



Estrutura do promotor intrônico do gene da Actina A3 citoplasmática em linhagens de *Bombyx mori* susceptíveis e resistentes ao Nucleopoliedrovírus.

Jeronimo Tavares¹; Quirino Alves de Lima Neto¹, Fabrícia Gimenes², Maria Aparecida Fernandez³

RESUMO: Actina é necessária para o transporte de nucleocapsídeos e para a expressão dos genes virais em uma infecção. Resultados prévios indicam que a linhagem de *Bombyx mori* C24A é mais resistente (22% letalidade) do que a linhagem M11A (95%) ao nucleopoliedrovírus, BmMNPV. Estas linhagens também apresentaram diferenças de tamanho e seqüência do primeiro íntron do gene da Actina A3. Este íntron foi previamente descrito como um promotor críptico para uma isoforma rara de actina. Nosso objetivo foi investigar uma correlação entre resistência ao BmMNPV e características estruturais do promotor intrônico. A curvatura intrínseca do DNA foi avaliada por ensaios de mobilidade em diferentes tipos de géis. Os parâmetros relativos à estrutura helicoidal do DNA: ENDS ratio, roll e twist foram estimados pelo programa Map15a. A projeção tridimensional da molécula foi determinada pelo programa 3D15m1. Os resultados mostram que ambos os fragmentos possuem sítios de DNA curvo não centralizado (mobilidade acelerada em géis de poliacrilamida). Ângulos twist > 34° e valores negativos para os ângulos roll sugerem a presença de DNA curvo nos fragmentos analisados. Contudo, existem diferenças entre os valores e localização de ENDS ratio. A linhagem susceptível M11A apresentou ENDS ratio no valor de 1.11 na posição 104 pb, enquanto a linhagem resistente apresenta valor 1.30 e posição 414 pb. Experimentos futuros podem indicar a provável participação da estrutura desse promotor intrônico na resistência viral de *B. mori* ao BmMNPV.

PALAVRAS-CHAVE: Actina; BmMNPV; *Bombyx mori*; DNA curvo; resistência.

1 INTRODUÇÃO

A proteína actina é necessária para o sucesso da infecção viral em células de insetos (Kasman e Volkman, 2000). Resultados de bioensaios mostraram que a linhagem de *Bombyx mori* C24A é mais resistente a infecção viral pelo nucleopoliedrovírus, BmMNPV, do que a linhagem M11A. As taxas de mortalidade são de 22% e 95% para as linhagens C24A e M11A, respectivamente. Foi relatada também a existência de uma isoforma rara do gene da Actina A3 citoplasmática, onde o primeiro íntron funciona como um promotor críptico (Fatyol *et al.*, 1998). Uma hipótese que está sob investigação é a possibilidade deste promotor intrônico ser dirigido por proteínas virais que funcionam como fatores de transcrição, aumentando assim a produção de actina e favorecendo o desenvolvimento do vírus.

¹Mestrando do Programa de pós-graduação em Biologia Celular e Molecular, Universidade Estadual de Maringá – UEM. Maringá – PR. Bolsista CAPES jeronimo.t@gmail.com; galneto@gmail.com

²Doutoranda do Programa de pós-graduação em Biologia Celular e Molecular, Universidade Estadual de Maringá – UEM. Maringá – PR. fabricia.gimenes@gmail.com

³Docente do Departamento de Biologia Celular e Genética, Universidade Estadual de Maringá – UEM. Maringá – PR. aparecidafernandez@gmail.com

Na interação de proteínas com regiões promotoras a estrutura curva do DNA (*bent*) pode ser associada a sítios de reconhecimento por fatores de transcrição, demonstrando assim a importância da conformação do DNA nas ligações proteína-DNA (Gimenes *et al*, 2008). Nessa área de pesquisa, nossa proposta é investigar a correlação entre a resistência de *B. mori* ao nucleopoliedrovírus e as características estruturais do promotor intrônico do gene da Actina, como sítios de DNA *bent*.

