

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

SABRINA MARQUES GODINHO KELMER

**MATRIZ NUCLEAR ASSOCIADA AOS SEGMENTOS DE DNA *BENT* E NÃO *BENT*
IDENTIFICADOS NAS ORIGENS DE REPLICAÇÃO EM CÉLULAS DE HAMSTER
CHINÊS**

Maringá
2019

SABRINA MARQUES GODINHO KELMER

**MATRIZ NUCLEAR ASSOCIADA AOS SEGMENTOS DE DNA *BENT* E NÃO *BENT*
IDENTIFICADOS NAS ORIGENS DE REPLICAÇÃO EM CÉLULAS DE HAMSTER
CHINÊS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (área de concentração - Biologia Celular e Molecular), da Universidade Estadual de Maringá para a obtenção do grau de Doutor em Ciências Biológicas.

Orientadora: Profa. Dra. MARIA APARECIDA FERNANDEZ

Maringá
2019

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
(Biblioteca Central - UEM, Maringá – PR., Brasil)

Kelmer, Sabrina Marques Godinho

K29m Matriz nuclear associada aos segmentos de DNA *bent* e não *bent* identificados nas origens de replicação em células de Hamster Chinês/ Sabrina Marques Godinho Kelmer. -- Maringá, 2019.

49 f. : il. color., figs., tabs.

Orientadora: Prof.a. Dr.a. Maria Aparecida Fernandez.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas, Área de Concentração em Biologia Celular e Molecular, 2019.

1. Origens de replicação. 2. Matriz nuclear. 3. DNA intrinsecamente curvo. 4. Gene AMPD2. I. Fernandez, Maria Aparecida, orient. II. Universidade Estadual de Maringá. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas. Área de Concentração em Biologia Celular e Molecular. III. Título.

CDD 22. ED.595.774

Jane Lessa Monção CRB9 1173

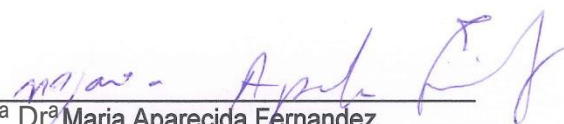
SABRINA MARQUES GODINHO KELMER

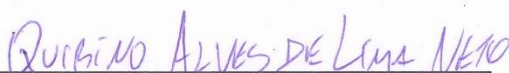
**MATRIZ NUCLEAR ASSOCIADA AOS SEGMENTOS DE DNA *BENT* E NÃO *BENT*
IDENTIFICADOS NAS ORIGENS DE REPLICAÇÃO EM CÉLULAS DE HAMSTER
CHINÊS**

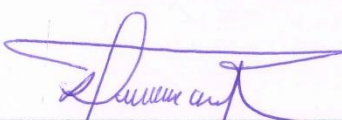
Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (área de concentração - Biologia Celular e Molecular), da Universidade Estadual de Maringá para a obtenção do grau de Doutor em Ciências Biológicas.

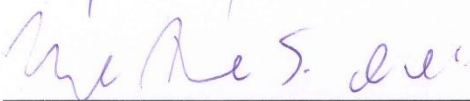
Aprovado em: 28/02/2019

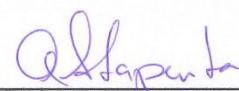
BANCA EXAMINADORA


Prof.ª Dr.ª Maria Aparecida Fernandez
Universidade Estadual de Maringá


Prof. Dr. Quirino Alves de Lima Neto
Universidade Estadual de Maringá


Prof.ª Dr.ª Lucinéia Fátima Chasko-Ribeiro
Universidade Estadual do Oeste do Paraná


Prof. Dr Marco Aurélio Schüler de Oliveira
Universidade Estadual de Maringá


Prof.ª Dr.ª Ana Silvia Lapenta
Universidade Estadual de Maringá

BIOGRAFIA

Sabrina Marques Godinho Kelmer, natural de Maringá/PR, casada, Bacharel em Biomedicina pela Faculdade Ingá – Unidade de Ensino Superior Ingá (2011), Mestre em Biologia Molecular e Celular pelo programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (2015), especialização em Gestão e Educação Ambiental, pela Uniasselvi (2016).

AGRADECIMENTOS

À Deus, inteligência suprema que conduz com perfeição a obra de Suas mãos.

Ao nosso Mestre Jesus, pelos ensinamentos de amor e perdão.

À minha família, pelo suporte e inspiração, Fábio e Rebeca.

À Profa. Dra. Maria Aparecida Fernandez, por me aceitar como aluna e pela oportunidade de crescer em conhecimento técnico-científico para desempenhar este trabalho e aos demais alunos do laboratório pelo apoio.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Biológicas – área de concentração Biologia Celular e Molecular, PBC.

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), mantenedora da bolsa de estudos.

Ao apoio técnico dos funcionários Marli Licero e Valmir Perón.

À secretaria do Programa de pós-graduação em Ciências Biológicas (PBC).

À Universidade Estadual de Maringá-PR, pela estrutura de laboratórios multiusuários e equipamentos do COMCAP – Complexo de Centrais de Apoio à Pesquisa e a Pró-reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação (PPG).

APRESENTAÇÃO

Esta tese é composta por dois artigos científicos, que serão enviados para publicação, em consonância com as Resoluções 038/2017 e 021/2018 do Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas, PBC.

I. Artigo completo redigido de acordo com a revista *International Journal of Molecular Sciences*, ISSN 1422-0067. Qualis B1 no CBI da CAPES.

Matriz nuclear associada ao DNA bent e não bent identificados em segmentos relacionados as origens de replicação presentes no domínio contendo o gene *AMPD2* em hamster Chinês

Sabrina M. G. Kelmer¹, Fabiana S. Rando², Ana P. S. Oliveira¹, Fabio R. Rosado³, Adriana F. Rosado³ e Maria A. Fernandez ^{1*}

1 Departamento de Biotecnologia, Genética e Biologia Celular, Universidade Estadual de Maringá, 87020-900 Maringá, Paraná, Brasil; sabrinamg12@hotmail.com (S.M.G.K.); paula-silva-oliveira@hotmail.com (APSO)

2 Central de Biologia Celular, Molecular e Estrutural do Complexo de Centrais de Apoio à Pesquisa, CBM/COMCAP, Universidade Estadual de Maringá, Av. Colombo 5790, Maringá, 87020-900, Paraná, Brazil. fabianasrando@gmail.com (F.S.R)

3 Departamento de Biociências, Universidade Federal do Paraná, setor Palotina, 85950-000 Palotina, Paraná, Brasil; fabiorosado@ufpr.br (F.R.R.); drifiorini@gmail.com (AFR).

II. Revisão, redigida de acordo com a revista *Genetics and Molecular Biology*, ISSN 1415-4757. Qualis B1 no CBI da CAPES.

Gene *AMPD2*: modelo para análise de origens de replicação em mamíferos

Sabrina Marques Godinho Kelmer¹, Maria Aparecida Fernandez¹.

¹Departamento de Biotecnologia, Genética e Biologia Celular, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, Paraná, Brasil.

RESUMO GERAL

Na busca pela elucidação dos mecanismos que envolvem o crescimento, divisão, e os fatores regulatórios do ciclo celular em eucariotos, muitos estudos apontam estruturas e moléculas que podem estar intimamente relacionadas aos processos de replicação e reparo do DNA, bem como direcionam sua proliferação ordenada ou não, como nos casos de carcinogêneses.

O câncer é um grupo de doenças caracterizadas pelo crescimento incontrolável e propagação anormal de células, segundo a estimativa do INCA para o biênio 2018-2019, devem ocorrer 600 mil novos casos de câncer, para cada ano no Brasil.

Um possível biomarcador para células tumorais é a matriz nuclear, alterações de suas proteínas já foram identificadas em câncer de bexiga, colon, fígado e soro de pacientes. A matriz nuclear corresponde a estrutura proteica residual do núcleo, obtida através de tratamentos bioquímicos para remoção quase total de DNA, RNA e demais componentes celulares.

In vivo, a matriz nuclear é descrita como responsável por ordenar a funcionalidade do núcleo, principalmente nos processos de replicação e transcrição do DNA, na arquitetura do núcleo, principalmente na organização do DNA, onde a molécula interage com regiões específicas de ancoramento, denominadas MARs (*Matrix Attachment Regions*), permitindo formação de loops de DNA, que foram classificados como estruturas operacionais facultativas durante a replicação.

Alguns elementos estruturais, como DNA intrinsecamente curvo ou DNA *bent*, foram relacionadas as regiões S/MARs, devido suas características em comum, principalmente pela sequência rica nas bases adenina (A) e timina (T).

Estudo anteriores apontam a interação da matriz nuclear com trechos de DNA *bent* próximos ou associados às origens de replicação. Um modelo para este estudo foi identificado no domínio do gene que codifica a enzima Adenilato deaminase 2, *AMPD2*, em linhagens de células transformadas, denominadas GMA32, originadas de fibroblastos de pulmão de hamster Chinês, as quais apresentaram uma superprodução do gene *AMPD2*, após tratamento com drogas antineoplásicas.

Neste domínio estão presentes os genes *GNAI3*, *GNAT2*, *AMPD2* e *GSTM4*. Entre os genes *GNAI3* e *GNAT2*, foi descrito uma região preferencial para a iniciação da replicação, a *oriGNAI3*. Outras origens potenciais são ativadas (*oriC*, *oriB* e *oriA*)

nesse segmento, quando a eficiência de iniciação da *oriGNAI3* é diminuída por modificação da cromatina na região.

Os segmentos de DNA *bent* (b) e não-*bent* (nb) foram determinados por análises computacionais, que identificaram trechos com curvatura intrínseca da molécula (*bent*), enquanto outros trechos, não-*bent*, foram incapazes de apresentar tal característica, presentes no domínio contendo o gene *AMPD2*, os quais foram mapeados e selecionados para a análise deste trabalho.

Os resultados obtidos demonstram uma interação dinâmica e significativa com as origens de replicação à estrutura da matriz nuclear e sua fração loop, considerando para a análise no segmento preferencial para replicação, a *oriGNAI3*, as regiões b2 e nb7, com detecção equitativa nas amostras de matriz nuclear e loop. Na origem *oriC*, os segmentos *bent* b4a e b4b, apresentam interações, sendo uma banda de maior intensidade na fração loop do b4b, enquanto para as duas frações não-*bent*, nb10 e nb11, analisadas nessa região, se apresentaram fortemente ligadas à matriz nuclear, embora a fração nb10 está localizada fora do local atribuída à *oriC*.

Foi observado na origem de replicação *oriB*, uma caracterização de associação à matriz nuclear bem distinta, das três regiões não-*bent*, nb1, nb2 e nb3, apenas a nb1 não está associada à matriz nuclear. De duas frações intrinsecamente *bent* analisadas, b5 e b6, as duas estão associadas intensamente à matriz nuclear, embora a fração b6 esteja à aproximadamente 2.700 pb à jusante da *oriB*.

Esta tese fornece resultados inéditos de caracterização de DNA *bent* e não-*bent* associado à matriz nuclear *in vivo*, em segmentos portadores de origens de replicação do DNA, *oriGNAI3*, *oriC* e *oriB* identificadas no domínio contendo o gene *AMPD2*, em células GMA32, contribuindo desta forma para uma melhor compreensão dessas estruturas em sítios detectados como de atividade de iniciação da replicação em mamíferos.

PALAVRAS-CHAVE: origens de replicação, matriz nuclear, DNA intrinsecamente curvo, gene *AMPD2*.

