ANÁLISE DA EXPRESSÃO DO GENE *Dmrt1* EM TECIDOS GONADAIS DE PARODONTIDAE (TELOSTEI: CHARACIFORMES)

Amanda Piveta Schnepper (PIBIC/CNPQ/UEPG), Viviane Nogaroto (Pesquisadora) Michelle Orane Schemberger (Pesquisadora), Marcelo Ricardo Vicari (Orientador), e-mail: vicarimr@yahoo.com.br

Universidade Estadual de Ponta Grossa/Departamento de Biologia Estrutural, Molecular e Genética

Ciências Biológicas/ Genética/ Genética Animal

Palavras-chave: Diferenciação sexual, modelagem proteica, regulação gênica

Resumo

O gene *Dmrt1* é conhecido como um gene participante da diferenciação sexual, porém em peixes esse mecanismo ainda é pouco conhecido. Visando elucidar a diferenciação sexual em peixes Parodontidae foram realizados testes de expressão gênica em gônadas de machos e fêmeas para o gene *Dmrt1* nas espécies *Parodon nasus* e *Apareiodon* sp. Estes testes demonstraram que o *Dmrt1* apresenta uma maior expressão em machos em *Apareiodon sp.*, indicando sua participação no desenvolvimento dos testículos. Além disso, foi realizada a predição da proteína DMRT1, onde foram encontrados domínios de ligação ao DNA e átomos de zinco, uma característica das proteínas que atuam na regulação da expressão gênica, sendo mais um indicativo que este gene atue na regulação da diferenciação sexual em Parodontidae. Os dados obtidos são promissores e abrem perspectiva para avaliação de outros genes envolvidos na cascata de diferenciação sexual em peixes.

Introdução

Parodontidae é constituída por um grupo de peixes com ampla distribuição pela América do Sul (PAVANELLI; BRITSKI, 2003). Apresentam um número diploide conservado de 54 cromossomos. Neste grupo há espécies sem sistema de cromossomos sexuais heteromórficos, espécies com proto-cromossomos sexuais e outras com sistema de cromossomos sexuais simples ZZ/ZW ou múltiplo ZZ/W_1W_2 (SCHEMBERGER et al., 2011). No entanto, em peixes a determinação sexual é pouco compreendida para quase a totalidade das espécies.

O gene *Dmrt1* (*Doublesex and Mab-3 Related Transcription factor 1*) codifica um domínio de ligação ao DNA que pertence para a família gênica que contém o domínio DM (*Doublesex* e *Mab-3*), o qual está envolvido na determinação sexual e diferenciação de organismos extremamente distantes filogeneticamente, incluindo desde corais à humanos (RAYMOND et al., 1998). Este genee que codifica o fator de transcrição DMRT1 que pode atuar na decisão primária da determinação sexual e na diferenciação sexual, ou em alguns organismos atuar em ambos os mecanismos (MATSON; ZARKOWER, 2012). Entre os peixes, o gene *Dmrt1* é descrito por ser expresso preferencialmente no desenvolvimento gonadal de macho.

Em Parodontidae o gene *Dmrt1* demonstrou a presença de cinco exons (1235 pb) e a matriz de leitura resultou em uma sequência de 295 aminoácidos para macho e para fêmea. A predição do polipeptídio demonstrou a presença de dois domínios proteicos íntegros: *DM DNA binding domain* e o *Double-sex mab3 related transcription factor 1* (SCHEMBERGER et al., 2016). A região regulatória deste gene em *Apareiodon* sp. demonstrou pequenas variações em sequências entre os genomas dos machos e fêmeas (SCHNEPPER et al., 2016) e entre os genomas das espécies *A. piracicabae*, *Apareiodon* sp., *P. nasus* e *A. affinis* (SCHEMBERGER, M. O. informação pessoal). Nesse sentido, associar dados da expressão gênica diferencial em tecido gonadal macho e fêmea destas quatro espécies de

Parodontidae, bem como, a predição da estrutura do fator transcricional DMRT1 poderá auxiliar no entendimento das modificações de rotas regulatórias para alteração gênica e, da atuação das proteínas da cascata de determinação sexual neste grupo de peixes.

