

GENÉTICA PARA MELHORAMENTO DE PLANTAS

REGULAÇÃO GENÉTICA E EPIGENÉTICA DE RESPOSTAS AO ESTRESSE EM POPULAÇÕES NATURAIS DE PLANTAS

Railson Schreinert dos Santos
Cesar Valmor Rombaldi
Antonio Costa de Oliveira

17.1 INTRODUÇÃO

Embora sob uma ótica linear existam estudos que demonstrem que a insegurança alimentar é resultado da dificuldade de acesso a alimentos numa perspectiva de ação política, uma avaliação mais global também inclui interferentes científico-tecnológicos, com desafios para a produção, a diminuição de perdas, a distribuição e o comércio justo. É fato inequívoco que a população mundial e a demanda por alimentos aumenta e, junto com elas, os problemas de limitação de expansão de áreas, bem como de recursos naturais. Assim, em plena ação corroborativa com as políticas nacionais e internacionais de redução de discrepâncias econômico-sociais, há que se responder à pergunta: como aumentar a produção de alimentos sem utilizar áreas impróprias e/ou comprometer os recursos naturais num contexto de mudanças

climáticas globais? A prospecção e a obtenção de plantas adaptadas a condições ambientais adversas, com potencial agrônomo para a produção de alimentos com propriedades nutricionais e funcionais diferenciadas é relevante, importante e inadiável. No processo de evolução, as plantas desenvolveram formas de responder e tolerar condições ambientais adversas, mas, para que se possa utilizar e/ou potencializar esses eventos evolutivos na produção de alimentos, combustíveis, vestuário, paisagens e reestabelecimento de biomas fortemente alterados, é necessária uma maior compreensão dos mecanismos genético-moleculares que coordenam a recepção e transdução de sinais e, por conseguinte, regulam vias metabólicas gerenciadoras do próprio genoma e aquelas do metabolismo primário e secundário das plantas. Grande parte dessas respostas se deve a dois tipos de regulação gênica: genética e epigenética. É nesse contexto que este capítulo está inserido, buscando responder às perguntas da atualidade na temática. O que se sabe sobre esses eventos? Como podemos acessar essas informações? Como elas podem contribuir para a evolução da produção agropecuária? Quais são os mecanismos envolvidos? Quais as técnicas mais empregadas na atualidade para abordar essa temática? Com essa abordagem, espera-se poder disponibilizar base conceitual, exemplos e aplicabilidade científica e tecnológica.

17.2 EVOLUÇÃO E ESTRESSE (POR QUE É IMPORTANTE ESTUDAR ESTRESSES AMBIENTAIS?)

Prospecções apontam para o aumento populacional mundial, prevendo-se aproximadamente 10 bilhões de pessoas no planeta Terra no ano de 2080. Isso significa que a produção de alimentos precisará crescer 0,4% ao ano. Indicadores ainda apontam para um aumento do poder aquisitivo em regiões em situação econômica mais vulnerável. Tudo isso levará a um aumento da demanda quantitativa e qualitativa de alimentos. Assim, os desafios relacionados à segurança alimentar mundial passam, sem dúvida, por ações de política socioeconômica, mas dependem fortemente do viés científico-tecnológico, que significa mais alimentos em menos área, com mais qualidade nutricional e funcional e na mesma base de produção.

Terras e recursos hídricos já são fortalezas limitadas na atualidade, tanto em termos quantitativos (*per capita*) quanto qualitativos. Além disso, a degradação dos solos, a salinização de áreas irrigadas, a urbanização, a utilização de grandes áreas para outros fins que não a produção de alimentos, as mudanças de regimes de temperatura e precipitações, bem como da

incidência de radiação, constituem-se em desafios reais para a produção agrícola e pecuária¹.

Apesar dessa perspectiva desafiadora e difícil, o histórico recente demonstra que, se há um problema real em potencial, medidas preventivas e, às vezes, ações corretivas devem ser tomadas. O Brasil, por exemplo, triplicou sua produção agrícola em três décadas, tendo aumentado em 80% a área cultivada. Isso indica que, apesar de ter avançado na fronteira agrícola, e em alguns casos de forma desordenada, exploratória e destruidora, também evoluiu em um dos principais indicadores da atividade: produtividade técnica. Porém, é sabido que não basta aumentar a produtividade (Kg.ha^{-1}): é preciso monitorar e evoluir para a redução do aporte de insumos, melhorar a produtividade econômica, diminuir a dependência de insumos protegidos e, sobretudo, gerar alimentos seguros, com diferencial nutricional e funcional, com proteção do ambiente e dos trabalhadores, valorizando o território.

Frente ao exposto, é necessário buscar alternativas para o aumento da produtividade técnica, embutindo todos os conceitos mencionados. Para isso, a ação mais aplicável, e de imediato, é aumentar o acesso à informação e ao conhecimento. Mesmo com os avanços ocorridos, ainda há dificuldades para transformar o conhecimento científico em produto tecnológico, promotor de desenvolvimento continuado. Outra importante estratégia de ação é o incentivo ao melhoramento genético de plantas, seja na adaptação de cultivares às condições locais e/ou na prospecção de novos genótipos na geração de novos materiais mais tolerantes e produtivos frente a fatores ambientais, bióticos ou abióticos, adversos².

Um grande número de fatores bióticos e abióticos tem impacto na produção e na produtividade agrícola. Os estresses bióticos são aqueles causados por outros organismos vivos, como bactérias, vírus, fungos, insetos-praga, plantas concorrentes cultivadas ou nativas. Já, os estresses abióticos são aqueles causados por agentes não vivos, como, falta ou excesso de água, salinidade, toxicidade causada por cátions ou ânions, ventos, temperaturas extremas, secas, inundações, radiações e até desastres naturais, como tornados e incêndios florestais. No contexto histórico da pesquisa agropecuária nacional e internacional, as ações majoritárias adotadas foram centradas em estratégias que buscassem mitigar esses estresses, ou propor recursos que pudessem amenizar os efeitos causados por esses agentes estressores. Como resultado, a produção agrícola e pecuária internacional aumentou e, apesar dos desafios, há condições de se produzir o necessário para o abastecimento atual. Contudo, como os indicadores apontam para incrementos de consumo, é necessário buscar estratégias que consolidem o conhecimento

já existente, assim como buscar novos vieses de pesquisa e desenvolvimento. Um deles visa, em vez de se contrapor aos fatores bióticos ou abióticos ameaçadores da produtividade técnica, valorizá-los como aliados da produção e da qualidade.

De certa forma, nos biomas em que as espécies coevoluem, já há um processo de melhoramento resultante do acúmulo de mutações seguido por seleção natural. Como resultado da evolução, há espécies adaptadas a condições ambientais adversas, sendo capazes de responder a diferentes estresses e garantindo a adequada reprodução e continuidade da espécie. É claro que, para a maioria dos casos, a produtividade técnica ainda é baixa, e muitas vezes elas produzem frutos ou grãos com teores elevados de fatores antinutricionais, de alcaloides e, até mesmo, moléculas alergênicas para os seres animais. De toda maneira, essas bases genéticas e o conhecimento de como essas plantas se adaptam, crescem, desenvolvem-se e se reproduzem nesses ambientes e condições constituem-se no referencial científico que deverá embasar o melhoramento genético assistido de plantas, associando ferramentas de genômica, transcriptômica, proteômica e metabolômica.

A teoria da seleção natural, introduzida por Charles Robert Darwin (1809-1882) em seu livro *On the Origin of Species by Means of Natural Selection*, ou *The Preservation of Favoured Races in the Struggle for Life*, de 1859, superou a “teoria lamarquista”, proposta pelo biólogo francês Jean-Baptiste Pierre Antoine de Monet, Chevalier de Lamarck (1744-1829), no livro *Philosophie zoologique ou exposition des considérations relatives à l’histoire naturelle des animaux*. Lamarck, como é mais conhecido, propunha que o ambiente causava mudanças nas necessidades dos organismos e, conseqüentemente, mudariam seu comportamento/características. Assim, o “lamarquismo” baseava-se nas chamadas leis do “uso e desuso” e de “transmissão dos caracteres adquiridos”.

A formulação e apresentação das leis da hereditariedade (leis de Mendel), que regem a transmissão dos caracteres hereditários, por Gregor Mendel (1822-1884), em 1865, seguida de avanços posteriores em estudos de genética, praticamente suplantaram as ideias lamarquistas, que só voltaram a ser discutidas mais atualmente. Na atualidade, a seleção natural é a única causa reconhecida de adaptação, mas não a única causa da evolução, que inclui eventos não necessariamente adaptativos como a mutação e também a deriva genética³. Um resumo das contribuições de Lamarck, Darwin e Mendel é apresentado na Figura 17.1.

Chama-se de deriva genética a mudança na frequência de um alelo em uma população devido à amostragem aleatória. É um processo importante,

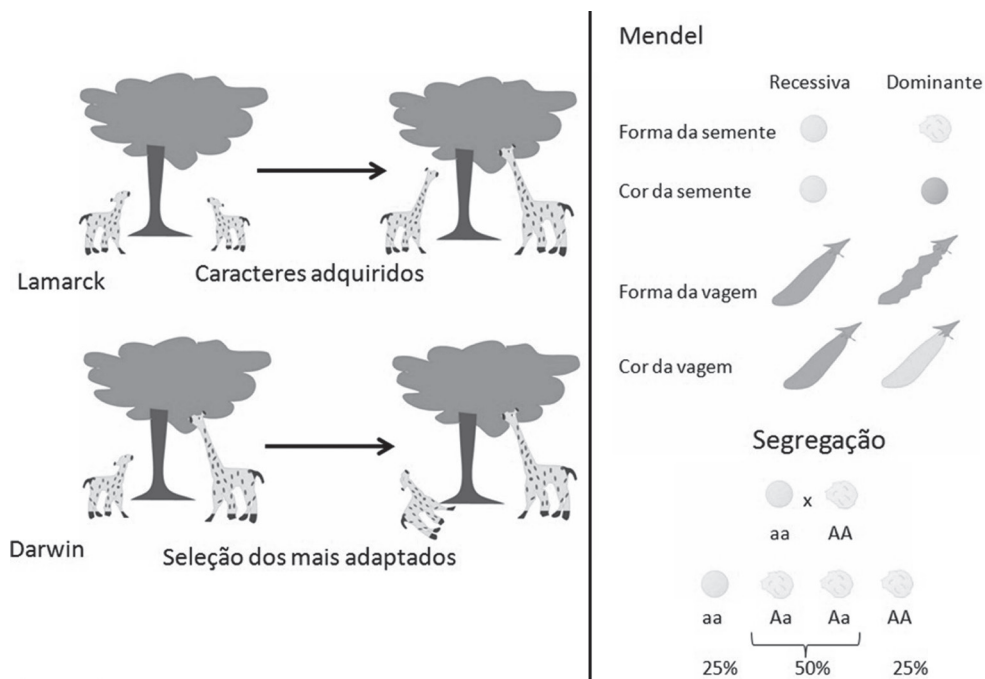


Figura 17.1 Teorias propostas por Lamarck e Darwin, à esquerda. Segregação dos caracteres proposta por Mendel, à direita.

que influi na evolução de organismos, em especial em populações pequenas. Há referencial teórico qualificado sobre o assunto⁴, mas, neste capítulo, somente as mutações serão mais detalhadas.

Mutações são alterações na sequência de nucleotídeos de um fragmento de ácido nucleico chamado selvagem (*wild-type*). Tais mutações são consequências de “erros” na recombinação do material genético, replicação do ácido desoxirribunucleico (DNA), fruto da ação de agentes exógenos bióticos ou abióticos, e até mesmo da ativação de sequências autopropagativas, como os elementos transponíveis descobertos por Barbara McClintock (1950) em milho, e que depois se mostraram presentes nos mais diversos genomas. As mutações podem não resultar em respostas fisiológicas, alterar o produto de um gene ou impedir o seu funcionamento. Elas podem ainda envolver grandes regiões de um cromossomo, tornando-se repetidas, caso em que geralmente ocorrem por erros na recombinação genética, podendo introduzir cópias de genes no genoma⁵. As cópias extras são fonte de matéria-prima para a criação de novos genes com novas funções, um fenômeno chamado de neofuncionalização⁶. Isso é importante porque a maioria dos

genes evolui dentro de famílias, partilhando um ancestral comum⁷, incluindo genes que direcionam modificações epigenéticas, como será detalhado na sequência. Essa duplicação de genes pode fazer com que a nova cópia situe-se em outras regiões do genoma, estando, assim, sujeita a elementos regulatórios diferentes.

Os efeitos das mutações podem ser classificados em três categorias. Há mutações que podem ser prejudiciais ao organismo dentro do ambiente em questão (prejudica o *fitness*); há mutações “neutras”, que têm pouco ou nenhum efeito sobre o *fitness*; e, há aquelas mutações vantajosas (raras), que aumentam o *fitness*, contribuindo com a adaptação do organismo⁸. As mutações com *fitness* aumentado tendem a ser selecionadas e passar às gerações seguintes. Assim, embora sempre submetida ao teste de hipótese, compreende-se melhor o processo de evolução do que na época de Darwin, no século XIX. Entretanto, como veremos, muito ainda vem sendo descoberto, e tais conhecimentos são de suma importância não só para o melhoramento genético de plantas, mas também para muitas outras áreas, incluindo o tratamento e cura de muitas doenças.

17.3 O QUE É REGULAÇÃO GENÉTICA E EPIGENÉTICA?

Para ter efeito, um gene precisa ser transcrito e, muitas vezes, traduzido (gerar uma proteína), e essa proteína atuar em algum evento bioquímico-fisiológico. Como foi citado anteriormente, o conceito de mutação ainda é bastante vago: “uma mudança na sequência de nucleotídeos”. As mutações podem gerar novas cópias de genes, indiretamente mudar a sequência de aminoácidos de uma proteína e sua função, bem como modificar o entorno desse gene. Assim, mudanças na sequência de aminoácidos de proteínas representam apenas uma das consequências da mutação, mas as sequências nucleicas têm papel mais complexo do que somente codificar polipeptídeos.

A regulação transcricional, que determina quando e quanto de um gene será transcrito, é resultado de ações de uma grande variedade de fatores, tais como a atividade de fatores de transcrição, remodeladores da cromatina, polimerases, helicases, topoisomerases, quinases, proteasomas, acetiltransferases, desacetilases e metiltransferases⁹. Todos esses fatores, os quais também estiveram sofrendo modificações e seleção ao longo do tempo, executam suas ações com precisão e exatidão em resposta às mudanças nas diferentes fases de desenvolvimento do organismo, bem como em resposta às influências do meio externo.

