



## MAPEAMENTO DE SÍTIOS DE CURVATURA EM SUBCLONES DA REGIÃO AMPLIFICADA *OR1A* DO DNA DE HAMSTER CHINÊS

**Cristiane Carlos Cristiano<sup>1</sup>; Bruna Manuelli Teles Moreira<sup>1</sup>; Ethiene Cristina Tomba<sup>1</sup>;  
Karen Izumi Takeda<sup>2</sup>; Maria Aparecida Fernandez<sup>3</sup>; Adriana Fiorini<sup>4</sup>**

**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 *oriGNA13*. Quando a eficiência de iniciação da *oriGNA13* 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* para obtenção do gráfico de ENDS ratio e fragmentos de restrição da região foram analisados através do comportamento eletroforético em géis de poliacrilamida. A análise computacional indicou picos de curvatura intrínseca de DNA na região do domínio da *oriA* (com valores de ENDS ratio acima de 1,2). A análise do comportamento eletroforético em géis de poliacrilamida revelou redução na mobilidade de fragmentos pertencentes ao início do fragmento, também na região *oriA*, confirmando a análise computacional. Estes resultados indicam que a região putativa de origem de replicação *oriA*, no domínio amplificado do gene *AMPD2* de hamster Chinês, apresenta sítios de curvatura intrínseca, que podem exercer papel regulatório nesta região.

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

### 1 INTRODUÇÃO

Segmentos curvos de DNA 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, ou seja, dependente da seqüência de nucleotídeos e são ocasionados pela repetição periódica de regiões que contêm trechos de 2 ou mais Adeninas/Timinas (dA/dT) dispostas a cada ~10 pares de bases, uma volta de hélice de DNA, ou múltiplos de 10 (Anderson, 1986).

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

<sup>1</sup>Acadêmicas do Curso de Ciências Biológicas do Centro Universitário de Maringá – CESUMAR. [cris\\_sol\\_c@hotmail.com](mailto:cris_sol_c@hotmail.com), [brunamanuelli@yahoo.com.br](mailto:brunamanuelli@yahoo.com.br), [ethitomb@gmail.com](mailto:ethitomb@gmail.com)

<sup>2</sup>Mestranda em Genética e Melhoramento. Universidade Estadual de Maringá. Maringá – PR. [karen.takeda@gmail.com](mailto:karen.takeda@gmail.com)

<sup>3</sup>Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. da Universidade Estadual de Maringá. Coordenadora da Central de Biologia Molecular, Estrutural e Funcional – COMCAP – UEM. [aparecidafernandez@gmail.com](mailto:aparecidafernandez@gmail.com)

<sup>4</sup>Orientadora e docente do Curso de Ciências Biológicas do Centro Universitário de Maringá – CESUMAR. [fiorini@cesumar.br](mailto:fiorini@cesumar.br)

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, exercendo um papel regulatório nestas regiões.

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 visou o mapeamento de sítios de DNA *bent* (curvo) intrínsecos na região onde se localiza a origem de replicação *oriA* no segmento poligênico amplificado do gene *AMPD2* em hamster Chinês.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 TRANSFORMAÇÃO BACTERIANA

O inserto de DNA 6,6 kb, pertencentes à região amplificada onde se localiza a origem de replicação *oriA*, já se encontram subclonado em plasmídeo. Este clone foi gentilmente cedido pela Profa. Dra. Maria Aparecida Fernandez, do COMCAP-UEM. Para se obter uma quantidade suficiente de DNA recombinante (inserto+vetor) para a pesquisa, este clone foi introduzido, por choque térmico, em cepas recombinantes de *E. coli* DH5 $\alpha$  e as colônias selecionadas em meio LB sólido (Luria Bertani na presença de ampicilina).

### 2.2 EXTRAÇÃO DO DNA RECOMBINANTE

As colônias recombinantes foram isoladas e o DNA foi extraído pelo método de preparação de DNA plasmidial, utilizando-se o reagente CTAB, brometo de cetil trimetilamônio (Del Sal et al., 1989).

