



Permutação circular de sítios intrínsecos de DNA curvo próximos à região *oriA* do domínio amplificado do gene *AMPD2*.

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

RESUMO: DNA curvo tem sido encontrado em regiões regulatórias como promotores, assim como sítios de recombinação, região de formação de nucleossomos e origens de replicação. Essas curvaturas podem ser intrínsecas, quando são produzidas pela seqüência de nucleotídeos ou extrínsecas quando são provocadas pela ligação de proteínas a segmentos de DNA. O envolvimento de origens de replicação em segmentos amplificados com sítios de DNA curvo intrínsecos foi primeiramente descrito para a região intergênica do segmento amplificado do gene DHFR de hamster Chinês. A presença de curvatura intrínseca do DNA foi descrita recentemente para a região de iniciação da replicação no segmento amplificado do gene C3-22 do sciarídeo *Rhynchosciara americana*. 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*). A presença de curvatura intrínseca em um fragmento de DNA pode ser estimada através de análise computacional e confirmada através da análise do comportamento eletroforético dos fragmentos, em géis de poliacrilamida. Fragmentos com curvatura intrínseca exibem mobilidade eletroforética alterada, em géis de poliacrilamida. Para localizar a posição de possíveis sítios de DNA curvo nos fragmentos que tiveram mobilidade eletroforética alterada, pode ser empregado o método de permutação circular, no qual, fragmentos são clonados em um plasmídeo contendo um *polylinker* duplicado, que permite, após clivagem com enzimas de restrição, produzir fragmentos com o sítio de curvatura em diferentes posições. Este trabalho tem como objetivo analisar, pelo método de permutação circular, produtos de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) contendo sítios intrínsecos de curvatura, da região amplificada onde se localiza a origem de replicação *oriA*. Os produtos da PCR serão analisados em gel de agarose a 1,4%. Após a confirmação da amplificação, uma alíquota da reação de PCR será utilizada para a ligação no plasmídeo pTZ57R/T, utilizando o kit InsTAclone™ PCR Cloning Kit (Fermentas). Os produtos de ligação serão utilizados para transformar bactérias competentes por choque térmico. Após a seleção e obtenção dos clones recombinantes, os plasmídeos contendo os produtos de PCR serão clivados com as enzimas de restrição *XbaI* e *Sall* para posterior clonagem dos fragmentos gerados no plasmídeo pBendBlue. A construção será submetida à clivagem com as enzimas de restrição presentes em ambos os lados do inserto do pBendblue, resultando em fragmentos do mesmo tamanho, mas com a posição dos sítios curvos permutadas. Após a clivagem, os fragmentos serão analisados por eletroforese em géis de poliacrilamida a 6% a 4°C, para a análise do comportamento eletroforético. Uma estimativa da localização do centro da curvatura pode ser obtida através da medida quantitativa da mobilidade relativa dos fragmentos permutados, extrapolando a posição do corte o qual poderia produzir máxima mobilidade no gel. Espera-se assim que os sítios intrínsecos de curvatura ao serem analisados por permutação circular apresentem alterações na mobilidade eletroforética e que seja estimada a posição precisa destes sítios.

Palavras chave: OriA; DNA curvo; Permutação circular; amplificação gênica.

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

²Profª. Drª. da Universidade Estadual de Maringá. Departamento de Biologia Celular e Genética, UEM. aparecidafernandez@gmail.com

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