Dentro da regulação transcricional, uma das áreas que tem se popularizado bastante é a epigenética. Literalmente, “epigenética” significa “no topo” (o prefixo “epi” significa “posição superior”, em grego) da genética. O britânico Conrad Hal Waddington (1905-1975) foi o primeiro cientista a falar e formalizar afirmativas e hipóteses em epigenética, então chamada “paisagem epigenética” (*epigenetic landscape*), em 1940, no livro *Organisers & Genes*. A “paisagem epigenética” era uma metáfora para descrever como a regulação gênica modula o desenvolvimento dos organismos¹⁰. Waddington referia-se à epigenética como sendo o estudo de “como os genes e seus produtos fazem o fenótipo ser o que ele é”. Pouco se sabia sobre epigenética, mas, desde então, muito se avançou nesse campo, modificando-se a conceituação.

Na atualidade, a epigenética geralmente é conceituada como sendo o conjunto de modificações que ocorrem na sequência de DNA e na cromatina, que são estáveis ao longo de diversas divisões celulares, mesmo não envolvendo mudanças na sequência de nucleotídeos do organismo¹¹. A epigenética tem papel importante no processo de diferenciação celular, permitindo que as células mantenham características diferentes e estáveis, apesar de terem o mesmo material genético.

Alguns exemplos de modificações epigenéticas incluem o silenciamento de muitos genes, o *imprinting* genômico, a permutação, o fenômeno de *bookmarking*, a inativação do cromossomo X, o efeito de posição dos genes no cromossomo, reprogramação celular, efeitos paternos, modificações de histonas e formação de heterocromatina, entre outros. O envolvimento da epigenética em doenças como o câncer impulsiona os estudos e um consequente aumento de conhecimento nessa área, especialmente em mamíferos. No caso do câncer, sabe-se que, até hoje, todos os tipos analisados apresentam anomalias epigenéticas, as quais parecem serem necessárias e suficientes para o início e progressão da doença.

O termo “herança epigenética” refere-se à transmissão de experiências ocorridas com os pais para os filhos através de modificações epigenéticas. Isso ocorre porque, em alguns genes, marcas epigenéticas são mantidas e passadas de uma geração para a geração seguinte sem que haja o apagamento do epigenoma de forma completa na formação do novo organismo, como descrito pelos conceitos tradicionais¹¹, o que retoma ideias lamarquistas. A epigenética já foi relacionada a diferentes eventos, como problemas em filhos de pessoas afetadas pela fome na Segunda Guerra Mundial¹², e até às modificações morfológicas sofridas pela abelha-rainha, que tem uma dieta diferente das demais, causando modificações no seu epigenoma¹³.

Atualmente, a importância dada à epigenética deve-se ao seu significado prático para a medicina, agricultura, conservação de espécies e também à maneira pela qual ela modifica nossa visão de hereditariedade e evolução. Em particular, fortalece o reconhecimento de que existem sistemas de herança epigenética através dos quais variações não advindas da sequência de DNA podem ser transmitidas por gerações, ampliando o conceito de hereditariedade e desafiando outros conceitos dogmáticos e amplamente aceitos.

Além da regulação transcricional, a atividade gênica depende ainda de eventos posteriores, que podem ocorrer tanto na molécula de ácido ribonucleio (RNA), como na proteína já formada. Esses eventos regulam a atividade gênica pós-transcricionalmente e pós-traducionalmente. Essa regulação tem grande impacto no fenótipo do organismo, permitindo a adaptação vegetal a diferentes situações, constituindo um importante campo de estudo.

17.4 REGULAÇÃO TRANSCRICIONAL E ESTRESSE

A atividade transcricional e sua regulação são de extrema importância para a vida celular. Prova disso é que inibidores da transcrição podem ser usados como antibióticos contra bactérias e fungos. Bons exemplos são a rifampicina, que inibe a RNA polimerase dependente de DNA, e a 8-hidroxiquinolina, um inibidor de transcrição antifúngico. A regulação transcricional funciona de forma bem diferente quando se comparam organismos procariotos e eucariotos.

Em procariotos, a presença de determinados nutrientes no meio determina quais genes serão expressos. Nesses seres uma combinação de ativadores e repressores e intensificadores (*enhancers*) determina a transcrição gênica¹⁴. Já em eucariotos, a regulação transcricional é fruto de diversas interações entre proteínas e DNA, de forma bem mais complexa que em procariotos⁹. Pode-se afirmar que a regulação transcricional inclui a epigenética e, em grande parte, depende dela. Muitos dos mecanismos de regulação transcricional serão vistos na seção dedicada à epigenética, pois, apesar de muitas vezes não se encaixarem no conceito de epigenética mais aceito (modificações herdáveis), é assim que são tratados pela maior parte da literatura disponível, devido, em grande parte, à íntima relação existente entre tais mecanismos (herdáveis e não diretamente herdáveis).

Antes de se abordar a regulação epigenética, é importante destacar que, em eucariotos, a regulação da transcrição tende a envolver interações combinatórias entre diversos elementos, o que permite uma resposta sofisticada

para várias condições ambientais, bem como diferenças espaciais e temporais na expressão gênica.

17.4.1 Alguns fatores importantes na regulação transcrricional

Apesar de serem elementos clássicos em procariotos, os eucariotos também fazem uso de intensificadores (Figura 17.2), os quais são pequenas regiões do DNA que podem ser ligadas às proteínas (fatores *trans*-atuantes, bem como um conjunto de fatores de transcrição) para aumentar os níveis de transcrição de determinados genes. Apesar dos intensificadores serem geralmente de atuação em *cis*, eles não precisam estar particularmente próximos dos genes em que atuam e, por vezes, não necessitam estar localizados no mesmo cromossomo¹⁵. Já os promotores são regiões de DNA de tamanho bastante variável que iniciam a transcrição de um determinado gene. Os

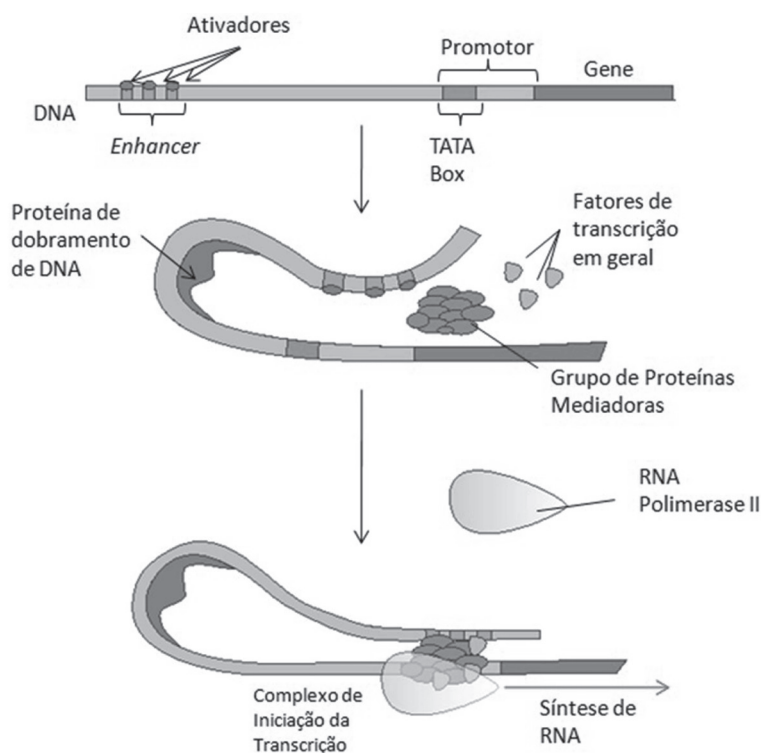


Figura 17.2 Forma de ação do intensificador (*enhancer*) na transcrição. Maiores detalhes podem ser encontrados no texto.

promotores estão localizados na região adjacente àquela que transcrevem, na mesma fita e a montante do gene. Outras sequências, como os íntrons, pedaços de pré-RNA mensageiro (pré-mRNA) removidos por *splicing*, também podem afetar a expressão gênica em plantas e outros eucariotos de diversas formas¹⁶. Obviamente, quando se faz referência a esses conceitos, fala-se do genoma nuclear eucarioto, pois os genomas mitocondrial e cloroplástico dos vegetais seguem uma lógica procariota.

Os fatores de transcrição (Figura 17.3A) são proteínas que se ligam a sequências específicas de DNA, controlando a transcrição¹⁷. Os fatores de transcrição podem executar tarefas isoladamente ou através da formação de complexos com outras proteínas, promovendo, assim, a ativação ou o bloqueio do recrutamento da RNA polimerase para genes específicos¹⁸. Tais fatores geralmente encontram-se junto às chamadas fábricas de transcrição (*transcription factories* – Figura 17.3B), que são regiões eucromáticas de atividade transcricional intensa. Parece existir certa preferência para

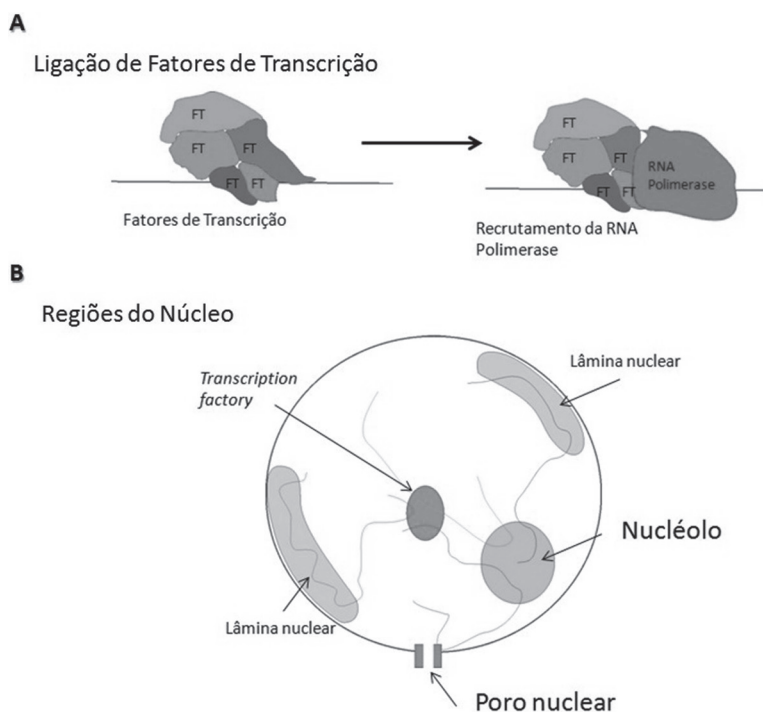


Figura 17.3 A) Ligação de fatores de transcrição à região promotora de genes com o recrutamento da RNA polimerase. B) Diferentes regiões do núcleo.

a associação de uma dada fábrica de transcrição a genes regulados pelo mesmo conjunto de fatores de transcrição¹⁹.

O primeiro fato que chamou a atenção para o papel dos fatores de transcrição na regulação gênica foi a sua importância ao longo do desenvolvimento das plantas²⁰. Nesses organismos, a primeira ideia de como o desenvolvimento é controlado por “interruptores” veio no início dos anos 1990, quando genes regulatórios importantes, que controlam a transição do crescimento vegetativo para reprodutivo, foram identificados em *Arabidopsis thaliana* e *Antirrhinum majus*. Esses genes codificam fatores de transcrição que determinam a identidade dos meristemas florais e órgãos. Estudos subsequentes demonstraram uma complexidade muito grande na forma como a regulação é realizada^{21,22}.

Além da relação dos fatores de transcrição com o desenvolvimento vegetal, muitos estudos também passaram a relacionar mudanças transcricionais de genes de plantas, seres humanos, entre outros, como forma de resposta a diferentes estresses²⁴⁻²⁶. Tais estudos continuam sendo realizados, aumentando as informações disponíveis sobre as formas pelas quais os genomas são regulados frente a estímulos ambientais.

Recentes análises em larga escala de sítios de ligação de fatores de transcrição ao DNA *in vivo*, utilizando técnicas de imunoprecipitação de cromatina (ChIP), tais como ChIP-seq e ChIP-chip²³, têm sido poderosas ferramentas para identificar possíveis genes-alvo.

Para a realização dos estudos de expressão transcricional, diferentes técnicas são utilizadas: *Nuclear run-on assay*²⁷, *RNase protection assay*²⁸, *ChIP-on-Chip* de RNA polimerase (RNAP)²⁹, microarranjo³⁰, *MS2-tagged RNA affinity purification* (MS2-TRAP)³¹, hibridização *in situ*³², *Northern blot*³³, *RNaseq*³⁴, reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real^{**35}.

17.5 REGULAÇÃO EPIGENÉTICA E ESTRESSE

A epigenética tornou-se uma das mais populares áreas de pesquisa na genômica funcional, propondo respostas para o entendimento do potencial de adaptação das plantas e de outros organismos. A variação epigenética pode, ou não, estar ligada à variação genética, assim como pode ser influenciada pelo ambiente em um mecanismo no qual este pode modelar o material hereditário^{36,37}. As formas de modificação epigenética da expressão gênica

* Mais informações sobre tais técnicas podem ser encontradas em outros capítulos dos volumes I, II e III desta obra, bem como nas referências aqui citadas.

variam entre as espécies, sendo que o foco neste capítulo serão as modificações que ocorrem em genomas vegetais. É importante destacar, ainda, que diferentes modificações epigenéticas estão descritas em plantas e estas são específicas de acordo com o tecido, espécie e idade do vegetal³⁸.

Sabendo-se dos efeitos das modificações epigenéticas sobre os vegetais fica evidente a importância do entendimento desses processos para o melhoramento genético visando tolerância/adaptação a estresses³⁹. Diferentes alterações epigenéticas existem, sendo que as mais estudadas atualmente são a metilação do DNA, modificações nas histonas e as provocadas por pequenos RNAs.

17.5.1 Metilação do DNA

A metilação de citosinas consiste em uma modificação covalente catalisada por uma enzima que transfere um grupo metil da S-adenosilmetionina para o carbono 5 de uma citosina, que passará a se chamar 5-metilcitosina (5mC). Plantas possuem níveis de 5mC relativamente altos, variando de 6% a 25% do total de citosinas, dependendo da espécie⁴⁰.

Nas plantas, diferentemente do que ocorre em mamíferos, a metilação de citosinas ocorre em três contextos: CpG, CpNpG e CpNpN, em que N significa A, C, ou T. Devido à sua natureza simétrica, a metilação CpG e CpNpG pode ser copiada na replicação do DNA, a partir do DNA hemimetilado (molécula de DNA em que somente uma das fitas, fita original ou paterna, se encontra metilada, logo após o evento de replicação). Entretanto, a metilação CpNpN, que é assimétrica, tem que ser restabelecida a cada replicação⁴¹.