2 MATERIAL E MÉTODOS

O gene da Actina citoplasmática A3 das linhagens C24A e M11A de *B. mori*, foi amplificado utilizando primers específicos construídos para o exon 1 (5' AAGGTGTGCTCGAACAGTGC 3') e exon 2 (5' AAGTTGCCGCGTTGGTAGT 3'). O fragmento amplificado de aproximadamente 500 pb foi clonado no vetor pGEM (PROMEGA) e liberado desse plasmídeo recombinante com a enzima *EcoRI* (Biolabs). O fragmento de restrição de cada linhagem foi analisado em diferentes sistemas de eletroforese. Géis de poliacrilamida 6% sem brometo de etídeo (PA) e com brometo de etídeo (PA + EtBr) foram realizados para determinar a curvatura intrínseca das moléculas. Géis de agarose foram utilizados como controle. O padrão de mobilidade foi obtido pelo cálculo do valor *R* (razão entre mobilidade aparente/mobilidade real). Valores *R* maiores que 1.1 indicam mobilidade reduzida, causada por curvaturas intrínsecas no DNA. Os fragmentos de restrição foram sequenciados utilizando o kit DYEnamic ET Dye Terminator (Amersham GE) no sequenciador automático MegaBACE 1000. Os parâmetros helicais ENDS ratios, roll e twist foram calculados pelo programa Map15a, enquanto a projeção 2D da estrutura tridimensional da molécula de DNA foi estimada pelo programa 3D15m1.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O brometo de etídeo (EtBr) intercala entre as bases do DNA e altera a estrutura tridimensional da molécula. Desta forma, géis de poliacrilamida sem brometo, quando comparados com géis que utilizam brometo, podem apresentar mobilidade diferenciada devido a conformações diversas que o DNA pode assumir; como curvaturas intrínsecas (Fiorini *et al.*, 2006). Os fragmentos de restrição (Fig. 1) apresentaram uma diferença na mobilidade nos géis de poliacrilamida. No gel de poliacrilamida sem brometo, ambas as amostras apresentaram mobilidade acelerada (Fig. 2). Contudo o fragmento de restrição da linhagem M11A não apresentou a mesma taxa de aceleração. Esta diferença na migração pode ser explicada pela presença de curvaturas na molécula de DNA. Curvaturas nas extremidades dos fragmentos determinam mobilidade acelerada, enquanto curvaturas centralizadas determinam mobilidade reduzida. Desta forma, a análise dos géis sugere que a ambas as linhagens possuem um sítio de DNA *bent* na extremidade, contudo, a linhagem M11A também possui um sítio de curvatura na região central do fragmento. O valor *R* calculado para as amostras foi de 0.82 (C24A) e 0.86 (M11A), evidenciando que as duas amostras tiveram mobilidade acelerada, embora a mobilidade do fragmento M11A tenha sido menos acentuada.

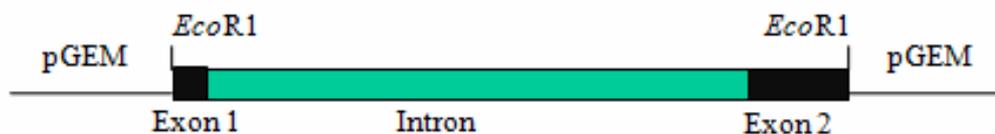


Figura 1. Fragmento de restrição do produto amplificado do gene da Actina A3 apresentando parte dos exons 1 e 2 e o primeiro íntron.

