9775* e *5-HT2A* (Figura 9).

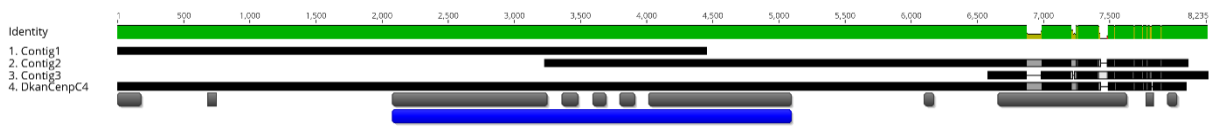


Figura 10. Alinhamento dos *contigs* 1, 2 e 3 com a sequência definida para o gene da *Cenp-C4* em *D. kanapiae* (DkanCenpC4). O alinhamento das sequências dos *contigs* mostra regiões idênticas (preto), divergentes (cinza) e de gaps (branco). As barras em cinza mostram sequências de íntrons inferidos

pelo algoritmo *Augustus* e por alinhamento com os genes da Cenp-C das outras espécies do grupo *montium*. A barra em azul representa a região deletada de *Cenp-C4* para análises de seleção positiva e construção da árvore filogenética.

Por último, além do gene da *Cenp-C1*, *D. vulcana* (subgrupo *seguyi*) foi a única espécie do grupo *montium* a apresentar uma segunda cópia integra no mesmo genoma. Esse parálogo da *Cenp-C1,* que denominamos de *Cenp-C5,* se encontra em um loco flanqueado pelos genes *atms* e *CG14655* (Figura 9). O gene da *Cenp-C5* foi encontrado dividido entre dois *contigs* (1 e 2) e com extremidades que não se sobrepõe (Figura 11). No entanto, como foi observada sintenia entre o loco dos genes *atms* e *CG14655* nas espécies representadas na Figura 9, as extremidades desses dois *contigs* foram conectadas. Essas extremidades correspondem a uma região de íntron (Figura 11) na sequência da *Cenp-C1* de *D. vulcana*.

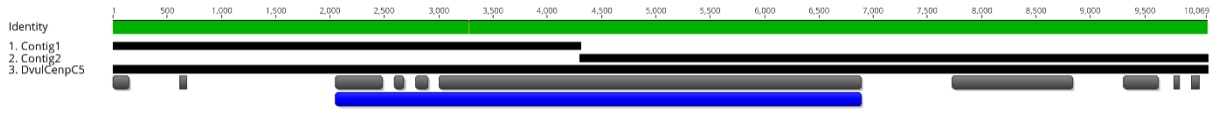


Figura 11. Alinhamento dos dois fragmentos do gene da *Cenp-C5* presentes em dois *contigs* (1 e 2) e da sequência definida para o gene da *Cenp-C5* em *D. vulcana* (DvulCenpC5). As barras em cinza mostram sequências de íntrons inferidos pelo algoritmo *Augustus* e por alinhamento com os genes da Cenp-C das outras espécies do grupo *montium*. A barra em azul representa a região deletada de *Cenp-C5* para análises de seleção positiva e construção da árvore filogenética.

É importante ressaltar que os locos das cinco cópias da *Cenp-C* (*Cenp-C1*, *Cenp-C2*, *Cenp-C3*, *Cenp-C4* e *Cenp-C5*) foram investigados em todas as espécies. Isso foi feito através do método de alinhamento gráfico *Dotplot*, utilizando a sequência de cada cópia de *Cenp-C* com seus genes flanqueadores contra seus respectivos locos nas outras espécies que supostamente não possuíam a cópia analisada. Um exemplo dessa análise é mostrado na Figura 12. Não encontramos nenhum vestígio da *Cenp-C1*, *Cenp-C2*, *Cenp-C3*, *Cenp-C4* ou *Cenp-C5* em espécies onde estes genes não foram encontrados. Isso indica que, provavelmente, a *Cenp-C3*, *Cenp-C4* e Cenp-C5 se originaram de duplicações independentes de *Cenp-C1*.

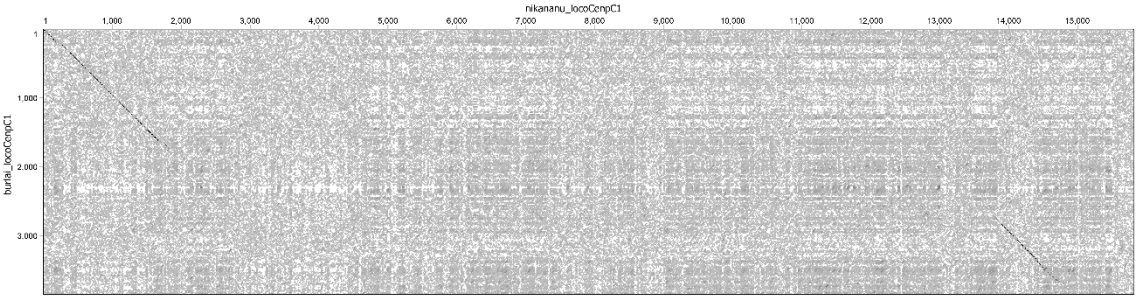


Figura 12. Gráfico *Dotplot* entre *Cenp-C1* de *D. nikananu* e seus genes flanquadores contra o loco da *Cenp-C1* de *D. burlai* e seus genes flanqueadores. A região de similaridade corresponde aos genes *CG1427* e *Tim10* que flanqueiam o gene da *Cenp-C1* de *D. nikananu*. Apenas os genes *CG1427* e *Tim10* estão presentes no loco da *Cenp-C1* no genoma de *D. burlai*.

No caso específico de *D. burlai,* nenhum loco contendo o gene inteiro da *Cenp-C* foi identificado. Porém, foram encontrados vários *contigs* curtos (1.026 pb a 25.030 pb) contendo fragmentos de *Cenp-C*. Quatro desses fragmentos estão flanqueados por diferentes conjuntos de genes, indicando localizações genômicas distintas. Desses quatro fragmentos, os três maiores estão representados na Figura 13.

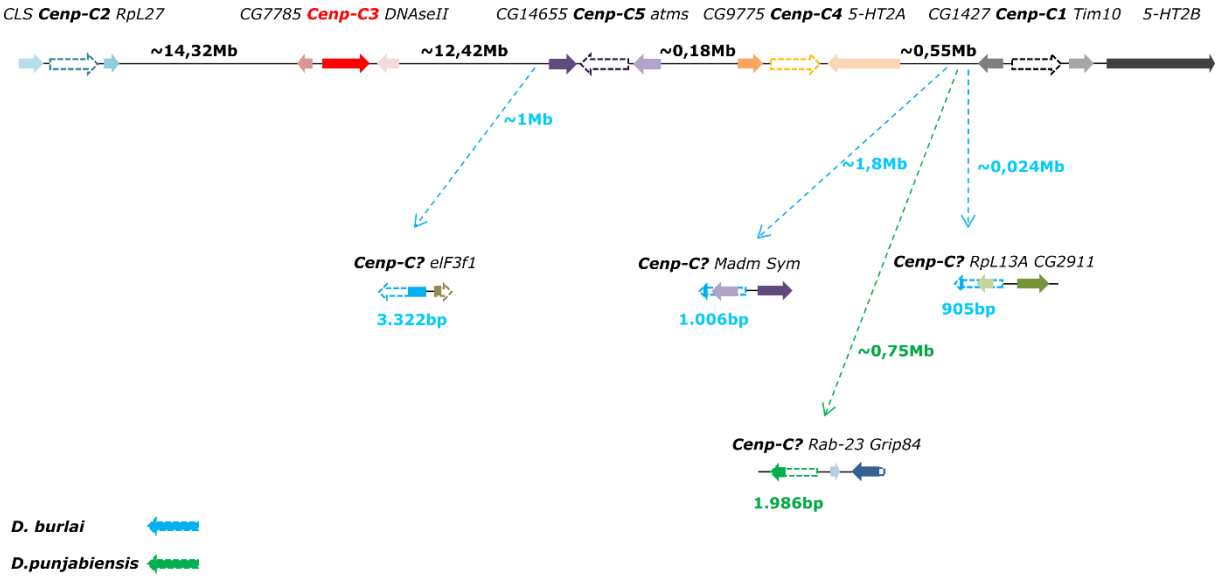


Figura 13. Disposição dos fragmentos do gene da *Cenp-C* de *D. burlai* e *D. punjabiensis* em relação aos 5 locos das cópias dos genes da *Cenp-C*, no cromossomo 3R de *D. triauraria*. As setas preenchidas e pontilhadas indicam, respectivamente, a presença e ausência dos genes que podem estar inteiros ou fragmentados. A orientação das setas indica a orientação dos genes no cromossomo. O tamanho das sequências de DNA presente entre os locos está representado em preto acima das linhas contínuas. As linhas pontilhadas com setas nas extremidades (azul e verde) mostram localização dos locos indicados pela seta. A distância desses locos em relação ao gene mais próximo (*CG14655* ou *CG1427*) está representada ao lado de cada linha pontilhada com a mesma cor da linha. Abaixo de cada fragmento do gene da *Cenp-C* é mostrado seu tamanho em pares de bases.

O mapeamento de *reads* de sequenciamento de *D. burlai* contra o gene ou a sequência codificante da *Cenp-C1* da espécie mais próxima (*D. nikananu*), também não possibilitou a recuperação da sequência completa do gene da *Cenp-C* nesta espécie. O que se observou foi um resultado ambíguo, com diferentes *reads* mapeando em uma mesma posição. É provável que nenhum gene completo da *Cenp-C* tenha sido montado em um único *contig* de

D. burlai, talvez devido à presença de sequências repetitivas em abundância nas regiões de íntrons, o que pode ter impedido a sua montagem. Por exemplo, no caso do fragmento de *Cenp-C* flanqueado pelo gene *eIF3f1* (Figura 13), o *contig* é justamente interrompido onde se iniciaria um íntron na sequência da *Cenp-C*. Essa mesma explicação pode ser atribuída à separação da *Cenp-C4* e *Cenp-C5* em fragmentos contidos em mais de um *contig*.

De fato, a maioria das espécies do grupo *montium* teve seus genomas montados a partir de *reads* curtas (100 pb) sequenciadas por *Illumina HiSeq 2000* ou *HiSeq 2500 Systems* (Bronski *et al*. 2020). Em contraste, outros sequenciamentos de três espécies do grupo geraram *reads* muito mais longas, como: 3kb e 8kb em *D. kikkawai* por uma combinação de 454 e Tecnologia Ilumina (Chen *et al*. 2014); 8.8 kb em *D. serrata* por *PacBio* (Allen *et al*. 2017); e 10 kb em *D. triauraria* por *Oxford Nanopore* e *Ilumina Hiseq* (Torosin *et al*. 2020), o que facilitou a montagem da *Cenp-C*. Por exemplo, a *Cenp-C1* de *D. serrata* se encontra separada entre dois *contigs* (*contig*1: 31.192 pb e *contig*2: 13.092 pb) no genoma montado por Bronski *et al*. (2020) (Figura 14). Já no genoma montado por Allen *et al*. (2017), a sequência se encontra em um mesmo *scaffold* de 5.769.022 pb. Outro fato que aponta que os genes da *Cenp-C* de *D. burlai* e *D. kanapiae* estão fragmentados por limitação da montagem dos genomas é que a Cenp-C é necessária para manutenção da Cid no centrômero (Erhardt *et al*. 2008; Orr & Sunkel 2011). Por isso, espera-se que cada espécie tenha pelo menos uma cópia do gene.

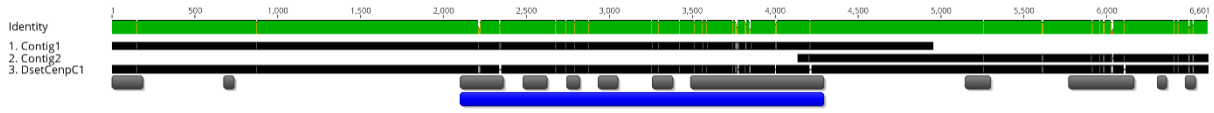


Figura 14. Alinhamento dos dois fragmentos (*contigs* 1 e 2) do gene da *Cenp-C1* de *D. serrata* montados por Bronski *et al*. (2020) e da sequência completa da *Cenp-C1* presente em apenas um *contig* montado por Allen *et al*. (2017). As barras em cinza mostram sequências dos íntrons definidos com base em RNA-Seq. A barra em azul representa a região deletada da *Cenp-C1* para análises de seleção positiva e construção da árvore filogenética.

Em *D. kanapiae* (subgrupo *parvula*), além do gene da *Cenp-C4*, também foi identificado um fragmento do gene da *Cenp-C* ocupando inteiramente um *contig* (3.140pb), o que impossibilita a identificação do seu loco.

Em *D. punjabiensis* (subgrupo *punjabiensis*), além do gene da *Cenp-C1*, também foram identificados outros seis fragmentos do gene da *Cenp-C*. Um deles ocupa quase inteiramente um *contig* (3.029 pb) e outros três estão presentes em *contigs* nos quais não foram identificados outros genes, sendo, portanto, impossível inferir os locos desses quatro fragmentos. Um quinto fragmento é flanqueado pelo gene *CG1427* que está em um *contig* diferente daquele onde está a *Cenp-C1*. Esse fragmento e o gene da *Cenp-C1* estão

flanqueados na posição 3’ por sequências diferentes. Isso, possivelmente, indica que houve uma duplicação parcial de *Cenp-C1* neste loco (Figura 9). E por último, o sexto fragmento foi encontrado flanqueado pelo gene *Rab-23* em uma região diferente do genoma (Figura 13).

Em *D. watanabei* (subgrupo *punjabiensis*), além da *Cenp-C1*, foram identificados outros cinco fragmentos da *Cenp-C* em diferentes *contigs* (2.692pb a 15.737 pb). No entanto, nenhum deles contém outro gene que possibilite a identificação do loco.

Em *D. vulcana* (subgrupo *seguyi*), além da *Cenp-C1* e da *Cenp-C5*, três fragmentos da *Cenp-C* foram encontrados em três diferentes *contigs*. Um desses *contigs* possui mais três outros genes (*Herzog*, *Sh3beta* e *Sec63*) que se localizam no braço esquerdo do cromossomo 3 (3L) de *D*. *triauraria*.

Em *D. bakoue* (subgrupo *seguyi*), além da *Cenp-C1,* um fragmento da *Cenp-C* foi encontrado em um *contig* contendo o gene (*canoe*) que se localiza no braço direito do cromossomo 3 (3R) de *D. triauraria*.

Por último, em *D. nikananu* (subgrupo *seguyi*), além da *Cenp-C1*, um fragmento da *Cenp-C* foi encontrado. Como nenhum outro gene foi encontrado no *contig* contendo esse fragmento, seu loco não pode ser identificado.

Os genes inteiros de *Cenp-C* encontrados nas espécies do grupo *montium* possuem grande variação de tamanho (5.575 a 10.801 pb) (Tabela 2). Essa variação ocorre, principalmente, devido à diferença de tamanho dos íntrons, já que a sequência codificadora (CDS) varia apenas de 3.513 a 4.650 pb. Esse tamanho variável entre os íntrons pode ser explicado, em parte, pela inserção de TEs nos íntrons, já que estes elementos podem corresponder a 26% (ou 2.819pb) (*D. watanabei Cenp-C1*) ou até 43,3% (ou 4.353pb) (*D. vulcana Cenp-C5*) do tamanho do gene. Em contraste, *Cenp-C* menores possuem menor proporção de TEs, como 1,2% (ou 67 pb) em *D. leontia Cenp-C1* ou 2,4% (ou 135 pb) em *D. pectinifera Cenp-C3*) (Figura 15).