### 2.3 ANÁLISE DA CURVATURA POR PROGRAMAS COMPUTACIONAIS

A seqüência do fragmento de 6,6 kb foi analisada utilizando o algoritmo de Eckdahl e Anderson (1987) através do programa computacional Map15a, gentilmente cedido por Philippe Pasero (Institute of Molecular Genetics, Montpellier, France) e Monique Marilley (Universite de la Mediterranee, Faculte de Medecine, Marseille, France), para a obtenção do gráfico de curvatura.

### 2.4 REAÇÕES DE CLIVAGEM COM ENZIMAS DE RESTRIÇÃO

O DNA recombinante foi clivado com enzimas de restrição *Xba*I; *Eco*RI; *Ava*I; *Sma*I e *Hind*III, visando centralizar as regiões contendo curvatura intrínseca. As reações foram mantidas a 37°C por aproximadamente 2 horas, seguido por purificação com fenol e clorofórmio e ressuspensão em tampão TE pH 8,0 (Tris-HCl 10mM + EDTA 1mM).

## 2.5 ANÁLISE DO COMPORTAMENTO ELETROFORÉTICO

Os fragmentos de restrição foram analisados em géis de agarose a 1%; géis de poliacrilamida a 6%, a 4°C e géis de poliacrilamida a 6%, em temperatura ambiente na presença de 1 µg/ml de brometo de etídio. A migração dos fragmentos foi comparada entre os géis através do cálculo do Valor R (definido pela razão do tamanho aparente em pares de bases dos fragmentos no gel, pelo tamanho real). Valores R entre 0,90 e 1,10 indicam mobilidade normal;  $\geq 1,11$ , redução na mobilidade e  $< 0,90$ , rápida mobilidade (MILOT et al., 1992).

## 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Figura 1 mostra o gráfico de ENDS ratio (indica picos de curvatura intrínseca) da região de ~6,6 kb do domínio amplificado do gene *AMPD2* de hamster Chinês, que contém a *oriA* e o gene *GSMT4*. Observa-se que a região da *oriA* apresenta picos de curvatura com valores de ENDS ratio acima de 1,2.

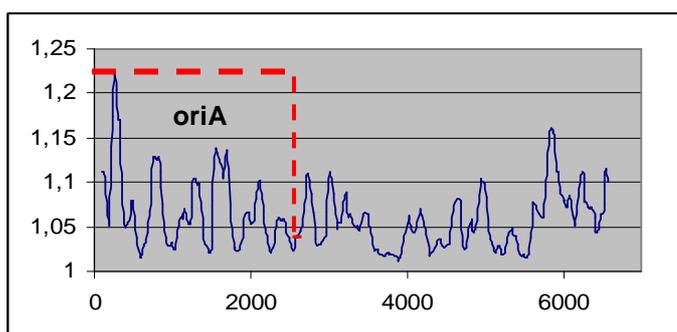


Figura 1. Análise *in silico* da curvatura intrínseca da região de ~6,6 kb do domínio amplificado do gene *AMPD2* de hamster Chinês, que contém a *oriA* e o gene *GSMT4*.

A análise do comportamento eletroforético dos fragmentos de restrição indicou fragmentos com mobilidade reduzida em géis de poliacrilamida (PA), indicativo da presença de curvatura intrínseca centralizada (setas), e mobilidade rápida, indicativo da presença de curvatura intrínseca descentralizada. A mobilidade normal na presença de brometo de etídio (PA+EtBr) comprovou que este comportamento eletroforético é devido à existência de sítios intrínsecos de curvatura. Géis de agarose foram utilizados como controle.