ABSTRACT

In the search for elucidation of the mechanisms that involve the growth, division, and regulatory factors of the cell cycle in eukaryotes, many studies propose to structures and molecules that may be closely related to DNA replication and repair processes, as well as directing their ordered proliferation or not, as in cases of carcinogenesis.

Cancer is a group of diseases characterized by uncontrollable growth and abnormal cell spread, according to INCA estimates for the 2018-2019 biennium, there should be 600,000 new cases of cancer each year in Brazil.

A possible biomarker for tumor cells is the nuclear matrix, changes in their proteins have already been identified in bladder, colon, liver and patient serum. The nuclear matrix corresponds to the residual protein structure of the nucleus, obtained through biochemical treatments for almost total removal of DNA, RNA and other cellular components.

In vivo, the nuclear matrix is described as responsible for ordering the nucleus functionality, especially in DNA replication and transcription processes, in the nucleus architecture, mainly in DNA organization, where the molecule interacts with specific anchoring regions, called MARs (Matrix Attachment Regions), allowing the formation of DNA loops, which were classified as facultative operational structures during replication.

Some structural elements, such as intrinsically curved DNA or bent DNA, were related to the S / MARs regions, due to their common characteristics, mainly by the base rich sequence adenine (A) and thymine (T).

Previous studies point to the interaction of the nuclear matrix with stretches of bent DNA close to or associated with the origins of replication. A model for this study was identified in the domain of the gene encoding the enzyme adenylate deaminase 2, AMPD2, in transformed cell lines, called GMA32, originating from Chinese hamster lung fibroblasts, which had an overproduction of the AMPD2 gene after treatment with antineoplastic drugs.

In this domain the genes GNAI3, GNAT2, AMPD2 and GSTM4 are present. Among the GNAI3 and GNAT2 genes, a preferential region for initiation of replication, oriGNAI3, has been described. Other potential sources are activated (oriC, oriB and

oriA) in this segment when the initiation efficiency of oriGNAI3 is decreased by modifying the chromatin in the region.

The bent (b) and non-bent (nb) DNA segments were determined by computational analysis, which identified sections with intrinsic bent curvature, while other non-bent segments were unable to show this characteristic, present in the domain containing the AMPD2 gene, which were mapped and selected for the analysis of this work.

The results obtained demonstrate a dynamic and significant interaction with the origins of replication to the nuclear matrix structure and its loop fraction, considering for the analysis in the preferential segment for replication, oriGNAI3, regions b2 and nb7, with equitable detection in the matrix samples nuclear and loop. In the origin oriC, the bent segments b4a and b4b, present interactions, being a band of greater intensity in the loop fraction of b4b, whereas for the two non-bent fractions, nb10 and nb11 analyzed in this region, they were strongly linked to the nuclear matrix, although the fraction nb10 is located outside the site attributed to oriC.

It was observed in the origin of replication oriB, a characterization of association to the very distinct nuclear matrix, of the three non-bent regions, nb1, nb2 and nb3, only nb1 is not associated to the nuclear matrix. Of two intrinsically bent fractions analyzed, b5 and b6, the two are strongly associated to the nuclear matrix, although fraction b6 is at approximately 2,700 bp downstream of oriB.

This thesis provides unpublished results of bent and non-bent DNA characterization associated with the nuclear matrix *in vivo*, in segments bearing origin of DNA replication, oriGNAI3, oriC and oriB identified in the domain containing the AMPD2 gene in GMA32 cells form for a better understanding of these structures at sites detected as mammalian initiation of replication.

KEYWORDS: origins of replication, nuclear matrix, intrinsically curved DNA, AMPD2 gene.



Artigo de Revisão

GENE *AMPD2*: MODELO PARA ANÁLISE DE ORIGENS DE REPLICAÇÃO EM MAMÍFEROS

Sabrina Marques Godinho Kelmer¹ e Maria Aparecida Fernandez¹.

¹ Departamento de Biotecnologia, Genética e Biologia Celular, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, Paraná, Brasil.

Resumo

No estudo para identificar os mecanismos e estruturas envolvidas com as origens de replicação do DNA em eucariotos superiores, foram adotados modelos de sistemas experimentais. O domínio amplificado que contém o gene *AMPD2*, estabelecido em células de hamster Chinês, que permite análises *in silico* de regiões de origens de replicação, que são ativadas para este processo fundamental na manutenção e propagação do ciclo celular. Nesta revisão abordaremos este modelo que foi amplamente estudado e estabelecido, indicando sua importância e relevante análise de estudos, que contribuem para esclarecer os processos de replicação, principalmente relacionadas às desordens celulares responsáveis pela tumorigênese.

Palavras chave: replicação de DNA eucariótico, amplificação gênica, biossíntese, células de mamíferos.

Envio de correspondência para Maria Aparecida Fernandez. Departamento de Biotecnologia, Genética e Biologia Celular, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, Paraná, Brasil. E-mail mafernandez@uem.br or aparecidafernandez@gmail.com; Tel.: +55-44-3011-5398

Introdução

Desvendar as origens de iniciação de replicação de DNA em mamíferos permanece como tema de diversos estudos e pesquisas, diante dos desafios de identificar os mecanismos e estruturas envolvidas, como alguma sequência consenso no genoma, que poderiam direcionar protocolos para aplicação clínica na tentativa de facilitar diagnóstico, prognóstico e tratamento de células tumorais. Durante o processo de replicação em eucariotos, muitas forquilhas são requeridas para uma síntese eficiente, que ocorre através de regulações meticulosas extremamente importantes, para manter e preservar a integridade da molécula, bem como direcionar sua proliferação ordenada ou não (Shen, 2011). Há cinquenta anos, a pesquisa de Huberman e Riggs (1968) demonstrou pela primeira vez que há múltiplos sítios e bidirecionais de origens de replicação, com intervalos de aproximadamente 100 kb (quilo bases) ao longo das fibras de cromossomos de mamíferos. Desde então, muitos estudos têm se baseado em modelos de

amplificação gênica para desenvolver métodos de investigação para identificar as origens de iniciação de replicação.

O primeiro modelo adotado foi o domínio da enzima dihidrofolato redutase (DHFR) em células de ovário de hamster Chinês e em HeLa. (Dijkwel *et al.*, 1991; Hamlin, 1992; Altman e Fanning, 2004; Mesner *et al.*, 2006), foi descoberto a partir de pacientes em tratamento com câncer que apresentaram resistência ao medicamento metotrexato. Este modelo requer múltiplos eventos de recombinação independente para gerar cópias com heterogeneidade, em número substancial detectado em populações celulares, no entanto os aspectos citogenéticos deste modelo dificultou a expansão de sua análise *in vitro*. (Wahl *et al.*, 1993)

Na década de 90, pesquisadores da Unité de Génétique Somaticque, Institut Pasteur, Paris, França, isolaram em células de fibroblasto de pulmão de hamster Chinês GMA32, que demonstraram resistência a drogas antineoplásicas, uma linhagem denominada 42, com superprodução do gene Adenilato deaminase 2, *AMPD2*, a qual conferiu a esta linhagem sobrevivência diante da ação inibitória de fármacos que atuam diretamente nas sínteses endógena e exógena de nucleotídeos fundamentais para o metabolismo energético celular. (Toledo *et al.*, 1998; 1999; 2000; Anglana *et al.*, 2003; Debatisse *et al.*, 2004; Courbet *et al.*, 2008)

Desta forma, o domínio contendo o gene *AMPD2*, foi sequenciado e mapeado, se tornando um sistema importante para análise de origens de replicação, já que este modelo apresenta segmentos de amplificação que são ativadas mais que uma vez no ciclo celular, promovendo cópias adicionais de extensas regiões do genoma. (Herrick *et al.*, 2005)

As amplificações gênicas são características essenciais de vários tipos de cânceres avançados, sendo esta uma característica significativa para prognóstico, tratamento clínico e terapêutico do câncer. Modelos que explicam o processo de amplificação, como ciclo de ruptura-fusão-ponte, excisão e segregação desigual de fragmentos de DNA extracromossômicos, prediz que independente de rupturas na dupla fita de DNA, a maioria ocorre para induzir a formação de amplificação. Muitos fatores celulares, teciduais e ambientais induzem danos e amplificações do DNA, indicando características de sequências de DNA lábil, com sítios frágeis que facilitam tais amplificações. (Myllykangas, e Knuutila, 2006; Graux, *et al.*, 2004, Hahn, 1993)

Diante das aberrações que algumas cópias de DNA podem sofrer, a análise *in loco* das origens de replicação identificadas nesses sistemas de amplificação gênica, permite mapeá-las e determinar que são derivadas de tipos celulares e regiões cromossômicas específicas. (Toledo *et al.*, 1998; DePhamphilis, 1999; Biamonti *et al.*, 2003; Tower, 2004)

1. Importância metabólica e identificação do gene *AMPD2*

A enzima adenilato desaminase (AMPD) ocorre em várias isoformas nos tecidos de mamíferos, sua importância fisiológica é indicada pela identificação de inerentes deficiências metabólicas. O gene está localizado no cromossomo 1 de humano (locus 1p13) e no cromossomo 3 de rato (Baron, *et al.*, 1996; Debatisse, *et al.*, 1992). O gene *AMPD2* é evolutivamente

conservado nos mamíferos, essencial para a manutenção do metabolismo energético das células, principalmente na síntese *de novo* de purinas, que são mediadas pelo *feedback* negativo na regulação dos nucleotídeos adenosina e guanina. (Akizu, et al., 2013, Szydłowska, 2008)

O *AMPD2* é um dos três parálogos em mamíferos para a conversão de AMP (adenosina monofosfato) em IMP (Inosina monofosfato), que é o primeiro nucleotídeo formado na síntese endógena (Bausch-Jurken, et al., 1992), a partir de um gene em comum AMP Deaminase, gene *AMPD1*. O gene *AMPD2* humano apresenta sequência com de 53% identidade e 69% similaridade sobre os 623 aminoácidos, quando comparado com os genes *AMPD1* e *3*.

As três isoenzimas identificadas para o gene foram: *AMPD1* presente no músculo esquelético, enquanto o *AMPD2* é expresso em tecido muscular visceral, principalmente no fígado e o *AMPD3*, presente nos eritrócitos, os quais desempenham propriedades fisiológicas, catalítica e regulatória. (Helmering, et al. 2014)

Indivíduos com homozigose do *AMPD1* apresentam mutações e deficiência de mioadenilato deaminase, possivelmente a doença genética mais prevalente em humanos. No entanto, apenas um pequeno percentual de indivíduos homozigotos-deficientes apresenta sintomas, incluindo acúmulo de AMP resultando em fadiga muscular e cólicas (Fishbein et al., 1978). Para as mutações na homozigose do gene *AMPD3* os indivíduos são saudáveis (Ogasawara et al., 1987), mas apresentam o aumento nos níveis do nucleotídeo adenosina nos eritrócitos. Análise por RT-PCR da família do gene em tecidos humanos mostra expressão predominante de *AMPD1* restrito ao músculo, mas *AMPD2* e *3* com expressão generalizada.

