

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA MOLECULAR

IZABEL CRISTINA RODRIGUES DA SILVA

**ISOLAMENTO E ANÁLISE DE REGIÕES DE CROMATINA NATIVA
CONTENDO SEGMENTOS DE DNA NA CONFORMAÇÃO Z
EM DIFERENTES TIPOS CELULARES**

BRASÍLIA-DF
2010

IZABEL CRISTINA RODRIGUES DA SILVA

**ISOLAMENTO E ANÁLISE DE REGIÕES DE CROMATINA NATIVA
CONTENDO SEGMENTOS DE DNA NA CONFORMAÇÃO Z
EM DIFERENTES TIPOS CELULARES**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Molecular, Faculdade de Medicina, Universidade de Brasília, como requisito parcial à obtenção do título de doutor.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo de Macedo Brígido

BRASÍLIA-DF
2010

Banca Examinadora:

Presidente: Prof. Dr. Marcelo de Macedo Brígido, UnB;

Membro: Prof. Dr. David John Bertiolli, UnB;

Membro: Prof. Dr. César Martins de Sá, UnB;

Membro: Prof. Dr. Márcio Poças Fonseca, UnB;

Membro externo : Prof. Dr. Luzitano Brandão Ferreira, CEUB;

Suplente: Prof. Dr. Bergmann Moraes Ribeiro, UnB;

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Biologia Molecular, Departamento de
Biologia Celular, IB/UnB.

Financiamento: CAPES.

Ao meu Senhor, meu Deus, toda Honra e toda Glória, agora e para sempre.

Aos meus pais, que sacrificaram seus sonhos para que eu pudesse realizar os meus, sem compreender nada do que eu fazia, fica para mim o exemplo de Amor incondicional.

À minha sobrinha Helena, o desejo que sua geração encontre um mundo mais justo e digno do que a minha encontrou.

AGRADECIMENTOS

Segundo a norma, esta parte da tese é livre, então vou me permitir toda licença poética e todo o sentimentalismo que está no meu interior.

A começar em expressar meu receio de que devido à correria da finalização deste texto, eu não pudesse cumprir com este item, o qual estou devendo tem 5 anos, na minha dissertação de mestrado. Mas esta não foi pela correria, foi pela minha inexperiência e falta de sabedoria. De lá pra cá, muito aconteceu e fica aqui minha chance de redimir.

Também tenho receio de esquecer alguém, e, portanto, se você abriu esta tese e buscou seu nome e ele não estiver aqui, peço antecipadamente desculpas pelo fato. E se você contribuiu para este trabalho saiba que de coração, em algum momento eu agradei.

... Agradecer... por quem começar? São tantas pessoas que efetivamente colaboraram que estou perdida. A ordem aqui também não interfere. Desde aqueles que contribuíram com as idéias, ou aquele colega-amigo que retirou, para mim, as placas de crescimento de bactéria da estufa a 37^oC, para que eu pudesse dormir mais um pouquinho após um dia anterior cheio de experimento, e me contou a triste novidade que nada cresceu (só esta lista encheria esta página).

Vou então começar a agradecer todos os meus professores de graduação e pós-graduação. Com toda aula eu pude aprender algo e reforçar a minha vontade de seguir carreira acadêmica. Em muitas aulas, reproduzo aquilo que aprendi, não só nos ensinamentos, mas também na postura.

Aos meus orientadores do presente e do passado.

Ao Professor Dr. Marcelo de Macedo Brígido, meu agradecimento muito muito muito especial. Professor, não tenho realmente como te agradecer por tudo o que você fez por mim. Acreditou em mim nas adversidades, teve muita paciência comigo, apostou neste trabalho, alocou recursos de outros projetos para que esta tese pudesse ter sido concluída. Sempre teve um conselho adequado para indicar a saída. É meu exemplo de inteligência e bondade.

Ao, Prof. Dr. Paulo Fernando de Arruda Mancera (UNESP/Botucatu). Seu modelo de orientador de IC foi passado para geração seguinte: aquela exigência de leitura de artigos, do rigor científico, pela busca dos novos conhecimentos, e pela atenção carinhosamente dispensada é meu modelo de orientação de IC hoje.

Ao meu orientador de mestrado, o Prof. Dr. Luiz Fernandez Lopez (FMUSP). Cometi um grande erro professor, como eu fui ingrata. O senhor sempre esteve comigo e eu me esqueci de colocar seu nome no slide de agradecimentos. Desculpe mesmo pela falta de sabedoria. Isto não só está sendo corrigido aqui, mas saiba que nas aulas de TCC sempre digo aos alunos para eles não se esquecerem de fazê-lo. Obrigada por tudo, pelos conselhos científicos e pelo investimento em mim enquanto profissional.

Aos professores do laboratório da Bio Mol que acompanharam de perto este trabalho.

Um agradecimento extremamente especial à Prof. Dra. Andrea Maranhão, pelos conselhos científicos sempre prudentes e certos. Pela paciência comigo nos ensinamentos, e também pelos recursos financeiros de outros projetos investidos neste. Obrigada por tudo.

Ao Professor Dr. Márcio Poças. Professor, aprendi que o tempo pode modificar qualquer situação, e que na providência divina tudo é possível. É sempre bom saber o quanto o senhor confia em mim, e o quanto tem carinho por este trabalho.

A Professora Dra Ildinete, meu exemplo – e de todos os alunos da BioMol- de humanidade e humildade. Professora muito obrigada pelos conselhos científicos e pelos momentos de exemplo.

A Professora Lídia, espero que a bronca que a senhora me deu na qualificação tenha surtido efeito. Tive uma atenção especial com a metodologia deste trabalho.

Aos demais professores, Maria Sueli, Fernando Araripe e Élide, fica também a gratidão pelo compartilhamento dos recursos dos projetos criados por vocês e que tive acesso, na forma de um equipamento utilizado, ou reagente. Em especial à Élide com a atenção à biossegurança do laboratório.

Aos colegas dos laboratórios da Bio mol.

A todos do laboratório 1, pela convivência e pelas informações “moleculares” trocadas.

À Kelly Simi, por ter compartilhado comigo desde o Bio Mol *way of* PCR, clonagem e etc... até os finais de semana nas profundezas do Minhocão Sul, fazendo experimento. Você já é abençoada, só peço para Deus duplicar bênçãos para você.

À Mariana Campos da Paz. Você não está mais no lab, mas me ajudou muito muito muito. Aquelas palavras que escrevi no seu cartão de aniversário continuam valendo: ainda bem que no mundo existem pessoas como você.

À Janaína, pelos diversos conselhos nos momentos difíceis.

Ao Victor e o Rafael pelos momentos engraçados e de sacadas inteligentes. Esses dois juntos montam um laboratório novo com um clips e um chiclete (Macgiver perde para vocês dois).

Ao Paulo, pelo exemplo de serenidade e confiança.

À Luana Quillici, pela cessão do vetor *pMACIA scFvZ22NLS*.

À *Galina* pelos conselhos na reta final.

Às estagiárias que me acompanharam: Aline e Priscila. A ajuda de vocês foi imprescindível.

A todos do laboratório 0, 2, 4 pelas dicas e experiências trocadas.

À Adriane e o Marcus pelas reações de seqüenciamento (e à Camila também).

Adriane, grata pelas dicas com as células A549.

Ah, e é sempre bom lembrar das coisas que aconteceram em 1986 perto de você e ver o quanto eu estou velha e que a geração que está na pós já é outra.

À turma do laboratório 3.

Vocês me adotaram!!!! Criança grande no laboratório pequeno!!! Amigos, meu doutorado não teria sido o mesmo sem vocês.

À Lorena e ao Thiago pelos conselhos científicos sempre funcionais. Thiago, muito obrigada pelas dicas do Real time...

Ao Marciano, pelos conselhos e pelo empréstimo de litros de RNase para laboratório 1 (você se lembra?) e pelos momentos de compartilhar angústias de um doutorado que não acaba nunca.

À Velbaline, minha ex-aluna, agora minha colega. Que orgulho de você! Muito obrigada por todas as infindáveis ajudas, principalmente para fazer células competentes. E por emprestar o ouvido para as

minhas lamentações. Desejo muita felicidade para você.

Hum... tá faltando uma pessoa... Acho que vou chamar a casa dela daqui a pouco para imprimir essa tese, vou jogar este arquivo que está no escritório para a chave maia e vou mandar imprimir na tchuntchis. Será que vou ter que ir antes ao Iguatamateca comprar mais um toner?..

Amiga!!! O que não seria do meu doc sem uma dose diária de Calli-Calli!!! Quantos momentos compartilhados!! Não tenho como agradecer por tudo, valeu pela amizade conquistada e de saber o quanto o que eu falo tem importância para você (e a inversa é verdadeira). E, ai de você com a sua teoria de Águas Claras não pertence mais ao seu nicho ecológico então vai me dar tchau, hein?

Às funcionárias do Lab: Dona Ivonildes, Fátima e Fernanda.... fundamentais para o bom andamento do laboratório. Ao novo agregado, Thompson, obrigada pela ajuda com o nitrogênio.

Agradecimentos externos ao lab de BioMol

Ao pessoal dos laboratórios de Genética e Morfologia, pelas parcerias conquistadas.

À coordenadora da pós, Profa Dra. Anamélia Bocca pelo carinho e compreensão dos problemas que enfrentei para execução deste trabalho.

À minha madrinha Sandra, e a Camila pela atenção e a casa compartilhada.

À “madrinha” Lelê. O melhor de tudo isso não foi nosso trabalho juntas, foi a amizade.

À Luciana Pereira por toda ajuda e por ter me apresentado a Lelê.

Aos “padrinhos” Luzitano Ferreira e Daniel Freire. Pela paciência, carinho, conselhos e por confiarem em mim na nossa empreitada maluca de fazer ciência por amor.

À minha irmã Raquel, pelo apoio quando precisei.

À Flávia, Leo e Marquinhos pelas experiências científicas trocadas, em especial à Flávia pelas broncas dadas e pela confiança de compartilharmos mais um trabalho.

Aos funcionários da Secretaria do programa de pós graduação, que correram muito para que minha defesa acontecesse num tempo recorde.

“Mais uma vez, os homens, desafiados pela dramaticidade da hora atual, se propõe (sic), a si mesmos, como problema. Descobrem que pouco sabem de si, de seu ‘posto no cosmos’, e se inquietam por saber mais. Estará, aliás, no reconhecimento do seu pouco saber de si uma das razões da procura. Ao se instalarem na quase, senão trágica descoberta do seu pouco saber de si, se fazem problema a eles mesmos. Indagam. Respondem, e suas novas respostas levam a novas perguntas.”

(Paulo Freire, *Pedagogia do Oprimido*, 2006, p.311)

"O risco só tem sentido quando o corro por uma razão valiosa, um ideal, um sonho mais além do risco mesmo."

(Paulo Freire, *À sombra desta mangueira*, 2000, p.57)

“(...)“Sonhar não é apenas um ato político necessário; mas, também uma conotação da forma histórico-social de “estar sendo” de mulheres e homens. Faz parte da natureza humana que, dentro da história, acha-se em permanente processo de tornar-se... *Não há mudanças sem sonhos; como não há sonhos sem esperança.*”

(Paulo Freire, *Pedagogia da esperança*, 1997, p.91, grifo meu)

RESUMO

SILVA ICR. **Isolamento e análise de regiões de cromatina nativa contendo segmentos de DNA na conformação Z em diferentes tipos celulares.** [tese]. Brasília: Faculdade de Medicina, Universidade de Brasília; 2010.

O Z-DNA é uma estrutura energeticamente desfavorável do DNA que pode ser formada sob certas condições fisiológicas e é conhecida por estar envolvida em uma série de atividades biológicas como a regulação da transcrição. O presente estudo teve como objetivo identificar regiões genômicas em conformação de Z-DNA no genoma humano. Para a pesquisa destas regiões na conformação Z no núcleo da célula, um vetor que contém informação genética para a expressão de um fragmento de anticorpo que reconhece Z-DNA (pMACIA scFvZ22NLS) foi transfectado em linhagens celulares humanas MCF-7 e A549, anteriormente a imunoprecipitação de cromatina com uso de agente fixador (XChIP) e clonagem. Outra estratégia substituiu a transfecção por um anticorpo monoclonal anti-Z-DNA, em uma estratégia ChIP sem o uso de fixadores (NChIP). Poucas sequências foram recuperadas destes experimentos e foram analisadas conforme seu conteúdo. Análise de dados por ferramentas de bioinformática mostraram três regiões no cromossomo 1 e uma no cromossomo 12 que contêm sequências potenciais formadoras de Z-DNA e foram confirmadas pelos programas Z-Catcher e Z-Hunt. Dentre elas, uma no cromossomo 1 contêm região repetitivas identificadas pelo programa *Repeat Masker* do tipo SINE/Alu, e tem similaridade com o segundo intron do gene *TMCC2* (transmembrane and coiled-coil domain family 2), que codifica a proteína cerebral n.11. A quantificação, por meio da PCR quantitativa em tempo Real, dos fragmentos recuperados pela estratégia de ChIP, revelou que independente do tipo celular, na mesma região, a recuperação foi estatisticamente igual, porém a estratégia ChIP livre de formaldeído recuperou uma maior quantidade de cada sequência formadora de Z. Estes dados sugerem a presença de sequências potenciais formadoras de Z-DNA que podem ser investigadas como potenciais elementos regulatórios.

Descritores: Z-DNA. Linhagem de células humanas. NChIP. XChIP.

ABSTRACT

SILVA ICR. **Isolation and analysis of native chromatin regions containing Z conformation DNA segments in different cell types.** [thesis]. Brasilia: Faculdade de Medicina, Universidade de Brasilia; 2010.

Left handed Z-DNA is an energetically unfavorable DNA structure that could be formed under certain physiological conditions and is involved in a number of cellular activities, such as transcription regulation. The present study focuses on identifying the distributions of Z-DNA regions in the human genome. To search for Z-DNA regions in the cell nucleus, a vector that codes for an antibody fragment that recognizes Z-DNA (pMACIA scFvZ22NLS) was transfected into human cancers MCF7 and A549 cell lines, prior to a chromatin immunoprecipitation with fixer agent (XChIP) and cloning approach. Another strategy used a monoclonal antibody against Z-DNA in a ChIP without fixer agents (NChIP). Few sequences were recovered from these experiments and they were analyzed for their nucleotide sequences. Bioinformatics analysis pointed three regions at chromosome 1 and one at chromosome 12 that presented potential Z- regions and these results were corroborated by the Z-Hunt and Z-Catcher softwares. Among them, one located at human chromosome 1, identified by the Repeat Masker software for harboring SINE/Alu repetitive elements, has similarity with the second intronic region of the TMCC2 (transmembrane and coiled-coil domain family 2) gene, which encodes for the cerebral protein n. 11. The quantification, through Real time quantitative PCR, of the fragments recovered by ChIP strategy, revealed that independently of cell type the Z-DNA conformation was present in the same region of the genome. The recovery of these segments was statistically similar in both strategies used; nevertheless the one free from formaldehyde ChIP recovered quantitatively most sequences. These data suggest the presence of physiologically relevant Z-DNA forming sequences in the human genome which may potentially play a role as regulatory elements. Hence, further investigations to determine its function are required.