Tabela 2. Características gerais dos genes da *Cenp-C* das espécies do grupo *montium*

Subgrupos	Gene	N. de éxons	Tamanho do gene (pb)	Tamanho da CDS (pb)
montium	***D. pectinifera Cenp-C3***	10	5.610	4.383
	D. triauraria Cenp-C3	11	5.907	4.650
	D. auraria Cenp-C3	11	6.667	4.632
	D. tani Cenp-C3	11	8.750	4.485
	D. rufa Cenp-C3	11	6.933	4.596
	D. lateicornis Cenp-C3	11	7.078	4.587
	D. asahinai Cenp-C3	11	7.147	4.602
parvula	***D. kanapiae Cenp-C4***	11	8.013	4.086
kikkawai	***D. kikkawai Cenp-C1***	13	6.229	4.149

	D. leontia Cenp-C1	13	5.575	3.978
	D. bocki Cenp-C1	11	6.310	4.122
serrata	***D. serrata Cenp-C1***	12	6.591	4.149
	D. bunnanda Cenp-C1	12	7.322	4.245
	D. truncata Cenp-C1	12	8.324	4.023
	D. mayri Cenp-C1	11	5.885	3.954
	D. birchii Cenp-C1	12	5.861	4.101
punjabiensis	***D. watanabei Cenp-C1***	12	10.801	4.068
	D. punjabiensis Cenp-C1	10	7.076	3.654
seguyi	***D. jambulina Cenp-C1***	11	7.015	3.864
	D. seguyi Cenp-C1	12	7.039	4.116
	D. vulcana Cenp-C1	7	8.552	3.513
	D. vulcana Cenp-C5	10	10.063	3.798
	D. bakoue Cenp-C1	11	9.264	3.978
	D. nikananu Cenp-C1	12	8.420	4.023

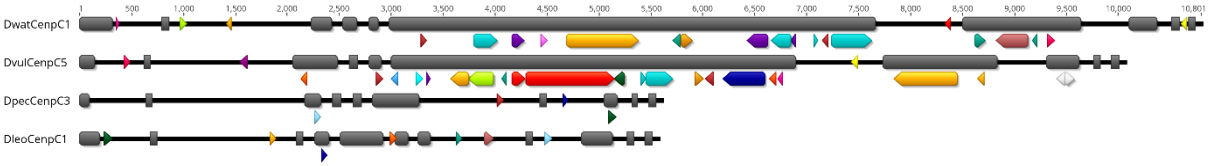


Figura 15. Representação da sequência do gene da *Cenp-C1* de *D. watanabei*, *Cenp-C5* de *D. vulcana*, *Cenp-C3* de *D. pectinifera* e *Cenp-C1* de *D. leontia*. As barras em cinza mostram sequências de íntrons inferidos pelo algoritmo *Augustus* e por alinhamento com os genes da *Cenp-C* de outras espécies do grupo *montium*. As linhas pretas representam os éxons. As barras coloridas representam sequências que possuem similaridade com TEs de acordo com o banco de dados RepBase.

Os cinco locos das cópias da *Cenp-C* descritos acima estão presentes no cromossomo 3R de *D. triauraria* (Figura 13). Genes representando estes 3 locos também estão localizados no cromossomo 3 de *D. melanogaster,* espécie que se divergiu do grupo *montium* há cerca de 28 milhões de anos (Russo *et al*. 2013). Portanto, é provável que os locos onde se encontram as cópias *Cenp-C3*, *Cenp-C4* ou *Cenp-C5* também estejam presentes no cromossomo 3 em todas as espécies do grupo *montium*.

As evidências obtidas no presente trabalho sugerem que todos as cópias de *Cenp-C* (*Cenp-C3*, *Cenp-C4* e *Cenp-C5*) identificadas nas espécies do grupo *montium* são funcionais. A evidência mais robusta é a essencialidade da *Cenp-C* na função centromérica que requer ao menos uma cópia. Outra evidência é que o algoritmo *Augustus* identificou a sequência codificante esperada para cada duplicação de *Cenp-C* e ausência de stop códons prematuros ao longo das sequências. A terceira evidência é a conservação observada entre as sequências de aminoácidos das cópias da *Cenp-C,* o que inclui motivos proteicos importantes para a função canônica de Cenp-C (ver tópico 4.2).

Como abordado anteriormente, em espécies do subgênero *Drosophila* foi hipotetizado que cada uma das duas cópias de Cid (Cid1 ou Cid6 e Cid5) e de Cenp-C (Cenp-C1 e Cenp-C2) poderiam estar interagindo de maneira específica entre elas como mostrado na Figura 5. Por isso, buscamos investigar com quantas cópias de Cenp-C as três cópias de Cid (Cid1, Cid3 e Cid4) estariam interagindo nas espécies do grupo *montium*.

Apesar de termos encontrado novas cópias de *Cenp-C* nessas espécies, cada espécie possui apenas uma cópia funcional, que equivale a *Cenp-C1*, mas em diferentes locos. Desta forma, podemos considerar *Cenp-C3* e *Cenp-C4* como "ortólogos funcionais" de *Cenp-C1*. Já *D. vulcana* é a única espécie do grupo *montium* que manteve duas cópias de *Cenp-C* no genoma, *Cenp-C1* e *Cenp-C5*.

Os resultados acima indicam que, supreendentemente, apenas uma cópia de Cenp-C é suficiente para interagir funcionalmente com as 3 cópias de Cid (Cid1, Cid3 e Cid4) presentes nas espécies do grupo *montium*. Este resultado contrasta com os obtidos em espécies do subgênero *Drosophila*, onde parálogos divergentes de Cid e Cenp-C co-existem nos mesmos genomas e possivelmente interagem entre si de forma específica. Já em *D. vulcana*, a presença de duas cópias Cenp-C levanta a questão se estas duplicatas interagem com cópias diferentes de Cid.

4.2. Identificação dos motivos proteicos conservados em cópias da *Cenp-C* nas espécies do grupo *montium*

A *Cenp-C1* de *D. melanogaster* possui 7 motivos proteicos funcionais distribuídos ao longo de sua sequência, da região N-terminal para a C-terminal, sendo estas: R-rich (*arginine-rich*), DH (*Drosophilid Cenp-C Homolegues*), AT *hook* 1 (AT1), NLS (*Nuclear Localization Signal*), CenH3 *binding*, AT *hook* 2 (AT2) e Cupin (Figura 16A). Os motivos AT1 e AT2 e o motivo NLS apresentam similaridade com AT *hook* que medeia a ligação ao suco menor do DNA e com o sinal de localização nuclear, respectivamente (Heeger *et al*. 2005).

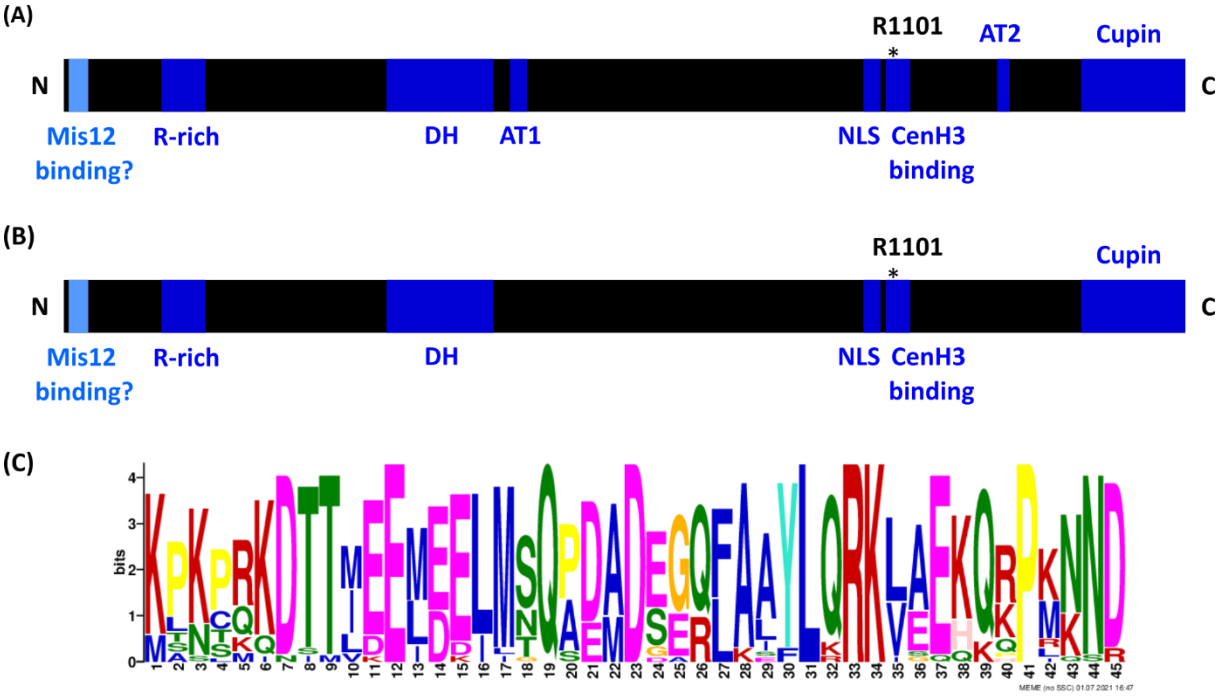


Figura 16. Motivos funcionais da sequência da proteína Cenp-C em *Drosophila*. (A) Representação dos 7 motivos funcionais identificados por Heeger et al. (2005) e do provável motivo Mis12 binding e suas respectivas posições na sequência da proteína da Cenp-C1 em *D. melanogaster*. O asterisco em preto corresponde a arginina (R1101) da Cenp-C que é idêntica em todas as proteínas. N e C indicam a região C-terminal e N-terminal da proteína, respectivamente. (B) Representação dos motivos presentes na sequência das cópias da Cenp-C, nas espécies do grupo *montium*. (C) Logo gerado pelo *MEME* do provável motivo de ligação do complexo Mis12 (Mis12 binding).

Todos os 7 motivos com exceção do AT1, parecem desempenhar importantes funções, já que a Cenp-C sem tais regiões foi incapaz de prevenir anormalidades fenotípicas em embriões contendo a Cenp-C mutante. A arginina presente na posição 1101 da Cenp-C1 (R1101), que corresponde à região do motivo CenH3 *binding*, se mostrou importante para a localização da Cenp-C no centrómero (Heeger *et al*. 2005). Esse aminoácido nesta posição foi encontrado em Cenp-C de *Drosophila,* plantas, leveduras e vertebrados (Heeger *et al*. 2005; Talbert *et al*. 2004; Teixeira *et al*. 2018). Além disso, o motivo Cupin é necessário para a formação de dímeros de Cenp-C. Apenas após essa dimerização é possível a interação da Cenp-C com a chaperona CAL1 para a deposição de nucleossomos contendo a Cid na cromatina centromérica e também para o recrutamento da própria Cenp-C para esse loco (Roure *et al*. 2019). No entanto, a função específica da maioria dos motivos ainda permanece desconhecida.

Dada a importante função de pelo menos seis dos motivos da Cenp-C determinados por Heeger *et al*. (2005) é esperado que os mesmos estejam conservados em espécies que possuem apenas uma cópia funcional do gene. Como previsto, com exceção dos motivos AT1 e AT2, todos os outros motivos se encontram conservados nas cópias de Cenp-C das

espécies do grupo *montium*, incluindo a arginina presente na posição 1101 (Figura 16B, Figura 17 e Figura 18). A conservação de motivos essenciais, incluindo CenH3 *binding* e o Cupin necessários para localização da Cenp-C/Cid no centrômero é um forte indicativo da manutenção da função centromérica para todas as cópias de *Cenp-C* identificadas nas espécies do grupo *montium*. Embora o motivo AT1 tenha se mostrado não essencial para função da Cenp-C1 em *D. melanogaster*, o mesmo não é verdadeiro para o motivo AT2 (Heeger *et al*. 2005). Desta forma, talvez este motivo não tenha sido detectado nas espécies do grupo *montium* devido ao seu grau de divergência em relação ao de outras espécies.

Enquanto que a região C-terminal da Cenp-C1 em *D. melanogaster* é suficiente para localização centromérica (Heeger *et al*. 2005), a região N-terminal é necessária para o recrutamento de proteínas do cinetócoro (Pzewloka *et al*. 2011). Esse recrutamento ocorre por interação direta entre o Mis12C e o fragmento N-terminal (1-105) da proteína Cenp-C1. Foi demonstrado que dentro desse fragmento, os resíduos de 9-35 possuem determinantes essenciais nessa interação (Liu *et al*. 2016). Outro estudo mostrou que os primeiros 45 aminoácidos da Cenp-C1 de *D. melanogaster* estão envolvidos na interação com Mis12-Nnf1a (subunidades do Mis12C) (Richter *el al*. 2016). Concordante com esses achados, detectamos um motivo na posição N-terminal de todas as Cenp-C das espécies do grupo *montium*. Esse motivo corresponde à região 2-43 da proteína Cenp-C1 de *D. melanogaster* (Figura 16C, Figura 17 e Figura 18). A ligação da Cenp-C ao Mis12C é necessária para o recrutamento dos demais componentes do cinetócoro ao centrômero (Liu *et al*. 2016; Richter *et al*. 2016). Por isso, a presença desse sexto motivo (Mis12 binding) conservado na Cenp-C das espécies do grupo *montium* pode representar mais um indício do seu papel na função centromérica.