A deficiência do gene *AMPD2*, resulta em definitivo a iniciação GTP-dependente na translocação de proteínas, correlacionando essa condição fenotípica com doenças neurodegenerativas, onde mutações no gene *AMPD2* afetam diretamente o sistema nervoso e o parênquima cerebelar, causando hipoplasia ponto-cerebelar, que pode ser contida através de administração de precursores de purinas, indicando assim, um novo tratamento em potencial para doenças neurodegenerativas em quadros iniciais. (Akizu, et al, 2013)

Durante transformação de tecidos neoplásicos, o metabolismo de purinas sofre mudanças substancialmente, sendo observado mudanças metabólicas relacionadas com expressão desses genes em amostras de carcinoma hepatocelular. (Szydłowska, 2008; Chapman, et al, 1976; Weber, et al, 1998).

Estudos apontam a associação de mutação no gene *AMPD2* com síndromes nefrótica e hipercolesterolemia em ratos, sendo identificado uma transversão da guanina-timina resultando na conversão entre os aminoácidos alanina pela serina na posição 341 do gene. Alterando o ciclo das purinas no catabolismo do AMP para ácido úrico. (Helmering, et al, 2014)

Durante investigações do metabolismo de purinas na linhagem CCL39 fibroblastos de hamster Chinês, pelo grupo de pesquisa da Profa. Dra. Michelle Debatisse, Institut Pasteur, Paris, França, verificou em algumas populações das células GMA32, a deficiência de desoxicitidina

quinase, enzima responsável pela fosforilação na síntese de mononucleotídeos, atuando em medicações antineoplásicas. Nestas linhagens foi observado, portanto uma mutação na superprodução do gene AMPD2, para compensar tal deficiência, a qual permitiu a capacidade do desenvolvimento normal das células.

A população celular foi isolada em meio seletivo contendo conformicina, que é um inibidor da adenosina desaminase (ADA) em altas concentrações também inibe o AMPD, essas duas enzimas controlam o canal de purinas para os compartimentos adenílico e guanílico. Quando a biossíntese da inosina monofosfato (IMP) é bloqueada pela azasserina (inibidor da atividade enzimática que envolve a glutamina), as células podem recuperar purinas adenílicas exógenas, tanto as desoxiadenosinas como adenina. Portanto, um meio contendo azasserina e desoxiadenosina, inibição de ADA pela conformicina leva à morte celular devido à inanição de IMP e derivados guanílicos, (Debatisse, et al. 1992), conforme representado na Figura 01.

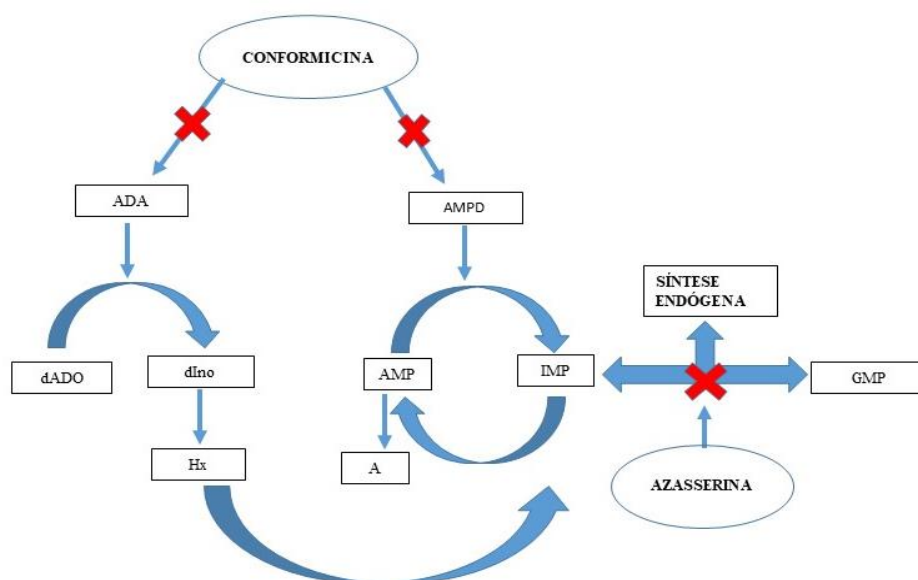


Figura 01: Ações simultâneas da interrupção da biossíntese *de novo* das purinas, pelos dois medicamentos, conformicina e azasserina, inibidores da ação das enzimas envolvidas, onde A (adenina), dAdo (desoxiadenosina), dIdo (desoxiinosina), Hx (hipoxantina), AMP (adenosina monofosfato), IMP (inosina monofosfato), GMP (guanosina monofosfato), AMPD (adenilato deaminase), ADA (adenosina deaminase). Fonte: adaptada de Debatisse, et al 1992.

A adenina é convertida em IMP após fosforilação pelo APRT (adenina fosforibosil transferase) e desaminação pelo AMPD. Usando a fonte desta purina, as células crescem AMPD-depende, que pode ser evitado pela adição de conformicina ao meio.

As mutantes resistentes foram selecionadas em cada um destes dois meios complexos e foi mostrado uma superexpressão ou de ADA ou de AMPD. O meio seletivo para AMPD foi usado com sucesso para cultura de células humanas e de rato. Sendo amplamente estudado essa condição de superprodução de AMPD mutante.

Na GMA32 seu crescimento eficiente na presença de adenina como fonte de purina foi reduzido com 0,5 µg/ml de conformicina. Três clones resistentes foram recuperados e analisados, apresentando um aumento na atividade AMPD-específica, sendo resistente apenas para concentrações de conformicina usadas para a seleção. Durante o crescimento prolongado em meio regular, a maioria das células retornaram ao estado selvagem para sensibilidade da droga. Dois clones foram capazes de crescer em meio contendo dez vezes mais concentração da droga (5,0 µg/ml), sendo isoladas para a primeira etapa da mutação. (Debatisse *et al*, 1993, cap. 13 p.173)

Desta forma o segmento do gene AMPD2 amplificado corresponde a uma região de aproximadamente 70 kb, a qual foi clonada em cosmídeos e em plasmídeos, transformados em bactérias competentes *Escherichia coli* DH5α por choque térmico ou eletroporação, e o DNA recombinante foi obtido após cultura por 16-18 horas a 37°C em meio LB (Sambrook e Russel, 2001) por extração pelo método do CTAB (Del Sal *et al.*, 1989).

A amplificação do segmento do gene AMPD2 foi mapeada e apresenta os domínios dos genes GNAI3, GNAT2, e GSTM4, dentre as origens de replicação detectadas, a origem preferencial para a iniciação da replicação no segmento é a oriGNAI3. Entretanto, quando a eficiência de iniciação da oriGNAI3 é diminuída, outras origens, oriC, oriB e oriA, são ativadas no segmento amplificado (Anglana *et al.*, 2003; Debatisse *et al.*, 2004, Lima Neto, *et al*, 2014). Como nenhuma sequência consenso foi encontrada nessas essas regiões, a presença de uma estrutura particular no DNA pode ser o fator determinante para que as mesmas funcionem como regiões de iniciação da replicação.

Como descrito por Toledo, *et al*, 1998, foi observado em relação aos outros sistemas, as sequências cromossômicas amplificadas em células com superexpressão de AMPD2 é o maior até o momento para seleção de gene, apresentando cerca 100-150 unidades de cópias mutantes acumulado do gene.

Em trabalhos anteriores deste grupo foi notada a propriedade de mecanismos de rearranjos cromossomal e segregação desigual na mitose, devido iniciação de replicação anormais durante amplificação de DNA em mamíferos, que frequentemente as células adquirem múltiplas cópias do gene AMPD2 no ciclo ruptura-fusão-ponte das cromátides (Debatisse, *et al.*, 1992, Toledo, *et al.*, 1992, Coquelle, *et al.*, 1997). Este modelo de ruptura-fusão-ponte, se baseia no modelo proposto por McClintock, nos eventos iniciação entre as regiões homólogas da cadeia.

Portanto, é de particular interesse que, que a presença de um gene amplificável naturalmente, possa ser explorada para ordenar um agrupamento de genes estudando os padrões de segregação das sequências que flanqueiam os genes independentes, demonstrando sua versatilidade como ferramenta fundamental nos estudos de replicação do DNA.

2. O segmento do gene AMPD2 no estudo de replicação do DNA

Diante deste modelo de sistema de amplificação gênica, vários estudos foram realizados referente à replicação de DNA, bem como evidenciar estruturas e/ou características específicas

da molécula de DNA intimamente relacionadas a este processo complexo que eucariotos superiores apresentam.

Os domínios presentes no segmento contendo o gene *AMPD2*, foram amplamente avaliados na participação dos eventos de iniciação de replicação do DNA. Pela detecção de uma zona de iniciação de replicação em uma região intergênica *GNAI3-GNAT2*, através de análise de gel de eletroforese 2D e análise cromossômica por sondas fluorescentes, para avaliar os mecanismos de rearranjos cromossômicos que dependem a segregação desigual na mitose, sendo responsáveis pela amplificação do DNA em mamíferos: as células adquirem mais frequentemente múltiplas cópias do gene *AMPD2* através de ciclos de pontes de fusão-fusão-cromátide. Os padrões de replicação nesses dois genes foram muito diferentes; as forquilhas de replicação do gene *GNAI3* se orientam em uma única direção, enquanto as do gene *GNAT2* progridem em ambas as direções dentro do gene. (Toledo, *et al*, 1998; 1999)

Na comparação da homologia de sequências da estrutura 3' terminal do gene *GNAI3* entre humano e hamster, bem como sua alta conservação na cadeia C terminal da proteína codificada pelo gene *Gai3*, observada nas espécies rato (94%), em cobaias (95%) e humano (92%), além de *xenopus* com 80%. Dados confrontados pelo autor no *GeneBank/EMBL* banco de dados com sequências de 4.8 Kb. Na análise de homologia da cadeia polipeptídica pelo banco de dados *Swissprot*, na sequência deduzida por 8 exons, revelou que os 64 aminoácidos são totalmente conservados entre hamster Chinês, humano e porquinho da Índia, e poucas modificações em bovino, rato e *xenopus*. (Baron, *et al*, 1994)

Estudos posteriores, no entanto, demonstram a preferência do gene *GNAI3* para ativar os eventos de origem de iniciação de replicação presente no domínio do gene *AMPD2*, além de indicar uma região próxima de DNA intrinsecamente curva (Lima Neto, *et al*, 2014), estabelecendo essa característica estrutural do DNA, com os sítios de origem de replicação.

Em procariotos, a iniciação da replicação é orientada por uma proteína que atua no sítio de origem de replicação promovendo a abertura da dupla fita adjacente aos segmentos rico nas bases adenina (A) e timina (T). (Bramhill e Kornberg, 1988)

Sequências específicas de ligação dessas proteínas em origens de replicação procarióticas apresentam domínios estruturais conservados, como DNA curvo, que desempenha um papel importante na replicação do DNA. (Eckdahl e Anderson, 1990; Hosid *et al.*, 2004)

Nos eucariotos inferiores, as origens de replicação estão bem esclarecidas, como em *Saccharomyces cerevisiae*, onde foram encontrados locais de DNA intrinsecamente curvos nas sequências de replicação autônoma (Marahrens e Stillman, 1992; Vernis *et al.*, 1999), indicando um elemento estrutural para aumentar a afinidade entre proteína e DNA em trechos ricos em A e T. (Williams *et al.*, 1988)

Uma organização semelhante foi encontrada em *Schizosaccharomyces pombe*, (Robinson e Bell, 2005), o que contribuiu para uma melhor compreensão da estrutura de origem de replicação

de organismos multicelulares, não sendo possível identificar uma sequência consenso aos sítios de origem de replicação. (Okuno *et al.*, 1999; Kelly e Brown, 2000)

No entanto a característica estrutural da molécula de DNA intrinsecamente curvos ou *bent* próximos aos sítios de origens de replicação como na oriGNAI3 e oriB no segmento amplificado do gene AMPD2 de hamster Chinês, (Balani *et al.*, 2006) e relatado por Coffman *et al.* (2006), no interior de centenas de pares de bases de um sítio de iniciação presente em uma região espaçadora não transcrita do gene de RNA ribossômico humano (DNAr) evidenciam uma relação crucial entre a curvatura do DNA e as regiões de origem de iniciação de replicação.

