

## **EVOLUÇÃO E EXPRESSÃO DE HOMÓLOGOS DA *DECREASE IN DNA METHYLATION 1* EM ARROZ E SOJA APONTAM PARA IMPORTÂNCIA NO DESENVOLVIMENTO VEGETAL**

**NATÃ DIENES MACHADO<sup>1</sup>; RAILSON SCHREINERT DOS SANTOS<sup>2</sup>; LUIS WILLIAN PACHECO ARGE<sup>3</sup>; DANIEL DA ROSA FARIAS<sup>4</sup>; GLACY JAQUELINE DA SILVA<sup>5</sup>; ANTONIO COSTA DE OLIVEIRA<sup>6</sup>**

<sup>1</sup> Universidade Federal de Pelotas - CDTec – natamachado@live.com;

<sup>2</sup> Universidade Federal de Pelotas – CDTec/FAEM – rschsan@hotmail.com;

<sup>3</sup> Universidade Federal de Pelotas - FAEM – l.willianpacheco@yahoo.com.br;

<sup>4</sup> Universidade Federal de Pelotas - FAEM – fariasdr@gmail.com;

<sup>5</sup> Universidade Federal de Pelotas - CDTec – glacy.jaqueline@gmail.com;

<sup>6</sup> Universidade Federal de Pelotas – CDTec/FAEM – acostol@cgfufpel.org.

### 1. INTRODUÇÃO

Metilação do DNA comumente discutida em eucariotos, é um processo bioquímico que envolve a adição de um grupo metil no 5º carbono das citosinas (Phillips, 2008) e possui como característica, a alteração da expressão gênica de forma estável ao longo de divisões celulares.

Em plantas, esse processo é diferente de mamíferos, onde ocorre principalmente no nucleotídeo citosina em sítios CpG, em plantas a citosina pode ser metilada em sítios CpG, CpHpG, e CpNpN (N = qualquer nucleotídeo, exceto guanina). As principais metiltransferases de DNA de *Arabidopsis*, que promovem a ligação covalente de os grupos metil no DNA, são DRM2, MET1 e CMT3 (SAZE et al., 2012).

O *Methyl-CpG-binding domain* (MBD) é um domínio de ligação a DNA metilado. Proteínas com MBDs podem se ligar ao DNA e recrutar modificadores da cromatina, sendo comumente relacionadas a repressão da transcrição gênica.

O gene *Decrease in DNA Methylation 1* (DDM1) de *Arabidopsis* é um dos reguladores epigenéticos que são necessários para manutenção da metilação de citosinas no DNA genômico.

A expressão transiente de DDM1 fundido a GFP mostrou que sítios DDM1 partilham de sítios comuns com proteínas AtMBD. ZEMACH et al. (2005) sugerem que a localização subnuclear de AtMBD não é dependente apenas da metilação CpG; DDM1 pode facilitar a localização de AtMBDs em domínios nucleares específicos. Juntamente com o processo de *small-RNA-directed DNA methylation* (RdDM), a DDM1 medeia praticamente toda a metilação de transposons e auxilia na regulação da expressão gênica (ZEMACH et al., 2013).

Embora a metilação da citosina possa afetar vários aspectos do crescimento e desenvolvimento das plantas, incluindo aqueles com importância agrícola, poucos ortólogos de DDM1 em outras plantas, além de *Arabidopsis*, foram estudados. HIGO et al. (2012) identificaram dois genes *DDM-like* em arroz (LOC\_Os09g27060 e LOC\_Os03g51230), os quais possuem alta similaridade com DDM1.

Ambos homólogos de DDM1 de arroz descritos por HIGO et al. (2012) são transcritos ao longo do desenvolvimento vegetal. Linhagens transgênicas de arroz com o gene *OsDDM1a* (LOC\_Os09g27060) silenciado apresentaram hipometilação do DNA genômico. Nessas linhas, sequências repetidas foram mais severamente afetadas do que sequências de cópia única, como ocorrem nos mutantes *ddm1* de *Arabidopsis*, assim, aumentando a atividade de transposons.

Considerando a importância dos genes DDM1 e homólogos, este trabalho tem como objetivo identificar genes codificadores de proteínas *DDM1-like* em soja

(*Glycine max* L. Merrill.), arroz (*Oryza sativa* L.) e *Physcomitrella patens* (Hedw.) Bruch & Schimp. (briófita). Dados de expressão transcricional e a similaridade entre os promotores também foram analisados, buscando fornecer informações iniciais para estudo mais detalhado destes genes.

