

## ANÁLISE *IN SILICO* DO GENE *OSNRAMP1* NO GENOMA DO ARROZ

Lívia Scheunemann dos Santos<sup>(1)</sup>, Luciano Carlos da Maia<sup>(1)</sup>, Andrea Miyasaka de Almeida<sup>(2)</sup>, Fernando Irajá Félix de Carvalho<sup>(1)</sup>, Antonio Costa de Oliveira<sup>(1)</sup>  
<sup>1</sup>Centro de Genômica e Fitomelhoramento – FAEM/UFPel, Campus Universitário, s/nº · Caixa Postal 354, 96010-900, Pelotas, RS. liviascheu@hotmail.com  
<sup>2</sup>Departamento de Biologia Vegetal - Universidade Federal de Viçosa

A homeostase de metais é um fator crítico para a sobrevivência de organismos vivos, e transportadores de metais têm papel central na manutenção da homeostase em células vivas, uma vez que o acúmulo excessivo de metais é potencialmente tóxico. Dessa forma, a regulação da concentração de metais deve ser estritamente controlada. Pesquisas recentes evidenciam o papel essencial de transportadores de metais na manutenção da homeostase (Nelson, 1999). Com o seqüenciamento de genomas vários genes transportadores de metais foram identificados e suas funções investigadas e componentes adicionais relativos à homeostase de ferro foram caracterizados. Apesar de não estarem relacionados diretamente à absorção de ferro, esses componentes estão provavelmente envolvidos no armazenamento de ferro. Membros de uma família gênica amplamente distribuída, a NRAMP (Natural Resistance-Associated Macrophage Protein) foram caracterizados em *Arabidopsis* e arroz (Belouchi et al., 1997; Thomine et al., 2000). Genes *NRAMP* codificam uma família de proteínas integrais da membrana em bactérias, fungos, plantas e animais (Cellier et al., 2001). Diversas proteínas NRAMP funcionam como transportadores de metais que transportam várias classes de cátions, incluindo metais essenciais como manganês (Mn), ferro (Fe) e cádmio (Cd). Essas proteínas têm papel essencial na absorção e homeostase de metais em leveduras, por exemplo (Thomine et al., 2003). Genes *NRAMP* foram identificados em várias espécies vegetais. Em *Arabidopsis*, análises genômicas revelaram a existência de seis seqüências com alta homologia a NRAMP (Alonso et al., 1999). Estudos funcionais revelaram que transportadores AtNRAMP modulam a toxidez de Fe e Cd em plantas (Curie et al., 2000). Devido ao fato de várias proteínas AtNRAMP transportarem ferro quando expressas em levedura e de que a expressão do gene *NRAMP* é elevada na deficiência de ferro, sugere-se que essas proteínas de membrana possam estar envolvidas na nutrição de ferro pelas plantas. Tanto em dicotiledôneas e monocotiledôneas não-gramíneas, que apresentam a estratégia I de absorção de ferro, como em gramíneas, que apresentam estratégia II de absorção, foram encontrados genes *NRAMP* altamente homólogos, sugerindo funções básicas comuns a proteínas NRAMP na homeostase celular do ferro, independente da estratégia de absorção utilizada pela planta. Com objetivo de conhecer as regiões do gene OsNRAMP com maior nível informativo para análise de polimorfismo nessa região entre plantas de arroz com diferenças no comportamento para a tolerância ao Fe, foram analisadas informações contidas no Banco de Dados NCBI referentes ao gene.

A partir dos dados publicados por GROSS et al. (2003) mostrando o posicionamento de um *locus* homólogo de *NRAMP1* no cromossomo 7 do arroz, foi localizado o RNA homólogo concatenado naquela região (gij115471426) que foi alinhado na pseudo-molécula do cromossomo 7 do genoma do arroz através do software BLASTN, com intuito de buscar as regiões de introns e exons. Posteriormente, utilizando um algoritmo escrito na linguagem *Perl* (Maia, 2007) foi efetuada a busca por regiões de DNA repetitivo (SSRs) num trecho abrangendo distância de 2.000pb *upstream* do primeiro exon do gene.

O resultado da busca apontou para um trecho, anotado pelo IRGSP como um gene homólogo a uma proteína integral de membrana, conforme domínio IPRO01046, contido no "InterPro Domain". O gene está nomeado como *OsNramp1* (id: Os07g0257200), sendo composto por 15 exons e 13 CDS, sendo dois desses exons descritos como UTRs. O alinhamento feito pelo BLASTN da região gj115471426 contra o cromossomo 7 mostrou 15

regiões concatenadas (transcritas) (Figura 1), sendo que o primeiro e o último exon estão descritos como regiões não traduzidas (UTR - *untranslated region*) para as proteínas homólogas depositadas no "InterPro Domain".

