



MAPEAMENTO *IN SILICO* DE SÍTIOS INTRÍNSECOS DE CURVATURA NA REGIÃO AMPLIFICADA *ORIA* DE HAMSTER CHINÊS

Cristiane Carlos Cristiano¹; Bruna Manuelli Teles Moreira¹; Ethiene Cristina Tomba¹; Maria Aparecida Fernandez²; Adriana Fiorini³

RESUMO: Origens de replicação e curvaturas intrínsecas do DNA são detectadas próximas ou co-localizadas, porém a função dessas estruturas na replicação ainda não foi determinada. Em células em cultura de fibroblasto de hamster Chinês induzidas à amplificação, o domínio do gene *AMPD2* é amplificado em uma região poligênica. Nessa região é descrita uma origem preferencial para a iniciação da replicação, a *oriGNAI3*. Quando a eficiência de iniciação da *oriGNAI3* é diminuída, outras origens potenciais são ativadas (*oriA*, *oriB* e *oriC*). Com o objetivo de identificar e discutir o possível envolvimento de sítios de DNA curvo com o processo de replicação que ocorre em segmentos amplificados, foi analisada, neste trabalho, a região amplificada de ~6.6 kb, onde se localiza a origem de replicação *oriA*. A seqüência foi analisada *in silico* através dos programas computacionais para análise da curvatura, Map15A e 3D15m1 e para desenho de *primers* para a PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) através do software Fast PCR. Foram observados dois picos de curvatura nas posições 300 e 5870 pb, com valores de ENDS ratio 1,13 e 1,12, respectivamente. A modelagem tridimensional da região de ~6,6 kb e de seqüências ao redor de cada pico foi obtida. O primeiro pico de curvatura está localizado na região da *oriA*. A análise *in silico* da PCR permite prever as condições ótimas desta reação, a qual poderá ser realizada para o isolamento e posterior subclonagem destes fragmentos. Esta análise preliminar permitirá estabelecer uma relação entre estrutura e função nesta região de replicação gênica.

PALAVRAS-CHAVE: DNA curvo; região amplificada; *oriA*.

1 INTRODUÇÃO

O DNA pode apresentar ao longo de sua molécula conformações estruturais alternativas como *loops*, cruciformes e curvaturas (Homburger, 1989). Segmentos de DNA curvos formam inúmeras deflexões do eixo principal da dupla hélice, denominadas sítios de DNA *bent*. Estes podem ocorrer por flexibilidade da região, onde a dupla hélice é capaz de se curvar quando em contato com uma proteína ou podem ser intrínsecos, este último dependente da seqüência de nucleotídeos, sendo ocasionada pela repetição periódica de regiões contendo trechos de 2 ou mais Adeninas/Timinas (dA/dT) dispostas cada ~10 pares de bases, uma volta de hélice de DNA, ou múltiplos de 10 (ANDERSON, 1986).

¹Acadêmicas do Curso de Ciências Biológicas. Departamento de Ciências Biológicas do Centro Universitário de Maringá – CESUMAR, Maringá – PR. cris_sol_c@hotmail.com, brunamanuelli@yahoo.com.br, ethitomb@gmail.com.

²Prof^a. Dr^a. da Universidade Estadual de Maringá. Departamento de Biologia Celular e Genética. Universidade Estadual de Maringá, UEM, Maringá – PR. aparecidafernandez@gmail.com

³ Discente do Curso de Ciências Biológicas do Cesumar. Departamento de Ciências Biológicas do Centro Universitário de Maringá – CESUMAR, Maringá – PR. fiorini@cesumar.br

A descoberta de seqüências de DNA curvo veio da verificação de fragmentos de DNA que exibiam comportamento eletroforético incomum em gel de poliacrilamida, intimamente associado com a curvatura presente no segmento analisado. A análise do comportamento eletroforético de fragmentos de DNA em géis de poliacrilamida permite a determinação do tamanho e da forma dos mesmos, pois estes géis dificultam a passagem de fragmentos com conformações alternativas através de seus poros regulares. Por outro lado, géis de agarose, que tem uma malha irregular, permitem apenas a análise do tamanho dos fragmentos.

Seqüências de DNA curvo intrínseco têm sido encontradas em promotores procarióticos, promotores eucarióticos, sítios de recombinação, regiões de formação de nucleossomos, regiões de associação à matriz nuclear (MARs) e origens de replicação.

