

Estudo da conservação da metilação do DNA no grupo *cardini* de *Drosophila*

Gilberto Cavalheiro Vieira¹, Marícia Fantinel D'Ávila¹, Vera Lúcia da Silva Valente¹

¹Departamento de Genética, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Introdução

Entre os processos epigenéticos de controle da expressão gênica em eucariotos, o processo mais conhecido é a metilação do DNA, que consiste essencialmente na adição de um grupo metil na posição C5 de citosinas pela ação catalítica de metiltransferases, podendo influenciar a expressão gênica sem modificar a sequência nucleotídica. Em *Drosophila* a enzima dDnmt2 é responsável pela metilação no DNA.

A metilação do DNA é um dos principais mecanismos epigenéticos que regulam a expressão gênica em células de mamíferos (cerca de 5% do genoma é metilado).

Contrastando com diversos grupos de vertebrados, que têm porções de DNA metilado em seus genomas, pouco se sabe sobre a metilação do DNA em invertebrados.

Em nosso grupo de pesquisa, estudos com espécies neotropicais do subgênero *Sophophora* de *Drosophila*, revelaram padrões sexo-específicos de metilação de genes de rDNA. Além disso, foi detectada uma conservação na parte do gene que codifica a porção catalítica da enzima dDnmt2 entre *D. willistoni* e *D. melanogaster*, havendo variação apenas na porção de reconhecimento da sequência a ser metilada (TRD).

D. willistoni é a única espécie Neotropical que teve seu genoma sequenciado pelo projeto *Drosophila 12 Genomes Consortium* e tem se mostrado singular em relação às onze outras, quanto a várias de suas características genômicas, o que chama atenção para o possível papel de forças evolutivas características desta região biogeográfica, atuantes sobre outras espécies, membros de diferentes subgêneros.

O grupo *cardini* faz parte do subgênero *Drosophila* e tem sua distribuição descrita para a região Neotropical, assim como o grupo *willistoni* (subgênero *Sophophora*). Alguns estudos foram realizados com espécies deste grupo evidenciando a alta variabilidade encontrada nestas moscas, similar à que é encontrada nas espécies do grupo *willistoni*.

Sendo assim, as espécies membros de ambos os subgêneros são de interesse para estudos evolutivos comparativos, uma vez que possuem distribuição geográfica e preferências alimentares similares e são simpátricas em grande parte do vasto território que ocupam.

Objetivo

Diante da necessidade de ampliar o conhecimento sobre o fenômeno da metilação no gênero *Drosophila*, o presente trabalho tem como objetivo avaliar a sua possível conservação entre os grupos *cardini* (subgrupos *cardini* e *dunni*) e *willistoni*, ambos constituídos de espécies de *Drosophila* neotropicais.

Material e Métodos

O DNA genômico foi obtido de acordo com o protocolo de fenol-clorofórmio padronizado no laboratório.

Nas análises por PCR foram utilizados primers que anelam na região que codifica a isoforma B da enzima dDnmt2, amplificando um fragmento de aproximadamente 980pb, descritos para *D. melanogaster*. Os produtos de PCR foram diretamente purificados por reação enzimática com exonuclease I e shrimp alkaline phosphatase (Exo-SAP) e posteriormente submetidos a sequenciamento automático.

Os cromatogramas foram editados no software Staden 2.0, e os alinhamentos gerados foram analisados através do uso dos softwares Mega 4.1, Muscle v3.8.31 e GeneDoc 2006.

Para investigar a ocorrência de fragmentos sexo-específicos metilados nos genes de rDNA nas espécies do grupo *cardini*, amostras de DNA genômico de machos e fêmeas de *D. polymorpha*, *D. neocardini* e *D. cardinoides* foram submetidas a clivagem por *Methylation Sensitive Restriction Endonucleases* (MSRE) com as enzimas *AluI* e *TaqI* e analisadas por Southern blot, utilizando como sonda o plasmídeo pDm238, que contém os genes de DNA ribossomal de *D. melanogaster*.

Resultados

Das dez espécies do grupo *cardini* analisadas por PCR, houve amplificação do fragmento esperado em 8 espécies: *D. acutilabella*, *D. cardinoides*, *D. dunni*, *D. neocardini*, *D. nigrodunni*, *D. neomorpha*, *D. parthenogenetica* e *D. similis* (figura 1). Como controle positivo utilizou-se a espécie *D. melanogaster*.

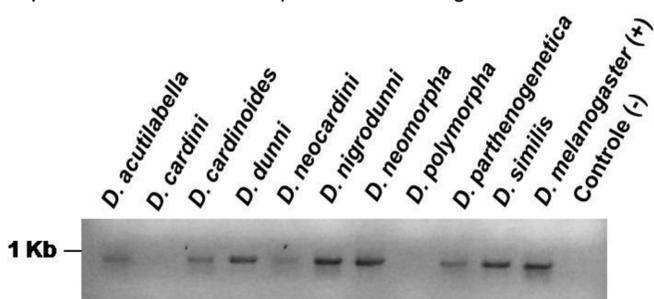


Fig 1. PCR do fragmento de *Dnmt2* em espécies do grupo *cardini* analisadas. Marcador: 1Kb Plus DNA Ladder Invitrogen®.

O alinhamento da sequência nucleotídica (Tabela 1) e sequência de aminoácidos da região TRD das espécies, cujos fragmentos foram sequenciados, indicou uma considerável diferença entre as sequências de espécies do grupo *cardini* analisadas em relação à *D. willistoni* (Figura 2).