Material e Métodos

O DNA genômico de um macho e uma fêmea de *Apareiodon* sp. foi extraído pelo método de CTAB segundo Murray e Thompson (1980). O sequenciamento genômico foi realizado pelo método illumina HiSeq. O RNA total foi extraído de *Apareiodon* sp. e *P. nasus* (8 machos e 8 fêmeas) pelo método de Trizol seguindo instruções do fabricante. O RNA total foi quantificado em NanoVue (GE Healthcare). Para a síntese do cDNA, aproximadamente 1 µg de RNA total foi submetido à transcrição reversa, utilizando-se o kit *First strand cDNA* (GE Helthcare). Os procedimentos estão de acordo com o comitê de ética em utilização de animais da UEPG (CEUA – 29/2016).

Os primers para ensaios da PCR do *Dmrt1* foram desenhados a partir dos dados genômicos de *Apareiodon* sp. A amplificação do *Dmrt1* a partir do cDNA total de gônadas de *Apareiodon* sp. foi realizada por reação de PCR que consistiu em 300 ηg de cDNA, 1x tampão, 2 mM $MgCl_2$, 200 µM dNTPs, 0.3 µM de primers Dmrt1 Fw e Dmrt1 Rv e 1 unidade de *Taq* polimerase, de acordo com as seguintes condições: 94ºC por 4 min, 35 ciclos a 94ºC por 1min, 58ºC por 50s e 72ºC por 1 min 30 sec. O sequenciamento nucleotídico foi realizado utilizando ABI-PRISM Genetic Analyzer (Carlsbad, CA). As sequências nucleotídicas obtidas foram submetidas ao BLASTn através do National Center for Biotechnology Information (NCBI) (USA), para análise de similaridade.

O cDNA de *Apareiodon* sp. e *P. nasus* foi utilizado para a amplificação do gene *Dmrt1* por qRT-PCR utilizando os reagentes: SYBR Green master mix (Roche) e 8 µM de cada primer. O gene do *rRNA 18S* foi utilizado como controle interno. A qPCR foi realizada no termociclador tempo real seguindo as seguintes condições: 10 min a 94 °C; 40 ciclos de 15 s a 94 °C, 30 s a 60 °C e 30 s a 72 °C; e uma curva de dissociação. O threshold cycle (Ct) foi mensurado e a expressão relativa foi calculada por 2-ΔΔCt (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001). Uma análise estatística foi realizada utilizando o teste de Shapiro-Wilk, e a seguir, os dados foram submetidos a um teste t de Student. O software utilizado para esta análise foi o The R Project for Statistical Computing (© The R Foundation) e Microsoft Office Exel.

A modelagem da proteína DMRT1 foi realizada por homologia, através do software Modeller versão 9.19 (WEBB; SALI, 2014). Como molde foi utilizada a proteína DMRT1 de humano, código 4yj0 no *Protein Data Bank* (PDB), sendo que, como apenas o domínio DM desta proteína foi cristalizado, a região predita da proteína DMRT1 limita-se igualmente ao domínio DM.

Resultados e Discussão

A partir dos dados obtidos para *Parodon nasus* e *Apareiodon* sp. foi observar uma expressão do gênica *Dmrt1* significativamente maior em gônadas de exemplares machos quando comparados às fêmeas (Figura 1).

A análise estatística resultou em um p-value de $1{,}554.10^{-4}$ bilateral e $7{,}77.10^{-5}$ unilateral em *Apareiodon sp*., indicando uma maior expressão do gene *Dmrt1* nos machos. Em *P. nasus* o p-value obtido foi de 0,07, e como o valor de α=0,05, não houve diferença significativa na expressão do gene *Dmrt1* nesta espécie, por este motivo, novos espécimes serão coletados e submetidos aos testes de expressão. É conhecido que o fator de transcrição DMRT1 atua na regulação de outros genes *downstream* na via de diferenciação sexual (MATSON; ZARKOWER, 2012). A detecção de níveis de expressão gênica *Dmrt1* diferencial entre machos e fêmeas de *Apareiodon* sp. abre perspectiva de investigação de promotores de genes da via de determinação sexual em Parodontidae para avaliação da presença do seu sítio de ligação ao DNA – *transcription factor binding site* (*TFBS*).