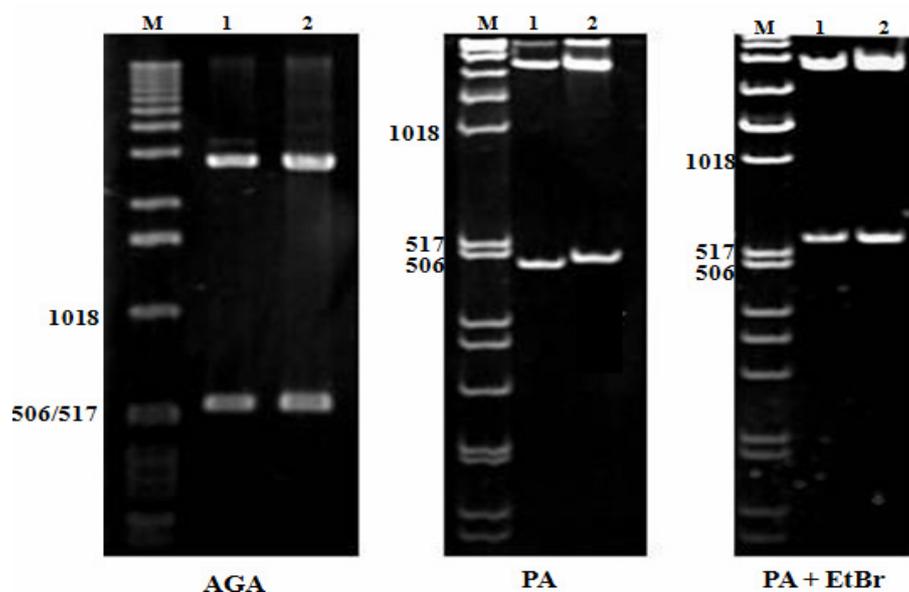


Figura 2. Ensaio de mobilidade eletroforética dos fragmentos do primeiro íntron do gene da Actina A3 de *B. mori*. AGA, gel agarose 1%; (PA) e (PA+EtBr) gel de poliacrilamida 6% sem e com brometo de etídeo, respectivamente. Linhagem C24A, raia 1; M11A, raia 2. M, Marcador de tamanho molecular 1kb Invitrogen. Ambas as amostras apresentaram migração acelerada no gel de poliacrilamida, embora exista uma pequena diferença entre as duas amostras, ocasionada pela estrutura das moléculas. Valor *R*: 0.82 (C24A) e 0.86 (M11A).

O ENDS ratio é um parâmetro que avalia a razão entre a distância das extremidades de fragmentos com o mesmo número de nucleotídeos, mas com estrutura diferente devido a curvatura da molécula de DNA. O ângulo roll mede a rotação vertical e o ângulo twist a rotação horizontal entre dois pares de bases consecutivos (Calladine *et al.*, 2004). Valores de ENDS ratio acima de 1.1 indicam a existência de curvatura intrínseca. Os parâmetros helicais indicaram que a linhagem C24A possui apenas um sítio de DNA *bent* (ENDS ratio 1.30 na posição 475 pb) enquanto a linhagem M11A possui dois sítios (ENDS ratio 1.1 nas posições 165 e 475 pb). A obtenção de valores de ângulos roll negativos e de ângulos twist $>34^\circ$ em todos os picos também sugerem a presença de DNA *bent* nesses segmentos. (Fig. 3)