Keywords: Z-DNA. Cell line. XChIP. NChIP.

LISTA DE ABREVIATURAS

ADAR1 Enzima Desaminase de Adenosina de RNA-fita dupla.
Amp^R Gene de resistência à ampicilina (β -lactamase)
BSA Albumina Sérica Bovina
°C Grau Celsius
ChIP Imunoprecipitação de Cromatina
DML-1 veja ZBP1
DNA Ácido desoxirribonucléico
EDTA Ácido etilenodiaminotetracético
FITC Fluoresceína isotiocianato
g Grama
g Força gravitacional
h Hora
IFN Interferon
kb Kilobase
L Litro
LM-PCR Reação em cadeia da polimerase mediada por ligase
M Molar
mA Miliampère
mg Miligrama
min Minuto
mL Mililitro
mM Milimolar
ms Milisegundo
ng Nanograma
NChIP Imunoprecipitação de Cromatina Nativa
OD densidade ótica
p Peso
pb Par de base
PBS Tampão salina fosfato
PCR Reação em cadeia da polimerase
pH Potencial hidrogeniônico
pmol picomol
PMSF Fluoreto de fenilmetilsulfonato
ptnA Proteína A de *Staphylococcus aureus*
rpm Rotações por minuto
RNA Ácido ribonucléico
RNAase Ribonuclease
scFv Fragmento variável (de anticorpo) de cadeia única
SDS Sódio Duodecil Sulfato
Tris Tri (hidroximetil) aminometano
U Unidade enzimática
v Volume
V Volts
VV *Vaccinia Virus*

XChIP Imunoprecipitação de Cromatina com uso de agente fixador

μ F Micro Faraday

μ g Micrograma

μ L Microlitro

μ m Micrômetro

μ M Micromolar

ZBP1 Z-DNA binding protein 1

Z-DNA DNA na conformação Z.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Diagramas de linhas das conformações B e Z do DNA.....	15
Figura 2 – A estrutura do Z-DNA induz instabilidade genética em células de mamíferos	27
Figura 3 – Representação do protocolo básico de imunoprecipitação de cromatina	29
Figura 4- Representação das reações químicas durante a ligação cruzada do DNA e proteínas induzidas pelo formaldeído.....	32
Figura 5 – Complicações possíveis no experimento de CHIP - Formação diferencial da ligação cruzada de proteínas-DNA	34
Figura 6 – Complicações possíveis no experimento de CHIP - Acessibilidade variável ao epítipo.....	36
Figura 7- Descrição da estratégia CHIP- chip.....	41
Figura 8- Diagrama esquemático da estratégia modificada para clonagem de fragmentos CHIP (Chip cloning).....	42
Figura 9 – Diagrama resumido do procedimento Q2 CHIP.....	44
Figura 10- Uma das abordagens experimentais utilizadas neste trabalho.....	46
Figura 11- Representação esquemática do vetor pMACIA scFvZ22NLS.....	50
Figura 12 – O método de transfecção com lipofectamine LTX parece ser mais eficiente e reprodutível em experimentos que utilizam células MCF-7.....	90
Figura 13 – O fragmento do anticorpo anti Z-DNA colocaliza-se com estruturas nucleares.....	91
Figura 14- Análise eletroforética em gel de agarose a 1% do teste da amplificação dos oligonucleotídeos.....	97
Figura 15- Fragmentos CHIP de regiões gênicas potenciais formadoras de Z-DNA são recuperados significativamente por CHIP quando comparados com a amplificação da sequência controle negativo (hGAPDH).....	99
Figura 16- Fragmentos CHIP de regiões gênicas potenciais formadoras de Z-DNA são recuperados significativamente por CHIP quando comparados com a amplificação da sequência controle negativo (hGAPDH).....	100

Figura 17- Fragmentos CHIP de regiões gênicas sem potencial formação de Z-DNA predita não são recuperadas após CHIP.....	101
Figura 18- Análise eletroforética em gel de agarose a 1% da amplificação, por LM-PCR dos fragmentos de Z-DNA obtidos por CHIP.....	106

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	14
1.1	Z-DNA.....	14
1.1.1	A conformação Z-DNA.....	14
1.1.2	Atividades biológicas que facilitam a formação de Z-DNA <i>in vivo</i>	16
1.1.3	Z-DNA como antígeno.....	16
1.1.4	Z-DNA e a transcrição.....	18
1.1.5	Z-DNA emerge como regulador.....	19
1.1.6	Proteínas Ligantes a Z-DNA.....	20
1.1.6.1	ADAR1.....	21
1.1.6.2	Proteína EL3 de Vaccinia vírus (VV).....	22
1.1.6.3	DLM-1.....	23
1.1.7	Doenças Humanas e Z-DNA.....	24
1.1.7.1	Z-DNA e Pontos de translocação cromossomal em Cânceres nos Tecidos Sanguíneos.....	24
1.1.7.2	Z-DNA e outras doenças.....	25
1.1.8	A instabilidade genética pode ser induzida pela presença de Z-DNA.....	26
1.2	<i>Imunoprecipitação de cromatina: princípios, aplicações e variações da estratégia</i>	28
1.2.1	Princípios da Imunoprecipitação de Cromatina.....	28
1.2.2	Etapas do experimento.....	28
1.2.3	Parâmetros críticos do CHIP.....	30
1.2.3.1	Tamanho da amostra.....	30
1.2.3.1.1	<i>Q2 ChIP- Quick and Quantitative Chromatin Immunoprecipitation assay</i>	30
1.2.3.2	Uso de agentes fixadores.....	31
1.2.3.2.1	<i>Formaldeído</i>	31
1.2.3.2.2	<i>Outros agentes fixadores</i>	33
1.2.3.2.3	<i>Problemas com a fixação e a Imunoprecipitação de cromatina nativa</i>	34
1.2.3.3	Anticorpos e os ensaios CHIP: problemas de interpretação e quantificação.....	35
1.2.3.4	Controles para CHIP.....	37
1.2.4	Tipos de abordagens que utilizam CHIP como ferramenta de análise.....	38
1.2.4.1	Estudo de modificações em histonas.....	38
1.2.4.2	Estudos de fatores de transcrição em regiões promotoras.....	39
1.2.5	Estratégias para análises de dados de CHIP.....	40
1.2.5.1	CHIP-chip.....	40
1.2.5.2	CHIP-cloning.....	41
1.2.5.3	PCR quantitativa em tempo real.....	43
2	OBJETIVOS.....	45
	Abordagem Experimental com uso de agente fixador.....	46
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	47
3.1	<i>Materiais</i>	48
3.1.1	Células.....	48
3.1.2	Plasmídios utilizados.....	50
3.1.2.1	<i>pMACIA scFvZ22NLS</i>	50

3.1.2.2	<i>pCMV-βgal</i>	50
3.1.2.3	<i>pGEM®-T Easy</i>	51
3.1.3	Oligonucleotídeos utilizados para seqüenciamento	51
3.1.4	Soluções estoques de inibidores de proteases	51
3.1.4.1	<i>PMSF (Phenilmethylsulfonyl Fluoride)</i>	52
3.1.4.2	<i>Aprotinina</i>	52
3.1.4.3	<i>Pepstatina A</i>	52
3.1.5	Meios de Cultura e soluções para bactérias	52
3.1.6	Meio de cultura e soluções para cultura de células de mamíferos	54
3.1.7	Soluções e tampões de uso geral	56
3.1.8	Material para preparo de células competentes e transformação – bactéria	57
3.1.9	Soluções e reagentes para eletroforese em gel de agarose	57
3.1.10	Marcadores moleculares para DNA	58
3.1.11	Kits comerciais	59
3.1.12	Anticorpos utilizados no ensaio de Imunoprecipitação de cromatina	60
3.1.13	Materiais para imunofluorescência de células em cultura	60
3.1.14	Materiais para Imunoprecipitação de cromatina	61
3.2	Métodos	63
3.2.1	Teste da transfecção de MCF-7 por três diferentes metodologias	63
3.2.1.1	<i>Transfecção de células MCF-7 pelo método de fosfato de cálcio</i>	63
3.2.1.2	<i>Transfecção de células MCF-7 pelo método de eletroporação</i>	64
3.2.1.3	<i>Transfecção de células MCF-7 com lipídeos catiônicos</i>	64
3.2.2	Imunofluorescência de células em cultura transfectadas com o vetor pMACIA scFvZ22NLS	65
3.2.2.1	<i>Transfecção de células MCF7 com uso do kit Lipofectamine™ LTX</i>	65
3.2.2.2	<i>Imunofluorescência</i>	65
3.2.3	Transfecção de células e imunoprecipitação de cromatina com uso de formaldeído como agente fixador (X-ChIP)	66
3.2.3.1	<i>Preparação das placas</i>	67
3.2.3.2	<i>Transfecção</i>	67
3.2.3.3	<i>Ensaio da imunoprecipitação de cromatina com uso de agente fixador</i>	68
3.2.3.3.1	<i>Cross-linking</i> mediada pelo formaldeído, lise das células, sonicação e	

remoção das ligações inespecíficas de proteína A.	68
3.2.3.3.2 Recuperação do complexo anticorpo-proteína-cromatina e lavagem da cromatina imunoprecipitada.	70
3.2.3.3.3 Eluição da cromatina, reversão do <i>cross-linking</i> e extração da cromatina.	71
3.2.4 Imunoprecipitação de cromatina nativa (N-ChIP)	72
3.2.5 Clonagem no Vetor pGEM-T easy®	76
3.2.5.1 Reação de reparo das extremidades dos fragmentos de DNA	76
3.2.5.2 Adenilação dos fragmentos de DNA	76
3.2.5.3 Ligação dos fragmentos de DNA aos vetores de clonagem.....	77
3.2.5.4 Transformação da bactéria <i>Escherichia coli</i> XL1Blue com plasmídeos pGEM-T easy recombinantes	77
3.2.5.5 Sequenciamento	79
3.2.5.6 Análise das sequências potencialmente formadoras de Z-DNA	79
3.2.5.6.1 Programa Z-Hunt	79
3.2.5.6.2 Programa Z-Catcher.....	80
3.2.5.7 Análise de sequências repetitivas nos clones com fragmentos de CHIP-Z-DNA..	81
3.2.6 PCR mediada por ligação (LM-PCR)	81
3.2.7 PCR qualitativo e PCR quantitativo em tempo real	83
3.2.7.1 Desenho dos oligonucleotídeos para a PCR em tempo real	83
3.2.7.2 PCR qualitativo.....	84
3.2.7.3 PCR em tempo real	85
3.2.7.4 Análise dos dados da PCR em tempo real	86
3.2.8 Análise estatística	87
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	89
4.1 A padronização da transfecção apontou a lipofecção como estratégia adequada para transfecção de células MCF-7.....	89
4.2 O fragmento de anticorpo anti Z-DNA, expresso a partir do vetor pMACIA scFvZ22NLS, colocaliza-se com estruturas nucleares.....	91
4.3 A análise de sequências obtidas pelo CHIP revelou a presença de sequências potenciais formadoras de Z-DNA e com sequências repetitivas.....	92
4.4 Desenho de oligonucleotídeos para reações de amplificação <i>in vitro</i> de regiões formadoras de Z-DNA	94
4.5 Teste de amplificação com oligonucleotídeos.....	97
4.6 PCR em tempo real para quantificação do enriquecimento da cromatina recuperada	
98	

4.7	<i>A imunoprecipitação de cromatina recuperou fragmentos de diferentes tamanhos</i>	105
5	CONCLUSÃO E PERSPECTIVA.....	107
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	108
	APÊNDICE 1.....	114
	<i>Sequências de clones obtidos pela estratégia ChIP que obtiveram Z score inferior a 700 e foram excluídos da validação por Real time PCR.....</i>	114
	APÊNDICE 2.....	117
	<i>Sequências de clones obtidos pela estratégia ChIP que obtiveram Z score superior a 700 e foram incluídos na validação por Real time PCR</i>	117

Introdução

1 INTRODUÇÃO

1.1 Z-DNA

1.1.1 A conformação Z-DNA

O Z-DNA é uma conformação alternativa do DNA, geralmente adotada em regiões de alternância de purinas – pirimidinas na sequência polinucleotídica, sendo a repetição dGdC a mais favorável. A relação entre o Z-DNA e o mais conhecido B-DNA foi estabelecida na década de 70 (Wang *et al.*, 1979).

Experimentos demonstraram que a exposição de sequências de DNA poli d(GC) a altas concentrações de sal (4M de NaCl) resultava na inversão do espectro de dicroísmo circular, devido a formação de uma estrutura secundária de DNA não usual (Pohl e Jovin, 1972). Posteriormente, a análise estrutural detalhada deste tipo de amostra por cristalografia de raios-X mostrou que o DNA forma uma estrutura em hélice orientada à esquerda, com pontes glicosídicas se alternando em conformação *anti e syn*¹. Nesta estrutura, o esqueleto fosfato assume uma orientação em *zig-zag* - o que caracteriza o termo Z-DNA. Observou-se ainda que o estado menos energético da molécula de DNA em solução fisiológica era o de conformação B, enquanto a conformação em Z, o estado energético mais elevado.

Devido ao fato que as purinas podem formar conformação *syn* sem grandes perdas energéticas, tornou-se perceptível que uma sequência específica de pares de bases era

¹ Os termos *syn* e *anti* referem-se a orientação da ligação glicosídica. As purinas assumem duas conformações: **anti** ou **syn**. As pirimidinas, como só têm um anel, ocorrem na conformação **anti**.

importante na determinação da energia necessária para a mudança de B-DNA para Z-DNA (Rich *et al.*, 1984). As sequências que mais prontamente eram convertidas tinham alternâncias de purinas e pirimidinas, especialmente de C e G. Esta mudança também ocorria facilmente com alternâncias de CA em uma fita e TG na outra (Nordheim *et al.*, 1981; Haniford e Pulleyblank, 1983). Porém, foi demonstrado que outras sequências são capazes de formar Z-DNA, como a TT (Feigon *et al.*, 1985).