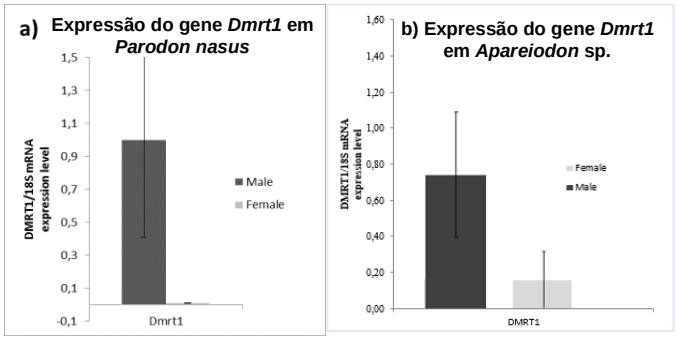


Figura 1: Em 1a temos a expressão do gene *Dmrt1* em *Parodon nasus*, e em 1b em *Apareiodon* sp. Nota-se que em ambas as espécies a expressão do gene *Dmrt1* foi maior em macho, porém apenas em *Apareiodon sp.* esta diferença é significativa. O alto desvio padrão pode ser atribuido ao baixo desenvolvimento dos testículos dos espécimes coletados.

Os testes mostraram uma maior expressão do gene *Dmrt1* nos machos das espécies analisadas, indicando que este gene pode ter função de desenvolvimento testicular conservada dentro de Parodontidae. Os altos desvios padrão presentes nas análises se devem a diferença de maturidade dos espécimes coletados, o que pode ter resultado em um p-value não significativo em *P. nasus* (novos ensaios qRT-PCR padronizados serão realizados).

A predição por homologia do domínio DM da proteína DMRT1 de *Apareiodon* sp. foi realizada em associação com seu provável *TFBS,* quando utilizado como molde a estrutura 4yj0 depositada no PDB (Figura 2). Em humanos, o domínio DM apresenta-se como um trímero (MURPHY et al., 2015) e, por tratar-se de uma região parcialmente conservada, é esperado que em *Apareiodon* sp. este domínio possua estrutura proteica semelhante. Foi demonstrado que o domínio DM do trímero DMRT1 se liga ao DNA inserindo suas α-hélices dentro do sulco maior e, consequentemente, ancorando o módulo de ligação ao zinco no sulco menor (MURPHY et al., 2015). Devido à similaridade e conservação do DMRT1 humana ao encontrado para *Apareiodon* sp., é possível inferir um mecanismo de associação ao DNA semelhante para este peixe Neotropical.

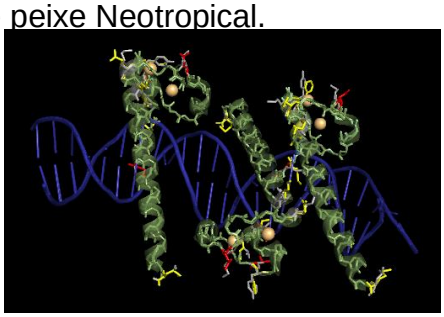


Figura 2: Estrutura do domínio DM da proteína DMRT1, modelado por homologia, apresentando-se na forma de trímero e sua interação com o DNA (estrutura em azul). Os aminoácidos representados em cinza são iguais ao do molde 4yj0, os em amarelo são semelhantes quimicamente e os em vermelho são diferentes quimicamente. As bolas brancas evidenciam os átomos de zinco ligados a hélice da proteína.