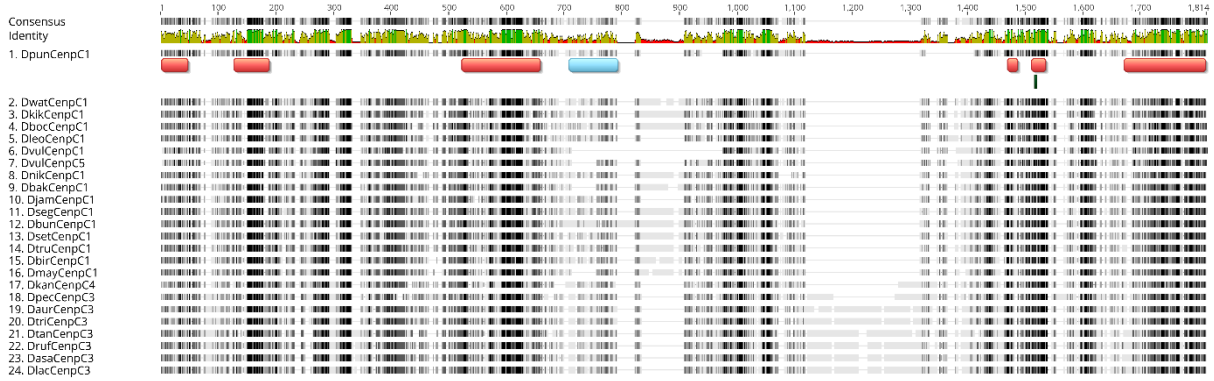
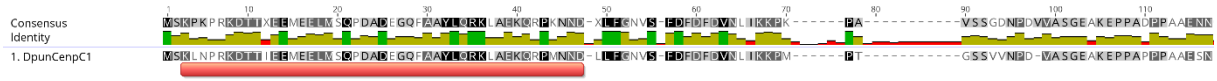
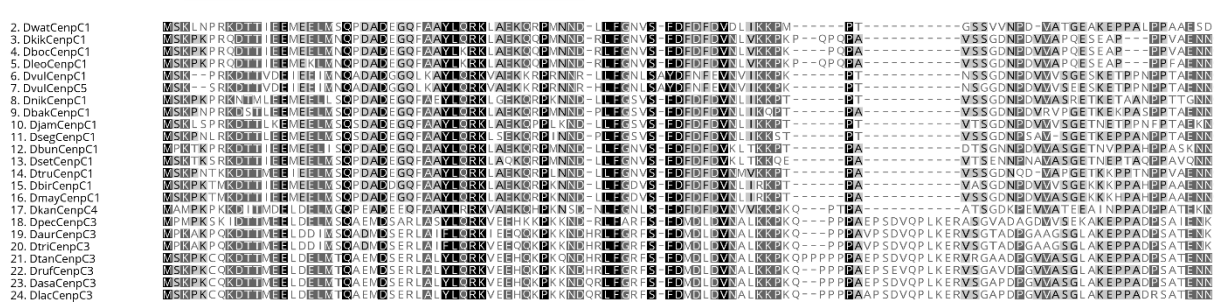
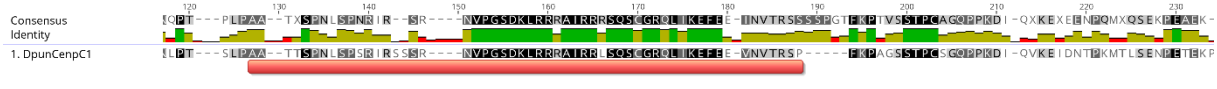
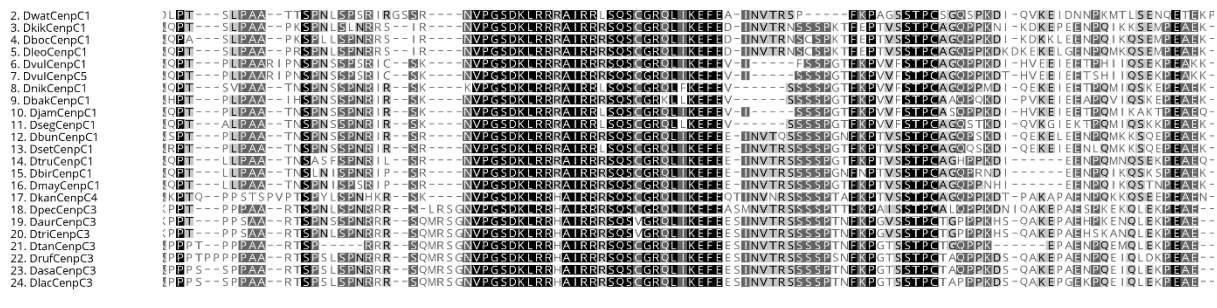


Figura 17. Alinhamento das proteínas Cenp-C das espécies do grupo *montium* mostrando a posição dos motivos proteicos identificados no presente trabalho. As barras em vermelho representam da esquerda para a direita: Mis12 *binding*, R-rich, DH, NLS, CenH3 *binding* e Cupin. A barra azul-claro representa as sequências removidas para a construção da filogenia dos genes e teste de seleção positiva. A pequena barra em verde-escuro abaixo do motivo CenH3 *binding* representa o aminoácido R-1101, presente em todas as cópias de Cenp-C do grupo *montium*.

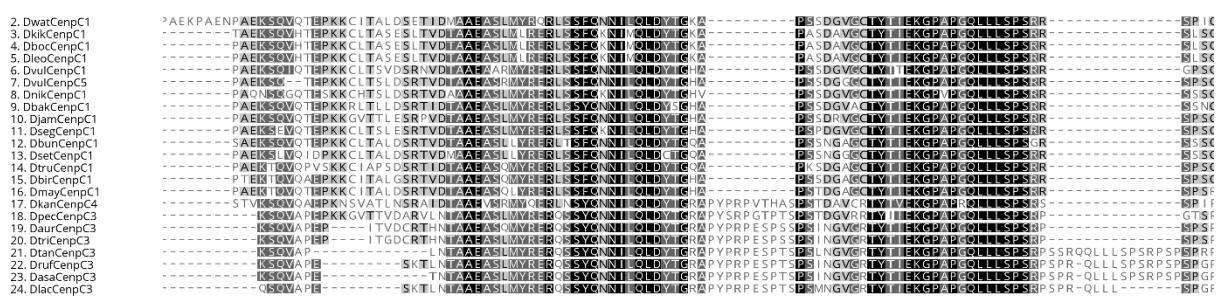

Consensus
Identity
1. DpunCenpC1

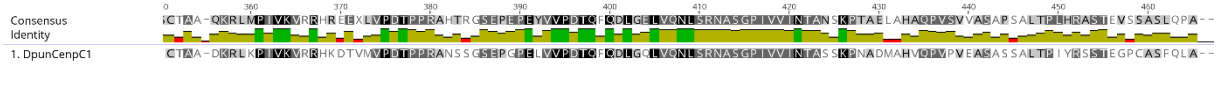

2. DwatCenpC1
3. DkikCenpC1
4. DbocCenpC1
5. DleoCenpC1
6. DvulCenpC1
7. DvulCenpC5
8. DnikCenpC1
9. DbakCenpC1
10. DjamCenpC1
11. DsegCenpC1
12. DbunCenpC1
13. DsetCenpC1
14. DtruCenpC1
15. DbirCenpC1
16. DmayCenpC1
17. DkanCenpC4
18. DpecCenpC3
19. DaurCenpC3
20. DtriCenpC3
21. DtanCenpC3
22. DrufCenpC3
23. DasaCenpC3
24. DlacCenpC3

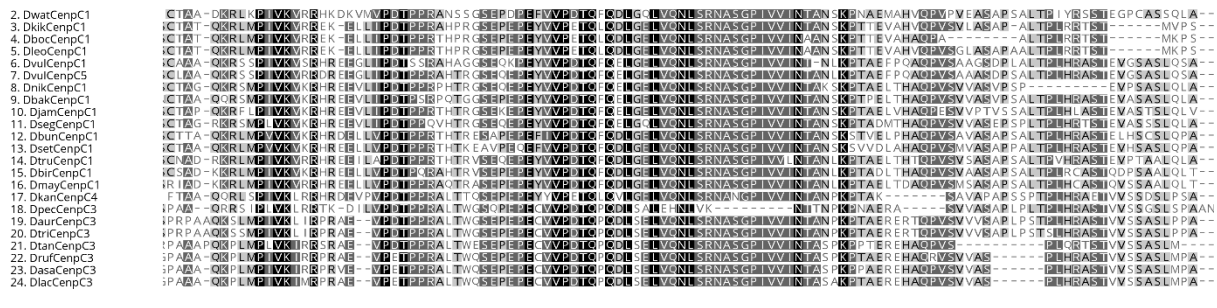

Consensus
Identity
1. DpunCenpC1

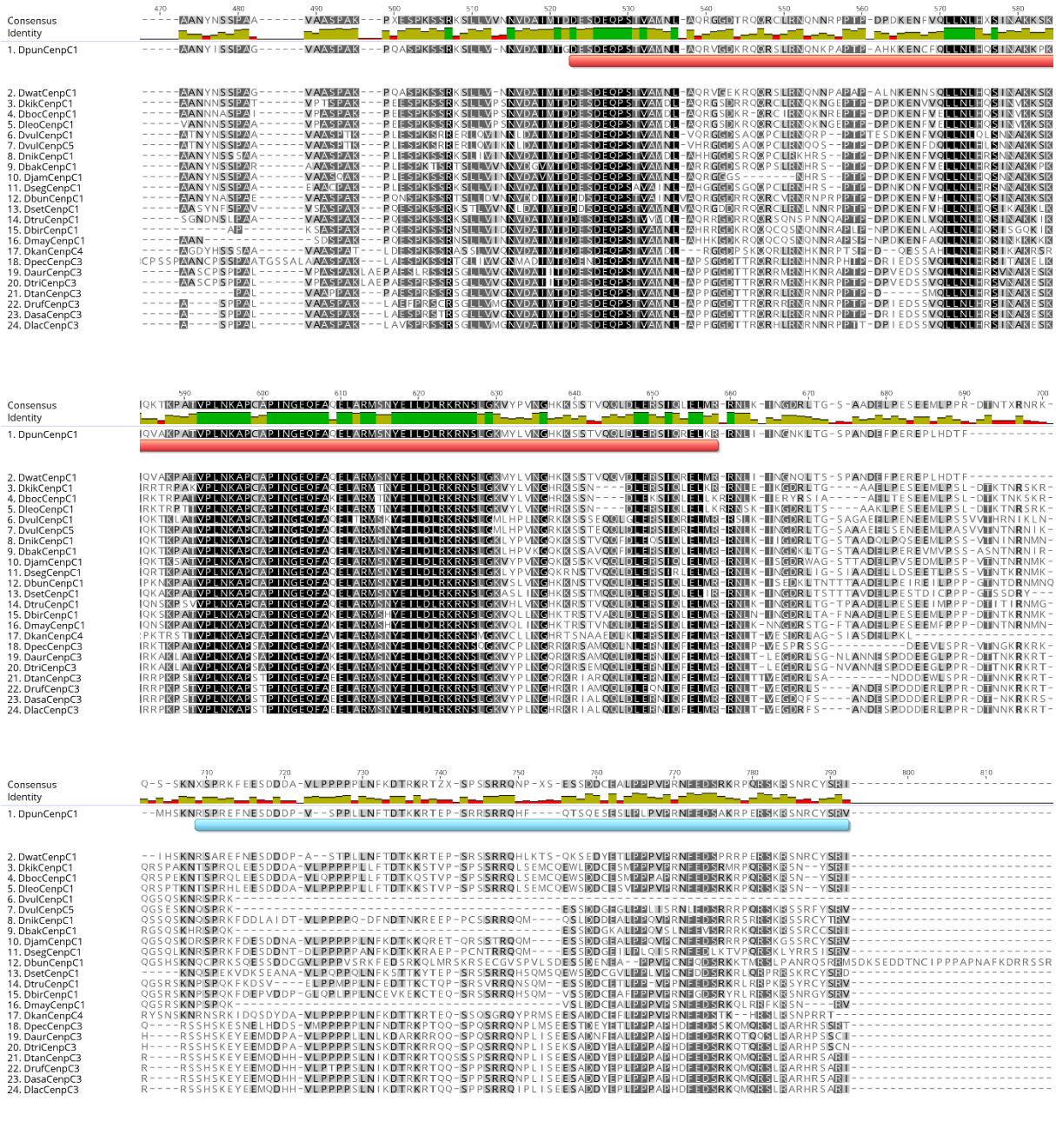

2. DwatCenpC1
3. DkikCenpC1
4. DbocCenpC1
5. DleoCenpC1
6. DvulCenpC1
7. DvulCenpC5
8. DnikCenpC1
9. DbakCenpC1
10. DjamCenpC1
11. DsegCenpC1
12. DbunCenpC1
13. DsetCenpC1
14. DtruCenpC1
15. DbirCenpC1
16. DmayCenpC1
17. DkanCenpC4
18. DpecCenpC3
19. DaurCenpC3
20. DtriCenpC3
21. DtanCenpC3
22. DrufCenpC3
23. DasaCenpC3
24. DlacCenpC3