A figura 1 apresenta um modelo esquemático da comparação do B-DNA e Z-DNA.

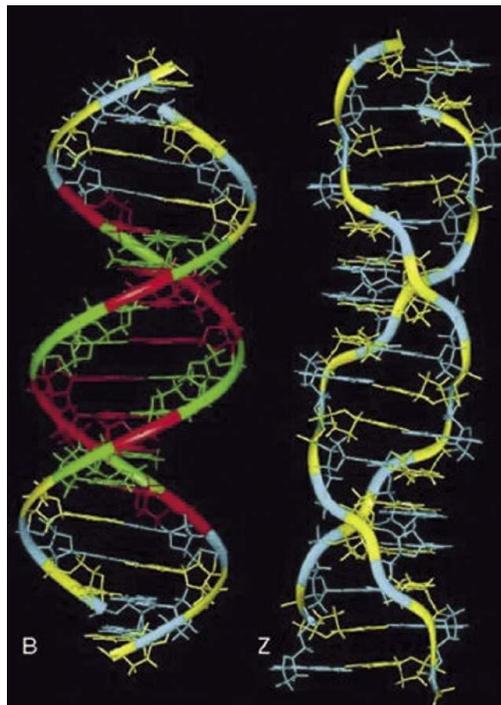


Figura 1 – Diagramas de linhas das conformações B e Z do DNA. O pareamento das bases em ambas as estruturas é do tipo Watson-Crick. Os nucleotídeos estão codificados por cor (a citosina está representada em amarelo; guanina em azul, timina em verde e adenina em vermelho). O B-DNA é uma dupla hélice orientada à direita com passo de 3,4nm e 10 pares de bases por volta. O Z-DNA é uma dupla hélice com orientação à esquerda, forma um zig-zag com passo de 4,5nm e 12 pares de bases por volta.
Fonte: Morange (2007)

1.1.2 Atividades biológicas que facilitam a formação de Z-DNA *in vivo*

As descobertas sobre Z-DNA estimularam os químicos a estudarem as mudanças conformacionais do DNA. No entanto, a relevância biológica do Z-DNA tem sido controversa desde a sua descoberta. Apesar das condições iônicas que foram adequadas para estabilizar o Z-DNA em muitos experimentos serem diferentes das condições celulares, demonstrou-se que a metilação de citosinas, e cátions esperminas e espermidinas também podem estabilizar o Z-DNA *in vivo* (Behe e Felsenfeld, 1981). Posteriormente, a descoberta de que o superenovelamento negativo dos plasmídeos em procariotos poderia estabilizar o Z-DNA (Haniford e Pulleyblank, 1983) reforçou a hipótese de que o Z-DNA ocorre *in vivo*.

Outras análises foram efetuadas para determinar a energia que era requerida para o superenovelamento de um plasmídeo com uma sequência particular que alterna da forma B para a forma Z. A energética destas conformações foi estudada para diferentes sequências (Ellison et. al., 1985). Este conhecimento levou Ellison *et al* (1985) a desenvolverem um algoritmo para prever a propensão de qualquer sequência do DNA alternar da forma B para a forma Z, o Z-Hunt. Posteriormente, este algoritmo foi atualizado por Champ *et al.* (2004) para o mapeamento do Z-DNA no cromossomo 22.

1.1.3 Z-DNA como antígeno

Contudo, o fundamento em direção à demonstração da função biológica do Z-DNA veio da pesquisa no ramo da imunologia. Isto foi possível porque diferentemente do B-DNA, o Z-DNA é altamente antigênico: tanto anticorpos policlonais (Lafer *et al.*, 1981) quanto

monoclonais (Moller *et al.*, 1982) podem se ligar as moléculas de Z-DNA. A caracterização destes anticorpos levou à descoberta de que anticorpos anti-Z-DNA são encontrados em doenças auto-imunes humanas, especialmente o lúpus eritematoso sistêmico (Lafer *et al.*, 1983).

Alguns anticorpos anti-Z-DNA têm sido preparados, os quais apresentam variação de especificidade quanto a diferentes sequências formadoras de Z-DNA. Este fato pode levar a crer que o Z-DNA apresente mais de um determinante antigênico na sua estrutura (Sanford e Stollar, 1990). Dois diferentes modelos de especificidade para anticorpos anti-Z-DNA foram identificados em vários anticorpos monoclonais gerados em camundongo C57BL/6: O Z44 e o Z22.

O anticorpo monoclonal Z44 liga-se ao Z-DNA somente quando a sequência nucleotídica está em perfeita alternância dG-dC (Nordheim *et al.*, 1986). Por outro lado, o anticorpo monoclonal Z22 reconhece o Z-DNA em variadas sequências de bases, incluindo (dG-dC)_n. (dG-dC)_n; (dT-dG)_n.(dC-dA)_n; (dG-dme5C)_n. (dG-dme5C)_n e (dG-dBr5C)_n.(dG-dBr5C)_n (Moller *et al.*, 1982). Sanford e Stollar (1990) demonstraram um íntimo contato de Z44 com o próton do carbono C5 da citosina. Por isso, quando o Z-DNA se encontra metilado nesta posição [d(G-m5C)₃], observa-se uma diminuição da ligação do Z44 à sequência de Z-DNA.

Para o Z22, os mesmos autores demonstraram que o próton do carbono C8 da guanidina, localizado próximo ao esqueleto açúcar-fosfato, desempenha um papel importante na interação antígeno-anticorpo. Porém, diferentemente de Z44, a ligação do Z22 ao Z-DNA não é bloqueada pela presença do grupo metil no carbono C5 da citosina. Estudos complementares apontaram que estes anticorpos monoclonais reconhecem diferentes regiões do DNA: o Z44 se liga as bases expostas na superfície que substitui a fenda

maior; e, o Z22 interage, pelo menos em parte, com o esqueleto fosfodiéster do DNA. Posteriormente, Brigido e Stollar (1991), clonaram e sequenciaram o cDNA dos domínios de cadeia leve e de cadeia pesada V_L e V_H dos anticorpos Z22 e Z44.

Anticorpos anti-Z-DNA também são uma poderosa ferramenta para avaliar a organização do cromossomo. Eles ligam-se a regiões de interbandas de cromossomos politênicos de *Drosophila* e esta ligação é particularmente forte em regiões de *puff*, onde há sítios com atividade transcricional aumentada (Nordheim *et al.*, 1981).

1.1.4 Z-DNA e a transcrição

Outras pesquisas indicaram uma associação da formação de Z-DNA à transcrição. Esta hipótese baseia-se no fato de que frente ao movimento da polimerase são desenvolvidas torções positivas das fitas. Apesar das topoisomerases atuarem no relaxamento da superfície do DNA, o movimento continuado das RNA polimerases gera mais torções negativas na fita do que as topoisomerases são capazes de relaxar. Quando cessa a transcrição, as topoisomerases rapidamente agem convertendo o DNA de volta à conformação B. Então, o Z-DNA foi visto como uma conformação transiente, servindo de tampão para o superenovelamento negativo, que é formada e desfeita, dependendo da atividade fisiológica.

Para estudar mais diretamente a associação entre Z-DNA e transcrição, pesquisadores utilizaram células de mamíferos encapsuladas em microcápsulas de agarose e tratadas com detergente suave para lisar a membrana plasmática, sem alterar o núcleo, o que permite reproduzir a taxa de transcrição *in vivo* (Jackson, Yuan e Cook, 1988). Com o uso de anticorpos monoclonais biotinilados contra o Z-DNA, o nível de Z-DNA foi determinado

nestes núcleos e demonstrou-se ser regulado pela torção da fita (Wittig, Dorbic e Rich, 1989). Além disso, um aumento na atividade transcricional dos núcleos embebidos resultaram em um aumento paralelo da quantidade de Z-DNA específico (Wittig, Dorbic e Rich, 1991). Por meio do uso de raios ultravioletas para a determinação da ligação cruzada de proteína – DNA, eles ligaram anticorpos anti-Z-DNA biotinilados ao DNA. Assim, foi possível isolar fragmentos restritos de DNA que eram ligados aos anticorpos e investigar as sequências de nucleotídeos específicas (Wittig *et al.*, 1992).

Em um estudo posterior foram encontradas três regiões próximas aos promotores do gene *c-MYC* (conhecido protooncogene) que formavam Z-DNA quando este gene era expresso, e os nucleotídeos desta região foram identificados. Entretanto, essas regiões rapidamente se revertiam a B-DNA se a transcrição do *c-MYC* fosse desligada (Wolfl, Wittig e Rich, 1995).

1.1.5 Z-DNA emerge como regulador

No início dos anos 2000, foi observado que o Z-DNA serve como substrato da enzima Uracil Desaminase interferindo com o processo de edição de RNA. Essa reafirmação do Z-DNA como alvo de regulação, realimentou a hipótese de sua participação em processos fundamentais do metabolismo informacional (Oh, Kim e Rich, 2002; Gagna e Lambert, 2003).

Liu *et al* (2001) também levantaram a possibilidade que o Z-DNA pode ser um componente importante na regulação de certos genes de mamíferos. A pesquisa sobre os genes regulados pelo fator BAF, um complexo de remodelagem de cromatina em mamíferos,

análogo ao complexo SWI/SNF de leveduras, sugeriu a função do Z-DNA como regulador da transcrição quando acoplado com o fator nuclear I (NFI).

Naquele estudo, arranjos de DNA foram usados para fazer uma triagem de uma biblioteca de genes que eram reguladas pelo complexo BAF em mamíferos. A triagem identificou 80 sequências de mRNA cujos os níveis eram elevados e dois sofreram supressão pelo complexo BAF. Uma análise bioquímica detalhada do gene do fator de crescimento estimulante da colônia-I (CSF-1), associado a um dos mRNAs induzidos, revelou uma formação de Z-DNA clássica (do tipo repetição CA/TG), imediatamente à montante do sítio consenso NFI. A substituição desta sequência repetitiva CA/TG por uma sequência aleatória resultou em uma atividade supressora do promotor do gene CSF-1.

No trabalho de Champ *et al.* (2004), questionou-se o mecanismo de acoplamento da ativação do NFI com Z-DNA induzido por transcrição poderia ser único para o gene CSF-I, ou se seria característico para uma ampla classe de genes regulados similarmente. No estudo atual, sequências que têm um forte potencial termodinâmico para formar Z-DNA e se ligar ao NFI foram identificadas no cromossomo 22 humano. Os resultados indicaram que um grupo bem definido de genes humanos pode ser regulado pelo acoplamento do Z-DNA com fator de transcrição NFI de eucariotos.

1.1.6 Proteínas Ligantes a Z-DNA

Devido ao fato que a conformação Z-DNA ter sido postulada para funcionar com um elemento *cis*, a identificação de proteínas que se ligam de um modo específico a estrutura do Z-DNA tem auxiliado na tentativa de identificação das funções biológicas do Z-DNA *in vivo*. Nas décadas passadas, algumas proteínas ligantes ao Z-DNA foram identificadas em *Vaccinia*

vírus, Escherichia coli, Drosophila, galinha, rato, boi, e no núcleo de células humanas (Rothenburg *et al.*, 2002). Apesar das funções da maioria destas proteínas ligantes a Z-DNA não terem sido completamente estabelecidas, as evidências mostram que elas participam de vias importantes na expressão gênica, na recombinação do DNA, na edição do RNA, na patogenicidade viral e no desenvolvimento tumoral, revisto por Rich e Zhang (2003). A enzima Desaminase de Adenosina de RNA-fita dupla (ADAR1), E3L e DLM-1 estão entre as proteínas estudadas. O domínio de ligação a Z-DNA destas proteínas, Z-alfa, demonstra alta similaridade de sequência adotando conformação *winged-helix* e liga-se a estrutura do Z-DNA de maneira específica.

1.1.6.1 ADAR1

ADAR1 é um membro da família das desaminases cuja expressão é induzida por interferon (IFN). Pela conversão de adeninas em inosinas, ADAR1 é uma importante molécula para geração da diversidade de RNA e de proteínas. Existem dois motivos de ligação ao Z-DNA: Z-alfa e Z-beta. O Z-alfa pertence à família das proteínas *winged-helix* e é capaz de se ligar especificamente ao Z-DNA com K_d de ~ 4 mM (Oh, Kim e Rich, 2002). Uma interação entre Z-alfa (ADAR1) e DNA plasmidial superenovelado contendo insertos GC(13) ou GC(2)CGC(10) foi observada em microscopia de força atômica (Kim *et al.*, 2004). A ligação de ADAR1 em uma estrutura Z-DNA pode aumentar a eficiência da edição A-para-I *in vitro* (Koeris *et al.*, 2005).

Propõe-se que a estrutura de Z-DNA induzida pela movimentação da enzima RNA polimerase em uma sequência apropriada seja capaz de recrutar a proteína ADAR1 no sítio de transcrição ao lado da maquinaria de transcrição para edição da nova fita de RNA

sintetizado (Oh, Kim e Rich, 2002). Além de revelar a edição de RNA, o estudo utilizou um gene repórter sob o controle de um promotor mínimo com uma sequência formadora de Z-DNA na vizinhança, e demonstrou que a interação Z-DNA e ADAR1 aumentam a atividade do promotor. Quando Z-alfa (ADAR1) é expresso na célula, ocorre um aumento substancial da transcrição do gene repórter, e esse resultado sugere que a formação de Z-DNA na região promotora é induzida ou estabilizada pela proteína ligante ao Z-DNA.

1.1.6.2 Proteína E3L de Vaccinia vírus (VV)

E3L é uma proteína codificada pelo gene de resistência a interferons no VV. O domínio N-terminal da proteína E3L tem similaridade de sequência à região de Z-alfa encontrada em ADAR1 e DLM-1, mas tem baixa afinidade de ligação a Z-DNA quando comparada com suas homólogas, devido ao resíduo Y48 no domínio Z-alfa, que adota uma conformação diferente na cadeia quando requer um rearranjo para ligação de Z-DNA. Ambos os domínios de ligação a dupla fita de RNA: Z-alfa e C-terminal são convocados para replicação de VV em inúmeras células hospedeiras (Beattie *et al.*, 1996), e para patogenicidade no modelo murino (Brandt e Jacobs, 2001).

Os *Vaccinia vírus* que contêm uma deleção na região N-terminal (incluindo o domínio de ligação a Z-DNA) de E3L são atenuados para neuropatogenicidade e falham na infecção de pulmões ou cérebros após instalação intranasal em camundongos C57BL/6. Pesquisadores têm considerado o uso de vírus recombinantes como vacinas para proteção contra sarampo devido ao decréscimo da neurovirulência (Brandt *et al.*, 2005). Os VV preservam sua patogenicidade quando os domínios ligantes a Z-DNA da proteína E3L são trocados por domínios de ligação a Z-DNA similares aos de ADAR1 e DLM-1 (Kim *et al.*, 2003).