As enzimas que participam da metilação do DNA vegetal são agrupadas em três categorias: metiltransferase (MET1), cromometilase3 (CMT3) e as chamadas metilases de domínios rearranjados (*momains rearranged methylases* – DRM). A MET1 é um homólogo da DNMT1 – DNA (citosina-5-)metiltransferase 1 – de mamíferos, predominantemente envolvida na manutenção de metilação CpG. A CMT3 é uma enzima específica de plantas que metila sequências CpNpG, especialmente em repetições centroméricas e transposons^{42,43}. Alguns trabalhos relatam uma redundância na atividade da CMT3 e MET1 em sítios CpNpG⁴⁴. As metiltransferases DRM1 e DRM2, por sua vez, parecem catalisar a metilação *de novo* em sequências assimétricas CpNpN⁴⁵, considerando-se que as DRMs têm capacidade de metilar qualquer citosina, independentemente do contexto⁴⁶.

A desmetilação pode ocorrer de duas formas: passiva e ativa (Figura 17.4). A passiva ocorre devido à inibição da metilação *de novo* ou à falta de capacidade de manter o chamado *imprinting* paterno após a replicação⁴⁷. A desmetilação ativa ocorre através da ação de glicosilases, as quais removem a metilação⁴⁸. A desmetilação ativa pode ser importante em prevenir a formação de epialelos hipermetilados no genoma vegetal⁴⁹, e a desmetilação de DNA alvo dirigida tem sido tema de estudos relevantes envolvendo o câncer⁵⁰. A desmetilação do DNA não é completamente compreendida e atualmente tem se mostrado bastante complexa, com diferentes consequências bioquímicas e moleculares para o organismo como um todo⁵¹.

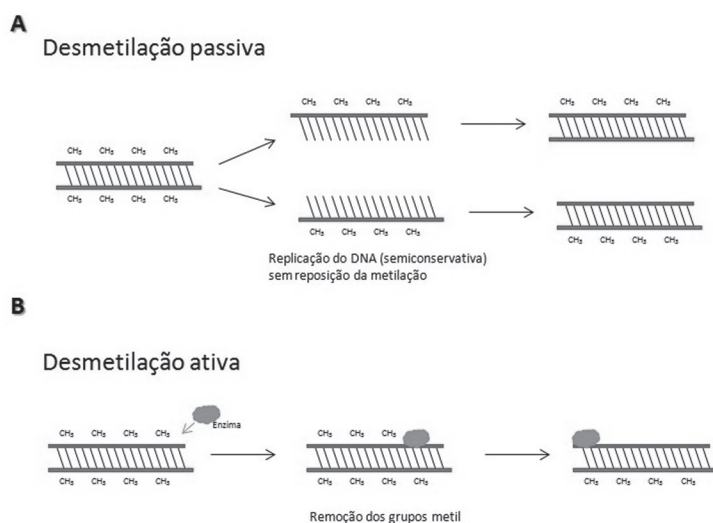


Figura 17.4 As duas formas de desmetilação possíveis. (A) A perda após a replicação do DNA e divisão celular sem reposição desta. (B) A remoção dos grupos metil por meio da ação de enzimas (glicosilases).

No arroz, a metilação CpG é característica de regiões gênicas, enquanto a metilação não CpG é abundante em elementos transponíveis⁵². A metilação na porção 5' do gene (promotor e parte da região transcrita) e na porção 3' (incluindo parte da região transcrita e sequências flangeadoras 3') geralmente inibe a expressão gênica⁵³⁻⁵⁵ (Figura 17.5). A relação da metilação com a inibição da expressão gênica e outras modificações ocorrentes na cromatina é um dos principais temas de estudo em epigenética atualmente. Outro tipo de modificação que vem emergindo como sendo de importância

para a regulação gênica é a chamada hidroximetilação, a qual é semelhante à metilação, mas que, em vez de inserir um grupo metil, insere um grupo hidroximetil no carbono 5 das citosinas (formando as chamadas 5-hidroximetilcitosinas – 5hmCs), como pode ser visto na Figura 17.6. A hidroximetilação tem suas peculiaridades o que torna importante a sua distinção da metilação comum através do uso de métodos de identificação apropriados.

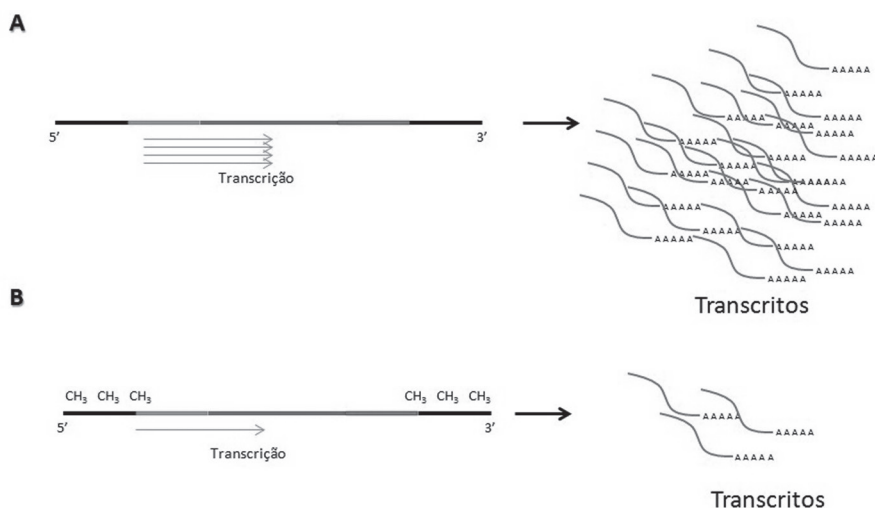


Figura 17.5 Consequência da metilação das regiões 5' e 3' dos genes, incluindo parte da região transcrita. (A) DNA não metilado com alto nível de transcritos. (B) DNA com regiões flaqueadoras e parte da região transcrita metilada e consequente menor nível de transcritos.

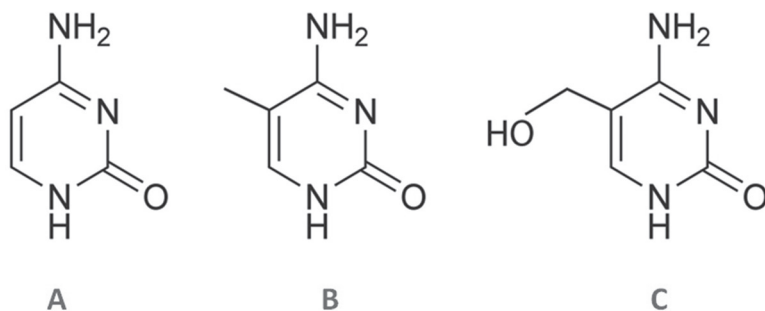


Figura 17.6 Moléculas de (A) citosina; (B) metilcitosina; (C) hidroximetilcitosina.

17.5.2 Modificações de histonas

As histonas estão sujeitas a uma grande variedade de modificações pós-traducionais, incluindo acetilação de lisinas, metilação de lisinas e argininas, fosforilação de serinas e treoninas, e ubiquitinação e sumoilação de lisinas⁵⁶, sendo que tais modificações ocorrem principalmente nas caudas N-terminais⁵⁷. Modificações covalentes na extremidade N-terminal das histonas afetam a posição e a compactação dos nucleossomos, tendo papel importante no remodelamento da cromatina e regulação gênica^{58,59}. Os processos de modificação pós-traducional de histonas mais comumente tratados em epigenética são a acetilação e a metilação de resíduos N-terminais, as quais têm impacto profundo no remodelamento da cromatina e, consequentemente, na atividade transcricional.

A metilação de lisinas é capaz de ativar ou reprimir genes, dependendo da sua localização. Os resíduos de lisina podem ser mono, di ou trimetilados, sendo que cada estado distinto confere diferentes significados biológicos. Por exemplo, H3K9me2 (que significa histona H3 dimetil Lis9, ou seja, uma dimetilação da lisina 9 da histona H3), H3K9me3, H3K27me3 e H4K20me3 reprimem a expressão, enquanto H3K4me1, H3K4me2, H3K4me3, H3K36me2 e H3K36me3 ativam a expressão de genes próximos. A metilação de histonas pode ser revertida por enzimas desmetiladoras⁶⁰. A H3K9me2 é mais comum em regiões de repetições heterocromáticas, enquanto H3K9me3 e H3K27me3 estão distribuídas em regiões gênicas^{61,62}.

A acetilação e a desacetilação de histonas parecem ser processos-chave para repressão e ativação da expressão gênica pela modificação da cromatina⁶³. A acetilação remove parte da carga positiva sobre as histonas, diminuindo, assim, a interação destas com os grupos fosfatos do DNA. Consequentemente, a cromatina fica mais relaxada, permitindo o acesso de fatores necessários à transcrição ao DNA, assim aumentando os níveis transcricionais de genes presentes na região em questão⁶⁴. Outros modelos sugerem que genes transcricionalmente ativos estariam correlacionados com o rápido *turn-over* na acetilação das histonas. Tal modelo exigiria que as histona acetiltransferases (HATs), que acetilam histonas, e histona desacetilases (HDACs), que desacetilam histonas, agissem em conjunto na cauda das histonas afetadas para manter os genes ativos⁶³.

A fosforilação é um fenômeno menos estudado entre as modificações até aqui descritas, mas de importância na regulação gênica. A fosforilação da histona H3 tem obtido maior destaque e tem sido associada à condensação e segregação cromossômica, ativação da transcrição, apoptose e reparação do

DNA. Tal modificação teria um papel especialmente importante no controle do ciclo celular vegetal⁶⁵.

A maioria das enzimas modificadoras de histonas em plantas são codificadas por famílias multigênicas. Mais de 15 membros de HATs foram encontrados em *Arabidopsis*⁶⁶. Já as HDACs de plantas podem ser agrupadas em quatro subclasses⁶², sendo que três delas parecem ter homologia primária com três classes de HDACs (RPD3, HDA1 e SIR2) encontradas em leveduras e células animais. Já a quarta classe de HDACs, conhecida como classe HD2, é encontrada somente em plantas^{67,68}.

A maioria das metilações nas lisinas das histonas é catalisada por proteínas chamadas (Su(var)3-9, E(Z) e Trithorax)-*domain* (SET). Existem 39 genes com domínio SET encontrados em *Arabidopsis*. Entretanto, a metilação H3K9 em *Arabidopsis* é mantida por homólogos de *Drosophila* SU(-VAR)3-9, chamados proteínas Su(var)3-9 homolog (SUVH)⁶⁹⁻⁷¹.

Estudos mostram que proteínas do grupo Polycomb (PcG, por exemplo: Polycomb *Repressive Complex 2* – PRC2) reprimem a expressão gênica mediando a metilação de H3K27 nos *loci*-alvo⁷². Proteínas PcG que possuem o domínio SET, MEDEA (MEA), CURLY LEAF (CLF) e SWINGER (SWN), por exemplo, são requeridas para o silenciamento mediado por H3K27me3 em genes importantes no desenvolvimento vegetal. Homólogos de proteínas Jumonji, uma classe de enzimas desmetiladoras descobertas após a LYSINE-SPECIFIC DEMETHYLASE 1 (LSD1) também parecem ter papel importante no desenvolvimento vegetal⁷³.

As modificações em histonas têm sido comumente relacionadas a respostas a estresses⁷⁴. Alguns exemplos são: aumento de H3K4me3 e H3K9ac em regiões promotoras de alguns genes responsivos a estresse por seca^{75,76}; mudanças de H3K4me1, H3K4me2 e H3K4me3 no genoma de *Arabidopsis* em resposta à seca⁷⁷; indução da expressão de HDACs em milho submetido a estresse por frio [Hu, 2011, Trichostatin A selectively suppresses the cold-induced transcription of the ZmDREB1 gene in maize]⁷⁸; decréscimo de H3K27me3 em COR15A (*cold-regulated gene 15°*) e ATGOLS3 em resposta a estresse por frio em *Arabidopsis*⁷⁹.

Maiores estudos da relação funcional entre fatores de modificação de histonas, rotas de pequenos RNAs interferentes (*small interfering RNA* – siRNAs) e de metilação de DNA, responsáveis por programas epigenéticos importantes no desenvolvimento em longo e curto prazo e em resposta a condições ambientais, seria crucial para decodificar o “código das histonas”.

17.5.3 Pequenos RNAs

Os pequenos RNAs (*small RNAs* – sRNAs) podem modificar a expressão de RNA mensageiro através da clivagem dos transcritos, repressão da tradução, ou pela metilação do DNA⁸⁰. A função dos sRNAs está relacionada com o seu tamanho: se possuírem 21 nucleotídeos (nts) de comprimento, o silenciamento é pós-transcricional; se possuírem 24 nts, o silenciamento deve-se à metilação do DNA dependente de RNA^{81,82}.

Os sRNAs têm importante ação na regulação genética e epigenética em resposta a estresses^{83,84}, bem como no crescimento e desenvolvimento⁸⁵ devido ao silenciamento transcricional por metilação de DNA dirigida por RNA (*RNA-directed DNA methylation* – RdDM). Nesse mecanismo, a produção de transcritos requeridos para a biogênese de siRNAs é mediada pela RNA polimerase II (RNAP II) e polimerase IV (RNAP IV), pela via de interferência de RNA. Inicialmente, RNAs fita única produzidos pela transcrição mediada pela RNA polimerase IV (RNAP IV) de DNA metilado são convertidos em RNA fita dupla (*double stranded RNAs* – dsRNA) pela RNA polimerase dependente de RNA (*RNA-dependent RNA polymerase 2* – RDR2). Esses RNAs são então processados pela DICER-LIKE 3 (DCL3), processo seguido pela HUA ENHANCER 1 (HEN1), que possui atividade metiltransferase, e então carregados nas argonautas (AGO). Esse complexo então interage com a maior subunidade da RNA polimerase V (RNAP V). Essa maquinaria toda é recrutada na sequência de DNA homóloga, permitindo a metilação pela DRM2. Além disso, a AGO4 também se liga, especificamente, a promotores de forma facilitada por longos RNAs não codificantes (*long noncoding RNA* – lncRNAs) derivados da RNAP IV. O recrutamento desse complexo guia a metilação assimétrica CpNpN em regiões promotoras, sendo importante na regulação da expressão gênica⁸⁶.

17.5.4 Relação entre epigenética e estresse

A metilação do DNA é controlada por fluxos hormonais, os quais são influenciados por diferentes fatores, entre eles estresses bióticos e abióticos⁸⁷, sendo que tais modificações podem contribuir para a adaptação do organismo⁸⁸. As condições ambientais têm impacto sobre um grande número de diferentes marcas e mecanismos genéticos e epigenéticos, incluindo a metilação do DNA, modificações das histonas ou de frequências de recombinação homóloga, bem como rearranjos genômicos^{76,88-91}. Estresses abióticos podem

causar tanto hipermetilação quanto hipometilação⁹²⁻⁹⁵, podendo ativar elementos transponíveis⁴⁰ de importância na adaptação ao estresse.