Nos organismos modelos mais estudados foi identificado nos *puffs* de DNA de moscas *sciaridae*, *Rhynchosciara americana*, múltiplos sítios de DNA bent na origem de replicação, localizado no gene C3-22 (Fiorini *et al.*, 2006a); e sítios encontrados na região promotora do gene BhC4-1 de *Bradysia hygida*. (Fiorini *et al.*, 2001)

A matriz nuclear como estrutura de grande relevância na análise de regiões do DNA *bent*, devido às regiões MARs (*Matrix Attachment Regions*) específicas de ancoramento de DNA, as quais foram relacionadas com as origens de replicação, conseqüentemente esta interação envolve principalmente a organização da molécula de DNA. (Anderson, 1986; Fiorini *et al.*, 1992; Fiorini, *et al.*, 2006)

A presença de trechos ricos em adenina, conferem áreas de alta instabilidade térmica e curvatura estável dependente desta sequência, sendo comuns nessas regiões e apontam importante papel nas funções das regiões MARs. O DNA intrinsecamente curvo foi identificado nos locais de ancoramento da matriz ou próximo a ela. (Yamamura e Nomura, 2001)

Desta forma, pode-se inferir a íntima relação entre a curvatura do DNA com os sítios de origem de iniciação de replicação e com estruturas nucleares, como a matriz nuclear, responsável pela organização da molécula, através de regiões específicas de seu ancoramento, permite orientar e /ou regular os processos de replicação em eucariotos, e assim direcionar novos estudos para elucidar os mecanismos e eventos envolvidos nesse processo meticuloso e crucial para a manutenção da vida.

Conclusão

Em eucariotos superiores, os mecanismo e eventos envolvidos e requeridos durante o processo de iniciação de replicação do DNA, permanecem desconhecidos. O controle transcricional é regulado para manter a integridade do genoma, sendo eficiente e sensível na ação da morte celular em células sob condições de estresses que estão propensas a danos no DNA. A sinalização de sítios frágeis, podem direcionar a quebra cromossômica para locais específicos predeterminados, desconhecendo o real motivo da existência de alguns sítios genômicos frágeis (Myllykangas e Knuutila, 2006).

Através de um modelo de amplificação gênica obtido pelo segmento do gene que codifica a enzima AMPD2, tornou-se desde sua descoberta, em células mutantes resistentes a conformicina

de fibroblasto de pulmão de hamster Chinês, uma ferramenta importante para avaliar *in silico* as origens de iniciação de replicação ali presentes e conduzir estudos para esclarecer os eventos relacionados.

Estudos posteriores identificaram presente neste segmento, a curvatura intrínseca do DNA, uma característica que tem sido relacionada às regiões de origem de iniciação de replicação, devido trechos ricos em bases A e T, que permitem maior curvatura da molécula.

Todas as análises que evidenciaram o DNA curvo presente em diferentes espécies, demonstraram sua afinidade pelas regiões de iniciação de replicação, fortalecendo assim a base para investigação sobre a replicação em mamíferos, necessário principalmente para se aplicar diante dos eventos de crescimento e propagação das células tumorais.

Referências:

ALTMAN, A. L. FANNING, E. (2004) Defined sequence modules and an architectural element cooperate to promote initiation at an ectopic mammalian chromosomal replication origin. *Mol Cell Biol* 24 (10): 4138-50.

ANDERSON, J. N. Detection, sequence patterns and function of unusual DNA structures. *Nucleic Acids Res.* 1986. 14: 8513-33.

ANGLANA, M. APIOU, F. BENSIMON, A. DEBATISSE, M. 2003. Dynamics of DNA replication in mammalian somatic cells: nucleotide pool modulates origin choice and interorigin spacing. *Cell* 114: 385-94.

ARCHER, S. JURANKA, P.F. HO, J.H. CHAN, V.L. An analysis of multiple mechanisms of adenosine toxicity in baby hamster kidney cells. *J Cell Physiol.* 1985; 124:226–232.

AKIZU, N. CANTAGREL, V. SCHROTH, J. *et al.* AMPD2 Regulates GTP Synthesis and is Mutated in a Potentially Treatable Neurodegenerative Brainstem Disorder. *Cell* 2013 August 1; 154(3):doi:10.1016/j.cell.2013.07.005. Elsevier Inc.

BALANI, V. A. TAKEDA, K. I. FIORINI, A. AND FERNANDEZ, M. A. (2006). Bent DNA sites in mammalian replication origins. In: XXXV Reunião Anual da SBBq, Águas de Lindóia, CD-ROM.

BARON, B. FERNANDEZ, M.A. TOLEDO, F. LE ROSCOUE T, D. MAYAU, V. MARTIN, N. BUTTIN, G. DEBATISSE, M. (1994): The highly conserved Chinese hamster GNAi3 gene maps less than 60 kb from the AMPD2 gene and lacks the intronic U6 snRNA present in its human counterpart. *Genomics* 24: 288–294.

BARON, B., FERNANDEZ, M.A., CARIGNON, S., TOLEDO, F., BUTTIN, G., DEBATISSE, M. 1996. GNAI3, GNAT2, AMPD2, GSTM are clustered in 120 kb of Chinese hamster chromosome 1q. *Mamm Genome.* Jun;7(6):429-32.

BAUSCH-JURKEN, M.T., MAHNKE-ZIZELMAN, D.K., MORISAKI, T., SABINA, R.L. (1992) Molecular cloning of AMP deaminase isoform L. Sequence and bacterial expression of human AMPD2 cDNA. *J Biol Chem* 267(31):22407–22413

BIAMONTI G, PAIXAO S, MONTECUCCO A, PEVERALI FA, RIVA S, FALASCHI A, 2003. Is DNA sequence sufficient to specify DNA replication origins in metazoan cells? *Chromosome Res* 11(5):403-12.

BRAMHILL, D. AND KORNBERG, A. (1988). Duplex opening by dnaA protein at novel sequences in initiation of replication at the origin of the E. coli chromosome. *Cell* 52: 743-755.

CHAPMAN, A. G, MILLER, A.L., ATKINSON, D.E (1976) Role of the adenylate deaminase reaction in regulation of adenine nucleotide metabolism in Ehrlich ascites tumor cells. *Cancer Res* 36(3):1144–1150

COFFMAN, F. D. HE, M. DIAZ, M. L. AND COHEN, S. (2006). Multiple initiation sites within the human ribosomal RNA gene. *Cell Cycle* 5: 1223-1233.

COQUELLE A, PIPIRAS E, TOLEDO F, BUTTIN G, DEBATISSE M. (1997) Expression of fragile sites triggers intrachromosomal mammalian gene amplification and sets boundaries to early amplicons. *Cell. Apr* 18;89(2):215–225.

COURBET S, GAY S, ARNOULT N, WRONKA G, ANGLANA M, BRISON O, DEBATISSE M, 2008. Replication fork movement sets chromatin loop size and origin choice in mammalian cells. *Nature* 455: 557-560,

DEBATISSE, M., TOLEDO, F., VINCENT, B. R. de S. AND BUTTIN, G. (1992) Amplification of the Adenylate-Deaminase 2 and linked genes in Chinese hamster lung fibroblasts. In Kellems, R. E. (ed.) *Gene Amplification in Mammalian Cells — A Comprehensive Guide*. Marcel Dekker, New York, NY, cap.13. pp. 173–183.

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

De PAMPHILIS, M.L. 1999. Replication origins in metazoan chromosomes: fact or fiction? *Bioessays* 21(1):5-16.

DEL SAL, G., MANFIOLETTI, G., SCHNEIDER, C. (1989) The CTAB-DNA Precipitation Method: A common mini-scale preparation of template DNA from phagemids, phages or plasmids suitable for sequencing. *Biotechniques*. 7: 514-20.

DIJKWELL, P.A., VAUGHN, J.P., HAMLIN, J.L. 1991. Mapping of replication initiation sites in mammalian genomes by two-dimensional gel analysis: stabilization and enrichment of replication intermediates by isolation on the nuclear matrix. *Mol Cell Biol* (8):3850-59.

ECKDAHL, T.T. AND ANDERSON, J.N. (1990). Conserved DNA structures in origins of replication. *Nucleic Acids Res.* 18: 1609-1612.

FISHBEIN, W.N., ARMBRUSTMACHER, V.W., GRIFFIN, J.L. Myoadenylate deaminase deficiency: a new disease of muscle. *Science*. 1978; 200:545–548.

FIORINI, A., BASSO, L. R., JR., PACO-LARSON, M. L., AND FERNANDEZ, M. A. (2001) *J. Cell. Biochem.*, 83, 1-13.

FIORINI, A., GOUVEIA, F. S., FERNANDEZ, M. A. (2006) Scaffold/Matrix Attachment Regions and Intrinsic DNA Curvature. *Biochemistry (Moscow)*, 71(5): 481-88.

FIORINI, A. GOUVEIA, F. S. SOARES, M. A. M. STOCKER, A. J. CIFERRI, R. R. FERNANDEZ, M. A. (2006a) DNA bending in the replication zone of the C3 DNA puff