Recentemente estudou-se que a proteína E3L (ou apenas o domínio Z-alfa) aumenta a expressão do gene repórter de cinco a dez vezes, nas células HeLa, quando um promotor mínimo contendo elementos IL-6, NF-AP ou p53 a jusante do TATA Box está presente; e até mesmo aumenta duas vezes a expressão com um promotor básico contendo somente TATA box, mas não mostra efeitos sobre o gene repórter se houver a perda do TATA box ou se contiver elementos CREB, AT-1 ou NF kappa B a montante do TATA box. A proteína E3L, seu domínio Z-alfa, ou proteínas quiméricas cujo domínio Z-alfa foi trocado pelo domínio Z-alfa de ADAR1 ou DLM-1, protegem significativamente células HeLa da apoptose induzida por higromicina-B em um experimento dose-tempo dependente (Kwon e Rich, 2005). Se uma deleção ou uma mutação de ponto for introduzida na região Z-alfa, o efeito da proteção desaparece, indicando que a ligação a Z-DNA é essencial para essa atividade.

1.1.6.3 DLM-1

DLM-1 é também conhecida como a proteína 1 ligante a Z-DNA (ZBP1). A capacidade ligante a Z-DNA desta proteína foi identificada pela busca de sequência em bancos de dados com homologia a região de Z-alfa ADAR1 (Schwartz *et al.*, 2001). DLM1 é uma proteína associado a um tumor, predominantemente expressa em tecidos linfáticos. A expressão de DLM-1 é induzida por IFN-gama ou lipo-polissacarídeos nos macrófagos peritoneais de camundongos. Sendo assim, especula-se que esteja envolvida nas respostas do hospedeiro contra estresse celulares, incluindo tumorigênese e infecção viral (Fu *et al.*, 1999).

A potencial função de DLM-1, e particularmente a sua potencial função de ligação a Z-DNA, no desenvolvimento do tumor e na resposta ao estresse permanece por ser esclarecida.

Proteínas ligantes a Z-DNA compartilham características estruturais comuns; por exemplo, peptídeos com alternância de lisinas (como os KGKGKGK) podem ligar-se especificamente ao Z-DNA (Kim *et al.*, 2006) e este tipo de sequência pode ser encontrada em muitas proteínas. Estas observações fornecem uma forte evidência que interação do domínio de ligação a Z-DNA e a estrutura de Z-DNA é crucial a função biológica dessas proteínas.

1.1.7 Doenças Humanas e Z-DNA

1.1.7.1 Z-DNA e Pontos de translocação cromossomal em Cânceres nos Tecidos Sanguíneos

As translocações cromossomais estão entre as alterações genéticas mais comuns em cânceres de tecidos sanguíneos (leucemias, linfomas e mielomas). Genes de receptores para imunoglobulinas e células-T estão entre os *loci* que frequentemente sofrem translocações, pois as quebras de DNA dupla fita ocorrem naturalmente durante a recombinação V(D)J para produção de anticorpos rearranjados ou de genes de receptores de antígenos (Sadofsky, 2001). Curiosamente, muitos pontos quentes de quebra encontrados em oncogenes não têm homologia com nenhuma sequência V(D)J nem com sítios com reconhecimento da recombinase, indicando que eles, então, não são o resultado de uma recombinação V(D)J (Hecht e Aster, 2000). Por outro lado, eles freqüentemente estão associados a regiões formadoras de Z-DNA ou de estruturas não-B-DNA.

Um exemplo disto é a translocação t(12;21)(p13q22), que fusiona os genes *ETV6* e *AML1*. Esta é a translocação cromossomal mais freqüentemente associada com leucemia linfoblástica aguda infantil em precursores de células-B. Vários pontos quentes de quebra e

polimorfismo de inserção foram encontrados próximos a sítios de alternância purina-pirimidina formadores de Z-DNA no gene *ETV6* (Thandla et al., 1999).

Boehm et al. (1989), examinaram os pontos de quebra de três translocações tumores-específicas nas quais os genes relatados de ambos cromossomos não estão ativamente transcritos. Todas as três translocações estudadas, uma translocação tumor-específica de célula B $t(11;14)(q13;32)$, e duas translocações associadas as células T- $t(11;14)(p13;q11)$ e $t(7;10)(q35;24)$, possuíam resíduos de alternância purina-pirimidina próximos de uma região de quebra, a saber: células com uma sequência formadora de Z-DNA de 800 bp (próxima ao ponto de quebra do cromossomo 11q13); células com uma translocação $t(11;14)(p13;q11)$ com região formadora de Z-DNA adjacente com 62 bp no 11p13; e células com uma sequência de 32 bp de alternância de purina-pirimidina foi encontrada no sítio de translocação 10q24.

1.1.7.2 Z-DNA e outras doenças

Além das translocações em cânceres de tecidos sanguíneos, existem evidências que sugerem a associação do Z-DNA com outras doenças humanas. Por exemplo, um aumento da quantidade de Z-DNA tem sido detectada no DNA no hipocampo de pacientes com Alzheimer, quando comparados com DNA de cérebro normal, embora a participação exata do Z-DNA nesta diferença não esteja completamente estabelecida (Suram *et al.*, 2002).

Por outro lado, a resistência natural associada ao gene da proteína 1 do macrófago (NRAMP1) parece influenciar a susceptibilidade a doenças auto-imunes em humanos (artrite reumatóide, diabetes do tipo 1, doença de Crohn) e infecciosas (tuberculose, leprose). Uma sequência potencial formadora de Z-DNA no promotor do gene NRAMP1 está envolvida na

sua regulação, e um polimorfismo associado à repetição de dinucleotídeos que compõem o Z-DNA contribui diretamente para susceptibilidade a doença (Takahashi *et al.*, 2004).

A carcinogênese induzida por metais também pode ser devida a presença de Z-DNA. Estudos apontam que íons metálicos como o níquel podem induzir ou estabilizar estruturas em conformação Z (Liquier *et al.*, 1984).

1.1.8 A instabilidade genética pode ser induzida pela presença de Z-DNA

A instabilidade genética é apontada como causa de muitas doenças incluindo câncer e distúrbios neurológicos. Há evidências significantivas que estruturas com conformações diferentes da B-DNA possam induzir a instabilidade genética (Wang e Vasquez, 2006). Expansões de trinucleotídeos repetidos são agentes associados a doenças como a Síndrome do X-frágil, a Coréia de Huntington, a ataxia de Friedreich e a distrofia miotônica (Bowater e Wells, 2001), e podem estar associados a formação de Z-DNA. Certos sítios frágeis ou pontos quentes de mutação do genoma candidatos a apresentarem quebras de DNA, translocações, inserções, deleções e ampliações são associados com variações na estrutura do DNA. Uma possível explicação para este fato pode ser a questão apontada por Zhang e Rowley (2006) que colocaram sítios de quebra pela topoisomerase II e sítios hipersensíveis a DNase I com pontos quentes de quebra genômica e várias translocações cromossômicas em leucemias. Notavelmente, a estrutura do DNA, além da sequência primária, pode ser responsável pela quebra pela topoisomerase II e DNase I *in vivo* (Borde e Duguet, 1998). O Z-DNA é um dos elementos mais freqüentes que ocorrem nestes sítios pontos quentes de mutação. A enzima DNase I cliva a fita simples de DNA na junção B-Z e a topoisomerase II tem preferência por

clivar sequências formadoras de Z-DNA (Sabourin *et al.*, 2003) .

A hipótese que o Z-DNA está associado com a instabilidade genética é apontada na figura 2.

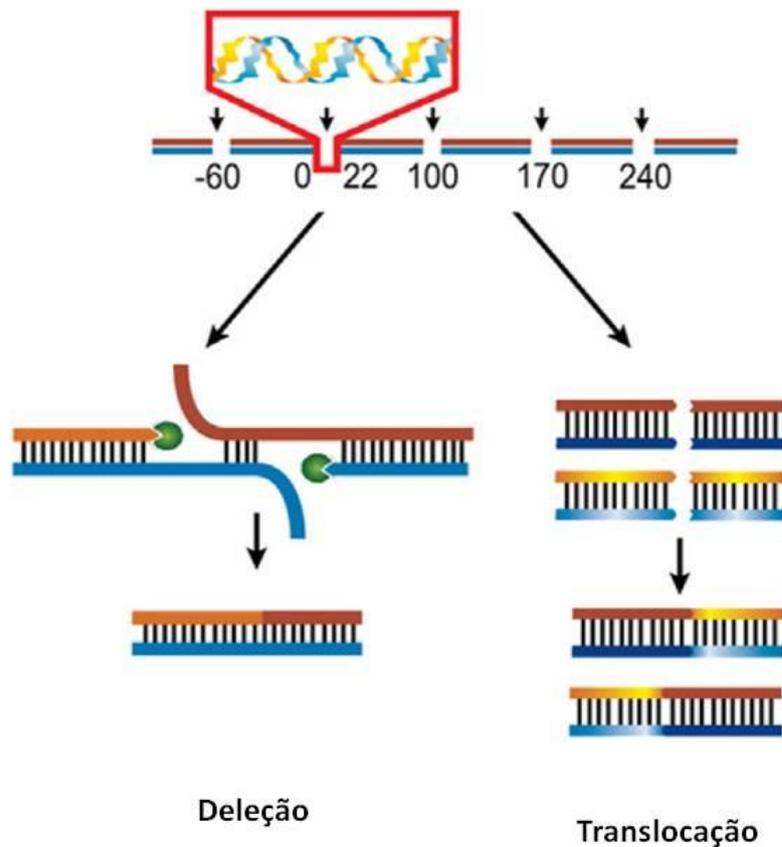


Figura 2 – A estrutura do Z-DNA induz instabilidade genética em células de mamíferos. A caixa vermelha mostra a estrutura de Z-DNA formada *in vivo*, que é reconhecida e clivada por enzimas ainda indefinidas. Este processo resulta em quebras na dupla fita de DNA. O reparo inadequado da dupla fita pode resultar em deleções, translocações ou rearranjos. Fonte: Wang e Vasquez (2007).

1.2 Imunoprecipitação de cromatina: princípios, aplicações e variações da estratégia

1.2.1 Princípios da Imunoprecipitação de Cromatina

A interação entre as proteínas e o DNA é essencial para muitas funções celulares como a replicação e o reparo do DNA, a manutenção da estabilidade genômica, a segregação dos cromossomos durante a divisão celular e a regulação da expressão gênica. A transcrição é controlada pela associação dinâmica de fatores de transcrição ou modificadores de cromatina com sequências alvo do DNA dentro das regiões regulatórias do gene. Estas associações são moduladas por modificações do DNA (metilação de dinucleotídeos CpG), modificações pós traducionais de histonas (fosforilação, ubiquitinação, acetilação, metilação) e a incorporações de variantes de histonas. Se forem herdadas, estas alterações são denominadas como modificações epigenéticas.

Há vários registros de métodos desenvolvidos para a compreensão dos eventos de interação DNA-proteína, dentre as estratégias, destaca-se a imunoprecipitação de cromatina (ChIP). O princípio da técnica é utilizar um anticorpo para identificar a presença de proteínas específicas (e, se for o caso, com modificações estruturais) associadas às regiões de DNA em estudo.

1.2.2 Etapas do experimento

Segundo Spencer *et al.* (2003) o ChIP padrão é composto das seguintes etapas: as

células são incubadas por um curto período com um agente fixador, para promover a ligação covalente do DNA com suas proteínas. Em seguida, a amostra é fragmentada por sonicação, e o lisado é centrifugado para remover debris celulares insolúveis. O lisado é incubado com um anticorpo primário, e os complexos antígeno- anticorpo são capturados com bilhas de proteína A ou G sefarose (a depender da natureza do anticorpo). A sefarose é lavada muitas vezes com tampões contendo diferentes concentrações de sal e detergentes, e os imunocomplexos são eluídos das bilhas de sefarose com um tampão de eluição com alta concentração de detergentes. Por fim, efetua-se a reversão da ligação DNA – proteína, e o DNA de interesse é isolado por extração fenólica e precipitação com etanol. O esquema básico do experimento está descrito na figura 3.

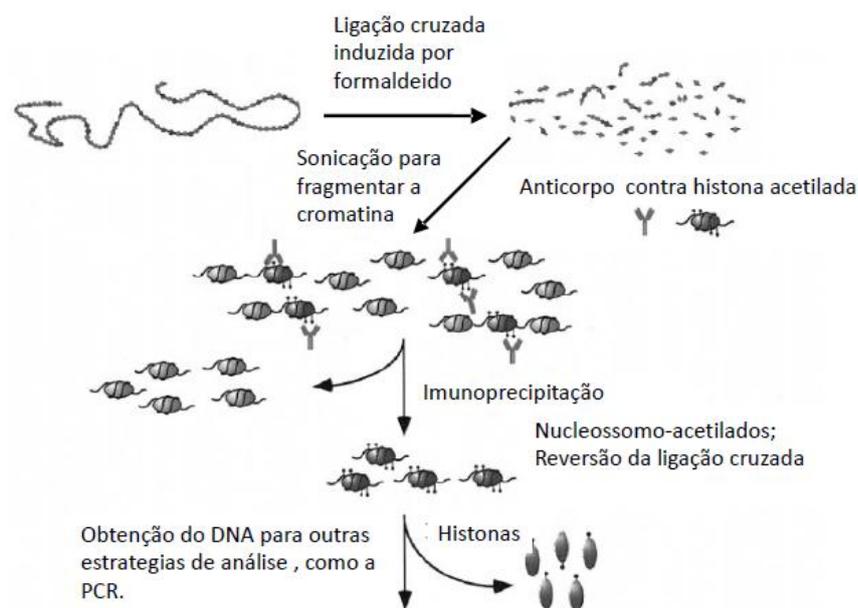


Figura 3 – Representação do protocolo básico de imunoprecipitação de cromatina. Neste caso, o estudo exemplificado enfoca a busca por histonas acetiladas associadas ao DNA.

Fonte: Kuo e Allis (1999)

Vários artigos apresentam diferentes versões do protocolo padrão de CHIP. Estas alterações, juntamente com reflexões sobre os pontos cruciais do ensaio, serão discutidas a diante.