Estudos que mostram que plantas transmitem seus epialelos à progênie^{91,96-99} levam a crer que modificações epigenéticas possam ser ainda um novo nível para a herança fenotípica, sendo possível, inclusive, que tais modificações possam aumentar o potencial evolutivo de organismos em resposta ao estresse abiótico¹⁰⁰. Bräutigam et al.¹⁰¹, estudando espécies florestais, consideraram que a epigenética constitui-se numa importante fonte de características adaptativas de interesse para o melhoramento, biotecnologia e para conservação do ecossistema, especialmente considerando-se o atual contexto de rápidas mudanças climáticas.

O nível de citosinas metiladas já foi medido em progênies de plantas tratadas e não tratadas por duas gerações, mostrando que, em geral, a metilação do DNA parece decrescer durante a ausência de estresse¹⁰². O envolvimento de uma variante de histona (H2A.Z) mostrou-se responsável por mediar a adaptação a curto prazo à mudança de temperatura em *A. thaliana*¹⁰³, e a hipometilação e transposição de um elemento transponível (Tam-3) em resposta a estresse por frio foi observada em *Antirrhinum*¹⁰⁴. Já num estudo feito recentemente¹⁰⁵, foi verificado que é possível a metilação de regiões promotoras de alguns genes *ethylene response factors* (ERFs), uma família de genes frequentemente relacionada à adaptação a estresses, seja responsável pela modificação da expressão transcricional desses genes em condições de deficiência de oxigênio, impossibilitando o acesso de fatores de transcrição a determinados elementos *cis*.

17.6 REGULAÇÃO PÓS-TRANSCRICIONAL E ESTRESSE

A regulação pós-transcricional refere-se ao controle da expressão gênica no nível de RNA, ou seja, entre a transcrição e a tradução do gene¹⁰⁶. A quantidade de mRNA disponível para tradução pode ser afetada em diferentes etapas do processo de maturação, desde a transcrição ao *splicing*, do transporte ao início da tradução. Após produzida a estabilidade, a distribuição de diferentes transcritos é regulada por meio de RBP (*RNA binding proteins*) que controlam várias etapas posteriores à transcrição: *splicing alternativo*, degradação nuclear, processamento, exportação nuclear, entre outros. Essas proteínas realizam esse evento graças ao RRM (*RNA recognition motif*) que se liga a sequências específicas, tipicamente nas UTRs 5' e 3' dos transcritos.

Duas famílias principais de proteínas, as proteínas de ligação ao RNA e as helicases de RNA, determinam o destino dos pré-mRNAs e mRNAs pela regulação dos passos da transcrição até a tradução. As proteínas de ligação ao RNA ligam-se a moléculas de RNA imediatamente após a transcrição, constituindo os complexos mRNP (*mRNA-protein*), até a tradução¹⁰⁷. RNA helicases catalisam rearranjos estruturais, atuando como chaperonas e permitindo que as moléculas de RNA dobrem-se corretamente¹⁰⁸. Além disso, RNA helicases promovem a remoção das proteínas de ligação ao RNA antes da tradução¹⁰⁹.

A seguir, será feita uma descrição de alguns dos mais importantes eventos que influenciam a regulação gênica pós-transcricionalmente.

17.6.1 Capeamento

O capeamento (Figura 17.7) consiste na modificação da extremidade 5' do mRNA, a qual é gerada pela ligação 5'-5' trifosfato entre a extremidade 5' de uma molécula de mRNA precursora e um nucleotídeo alterado (guanosina monofosfato metilado – GMP metilado). O capeamento 5' é importante no processamento do RNA, transporte nuclear e iniciação da tradução¹¹⁰. Ele protege o mRNA da ação de ribonucleases e também é responsável por interagir com complexos proteicos que processam, exportam o mRNA para o citosol e promovem a ligação deste com os ribossomos.

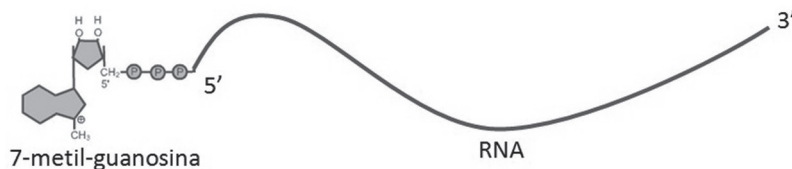


Figura 17.7 Ilustração do capeamento do RNA mensageiro com a colocação de uma 7-metil-guanosina na extremidade 5'.

17.6.2 Splicing

O *splicing* (Figura 17.8) é o processo de remoção dos íntrons depois da transcrição do RNA. O *splicing* só ocorre em eucariotos, já que procariotos não possuem íntrons. Este processo foi descoberto por Richard J. Roberts e Phillip A. Sharp, que receberam um prêmio Nobel em 1993 pela descoberta.

O responsável pelo *splicing* é o spliceossomo, um complexo de RNAs e proteínas que se liga de cada lado dos íntrons, faz um *looping* nas moléculas de RNA e as cliva, assim unindo as extremidades dos éxons. Um exemplo bem atual da importância do *splicing* é a influência do *timing* dessa modificação na disponibilidade de transcritos de genes de resposta inflamatória¹¹¹.

Aproximadamente 35% a 60% dos genes humanos¹¹², e 20% a 60% dos genes de plantas, sofrem o chamado *splicing alternativo*¹¹³. Esse evento pode levar a mudanças funcionalmente relevantes nas proteínas, formando diferentes polipeptídeos, com funções ou locais subcelulares também diferentes a partir de um mesmo gene. Dos diferentes tipos de *splicing alternativos* conhecidos, a “retenção de íntron” é o tipo mais comum em *Arabidopsis* e arroz^{114,115}.

Eventos de *splicing alternativo* parecem ocorrer preferencialmente em mRNAs de determinadas classes de genes normalmente envolvidos na transdução de sinal, ou que codificam enzimas, receptores e fatores de transcrição¹¹⁶. Em plantas, alguns fatores de transcrição sofrem *splicing* em resposta a condições ambientais¹¹⁷⁻¹¹⁹.

As “proteínas serina/arginina”, por exemplo, são uma classe de proteínas de ligação ao RNA, com papel no controle de *splicing*. Elas são conhecidas por promover o *splicing alternativo* dos seus próprios transcritos, bem como de outros^{120,121}. A regulação por *splicing alternativo* de genes cujos produtos, por sua vez, alteram o *splicing* de outros genes pode aumentar a cascata de transdução de sinal em resposta a estímulos estressores.

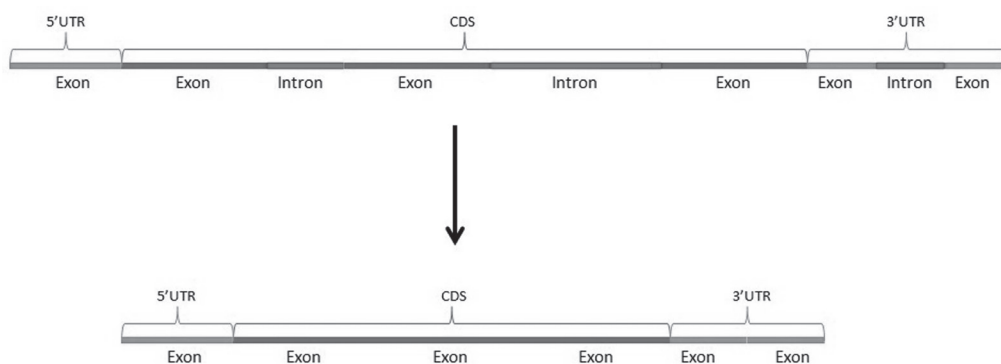


Figura 17.8 *Splicing* da molécula de RNA dando origem a uma molécula de mRNA madura, sem íntrons.

17.6.3 Poliadenilação

A poliadenilação (Figura 17.9) consiste na ligação de uma cauda poli(A) à molécula de RNA mensageiro. Nos eucariotos, a maioria das moléculas de RNA mensageiro termina com a cauda poliadenilada na extremidade 3', que é importante para a estabilidade do mRNA, promove a eficiência traducional do mRNA e tem papel no transporte do mRNA maduro do núcleo para o citoplasma¹²², sendo um importante passo na regulação pós-transcricional.

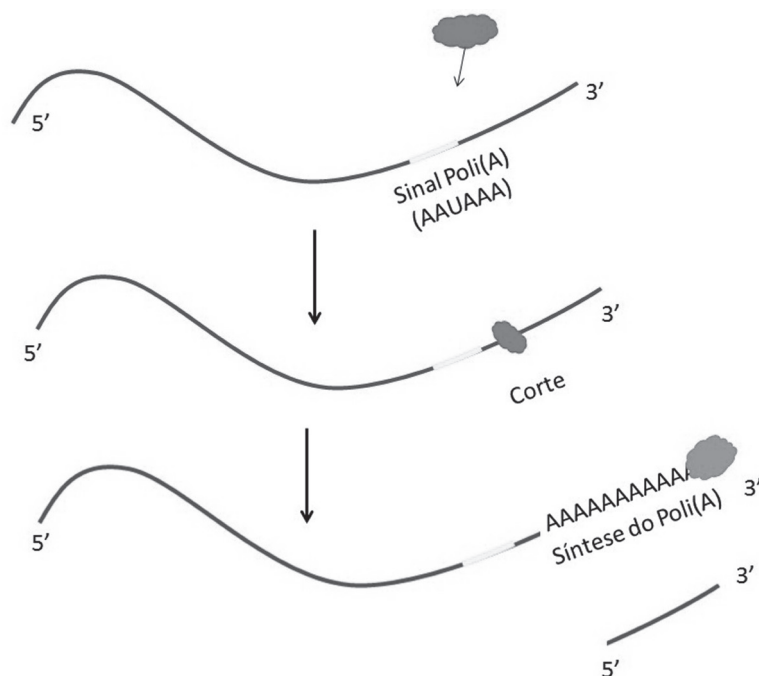


Figura 17.9 Processo de poliadenilação do mRNA. Após o reconhecimento do sinal de AAUAAA, a extremidade 3' é removida por um complexo enzimático, onde então se dará a síntese da cauda poli (A).

17.6.4 Edição de RNA

A edição de RNA (Figura 17.10) é um processo molecular em que algumas células conseguem fazer pequenas modificações na sequência de nucleotídeos de uma molécula de RNA após esta já ter sido gerada. A edição de RNA é relativamente rara, e formas comuns de processamento de RNA como *splicing*, capeamento 5' e poliadenilação não são vistas como formas

de edição de RNA. Esses eventos podem incluir a inserção, deleção e conversão de bases de nucleotídeos no interior da molécula de RNA editado, sendo uma forma importante de regulação pós-transcricional¹²³. O processo de edição de RNA tem importância não só no desenvolvimento do vegetal, mas também na resposta a estresses¹²⁴.

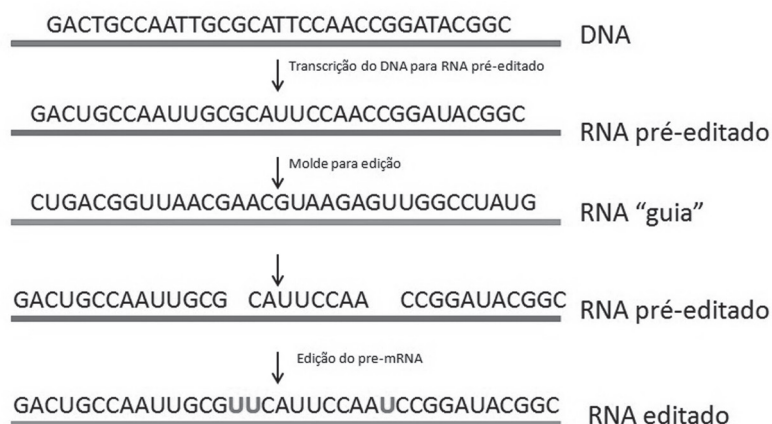


Figura 17.10 Etapas da edição de RNA.

17.6.5 Tráfego nuclear

As únicas vias de tráfego macromolecular entre o citoplasma e o núcleo são os poros nucleares e grandes complexos multiproteicos incorporados no envelope nuclear¹²⁵. Eles consistem em várias cópias de diferentes proteínas chamadas nucleoporinas. A regulação gênica em eucariotos requer a transdução de sinais do ambiente para o núcleo por meio de proteínas reguladoras específicas e a exportação de mRNAs e RNAs não codificantes do núcleo para o citoplasma. A exportação de mRNA requer uma RNA helicase e várias nucleoporinas, além das proteínas de ligação ao RNA¹²⁶. Já as proteínas chamadas carioferinas medeiam o transporte de outras proteínas e moléculas de RNA não codificantes através do envelope nuclear^{127,128}. As carioferinas reconhecem o sinal de localização nuclear de proteínas e ácidos nucleicos e formam um complexo heterotrimérico com estes. Este complexo é em seguida voltado para o poro nuclear através da interação direta de uma carioferina com nucleoporinas específicas, sendo então translocado para o núcleo¹²⁹.

O tráfego núcleo-citoplasmático é um evento regulado (Figura 17.11). Trabalhos recentes têm sugerido que nucleoporinas e carioferinas estejam envolvidas em muitos aspectos da vida vegetal, incluindo a resposta a estresse abiótico, por afetar a importação e a exportação nuclear^{125,130}.

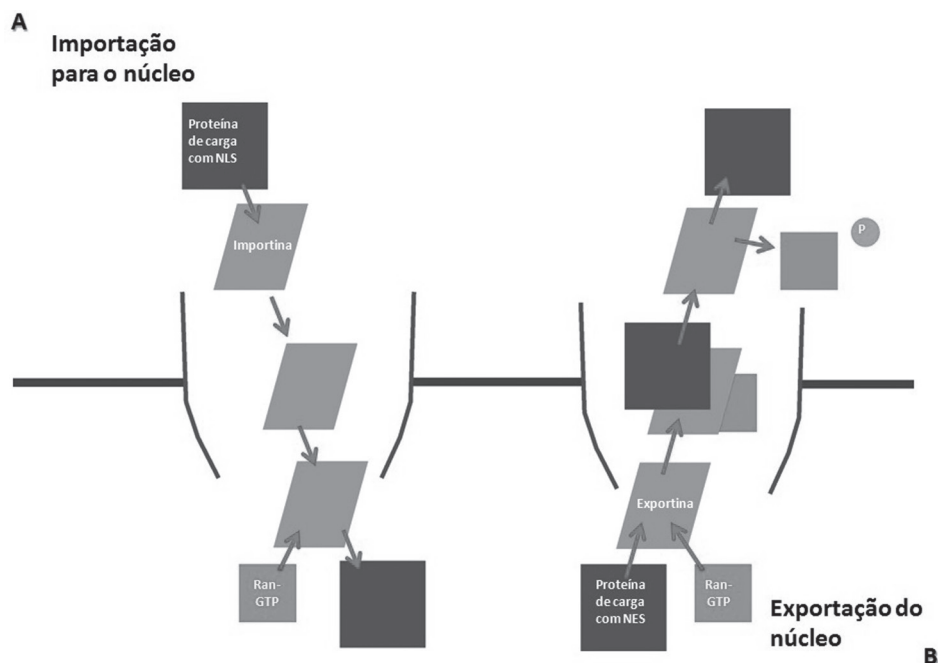


Figura 17.11 Tráfego macromolecular entre o citoplasma e o núcleo mediado por carioferinas chamadas (A) importinas (na importação) e (B) exportinas (na exportação). Mais informações podem ser encontradas no texto e nas referências.