Os modelos experimentais intensivamente utilizados para o estudo da seqüência e estrutura de origens de replicação em metazoários são os sistemas onde ocorre a amplificação gênica. Dentre esses sistemas, os regulados no desenvolvimento são os descritos em segmento cromossômico que contém os genes coriônicos de *Drosophila* (revisão em CLAYCOMB e ORR-WEAVER, 2005) e dos segmentos formadores de pufes de DNA em sciarídeos como em *Rhynchosciara americana* (FIORINI et al., 2006b) e *Sciara coprophila* (BIELINSKY e GERBI, 2001).

Em sistemas de amplificação induzida *in vitro* em células de mamíferos em cultura, podem ser citados os do *locus* gênico do segmento amplificado da enzima Dihidrofolato Redutase, *DHFR* (Mesner et al., 2006) e da Adenilato Deaminase 2, *AMPD2* (DEBATISSE et al., 2004) descritos, respectivamente, em linhagens de células em cultura de ovário e de pulmão de hamster Chinês.

Sendo assim, este trabalho visa mapear sítios de DNA *bent* intrínsecos na região onde se localiza a origem de replicação oriA no segmento poligênico amplificado do gene *AMPD2* em hamster Chinês e estabelecer uma possível relação entre a estrutura e função nesta região de replicação do DNA.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Análise da computacional da curvatura

Para a verificação de prováveis sítios de curvatura intrínseca, as seqüências de ~6,6 kb foi analisada utilizando o algoritmo de Eckdahl e Anderson (1987) através dos programas computacionais map15a, para análise do parâmetro *ENDS ratio* e 3d15m1, para a obtenção da modelagem tridimensional. Estes programas foram gentilmente cedidos por Philippe Pasero (Institute of Molecular Genetics, Montpellier, France) e Monique Marilley (Universite de la Mediterranee, Faculte de Medecine, Marseille, France). Valores de *ENDS ratio* representam a razão do tamanho entre as extremidades do fragmento pelo tamanho das extremidades do mesmo fragmento com curvatura, sendo que neste trabalho foram considerados valores acima de 1.11 como significativos.

2.2 PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) *in silico*

A seqüência de ~6,6 kb foi analisada através do software FAST PCR, disponível online na página <<http://www.biocenter.helsinki.fi/bi/Programs/fastpcr.htm>>, para o desenho de *primers* para a amplificação por PCR de seqüências ao redor de cada pico de curvatura. Foram escolhidas as melhores combinações quanto à compatibilidade das temperaturas de anelamento dos *primers*.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A seqüência de ~6,6 kb apresentou dois maiores picos de curvatura nas posições 300 e 5870 pb, com valores de ENDS ratio 1,13 e 1,12, respectivamente (Figura 1). Valores acima de 1,11 são considerados, por alguns autores, como valores significativos. A modelagem 2D permitiu a visualização da contribuição destes sítios de curvatura intrínseca para a estrutura global da região. O primeiro pico de curvatura, posição 300 pb, está localizado na região de origem de replicação *oriA*.

Origens de replicação e curvaturas intrínsecas do DNA têm sido encontradas próximas ou co-localizadas no mesmo segmento cromossômico, porém a correlação entre essas estruturas ainda não é conhecida. Em eucariotos inferiores, como *Saccharomyces cerevisiae*, sítios de DNA *bent* intrínseco são conservados em seqüências ARS (*Autonomously Replicating Sequences*) (VERNIS et al., 1999). Também tem sido proposto que sítios de DNA *bent* podem ser encontrados associados com ORC's (*Origin Recognition Complex*; GERBI et al., 2002).