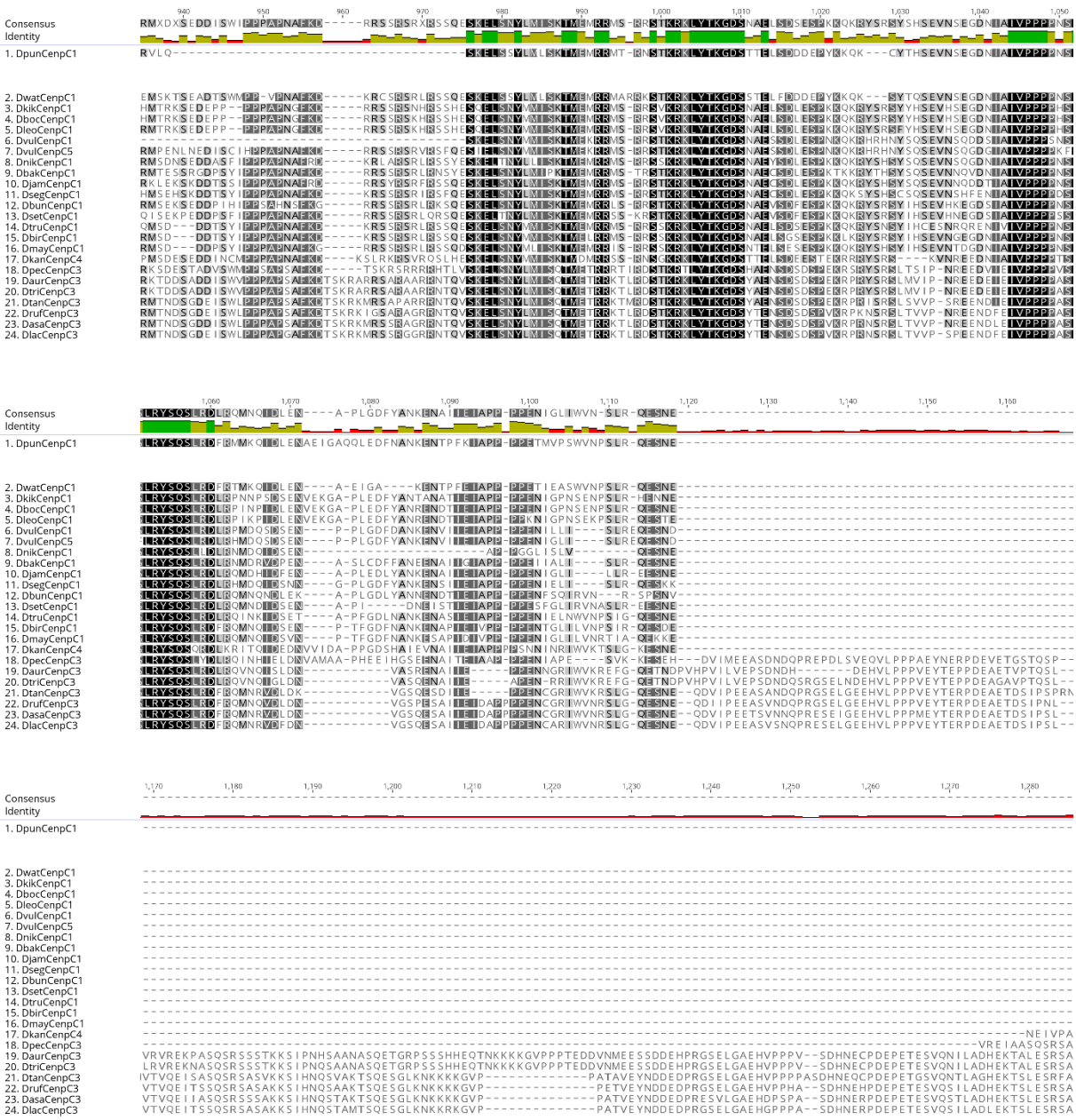

Consensus
Identity
1. DpunCenpC1

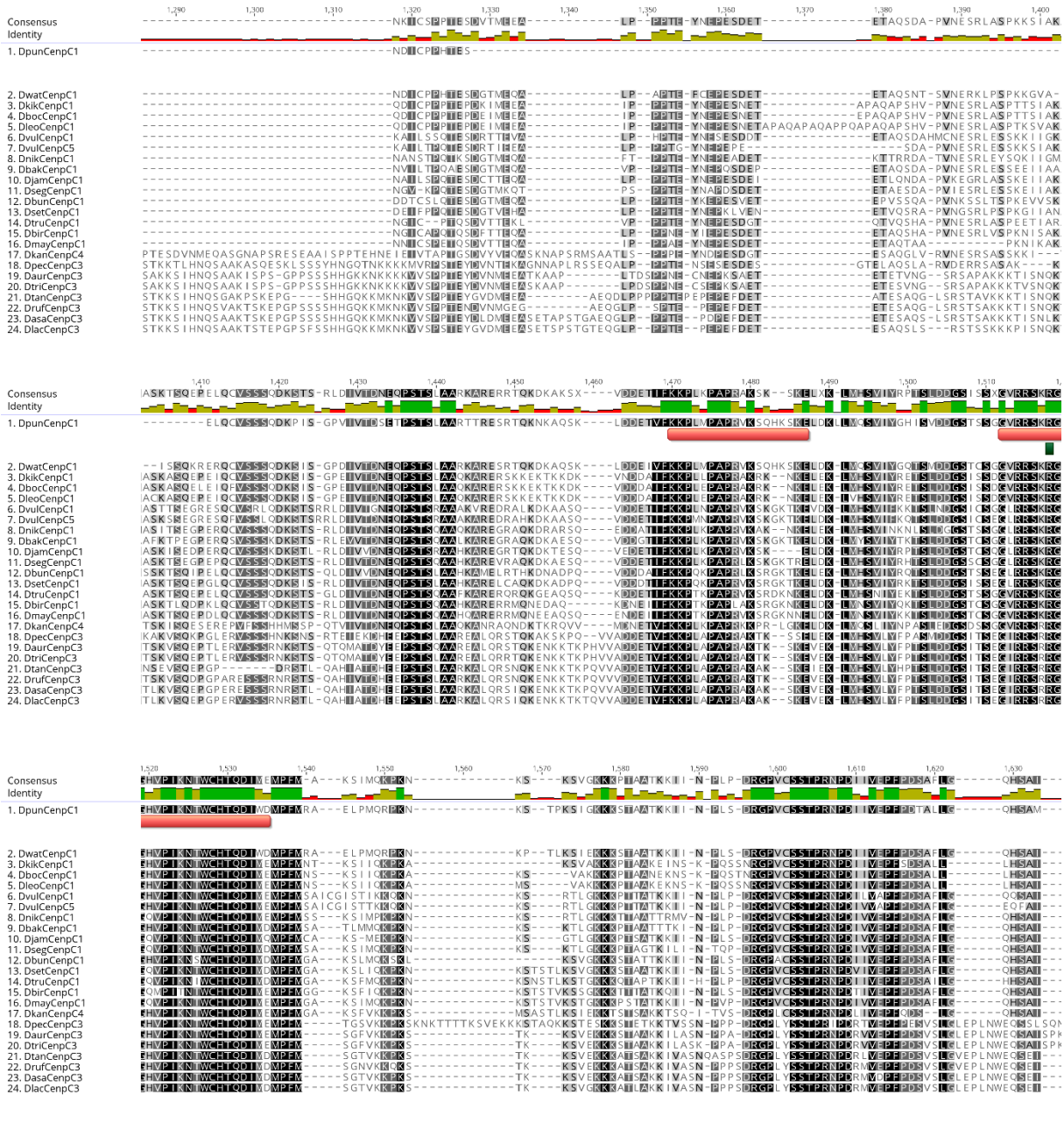

2. DwatCenpC1
3. DkikCenpC1
4. DbocCenpC1
5. DleoCenpC1
6. DvulCenpC1
7. DvulCenpC5
8. DnikCenpC1
9. DbakCenpC1
10. DjamCenpC1
11. DsegCenpC1
12. DbunCenpC1
13. DsetCenpC1
14. DtruCenpC1
15. DbirCenpC1
16. DmayCenpC1
17. DkanCenpC4
18. DpecCenpC3
19. DaurCenpC3
20. DtriCenpC3
21. DtanCenpC3
22. DrufCenpC3
23. DasaCenpC3
24. DlacCenpC3


Consensus
Identity
1. DpunCenpC1


2. DwatCenpC1
3. DkikCenpC1
4. DbocCenpC1
5. DleoCenpC1
6. DvulCenpC1
7. DvulCenpC5
8. DnikCenpC1
9. DbakCenpC1
10. DjamCenpC1
11. DsegCenpC1
12. DbunCenpC1
13. DsetCenpC1
14. DtruCenpC1
15. DbirCenpC1
16. DmayCenpC1
17. DkanCenpC4
18. DpecCenpC3
19. DaurCenpC3
20. DtriCenpC3
21. DtanCenpC3
22. DrufCenpC3
23. DasaCenpC3
24. DlacCenpC3


Consensus
Identity
1. DpunCenpC1
2. DwatCenpC1
3. DkikCenpC1
4. DbocCenpC1
5. DleoCenpC1
6. DvulCenpC1
7. DvulCenpC5
8. DnikCenpC1
9. DbakCenpC1
10. DjamCenpC1
11. DsegCenpC1
12. DbunCenpC1
13. DsetCenpC1
14. DtruCenpC1
15. DbirCenpC1
16. DmayCenpC1
17. DkanCenpC4
18. DpecCenpC3
19. DaurCenpC3
20. DtriCenpC3
21. DtanCenpC3
22. DrufCenpC3
23. DasaCenpC3
24. DlacCenpC3


Consensus
Identity
1. DpunCenpC1
2. DwatCenpC1
3. DkikCenpC1
4. DbocCenpC1
5. DleoCenpC1
6. DvulCenpC1
7. DvulCenpC5
8. DnikCenpC1
9. DbakCenpC1
10. DjamCenpC1
11. DsegCenpC1
12. DbunCenpC1
13. DsetCenpC1
14. DtruCenpC1
15. DbirCenpC1
16. DmayCenpC1
17. DkanCenpC4
18. DpecCenpC3
19. DaurCenpC3
20. DtriCenpC3
21. DtanCenpC3
22. DrufCenpC3
23. DasaCenpC3
24. DlacCenpC3


Consensus
Identity
1. DpunCenpC1
2. DwatCenpC1
3. DkikCenpC1
4. DbocCenpC1
5. DleoCenpC1
6. DvulCenpC1
7. DvulCenpC5
8. DnikCenpC1
9. DbakCenpC1
10. DjamCenpC1
11. DsegCenpC1
12. DbunCenpC1
13. DsetCenpC1
14. DtruCenpC1
15. DbirCenpC1
16. DmayCenpC1
17. DkanCenpC4
18. DpecCenpC3
19. DaurCenpC3
20. DtriCenpC3
21. DtanCenpC3
22. DrufCenpC3
23. DasaCenpC3
24. DlacCenpC3

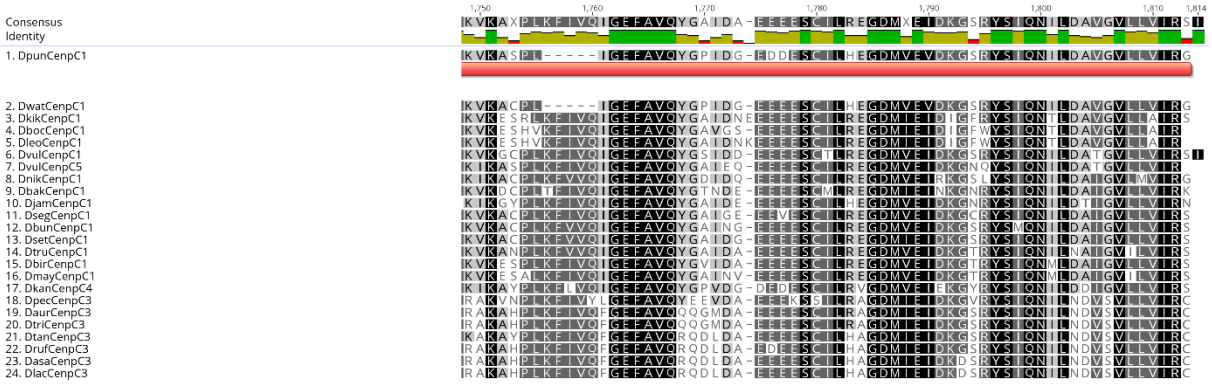


Figura 18. Alinhamento amplificado das proteínas Cenp-C das espécies do grupo *montium* mostrando a posição dos motivos proteicos identificados no presente trabalho. As barras em vermelho representam nesta mesma ordem: Mis12 *binding*, R-rich, DH, NLS, CenH3 *binding* e Cupin. A barra azul-claro representa as sequências removidas para a construção da filogenia dos genes e teste de seleção positiva. A pequena barra em verde-escuro abaixo do motivo CenH3 *binding* representa o aminoácido R-1101 idêntico em todas as proteínas.

4.3. As duas cópias da *Cenp-C* no genoma de *D. vulcana*

A presença de duas cópias da *Cenp-C* (*Cenp-C1* e *Cenp-C5*) em *D. vulcana* desempenhando a mesma função permitiria teoricamente o relaxamento das pressões seletivas em ao menos uma delas, com subsequente pseudogenização. Porém, várias evidências apontam que ambas as cópias são funcionais. De acordo com o algoritmo *Augustus*, não há presença de stop códons prematuros ao longo da sequência de nenhum dos dois genes. Além disso, há uma maior identidade (81,9%) entre as proteínas codificadas pelo gene da *Cenp-C1* e *Cenp-C5* quando comparadas às proteínas das outras espécies do grupo *montium* (Figura 19). Essa identidade varia de 38,9% (*Cenp-C3* de *D.tani*) a 68,3% (*Cenp-C1* de *D. jambulina*) de identidade em relação à *Cenp-C1* e 43,6% (*Cenp-C3* de *D.tani*) a 75,0% (*Cenp-C1 de D. jambulina*) de identidade em relação à *Cenp-C5*. Por último, seis dos motivos essenciais à função do centrômero estão presentes na sequência da proteína de *Cenp-C1* e *Cenp-C5*, assim como na *Cenp-C* das demais espécies. Em conjunto esses achados apontam para a retenção da função centromérica em ambas as cópias de Cenp-C em *D. vulcana*.

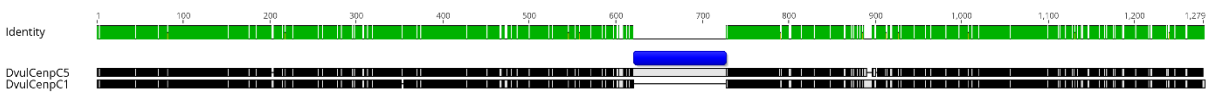


Figura 19. Alinhamento das proteínas codificadas pelo gene da *Cenp-C1* e *Cenp-C5* de *D. vulcana*. O alinhamento das sequências dos *contigs* mostra regiões idênticas (preto), divergentes (cinza) e de gaps

(branco). A barra em azul representa a região deletada da *Cenp-C5* para construção da árvore filogenética.

O algoritmo *Augustus* identificou três éxons adicionais no gene da *Cenp-C5* (Figura 20). A sequência de aminoácidos codificada por esses éxons possui homologia com as sequências de aminoácidos encontrados nos éxons de todas as outras espécies do grupo *montium*. Porém, nenhum motivo proteico foi identificado nessa região. Futuros estudos elucidarão se a presença ou ausência desses éxons afetam a função do gene da *Cenp-C5.*

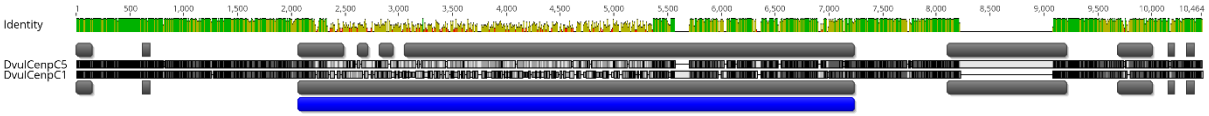


Figura 20. Alinhamento do gene da *Cenp-C1* e *Cenp-C5* de *D. vulcana*. O alinhamento das sequências mostra regiões idênticas (preto), divergentes (cinza) e de gaps (branco). As barras em cinza mostram sequências de íntrons inferidos pelo algoritmo *Augustus* e por alinhamento com os genes da *Cenp-C* das outras espécies do grupo *montium*. A barra em azul representa a região deletada da *Cenp-C5* para construção da árvore filogenética.

Embora vários fatores apontem para a manutenção da função centromérica da *Cenp-C1* e da *Cenp-C5* em *D. vulcana*, serão necessários estudos experimentais futuros para determinar se ambas as cópias codificam proteínas que se localizam no centrômero. A essencialidade de ambas as proteínas em função centromérica poderá ser verificada por nocaute dos genes. Também poderá ser analisado de que maneira essas proteínas interagem com as cópias de Cid encontradas na espécie.

4.4. Relações evolutivas entre as cópias da *Cenp-C* nas espécies do grupo *montium*

Para entendermos as relações evolutivas entre as cópias de Cenp-C encontradas, construímos uma árvore MV contendo todas as sequencias de *Cenp-C* inteiras obtidas no presente trabalho (Figura 21). A topologia da árvore indica que todas as cópias se agrupam conforme os subgrupos propostos por Yassin (2018) (Figura 21). Esta topologia também está de acordo com a robusta filogenia do grupo *montium* proposta por Conner *et al*. (2021) (Figura 9). Portanto, esse resultado indica que, no geral, as relações evolutivas entre as cópias dos genes da *Cenp-C* (Figura 21), refletem a relação evolutiva entre as espécies.

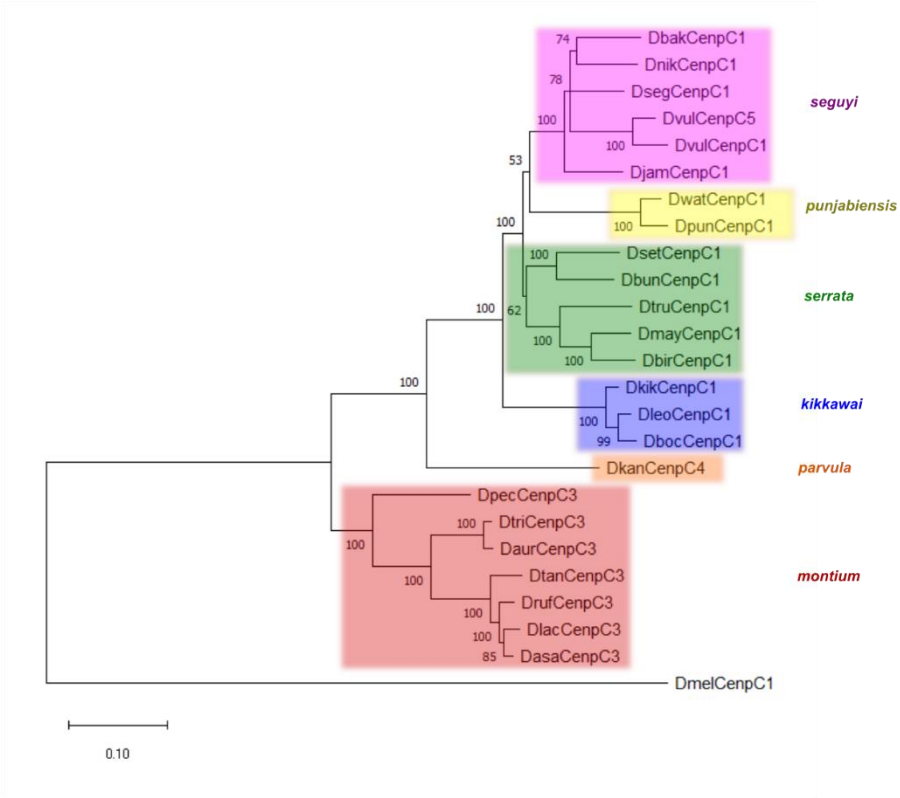


Figura 21. Árvore de máxima verossimilhança mostrando as relações filogenéticas entre as cópias do gene da *Cenp-C* nas espécies do grupo *montium*. O nome dos subgrupos e suas respectivas espécies são mostrados em cores iguais. O valor de *bootstrap* está indicado em cada nó. A escala indica o número de substituições por sítio.