17.6.6 natsiRNAs e miRNAs

O estudo dos microRNAs (miRNAs) e dos siRNAs endógenos tem demonstrado grande importância destes na rede de regulação de resposta a estresses nas plantas¹³¹. Esses pequenos RNAs não codificantes silenciam genes-alvos pós-transcricionalmente, quer orientando a degradação, quer reprimindo a tradução dos mRNAs-alvos^{132,133}.

A modificação da transcrição de miRNAs ocorre em resposta ao estresse^{131,134,135}, e miRNAs podem ainda causar mudanças das rotas de ubiquitinação de forma estresse dependente¹³⁶. Genomas eucarióticos contêm muitos genes sobrepostos, aproximadamente 10% dos genes de *Arabidopsis*,

são pares de genes convergentes sobrepostos, também conhecidos como pares de genes *cis*-antisense naturais^{137,138}. Apesar de sua importância funcional não ser conhecida, uma possibilidade intrigante é que transcritos sobrepostos em orientação antisense formem RNAs de fita dupla que podem ser transformados em siRNAs. Estes, assim chamados nat-siRNAs (*natural antisense transcripts-generated siRNAs*) surgiram como importantes atores na resposta vegetal a estresses¹³⁹. Um resumo das etapas das rotas de silenciamento por RNA é apresentado na Figura 17.12.

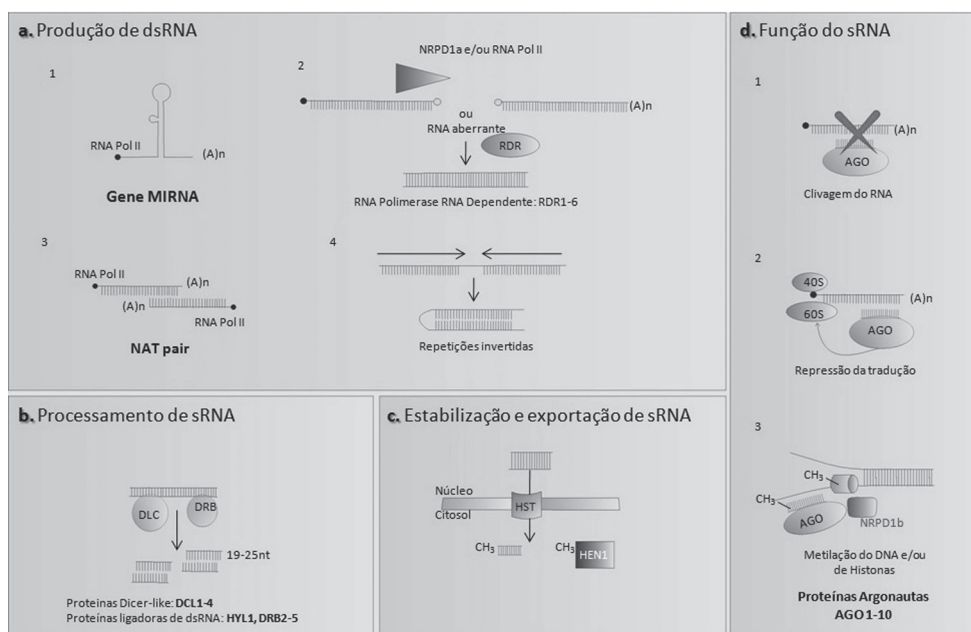


Figura 17.12 Etapas das rotas de silenciamento por RNA. (a) Várias fontes de RNAs dupla-fita (dsRNA) (b) processados em pequenos RNAs (sRNAs) por uma ou quatro *dicer-like proteins* (DCLs) com a assistência de *dsRNA-binding proteins*; (c) estabilização do sRNA mediada por HUA ENHANCER 1 (HEN1) e exportação por HASTY (HST); (d) forma de operação do sRNA. Figura modificada de Ruiz-Ferrer e Voinnet (2009)⁸³.

17.7 REGULAÇÃO PÓS-TRADUCIONAL E ESTRESSE

A resposta molecular das plantas ao estresse abiótico é um processo complexo, e se dá principalmente com base na modulação da atividade transcricional; entretanto, como já vimos, outros mecanismos pós-transcricionais baseados em *splicing* alternativo, processamento de RNA, bem como

silenciamento de RNA, podem também modificar a resposta vegetal a estresses. A regulação pós-traducional refere-se ao controle dos níveis de proteína ativa através de modificações desta após a sua formação/tradução, como foi visto no caso das histonas (metilação, acetilação). Além de fosforilação de proteínas, outras modificações pós-traducionais, como ubiquitinação e sumoilação, podem também regular a ativação de moléculas preexistentes para garantir uma resposta rápida a estresses¹⁴⁰.

17.7.1 Ubiquitinação e degradação responsiva a estresse

A ubiquitinação é a ligação covalente de uma pequena proteína chamada ubiquitina às proteínas-alvos¹⁴¹. A fixação da ubiquitina é mediada pela ação conjunta de três enzimas: enzima de ativação da ubiquitina (E1), enzima de conjugação da ubiquitina (E2) e a ubiquitina-ligase (E3), sendo que esta última é responsável pela especificidade da ubiquitinação¹⁴². A adição de uma cadeia multiubiquitina geralmente marca proteínas para degradação intracelular através do proteossoma 26S (Figura 17.13), uma protease de subunidades múltiplas dependente de ATP, cuja principal função é a degradação por proteólise. Entre as proteínas marcadas para degradação estão as com dobramento incorreto e proteínas que não são mais necessárias para a célula. A monoubiquitinação, entretanto, pode regular o reparo do DNA, função de histonas, expressão gênica, entre outros processos¹⁴³.

Uma série de estudos tem hipotetizado que a degradação de proteínas seja dependente de ubiquitina nos mecanismos de sinalização e resposta a estresse^{144,145}. Análises de transcriptomas e proteomas, realizadas em diferentes espécies vegetais submetidas à exposição de estresses abióticos, indicou que centenas de transcritos/proteínas relacionados à ubiquitinação são modificados durante a resposta ao estresse, sugerindo importância da ubiquitinação na determinação da tolerância ao estresse^{142,146-148}.

Variações nas atividades de ligase E3 podem ser alcançadas através de alterações na expressão dos seus correspondentes mRNAs¹⁴², na indução de variantes de *splicing*^{119,149}, silenciamento mediado por miRNA¹³¹ e fosforilação¹⁵⁰. Além disso, dado que a ubiquitinação e a sumoilação reconhecem a mesma lisina, a sumoilação pode impedir a degradação da proteína, impedindo a ligação de ubiquitina¹⁵¹. A atividade de ligase E3 também pode ser aumentada por alterações conformacionais devido à ligação de determinadas moléculas. A interação de moléculas de auxina, jasmonato ou giberelina, que são hormônios reguladores do crescimento e desenvolvimento de plantas,

com o receptor *F-box*, provoca uma mudança conformacional no complexo ligase E3 correspondente, resultando na ativação da enzima e subsequente degradação de proteínas-alvo¹⁵²⁻¹⁵⁴.

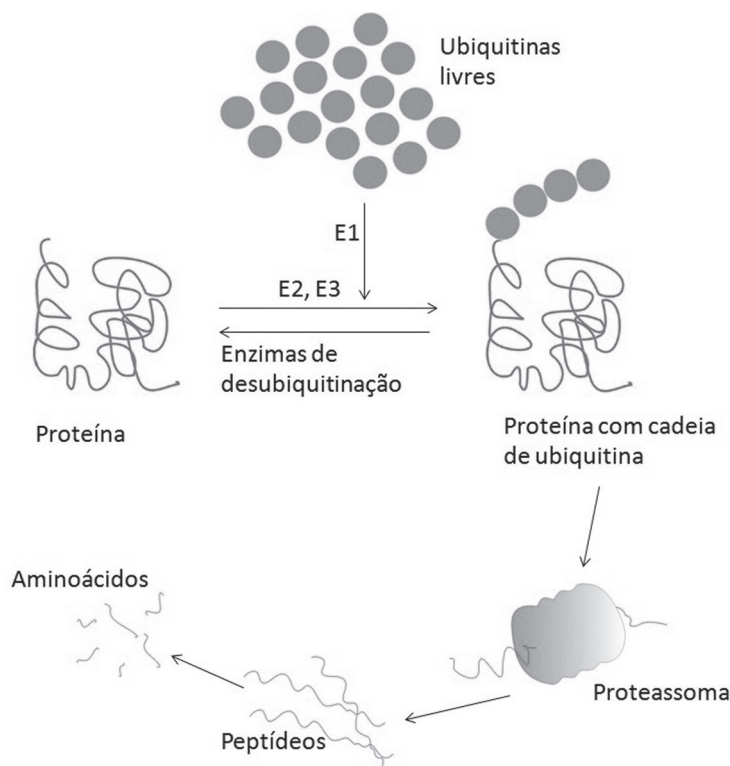


Figura 17.13 Adição de cadeia multiubiquitina e degradação de proteínas pelo proteassoma.

17.7.2 Sumoilação na resposta a estresse

A sumoilação é uma modificação pós-traducional reversível com base na conjugação covalente do peptídeo SUMO (*small ubiquitin-like modifier*)¹⁵⁵. Os passos de conjugação são semelhantes àqueles que operam na via de ubiquitinação. Em contraste com a maioria dos sistemas de conjugação de ubiquitina, que dependem de ligases E3 para reconhecimento específico das proteínas-alvo, as enzimas E2 e E3 da maquinaria de sumoilação atuam em muitas proteínas diferentes.

A sumoilação altera a função da proteína mascarando ou adicionando superfícies de interação, bem como através da indução de alterações conformacionais. Uma grande variedade de efeitos biológicos da sumoilação foram observados, incluindo realocização subcelular, alterações na atividade enzimática e proteção da degradação mediada por ubiquitina. A conjugação ao SUMO pode promover ou reprimir a transcrição através da importação nuclear de fatores de transcrição. SUMO pode influenciar a montagem (*assembly*) de fatores de transcrição em promotores ou o recrutamento de enzimas modificadoras da cromatina, acima de tudo, quando associada à repressão da transcrição¹⁵⁶.

Análises de perda e ganho de função, bem como o padrão de SUMO-conjugados revelou um papel essencial da sumoilação em plantas em resposta a sinais ambientais. A análise de expressão em larga escala do genoma de *Arabidopsis* identificou 300 de 1.700 sequências induzidas por seca, cuja indução é mediada pelo SUMO E3 ligase SIZ1¹⁵⁷. Mutantes *siz1* de *Arabidopsis*, por exemplo, são menos tolerantes a estresses¹⁵⁷⁻¹⁶⁰.

17.8 COMBINAÇÃO DE REDES REGULATÓRIAS

Existe uma rede combinatória de regulação transcricional, pós-transcricional e pós-traducional, existindo ações recíprocas entre os diferentes tipos de regulação gênica (Figura 17.14). Assim, uma crescente variedade de mecanismos de interação que moldam o transcriptoma e o proteoma, contribuindo para o ajuste fino do metabolismo celular, vem se revelando.

17.9 TÉCNICA

Como relatado no início deste capítulo, várias técnicas podem ser utilizadas para a quantificação da expressão transcricional. Tais técnicas estão descritas e disponíveis na literatura²⁷⁻³⁵, e o mesmo ocorre para outras técnicas de interesse no estudo da regulação gênica e para análise de modificações epigenéticas. O número de técnicas disponíveis é tão grande que livros inteiros são escritos somente para descrever alguns grupos delas¹⁶¹⁻¹⁶³. As técnicas utilizadas devem ser escolhidas de acordo com o objetivo específico do estudo em questão. Novas técnicas surgem constantemente, oferecendo novas possibilidades de estudo, ou tornando outras obsoletas devido ao aumento de precisão, de espectro, ou pela diminuição dos custos.

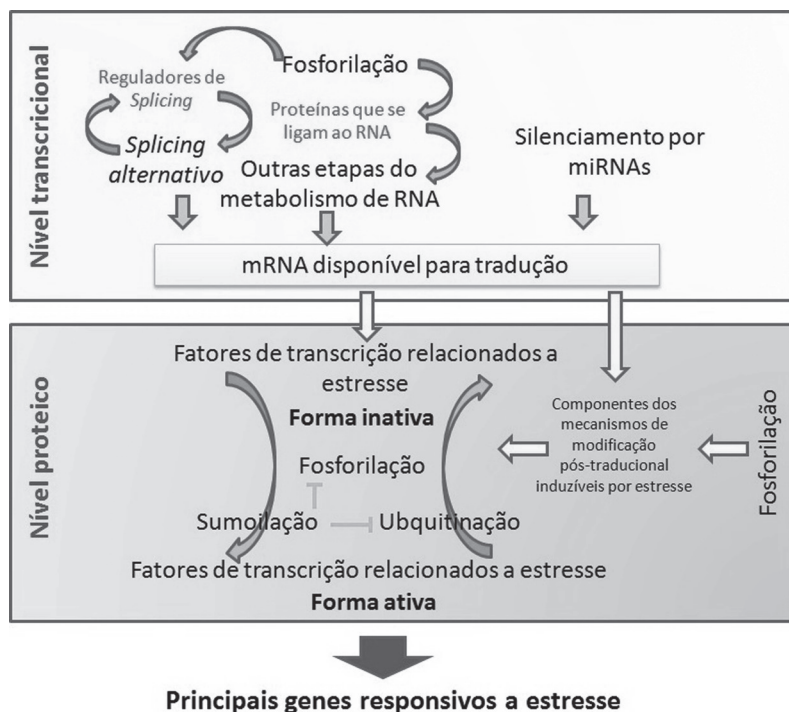


Figura 17.14 Modelo do *cross-talking* entre formas de regulação pós-transcricional e pós-traducional envolvidas no controle da resposta vegetal a estresse. Figura modificada de Mazzucotelli et al. (2008)¹⁴⁰.

Em função da variedade de técnicas existentes e da impossibilidade de descrevê-las em detalhes, optou-se pela descrição de uma técnica de análise epigenética que vem sendo bastante utilizada: a conversão de citosinas não metiladas com bissulfito de sódio seguida de sequenciamento. Tal técnica tem variações, podendo ser feita utilizando-se materiais diferentes; assim sendo, salienta-se aqui que os materiais e empresas citados não devem ser obrigatoriamente utilizados como parte do protocolo, servindo apenas de exemplo.