Tabela 1. Valores percentuais de similaridade nucleotídica entre as espécies analisadas da região TRD

	<i>D. willistoni</i>	<i>D. neomorpha</i>	<i>D. neocardini</i>	<i>D. parthenogenetica</i>	<i>D. cardinoides</i>	<i>D. dunni</i>	<i>D. nigrodunni</i>
<i>D. willistoni</i>		45%	48%	51%	52%	50%	51%
<i>D. neomorpha</i>			84%	83%	83%	82%	59%
<i>D. neocardini</i>				86%	87%	88%	60%
<i>D. parthenogenetica</i>					98%	89%	61%
<i>D. cardinoides</i>						90%	62%
<i>D. dunni</i>							62%
<i>D. nigrodunni</i>							

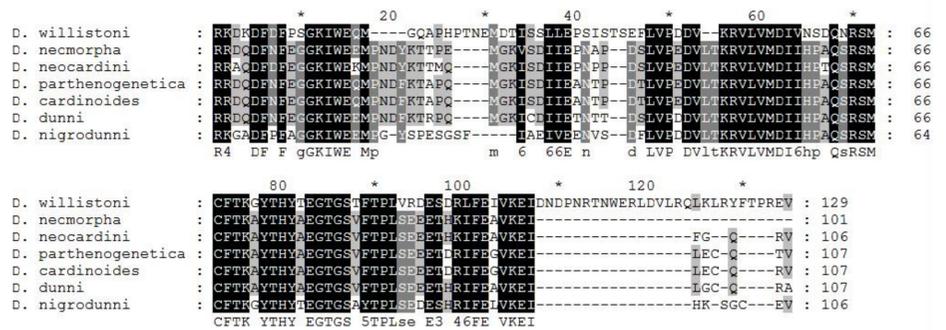


Fig 2. Alinhamento de aminoácidos da região de reconhecimento da sequência a ser metilada (TRD) dos fragmentos de espécies do grupo *cardini* sequenciados.

Nas análises por Southern Blot do DNA genômico das espécies do grupo *cardini* (*D. cardinoides*, *D. neocardini* e *D. polymorpha*) com a sonda pDm238 (rDNA) não foram observados padrões de fragmentos indicativos de metilação sexo-específica (Figura 3).

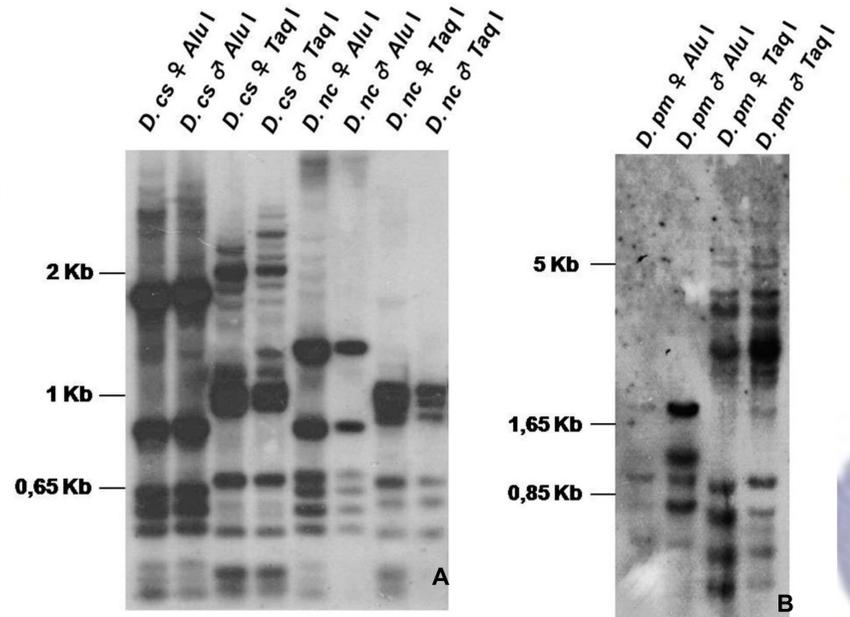


Fig 3. Southern blot das espécies do grupo *cardini* clivadas com *AluI* e *TaqI*: **A)** *D. cardinoides* e *D. neocardini* e **B)** *D. polymorpha*. Sonda: pDm238 (rDNA). Marcador: 1Kb Plus DNA Ladder Invitrogen®.

Discussão e Perspectivas

A comparação de padrões de controle epigenético da expressão gênica por metilação entre os grupos *cardini* e *willistoni* de *Drosophila* é de grande interesse, uma vez que pode revelar respostas similares (ou não) a fatores ambientais comuns, atuantes no Neotrópico. Além disso, estudos moleculares direcionados à resolução filogenética de representantes Neotropicais do gênero *Drosophila* são escassos.

Nosso grupo de pesquisa vem realizando uma série de estudos sobre as espécies de *Drosophila* de ambos os grupos, sob aspectos moleculares, ecológicos e citogenéticos, no intuito de preencher esta lacuna do conhecimento.

Em nosso presente trabalho, pudemos evidenciar que, apesar de serem espécies neotropicais, compartilhando nichos e ecologia semelhantes, as espécies dos grupos *cardini* e *willistoni* não apresentam analogia na ocorrência de metilação em seus genomas.

Os fragmentos analisados que contém a porção de reconhecimento da sequência a ser metilada (TRD), apresentam alta divergência nucleotídica entre as espécies do grupo *cardini* quando comparadas às do grupo da *D. willistoni*, o que também pode ser evidenciado pelo alinhamento dos aminoácidos.

Assim, o fenômeno da metilação sexo-específica dos genes de rDNA parece ser uma peculiaridade da *Drosophila willistoni* e das espécies mais proximamente relacionadas a ela.

Os próximos passos do nosso trabalho serão: sequenciar os fragmentos amplificados de *Dnmt2* nas demais espécies do grupo *cardini* e analisar por Southern blot, as espécies deste grupo que não foram ainda estudadas para confirmar as conclusões descritas acima.