- amplicon of *Rhynchosciara americana* (Diptera: Sciaridae). *Mol Biol Rep.* 33: 71-82
- GRAUX, J. C. COOLS, C. MELOTTE, H. QUENTMEIER, A. FERRANDO, R. LEVINE, et al., Fusion of NUP214 to ABL1 on amplified episomes in T-cell acute lymphoblastic leukemia, *Nat. Genet.* 36 (2004) 1084–1089.
- HAHN, P. J. Molecular biology of double-minute chromosomes, *Bioessays* 15 (1993) 477–484.
- HAMLIN, J.L. Mammalian origins of replication. *Bioessays*. 1992 Oct; 14(10):651-9.
- HELMERING, J. JUAN, T. CHI, M. L. et al. (2014) A mutation in Ampd2 is associated with nephrotic syndrome and hypercholesterolemia in mice *Lipids in Health and Disease*, 13:167.
- HERRICK, J., CONTI, C., TEISSIER, S., THIERY, F., COUTURIER, J., SASTRE-GARAU, X., FAVRE, M., ORTH, G. BENSIMON, A. 2005. Genomic organization of amplified MYC genes suggests distinct mechanisms of amplification in tumorigenesis. *Cancer Res* 65(4):1174-79.
- HOSID, S. TRIFONOV, E. N. AND BOLSHOY, A. (2004). Sequence periodicity of *Escherichia coli* is concentrated in intergenic regions. *BMC Mol. Biol.* 5: 14.
- HUBERMAN, J. A. and RIGGS, A. D. On the Mechanism of DNA Replication in Mammalian Chromosomes. *J. Mol. Biol.* (1968) 32,327-341
- KELLY, T. J. AND BROWN, G.W. (2000). Regulation of chromosome replication. *Annu. Rev. Biochem.* 69: 829-880
- KIYAMA, R. ONISHI, Y. WANAPIRAK, C. AND WADAKIYAMA, Y. (1999) Regulation of transcription by bent DNA through chromatin structure. *Gene Ther Mol Biol Vol* 4, 363-368.
- KRAJEWSKI, W. A., RAZIN, S. V. (1992) Organization of specific DNA sequence elements in the region of the replication origin and matrix attachment site in the chicken alpha-globin gene domain. *Mol Gen Genet.* (2–3): 381–88.
- LIMA NETO, Q. A., RANDO, F. S., FREITAS, D. V. B., RODRIGUES, L. F. ROSADO, F. R., FIORINI, A., GIMENES, F., TAVARES, J. and FERNANDEZ, M. A. (2014) Straight Core Structure of DNA Replication Origins in the Mammalian AMPD2 Locus. ISSN 0006_2979, *Biochemistry (Moscow)*. Vol. 79, No. 1, pp. 37_43. © Pleiades Publishing, Ltd. Published in Russian in *Biokhimiya*, 2014, Vol. 79, No. 1, pp. 49_56.
- MESNER LD, CRAWFORD EL, HAMLIN JL, 2006. Isolating apparently pure libraries of replication origins from complex genomes. *Mol Cell* 21(5):719-26. Erratum in: *Mol Cell* 21(6):881.
- MYLLYKANGAS S, KNUUTILA S, 2006. Manifestation, mechanisms and mysteries of gene amplifications. *Cancer Lett* 232(1):79-89.
- OGASAWARA, N, GOTO, H, YAMADA, Y., NISHIGAKI, I., ITOH, T., HASEGAWA, I., PARK, K.S. Deficiency of AMP deaminase in erythrocytes. *Hum Genet.* 1987; 75:15–18.
- OKUNO, Y. SATOH, H. SEKIGUCHI, M. AND MASUKATA, H. (1999). Clustered adenine/thymine stretches are essential for function of a fission yeast replication origin. *Mol. Cell Biol.* 19: 6699-6709.
- RATHBONE, M.P. MIDDLEMISS, P.J. GYSBERS, J.W. ANDREW, C. HERMAN, M.A.

- REED, J.K. CICCARELLI, R. DI IORIO, P. CACIAGLI, F. Trophic effects of purines in neurons and glial cells. *Prog Neurobiol.* 1999; 59:663– 690.
- ROBINSON, N. P. AND BELL, S. D. (2005). Origins of DNA replication in the three domains of life. *FEBS J.* 272: 3757-3766
- SAMBROOK, J., RUSSELL, D. W. (2001) *Molecular cloning: A laboratory manual.* 3rd ed. New York: Cold spring Harbor Laboratory Press.
- SHEN, Z. Genomic instability and cancer: an introduction. *J. Mol. Cell Biol.* 2011, 3: 13. <http://dx.doi.org/10.1093/jmcb/mjq057>.
- SZYDŁOWSKA, M., ROSZKOWSKA, A. Expression patterns of AMP-deaminase isozymes in human hepatocellular carcinoma (HCC). *Mol Cell Biochem* (2008) 318:1–5 DOI 10.1007/s11010-008-9773-x
- TOLEDO F, BARON B, FERNANDEZ MA, LACHAGES AM, MAYAU V, BUTTIN G, DEBATISSE M, 1998. oriGNAI3: a narrow zone of preferential replication initiation in mammalian cells identified by 2D gel and competitive PCR replicon mapping techniques. *Nucleic Acids Res* 26(10):2313-21.
- TOLEDO F, COQUELLE A, SVETLOVA E, DEBATISSE M, 2000. Enhanced flexibility and aphidicolin-induced DNA breaks near mammalian replication origins: implications for replicon mapping and chromosome fragility. *Nucleic Acids Res* 28(23):4805-13.
- TOLEDO F, LACHAGES AM, MAYAU V, DEBATISSE M, 1999. Initiation of DNA replication at the Chinese hamster origin oriGNAI3 relies on local sequences and/or chromatin structures, but not on transcription of the nearby GNAI3 gene. *Nucleic Acids Res* 27(7):1600-08.
- TOLEDO, F. BUTTIN, G. DEBATISSE, M. (1993) The origin of chromosome rearrangements at early stages of AMPD2 gene amplification in Chinese hamster cells. *Current Biology*, Vol. 3 N. 5
- TOWER J. 2004. Developmental gene amplification and origin regulation. *Annu Rev Genet* 38: 273–304.
- WAHL, G. M. CARROLL, S. M. WINDLE, B. E. (1993) Cytogenetic and molecular dynamics of mammalian gene amplification: evidence supporting chromosome breakage as an initiating event. In Kellems, R. E. (ed.) *Gene Amplification in Mammalian Cells — A Comprehensive Guide.* Marcel Dekker, New York, NY, cap.40. pp. 513–532.
- WEBER G, SHEN F, LI W (1998) Role of purine metabolism in regulation of signal transduction in human carcinoma cells. *Adv Exp Med Biol* 431:401–408
- WILLIAMS, J.S. ECKDAHL, T. T. AND ANDERSON, J. N. (1988). Bent DNA functions as a replication enhancer in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell Biol.* 8: 2763-2769.
- YAMAMURA, J. NOMURA, K. Analysis of sequence-dependent curvature in matrix attachment regions. *FEBS Letters* 489 (2001) 166-170



Artigo

Matriz nuclear associada ao DNA bent e não bent identificados em segmentos relacionados as origens de replicação presentes no domínio contendo o gene *AMPD2* em hamster Chinês

Sabrina M. G. Kelmer¹, Fabiana S. Rando², Ana P. S. Oliveira¹, Fabio R. Rosado³, Adriana F. Rosado³ e Maria A. Fernandez ^{1*}

- 1 Departamento de Biotecnologia, Genética e Biologia Celular, Universidade Estadual de Maringá, 87020-900 Maringá, Paraná, Brasil; sabrinamg12@hotmail.com (S.M.G.K.); paula-silva-oliveira@hotmail.com (APSO)
- 2 Central de Biologia Celular, Molecular e Estrutural do Complexo de Centrais de Apoio à Pesquisa, CBM/COMCAP, Universidade Estadual de Maringá, Av. Colombo 5790, Maringá, 87020-900, Paraná, Brazil. fabianasrando@gmail.com (F.S.R)
- 3 Departamento de Biociências, Universidade Federal do Paraná, setor Palotina, 85950-000 Palotina, Paraná, Brasil; fabiorosado@ufpr.br (F.R.R.); drifiorini@gmail.com (AFR).

* Correspondence: mafernandez@uem.br. Tel.: +55-44-3011-5398

Received: date; Accepted: date; Published: date

Resumo: As origens de replicação OriGNAI3, OriC e OriB, identificadas no domínio do gene *AMPD2* (adenosina monofostato deaminase 2), em células de fibroblastos de pulmão de hamster Chinês, apresentam relevante potencial de ativação para o processo de replicação de DNA em mamíferos. Uma característica apontada em estudos anteriores, denotam a presença da estrutura diferencial do DNA intrinsecamente curvo ou bent, em segmentos próximos ou no interior de tais origens de replicação. Neste estudo, foi avaliado a interação da estrutura denominada matriz nuclear, associada aos segmentos de DNA bent e não-bent presentes no domínio do gene *AMPD2*, para avaliar o dinamismo de suas regiões específicas para o ancoramento da molécula de DNA, as MARs (*Matrix Attachment Regions*), a qual é responsável pela organização e arquitetura nuclear, e coordenar os eventos de replicação e transcrição de DNA. Os resultados obtidos demonstram *in vivo* esta associação, com positividade para as regiões analisadas, nb7 e b2 (OriGNAI3), b4a, b4b, nb10 e nb11 (OriC) e nb2, nb3, b5 e b6 (OriB), indicando a funcionalidade da matriz nuclear em relação ao processo de replicação do DNA, contribuindo assim, para compreensão do complexo mecanismo da proliferação e manutenção celular.

Palavras chave: Origens de replicação, matriz nuclear, regiões bent e não-bent, proliferação celular

1. Introdução

Durante o processo de replicação do DNA são requeridas várias alterações ordenadas para evitar formação tumoral e/ou outras desordens celulares. Devido ao maior tamanho do DNA eucariótico, muitas forquilhas de replicação são requeridas pela síntese eficiente do DNA, através de regulações meticulosas extremamente importantes [1].

Em sistemas nos quais as origens de replicação foram mapeadas, essas são derivadas de tipos celulares e regiões cromossômicas específicas. As análises de intermediários de replicação, através de diferentes metodologias, apontam para a inexistência de tamanho e sequências comuns nessas regiões de iniciação da replicação [2,3,4,5,6,7]. Um modelo atrativo para o estudo da sequência e da estrutura da cromatina de origens de replicação é a região do domínio do gene que codifica a enzima Adenilato deaminase 2, *AMPD2* de células de fibroblasto de pulmão de hamster Chinês, por ser bem caracterizada [2,6,7,8].

Este domínio contém os genes *GNAI3*, *GNAT2*, *AMPD2* e *GSTM4*. Entre os genes *GNAI3* e *GNAT2*, foi descrito uma região preferencial para a iniciação da replicação, a *oriGNAI3*. Outras origens potenciais são ativadas (*oriC*, *oriB* e *oriA*), quando a eficiência de iniciação da *oriGNAI3* é diminuída [8].

Uma característica estrutura da molécula de DNA que pertence aos trechos de origens de replicação é a sua curvatura intrínseca, devido à maior presença de resíduos de adeninas (em geral dois ou mais) repetidos a cada dez pares de base (pb) aproximadamente, correspondendo a uma volta da hélice do DNA, ou múltiplos de 10 [9]. Independentemente de serem regiões ricas em A e T, o que normalmente é uma característica geral de segmentos onde ocorre a iniciação da replicação do DNA, elementos do DNA que caracterizem uma origem de replicação em metazoários ainda são desconhecidos. Na identificação de motivos estruturais nos segmentos de iniciação da replicação, sítios com trechos de A ou T consecutivos (dA:dT), repetidos periodicamente, produzindo uma curvatura local no DNA [10,11].

No núcleo a estrutura da cromatina é altamente organizada através das interações DNA-matriz nuclear. As sequências DNA que se ligam preferencialmente a matriz nuclear são designadas como MARs (*matrix attachment regions*) e/ou SARs (*scaffold associated regions*), as quais são denominadas em S/MARs. Essas regiões estão mais frequentemente localizadas em segmentos não codificantes do DNA, com aproximadamente 200 pb de extensão, são trechos ricos em AT e contêm sequências de consenso de topoisomerase II e outros motivos [12,13]. Esses segmentos podem ser responsáveis em ativar a expressão gênica [14,15]. Sobre os elementos S/MARs relatados, muitos não exibem homologia de sequência extensa, mas eles parecem ser funcionalmente conservados [16,17].

Segundo Vassetzky, *et al* [18], em um modelo da inter-relação da região S/MARs e a curvatura do DNA e seu ancoramento na matriz nuclear, sugere que o tamanho da curvatura da cromatina aumente com diferenciação celular, e diminuam com a progressão para a malignidade do câncer. Essa consideração é baseada no conhecimento de que provavelmente sítios das origens de replicação estão co-localizados com sítios S/MARs, e conseqüentemente esta interação envolve também a organização da molécula de DNA com a formação de loops ou alças, que desempenha um papel estrutural principalmente relacionado à replicação [19].

Com os dados disponíveis até o momento foi realizada a proposta de analisar nesse trabalho a associação *in vivo* à matriz nuclear e/ou a fração loop de regiões intrinsecamente *bent* e não-*bent*, mapeadas em segmentos das origens de replicação *oriGNAI3*, *oriC* e *oriB* no domínio amplificado contendo o gene *AMPD2*.