A conversão seguida de sequenciamento consiste no tratamento do DNA com bissulfito de sódio, que é capaz de realizar uma modificação química no DNA (Figura 17.14) convertendo citosinas não metiladas em uracilas, as quais podem ser substituídas por timinas na replicação (*in vitro* ou *in vivo*). As diferenças entre as sequências podem ser analisadas por sequenciamento, indicando diferenças de metilação entre diferentes moléculas de DNA tratadas com bissulfito.

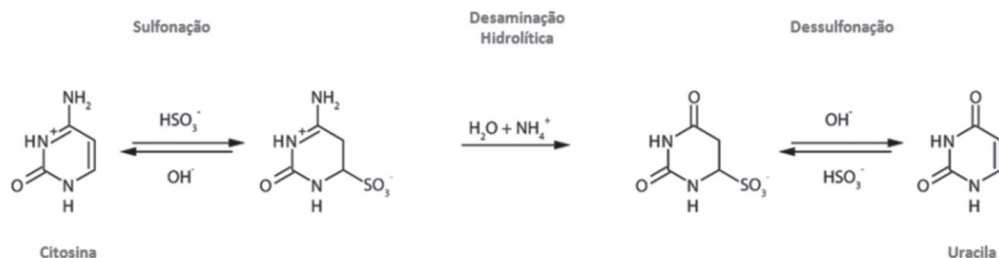


Figura 17.15 Conversão de citosinas não metiladas em uracilas, por meio do uso de bissulfite de sódio.

Protocolo

- **Conversão de citosinas em uracilas:** a conversão de citosinas não metiladas em uracilas pode ser feita com a utilização de diferentes kits comerciais disponíveis, como, por exemplo, o EpiTect Bisulfite Kit (QiagenTM).
- **Amplificação da região de interesse:** a amplificação da região de interesse pode ser feita utilizando oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) desenhados com a utilização de programas computacionais específicos para isto, como o Methyl Primer Express[®] (Applied BiosystemsTM) ou o Kismeth¹⁶⁴. As condições da reação de amplificação dependerão basicamente dos *primers*, tamanho do fragmento e da *Taq* DNA polimerase utilizada.
- **Corrida em gel e purificação do fragmento:** após a amplificação, o fragmento é corrido em gel e purificado utilizando kits comerciais, como, por exemplo, o PureLink Quick Gel Extraction Kit (InvitrogenTM). O fragmento purificado servirá para clonagem em vetor apropriado e multiplicação em *E. coli* DH5 α ou TOP10.
- **Preparo de células competentes**
 - 1) Em uma placa estéril, adicionar 20 mL de Luria broth (LB) sólido diluído.
 - 2) Deixar polimerizar e estriar uma alíquota de células *E. coli* cepa TOP10 ou DH5 α .
 - 3) Incubar a 37 °C durante 18 horas. Selecionar uma colônia e colocá-la em um frasco com 3 mL de LB líquido.

- 4) Incubar a 37 °C sob agitação durante 18 horas (pré-inóculo).
 - 5) Adicionar o pré-inóculo em um frasco com 250 mL de LB líquido.
 - 6) Incubar a 37 °C sob agitação durante 2 a 3 horas, até atingir densidade ótica (D.O) de 0,4-0,6.
 - 7) Manter o frasco em gelo durante 30 minutos (para cessar o crescimento bacteriano).
 - 8) Colocar em frascos especiais para centrifugação.
 - 9) Centrifugar a 4.000 g durante 10 minutos.
 - 10) Descartar o sobrenadante e proceder à lavagem com 20 mL de água apirogênica estéril gelada (agitar até dissolver o precipitado).
 - 11) Centrifugar a 4.000 g durante 10 minutos.
 - 12) Descartar o sobrenadante e proceder lavagem com 20 mL de água apirogênica estéril gelada (agitar até dissolver o precipitado).
 - 13) Centrifugar a 4.000 g durante 10 minutos.
 - 14) Descartar o sobrenadante e proceder lavagem com 20 mL de água acrescida de 10 % de glicerol estéril gelada (agitar até dissolver o precipitado).
 - 15) Centrifugar a 4.000 g durante 10 minutos.
 - 16) Descartar o sobrenadante.
 - 17) Dissolver o precipitado com 250 µL de água acrescida de 10% de glicerol estéril gelada.
 - 18) Fazer alíquotas com 100 µL cada.
 - 19) Proceder à transformação (as demais, armazenar a -70 °C).
- **Reação de ligação vetor com amplicon:** pode-se seguir o protocolo original do produto (por exemplo, TOPO®-TA 2.0), ou alternativamente executar a seguinte reação, a qual é mais econômica: 0,5 µL de vetor de clonagem (15 ng.µL⁻¹ a 20 ng.µL⁻¹); 1,0 µL de produto de PCR (20 ng.µL⁻¹); 0,5 µL de solução salina diluída (1:4 solução salina:água); 1,0 µL de água. Deixar em temperatura ambiente durante 1 hora. Observação: pode-se colocar até duas vezes mais produto de PCR com relação ao vetor.
 - **Transformação*:**
 - 1) Adicionar 1 µL de reação de ligação em 100 µL de células competentes.
 - 2) Colocar em cubeta de 2 mm.
 - 3) Proceder ao choque (25 µF, 200 Ω, 2.500 V).

* Fazer também amostra controle utilizando pUC19, para checar qualidade das células.

- 4) Acrescentar 400 mL de meio LB líquido.
- 5) Incubar a 37 °C sob agitação durante 1 hora.

- **Preparo de placas para vetor TOPO®-TA 2.0:** colocar em cada placa 20 mL de LB sólido diluído acrescido de 20 µL de canamicina (50 mg.mL⁻¹) – Vetor TOPO confere resistência a canamicina; 20 µL de 5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactosídeo (X-Gal, 40 mg.mL⁻¹); 60 µL de Isopropil β-D-1-tiogalactopiranosídeo (IPTG, 100 mM). Preparar 3 placas por amostra (plaquear as bactérias em concentração adequada) e incubar a 37 °C durante 18 horas.

- **Extração de DNA plasmidial:**

- 1) Crescer *Escherichia coli* em cultura líquida a 37 °C.
- 2) 1,5 mL de cultura líquida.
- 3) Centrifugar 10 min em velocidade máxima.
- 4) 300 µL de solução I + 5 µL de Rnase (10 mg.mL⁻¹) → Vortexar bem para ressuspender todo o precipitado.
- 5) 300 µL de solução II; misturar levemente invertendo o tubo (não dar vórtex).
- 6) Deixar 5 minutos à temperatura ambiente.
- 7) 300 µL de solução III.
- 8) Centrifugar 5 minutos em máxima velocidade.
- 9) Coletar o líquido em um microtubo limpo e adicionar 640 µL de isopropanol a cada 800 µL de líquido.
- 10) Centrifugar 20 minutos.
- 11) Remover o máximo possível do isopropanol, com pipeta.
- 12) Lavar o precipitado com etanol 70%.
- 13) Secar bem, com pipeta, dando um *spin* (rápida centrifugação para decantar todo o líquido nos tubos) e pipetando novamente.
- 14) Deixar secar 10 minutos em temperatura ambiente.
- 15) Ressuspender em 20 µL de água ultra pura estéril.
- 16) Aplicar 5 µL em gel de agarose 1% para verificar concentração e pureza.
- 17) Fazer PCR utilizando os iniciadores específicos para verificar a inserção do fragmento de interesse no vetor TOPO.

Tabela 17.1 Preparo das soluções para o Miniprep

SOLUÇÃO I	SOLUÇÃO II	SOLUÇÃO III
Glicose 50 mM	Dodecil sulfato de sódio (SDS) 1%	60 mL de acetato e potássio 5M
Ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) pH 8,0 10 mM	NaOH 0,2 N	11,5 mL de ácido acético glacial
TRIS pH 8,0 25 mM		28,5 mL água ultrapura estéril

Verificar quantidade e integridade do DNA em gel de agarose e espectrofotômetro e enviar as amostras para sequenciamento a fim de verificar a integridade do fragmento inserido.

- **Análise dos resultados de sequenciamento:** a análise dos resultados de sequenciamento pode ser feita por diferentes programas, entre eles, o Kismeth¹⁶⁴.

17.10 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS

O controle transcricional e a rede de modificações pós-transcricionais e pós-traducionais asseguram temporal e espacialmente padrões apropriados de expressão gênica ao longo do desenvolvimento vegetal e frente a estresses.

Intensificadores e outros elementos regulatórios constituem intermediários-chaves nas redes regulatórias e, para entendê-las, é essencial decifrar as complexas relações entre fatores de transcrição e elementos *cis* regulatórios, bem como a contribuição destes para a expressão gênica. A ação combinatória de múltiplos fatores de transcrição constitui característica chave para interconexão de redes de regulação gênica¹⁷.

Nesse sentido, avanços técnicos marcantes em transcriptômica e metabolômica estão disponíveis para ajudar no entendimento das respostas moleculares a estresses, e as chamadas “análises ômicas” são importantes ferramentas para alcançar esse objetivo. A integração entre metaboloma e transcriptoma revela que muitas importantes rotas metabólicas são reguladas em nível transcricional, já outras são reguladas em nível pós-transcricional, traducional, pós-traducional ou por mecanismos de *feedback*. É importante lembrar que metabólitos não só têm papel funcional direto na tolerância a estresse, mas ainda agem como moléculas sinalizadoras, o que

reforça a necessidade de análises “ômicas” integradas para identificar as funções de redes regulatórias de metabólitos a estresses¹⁶⁵.

A regulação pós-transcricional por RNAs não codificantes (*non-coding RNA* – ncRNAs) como sRNAs e RNAs antissenso (*antisense RNA* – asRNA) se tornaram mais bem compreendidas com recentes avanços em análises de transcriptomas inteiros. Essas análises incluem o uso de microarranjos de alta densidade e técnicas que usam sequenciamento de nova geração, como o *RNA-seq*.

O próximo grande desafio do *RNA-seq* é o sequenciamento de transcriptomas mais complexos, identificar mudanças de expressão de raras isoformas de RNA de todos os genes. Vale lembrar que a constante diminuição dos custos de sequenciamento deverá fazer com que o *RNA-seq* substitua completamente o microarranjo para muitas aplicações que envolvam a determinação da estrutura e dinâmica do transcriptoma.

Notavelmente, as proteínas de ligação ao RNA estão envolvidas em todos os aspectos da regulação das moléculas de RNA, tais como transcrição, *splicing*, e estabilização. Analisar a função dessas proteínas é essencial para compreender os mecanismos de regulação do RNA em resposta a estresses. A identificação e análise de fatores que interagem com essas proteínas irão ajudar a revelar a estrutura e mecanismo de ação de complexos reguladores de RNA⁸⁴.

Apesar dos muitos estudos relacionando a metilação de DNA e a resposta a estresses bióticos e abióticos, muitas perguntas continuam sem solução nesse campo, incluindo a forma como as plantas detectam o estresse, como ativam mecanismos de adaptação e como agem os componentes das vias de metilação. Análises de componentes regulatórios envolvidos na metilação/desmetilação em mutantes deram pistas sobre parte desses processos epigenéticos, mas uma investigação completa é necessária para sua melhor compreensão.

Com genoma relativamente pequeno em relação às demais espécies e protocolos de análise bem delineados, o arroz e *Arabidopsis* ainda são as plantas mais fáceis para se estudar das modificações epigenéticas. Compreender os mecanismos epigenéticos de resposta a estresses ambientais e sua provável aplicação na manipulação genética de plantas é um grande desafio. Dados de diversos metilomas obtidos com novas técnicas de sequenciamento poderão ser usados para selecionar alvos para transformação genética; assim, epialelos descobertos em diferentes estudos poderão ser explorados por programas de melhoramento genético de plantas. Passos iniciais desse processo envolvem a determinação dos padrões de metilação entre os indivíduos na

população selecionada, seguida de exame de padrões de metilação significativos na expressão de diferentes fenótipos. Lembramos que plantas transgênicas de valor comercial, especialmente de arroz, devem ao mesmo tempo possuir produtividade relativamente alta e manter outras características importantes à agricultura em conjunto com a característica de tolerância a determinados estresses.

REFERÊNCIAS

1. Alexandratos N, Bruinsma J. World agriculture towards 2030/2050: the 2012 revision Rome 2012 [Internet]. [Cited 2013 August 27]. Available from: http://www.fao.org/fileadmin/templates/esa/Global_perspectives/world_ag_2030_50_2012_rev.pdf.
2. Fischer RA, Byerlee D, Edmeades GO. Can Technology Deliver On The Yield Challenge to 2050? 2009 [Internet]. [Cited 2013 August 17]. Available from: <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/012/ak977e/ak977e00.pdf>.
3. Kimura M. The neutral theory of molecular evolution – a review of recent-evidence. *Japanese Journal of Genetics*. 1991;66(4):367-86.
4. Masel J. Genetic drift. *Current Biology*. 2011;21(20):R837-R8.
5. Hastings PJ, James RL, Susan MR, Grzegorz I. Mechanisms of change in gene copy number. *Nature Reviews Genetics*. 2009;10(8):551.
6. Rastogi S, Liberles DA. Subfunctionalization of duplicated genes as a transition state to neofunctionalization. *BMC Evolutionary Biology*. 2005;5.
7. Harrison PM, Gerstein M. Studying Genomes Through the Aeons: Protein Families, Pseudogenes and Proteome Evolution. *Journal of Molecular Biology*. 2002;318(5):1155-74.
8. Eyre-walker A, Keightley PD. The distribution of fitness effects of new mutations. *Nature Reviews Genetics*. 2007;8(8):610.
9. Coulon A, Chow CC, Singer RH, Larson DR. Eukaryotic transcriptional dynamics: from single molecules to cell populations. *Nature Reviews Genetics*. 2013;14(8):572-84.
10. Slack JMW. Conrad Hal Waddington: the last Renaissance biologist? *Nature Reviews Genetics*. 2002;3(11):889.
11. Brasset E, Chambeyron S. Epigenetics and transgenerational inheritance. *Genome Biology*. 2013;14:306.
12. Ahmed F. Epigenetics: Tales of adversity. *Nature*. 2010;468(7327):S20.
13. Lyko F, Foret S, Kucharski R, Wolf S, Falckenhayn C, Maleszka R. The Honey Bee Epigenomes: Differential Methylation of Brain DNA in Queens and Workers. *PLoS Biology*. 2010;8(11).
14. Choudhuri S. Gene regulation and molecular toxicology. *Toxicology Mechanisms and Methods*. 2004;15(1):1.
15. Spilianakis CG, Lalioti MD, Town T, Lee GR, Flavell RA. Interchromosomal associations between alternatively expressed loci. *Nature*. 2005;435(7042):637-45.
16. Rose AB. Intron-mediated regulation of gene expression. *Current Topics in Microbiology and Immunology*. 2008;326:277-90.
17. Spitz F, Furlong EEM. Transcription factors: from enhancer binding to developmental control. *Nature Reviews Genetics*. 2012;13(9):613.