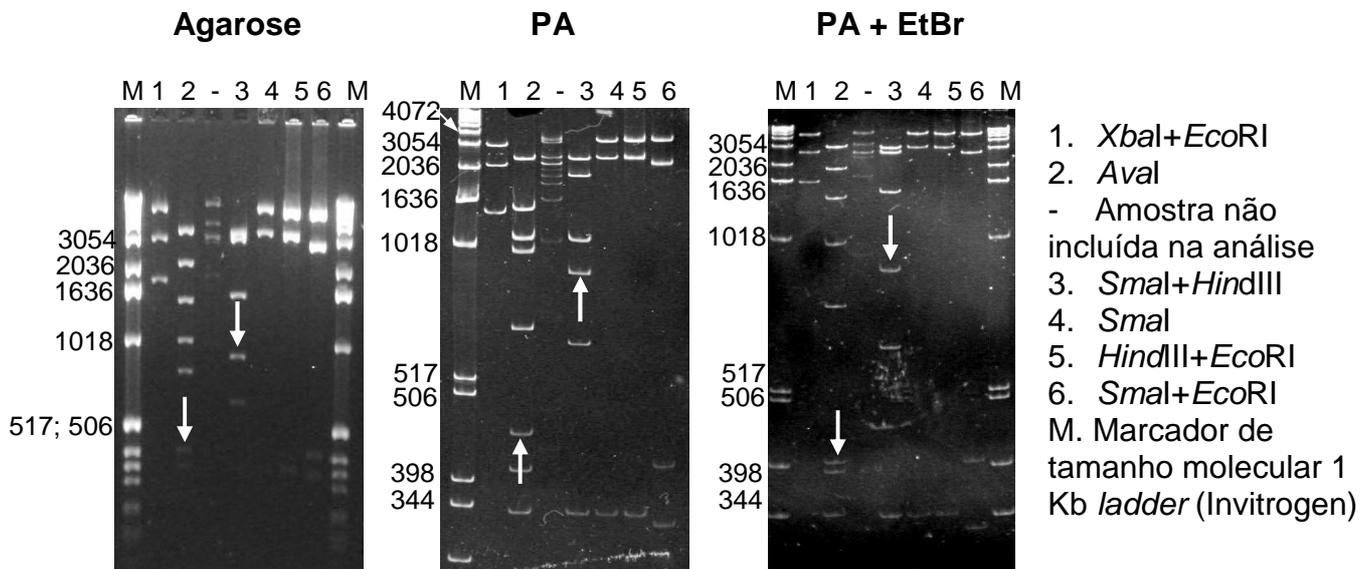


Figura 2. Análise do comportamento eletroforético dos fragmentos de restrição pertencentes à região contendo a *oriA* de hamster Chinês. As setas indicam fragmentos com mobilidade reduzida.

Após a corrida eletroforética, para cada fragmento foram obtidos os Valores R (VR) e um mapa de restrição foi construído (Figura 3). Foi possível observar que apenas dois fragmentos, pertencentes à região de origem de replicação putativa (*oriA*), apresentaram Valores R maiores que 1,10, indicando a existência de sítios intrínsecos de curvatura centralizados nestes fragmentos. Os demais fragmentos, no domínio do gene *GMST4*, apresentaram Valores R abaixo de 0,90, o que indica a existência de sítios curvos nas extremidades destes fragmentos.