A presença do módulo de zinco no domínio DM é conservado em vertebrados, o que caracteriza esta região como um domínio de ligação ao DNA (ZHU et al., 2000). Acredita-se que os átomos de zinco presentes nas proteínas do tipo dedo de zinco atuam na regulação da expressão gênica em resposta a variações na concentração de zinco (LAITY et al., 2001). Esta resposta regulatória é um indicativo de que o gene *Dmrt1* pode atuar como regulador da cascata gênica para diferenciação sexual em *Apareiodon* sp.

Nossos dados demonstraram uma possível associação do domínio DM ao DNA de Parodontidae semelhante ao encontrado para humanos. Ainda, a diferença de expressão gênica significativa do *Dmrt1* dentro de machos de Parodontidae é um indicativo de que este gene pode atuar como regulador da cascata gênica para diferenciação sexual neste grupo de peixes.

Conclusões

Os dados de expressão gênicas mostram que o gene *Dmrt1* é mais expresso em testículos em relação aos ovários de *Apareiodon* sp., sendo um indicativo de que este gene está relacionado com o desenvolvimento testicular na família Parodontidae. A análise estrutural do domínio DM da proteína DMRT1 mostrou semelhanças com a proteína 4yj0 (código PDB) deste gene em humanos. Foram encontrados átomos de zinco na estrutura da proteína, o que é característico das proteínas que atuam na regulação da expressão gênica. Sendo assim, é possível inferir que o *Dmrt1* pode atuar como regulador da cascata gênica na diferenciação sexual em Parodontidae.

Agradecimentos

Agradecemos o Ministério do Meio Ambiente/Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (MMA/ICMBio/SISBIO No. 15117) pela autorização de captura de exemplares de peixes na natureza. O estudo foi financiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Secretaria de Ciência e Tecnologia do Estado do Paraná (SETI) e Fundação Araucária de Apoio ao Desenvolvimento Científico do Estado do Paraná (Fundação Araucária).

Referências

LAITY, J.H.; LEE, B.M.; WRIGHT, P.E. Zinc fingerproteins: new insights into structural and functional diversity. **Current Opinion in Structural Biology,** v.11, p. 39-46, 2001

MATSON, C. K.; ZARKOWER, D. Sex and the singular DM domain: insights into sexual regulation, evolution and plasticity. **Nature Reviews Genetics,** v. 13, p. 163-174, 2012.

MURPHY, M.W. *et al.* An ancient protein-DNA interaction underlying metazoan sex determination. **Nature Structure Molecular Biology**, v. 22(6), p.442-451, 2015.

PAVANELLI, C.S; BRITSKI, H.A. *Apareiodon* Eigenmann, 1916 (Teleostei, Characiformes), from the Tocantins-Araguaia Basin, with description of three new species. **Copeia** v. 2, p. 337-348, 2003.

RAYMOND, C.S., *et al*. Evidence for evolutionary conservation of sex-determining genes. **Nature** v. 391, p. 691–695, 1998.

SCHEMBERGER, M.O. *et al*. Differentiation of repetitive DNA sites and sex chromosome systems reveal closely related group in Parodontidae (Actinopterygii: Characiformes). **Genetica** v. 139, p. 1499–1508, 2011.

SCHEMBERGER, M. O. *et al* Comparative male and female characterization and expression of dmrt1 gene of Apareiodon sp. (Characiformes, Parodontidae. In: 21st International chromosome conference, 2016, Foz do Iguaçu. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 148. p. 152-153, 2016.

SCHNEPPER, A. P. *et al*. Análise molecular preliminar e expressão do gene Dmrt1 em Apareiodon sp. (Characiformes: Parodontidae). In: XVII Simpósio de Citogenética e Genética de Peixes, 2016, São Carlos. **XVII Simpósio de Citogenética e Genética de Peixes**, 2016.

WEBB, B.; SALI, A. Comparative Protein Structure Modeling Using MODELLER; **Current Protocols in Bioinformatics**, p. 5.6.1-5.6.32, 2014

ZHU, L *et al.* Sexual dimorphism in diverse metazoans is regulated by a novel class of intertwined zinc fingers. **Genes & Development**, v. 14, p. 1750-1764, 2000.