2. Resultados

As regiões selecionadas para análise de PCR (Polymerase Chain Reaction), correspondem a sequência das origens de replicação representada no mapa físico do domínio contendo o gene

AMPD2, conforme Figura 1.

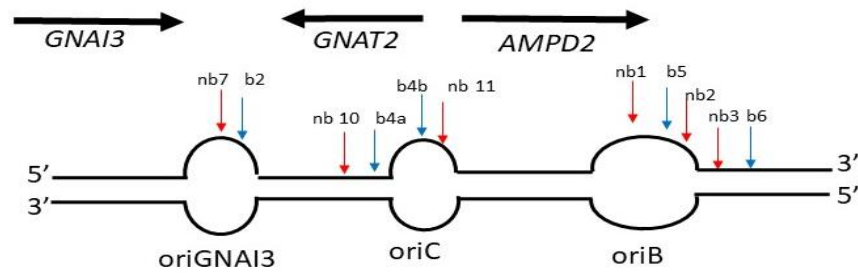


Figura 1. Representação do segmento genômico do locus do gene *AMPD2* em hamster Chinês. As setas horizontais indicam o sentido da direção da transcrição. Os locais onde sítios de DNA *bent* (b) estão em setas azuis e não *bent* (nb) em setas vermelhas, detectados nas origens de replicação, sendo nb7 e b2 (*OriGNAI3*), b4a, b4b, nb10 e nb11 (*OriC*) e nb1, nb2, b5 e b6 (*OriB*). Fonte: Adaptado de Fernandez et al, 1997.

2.1. A origem preferencial *oriGNAI3*

A *oriGNAI3*, é mapeada em 1713 nucleotídeos, no segmento intergênico entre os genes *GNAI3* e *GNAT2* em genoma de hamster Chinês. O segmento que comporta essa origem de replicação se inicia após 691 nucleotídeos do sítio poly-A do gene *GNAI3*. Nesse segmento foram identificadas duas regiões denominadas DNA intrinsicamente *bent*, b1 e b2, sendo que nesse trabalho somente foi analisado o fragmento b2, que apresenta a sequência de nucleotídeos a partir da região não-*bent*, de 106 pares de base, pb, denominada nb7 nessa região, a qual se localiza a aproximadamente 300 nucleotídeos à montante da região designada como *bent* b2, de 90 pb. (Figura 1).

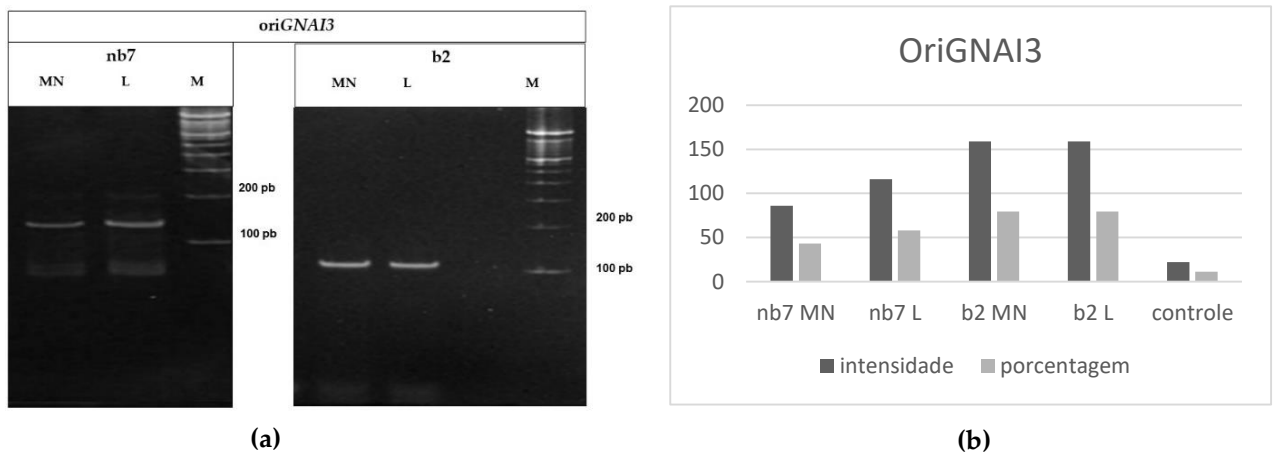


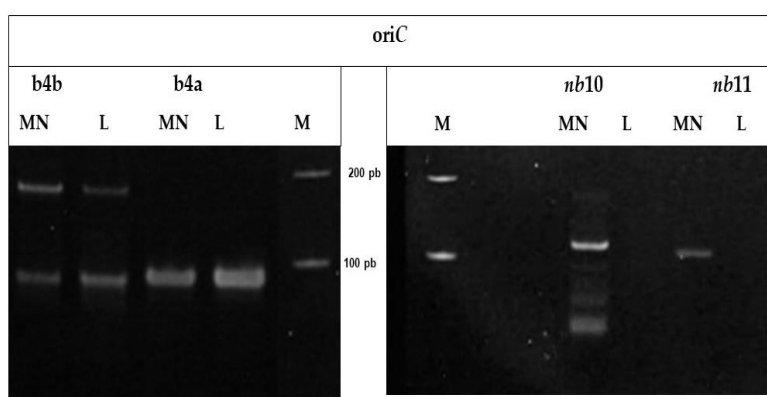
Figura 2. Análise de associação *in vivo* de sequências *bent* (b) e não-*bent* (nb) no segmento da origem de replicação *oriGNAI3*. **(a)** Detecção das regiões nb7, com 106 pb e de b2 com 90 pb. Sendo MN – fração matriz nuclear; L – fração Loop; M - Marcador de tamanho molecular 100 bp Invitrogen, pb (pares de bases). **(b)** Leitura numérica em pixels das bandas amplificadas pelo programa Image J.

Nas frações matriz nuclear e loop a sequência nb7 é detectada em associação predominante na fração loop, 58%, enquanto apenas 43% de associação com a matriz nuclear; para a região

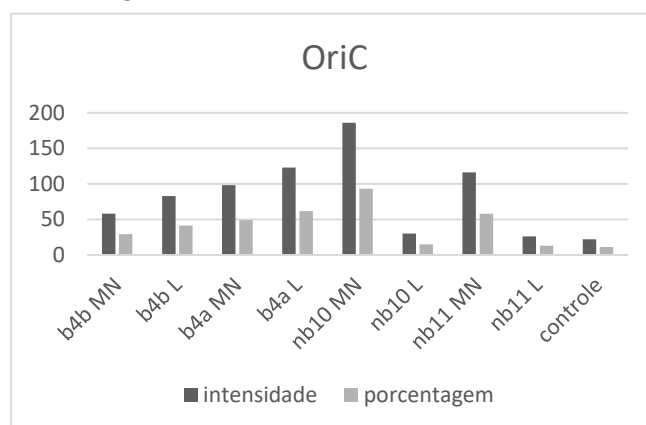
intrinsecamente *bent* b2, foi detectada com distribuição equitativa nas frações matriz nuclear e loop (Figura 2 b e c), indicando 79,5% da região se encontra associada à matriz nuclear e ao loop. Sendo que a *oriGNAI3* é determinada como constitutiva nesse tipo celular, a região de DNA intrinsecamente *bent* b2 estar associado *in vivo* à matriz nuclear revela a atividade funcional da região *bent* dessa origem de replicação.

2.2. A origem *oriC*

A *oriC* está situada em segmento intergênico, próximo às regiões 5' dos genes *GNAT2* e *AMPD2* (Figura 1) e é considerada estar mapeada a um fragmento menor, de 953 pb, em relação às todas as outras origens determinadas no domínio do gene *AMPD2*. Entre as duas regiões identificadas como intrinsecamente *bent*, somente a b4b, de 92 pb está no segmento identificado como *oriC*. Na Figura 3, no segmento de 857 pb, à montante a aproximadamente ~1.700 pb do início da *oriC*, somente nb10, de 91 pb, foi mapeada associada à matriz nuclear com 93% de intensidade. Em conjunto com esse fragmento não *bent* o nb11 apresenta 58% associado, cuja localização é sobreposta ao *bent* b4b, apresenta apenas 29%, devido uma ligação inespecífica sempre com dupla banda superior, o que indicou uma menor fração associação à matriz nuclear, prejudicando este resultado. *In vivo* mostram coerência destes resultados, pois a *oriC* não é preferencialmente ativa na replicação de DNA nesse domínio do gene *AMPD2*.



(c)



(d)

Figura 3. Análise de associação *in vivo* de sequencias *bent* (b) e não-*bent* (nb) no segmento da origem de replicação *oriC*. (c) Os segmentos *bent* b4a (85 pb) e b4b (92 pb), e nb10 (91 pb) e nb11 (85 pb). MN – fração matriz nuclear; L – fração Loop; M - Marcador de tamanho molecular 100 pb Invitrogen. (d) Leitura numérica em pixels das bandas amplificadas pelo programa Image J.

2.3. A origem *oriB*

A *oriB* está situada após a região 3' do gene *AMPD2* (Figura 1) e foi mapeada no maior fragmento, com 3.500 pb. Na análise aqui realizada, duas regiões não-*bent*, determinadas como nb1, nb2, com 97, 81 e uma *bent*, b5 com 81 pb, respectivamente, estão localizadas no interior da de 89 pb estão localizadas de ~2.500 pb após *oriB*. As duas regiões *bent*, b5 e b6, independentes de sua localização, foram detectadas como associadas à matriz nuclear, Figura 4.

Para os segmentos não *bent* mostraram interação com a matriz nuclear na análise de nb2 (90%) e nb3 (58%), com exceção do nb1; no entanto estas regiões estão muito próximas das *bent* b5 (77%) e b6 (50,5%), esse resultado *in vivo* são coerentes, pois estão no interior de uma região maior que deve se associar à matriz nuclear.

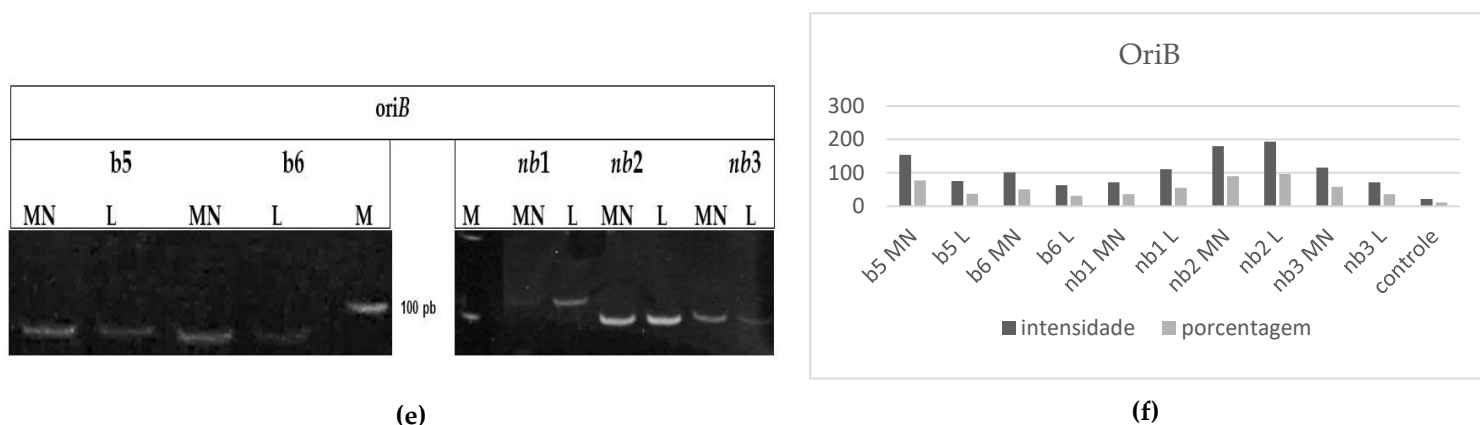


Figura 4. Análise de associação *in vivo* de sequências *bent* (b) e não-*bent* (nb) no segmento da origem de replicação *oriB*. **(e)** Os segmentos detectados *nb1* (97 pb), *nb2* (81 pb) e *nb3* (85 pb) e as regiões de DNA intrinsicamente *bent* *b5* (81 pb) e *b6* (89 pb). MN – fração matriz nuclear; L – fração Loop; M - Marcador de tamanho molecular 100 bp Invitrogen. **(f)** Correspondente gráfico da análise pelo programa Image J, indicando a intensidade da amplificação e porcentagem.