1.2.3 Parâmetros críticos do CHIP

1.2.3.1 Tamanho da amostra

Um dos grandes pontos críticos dos protocolos de CHIP é justamente a quantidade de células empregadas. O protocolo clássico sugere que o número de células seja entre 10^6 e 10^7 células, mas há autores que descreveram um número superior, como foi o número usado por Martone *et al* (2003), no mapeamento dos sítios de ligação de NF- κ B ao longo do cromossomo 22 humano (5×10^8 células).

Porém, nem sempre a amostra a ser estudada se trata de uma linhagem celular, obtida com abundância nos laboratórios de cultura de células, mas sim de amostras de biópsia de paciente ou até mesmo de células tronco de um embrião em fase de diferenciação. Para isto, pesquisadores desenvolveram adaptações elegantes ao protocolo de CHIP, com intuito de reduzir o número de células a serem analisadas.

1.2.3.1.1 Q2 CHIP- Quick and Quantitative Chromatin Immunoprecipitation assay

Outra proposta foi feita por Dahl e Collas (2007). O protocolo é livre de agentes radioativos, e pode ser aplicado as amostras com 1.000 a 100.000 células. A estratégia permite o uso de agentes fixadores, assim pode ser empregada tanto no estudo de histonas, quanto para fatores de transcrição. A análise dos fragmentos imunoprecipitados é feita por

meio de PCR quantitativa em tempo real. No ano seguinte, Dahl e Collas (2008) propuseram uma metodologia para avaliação de um número mais reduzido de células – 1.000 células – com intuito de observar modificações nas histonas H3 em biópsias de osteosarcoma.

1.2.3.2 Uso de agentes fixadores

Os fixadores promovem a ligação covalente cruzada entre as proteínas e o DNA, e assim, facilitam o isolamento de proteínas complexadas com DNA. A seguir, a descrição do fixador mais utilizado- formaldeído, e outras opções de fixadores.

1.2.3.2.1 Formaldeído

O formaldeído (HCHO), ou metanal, é um agente desnaturante que induz a ligação cruzada covalente entre proteínas-DNA, proteínas-RNA, e proteína-proteína e a reversão desta ligação é facilmente realizada em laboratório, com adição de solução com alta concentração de sal (Orlando, 2000; Buesa, 2008).

Uma das primeiras demonstrações da ligação cruzada proteína-DNA em presença de metanal foi feita por Solomon et al. (1988), com intuito de se estudar, em drosofilídeos, a estrutura da cromatina de Proteínas de Choque Térmico HSP70², sob diferentes situações de temperatura. Aproximadamente 15×10^9 células intactas de *Drosophila melanogaster* foram

² O termo Proteínas de Choque Térmico HSP70 segue a tradução recomendada pelo Descritores de Ciências da Saúde, alterado em 2006.

tratadas com HCHO 1% por oito minutos, e em contraste com outro experimento realizado pelos pesquisadores com um tempo de fixação com metanal de 100 horas, foi possível observar que o tempo inferior de fixação é adequado para induzir a ligação cruzada histona-DNA, e minimiza a possibilidade de produzir ligações cruzadas entre as histonas. Como resultado, os autores puderam avaliar que a histona H4 permanece ligada a região gênica, independente da taxa de transcrição.

O formaldeído reage principalmente com as cadeias laterais das lisinas e argininas presentes nas proteínas e com componentes das purinas e piridiminas do DNA. Por outro lado, o formaldeído não reage com o DNA fita dupla livre, e assim evitar dano ao DNA (Orlando, Strutt e Paro, 1997).

A figura 4 mostra as principais reações químicas entre o DNA e as proteínas provocadas pela reação cruzada com indução do formaldeído.

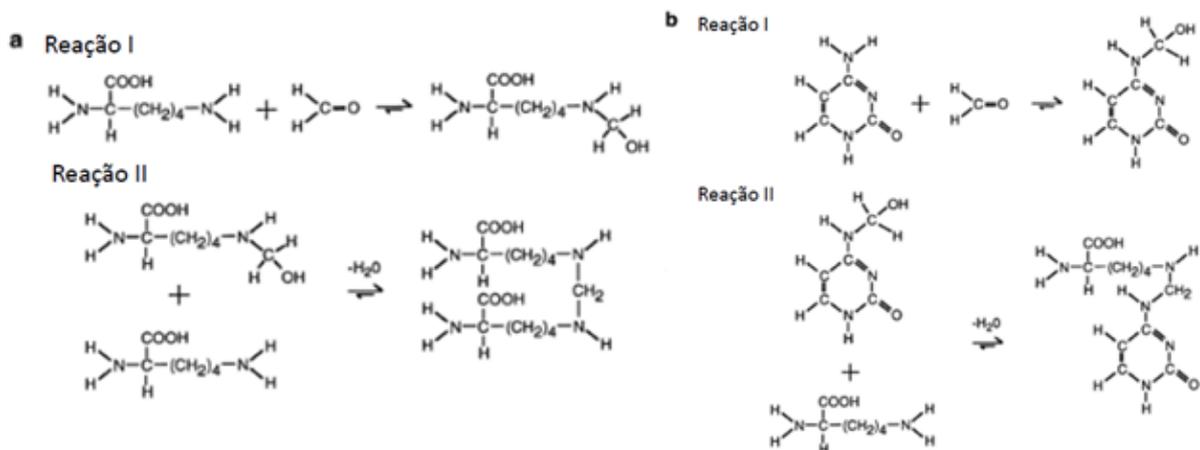


Figura 4- Representação das reações químicas durante a ligação cruzada do DNA e proteínas induzidas pelo formaldeído. Formaldeído (HCHO) é um composto reativo dipolar em que o átomo de carbono é um centro nucleofílico. Grupos amino e imino das proteínas (por exemplo, as cadeias laterais das lisinas e das argininas) e dos ácidos nucleicos (por exemplo, citosina) reagem com o HCHO, e pode levar a formação de uma base de Schiff. Este intermediário pode reagir com um segundo grupo amino (reação II), e promove a reação de condensação³. As ligações cruzadas podem ser revertidas com tampões contendo Tris-HCl. Isto leva a uma queda de pH e protonação dos grupos aminos, assim força o equilíbrio na direção reversa. (a) ligação cruzada do formaldeído com as cadeias laterais de duas lisinas, (b) ligação cruzada que envolve citosina e lisina. Fonte:

3 A reação de condensação, segundo o *IUPAC Compendium of Chemical Terminology*, pode ser definida como a reação química em que duas moléculas combinam-se para formar uma única molécula, e é acompanhada da formação de água ou outra molécula pequena como a amônia.

Orlando, Strutt e Paro, (1997)

1.2.3.2.2 Outros agentes fixadores

O formaldeído fornece poucos pontos para ligação cruzada e não é eficiente para avaliar proteínas que estão indiretamente associadas com o DNA, como os coativadores e correpressores transcricionais. Por isso, outros agentes fixadores foram usados em experimentos de imunoprecipitação de cromatina (Zeng *et al.*, 2006).

Spencer *et al.* (2003) sugerem o uso de cisplatina como agente alternativo para induzir ligação cruzada, já que a resolução é o dobro do formaldeído (4 Å), sendo de grande utilidade para estudos de proteínas da matriz nuclear e sua ligação ao DNA. Por outro lado, Nowak, Tian e Brasier (2005) utilizaram duas etapas de fixação em células HeLa - a primeira com o formaldeído e a segunda com éster de N-hidroxisuccinimida (NHS) - para avaliar as redes de controle genético induzidas pelo fator de transcrição NF- κ B, e verificaram que os resultados foram mais reproduzíveis do que com apenas o formaldeído.

A tabela 1 resume os principais fixadores que podem ser utilizados nos experimentos com ChIP.

Tabela 1- Propriedades químicas dos agentes de reação-cruzada disponíveis para ChIP

Agente indutor	Grupo químico	Resolução (Å)	N. de grupos	Solução estoque	Solução de trabalho (mM)
Cisplatina	Organometálico	4	2	100 nM	0,3-1,0
DMA	Imidoester	8,6	2	--	10
DMP	Imidoester	9,2	2	--	10
DMS	Imidoester	11	2	--	10
DSG	NHS-ester	7,7	2	0,5M	2
DSS	NHS-ester	11,4	2	0,5M	2
DSG	NHS-ester	16,1	2	0,5M	2
Formaldeído	Ponte de metileno	2	2	37%(p/p)	1%(p/p)

Nota: DMA = dimetil adipidato; DMP=dimetil pimelimidato; DMS = dimetil suberimidato; NHS= N-hidroxisuccinimida; DSS = disuccinimidil suberato; DSG = disuccinidil glutarato; EGS = succinimidilsuccinato

Fonte: Nowak, Tian e Brasier (2005)

1.2.3.2.3 Problemas com a fixação e a Imunoprecipitação de cromatina nativa

A maioria dos epítomos reconhecidos por anticorpos contra histonas modificadas podem ser rompidos ou destruídos pela ação de agentes químicos que provocam a reação cruzada, particularmente as reações que envolvem as lisinas das porções N-terminais das proteínas. Estes e outros problemas, como a presença de outras proteínas no sítio de interação DNA-proteína alvo podem ser descritos na figura 5.

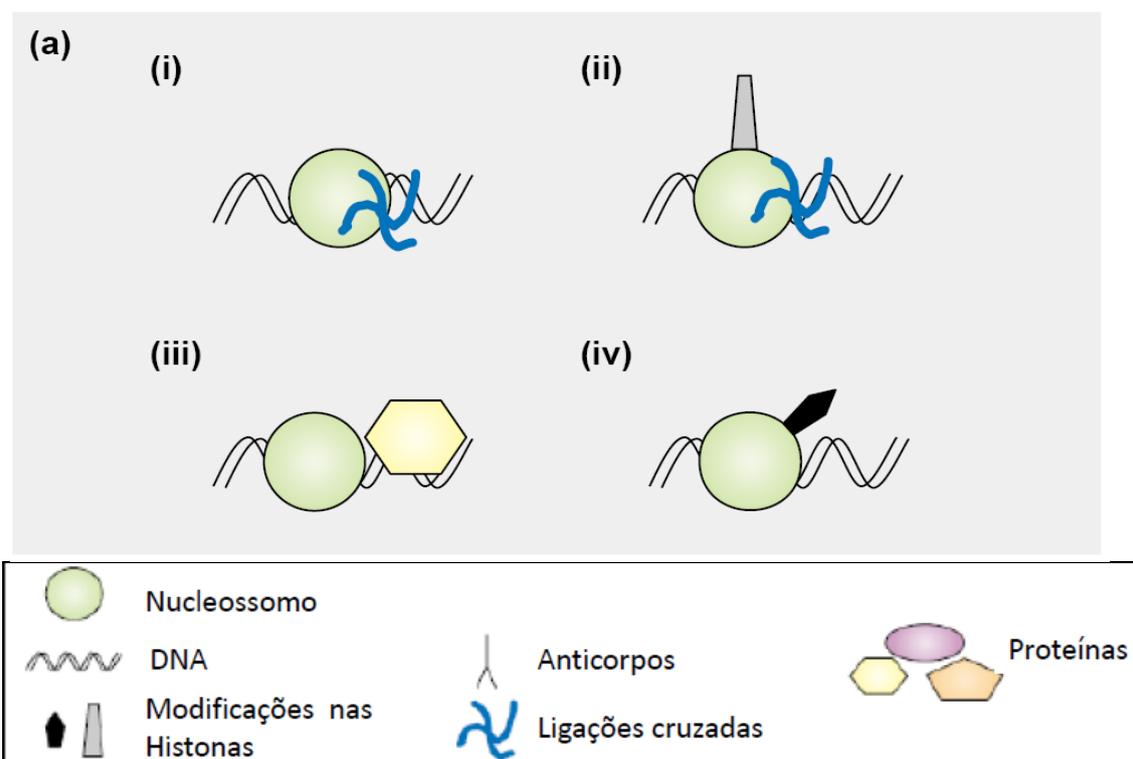


Figura 5 – Complicações possíveis no experimento de CHIP - Formação diferencial da ligação cruzada de proteínas-DNA. No caso ideal, nucleossomos não modificados (i) e modificados (ii) são eficientemente ligados ao DNA. No caso (iii), a presença de uma proteína que se liga a histona, ou ao DNA, previne a interação DNA-proteína de interesse, por bloquear o motivo de ligação. No caso (iv), a presença de uma lisina modificada previne a ligação-cruzada eficiente entre a histona e o DNA. Fonte: Hanlon e Lieb (2004)

Com intuito de eliminar estes problemas, os pesquisadores desenvolveram a estratégia de Imunoprecipitação de Cromatina Nativa (NChIP). No início, a preparação, livre de agentes fixadores, utilizou nuclease de micrococo para isolar as regiões da cromatina de interesse (Gregory *et al.*, 2001). As vantagens de NChIP, comparadas as de XChIP (ChIP com

agentes fixadores) podem ser resumidas na tabela 2.

Tabela 2- Vantagens e desvantagens da imunoprecipitação de cromatina usando cromatina fixada ou nativa (XChIP e NChIP, respectivamente)

NChIP		XChIP	
Vantagens	Desvantagens	Vantagens	Desvantagens
A especificidade do anticorpo é previsível	Não é uma ferramenta útil para analisar proteínas diferentes de histonas	Aplicável a proteínas não-histona que se ligam fracamente (ou indiretamente) ao DNA	É frequentemente ineficiente devido ao interrompimento do epítopo
Preparação eficiente (o DNA e as proteínas podem ser analisados)	A digestão seletiva da nuclease pode alterar as regiões da cromatina a serem estudadas	Minimiza o rearranjo das histonas	Uma fixação transiente ou interações fortuitas podem fornecer resultados falso-positivos sobre as interações DNA-proteína

Fonte: O'neill e Turner (2003)

1.2.3.3 Anticorpos e os ensaios ChIP: problemas de interpretação e quantificação

Os anticorpos são os fatores mais importantes para o sucesso de ChIP. O sucesso de um anticorpo específico em outros tipos de experimento, como *Western blotting* e imunocitoquímica, não significa automaticamente que este anticorpo era apropriado para ChIP, e ele deve ser testado.

Neste sentido, Suka *et al* (2001) mostraram - com o uso de mutações sítio específicas em histonas de leveduras e estratégias para validação dos anticorpos- que as imunoglobulinas capazes de reconhecer as variações na estrutura química da proteína podem falhar na especificidade quando forem utilizadas em ChIP.