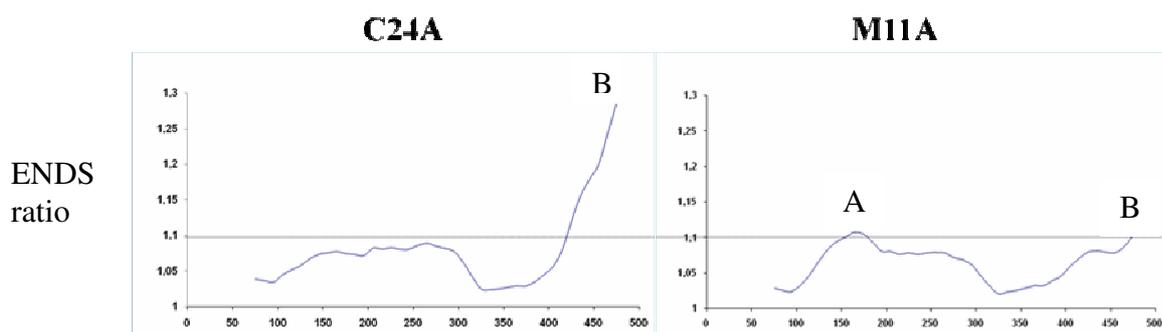


Figura 3. Análise *in silico* dos fragmentos de restrição C24A e M11A. O programa Map15a realizou a análise com janela de 150 a cada 10 pb para calcular os parâmetros helicais ENDS ratio, roll e twist. ENDS ratio >1.10 (Linha horizontal), Twist $>34.00^\circ$ e roll negativos indicaram sítios de DNA curvo nesses segmentos. Sítio de DNA *bent* A na posição 165 pb na seqüência da linhagem M11A e sítios de DNA *bent* B na posição 475 pb nas linhagens C24A e M11A.

A projeção bidimensional da estrutura tridimensional gerada pelo programa 3D15m1 está representada na Fig. 4, evidenciando as curvaturas dos fragmentos de restrição.

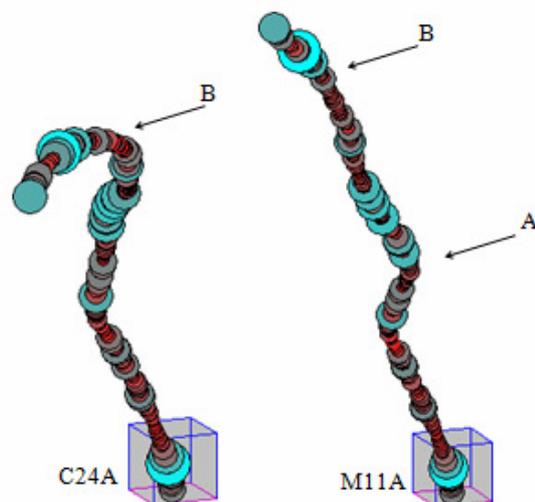


Figura 4. Projeção bidimensional da trajetória 3D do gene da Actina citoplasmática A3 de linhagens de *B. mori*. Setas indicam sítios de DNA *bent* **A** (165 pb) e **B** (475 pb). Os círculos coloridos indicam a variação de energia livre (ΔG) (em azul o ΔG é maior). Os resultados mostram que ambos os fragmentos possuem sítios de DNA *bent* não centralizados.

4 CONCLUSÃO

O presente estudo mostrou que a linhagem M11A (susceptível) de *B. mori* possui dois sítios (A e B) de DNA *bent* no primeiro intron do gene da Actina A3, enquanto a linhagem C24A (resistente) possui apenas um (B). A análise bidimensional dos fragmentos mostrou uma diferença na estrutura das duas moléculas. Estas variações estruturais podem estar relacionadas a interação de proteínas virais com o promotor intrônico, determinando a existência de linhagens de *B. mori* resistentes ao BmMNPV.

REFERÊNCIAS

CALLADINE, C. R. et al. **Understanding DNA**. 3 ed. Londres: Elsevier Academic Press, 2004. p. 39-60.

FATYOL, K. et al. Molecular characterization of a stably transformed *Bombyx mori* cell line: identification of alternative transcriptional initiation sites of the A3 cytoplasmic actin gene. **Mol. Gen. Genet.**, v. 260, n. 1, p. 1-8, 1998.

FIORINI, A.; GOUVEIA, F. S.; FERNANDEZ, M. A. Scaffold/matrix attachment regions and intrinsic DNA curvature. **Biochemistry**, v. 71, p. 481-488, 2006.

GIMENES, F. et al. Intrinsically bent DNA in replication origins and gene promoters. **Gen. Mol. Resea.** v. 7, n. 2, p. 549-558, 2008.

KASMAN, L. M.; VOLKMAN, L. E. Filamentous actin is required for lepidopteran nucleopolyhedrovirus progeny production. **Journal of General Virology**. v. 81, p. 1881–1888, 2000.