Não existem dúvidas de que o loco de *Cenp-C1* representa a condição primitiva de *Cenp-C* dentro do gênero *Drosophila*. Neste loco, o gene *Cenp-C1* é flanqueado pelos genes *CG1427* e *Tim10.* Nas espécies do subgrupo *montium*, as sequências flanqueadas pelos genes *CG1427* e *Tim10* não possuem homologia com *Cenp-C1* e possuem tamanhos variando de 978 pb (*D. pectinifera*) a 3.051pb (*D. asahinai*). No entanto, o tamanho da *Cenp-C3* varia de 5.610pb (*D. pectinifera*) à 8.750pb (*D. tani*). Esses dados mostram uma possível deleção de *Cenp-C1* das espécies do subgrupo *montium.* Em resumo, a origem da *Cenp-C3* ocorreu depois da separação do subgrupo *montium* dos demais subgrupos, com posterior deleção da *Cenp-C1*.

De todas as espécies analisadas, apenas *D. kanapiae* possui a *Cenp-C4*. Com base nesse dado, provavelmente, essa cópia se originou pelo menos depois da separação do subgrupo *parvula* dos demais subgrupos. Assim como no caso do gene *Cenp-C3*, o gene *Cenp-C4* pode ter se originado a partir de uma duplicação da *Cenp-C1,* seguida de posterior deleção de *Cenp-C1*. Isso porque a sequência contida entre os genes *CG1427* e *Tim10* do loco de *Cenp-C1* em *D. kanapiae* contém apenas 585 pb, enquanto que a *Cenp-C4* possui 8.013 pb. Nesse caso, um indício de duplicação seguido de deleção está mais evidente,

devido à presença de um fragmento do gene *CG1427* no loco onde se encontra a *Cenp-C4* (Figura 9). Esse fragmento está flanqueando a posição 5' da *Cenp-C4* e na orientação esperada, caso tenha se derivado da duplicação do *CG1427* do loco original.

O agrupamento dos genes da *Cenp-C1* e *Cenp-C5* de *D. vulcana*, com alto valor de *bootstrap*, indica que *Cenp-C5* pode ter resultado da duplicação do gene da *Cenp-C1* dentro da linhagem que deu origem a essa espécie (Figura 21). Tendo como base o tempo de divergência estimado por Yassin *et al*. (2016), essa duplicação ocorreu em um passado relativamente recente, há menos de 5 milhões de anos.

Além das três novas cópias inteiras da *Cenp-C* identificadas, duplicações de vários fragmentos do gene também foram observados em sete espécies do grupo *montium*. Em *D*. *burlai*, pelo menos quatro fragmentos do gene da *Cenp-C* duplicados estão presentes em diferentes localizações genômicas (Figura 13). Porém, como explicado anteriormente, é possível que um deles represente uma cópia inteira do gene da *Cenp*-C que não pôde ser montada, devido às limitações do sequenciamento. Em *D*. *punjabiensis*, foram encontrados pelo menos dois fragmentos em diferentes localizações genômicas (Figura 9 e Figura 13). Em *D. vulcana* e em *D. bakoue* o fragmento encontrado também ocupa uma localização genômica distinta. E por último, em *D. kanapiae*, *D*. *watanabei* e *D. nikananu* embora nenhum fragmento esteja flanqueado por genes que indiquem seus locos, outros fragmentos duplicados foram encontrados.

Como mencionado anteriormente, a *Cenp-C3* e a *Cenp-C4* substituem funcionalmente a *Cenp-C1* em algumas espécies do grupo *montium*. Por isso, é esperado que em uma filogenia a *Cenp-C1*, *Cenp-C3* e *Cenp-C4* dessas espécies formem um grupo monofilético dentro do subgênero *Sophophora*. Para confirmar essa hipótese foi construída uma árvore ML, contendo a *Cenp-C* das espécies do grupo *montium*, a *Cenp-C1* de outras espécies do subgênero *Sophophora* e a *Cenp-C1* e *Cenp-C2* de espécies do subgênero *Drosophila* (Figura 22). Todos os genes de *Cenp-C* das novas espécies incluídas para construção da árvore, foram anteriormente estudas por nosso grupo (Teixeira *et al*. 2018). Como esperado, conforme a filogenia das espécies do gênero *Drosophila,* a *Cenp-C* das espécies do grupo *montium* formam um grupo monofilético que agrupa com a *Cenp-C1* das demais espécies do subgênero *Sophophora*.

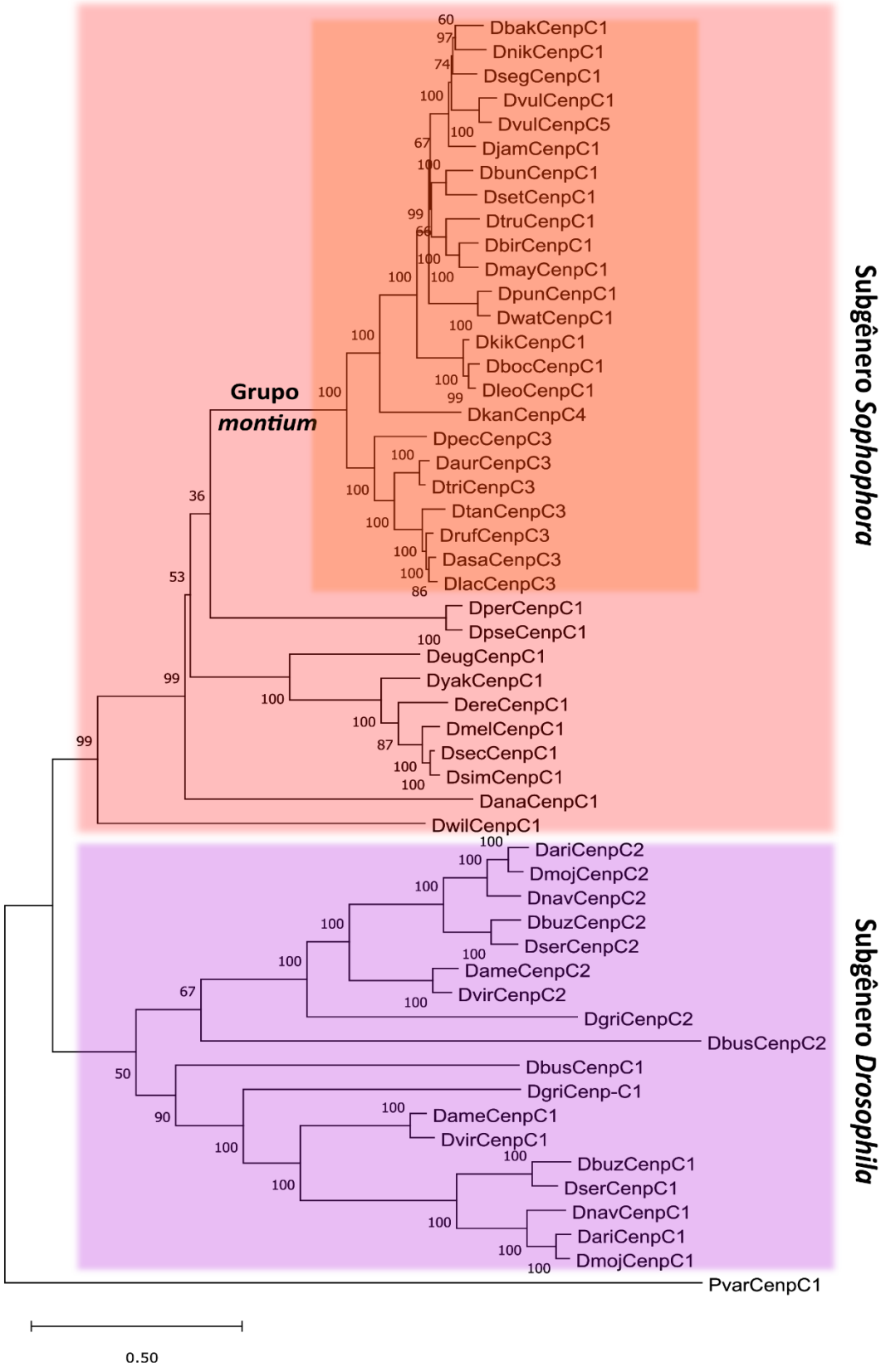


Figura 22. Árvore de máxima verossimilhança mostrando as relações filogenéticas entre as cópias do gene da *Cenp-C* nas espécies dos subgêneros *Sophophora* e *Drosophila*. O valor de *bootstrap* está indicado em cada nó. A escala indica o número de substituições por sítio.

Em resumo, todas as três novas cópias (*Cenp-3*, *Cenp-C4* e *Cenp-C5*) derivam de duplicações da *Cenp-C1* que é o gene ancestral da *Cenp-C* nas espécies do gênero *Drosophila* (Figura 23). A topologia da árvore em acordo com a filogenia das espécies é o resultado esperado para genes duplicados, que agora assumem o papel funcional dos seus respectivos parálogos (*Cenp-C1*) perdidos independentemente em cada subgrupo. Não só duplicações completas, mas também parciais da *Cenp-C,* ocorreram de maneira recorrente nas espécies do grupo *montium*. E por último, a filogenia do gene da *Cenp-C* das espécies do subgênero *Sophophora* e do subgênero *Drosophila* corroboram com a afirmação de que a *Cenp-C3* e *Cenp-C4* sejam ortólogos funcionais da *Cenp-C1* nas espécies do grupo *montium*.

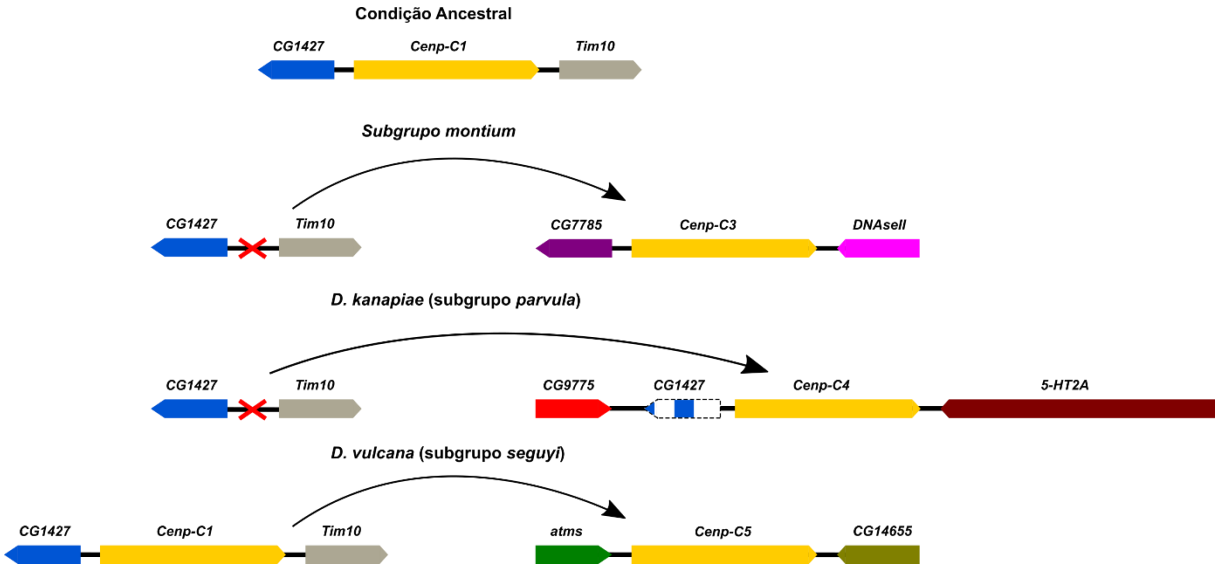


Figura 23. Hipótese de origem e perda dos genes da *Cenp-C* nas espécies do grupo *montium*. Na espécie ancestral que deu origem às espécies do grupo *montium*, a *Cenp-C1* foi duplicada e inserida em um novo loco dando origem à *Cenp-C3*. Em seguida, a *Cenp-C1* foi deletada do loco ancestral. Na espécie ancestral que deu origem às espécies do subgrupo *parvula* ou dentro do subgrupo, a *Cenp-C1* e o gene *CG1427* foram duplicados e inseridos em um novo loco. Em seguida, houve a deleção da *Cenp-C1* no loco ancestral e degeneração do gene *CG1427* no novo loco. E por último em *D. vulcana* houve a duplicação da *Cenp-C1* que foi inserida em um segundo loco dando origem a *Cenp-C5*, ambas as cópias foram mantidas.

4.5. Origem das duplicações do gene da *Cenp-C* nas espécies do grupo *montium*

Duplicações gênicas podem resultar de diferentes mecanismos, como: *crossing-over* desigual, retrotransposição, duplicação cromossômica/genômica que são raras em animais

(Zhang 2003) ou por transposição por intermédio de transposons de DNA (Cerbin & Jiang 2018).

O *crossing-over* desigual geralmente produz cópias em tandem (Zhang 2003). Por isso, se esperaria que um gene duplicado como consequência desse processo estivesse flanqueado pelas mesmas sequências que a cópia que lhe deu origem. Porém, como mostrado anteriormente, cada uma das cópias da *Cenp-C* se encontra flanqueada por genes diferentes (Figura 9), e a Figura 13 mostra que estas cópias se localizam em diferentes locos do cromossomo 3.

A duplicação por retrotransposição pode ocorrer quando um mRNA proveniente de um gene é retrotranscrito em DNA complementar (cDNA) e em seguida inserido no genoma, gerando uma retrocópia do gene que, ainda que raramente, pode ser funcional (Zhang 2003). Algumas assinaturas moleculares são esperadas para o gene duplicado pelos mecanismos citados acima, como: perda de íntrons e sequências regulatórias, presença de cauda poli-A e presença de repetições curtas e diretas flanqueadoras. Nesse caso, esses mecanismos não podem explicar as duplicações do gene da *Cenp-C1*, pois todas as cópias analisadas mantiveram os íntrons em suas sequências.