3. Discussão

Os estudos para estabelecer os mecanismos envolvidos no processo de iniciação de replicação de DNA, onde muitas forquilhas de replicação são requeridas para sua síntese eficiente, através de regulações meticolosas para manter e preservar a integridade do DNA, bem como direcionar sua proliferação ordenada ou não, como nos casos de carcinogêneses, são de extrema importância [1].

A presença de sequências conservadas na iniciação da replicação em *Saccharomyces cerevisiae* foi determinante para o isolamento do complexo de reconhecimento de origem [20]. A existência desse complexo revelou que eucariotos dependem da ligação de proteínas específicas, para identificar e ativar as regiões genômicas onde ocorre a iniciação da replicação. O Complexo de Reconhecimento de Origem (ORC) é conservado evolutivamente, e tem sido identificado em todas as demais células eucarióticas, embora, independente de sequências altamente conservadas em leveduras, para os demais eucariotos a sequência de nucleotídeos de uma origem de replicação é, até o momento, não reportado [8].

O segmento amplificado do gene *AMPD2* de células transformadas de hamster Chinês, com sítios de origens de iniciação de replicação identificados, tornou-se um modelo atrativo para este estudo, levando também em consideração as estruturas diferenciais apresentadas pelo DNA, denominadas *bent* e não-*bent*. Estudos anteriores indicaram que as regiões de curvatura intrínseca do DNA associada à matriz nuclear e as sequências específicas denominadas de S/MARs estão associadas a origens de replicação, baseada no conhecimento de que os sítios das origens de replicação estão co-localizados com sítios S/MARs, e conseqüentemente esta interação envolve também a organização da molécula de DNA através da matriz nuclear. [9,21-27].

Embora experimentos *in vitro* com matriz nuclear nuas e a análise de associação à sequência *bent* *b5* localizada na *oriB*, havia reportado a associação à matriz nuclear dessa fração [28], a análise *in vivo* nesse domínio do gene *AMPD2*, as origens determinadas como preferencial, como a *oriGNAI3* e em *oriC* e *oriB* ainda não havia ocorrido. As detecções, foram analisados pelo programa Image J, fornecem números exatos pela leitura em pixels pela intensidade que cada banda amplificada nos géis apresenta. Desta forma, foi calculado valores de porcentagem para

cada segmento, considerando que valores inferiores a 20% foram desconsiderados para associação positivas das amostras Figuras 2b, 3d e 4f e Tabela1.

Nessa avaliação em células GMA32, os resultados expressos como associação não detectada à matriz nuclear, como no segmento nb1, embora pertence a região determinada como segmento da oriB, se encontra a aproximadamente 1.000 pb da fração *bent* b5. Essa não associação nb1 pode ocorrer devido a dinâmica interação que tal estrutura exerce sobre a molécula de DNA, e por outros fatores não observados. As outras frações não-*bent*, nb11, nb10, nb2 e nb3, inseridas em origens não preferencias, apresentam a associações à matriz nuclear de modo evidente, e não possuem parâmetros que as associam entre si.

A associação à matriz nuclear da região intrinsecamente *bent* b2, presente no segmento formador da origem de replicação do DNA preferencial do segmento, a oriGNAI3, apresentou uma distribuição equitativa entre as frações matriz nuclear e loop. Nas demais origens analisadas, oriB e oriC, os segmentos intrinsecamente *bent*, b4b e b5, essa última apresenta uma associação forte com a fração matriz nuclear, embora a fração b4b apresenta resultados em duas bandas, sendo que somente a maior, a qual é diferente do segmento observado na sequencias de nucleotídeos da região, é associada à matriz nuclear. As duas outras analisadas e que não estão localizadas nas regiões das origens oriC e oriB, fragmentos b4a e b6, respectivamente, somente a b6 apresenta associação à matriz nuclear, demonstrando assim, que a interação não depende de fatores específicos, e que ocorre de maneira dinâmica ao longo do segmento do gene no momento do ciclo celular.

4. Materiais e Métodos

4.1. Cultura celular

Utilizada linhagem de fibroblasto de pulmão de hamster Chinês, GMA32, cedidas pela Professora Dra. Michelle Debatisse, Unité de Génétique Somatique, Institut Pasteur, Paris, França. Cultivadas em meio RPMI-1640 medium, pH 7.4, suplementado com HEPES 10mM, bicarbonato de sódio 24mM, 10 µg/ml penicilina e estreptomicina e 10% de soro fetal bovino, mantidas em estufa umidificada a 37°C com 5% de CO₂.

4.2 Preparação e extração da matriz nuclear

A preparação e extração da matriz nuclear seguirá o protocolo descrito por Fernandez, *et al.*, [28], utilizando a quantidade de $4,0 \times 10^7$ células, cultivadas em duas placas de Petri de 150 mm, com 80% de confluência, são removidas com *scraper*, para manter as características da monocamada em cultura, que simula o comportamento morfofuncional das células como *in vivo*; coletadas juntamente com o meio de cultura em um tubo de 50 mL e iniciado o processo de centrifugação a 2000 rpm por 5 minutos a 4°C, o pellet é ressuspensionado em 5 mL de tampão CWB (5mM Tris-HCl pH 7,4; 50 mM KCl; 0,05 mM espermina; 0,125 mM espermidina; 0,5% tiodiglicerol; 0,25 mM PMSF; 0,5 mM EDTA). Para lise dos núcleos o pellet é ressuspensionado em 5 mL no tampão CWB acrescido de 0,05% de digitonina, transferido para homogeneizador Dounce, Wheaton®, a solução deve ser aspirada utilizando seringa de 5 mL e agulha 21G1, transferindo para um tubo de 15 mL, neste passo pode ser observado em microscópico óptico invertido, na câmara de Neubauer com uma gota de azul de Tripán, o rompimento das células e a integridade dos núcleos. A amostra é aplicada em colchão de glicerol (2 mL de CWB com 12,5% de glicerol) e centrifugado. O pellet ressuspensionado em 500µL tampão CWB com digitonina e sem EDTA, retirando 100 µL desta amostra com a fração do núcleo. Aos 400µL são adicionados 4 mL de CWB sem EDTA e sem digitonina e 2,67 µL de Cu₂SO₄ 50 mM, incubado por 20 minutos a 4°C. Utilizando a seringa com agulha 21G1, para injetar 5 mL de tampão de LIS (Diiodosalicylato de Lítio 10mM; Acetato de Lítio 100mM; Digitonina 0,05%; Espermina 0,05mM; Espermidina 0,125mM; PMSF 0.25mM; Hepes-KOH pH 7,2 20mM), incubação por 5 minutos em temperatura ambiente, e centrifugado por 10 minutos, a 4°C, a 2500 rpm, ao final deste processo adquirimos um pellet flutuante, como uma água-viva, característico da matriz nuclear.

O pellet final é submetido a centrifugação com o tampão H (50 mM Tris HCl pH 7.4; 10mM MgCl₂; 1mM NaCl; 1mM DTE, Boehringer) e submetido à clivagem com 250 a 500 U de enzima de restrição EcoRI, durante 2 horas, a 37°C, sob agitação constante. O DNA não ancorado (fração loop) será separado do DNA ancorado (fração matriz nuclear) por centrifugação a 4000 rpm, a 4°C, por 10 minutos. Ambas as frações serão submetidas à digestão com proteinase K 200 µg/mL por 30 minutos a 37°C, extraídas pelo método fenol:clorofórmio e as concentrações de DNA, analisadas pelo equipamento Nanodrop, Thermo Fisher Scientific®.

4.3 Amplificação dos fragmentos de DNA não-bent e bent por PCR

Os primers estabelecidos para as regiões de aproximadamente 100 pb contendo os segmentos de DNA bent e não-bent, que selecionadas através de análises computacional em estudos anteriores, foram utilizados nas reações de PCR com as amostras obtidas da matriz nuclear e loop, das células GMA32, com volume final de 20 µL, sendo 2.5 mM dNTP mix, 100 ng DNA, 0,5 µL de cada primer (forward e reverse), 1X PCR buffer (com 1.5 mM MgCl₂), e 1 U TaqDNA Polymerase (Invitrogen®). A amplificação ocorreu nas seguintes condições: 1 min a 94°C, 1 min a 62°C e 1 min a 72°C, no total de 30 ciclos, com extensão final por 10 min a 72°C.

4.4 Gel de poliacrilamida

Para avaliar a amplificação dos fragmentos produzidos pelas reações de PCR, foi utilizado gel de poliacrilamida a 12%, TBE 1 X (45mM Tris-Borato, 1mM EDTA, pH 8,0), 0.1% TEMED e 1% persulfato de amônio, utilizando como padrão, 100 pb ladder (Biolabs) em sistema de eletroforese vertical (Bio-Rad) sob voltagem 120V por 1 hora, segundo procedimentos descritos anteriormente [28, 29]. Após eletroforese o gel foi corado em solução de TBE 1X e 10% brometo de etídio, mantido por 20 minutos em local protegido de luz. A revelação ocorre no sistema de fotodocumentação UVP.

4.5 Avaliação da extração da matriz nuclear das células GMA32 por Western blot

Com a obtenção da estrutura da matriz nuclear das células GMA32 pelo protocolo padrão de LIS (diiodosalicylato de lítio), foram separadas as frações proteicas de núcleo e matriz nuclear para análise por Western blot, confirmando assim, pela detecção da proteína específica da matriz nuclear p84 (abcam® ab 487), a correta extração da estrutura residual nuclear (Figura 5).

As amostras foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida unidimensional do tipo descontínuo, na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE; segundo Laemmli *et al.* [30]. Os géis compostos de solução de acrilamida/bis-acrilamida na proporção de 29:1%, sendo que o gel de empilhamento com concentração de 5% (0,125 M de Tris-HCl, pH 6,8; 0,1% de SDS) e o gel de separação a 10% (0,375 M de Tris-HCl, pH 8,8; 0,1% de SDS). A separação eletroforética foi realizada a 100 volts por 90 minutos.