Dentre outros problemas de interpretação de ChIP, podemos ressaltar que as preparações diferentes de anticorpos tem propriedades distintas, e isto pode afetar os

resultados de CHIP. Anticorpos estão disponíveis nas preparações monoclonais ou policlonais. Anticorpos monoclonais têm alta especificidade quando comparados com soro policlonal, mas o soro policlonal pode reconhecer uma série de epítopos da molécula-alvo, aumentando os níveis de sinal de amostras com pouca abundância. Para demonstrar este fato, Edmondson *et al.* (2002) observaram que o anticorpo policlonal contra lisina 9 e 14 da histina H3 (Upstate #06-599) reconhecem principalmente a lisina 9.

Além disso, a presença de modificações de histonas adjacentes pode prevenir o reconhecimento pelo anticorpo. Por exemplo, o fosfato na serina 10 impede a ligação do mesmo anticorpo policlonal anti-lisina 9/14 na cauda acetilada da histona H3 (Thomson, Clayton e Mahadevan, 2001).

A figura 6 representa os principais problemas com o reconhecimento de anticorpos.

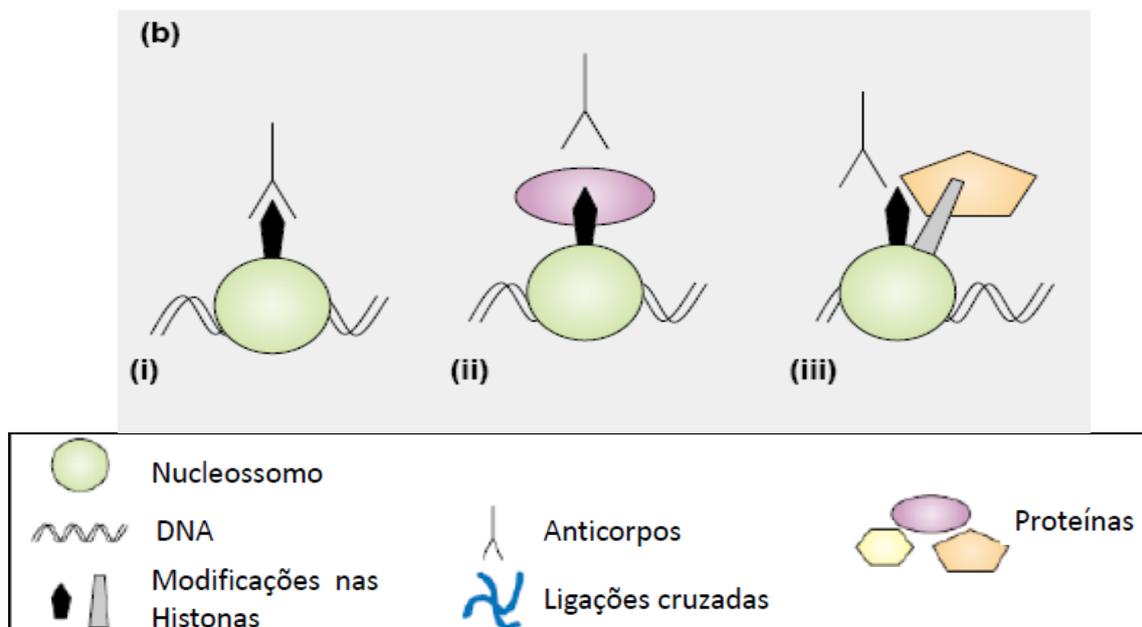


Figura 6 – Complicações possíveis no experimento de CHIP - Acessibilidade variável ao epítipo. Em todos os três casos apresentados, o nucleossomo contém uma modificação na histona de interesse. No caso (i), a modificação poderia ser detectada por CHIP, entretanto nos casos (ii) e (iii) o epítipo não será detectado corretamente, devido ao bloqueio por competição direta (ii) ou bloqueio causado por uma proteína ligada a alguma modificação na vizinhança daquela em estudo (Hanlon e Lieb, 2004)

Outro fator que altera os resultados de CHIP é a relação quantidade de DNA *versus* anticorpo. Para garantir se diluições do material a ser imunoprecipitado afetam na eficiência de CHIP, Haring *et al* (2007) recomendam a titulação de cromatina em relação ao anticorpo fixado. A comparação foi feita com o anticorpo contra histona H4 hiperacetilada (Upstate, #06-946) e outro que reconhece um domínio invariante de H3 (H3 core, Abcam #AB1791). Em ambos experimentos, os seguintes fatores de diluições de cromatina foram utilizados: 0, 1:2, 1:4; somente no experimento com H3 core uma maior diluição de cromatina aumenta a recuperação do material imunoprecipitado.

1.2.3.4 Controles para CHIP

Para assegurar a acurácia dos dados de CHIP, Haring *et al.* (2007) sugerem o uso de duas amostras controles específicas para o experimento CHIP: uma amostra de entrada (*input*) e uma amostra sem adição do anticorpo. Se o experimento posterior for uma PCR, os mesmos iniciadores devem ser utilizados para a amostra de interesse deverão ser utilizados na amplificação dos controles.

A finalidade destes controles é a seguinte: a amostra *input* será um indicativo quantitativo de cromatina usada na reação de CHIP. Trata-se de uma alíquota tomada do experimento antes *do preclearance* com bilhas de sefarose, mas é submetida à reversão da ligação cruzada, para liberação do DNA. Além de servir como controle positivo, os dados derivados da amostra *input* poderão compor a normalização dos resultados. Já o controle “anticorpo não relacionado” é uma amostra de cromatina na qual um anticorpo diferente do específico foi adicionado. Se o experimento posterior for uma qPCR, o resultante das

amostras “anticorpo não relacionado” indicam que um background de sinal ocorreu na preparação dos fragmentos CHIP. Este problema pode ser diminuído ao aumentar o número de lavagens na etapa com bilhas de sefarose.

1.2.4 Tipos de abordagens que utilizam CHIP como ferramenta de análise

1.2.4.1 Estudo de modificações em histonas

As funções regulatórias da cromatina são mediadas em parte por modificações pós-traducionais nas porções N-terminais das histonas, tais como a metilação, acetilação, fosforilação e a ubiquitinação. Muitas destas modificações foram relacionadas a mecanismos de ativação ou repressão do processo transcricional, enquanto outras regulam o reparo ao DNA ou a replicação, como revisto por (Hawkins e Ren, 2006).

As modificações em histonas podem ser avaliadas por meio da estratégia de CHIP. Entre as pesquisas realizadas, Puppo *et al.* (2005) avaliaram os níveis de acetilação de histonas (por meio de *screening* com anticorpos contra histona H4 tetracetilada), em células com diferentes graus de expressão endógena de *RET*⁴ – células IMR32 (neuroblastoma humano – expressa RET em níveis baixos); células MTC-TT (carcinoma da região medular da tireóide humana – possui alto nível de expressão de *RET*). Os pesquisadores notaram que existe uma forte correlação entre a acetilação da histona e a expressão de *RET* endógeno em cada linhagem celular: IMR32 mostram uma baixa acetilação global, exceto na região do promotor mínimo de *RET*, e MTC-TT apresentam altos níveis de acetilação quando

⁴ O proto-oncogene *RET* (*Rearranged during Transfection*) codifica um receptor de tirosina quinase nas células neuronais e neuroepiteliais, conforme descrito por (Hansford e Mulligan, 2000).

comparadas com IMR32.

1.2.4.2 Estudos de fatores de transcrição em regiões promotoras

A regulação tecido- específica de genes depende de uma série de fatores de transcrição expressos em células e sua ligação com regiões promotoras contidas na cromatina. O ensaio de imunoprecipitação de cromatina pode fornecer acesso direto a estas interações DNA/proteínas em um promotor específico, em um tecido-específico e dado estágio de desenvolvimento ou sob influência hormonal.

Weinmann *et al* (2001) verificaram que CHIP pode ser usado para identificar promotores regulados pelos fatores E2F (com sítios de ligação consenso e não-consenso), e nem todos promotores regulados por E2F mostram perfis de expressão idênticos. Em Weinmann e Farnham, (2002), a mesma equipe de pesquisadores utilizou a estratégia CHIP para identificar genes que são alvos específicos do fator de transcrição E2F1, e não de outros da mesma família. Eles checaram que apesar da família E2F estar envolvida na regulação de genes atuantes na progressão do ciclo celular ou do reparo ao DNA, o fator E2F1 pode regular genes com funções distintas, por exemplo, em células de camundongos C3H/HeJ, a ausência deste fator de transcrição provoca a queda de transcritos do gene da tioester S-metiltransferase, que codifica uma importante enzima do metabolismo de compostos contendo selênio e enxofre.

1.2.5 Estratégias para análises de dados de CHIP

1.2.5.1 CHIP-chip

CHIP-chip combina as técnicas CHIP e microarranjo. Em resumo, o desenho experimental do CHIP segue o mesmo do clássico, porém o DNA recuperado e os controles experimentais são marcados com fluoróforos e aplicados à lâminas para análise dos microarranjos (Wu *et al.*, 2006).

Assim, experimentos com CHIP-chip são utilizados para reconhecer quais genes são ligados por um dado fator de transcrição. Ren *et al* (2000) identificaram novos alvos para os fatores de transcrição Gal4 e Ste12, por meio de CHIP-chip, em um arranjo de DNA intergênico de levedura.

A extensão da aplicação CHIP-chip depende, em parte, do desenvolvimento da tecnologia de microarranjo de DNA, especialmente da disponibilidade de lâminas presentes para análises dos organismos. Em humanos, um dos primeiros experimentos CHIP-chip adotou o arranjo com ilhas CpG para selecionar novos alvos de E2F4. A razão desta abordagem deve-se ao fato que as ilhas de CpG estão frequentemente associadas com a região promotora ou ao primeiro exon do gene (Weinmann *et al.*, 2001). A figura 7 resume o experimento de CHIP-chip.

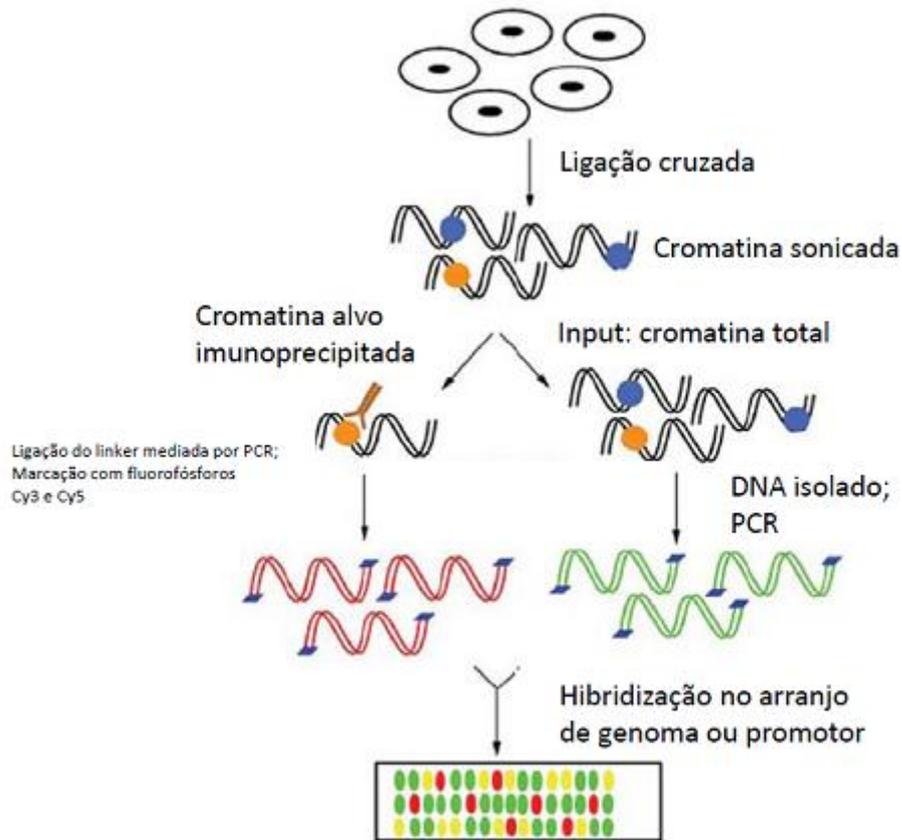


Figura 7- Descrição da estratégia ChIP- chip. Brevemente, os DNA e as proteínas sofrem reação-cruzada *in vivo* com formaldeído. O DNA ligado à proteína é sonicado e reduzido a fragmentos de 200 a 2000 pb. Então são imunoprecipitados com anticorpos específicos contra a proteína. Assim, o DNA purificado após a reversão da ligação cruzada é recuperado, e juntamente com os controles, são marcados com substâncias fluorescentes (Cy5 e Cy3, repectivamente) e aplicados às lâminas para análise do microarranjo. Fonte: Hawkins e Ren (2006)

1.2.5.2 ChIP-cloning

Uma das primeiras modificações ao procedimento de ChIP foi redesenhar a estratégia para se obter clones com regiões promotoras específicos, já que as amostras precipitadas podem conter uma ampla coleção de fragmentos genômicos com regiões que interagem com o fator em estudo. Por isso, parece razoável, estrategicamente, a preparação de uma biblioteca.

Segundo o recomendado por Weinmann e Farnham (2002), com base em dados estudados pela equipe em Weinmann *et al* (2001), uma das modificações que deve ser feita

no protocolo padrão é tornar os fragmentos competentes para clonagem. Durante o passo da sonicação, o DNA é fragmentado e cria extremidades randômicas nas pontas 5' e 3'. Estes overhangs precisam ser modificados para uma clonagem eficiente. Uma maneira é usar a enzima T4 DNA polimerase para criar extremidades abruptas que podem ser clonadas em um vetor com extremidades abruptas para posterior caracterização.

Por outro lado, (Huang *et al.*, 2006), recomendaram outros passos adicionais: a) no passo da imunoprecipitação e bilhas de sefarose, efetuar lavagens criteriosas , e em passos seqüenciais, com lítio, alto sal, baixo sal e tampão TE. Adicionalmente, efetuar a digestão do material imunoprecipitado, ainda em presença de bilhas de sefarose, com enzimas de digestão que reconheçam 4 pb (*Sau3AI*). b) Efetuar a clonagem em um vetor pZero-2 (Invitrogen) digerido com a enzima *Bam*HI. O detalhe desta proposta está na figura 8.