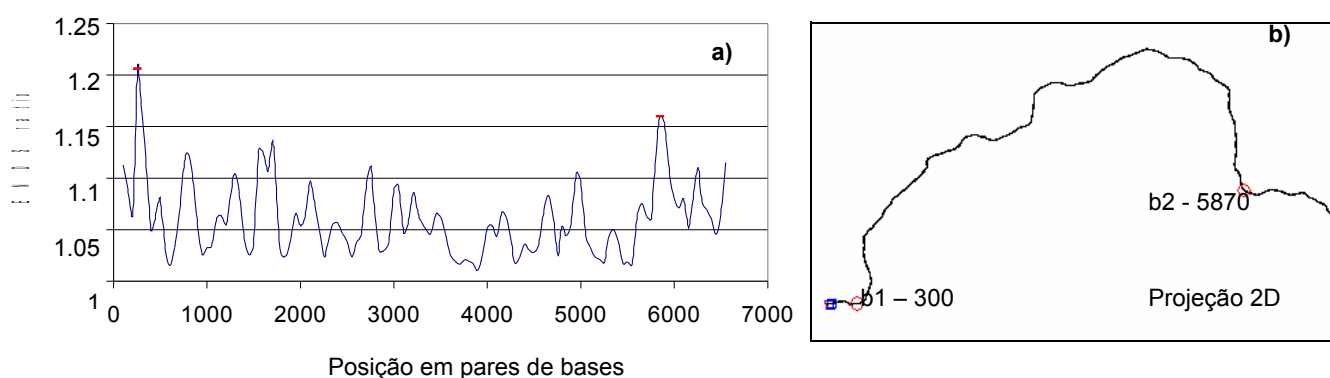


Figura 1. a) Sítios intrínsecos de curvatura representados por valores de *ENDS ratio*. Os maiores picos de curvatura estão indicados nas posições 300 e 5870 pb, com valores de *ENDS ratio* de 1,13 e 1,12 respectivamente. b) Projeção bidimensional da via tridimensional indicando os dois sítios de curvatura.

Para o isolamento de seqüências franqueando os dois maiores picos de curvatura detectados *in silico*, a seqüência de ~6,6 kb foi analisada pelo software FAST PCR (Tabela 1). Com esta análise foi possível determinar a menor região a ser amplificada por PCR, a seqüência dos *primers reverse* e *forward* e a temperatura ótima de anelamento destes *primers*. Após a amplificação por PCR, os *amplicons* obtidos poderão ser subclonados em plasmídeos especiais para a análise da curvatura, permitindo a análise por permutação circular, para a estimativa precisa dos picos de curvatura.

Tabela 1. Predição das seqüências de *primers* e temperaturas de anelamento para amplificação por PCR dos dois picos de curvatura intrínseca, utilizando o software FAST PCR.

Posição das curvaturas	Posição de anelamento dos primers	Seqüência do primer	Amplicon	Tpt de anelamento	Tpt ótima de anelamento
b1 300 pb	F1_110-130	tataagcgccccccattgaa	389bp	59,6°C	59,4°C
	R1_475-498	tccaagccagggcttacaggtagc		63,5°C	
b2 5870 pb	F1_176-198	gtccaagatgaaggactctcca	384bp	58,9 °C	58,7°C
	R1_538-559	ccacccttcaaagtcaatggaa		57,4 °C	

F: forward; R: reverse.

A seqüência ao redor dos dois picos de curvatura foram analisadas quanto valores de ENDS ratio e através da modelagem 2D (Figura 2). Foram observados trechos de três ou mais seqüências de A/T ao redor dos picos de curvatura. Os *primers* desenhados para o isolamento dos sítios de curvatura foram indicados na modelagem 2D, permitindo a visualização da estrutura do fragmento a ser amplificada. Estas análises indicam que os dois picos de DNA *bent* mantêm a estrutura curva dos *amplicons*, indicando que estes poderão apresentar alterações na mobilidade eletroforética ao serem analisados em géis de poliácridamida. O motivo CA(n)T, descrito próximo às regiões de curvatura, foi encontrado para as duas seqüências analisadas.