18. Lee TI, Young RA. Transcription of eukaryotic protein- coding genes. *Annual Review of Genetics*. 2000;34:77.
19. Schoenfelder S, Clay I, Fraser P. The transcriptional interactome: gene expression in 3D. *Current Opinion in Genetics & Development*. 2010;20(2):127-33.
20. Kaufmann K, Pajoro A, Angenent GC. Regulation of transcription in plants: mechanisms controlling developmental switches. *Nature Reviews Genetics*. 2010;11(12):830.
21. Babu MM, Luscombe NM, Aravind L, Gerstein M, Teichmann SA. Structure and evolution of transcriptional regulatory networks. *Current Opinion in Structural Biology*. 2004;14(3):283-91.
22. Yu HY, Gerstein M. Genomic analysis of the hierarchical structure of regulatory networks. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2006;103(40):14724-31.
23. Farnham PJ. Insights from genomic profiling of transcription factors. *Nature Reviews Genetics*. 2009;10(9):605.
24. Singh KB, Foley RC, Oñate-Sánchez L. Transcription factors in plant defense and stress responses. *Current Opinion in Plant Biology*. 2002;5(5):430-6.
25. Ljungman M. The transcription stress response. *Cell Cycle*. 2007;6(18):2252-7.
26. Nadal ED, Ammerer G, Posas F. Controlling gene expression in response to stress. *Nature Reviews Genetics*. 2011;12(12):833.
27. Smale ST. Nuclear run-on assay. *Cold Spring Harbor Protocols*. 2009 Nov;2009(11):pdb.prot5329.
28. Carey MF, Peterson CL, Smale ST. The RNase protection assay. *Cold Spring Harbor Protocols*. 2013 Mar;2013(3):pdb.prot071910.
29. Tummala P, Mali RS, Guzman E, Zhang X, Mitton KP. Temporal ChIP-on- Chip of RNA- Polymerase- II to detect novel gene activation events during photoreceptor maturation. *Molecular Vision*. 2010;16(31-32):252-71.
30. Sealfon SC, Chu TT. RNA and DNA microarrays. *Methods in Molecular Biology*. 2011:3-34.
31. Yoon JH, Srikantan S, Gorospe M. MS2-TRAP (MS2- tagged RNA affinity purification): Tagging RNA to identify associated miRNAs. *Methods*. 2012;58(2):81-7.
32. O'Connor C. Fluorescence *in situ* hybridization. *Nature Education*. 2008;1(1).
33. Bhardwaj AR, Pandey R, Agarwal M, Katiyar-Agarwal S. Northern blot analysis for expression profiling of mRNAs and small RNAs. *Methods in Molecular Biology*. 2012:26.
34. Wang Z, Gerstein M, Snyder M. RNA- Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nature Reviews Genetics*. 2009;10(1):57.
35. Wong ML, Medrano JF. Real-time PCR for mRNA quantitation. *Biotechniques*. 2005:75-85.

36. Richards EJ. Inherited epigenetic variation – revisiting soft inheritance. *Nature Reviews Genetics*. 2006;7(5):395.
37. Richards CL, Bosssdorf O, Pigliucci M. What Role Does Heritable Epigenetic Variation Play in Phenotypic Evolution? *Bioscience*. 2010;60(3):232-7.
38. Vanyushin BF, Ashapkin VV. DNA methylation in higher plants: past, present and future. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2011;1809:360-8.
39. Sahu P, Pandey G, Sharma N, Puranik S, Muthamilarasan M, Prasad M. Epigenetic mechanisms of plant stress responses and adaptation. *Plant Cell Reports*. 2013;32(8):1151-9.
40. Steward N, Kusano T, Sano H. Expression of ZmMET1, a gene encoding a DNA methyltransferase from maize, is associated not only with DNA replication in actively proliferating cells, but also with altered DNA methylation status in cold-stressed quiescent cells. *Nucleic Acids Research*. 2000;28(17):3250.
41. Karlsson M, Weber W, Fussenegger M. *De novo* design and construction of an inducible gene expression system in mammalian cells. *Methods in Enzymology*. 2011:239-53.
42. Lindroth AM, Cao XF, Jackson JP, Zilberman D, McCallum CM, Henikoff S, et al. Requirement of Chromomethylase3 for maintenance of CpXpG methylation. *Science*. 2001;292(5524):2077-80.
43. Tompa R, McCallum CM, Delrow J, Henikoff JG, van Steensel B, Henikoff S. Genome- Wide Profiling of DNA Methylation Reveals Transposon Targets of Chromomethylase 3. *Current Biology*. 2002;12(1):65-8.
44. Cao X, Aufsatz W, Zilberman D, Mette MF, Huang MS, Matzke M, et al. Role of the DRM and CMT3 Methyltransferases in RNA – Directed DNA Methylation. *Current Biology*. 2003;13(24):2212-7.
45. Cao X, Jacobsen SE. Role of the Arabidopsis DRM Methyltransferases in *de novo* DNA Methylation and Gene Silencing. *Current Biology*. 2002;12(13):1138-44.
46. Wada Y, Ohya H, Yamaguchi Y, Koizumi N, Sano H. Preferential *de novo* methylation of cytosine residues in non- CpG sequences by a domains rearranged DNA methyltransferase from tobacco plants. *The Journal of Biological Chemistry*. 2003;278(43):42386.
47. Kankel MW, Ramsey DE, Stokes TL, Flowers SK, Haag JR, Jeddeloh JA, et al. Arabidopsis MET1 cytosine methyltransferase mutants. *Genetics*. 2003;163(3):1109.
48. Zhu JH, Kapoor A, Sridhar VV, Agius F, Zhu JK. The DNA glycosylase/ lyase ROS1 functions in pruning DNA methylation patterns in Arabidopsis. *Current Biology*. 2007;17(1):54-9.
49. Penterman J, Zilberman D, Huh JH, Ballinger T, Henikoff S, Fischer RL. DNA demethylation in the Arabidopsis genome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2007;104(16):6752-7.

50. Schafer A, Karaulanov E, Stapf U, Doderlein G, Niehrs C. Ing1 functions in DNA demethylation by directing Gadd45a to H3K4me3. *Genes & Development*. 2013;27(3):261-73.
51. Franchini D-M, Schmitz K-M, Petersen-Mahrt SK. 5- Methylcytosine DNA Demethylation: More Than Losing a Methyl Group.(Report). *Annual Review of Genetics*. 2012;46:419.
52. Zemach A, McDaniel IE, Silva P, Zilberman D. Genome-wide evolutionary analysis of eucaryotic DNA methylation. *Science*. 2010;916-9.
53. Zhang XY, Yazaki J, Sundaresan A, Cokus S, Chan SWL, Chen HM, et al. Genome-wide high-resolution mapping and functional analysis of DNA methylation in *Arabidopsis*. *Cell*. 2006;126(6):1189-201.
54. Gehring M, Henikoff S. DNA methylation dynamics in plant genomes. *BBA – Gene Structure and Expression*. 2007;1769(5):276-86.
55. Zilberman D, Gehring M, Tran RK, Ballinger T, Henikoff S. Genome-wide analysis of *Arabidopsis thaliana* DNA methylation uncovers an interdependence between methylation and transcription. *Nature Genetics*. 2007;39(1):61-9.
56. Vasquero A, Loyola A, Reinberg D. The Constantly Changing Face of Chromatin. *Science of Aging Knowledge Environment*. 2003;2003:RE4.
57. Cosgrove MS, Boeke JD, Wolberger C. Regulated nucleosome mobility and the histone code. *Nature Structural & Molecular Biology*. 2004;11(11):1037-43.
58. Kouzarides T. Chromatin modifications and their function. *Cell*. 2007;128:693-705.
59. Kimura H. Histone modifications for human epigenome analysis. *Journal of Human Genetics*. 2013;439-45.
60. Cloos PAC, Christensen J, Agger K, Helin K. Erasing the methyl mark: histone demethylases at the center of cellular differentiation and disease. *Genes & Development*. 2008;22(9):1115-40.
61. Turck F, Roudier F, Farrona S, Martin-Magniette ML, Guillaume E, Buisine N, et al. *Arabidopsis* TFL2/ LHP1 specifically associates with genes marked by trimethylation of histone H3 lysine 27. *PLoS Genetics*. 2007;3(6):855-66.
62. Zhang XY, Clarenz O, Cokus S, Bernatavichute YV, Pellegrini M, Goodrich J, et al. Whole- genome analysis of histone H3 lysine 27 trimethylation in *Arabidopsis*. *PLoS Biology*. 2007;5(5):1026-35.
63. Shahbazian MD, Grunstein M. Function of site-specific histone acetylation and deacetylation. *Annual Review of Biochemistry*. 2007:75-100.
64. Grunstein M. Histone acetylation in chromatin structure and transcription. *Nature*. 1997;389(6649):349.
65. Houbena A, Demidova D, Capertab AD, Karimia R, Aguecia F, Vlasenko L. Phosphorylation of histone H3 in plants—A dynamic affair. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2007;1769:308-15.

66. Zhou DX. Regulatory mechanism of histone epigenetic modifications in plants. *Epigenetics*. 2009;4(1):15-8.
67. Huang LM, Sun QW, Qin FJ, Li C, Zhao Y, Zhou DX. Down- regulation of a SILENT INFORMATION REGULATOR2- related histone deacetylase gene, OsSRT1, induces DNA fragmentation and cell death in rice. *Plant Physiology*. 2007;144(3):1508-19.
68. Pandey R, Müller A, Napoli CA, Selinger DA, Pikaard CS, Richards EJ, et al. Analysis of histone acetyltransferase and histone deacetylase families of *Arabidopsis thaliana* suggests functional diversification of chromatin modification among multicellular eukaryotes. *Nucleic Acids Research*. 2002;30(23):5036.
69. Jackson JP, Lindroth AM, Cao XF, Jacobsen SE. Control of CpNpG DNA methylation by the Kryptonite histone H3 methyltransferase. *Nature*. 2002;416(6880):556-60.
70. Ebbs ML, Bartee L, Bender J. H3 Lysine 9 Methylation Is Maintained on a Transcribed Inverted Repeat by Combined Action of SUVH6 and SUVH4 Methyltransferases. *Molecular and Cellular Biology*. 2005;25(23):10507.
71. Naumann K, Fischer A, Hofmann I, Krauss V, Phalke S, Irmeler K, et al. Pivotal role of AtSUVH2 in heterochromatic histone methylation and gene silencing in *Arabidopsis*. *The EMBO Journal*. 2005;24(7):1418.
72. Pien S, Grossniklaus U. Polycomb group and trithorax group proteins in *Arabidopsis*. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2007;1769:375-82.
73. Chen X, Hu Y, Zhou DX. Epigenetic gene regulation by plant Jumonji group of histone demethylase. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2011;1809:6.
74. Yuan L, Liu X, Luo M, Yang S, Wu KJ. Involvement of Histone Modifications in Plant Abiotic Stress Responses. *Journal of Integrative Plant Biology*. 2013;1-10.
75. Kim JM, To TK, Ishida J, Morosawa T, Kawashima M, Matsui A, et al. Alterations of Lysine Modifications on the Histone H3 N- Tail under Drought Stress Conditions in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiology*. 2008;49(10):1580-8.
76. Chinnusamy V, Zhu J-K. Epigenetic regulation of stress responses in plants. *Current Opinion in Plant Biology*. 2009;12(2):133-9.
77. van Dijk K, Ding Y, Malkaram S, Riethoven JJM, Liu R, Yang JY, et al. Dynamic changes in genome- wide histone H3 lysine 4 methylation patterns in response to dehydration stress in *Arabidopsis thaliana*. *BMC Plant Biology*. 2010;10.
78. Hu Y, Zhang L, Zhao L, Li J, He S, Zhou K, et al. Trichostatin A selectively suppresses the cold- induced transcription of the ZmDREB1 gene in maize. *PloS One*. 2011;6(7):e22132.
79. Kwon CS, Lee D, Choi G, Chung WI. Histone occupancy-dependent and -independent removal of H3K27 trimethylation at cold- responsive genes in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*. 2009;60(1):112-21.
80. Ramachandran V, Chen X. Small RNA metabolism in *Arabidopsis*. *Trends in Plant Science*. 2008;13(7):368-74.

81. Slotkin RK, Martienssen R. Transposable elements and the epigenetic regulation of the genome. *Nature Reviews Genetics*. 2007;8(4):272.
82. Schwach F, Moxon S, Moulton V, Dalmay T. Deciphering the diversity of small RNAs in plants: the long and short of it. *Briefings in Functional Genomics and Proteomics*. 2009;8(6):472.
83. Ruiz-Ferrer V, Voinnet O. Roles of plant small RNAs in biotic stress responses. (Report). *Annual Review of Plant Biology*. 2009;60:485-510.
84. Nakaminami K, Matsui A, Shinozaki K, Seki M. RNA regulation in plant abiotic stress responses. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2012;149-53.
85. Chen X. Small RNAs and Their Roles in Plant Development. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 2009. p. 21-44.
86. Zheng Q, Rowley MJ, Bohmdorfer G, Sandhu D, Gregory BD, Wierzbicki AT. RNA polymerase V targets transcriptional silencing components to promoters of protein-coding genes. *The Plant Journal*. 2013;73(2):179-89.
87. Zhang L, Wang Y, Zhang XH, Zhang M, Han DG, Qiu CP, et al. Dynamics of phytohormone and DNA methylation patterns changes during dormancy induction in strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.). *Plant Cell Reports*. 2012;31(1):155-65.
88. Mirouze M, Paszkowski J. Epigenetic contribution to stress adaptation in plants. *Current Opinion in Plant Biology*. 2011;14(3):267-74.
89. Bond DM, Finnegan EJ. Passing the message on: inheritance of epigenetic traits. *Trends in Plant Science*. 2007;12(5):211-6.
90. Feil R, Fraga MF. Epigenetics and the environment: emerging patterns and implications. *Nature Reviews Genetics*. 2012;13(2):97.
91. Hauser M, Aufsatz W, Jonak C, Luschnig C. Transgenerational epigenetic inheritance in plants. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2011:10.
92. Kovarik A, Koukalova B, Bezdek M, Opatrny Z. Hypermethylation of tobacco heterochromatic loci in response to osmotic stress. *Theoretical and Applied Genetics*. 1997;95(1-2):301-6.
93. Dyachenko OV, Zakharchenko NS, Shevchuk TV, Bohnert HJ, Cushman JC, Buryanov YI. Effect of hypermethylation of CCWGG sequences in DNA of *Mesembryanthemum crystallinum* plants on their adaptation to salt stress. *Biochemistry (Moscow)*. 2006;71(4):461-5.
94. Choi CS, Sano H. Abiotic- stress induces demethylation and transcriptional activation of a gene encoding a glycerophosphodiesterase- like protein in tobacco plants. *Molecular Genetics and Genomics*. 2007;277(5):589-600.
95. Boyko A, Kathiria P, Zemp FJ, Yao Y, Pogribny I, Kovalchuk I. Transgenerational changes in the genome stability and methylation in pathogen-infected plants: (virus-induced plant genome instability). *Nucleic Acids Research*. 2007;35(5):1714.