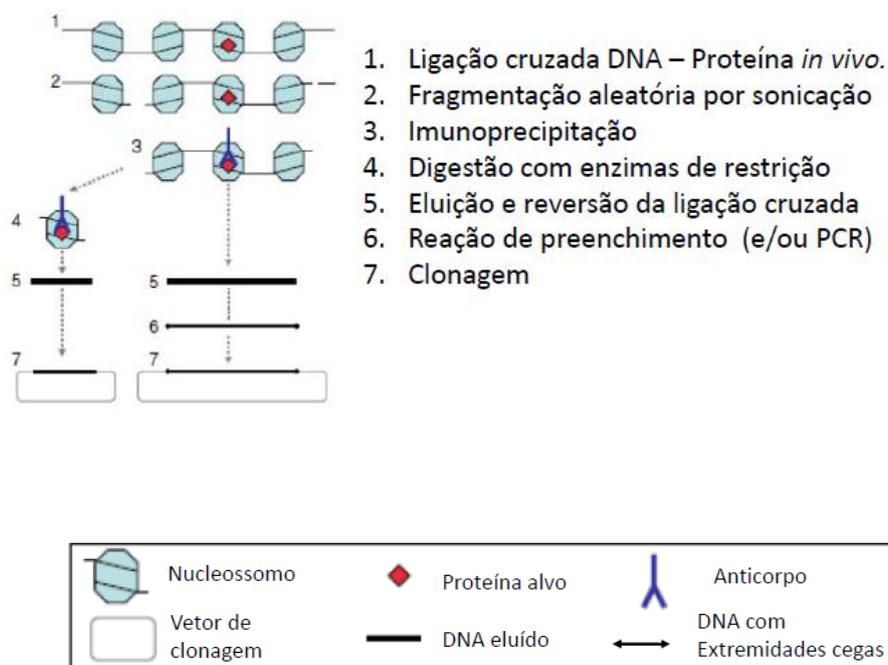


Figura 8- Diagrama esquemático da estratégia modificada para clonagem de fragmentos ChIP (*Chip cloning*). A estratégia tradicional de clonagem requer os passos de preenchimento e a ligação na extremidade cega (passos de 1 a 3; 5 a 7), enquanto a proposta recomendada por Huang e colaboradores adiciona uma etapa com enzima de restrição antes da eluição das contas de sefarose, o que dispensa o preenchimento e a ligação na extremidade cega (passos 1 a 5;7). Fonte: Huang et al., (2006)

1.2.5.3 PCR quantitativa em tempo real

Na literatura atual, a técnica de PCR convencional é a mais utilizada para analisar dados de CHIP de amostras oriundas de cultura de células animais e de plantas. Neste método, a intensidade da banda de DNA no gel de agarose nem sempre reflete a abundância inicial de um fragmento específico imunoprecipitado. Como a interpretação da quantificação do resultado da imunoprecipitação de cromatina é ponto crucial na avaliação, alguns autores sugerem a aplicação de PCR quantitativa em tempo real

O método Q² CHIP – *Quick and Quantitative Immunoprecipitation assay*, foi uma adaptação desenvolvida por (Dahl e Collas, 2007). A suspensão da reação de ligação cruzada é feita com butirato (um inibidor de deacetilase de histonas- para manter o estado de acetilação das células), e, em seguida, são efetuadas lavagens extensivas do imunoprecipitado, e a reversão do cross-linking é combinada com a digestão de proteínas, o que reduz o tempo experimental. Posteriormente, analisa-se, por meio de uma PCR quantitativa em tempo real (realizada no sistema de detecção MyiQ, com uso de iQSYBR Green) o material imunoprecipitado em triplicatas de 5uL do DNA template. A figura 9 apresenta o esquema da metodologia.

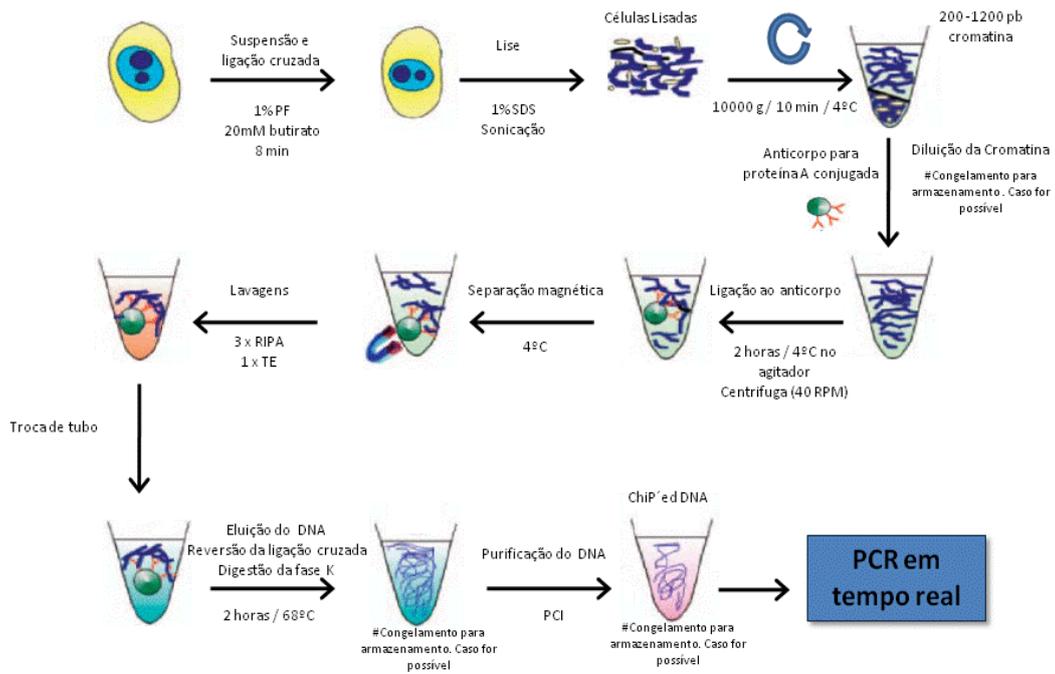


Figura 9 – Diagrama resumido do procedimento Q² ChIP. Abreviaturas: bp = pares de bases; PCI= fenol/clorofórmio/álcool isoamílico; PF= paraformaldeído. Fonte: Dahl e Collas (2007)

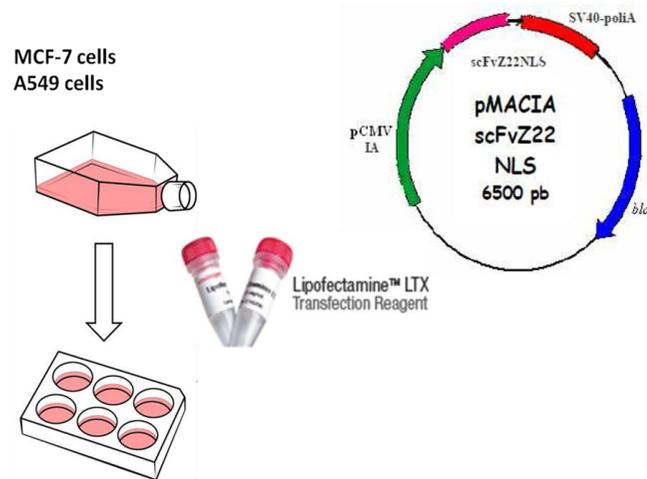
2 OBJETIVOS

O presente trabalho teve como objetivo identificar regiões genômicas em conformação de Z-DNA na cromatina nativa por meio de imunoprecipitação cromossomal (ChIP), e investigar a possível associação dessas regiões a elementos regulatórios da expressão gênica e diferenciação celulares.

O projeto envolveu basicamente a transfecção de células em cultura com sequências gênicas para a expressão de fragmentos de anticorpos anti-Z-DNA ou uso de anticorpos monoclonais que reconhecem regiões em conformação Z, imunoprecipitação do material contendo Z-DNA, clonagem dos fragmentos, sequenciamento e bioinformática para clones genômicos de diferentes tipos celulares e quantificação dos fragmentos recuperados por PCR quantitativa em tempo real.

Abordagem Experimental com uso de agente fixador

1- Transfection



2- CHIP cloning, LM-PCR and Real Time PCR

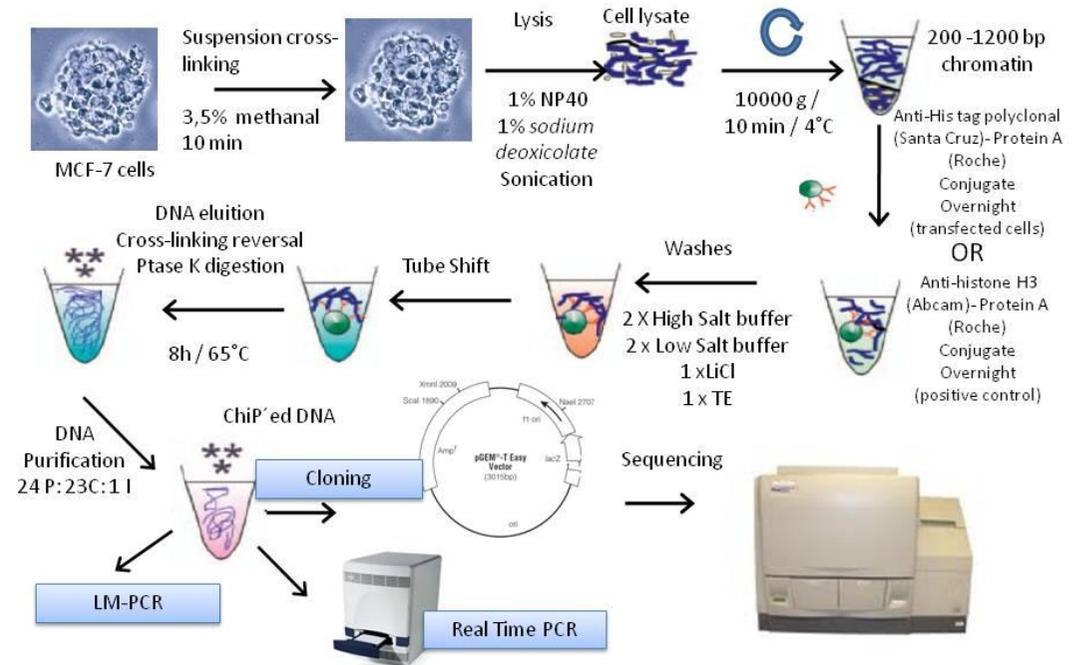


Figura 10- Uma das abordagens experimentais utilizadas neste trabalho: transfecção seguida por imunoprecipitação de cromatina para posterior clonagem, amplificação por LM-PCR ou quantificação dos fragmentos recuperados por PCR quantitativa em tempo real (adaptado de Dahl e Collas (2007))

Materiais e Métodos

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 *Materiais*

3.1.1 Células

3.1.1.1 *Linhagem Bacteriana XL1-Blue*

XL1-Blue (Stratagene[®]) - *recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F' proAB lacIqZ M15Tn10 (Tet[®])]* (Sambrook e Russel, 2001).

Essa linhagem foi utilizada nos procedimentos de transformação bacteriana, para a clonagem dos fragmentos de imunoprecipitação de cromatina em um vetor, e em seguida executar a análise das sequências produzidas pelo seqüenciamento.

3.1.1.2 *Linhagens de Células de Humanas*

3.1.1.2.1 MCF-7

A linhagem de células humanas MCF-7 (adenocarcinoma de mama) expressa receptores de hormônios estrógenos, derivadas de uma paciente do sexo feminino, com 69 anos. São células aderentes, com nível de biossegurança 1 e de tempo de duplicação de 29h

(ATCC Cat. N. HTB-22).

Um estudo feito por Zwelling, Kerrigan e Lippman (1983) estudaram a hipótese de que células MCF-7 que receberam tratamento com hormônio estrogênio apresentaram mais quebras no DNA do que aqueles que não receberam este tratamento, e levantaram a hipótese de que este fato pode ser atribuído a que o tratamento poderia induzir a formação de Z-DNA.

Esta linhagem foi utilizada para os estudos de regiões potenciais formadoras de Z-DNA por meio das estratégias de imunofluorescência de células em cultura e CHIP.

3.1.1.2.2 A549

A linhagem A549 (ATCC CCL-185) é constituída por células oriundas de um adenocarcinoma do epitélio basal alveolar humano. Foi desenvolvida pela primeira vez em 1972 pelo pesquisador D.J. Giard e seus colaboradores de um tumor explantado de um homem caucasiano com 58 anos.

Estas células foram utilizadas em um estudo, desenvolvido por Li et al (2009), para identificação de Z-DNA com CHIP utilizando a precipitação da ligação do domínio Zalfa de ADAR1 e Z-DNA

Neste trabalho, estas células também foram utilizadas nos estudos de identificação de Z-DNA por CHIP.

3.1.2 Plasmídios utilizados

3.1.2.1 *pMACIA scFvZ22NLS*

O vetor *pMACIA scFvZ22NLS* foi contruído por Quilici (2008), para clonar o gene que codifica o fragmento de anticorpo na forma de scFv anti-Z-DNA Z22. Além desta informação genética, contêm sequências codificadoras de um sinal de localização nuclear (NLS); para proteína A de *Staphylococcus aureus* e His-TAG, para detecção e isolamento da proteína posteriormente expressa. O esquema do vetor é representado na figura 11.

Neste trabalho, o vetor foi utilizado nos experimentos de transfecção de células humanas.

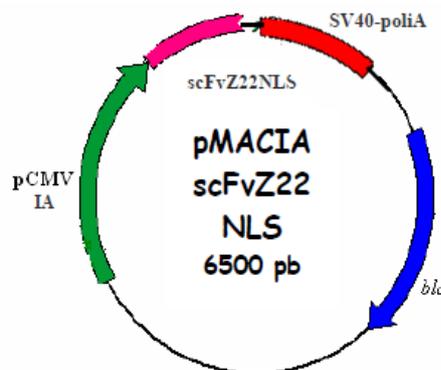


Figura 11- Representação esquemática do vetor *pMACIA scFvZ22NLS*. O vetor para a expressão em células de mamífero *pMACIA* contém um promotor de CMV e íntron A. Os sítios para as enzimas de restrição utilizadas foram evidenciados em vermelho. A seta azul identificada por “bla” é o gene da β -Lactamase, que confere resistência à ampicilina para a amplificação dos plasmídios em bactérias. Fonte: Quilici (2008).

3.1.2.2 *pCMV- β gal*

O plasmídeo de 7200pb *pCMV- β gal* (Clontech), contém o gene *lacZ* de *Escherichia coli*, codificador da enzima β -galactosidase. Assim, o *lacZ* foi utilizado como gene repórter para a eficiência da transfecção. A atividade hidrolítica de β -galactosidase, sobre a ligação glicolítica do substrato sintético Xgal, produz um monômero indoxil sem cor, o 5-bromo-4-

cloro-indoxil. A oxidação não enzimática e a dimerização ocorrem na presença dos íons ferroso e férrico, e resulta no 5,5'-di-bromo-4,4'-dicloro-indigo, um composto estável e insolúvel de cor azul escura.