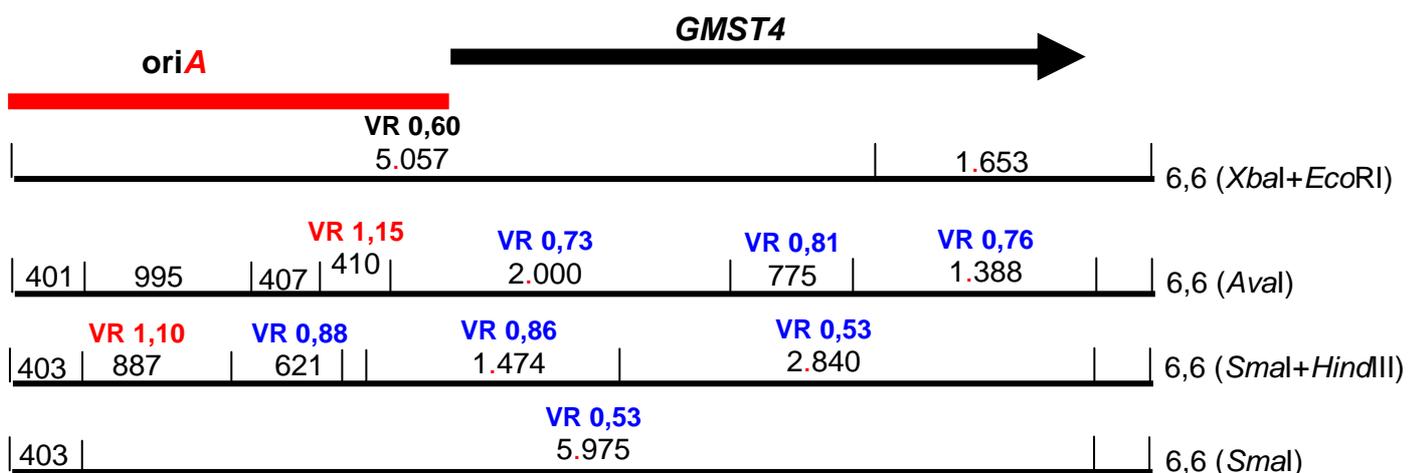


Figura 3. Mapa de restrição da região de ~6,6 kb mostrando a localização dos fragmentos de restrição, com seus respectivos tamanhos e Valores R. A *oriA* e o gene *GMST4* estão indicados no topo da figura.

#### 4 CONCLUSÃO

Com este trabalho foi possível concluir que a região do domínio amplificado do gene AMPD2 de hamster Chinês apresenta sítios de curvatura intrínseca. Vários autores relatam tanto a existência de sítios curvos de DNA em origens de replicação, quanto a importância funcional destas estruturas nestas regiões regulatórias. A próxima etapa deste trabalho será a construção de modelagens 2D e a análise detalhada das seqüências contendo estes locais de curvatura, como objetivo de identificar motivos de seqüência responsáveis por esta característica.

## REFERÊNCIAS

BIELINSKY, AK., *et. al.* Origin recognition complex binding to a metazoan replication origin. **Current Biology**, v. 11, n.18, p.1427-31, 2001.

CLAYCOMB, JM., ORR-WEAVER, TL. Developmental gene amplification: insights into DNA replication and gene expression. **Trends in Genetics**, v. 21, n. 3, p.149-62, 2005.

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

Del Sal G, Manfioletti G, Schneider C.. The CTAB-DNA precipitation method: a common mini-scale preparation of template DNA from phagemids, phages or plasmids suitable for sequencing. **Biotechniques** v. 7, n. 5, p. 514-520. 1989

ECKDAHL, TT., ANDERSON, JN. Computer modelling of DNA structures involved in chromosome maintenance. **Nucleic Acids Research**, v. 15, p. 8531-8545, 1987.

FIORINI, A., *et. al.* DNA bending in the replication zone of the C3 DNA puff amplicon of *Rhynchosciara americana* (Diptera: Sciaridae). **Molecular Biology Reports**, v. 33, p. 71-82, 2006b.

MESNER, LD., CRAWFORD, EL., HAMLIN, JL. Isolating apparently pure libraries of replication origins from complex genomes. **Molecular Cell**, v. 21, n. 5, p. 719-726. Erratum in: **Molecular Cell**, 2006, v. 21, n. 6, p. 881, 2006.

MILOT, E., *et. al.* Chromosomal illegitimate recombination in mammalian cells is associated with intrinsically bent DNA elements. **EMBO Journal**, v. 11, p. 5063-5070, 1992.