96. Hollick JB, Patterson GI, Coe EH, Cone KC, Chandler VL. Allelic interactions heritably alter the activity of a metastable maize pl allele. *Genetics*. 1995;141(2):709.
97. Stokes TL, Kunkel BN, Richards EJ. Epigenetic variation in Arabidopsis disease resistance. *Genes & Development*. 2002;16(2):171-82.
98. Verhoeven KJF, Jansen JJ, van Dijk PJ, Biere A. Stress- induced DNA methylation changes and their heritability in asexual dandelions. *New Phytologist*. 2010;185(4):1108-18.
99. Feng Q, Yang C, Lin X, Wang J, Ou X, Zhang C, et al. Salt and alkaline stress induced transgenerational alteration in DNA methylation of rice (*Oryza sativa*). *Australian Journal of Crop Science*. 2012;5.
100. Bossdorf O, Richards CL, Pigliucci M. Epigenetics for ecologists. *Ecology Letters*. 2008;11(2):106-15.
101. Bräutigam K, Vining KJ, Lafon-placette C, Fossdal CG, Mirouze M, Marcos JG, et al. Epigenetic regulation of adaptive responses of forest tree species to the environment. *Ecology and Evolution*. 2013;3(2):399-415.
102. Boyko A, Blevins T, Yao YL, Golubov A, Bilichak A, Ilnytskyy Y, et al. Transgenerational Adaptation of Arabidopsis to Stress Requires DNA Methylation and the Function of Dicer- Like Proteins. *PLoS One*. 2010;5(3).
103. Kumar SV, Wigge PA. H2A.Z- Containing Nucleosomes Mediate the Thermosensory Response in Arabidopsis. *Cell*. 2010;140(1):136-47.
104. Hashida SN, Uchiyama T, Martin C, Kishima Y, Sano Y, Mikami T. The temperature-dependent change in methylation of the Antirrhinum transposon Tam3 is controlled by the activity of its transposase. *Plant Cell*. 2006;18(1):104-18.
105. Santos RS, Kruger MM, Pegoraro C, Madabula FP, Maia LC, Rombaldi CV, et al. Transcriptional Regulation of Seven ERFs in Rice Under Oxygen Depletion and Iron Overload Stress.(Report). *Tropical Plant Biology*. 2013;6(1):16.
106. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. *Molecular Biology of the Cell*. 5. ed. New York: Garland Science; 2007. 1392 p.
107. Burd CG, Dreyfuss G. Conserved structures and diversity of functions of RNA-binding proteins. *Science*. 1994;265(5172):615.
108. Owttrim GW. RNA helicase and abiotic stress. *Nucleic Acids Research*, v 34, p 3220-3230, 2006. 2006:3220-30.
109. Jankowsky E, Bowers H. Remodeling of ribonucleoprotein complexes with DExH/ D RNA helicases. *Nucleic Acids Research*. 2006;34(15):4181.
110. Lewis JD, Izaurflde E. The Role of the Cap Structure in RNA Processing and Nuclear Export. *European Journal of Biochemistry*. 1997;247(2):461-9.
111. Hao S, Baltimore D. RNA splicing regulates the temporal order of TNF- induced gene expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2013;110(29):11934.

112. Nagasaki H, Arita M, Nishizawa T, Suwa M, Gotoh O. Species- specific variation of alternative splicing and transcriptional initiation in six eukaryotes. *Gene*. 2005;364:53-62.
113. Ner-Gaon H, Leviatan N, Rubin E, Fluhr R. Comparative cross- species alternative splicing in plants. *Plant Physiology*. 2007;144(3):1632-41.
114. Ner-Gaon H, Halachmi R, Savaldi-Goldstein S, Rubin E, Ophir R, Fluhr R. Intron retention is a major phenomenon in alternative splicing in Arabidopsis. *The Plant Journal*. 2004;39(6):877-85.
115. Kim E, Magen A, Ast G. Different levels of alternative splicing among eukaryotes. *Nucleic Acids Research*. 2007;35(1):125.
116. Ner-Gaon H, Fluhr R. Whole-genome microarray in Arabidopsis facilitates global analysis of retained introns. *DNA Research*. 2006;13(3):111-21.
117. Egawa C, Kobayashi F, Ishibashi M, Nakamura T, Nakamura C, Takumi S. Differential regulation of transcript accumulation and alternative splicing of a DREB2 homolog under abiotic stress conditions in common wheat. *Genes and Genetic Systems*. 2006;81(2):77-91.
118. Li J, Li X, Guo L, Lu F, Feng X, He K, et al. A subgroup of MYB transcription factor genes undergoes highly conserved alternative splicing in Arabidopsis and rice. *Journal of Experimental Botany*. 2006;57(6):1263.
119. Mastrangelo AM, Belloni S, Barilli S, Ruperti B, Di Fonzo N, Stanca AM, et al. Low temperature promotes intron retention in two e- cor genes of durum wheat. *Planta*. 2005;221(5):705-15.
120. Wollerton MC, Gooding C, Wagner EJ, Garcia-Blanco MA, Smith CW. Autoregulation of polypyrimidine tract binding protein by alter-native splicing leading to nonsense-mediated decay. *Molecular Cell*. 2004.
121. Wang BB, Brendel V. Genome wide comparative analysis of alternative splicing in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2006;7175-80.
122. Colgan DF, Manley JL. Mechanism and regulation of mRNA polyadenylation. *Genes & Development*. 1997;11(21):2755.
123. Gott JM, Emeson RB. Functions and mechanisms of RNA editing. *Annual Review of Genetics*. 2000:499.
124. Yuan H, Liu D. Functional disruption of the pentatricopeptide protein SLG1 affects mitochondrial RNA editing, plant development, and responses to abiotic stresses in Arabidopsis. *The Plant Journal*. 2012;70(3):432-44.
125. Xu XM, Meier I. The nuclear pore comes to the fore. *Trends in Plant Science*. 2008;13(1):20-7.
126. Cole CN, Scarcelli JJ. Transport of messenger RNA from the nucleus to the cytoplasm. *Current Opinion in Cell Biology*. 2006;18(3):299-306.

127. Mosammaparast N, Pemberton LF. Karyopherins: from nuclear- transport mediators to nuclear- function regulators. *Trends in Cell Biology*. 2004;14(10):547-56.
128. Harel A, Forbes DJ. Importin Beta: Conducting a Much Larger Cellular Symphony. *Molecular Cell*. 2004;16(3):319-30.
129. Damelin M, Silver PA, Corbett AH. Nuclear protein transport. *Methods in Enzymology*. 2002;351:21.
130. Dong C-H, Hu X, Tang W, Zheng X, Kim YS, Lee B-h, et al. A Putative Arabidopsis Nucleoporin, AtNUP160, Is Critical for RNA Export and Required for Plant Tolerance to Cold Stress. *Molecular and Cellular Biology*. 2006;26(24):9533.
131. Sunkar R, Chinnusamy V, Zhu J, Zhu J-K. Small RNAs as big players in plant abiotic stress responses and nutrient deprivation. *Trends in Plant Science*. 2007;12(7):301-9.
132. Scott MH, Emily B, David B, Gregory JH. An RNA- directed nuclease mediates post- transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature*. 2000;404(6775):293.
133. Ma XR, Kim EJ, Kook I, Ma FR, Voshall A, Moriyama E, et al. Small Interfering RNA- Mediated Translation Repression Alters Ribosome Sensitivity to Inhibition by Cycloheximide in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Cell*. 2013;25(3):985-98.
134. Phillips JR, Dalmay T, Bartels D. The role of small RNAs in abiotic stress. *FEBS Letters*. 2007;581(19):3592-7.
135. Zhang BH, Pan XP, Cannon CH, Cobb GP, Anderson TA. Conservation and divergence of plant microRNA genes. *The Plant Journal*. 2006;46(2):243-59.
136. Bari R, Pant BD, Stitt M, Scheible WR. PHO2, microRNA399, and PHR1 define a phosphate- signaling pathway in plants. *Plant Physiology*. 2006;141(3):988-99.
137. Jen C-h, Michalopoulos I, Westhead DR, Meyer P, Jen C-H. Natural antisense transcripts with coding capacity in *Arabidopsis* may have a regulatory role that is not linked to double- stranded RNA degradation. *Genome Biology*. 2005;6(6):R51-R.
138. Wang X-j, Gaasterland T, Chua N-h, Wang X-J, Chua N-H. Genome- wide prediction and identification of cis- natural antisense transcripts in *Arabidopsis thaliana*. *Genome Biology*. 2005;6(4):R30.
139. Zhang XM, Xia J, Lii YFE, Barrera-Figueroa BE, Zhou XF, Gao S, et al. Genome-wide analysis of plant nat- siRNAs reveals insights into their distribution, biogenesis and function. *Genome Biology*. 2012;13(3).
140. Mazzucotelli E, Mastrangelo AM, Crosatti C, Guerra D, Stanca AM, Cattivelli L. Abiotic stress response in plants: When post- transcriptional and post- translational regulations control transcription. *Plant Science*. 2008;174(4):420-31.
141. Weissman AM. Themes and variations on ubiquitylation. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2001;2(3):169.
142. Mazzucotelli E, Belloni S, Marone D, De Leonardis A, Guerra D, Di Fonzo N, et al. The E3 Ubiquitin Ligase Gene Family in Plants: Regulation by Degradation. *Current Genomics*. 2006;7(8):509-22.

143. Sadowski M, Suryadinata R, Tan AR, Roesley SNA, Sarcevic B. Protein monoubiquitination and polyubiquitination generate structural diversity to control distinct biological processes. *IUBMB Life*. 2012;136-42.
144. Ellis C, Turner JG, Devoto A. Protein complexes mediate signalling in plant responses to hormones, light, sucrose and pathogens. *Plant Molecular Biology*. 2002;50(6):971-80.
145. Zhang YY, Xie Q. Ubiquitination in abscissic acid-related pathway. *Journal of Integrative Plant Biology*. 2007;87-93.
146. Zang X, Komatsu S. A proteomics approach for identifying osmotic- stress- related proteins in rice. *Phytochemistry*. 2007;68(4):426-37.
147. Dooki AD, Mayer-Posner FJ, Askari H, Zaiee AA, Salekdeh GH. Proteomic responses of rice young panicles to salinity. *Proteomics*. 2006;6(24):6498-507.
148. Pandey A, Chakraborty S, Datta A, Chakraborty N. Proteomics approach to identify dehydration responsive nuclear proteins from chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Molecular & Cellular Proteomics*. 2008;7(1):88-107.
149. Gingerich DJ, Gagne JM, Salter DW, Hellmann H, Estelle M, Ma L, et al. Cullins 3a and 3b assemble with members of the broad complex/ tramtrack/ bric-a- brac (BTB) protein family to form essential ubiquitin- protein ligases (E3s) in Arabidopsis. *The Journal of Biological Chemistry*. 2005;280(19):18810.
150. Pedmale UV, Liscum E. Regulation of phototropic signaling in Arabidopsis via phosphorylation state changes in the phototropin 1- interacting protein NPH3. *The Journal of Biological Chemistry*. 2007;282(27):19992.
151. Bossis G, Melchior F. SUMO: regulating the regulator. *Cell Division*. 2006;1(1):13.
152. Thines B, Katsir L, Melotto M, Niu Y, Mandaokar A, Liu G, et al. JAZ repressor proteins are targets of the SCFCOI1 complex during jasmonate signalling. *Nature*. 2007;448(7154):661.
153. Tan X, Calderon-Villalobos LIA, Sharon M, Zheng CX, Robinson CV, Estelle M, et al. Mechanism of auxin perception by the TIR1 ubiquitin ligase. *Nature*. 2007;446(7136):640-5.
154. Ueguchi-Tanaka M, Nakajima M, Katoh E, Ohmiya H, Asano K, Saji S, et al. Molecular interactions of a soluble gibberellin receptor, GID1, with a rice DELLA protein, SLR1, and gibberellins. *The Plant Cell*. 2007;2140-55.
155. Hay RT. SUMO: A History of Modification. *Molecular Cell*. 2005;18(1):1-12.
156. Melchior F, Schergaut M, Pichler A. SUMO: ligases, isopeptidases and nuclear pores. *Trends in Biochemical Sciences*. 2003;28(11):612-8.
157. Catala R, Ouyang J, Abreu IA, Hu Y, Seo H, Zhang X, et al. The Arabidopsis E3 SUMO ligase SIZ1 regulates plant growth and drought responses. *The Plant Cell*. 2007;19(9):2952-66.
158. Miura K, Rus A, Sharkhuu A, Yokoi S, Karthikeyan AS, Raghothama KG, et al. The Arabidopsis SUMO E3 ligase SIZ1 controls phosphate deficiency responses.

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2005;102(21):7760-5.

159. Yoo CY, Miura K, Jin JB, Lee J, Park HC, Salt DE, et al. SIZ1 small ubiquitin-like modifier E3 ligase facilitates basal thermo tolerance in Arabidopsis independent of salicylic acid. *Plant Physiology*. 2006;1548-58.

160. Miura K, Jin JB, Lee J, Yoo CY, Stirm V, Miura T, et al. SIZ1- mediated sumoylation of ICE1 controls CBF3/ DREB1A expression and freezing tolerance in Arabidopsis. *The Plant Cell*. 2007;19(4):1403-14.

161. Kovalchuk I, Zemp FJ. *Plant Epigenetics: Methods and Protocols*. Totowa: Humana Press; 2010.

162. Vancura A. *Transcriptional Regulation: Methods and Protocols*. Totowa: Humana Press; 2011. 605 p.

163. Collas P. *Chromatin Immunoprecipitation Assays: Methods and Protocols*. Totowa: Humana Press; 2009. 268 p.

164. Gruntman E, Qi Y, Slotkin RK, Roeder T, Martienssen RA, Sachidanandam R. Kismeth: Analyzer of plant methylation states through bisulfite sequencing. (Software) (<http://katahdin.mssm.edu/kismeth>). *BMC Bioinformatics*. 2008;9(371):371.

165. Urano K, Kurihara Y, Seki M, Shinozaki K. 'Omics' analyses of regulatory networks in plant abiotic stress responses. *Current Opinion in Plant Biology*. 2010;13(2):132-8.