Retroelementos podem também estar associados a duplicações gênicas por meio do processo de transdução. Esse processo é caracterizado pela captura de um gene hospedeiro como parte do elemento de transposição (Feschotte & Pritham 2007). A transdução, geralmente, ocorre quando o sinal fraco de poliadenilação de um retroelemento, inserido a montante de um gene, é pulado pela maquinaria de transcrição de RNA que, em seguida, reconhece o sinal de poliadenilação no final do gene. O transcrito gerado contendo a sequência do retroelemento e do gene é depois integrado ao genoma. Como esse processo foi responsável por duplicar um gene inteiro três vezes em humanos (Xing *et al*. 2006), seria possível que o mesmo pudesse ser responsável pela duplicação do gene da *Cenp-C1*. No entanto, nesse caso, todas as três duplicações do gene possuíam como característica a perda de íntrons. Outras características observadas nesses casos é a presença de sequências flanqueadoras pertencentes ao loco de origem, presença de cauda poli-A e de repetições curtas e diretas flanqueadoras.

Um segundo processo de transdução gerou uma duplicação atípica de uma sequência de 24.7kb envolvendo um retrotransposons do tipo LTR (Repetição longa terminal) em tomates (Xiao *et al*. 2008). As duas LTRs localizadas nas extremidades de um retrotransposon do tipo LTR são necessárias para o processo de transposição. Foi proposto que o transcrito do retrotransposon se iniciou em sua 5` LTR, mas ao invés de parar na 3`LTR, foi finalizado em uma terceira LTR que flanqueava a região de 24.7kb duplicada. Quatro genes foram duplicados durante o processo, dois deles estavam em orientação antisenso em relação ao retrotransposon e por isso tiveram as sequências de íntron conservadas. No loco duplicado

foram observadas sequências de LTRs flanqueando a sequência duplicada na região 5’ e 3’ e também repetições curtas e diretas flanqueadoras. Como ocorrido nesse caso, não podemos descartar a possibilidade de que os íntrons das duplicações da *Cenp-C1* tenham sido mantidos em processos de transdução, devido à orientação antisenso do gene em relação ao elemento. Considerando que o retrotransposon e as cópias dos genes duplicados foram mantidos também no loco de origem, é provável que se trate de um evento recente. Por isso, como explicado mais a frente, *D. vulcana* foi a melhor opção para investigar uma possível duplicação envolvendo retrotransposons.

Embora os mecanismos de duplicação via transposons de DNA ainda não sejam claros, evidências sugerem que esses elementos carreguem mais frequentemente genes ou fragmentos de genes do que os retrotransposons (Cerbin & Jiang, 2018). Isso poderia explicar, por exemplo, os diversos fragmentos da *Cenp-C* observados nas espécies *D. burlai*, *D. watanabei* e *D. punjabiensis*. Porém, diferente dos retrotransposons, a identificação da duplicação por elementos de DNA é mais difícil, pois exige o reconhecimento de estruturas intactas (como suas repetições invertidas terminais e as duplicações geradas no sítio alvo) associadas a eles (Cerbin & Jiang, 2018). Além disso, a falta de pressão evolutiva sob as sequências dos transposons causa divergência que pode dificultar sua detecção. Por exemplo, a maioria dos Pack-MULEs (transposons de DNA não-autônomos) ficam irreconhecíveis dentro de 6 milhões de anos (Zhao *et al*. 2018).

Dada a dificuldade de se avaliar eventos antigos de duplicação por intermédio de transposons, procurou-se por evidências de transposons associados à origem de *Cenp-C5* que, entre as cópias encontradas, é a de origem mais recente (~5 milhões de anos). Assim, através da base de dados de elementos repetitivos Repbase, foi feita uma busca por transposons flaqueando as cópias dos genes da *Cenp-C1 e Cenp-C5* de *D. vulcana*. Detectou-se cópias de um elemento de transposição (TE), similar ao Harbinger-2_DRh, flanqueando os dois parálogos (Figura 24A e C). Duas dessas cópias flanqueiam *Cenp-C1*, uma na posição 5’ e outra na posição 3’, e uma terceira cópia flanqueia *Cenp-C5* na posição 3’ (Figura 24C). As três cópias deste elemento Harbinger-2_DRh-*like* conservam a repetição terminal invertida (TIR) de 20 pb em apenas um dos lados da sequência do TE e com identidade de 75% com a TIR (20 pb) do Harbinger-2_DRh.

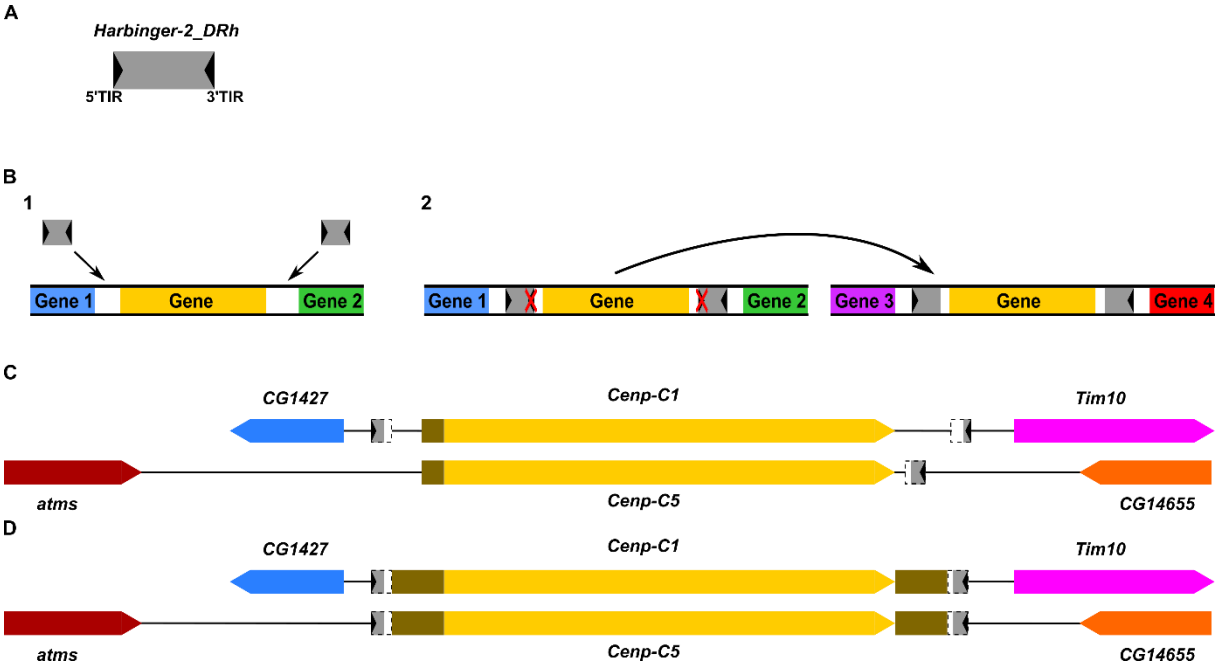


Figura 24. (A) Representação do elemento TE Harbinger-2_DRh. Setas em preto indicam TIRs e retângulo em cinza indica a sequência interna às TIRs. (B) Evento de transposição por mecanismo *cut and paste* esperado para duplicação gênica. 1. Duas cópias do TE se insere em ambos os lados da *Cenp-C1*.2. Uma das TIRs de cada TE sofre mutações impedindo a ligação da transposase. Os elementos são reconhecidos pela mesma transposase e são transpostos para um segundo loco levando a sequência interna a eles. (C) Representação dos locos da *Cenp-C1* e da *Cenp-C5* com suas sequências flanqueadoras, observados no genoma de *D. vulcana*. Pontas de seta indicam a posição 3' dos genes. Fragmentos homólogos (65 a 74% de identidade e 54 a 152pb) ao Harbinger-2_DRh indicados pelo Repbase estão em cinza e preto. Os pontilhados delimitam a região de homologia (85 a 95% de identidade e 189 a 190pb) entre as três cópias do elemento Harbinger-2_DRh-*like*. Linhas pretas e barras em bege indicam, respectivamente, sequências intergênicas e sequências com homologia (211pb e 206pb) entre os dois locos. (D) Representação do que seria esperado para os locos da *Cenp-C* de *D. vulcana*, se um elemento Harbinger-2_DRh-*like* estivesse envolvido no processo de duplicação.

Os Harbingers compreendem uma superfamília de transposons de DNA que se transpõem pelo mecanismo "*cut and paste*" (Feschotte & Pritham, 2007). Esta transposição se inicia pela associação da transposase com as repetições terminais invertidas (TIR) do elemento (Figura 24A) (Skipper *et al*. 2013). Sendo assim, uma hipótese que explicaria a duplicação da *Cenp-C* em *D. vulcana* seria a de que duas cópias de um elemento do tipo Harbinger teriam se inserido em ambas extremidades 5' e 3' do gene da *Cenp-C1* (Figura 24B.1). Em seguida uma das TIRs de cada uma dessas cópias teria sofrido mutações que impediram a ligação da proteína transposase a essas sequências (Figura 24B.2). Desse modo, os dois elementos Harbinger poderiam ter sido reconhecidos pela mesma transposase. A consequência disso é que a sequência interna a essas duas cópias de TEs, no caso o gene *Cenp-C1,* seria transposto para um segundo loco. Neste caso, seria esperado encontrar duas cópias do Harbinger, uma em cada extremidade da *Cenp*-C5 (Figura 24D), mas apenas uma foi encontrada. Em segundo lugar, a sequência entre *Cenp-C1* na posição 3' e a cópia do

Harbinger, e a sequência entre a *Cenp-C5* na posição 3' e a cópia do Harbinger, deveriam ser homólogas, o que não foi observado. Por isso, os dados levantados até o momento não permitem associar o Harbinger-2_DRh-*like* com a origem de *Cenp-C5.*

Em resumo, embora nossas análises conseguiram descartar alguns mecanismos responsáveis pela origem das duplicações de Cenp-C no grupo *montium*, não conseguimos determinar precisamente qual ou quais foram os mecanismos envolvidos.

4.6. Teste de seleção positiva nas cópias de Cenp-C

Para determinar se a *Cenp-C* evolui sob seleção positiva foram utilizados os modelos de sítios-aleatórios (M1a vs M2a, M7 vs M8 e M8a vs M8) que partem do princípio de que *a priori* não sabemos quais sítios da proteína estão conservados ou sob seleção positiva. Como a maioria das espécies possui apenas uma cópia da *Cenp-C,* é esperado que nessas espécies a *Cenp-C* exerça uma mesma função e, portanto, esteja sob efeito das mesmas pressões seletivas.

Em *D. vulcana* dois genes aparentemente funcionais foram encontrados, não sendo possível determinar se algum deles evolui sob o mesmo padrão dos genes das demais espécies. Por esse motivo, a *Cenp-C1* e *Cenp-C5* de *D. vulcana* foram excluídas das análises.

A análise de seleção nos 22 genes da *Cenp-C* de espécies do grupo *montium* revelou quatro aminoácidos, localizados entre motivos proteicos, evoluindo sob seleção positiva (Figura 25 e Figura 26). Esse resultado foi considerado significativo para os modelos M7 vs M8 e M8a vs M8 (Tabela 3). O primeiro aminoácido se encontra na posição 354 entre os motivos R-rich e DH, o segundo e o terceiro se encontram nas posições 624 e 639, respectivamente, entre o motivo DH e NLS e o quarto se encontra na posição 720 entre os motivos NLS e CenH3 *binding*.

Conforme a hipótese do impulso centromérico é esperado que os resíduos da Cenp-C que fazem contato com o cenDNA evoluam sob seleção positiva mitigando possíveis efeitos deletérios associados à expansão desse cenDNA. Nenhum estudo até o momento identificou quais aminoácidos da Cenp-C estão diretamente em contato com o DNA centromérico em *Drosophila*. No entanto, é possível que esses quatro aminoácidos estejam evoluindo sob seleção positiva e suprimindo o impulso centromérico, como observado por Talbert (2004) para a Cenp-C de gramíneas e mamíferos. Como em nossas análises, regiões da *Cenp-C* fracamente alinhadas foram deletadas, é possível que esses quatro aminoácidos não sejam os únicos evoluindo sob seleção positiva nas espécies do grupo *montium*.