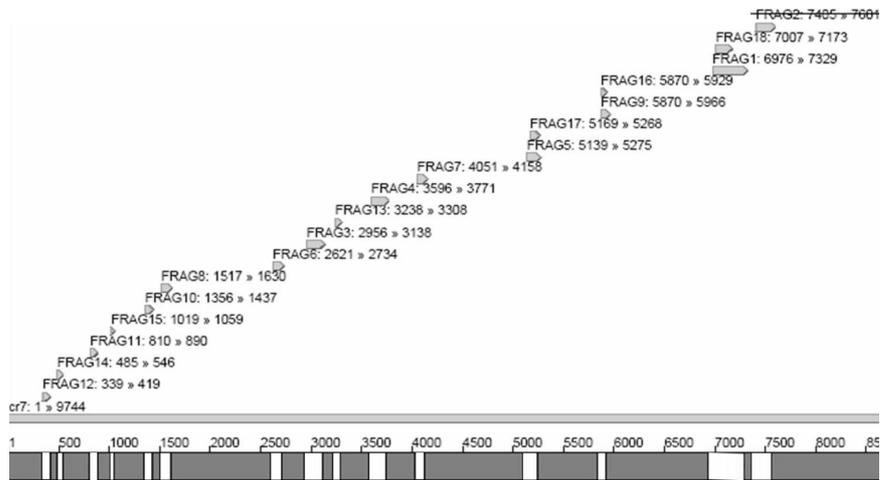


Figura 1. Alinhamento dos transcritos de OsNRAMP1 (gi|115471426) contra região do cromossomo 7 contendo gene Os07g0257200.

O resultado da busca por SSRs resultou na ocorrência de 3 seqüências: TC<sub>28</sub> entre os exons 11 e 15, TA<sub>11</sub> entre os exons 16 e 18 e ATTA<sub>5</sub> 30pb após o último exon (UTR), conforme a Figura 2.

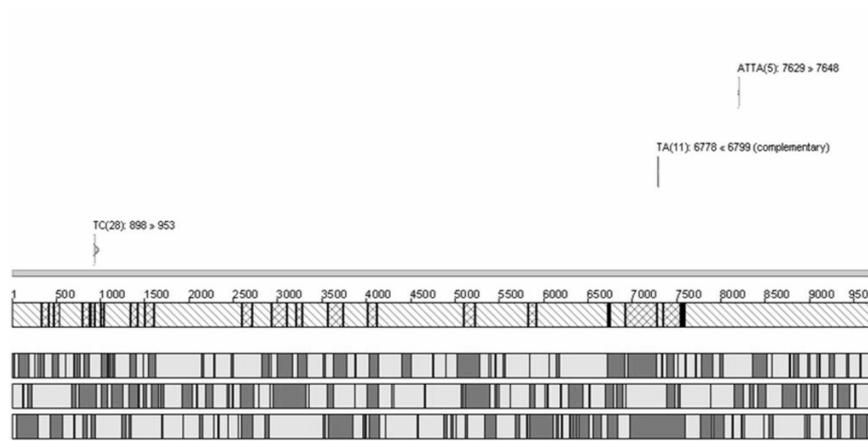


Figura 2. Regiões do gene OsNRAMP1 contendo trechos de DNA repetitivo (SSRs).

A análise dos resultados indica que uma possível estratégia no uso de marcadores moleculares para evidenciar polimorfismo do gene entre diferentes cultivares é o uso de

*primers* que amplifiquem um trecho total de 7.600pb. Outra estratégia seria a utilização de marcadores para a amplificação específica de cada exon. Não obstante, a identificação de 3 SSRs entre exons prove uma forte possibilidade de que alterações nessas regiões de DNA repetitivo possam ter influência nas diferenças funcionais desse gene.

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

- ALONSO, J.M. HIRAYAMA, T., ROMAN, G., NOURIZADEH, S., ECKER, J.R. EIN2, a bifunctional transducer of ethylene and stress responses in *Arabidopsis*. *Science*, 1999, 284, 2148-2152.
- BELOUCHI, A., KWAN, T., GROS, P. Cloning and characterization of the OsNRAMP family from *Oryza sativa*, a new family of membrane proteins possibly implicated in the transport of metal ions. *Plant Mol. Biol.* 1997, 33, 1085-1092.
- CELLIER, M.F.M., BERGEVIN, I., BOYER, E., RICHER, E. Polyphyletic origins of bacterial Nramp transporters. *TIGS*, 2001, 17, 365-370.
- CURIE, C., ALONSO, J.M., LE JEAN, M., ECKER, R., BRIAT, J-F. Involvement of NRAMP1 from *Arabidopsis thaliana* in iron transport. *Biochem. J.* 2000, 347, 749-755.
- GROSS, J., STEIN, R.J., FETT-NETO, A.G., FETT, J.P. Iron homeostasis related genes in rice. *Gen. Mol. Biol.* 2003, 26, 4, 477-497.
- INTERNATIONAL RICE GENOME SEQUENCING PROJECT (IRGSP). Disponível em: <http://rgp.dna.affrc.go.jp/IRGSP/index.html> Acesso em: 27 de maio de 2007.
- MAIA, L. Desenvolvimento de ferramenta para análise *in silico* da ocorrência de microssatélites (*Simple Sequence Repeats*) no genoma do arroz. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Pelotas, UFPel, Brasil, 2007.
- NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION (NCBI). Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> Acesso em: 27 de maio de 2007.
- NCBI/BLASTN. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/> Acesso em: 27 de maio de 2007.
- NELSON, N. **Metal ion transporters and homeostasis.** *EMBO J.* 1999, 18, 4361-4371.
- THOMINE, S., LELIÈVRE, F., DEBARBIEUX, E., SCHROEDER, J.I., BARBIER-BRYGOO, H. AtNRAMP, a multispecific vacuolar metal transporter involved in plant responses to iron deficiency. *The Plant J.* 2003, 34, 685-695.
- THOMINE, S., WANG, R., WARD, J.M., CRAWFORD, N.M., SCHROEDER, J.I. Cadmium and iron transport by members of a plant transporter gene family in *Arabidopsis* with homology to NRAMP genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2000, 97, 4991-4996.