

Estudo da Conservação da Sequência da DNA Metiltransferase 2 (Dnmt2) no Gênero *Drosophila*

Gilberto Cavalheiro Vieira¹; Marícia Fantinel D'Ávila¹; Maríndia Deprá¹; Vera Lúcia da Silva Valente¹
¹Departamento de Genética, Instituto de Biociências da Universidade do Rio Grande do Sul

Introdução

A metilação de DNA é imprescindível na regulação da expressão gênica nos mamíferos. Em invertebrados, no entanto, o processo de metilação é menos conhecido. Sabe-se que os níveis de citosinas metiladas diferem entre insetos e vertebrados: 0,5% em embriões de *Drosophila melanogaster* e *Anopheles gambiae* são metilados, enquanto o valor em vertebrados é de aproximadamente 5%. Nos vertebrados há quatro diferentes tipos de enzimas DNA metiltransferases (Dnmt1, Dnmt2, Dnmt3), mas nas espécies de *Drosophila* e de alguns outros insetos até agora estudadas, detectou-se atividade de somente uma enzima do tipo Dnmt2.

Em *D. melanogaster*, a metilação do DNA parece ser um sinal epigenético transiente, nos estágios iniciais de desenvolvimento. Contudo, trabalhos do nosso grupo de pesquisas revelaram que em espécies do subgrupo *willistoni* há padrões de metilação sexo-específicos de genes de rDNA, em indivíduos adultos. Além disso, foi detectada uma conservação significativa na porção catalítica da enzima Dnmt2 entre as espécies pertencentes aos grupos *willistoni*, *melanogaster* e *cardini*, havendo uma variação maior na porção de reconhecimento da sequência a ser metilada (TRD).

Objetivos

O presente trabalho tem o objetivo de analisar o gene *Dnmt2* em diferentes espécies de *Drosophila* a fim de gerar dados que ajudem a inferir o significado evolutivo da metilação do DNA dentro do gênero.

Material e Métodos

Amostras de DNA genômico de 60 espécies da família Drosophilidae foram extraídas de acordo com o protocolo de fenol-clorofórmio e utilizadas em amplificações por PCR. Foram usados primers para a região que codifica a isoforma B da enzima Dnmt2, gerando um fragmento de aproximadamente 980pb. Os fragmentos, depois de purificados, foram submetidos a sequenciamento automático.

A análise dos alinhamentos e cromatogramas foi feita nos programas do Staden Package e Mega 5.05, além do GeneDoc para visualizar a identidade e percentual de conservação das sequências obtidas.

Resultados e Discussão

Foram obtidos amplicons de 18 espécies do gênero *Drosophila*, além de sequência de insetos cujos genomas estão disponíveis no Flybase (ou banco de dados de *Drosophila*), num total de 30 espécies. Essas espécies pertencem aos seguintes grupos: *guarani*, *guaramunu*, *tripunctata*, *calloptera*, *immigrans*, *mesophragmatica*, *flavopilosa*, *repleta*, *melanogaster* and *willistoni*.

A análise das estimativas de divergência evolutiva ao longo das sequências pareadas dos 13 grupos de *Drosophila* apresenta divergência mínima de 14,1% entre os grupos *guaramunu* e *calloptera*, e máxima de 35,5% entre os grupos *willistoni* e *mesophragmatica* (tabela 1).

O alinhamento de aminoácidos de Dnmt2, das 30 espécies, indica grande conservação nos motivos responsáveis pela região catalítica da enzima. Porém a TRD apresenta uma considerável diferença entre as sequências analisadas.

As análises filogenéticas resultantes dos alinhamentos de sequências de nucleotídeos apresentaram significativa congruência com árvores obtidas em trabalhos divulgados anteriormente, usando metodologia similar para o gene *Adh* (figura 1), recuperando as principais radiações.

Já as análises efetuadas com as sequências de aminoácidos separaram o subgênero *Drosophila* em dois clados principais: um composto pela radiação *virilis-repleta* e outro com a radiação *immigrans-hirtodrosophila*. No entanto, os grupos *willistoni* e *obscura* não mostraram a posição basal esperada em relação ao grupo *melanogaster*.

Tabela 1. Estimativas de divergência evolutiva sobre sequência pareadas entre grupos de espécies Drosophilidae. O número de diferenças de aminoácidos média por sítio de todos os pares de sequências entre os grupos são mostrados abaixo da diagonal. A divergência evolutiva de nucleotídeos é mostrada acima da diagonal.

Groups	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
1 <i>willistoni</i>		0.350	0.351	0.345	0.338	0.322	0.316	0.335	0.355	0.340	0.348	0.332	0.336
2 <i>guaramunu</i>	0.309		0.145	0.141	0.173	0.262	0.226	0.259	0.245	0.250	0.270	0.269	0.302
3 <i>tripunctata</i>	0.311	0.108		0.169	0.190	0.261	0.239	0.270	0.256	0.265	0.279	0.284	0.308
4 <i>calloptera</i>	0.312	0.094	0.116		0.170	0.274	0.239	0.270	0.248	0.255	0.276	0.301	0.316
5 <i>guarani</i>	0.316	0.131	0.142	0.127		0.255	0.243	0.273	0.249	0.262	0.270	0.288	0.324
6 <i>immigrans</i>	0.279	0.201	0.214	0.205	0.201		0.273	0.283	0.268	0.290	0.265	0.293	0.301
7 <i>virilis</i>	0.293	0.170	0.189	0.188	0.201	0.183		0.174	0.175	0.192	0.211	0.259	0.311
8 <i>flavopilosa</i>	0.317	0.214	0.237	0.231	0.262	0.214	0.118		0.161	0.173	0.239	0.301	0.327
9 <i>mesophragmatica</i>	0.320	0.197	0.214	0.213	0.231	0.213	0.102	0.147		0.166	0.236	0.288	0.313
10 <i>repleta</i>	0.308	0.209	0.222	0.225	0.239	0.227	0.127	0.155	0.123		0.234	0.289	0.306
11 Hawaiian <i>Drosophila</i>	0.282	0.240	0.243	0.245	0.231	0.218	0.148	0.201	0.192	0.179		0.279	0.301
12 <i>obscura</i>	0.281	0.243	0.254	0.253	0.243	0.234	0.218	0.266	0.256	0.262	0.231		0.243
13 <i>melanogaster</i>	0.305	0.249	0.252	0.249	0.268	0.247	0.217	0.246	0.248	0.246	0.239	0.209	