## 2. METODOLOGIA

Utilizou-se a ferramenta BLASTp + (Altschul et al., 1990) para encontrar sequências similares (> 50% de identidade) a DDM1 de *Arabidopsis* (Query: AT5G66750) nos bancos de proteínas preditas de soja, arroz e *P. patens*. As identificações obtidas para os genes de soja e arroz foram utilizadas no *Genevestigator* (HRUZ et al., 2008) com a finalidade de encontrar dados de expressão transcricional destes genes ao longo do desenvolvimento e em diferentes órgãos da planta. As sequências de aminoácidos e as regiões promotoras dos genes (-1000pbs) foram alinhadas (ClustalW2 - LARKIN et al., 2007), utilizando a matriz PAM (Dayhoff) para proteínas e IUB para nucleotídeos. As topologias das árvores filogenéticas foram definidas com o uso do programa Mr.Bayes v.3.2.2 (HUELSENBECK; RONQUIST, 2001), utilizando a sequência de *P. patens* (briófita) como *outgroup*, e as figuras foram geradas com o programa FigTree v.1.3.1 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>). A busca por motivos conservados nas regiões promotoras foi feita através do MEME suíte (TIMOTHY et al., 2009), utilizando as condições padrão. Buscou-se ainda encontrar ilhas CpG nos promotores destes genes através do PlantPAN (CHANG et al., 2008).

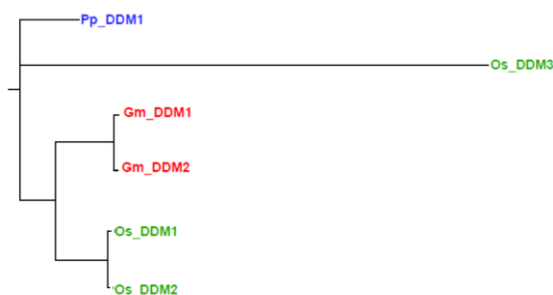
## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os genes identificados nas bases de proteínas preditas de soja, arroz e *P. patens* são mostrados na Tabela 1, juntamente com o nome genérico utilizado neste estudo.

**Tabela 1** Genes identificados nos bancos de proteínas preditas de *P. patens*, soja e arroz, a partir do BLAST utilizando a DDM1 de *Arabidopsis* como *query*.

Nome Genérico	Número de Acesso	(%) de identidade com DDM 1
Gm_DDM1	Glyma01g38150.1	69
Gm_DDM2	Glyma11g07220.1	68
Os_DDM1	LOC_Os09g27060.1	65
Os_DDM2	LOC_Os03g51230.1	54
Os_DDM3	LOC_Os04g59624.1	53
Pp_DDM1	XP_001763998.1	56

Dois destes homólogos (LOC\_Os09g27060 e LOC\_Os03g51230) já haviam sido identificados também em trabalho anterior (HIGO et al., 2012). A árvore filogenética obtida a partir do alinhamento das proteínas preditas, e possivelmente homólogas a DDM1 é apresentada na Figura 1.

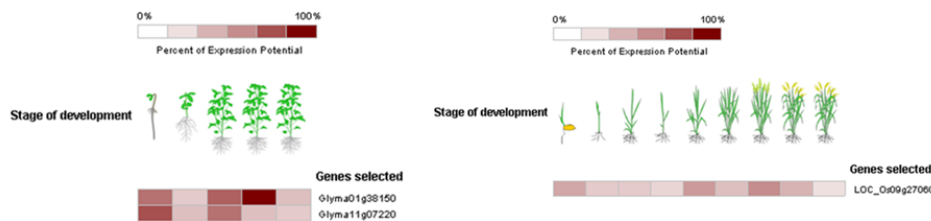


**Figura 1** Árvore filogenética obtida a partir do alinhamento de aminoácidos dos genes em estudo.

A figura demonstra maior similaridade entre as Os\_DDM1 e Os\_DDM2 com as Gm\_DDM1 e Gm\_DDM2. Com base na utilização de *P. patens* como ancestral

(VICTORIA et al., 2012), tais genes devem ter possuído um ancestral comum antes da divergência entre mono e dicotiledôneas, tendo sofrido duplicação posterior.

O perfil de expressão transcricional dos genes de soja e do Os\_DDM1 (demais genes de arroz não foram encontrados no banco de dados do *Genevestigator*) de arroz ao longo do desenvolvimento da cultura são exibidos na Figura 2.



**Figura 2** Expressão transcricional dos genes em estudos, em diferentes estádios de desenvolvimento da soja e do arroz.

Todos os genes demonstram aumento de expressão nas fases iniciais e na transição para a floração, denotando uma provável importância destes genes nestas fases de desenvolvimento.

Para estudar a relação de similaridade entre os perfis de expressão desses genes, as suas sequências promotoras também foram alinhadas, formando outra árvore filogenética (dados não exibidos). Esses dados também demonstram maior similaridade entre os genes Os\_DDM1, Os\_DDM2, Gm\_DDM1 e GmDDM2; separando o Os\_DDM3 dos demais.

A similaridade de expressão entre os genes mais parecidos entre si pode ser um indicativo de que estes ainda estão em processo de neofuncionalização, possivelmente ainda tendo funções redundantes ou sendo pseudogenes. Entretanto maiores estudos ainda são necessários.

Análises da presença de motivos conservados nas regiões promotoras destes genes também foram feitas (dados não exibidos), demonstrando regiões bem conservadas principalmente na região proximal dos dois genes de soja, os quais têm expressão bem similar.