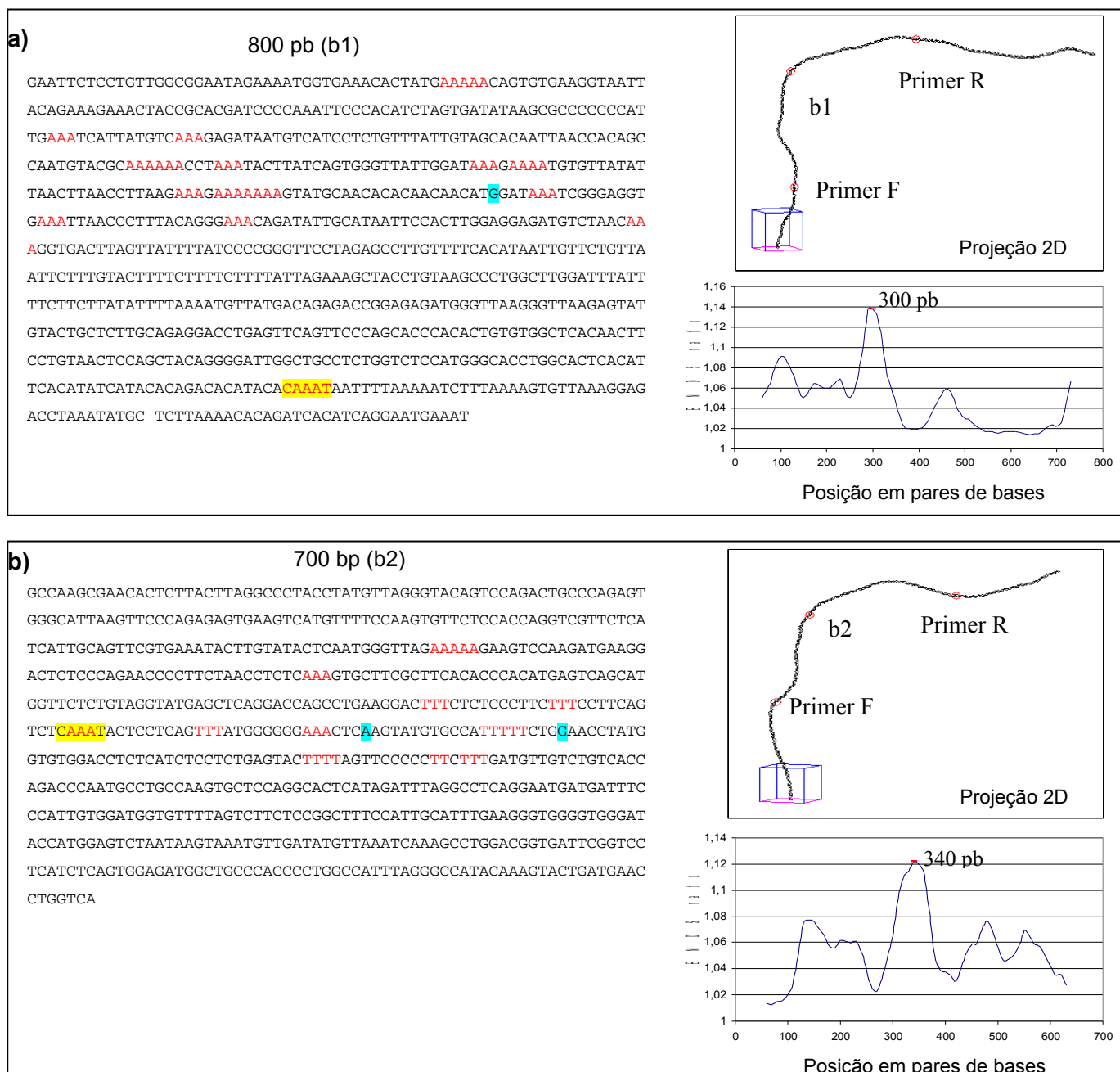


Figura 2. Trechos de três ou mais A/T ao redor dos picos de curvatura estão representados por letras vermelhas. Os *primers forward* e *reverse* estão indicados na modelagem 2D. O motivo CA(n)T está selecionado pela cor amarela. Os maiores picos de curvatura estão indicados nas posições 300 e 340 pb, em relação ao início do fragmento analisado.

4 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste trabalho permitiram concluir que a região amplificada *oriA* apresenta dois picos de pronunciados de curvatura, sendo um detectado na região contendo a *oriA*. A análise *in silico* da seqüência foi útil para se visualizar a modelagem bidimensional destas curvaturas e encontrar motivos de seqüência, além de se estabelecer as condições ótimas da PCR como a melhor temperatura de anelamento dos *primers* e o tamanho dos *amplicons*, da região compreendendo os sítios de curvatura.

REFERÊNCIAS

ANDERSON J. N. Detection, sequence patterns and function of unusual DNA structures. **Nucleic Acids Res.** p. 14:8513-8533. 1986.

BIELINSKY A. K, GERBI S. A. Where it all starts: eukaryotic origins of DNA replication. **J Cell Sci** p. 114:643-51. 2001.

[CLAYCOMB J.](#) M, [ORR-WEAVER T.](#) L. Developmental gene amplification: insights into DNA replication and gene expression. **Trends Genet** 21 p. (3):149-62. 2005.

DEBATISSE M, TOLEDO F, ANGLANA M. Replication initiation in mammalian cells: changing preferences. **Cell Cycle.** p. 3(1):19-21. 2004.

FIORINI A, GOUVEIA F. S, SOARES M. A. M, STOCKER A. J, CIFERRI R. R, FERNANDEZ, M. A. DNA bending in the replication zone of the C3 DNA puff amplicon of *Rhynchosciara americana* (Diptera: Sciaridae). **Mol Biol Rep.** p. 33:71-82. 2006b.

HOMBERGER H. P. Bent DNA is a structural feature of scaffold-attachment regions in *Drosophila melanogaster* interphase nuclei. **Chromosoma (Berl).** p. 98:99-104. 1989.

MESNER L. D, CRAWFORD E. L, HAMLIN J. L. Isolating apparently pure libraries of replication origins from complex genomes. *Mol Cell.* p. 21(5):719-26. Erratum in: **Mol Cell** 2006 p. 21(6):881. 2006.