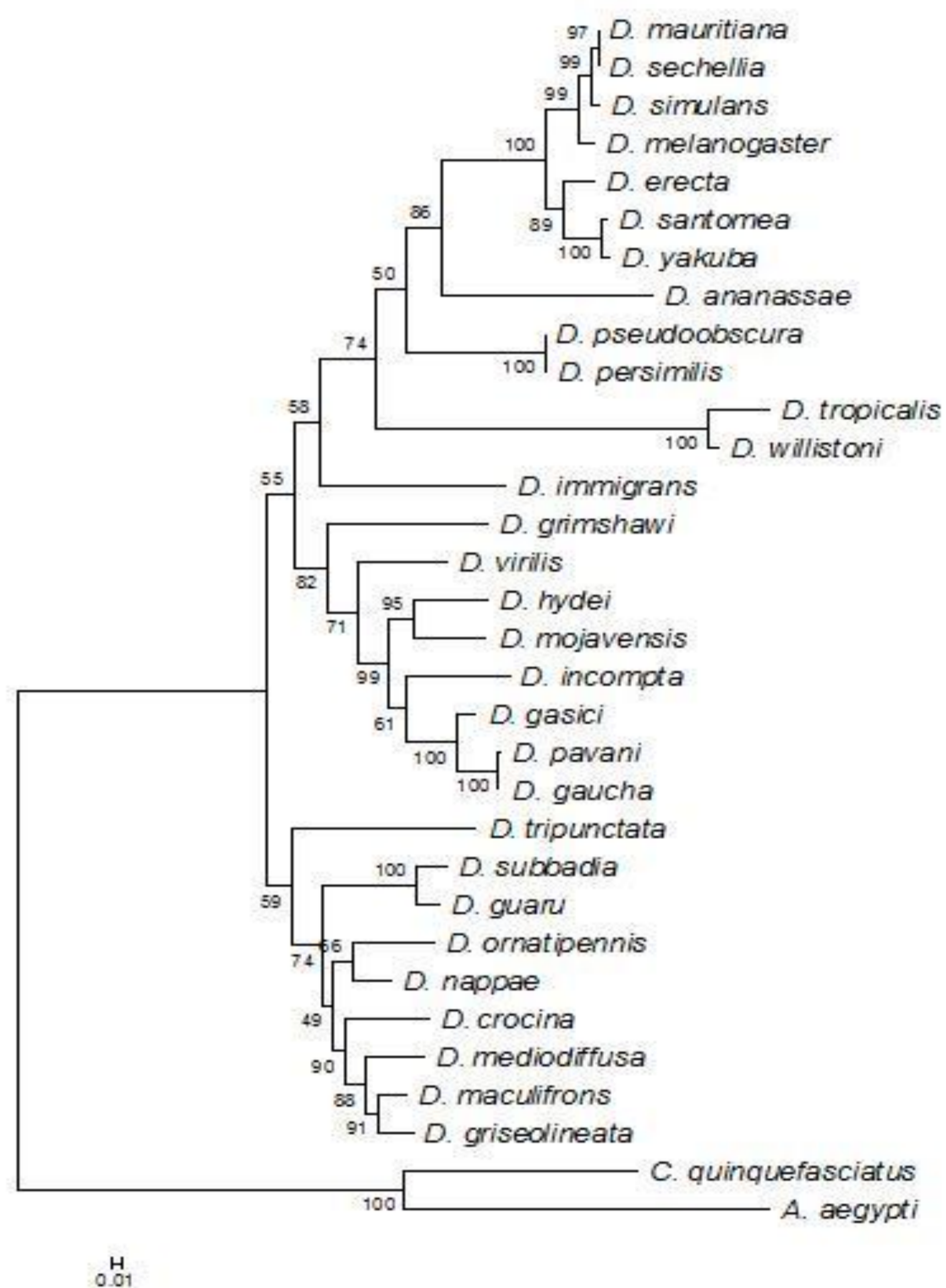


Fig. 1. A análise filogenética do gene *Dnmt2* baseada no alinhamento de sequências de nucleotídeos. A árvore foi gerada usando o método Neighbor-Joining com o modelo Tamura-Nei com distribuição gama. Os números acima dos ramos são os valores *bootstrap* com base em 5.000 repetições na árvore consenso. As espécies *C. quinquefasciatus* e *A. aegypti* foram utilizadas como grupos externos.

Diante dos resultados apresentados, as próximas etapas do nosso trabalho são a inclusão de mais espécies da família Drosophilidae em análises futuras no intuito de traçar um perfil evolutivo para o gene *Dnmt2*, auxiliando na investigação das possíveis funções da metilação do DNA em espécies do gênero *Drosophila*.