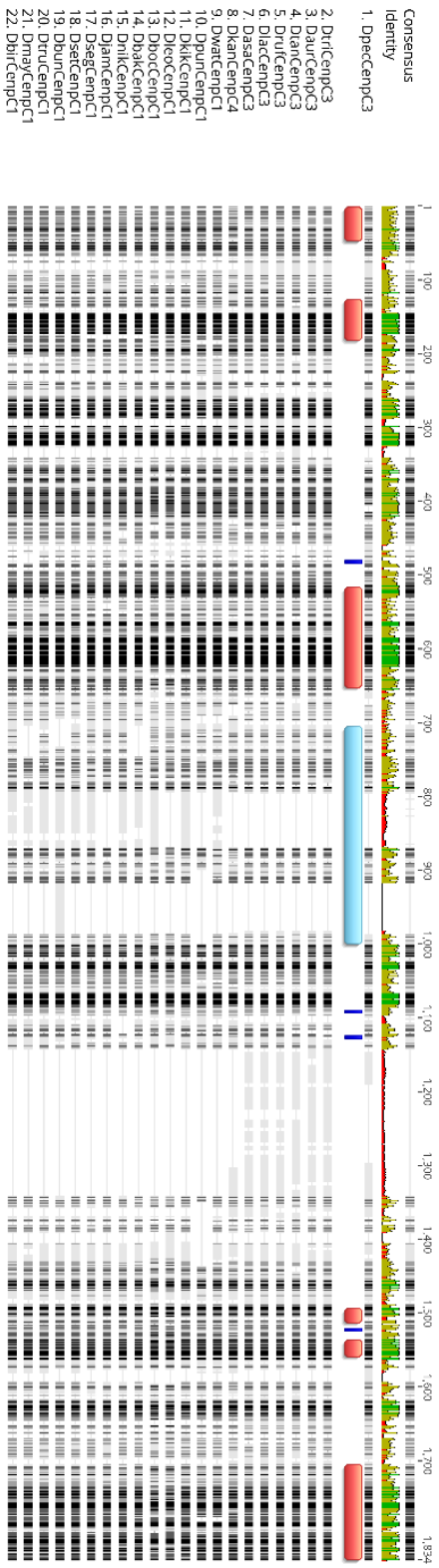
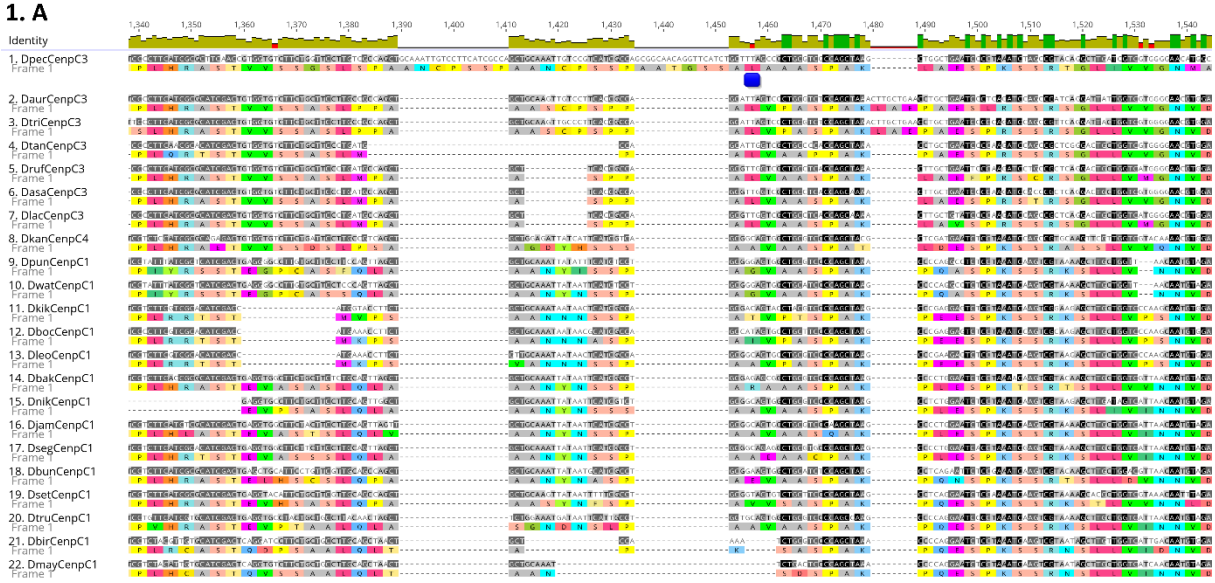
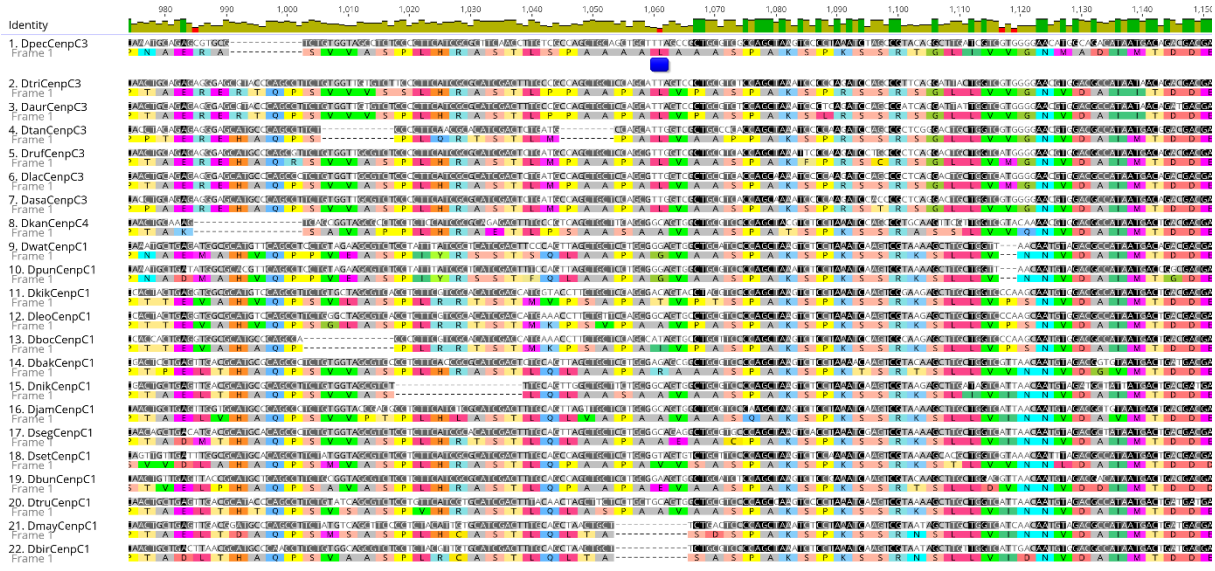


Figura 25. Alinhamento das proteínas Cenp-C das espécies do grupo *montium* mostrando os sítios da proteína que apresentaram assinatura de seleção positiva. As barras em vermelho representam da esquerda para a direita os motivos: Mis12 *binding*, R-rich, DH, NLS, CenH3 *binding* e Cupin. A barra azul-claro representa as sequências removidas para a construção da filogenia dos genes e teste de seleção positiva. As pequenas barras em azul-escuro representam os sítios sob seleção positiva.

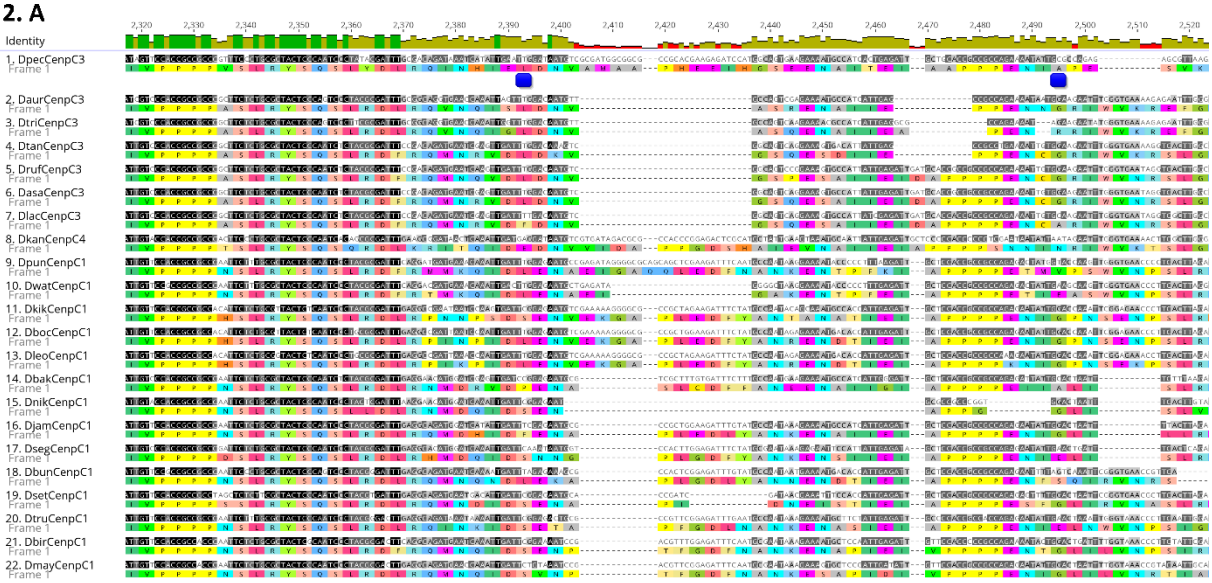
1. A


Identity
1. DpecCenpC3
2. DaurCenpC3
3. DtriCenpC3
4. DtanCenpC3
5. DrufCenpC3
6. DlacCenpC3
7. DlacCenpC3
8. DkanCenpC4
9. DpunCenpC1
10. DwatCenpC1
11. DkikCenpC1
12. DbocCenpC1
13. DleoCenpC1
14. DbakCenpC1
15. DnikCenpC1
16. DjamCenpC1
17. DsegCenpC1
18. DbunCenpC1
19. DsetCenpC1
20. DtruCenpC1
21. DbirCenpC1
22. DmayCenpC1

1. B


Identity
1. DpecCenpC3
2. DtriCenpC3
3. DaurCenpC3
4. DtanCenpC3
5. DrufCenpC3
6. DlacCenpC3
7. DasaCenpC3
8. DkanCenpC4
9. DwatCenpC1
10. DpunCenpC1
11. DkikCenpC1
12. DleoCenpC1
13. DbocCenpC1
14. DbakCenpC1
15. DnikCenpC1
16. DjamCenpC1
17. DsegCenpC1
18. DsetCenpC1
19. DbunCenpC1
20. DtruCenpC1
21. DmayCenpC1
22. DbirCenpC1

2. A


Identity
1, DpecCenpC3
2, DaurCenpC3
3, DtriCenpC3
4, DtanCenpC3
5, DrufCenpC3
6, DlacCenpC3
7, DlacCenpC3
8, DkanCenpC4
9, DpunCenpC1
10. DwatCenpC1
11. DkikCenpC1
12. DbocCenpC1
13. DleoCenpC1
14. DbakCenpC1
15. DnilCenpC1
16. DjamCenpC1
17. DsegCenpC1
18. DbunCenpC1
19. DsetCenpC1
20. DtruCenpC1
21. DbirCenpC1
22. DmayCenpC1

2. B


Identity
1, DpecCenpC3
2, DtriCenpC3
3, DaurCenpC3
4, DtanCenpC3
5, DrufCenpC3
6, DlacCenpC3
7, DasaCenpC3
8, DkanCenpC4
9, DwatCenpC1
10. DpunCenpC1
11. DkikCenpC1
12. DleoCenpC1
13. DbocCenpC1
14. DbakCenpC1
15. DnilCenpC1
16. DjamCenpC1
17. DsegCenpC1
18. DsetCenpC1
19. DbunCenpC1
20. DtruCenpC1
21. DmayCenpC1
22. DbirCenpC1

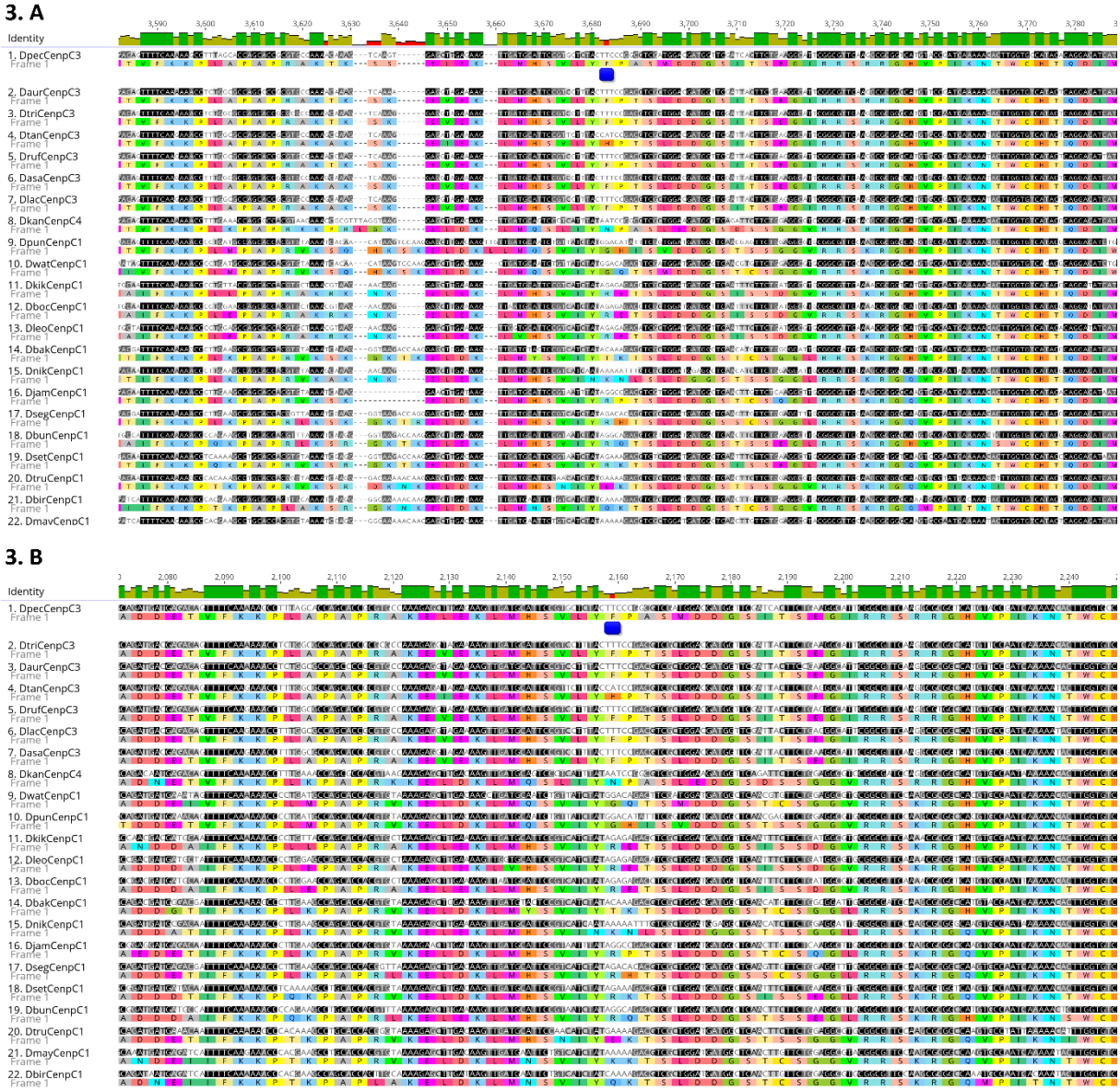


Figura 26. Alinhamento de códons da *Cenp-C* das espécies do grupo *montium* mostrando os sítios que apresentaram assinatura de seleção positiva. Cada sítio (barras em azul-escuro) é mostrado nas imagens. (1.A) Localização do primeiro sítio antes do refinamento manual do alinhamento. (1.B) Localização do primeiro sítio após refinamento manual do alinhamento. (2.A) Localização do segundo e terceiro sítios antes do refinamento manual do alinhamento. (2.B) Localização do segundo e terceiro sítios após refinamento manual do alinhamento. (3.A) Localização do quarto sítio antes do refinamento manual do alinhamento. (3.B) Localização do quarto sítio após refinamento manual do alinhamento. O refinamento manual do alinhamento foi feito conforme especificado na metodologia.

Tabela 3. Sítios sob seleção positiva de acordo com o modelo de sítios-aleatórios (CodeML)

Genes	M1a vs M2a p-value	M2 % sites with ω > 1 (Avg ω)	M7 vs M8 p-value	M8 % sites with ω > 1 (Avg ω)	M8a vs M8 p-value	M8 BEB (PP%)
Cenp-C1/Cenp-C3/Cenp-C4	1	0.63(0.14)	**0.005**	0.02 (1.91)	**0.016**	354 L (87.4) 624 L (80.5) 639 A (93.0) 720 F (89.8)

Modelo de frequência de códons F3X4. Os valores de P < 0.05 estão indicados em negrito.

5. CONCLUSÕES

Em relação aos nossos objetivos, as principais conclusões do presente trabalho foram:

Identificar o gene da proteína centromérica *Cenp-C* nas espécies do grupo *montium* e investigar se existem duplicações de *Cenp-C* nas espécies estudadas.

Foi identificado o gene da *Cenp-C1* e mais três novas cópias (*Cenp-C3*, *Cenp-C4* e *Cenp-C5*) nas espécies do grupo *montium*. Porém *D. vulcana* é a única espécie que possui duas cópias (*Cenp-C1* e *Cenp-C5*) em seu genoma. Várias evidências indicam que todas essas cópias são funcionais. Como em um trabalho anterior foram identificadas três cópias da Cid nessas mesmas espécies, nossos resultados mostram que apenas uma cópia da proteína Cenp-C interage com as três cópias da Cid para função centromérica.

Identificar e caracterizar motivos conservados da proteína *Cenp-C* nas espécies do grupo *montium*.

Dos oito motivos proteicos caracterizados para Cenp-C em *Drosophila*, seis se encontram conservados em todas as cópias de Cenp-C do grupo *montium*. Entre esses seis motivos estão o CenH3 *binding*, Cupin e Mis12 *binding* que apresentam funções essenciais para a função do centrômero. Esse resultado sugere que todas as cópias de Cenp-C encontradas no presente trabalho são funcionais e desempenham função centromérica.

Analisar a relação evolutiva entre as cópias de *Cenp-C* encontradas.