Depois de separadas, as proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose, utilizando o tampão de transferência (Tris 48 mM; Glycine 39 mM; etanol 20%; SDS 0,0375%) e novamente sob voltagem de 70 volts por 40 minutos e 100 volts por 20 minutos. A eficiência da eletrotransferência foi avaliada pela coloração das membranas com o corante Ponceau S para proteínas. O corante foi removido da membrana por sucessivas lavagens com TBS-T 1X (Tris-HCl 100 mM pH 7,5; NaCl 1,5 M e Tween-20 0,05%). A membrana foi bloqueada com solução de bloqueio (leite desnatado a 2,5% em TBS-T 1X) por 1 hora sob agitação a 25°C.

Para a detecção da proteína p84 [5E10] (ab487, Abcam®) foi utilizada a diluição 1:4000 em solução de bloqueio e incubada por 1 hora a temperatura ambiente sob agitação. O anticorpo secundário goat anti-mouse (HRP, Dako, P0447) utilizado na diluição 1:10000, repete-se as mesmas

condições dos anticorpos primários para incubação da membrana. A revelação foi obtida utilizando o kit GE Healthcare, ECL™ Prime Western Blotting Detection Reagent, no equipamento ImageQuant LAS 500, GE®, através de leitura em quimiluminescência, fornecendo a imagem do blot, indicando a presença da proteína de interesse.

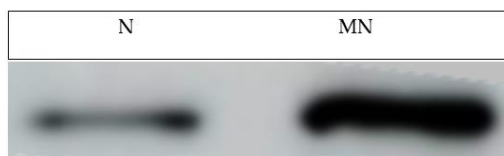


Figura 5. Análise por *Western blot* com detecção da proteína p84 nas amostras N (núcleo) e MN (matriz nuclear) pelo anticorpo p84 (abcam® ab 487).

4.6 Análises pelo programa Image J

O programa de leitura de imagens Image J, fornece medidas numéricas em pixels através da análise colorimétrica em escala de cinza, indicando a intensidade da banda de amplificação por PCR, em valores para estudos estatísticos. Neste trabalho foi aplicado a porcentagem para evidenciar a detecção das amostras positivas, excluindo leituras abaixo de 15%, conforme valores atribuídos ao controle negativo, e para bandas visivelmente não detectada, porém a leitura de escala de cinza foi realizada como em nb1 MN, conforme Tabela 1.

Origens	Segmentos	Intensidade	%
OriGNAI3	nb7 MN	86	43
	nb7 L	116	58
	b2 MN	159	79,5
	b2 L	159	79,5
OriC	b4b MN	58	29
	b4b L	83	42
	b4a MN	98	49
	b4a L	123	62
	nb10 MN	186	93
	nb10 L	30	15
	nb11 MN	116	58
OriB	nb11 L	26	13
	b5 MN	154	77
	b5 L	75	37,5
	b6 MN	101	50,5
	b6 L	63	31,5
	nb1 MN	72	36
	nb1 L	111	55,5
	nb2 MN	180	90
	nb2 L	193	96,5
Controle	nb3 MN	116	58
	nb3 L	72	36
		22	11

Tabela 1. Análise das amplificações detectadas em géis de poliacrilamida definida pela intensidade das bandas pelo programa leitor de imagens Image J.

5. Conclusões

A análise da matriz nuclear, que representa uma estrutura de suma importância na organização do núcleo e sua compartimentalização, principalmente na organização da molécula de DNA, através de regiões específicas de ancoramento (MARs), com a formação de loops,

permite avaliar sua interação dinâmica com as estruturas diferenciais do DNA não-*bent* e *bent*, presentes em segmentos portadores de origens de replicação. Os resultados obtidos nesse trabalho permitem concluir que, foi detectado uma associação diferencial da região intrinsecamente *bent* denominada b2, na origem de replicação preferencial do sistema, a oriGNAI3, associação essa que pode ser indicativo da intensa atividade desta origem de replicação no domínio do gene AMPD2 de células de hamster Chinês.

Portanto, no estudo para elucidar os mecanismos envolvidos com as origens de replicação em metazoários, associar estruturas nucleares importantes, que atuam diretamente na manutenção e na funcionalidade nuclear, podem direcionar estudos para aplicação clínica na determinação de protocolos para facilitar diagnóstico, prognóstico e direcionamento no tratamento para células tumorais.

Conflitos de interesses: Os autores declaram nenhum conflito de interesse.

Agradecimentos: Este trabalho teve o suporte da CNPq, CAPES, Fundação Araucária e Secretaria de Estado da Ciência, Tecnologia e Ensino Superior–FUNDO PARANÁ. SMGK, FSR, APSO; FRR; AFR e MAF are recipients of fellowships from Brazilian National Research Council (CNPq). Os autores agradecem ao COMCAP - Complexo de Centrais de Apoio à Pesquisa, da Universidade Estadual de Maringá, UEM, PR, Brasil.

Referências

1. Shen, Z. Genomic instability and cancer: an introduction. *J. Mol. Cell Biol.* **2011**, *3*: 1-3. <http://dx.doi.org/10.1093/jmcb/mjq057>.
2. Toledo, F.; Baron, B., Fernandez, M. A., Lachages, A. M., Mayau, V., Buttin, G., Debatisse, M. OriGNAI3: a narrow zone of preferential replication initiation in mammalian cells identified by 2D gel and competitive PCR replicon mapping techniques. *Nucleic Acids Res* **1998**, *26*(10):2313-21.
3. DePamphilis M.L. Replication origins in metazoan chromosomes: fact or fiction? *Bioessays* **1999**, *21*(1):5-16.
4. Biamonti, G. Paixao, S., Montecucco, A., Peverali, F. A., Riva, S., Falaschi, A. Is DNA sequence sufficient to specify DNA replication origins in metazoan cells? *Chromosome Res* **2003**. *11*(5):403-12.
5. Tower, J. Developmental gene amplification and origin regulation. *Annu Rev Genet* **2004**. *38*: 273–304.
6. Toledo, F., Lachages, A. M., Mayau, V., Debatisse, M. Initiation of DNA replication at the Chinese hamster origin oriGNAI3 relies on local sequences and/or chromatin structures, but not on transcription of the nearby GNAI3 gene. *Nucleic Acids Res.* **1999**. *27*(7):1600-08.
7. Lima Neto, Q. A.; Rando, F. S.; Freitas, D. V. B.; Rodrigues, I. F.; Rosado, F. R.; Fiorini, A.; Gimenes, F.; Tavares, J.; Fernandez, M. A. Straight core structure of DNA replication origins in the mammalian AMPD2 locus. *Biochemistry (New York)*, **2014**. *79*:37 - 43, 2014.
8. Debatisse, M., Toledo, F., Anglana, M. Replication initiation in mammalian cells: changing preferences. *Cell Cycle* **2004**. *3*(1):19-21.
9. Anderson, J. N. Detection, sequence patterns and function of unusual DNA structures. *Nucleic Acids Res* **1986**. *14*: 8513-33.
10. Segal, E., Widom, J. (2009) Poly(dA:dT) tracts: major determinants of nucleosome organization. *Curr Opin Struct Biol*, **2009**. *19*(1):65-71.
11. Passos, K.J.R., Fiorini, A., Rosado, F.R, Freitas, D.V.B, Lima Neto, A. Q. Pattaro Junior, J. R., Gaspar V. P. and Fernandez, M.A. Ability of HMGB1 protein to bind to intrinsically bent and non-bent DNA sites in the AMPD2 gene amplicon. *Genet. Mol. Res.* **2016**. *15* (2): gmr.15027441.
12. Cockerill, P.N.; Garrard, W.T. Chromosomal loop anchorage sites appear to be evolutionarily conserved. *FEBS. Lett* **1986**, *204*(1): 5–7. 12.

13. Adachi, Y.; Kas, E.; Laemmli U.K. Preferential, cooperative binding of DNA topoisomerase II to scaffold-associated regions. *Embo J* **1989**, *8*(13): 3997–4006.
14. Allen, G.C.; Spiker, S.; Thompson, W.F. Use of matrix attachment regions (MARs) to minimize transgene silencing. *Plant Mol Biol* **2000**, *43*(2–3): 361–376. 14.
15. Girod, P.A.; Zahn-Zabal, M.; Mermod, N. Use of the chicken lysozyme 59 matrix attachment region to generate high producer CHO cell lines. *Biotechnol Bioeng.* **2005**, *91*(1): 1–11. 15.
16. Fukuda, Y. Characterization of matrix attachment sites in the upstream region of a tobacco chitinase gene. *Plant Mol Biol.* **1999**, *39*(5): 1051–1062.
17. Jin, Y.; Liu, Z.; Cao, W.; Ma, X.; Fan, Y.; et al. Novel Functional MAR Elements of Double Minute Chromosomes in Human Ovarian Cells Capable of Enhancing Gene Expression. *PLoS ONE* **2012**, *7*(2): e30419. doi:10.1371/journal.pone.0030419.
18. Vassetzky, Y. S.; Hair, A.; Razin, S. V. Rearrangement of Chromatin Domains in Cancer and Development. *Journal of Cellular Biochemistry Supplement*, **2000**. 35:54-60.
19. Castillo-Mora, R.C. Aranda-Anzaldo, A. Reorganization of the DNA–Nuclear Matrix Interactions in a 210 kb Genomic Region Centered on c-myc After DNA Replication In Vivo. **2012** *Journal of Cellular Biochemistry* *113*:2451–2463.
20. Bell, S. P., Stillman, B. ATP-dependent recognition of eukaryotic origins of DNA replication by a multiprotein complex. *Nature*, **1992**. 357(6374):128-34.
21. Krajewski, W. A., Razin, S. V. Organization of specific DNA sequence elements in the region of the replication origin and matrix attachment site in the chicken alpha-globin gene domain. *Mol Gen Genet* **1992**. (2–3): 381–88.
22. Fiorini, A., Gouveia, F. S., Fernandez, M. A. Scaffold/Matrix Attachment Regions and Intrinsic DNA Curvature. *Biochemistry (Moscow)* **2005**, *71*(5): 481-88.
23. Altman, A. L., Fanning, E. Defined sequence modules and an architectural element cooperate to promote initiation at an ectopic mammalian chromosomal replication origin. *Mol Cell Biol*, **2004**. *24* (10): 4138-50.
24. 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*, **2006** .33: 71-82
25. Balani, V. A., Lima Neto, Q. A. L., Takeda, K. I., Gimenes, F., Fiorini, A., Detatisse, M. & Fernandez, M. A. Replication origins oriGNAI3 and oriB of the mammalian AMPD2 locus nested in a region of straight DNA flanked by intrinsically bent DNA sites. *BMB Reports Papers in Press* available online, **2010**.
26. Gimenes, F., Assis, M. A., Fiorini, A., Mareze, V. A., Monesi, N., Fernandez, M. A. Intrinsically bent DNA sites in the *Drosophila melanogaster* third chromosome amplified domain. *Mol Genet Genomics* **2009**, *281*: 539-49.
27. Gimenes, F., Takeda, K. I., Gouveia, F. S., Fiorini, A., Fernandez, M. A. Intrinsically bent DNA in replication origins and gene promoters. *Genet Mol Res* **2008b**. *7*(2): 549-58.
28. Fernandez, M. A., Baron, B., Prigent, M., Toledo, F., Buttin, G. & Debatisse, M. Matrix attachment regions and transcription units in a polygenic mammalian locus overlapping two isochores. *J CellBiochem*, **1997**. *67*, 541-51.
29. Sambrook, J., Russell, D. W. *Molecular cloning: A laboratory manual*. 3rd ed. New York: Cold spring Harbor Laboratory Press. **2001**.
30. Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. **1970**, *227*, 680-685.



© 2019 by the authors. Submitted for possible open access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