A procura por ilhas CpG/CpNpG em genes *DDM1-like* aqui estudados, (dados não exibidos) resultaram na detecção de somente uma ilha na Pp\_DDM1, demonstrando uma possível perda de regulação por metilação nestes genes ao longo da evolução.

#### 4. CONCLUSÕES

Putativos homólogos de DDM1 foram encontrados em número semelhante nos bancos de dados de proteínas preditas de arroz e soja.

Análise em bancos de dados públicos de microarranjo demonstram aumento da expressão transcricional de três dos genes em estudo, nas fases iniciais de desenvolvimento, bem como na transição para a floração.

Os genes Os\_DDM1/Os\_DDM2 e Gm\_DDM1/Gm\_DDM2 se agrupam, indicando que provavelmente um único ancestral existia antes da divergência entre mono e dicotiledôneas, mas ambos devem ter sofrido duplicação posterior.

A similaridade encontrada nas sequências de aminoácidos dos genes em estudo foi parecida quando se analisando a região promotora dos genes.

A análise de ilhas CpG/CpNpG nas regiões promotoras dos genes em estudo, demonstra a perda destas ao longo da evolução vegetal para genes *DDM1-like*.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALTSCHUL, S.F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E.W.; LIPMAN, D.J. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, v.215, p.403-410, 1990.

BAILEY, T.L.; BODÉN, M.; BUSKE F.A.; FRITH, M.; GRANT, C.E.; CLEMENTI, L.; REN, J.; LI, W.W.; NOBLE, W.S. MEME SUITE: tools for motif discovery and searching. **Nucleic Acids Research**, v.37, p.202-208, 2009.

CHANG, W.C.; LEE, T.Y.; HUANG, H.D.; HUANG H.Y.; PAN R.L. PlantPAN: Plant Promoter Analysis Navigator, for identifying combinatorial cis-regulatory elements with distance constraint in plant gene group. **BMC Genomics**, v.9, p.561, 2008.

HIGO, H.; TAHIR, M.; TAKASHIMA, K.; MIURA, A.; WATANABE, K.; TAGIRI, A.; UGAKI, M.; ISHIKAWA, R.; EIGUCHI, M.; KURATA, N.; SASAKI, T.; RICHARDS, E.; TAKANO, M.; KISHIMOTO, N.; KAKUTANI, T.; HABU, Y. DDM1 (decrease in DNA methylation) genes in rice (*Oryza sativa*). **Molecular Genetics and Genomics MGG**, v.287, n.10, p.785-792, 2012.

HRUZ, T.; LAULE, O.; SZABO, G.; WESSENDORP, F.; BLEULER, S.; OERTLE, L.; WIDMAYER, P.; GRUISSEM, W.; ZIMMERMANN, P. Genevestigator v3: a reference expression database for the meta-analysis of transcriptomes. **Advances in Bioinformatics**, 2008.

HUELSENBECK, J. P.; RONQUIST, F. MRBAYES: Bayesian inference of phylogeny. **Bioinformatics** v.17, p.754-755, 2001.

LARKIN, M.A.; BLACKSHIELDS, G.; BROWN, N.P.; CHENNA, R.; MCGETTIGAN, P.A.; MCWILLIAM, H.; VALENTIN, F.; WALLACE, I.M.; WILM, A.; LOPEZ, R.; THOMPSON, J.D.; GIBSON, T.J.; HIGGINS, D.G. Clustal W and Clustal X version 2.0. **Bioinformatics**, v.23, n.21, p.2947-2948, 2007.

PHILLIPS, T. The Role of Methylation in Gene Expression. **Nature Education**, v.1, n.1, 2008.

SAZE, H.; TSUGANE, K.; KANNO, T.; NISHIMURA, T. DNA methylation in plants: relationship to small RNAs and histone modifications, and functions in transposon inactivation. **Plant and Cell Physiology**, v.53, n.5, p.766-784. 2012.

VICTORIA F. de C.; BERVALD, C.M.; DA MAIA, L.C.; DE SOUSA R.O.; PANAUD O.; DE OLIVEIRA A.C. Phylogenetic relationships and selective pressure on gene families related to iron homeostasis in land plants. **Genome**, v.55, n.12, p.883-900, 2012.

ZEMACH, A.; LI, Y.; WAYBURN, B.; BEN-MEIR, H.; KISS, V.; AVIVI, Y.; KALCHENKO, V.; JACOBSEN, S.E.; GRAFI, G. DDM1 binds Arabidopsis methyl-CpG binding domain proteins and affects their subnuclear localization. **The Plant Cell**, v.17, n.5, p.1549-1558, 2005.

ZEMACH, A.; KIM, M.Y.; HSIEH, P.H.; COLEMAN-DERR, D.; ESHED-WILLIAMS, L.; THAO, K.; HARMER, S.L.; ZILBERMAN, D. The Arabidopsis nucleosome remodeler DDM1 allows DNA methyltransferases to access H1-containing heterochromatin. **Cell**, v.153, n.1, p.193-205, 2013.