Todas as três cópias da *Cenp-C* encontradas nas espécies do grupo *montium* (*Cenp-C3*, *Cenp-C4*, *Cenp-C5*) derivam de duplicações independentes de *Cenp-C1*, seguida de perda *Cenp-C1* na maioria das linhagens. A árvore filogenética das sequencias de *Cenp-C* de cada subgrupo apresenta topologia que está de acordo com a árvore das espécies. Eventos de duplicações completas ou parciais da *Cenp-C* nas espécies do grupo *montium* ocorreram várias vezes e de maneira independente. E por último, a árvore das espécies do gênero *Drosophila* confirma que a *Cenp-C3* e a *Cenp-C4* são ortólogos funcionais da *Cenp-C1* nas espécies do grupo *montium*.

Identificar quais os mecanismos envolvidos nas duplicações da *Cenp-C*.

Não foi possível determinar o processo envolvido na duplicação do gene da *Cenp-C*. No entanto, não encontramos evidências de duplicação via *crossing-over* desigual ou por intermédio de TEs.

Testar se existe seleção positiva atuando na *Cenp-C*.

Encontramos assinaturas de seleção positiva em quatro aminoácidos da Cenp-C das espécies do grupo *montium*. Apesar de não termos nenhuma evidência experimental que determine os sítios em contato com o DNA centromérico em *Drosophila*, não descartamos a possibilidade de que nas espécies do grupo *montium*, a evolução de Cenp-C sofra influência do impulso centromérico.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALLEN, S. L. et al. Single-molecule sequencing of the Drosophila serrata genome. **G3: Genes, Genomes, Genetics**, v. 7, n. 3, p. 781–788, 2017.

ASHBURNER, M.; BERGMAN, C. M. Drosophila melanogaster: A case study of a model genomic sequence and its consequences. **Genome Research**, v. 15, n. 12, p. 1661–1667, 2005.

BAILEY, T. L. et al. The MEME Suite. **Nucleic Acids Research**, v. 43, n. W1, p. W39–W49, 2015.

BAILEY, T. L.; GRIBSKOV, M. Combining evidence using p-values: Application to sequence homology searches. **Bioinformatics**, v. 14, n. 1, p. 48–54, 1998.

BARRA, V.; FACHINETTI, D. The dark side of centromeres: types, causes and consequences of structural abnormalities implicating centromeric DNA. **Nature Communications**, v. 9, n. 1, p. 4340, 18 dez. 2018.

BRONSKI, M. J. et al. Whole genome sequences of 23 species from the drosophila montium species group (Diptera: Drosophilidae): A resource for testing evolutionary hypotheses. **G3: Genes, Genomes, Genetics**, v. 10, n. 5, p. 1443–1455, 2020.

BROWN, J. D.; O'NEILL, R. J. The Evolution of Centromeric DNA Sequences. **eLS**, p. 1–11, 2014.

CARROLL, C. W.; MILKS, K. J.; STRAIGHT, A. F. Dual recognition of CENP-A nucleosomes is required for centromere assembly. **Journal of Cell Biology**, v. 189, n. 7, p. 1143–1155, 2010.

CERBIN, S.; JIANG, N. Duplication of host genes by transposable elements. **Current Opinion in Genetics and Development**, v. 49, n. Figure 1, p. 63–69, 2018.

CHEN, Z. X. et al. Comparative validation of the D. melanogaster modENCODE transcriptome annotation. **Genome Research**, v. 24, n. 7, p. 1209–1223, 2014.

COHEN, R. L. et al. Structural and Functional Dissection of Mif2p, a Conserved DNA-binding Kinetochore Protein. **Molecular Biology of the Cell**, v. 19, n. 10, p. 4480–4491, out. 2008.

CONNER, W. R. et al. A phylogeny for the Drosophila montium species group: A model clade for comparative analyses. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 158, n. April 2020, p. 107061, 2021.

COOPER, J. L.; HENIKOFF, S. Adaptive evolution of the histone fold domain in centromeric histones. **Molecular Biology and Evolution**, v. 21, n. 9, p. 1712–1718, 2004.

CORDAUX, R.; BATZER, M. A. The impact of retrotransposons on human genome evolution. **Nature Reviews Genetics**, v. 10, n. 10, p. 691–703, 2009.

DA LAGE, J. L. et al. A phylogeny of Drosophilidae using the Amyrel gene: Questioning the Drosophila melanogaster species group boundaries. **Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research**, v. 45, n. 1, p. 47–63, 2007.

DALAL, Y. et al. Structure, dynamics, and evolution of centromeric nucleosomes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 104, n. 41, p. 15974–15981, 2007.

DAWE, R. K.; HENIKOFF, S. Centromeres put epigenetics in the driver's seat. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 31, n. 12, p. 662–669, 2006.

ERHARDT, S. et al. Genome-wide analysis reveals a cell cycle-dependent mechanism controlling centromere propagation. **Journal of Cell Biology**, v. 183, n. 5, p. 805–818, 2008.

FALK, S. J. et al. CENP-C reshapes and stabilizes CENP-A nucleosomes at the centromere. **Science**, v. 348, n. 6235, p. 699–703, 8 maio 2015.

FESCHOTTE, C.; PRITHAM, E. J. DNA transposons and the evolution of eukaryotic

genomes. **Annual Review of Genetics**, v. 41, p. 331–368, 2007.

FINET, C. et al. DrosoPhyla: Resources for Drosophilid Phylogeny and Systematics. **Genome Biology and Evolution**, v. 13, n. 8, p. 1–13, 2021.

HALES, K. G. et al. Genetics on the fly: A primer on the drosophila model system. **Genetics**, v. 201, n. 3, p. 815–842, 2015.

HARTLEY, G.; O'NEILL, R. J. Centromere repeats: Hidden gems of the genome. **Genes**, v. 10, n. 3, 2019.

HEEGER, S. et al. Genetic interactions of separase regulatory subunits reveal the diverged Drosophila Cenp-C homolog. **Genes and Development**, v. 19, n. 17, p. 2041–2053, 2005.

HENIKOFF, S. et al. The Centromere Paradox: Stable Inheritance with Rapidly Evolving. **Science**, v. 293, n. 5532, p. 1098–1102, 2001.

HOOFF, J. J. et al. Evolutionary dynamics of the kinetochore network in eukaryotes as revealed by comparative genomics. **EMBO reports**, v. 18, n. 9, p. 1559–1571, 2017.

KATO, H. et al. Reports 11. **Science**, v. 340, n. 6136, p. 1110–1113, 2013.

KOONIN, E. V. Orthologs, paralogs, and evolutionary genomics. **Annual Review of Genetics**, v. 39, p. 309–338, 2005.

KUMAR, S. et al. MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. **Molecular Biology and Evolution**, v. 35, n. 6, p. 1547–1549, 2018.

KURSEL, L. E.; MALIK, H. S. Recurrent gene duplication leads to diverse repertoires of centromeric histones in Drosophila species. **Molecular Biology and Evolution**, v. 34, n. 6, p. 1445–1462, 2017.

LIU, Y. et al. Insights from the reconstitution of the divergent outer kinetochore of Drosophila melanogaster. **Open Biology**, v. 6, n. 2, 2016.

MALIK, H. S.; BAYES, J. J. Genetic conflicts during meiosis and the evolutionary origins of centromere complexity. **Biochemical Society Transactions**, v. 34, n. 4, p. 569–573, 2006.

MALIK, H. S.; HENIKOFF, S. Adaptive evolution of Cid, a centromere-specific histone in Drosophila. **Genetics**, v. 157, n. 3, p. 1293–1298, 2001.

MALIK, H. S.; HENIKOFF, S. Conflict begets complexity : the evolution of centromeres. **Current Opinion in Genetics & Development**, v. 12, n. 6, p. 711–718, 2002.

MALIK, H. S.; VERMAAK, D.; HENIKOFF, S. Recurrent evolution of DNA-binding motifs in the Drosophila centromeric histone. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 99, n. 3, p. 1449–1454, 2002.

MARESCA, T. J. Chromosome segregation: A kinetochore missing link is found. **Current Biology**, v. 21, n. 7, p. R261–R263, 2011.

MARKOW, T. A.; O'GRADY, P. Summary for Policymakers. In: INTERGOVERNMENTAL PANEL ON CLIMATE CHANGE (Ed.). . **Climate Change 2013 - The Physical Science Basis**. Cambridge: Cambridge University Press, 2006. p. 1–30.

MCKINLEY, K. L.; CHEESEMAN, I. M. The molecular basis for centromere identity and function. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 17, n. 1, p. 16–29, 2016.

MELTERS, D. P. et al. Comparative analysis of tandem repeats from hundreds of species reveals unique insights into centromere evolution. **Genome Biology**, v. 14, n. 1, p. 1–20, 2013.

MOREE, B. et al. CENP-C recruits M18BP1 to centromeres to promote CENP-A chromatin assembly. **Journal of Cell Biology**, v. 194, n. 6, p. 855–871, 2011.

MUSACCHIO, A.; DESAI, A. A molecular view of kinetochore assembly and function. **Biology**, v. 6, n. 1, 2017.

O'GRADY, P. M.; DESALLE, R. Phylogeny of the genus Drosophila. **Genetics**, v. 209, n. 1, p. 1–25, 2018.

ORR, B.; SUNKEL, C. E. Drosophila CENP-C is essential for centromere identity. **Chromosoma**, v. 120, n. 1, p. 83–96, 2011.

PLOHL, M. et al. Satellite DNAs between selfishness and functionality: Structure, genomics and evolution of tandem repeats in centromeric (hetero)chromatin. **Gene**, v. 409, n. 1–2, p. 72–82, 2008.

PLOHL, M.; MEŠTROVIĆ, N.; MRAVINAC, B. Centromere identity from the DNA point of view. **Chromosoma**, v. 123, n. 4, p. 313–325, 2014.

POLITI, V. et al. CENP-C binds the alpha-satellite DNA in vivo at specific centromere domains. **Journal of Cell Science**, v. 115, n. 11, p. 2317–2327, 2002.

PRZEWLOKA, M. R. et al. Molecular analysis of core kinetochore composition and assembly in Drosophila melanogaster. **PLoS ONE**, v. 2, n. 5, 2007.

PRZEWLOKA, M. R. et al. CENP-C is a structural platform for kinetochore assembly. **Current Biology**, v. 21, n. 5, p. 399–405, 2011.

PRZEWLOKA, M. R.; GLOVER, D. M. The kinetochore and the centromere: A working long distance relationship. **Annual Review of Genetics**, v. 43, p. 439–465, 2009.

RASTOGI, S.; LIBERLES, D. A. Subfunctionalization of duplicated genes as a transition state to neofunctionalization. **BMC Evolutionary Biology**, v. 5, p. 1–7, 2005.

RICHTER, M. M. et al. Network of protein interactions within the Drosophila inner kinetochore. **Open Biology**, v. 6, n. 2, 2016.

ROSIN, L. F.; MELLONE, B. G. Centromeres Drive a Hard Bargain. **Trends in Genetics**, v. 33, n. 2, p. 101–117, 2017.

ROURE, V. et al. Reconstituting Drosophila Centromere Identity in Human Cells. **Cell Reports**, v. 29, n. 2, p. 464- 479.e5, 2019.

RUSSO, C. A. M. et al. Phylogenetic analysis and a time tree for a large drosophilid data set (Diptera: Drosophilidae). **Zoological Journal of the Linnean Society**, v. 169, n. 4, p. 765–775, 2013.

RUSSO, C. A. M.; TAKEZAKI, N.; NEI, M. Molecular phylogeny and divergence times of drosophilid species. **Molecular Biology and Evolution**, v. 12, n. 3, p. 391–404, 1995.

SKIPPER, K. A. et al. DNA transposon-based gene vehicles - Scenes from an evolutionary drive. **Journal of Biomedical Science**, v. 20, n. 1, p. 1–23, 2013.

STANKE, M.; MORGENSTERN, B. AUGUSTUS: A web server for gene prediction in eukaryotes that allows user-defined constraints. **Nucleic Acids Research**, v. 33, n. SUPPL. 2, p. 465–467, 2005.

TALBERT, P. B.; BRYSON, T. D.; HENIKOFF, S. Adaptive evolution of centromere proteins in plants and animals. **Journal of Biology**, v. 3, n. 4, 2004.

TALBERT, P. B.; HENIKOFF, S. What makes a centromere ? **Experimental Cell Research**, v. 389, n. 2, p. 111895, 2020.

TAMURA, K.; SUBRAMANIAN, S.; KUMAR, S. Temporal Patterns of Fruit Fly (Drosophila) Evolution Revealed by Mutation Clocks. **Molecular Biology and Evolution**, v. 21, n. 1, p. 36–44, 2004.

TEIXEIRA, J. R. et al. Concurrent Duplication of Drosophila Cid and Cenp-C Genes Resulted in Accelerated Evolution and Male Germline-Biased Expression of the New Copies. **Journal of Molecular Evolution**, v. 86, n. 6, p. 353–364, 2018.

TOROSIN, N. S. et al. 3D genome evolution and reorganization in the Drosophila melanogaster species group. **PLoS Genetics**, v. 16, n. 12, p. 1–29, 2020.

TRAZZI, S. et al. In vivo functional dissection of human inner kinetochore protein CENP-C. **Journal of Structural Biology**, v. 140, n. 1–3, p. 39–48, 2002.

WESTHORPE, F. G.; FULLER, C. J.; STRAIGHT, A. F. A cell-free CENP-A assembly system defines the chromatin requirements for centromere maintenance. **Journal of Cell Biology**, v. 209, n. 6, p. 789–801, 2015.

WICKER, T. et al. Apg Iv. **Nature Reviews Genetics**, v. 8, n. 12, p. 973–982, 2007.

XIAO, H. et al. A retrotransposon-mediated gene duplication underlies morphological variation of tomato fruit. **Science**, v. 319, n. 5869, p. 1527–1530, 2008.

XING, J. et al. Emergence of primate genes by retrotransposon-mediated sequence transduction. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 103, n. 47, p. 17608–17613, 2006.

XU, B.; YANG, Z. PamlX: A graphical user interface for PAML. **Molecular Biology and Evolution**, v. 30, n. 12, p. 2723–2724, 2013.

YANG, Y. et al. Increasing the data size to accurately reconstruct the phylogenetic relationships between nine subgroups of the Drosophila melanogaster species group (Drosophilidae, Diptera). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 62, n. 1, p. 214–223, 2012.

YASSIN, A. Phylogenetic classification of the Drosophilidae Rondani (Diptera): The role of

morphology in the postgenomic era. **Systematic Entomology**, v. 38, n. 2, p. 349–364, 2013.
YASSIN, A. et al. The pdm3 Locus Is a Hotspot for Recurrent Evolution of Female-Limited Color Dimorphism in Drosophila. **Current Biology**, v. 26, n. 18, p. 2412–2422, 2016.
YASSIN, A. Phylogenetic biogeography and classification of the Drosophila montium species group (Diptera: Drosophilidae). **Annales de la Societe Entomologique de France**, v. 54, n. 2, p. 167–175, 2018.
ZHANG, J. Evolution by gene duplication: An update. **Trends in Ecology and Evolution**, v. 18, n. 6, p. 292–298, 2003.
ZHAO, D. et al. The unique epigenetic features of Pack-MULEs and their impact on chromosomal base composition and expression spectrum. n. January, p. 1–18, 2018.