3.1.2.3 pGEM[®]-T Easy

O plasmídeo pGEM[®]-T Easy (Promega), possui 3015 pb, e contém o gene de resistência a ampicilina (*amp*) como marca de seleção, a origem de replicação bacteriana (*ori*), parte do gene α *lacZ*, sítio múltiplo de clonagem na região codificadora do gene *lacZ* e os promotores T7 e SP6 flanqueando a região de clonagem.

Este plasmídeo foi utilizado para o seqüenciamento dos fragmentos de Z-DNA recuperados por CHIP.

3.1.3 Oligonucleotídeos utilizados para seqüenciamento

Os oligonucleotídeos utilizados, sintetizados pela IDT (*Integrated DNA Technologies*), foram recebidos na forma de um liofilizado, posteriormente ressuspendido em Tris-HCl 5 mM pH 7, para uma concentração final de 100 μ M.

Para o seqüenciamento, foram utilizados os oligonucleotídeos M13 Universal (5' GTAAAACGACGGCCAGT 3') e M13 Reverso (5' CAGGAAACAGCTATGAAC 3').

3.1.4 Soluções estoques de inibidores de proteases

3.1.4.1 PMSF (*Phenilmethylsulfonyl Fluoride*)

Solubilizado em isopropanol e estocado a temperatura ambiente por até 1 ano. É um inibidor de serino e tiol proteases como, por exemplo, tripsina, quimiotripsina, trombina, papaína etc. Adicionar a uma concentração final de 1 mM.

3.1.4.2 Aprotinina

Solubilizada em água e estocada a -20°C por seis meses. A aprotinina (Roche) é polipeptídeo monomérico, de pequena massa molecular, extraída do pulmão bovino com propriedade de inibir serino-proteinases (proteinases, em sua maioria de origem animal, que possuem os aminoácidos serina, histidina e aspartato, como por exemplo: tripsina, quimotripsina, plasmina, e calicreina). Adicionar a uma concentração final de 1 µg/mL.

3.1.4.3 Pepstatina A

Solubilizada em água e estocada a -20°C por um mês. A pesptatina (Roche) especificamente inibe aspártico proteinases, como por exemplo, pepsina, renina, catepsina D, quimosina. Adicionar a uma concentração final de 1 µg/mL.

3.1.5 Meios de Cultura e soluções para bactérias

Meio LB (*Luria-Bertani*)

Peptona de caseína	1,0% (p/v)
Extrato de levedura	0,5% (p/v)
NaCl	1,0% (p/v)

pH 7,2.

Meio LB ágar

Meio LB adicionado de ágar bacteriológico a 1,4% (p/v).

Meio SB (*Super Broth*)

Peptona de caseína 3,0% (p/v)

Extrato de levedura 2,0% (p/v)

MOPS 1,0% (p/v)

pH 7,2.

Meio SOB

Bacto-triptona 2,0% (p/v)

Extrato de levedura 0,5% (p/v)

NaCl 0,06% (p/v)

KCl 0,002% (p/v)

pH 7,2.

Meio SOC

Meio SOB 98 mL

Solução estoque de Mg^{2+} 2 M 1 mL

Solução estoque de glicose 2 M 1 mL

Solução estoque de glicose 2 M

Esterilizada por filtração e estocada a 4°C.

Solução estoque de Mg 2 M

MgCl₂ 1 M

MgSO₄ 1 M

Esterilizada por filtração e estocada a 4°C.

Após dissolver os reagentes em água, todos os meios de cultura foram autoclavados a 120°C por 20 minutos.

3.1.6 Meio de cultura e soluções para cultura de células de mamíferos**Meio RPMI 1640 com L-glutamina a 2 mM Suplementado (GIBCO, n catálogo: 31800-014)**

Meio Base 1 pacote

NaHCO₃ 2 g

dH₂O q.s.p 1 L

pH 7,4

Meio de Congelamento de Células

RPMI

Soro Fetal Bovino 20% (v/v)

DMSO 5% (v/v)

Solução salina balanceada sem Cálcio e Magnésio (BSS.CMF)

NaCl 8 g

KCl 0,4 g

Na_2HPO_4 0,048 g

KH_2PO_4 0,06 g

Glicose 1 g

Vermelho de fenol 0,01 g

dH_2O q.s.p. 1 L

pH 7,4

Tripsina-EDTA (GICBO, n catálogo: 27250-018)

Tripsina 2,5 g

EDTA 0,38 g

BSS.CMF qsp 1 L

pH 7,4

Soro Fetal Bovino (GIBCO, n catálogo: 10438-026)

Estocar de -5 a -20 °C.

Adicionado ao meio de cultura RPMI com L-glutamina à concentração de 10% (v/v).

Azul de Tripán

Corante Azul de Tripán 400 mg

PBS pH 7,2 q.s.p. 100 mL

Reagente de transfecção Lipofectamine LTX (kit Lipofectamine™ LTX (Invitrogen Cat.N. 15338-100))

Esse reagente de transfecção é um lipídeo que permite a transfecção de diversas linhagens de células de mamíferos.

3.1.7 Soluções e tampões de uso geral

Azida Sódica – Solução estoque 100X

Azida sódica 5% (p/v)

Esta solução era utilizada para a conservação do tampão PBS nas soluções estoque dos anticorpos em concentração final de 0,05% (p/v).

Tampão TE

Tris-HCl pH 8,0 10 mM

EDTA pH 8,0 1 mM

Tampão PBS (Phosphate-Buffered Saline) 10X, pH 7,4

NaCl 1,5 M

Na₂HPO₄ 0,1 M

NaN₃ 0,02% (p/v)

3.1.8 Material para preparo de células competentes e transformação – bactéria

Glicerol 50% (v/v)

Esterilizado por filtração e estocada a 4°C

Cubetas de eletroporação (Gene Pulser/MicroPulser Cuvettes, Biorad®, no catálogo: 165-2086)

3.1.9 Soluções e reagentes para eletroforese em gel de agarose

Tampão de corrida TEB 10X

Trizma base 0,89 M

Ácido Bórico 0,89 M

EDTA 0,02 M

dH₂O q.s.p. 1 L

pH 8,0

Tampão de corrida TAE 50X

Tampão Tris-Acetato 2 M

Trizma-base 242 g

Ácido Acético Glacial 57,10 mL

EDTA pH 8,0 0,05 M

dH₂O q.s.p. 1 L

Tampão de amostra para gel de agarose 10X

Tampão de corrida TEB 20X	50% (v/v)
Glicerol	50% (v/v)
Azul de Bromofenol	0,1% (p/v)
Xileno Cianol	0,1% (p/v)

Solução de brometo de etídeo 20.000X

Brometo de etídeo	10 mg/mL
-------------------	----------

3.1.10 Marcadores moleculares para DNA**1 kb plus DNA Ladder** – (Invitrogen[®] n.º. catálogo. 10787-026)

Fragmentos de DNA em pb: 100; 200; 300; 400; 500; 650; 850; 1.000; 1.650; 2.000; 3.000; 4.000; 5.000; 6.000; 7.000; 8.000; 9.000; 10.000; 11.000; 12.000.

1 kb DNA Ladder – (Invitrogen[®] n.º. catálogo. 15615-016)

Fragmentos de DNA em pb: 201; 220; 298; 344; 396; 500; 517; 1.018; 1.636; 2.036; 3.054; 4.072; 5.090; 6.106; 7.126; 8.144; 9.162; 10.180; 11.198; 12.216.

Low Mass DNA Ladder (Invitrogen[®] n.º. catálogo. 10068-013)

Mistura equimolar de fragmentos de DNA em pb de 2.000; 1.200; 800; 400; 200 e 100. Utilizando 2 µL do marcador, corresponde a massa de 100; 60; 40; 20; 10 e 5 ng, respectivamente.

High Mass DNA Ladder (Invitrogen[®] n.º. catálogo 10496-016)

Mistura equimolar de fragmentos de DNA em pb de 10.000; 6.000; 4.000; 3.000; 2.000 e 1.000. Utilizando 2 µL do marcador, corresponde a massa de 100; 60; 40; 30; 20 e 10 ng, respectivamente.

3.1.11 Kits comerciais

QIAGEN Plasmid Maxi Kit 25 – Para preparação plasmidial em larga escala (Qiagen[®], n.º. catálogo 12163).

QIAprep Spin Miniprep Kit (250) - Para preparação plasmidial em pequena escala (Qiagen[®], n.º. catálogo 27106).

Qiaquick Gel Extraction kit 50 – Para extração de DNA de gel de agarose (Qiagen[®], n.º. catálogo 28704).

Colunas para extração de DNA de gel de agarose por Freeze Squeeze – Ultrafree DA Centrifugal Unit (Millipore[®], n.º. catálogo 42600).

Chromatin Immunoprecipitation (ChIP) Assay kit – Para imunoprecipitação de cromatina (Millipore, n.º. catálogo 17-295 e n.º. de lote DAM1560176)

Fast SYBR Green kit – Para experimentos de Real Time PCR (Applied Biosystems, n. catálogo N4385612 e n. de lote 1002033)

3.1.12 Anticorpos utilizados no ensaio de Imunoprecipitação de cromatina

His-probe (G-18) (Santa Cruz, Cat. n. sc-804)

Anti histona H3 (Abcam, Cat n. ab1791)

mAbZ22 (Möler et al., 1982)

Utilizados na concentração de $2\mu\text{g}/2 \times 10^6$ células

3.1.13 Materiais para imunofluorescência de células em cultura

- Células MCF-7 mantidas em meio RPMI 1640 completo (suplementado com L-glutamina - GIBCO Cat. N. 31800-014; 0,2% p/v de bicarbonato de sódio) e 10% de soro fetal bovino (GIBCO Cat. N 16000028). A cultura foi mantida a 37°C com 5% de CO₂.
- Plasmídeo pMACIA scFvZ22NLS na concentração de $1\mu\text{g}/\mu\text{L}$.
- LipofectamineTM LTX (Invitrogen Cat.N. 15338-100).
- Placas de 6 poços para cultura de células (TPP Cat. N. 92006)
- Materiais suplementares (micropipetas, ponteiras, tubos tipo Eppendorf).
- Lamínulas redondas de 20 mm² autoclavadas.
- Lâminas para microscopia.
- Pinça estéril.

- Tampão fosfato salino (PBS): NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, Na₂HPO₄·2H₂O 9,1 mM, KH₂PO₄ 1,8 mM, pH 7,4.
- Solução de bloqueio (PBS-leite 5%).
- Solução para fixação (3,7% de formaldeído diluído em PBS).
- Tampão de permeabilização (0,2% de Triton X-100 em PBS).
- Câmara úmida.
- Anticorpo IgG Coelho (Sigma Cat. N. I 8140) e anticorpo anti IgG de Coelho (H+L) produzido em Cabra conjugado com fluorescein isothiocyanate- FITC (KPL Cat. N. 02-15-06)
- Solução para montagem das lâminas (Prolong Antifade).
- Diacetato de 4,6 diamino 2-fenilindol –DAPI (Sigma, # D-8417; Lote: 123k4060).
- Microscópio confocal de varredura a laser Leica SP5.

3.1.14 Materiais para Imunoprecipitação de cromatina

- **Fixador:** formaldeído 3,7%(v/v)/PBS
- **Inibidores de protease:** adicionados no momento do experimento (fluoreto de fenilmetilsulfonil-PMSF 1mM, aprotinina 1µg/µL e pepstatina A 1µg/µL)
- **Tampão de lise SDS:** 1% SDS, 10mM EDTA, 50mM Tris, pH 8,1
- Solução 5M de NaCl
- **Tampão de diluição do ChIP:** SDS 0,01%; Triton X-100 1,1%; EDTA 1,2mM; Tris-HCl 16,7mM, pH 8,1; NaCl 167 mM
- Proteína A agarose (Roche)

- **Tampão baixa concentração de sal:** SDS 0,1%; Triton X-100 1%; EDTA 2mM; Tris-HCl 20mM, pH 8,1; NaCl 150mM
- **Tampão com alta concentração de sal:** SDS 0,1%; Triton X-100 1%; EDTA 2mM; Tris-HCl 20mM, pH 8,1; NaCl 500mM
- **Tampão TBS 10x :** Tris-HCl 100mM, pH 7,5; NaCl 500mM; CaCl₂ 30mM; MgCl₂ 20mM
- **Tampão TBS/Tween:** 1% Tween 40 (v/v)/ TBS
- **Tampão TBS/sucrose 1:** sucrose 25%(p/v)/TBS
- **TBS/sucrose 2:** sucrose 50%(p/v)/TBS
- **Solução de cloreto de lítio:** LiCl 0,25M; IGEPAL-CA630 1%; deoxicolato de sódio 1%; EDTA 1mM; Tris-HCl 10mM pH 8,1
- **Tampão TE:** Tris-HCl 10 mM, pH 8,0; EDTA 1mM
- **Tampão de Eluição:** 0,1 M NaHCO₃ e 1% SDS
- **Solução de remoção de proteínas contaminantes:** Proteinase K 10 mg/mL; EDTA 0,5 M e Tris-HCl 1M, pH 6,5 (utilizar separadamente no experimento)
- **Clorofane:** Fenol (equilibrado em pH 7,6) 1v e Clorofórmio 1v. Solução equilibrada com Tris-HCl 100mM pH 8,0
- **Clorofil:** Clorofórmio 24v; Álcool isoamílico 1v . Solução equilibrada com 0,25v de tampão TE.

3.2 Métodos

3.2.1 Teste da transfecção de MCF-7 por três diferentes metodologias

A linhagem celular MCF-7 tem sido relatada como de difícil transfecção. Como os estudos da localização de Z-DNA utilizaram um vetor com a informação gênica para codificar um fragmento de anticorpo contra o DNA, o desafio de estabelecer uma estratégia que eficientemente produziu a transfecção desta linhagem celular foi a primeira etapa deste trabalho. Foram testadas três estratégias: transfecção por fosfato de cálcio, por eletroporação ou por lipídeos catiônicos, e o vetor utilizado foi o com o vetor pCMV-βgal (Clontech). O resultado da transfecção foi identificado pela contagem do número de células que apresentaram coloração azul, após 48h do ensaio de transfecção, num campo de cem células (escolhido aleatoriamente), em três diferentes poços (triplicatas) de três momentos experimentais diferentes, para cada metodologia de transfecção.

3.2.1.1 *Transfecção de células MCF-7 pelo método de fosfato de cálcio*

As células MCF-7 foram semeadas em placas de culturas de 6 poços, a uma quantidade de 2×10^5 células/poço, no dia anterior à transfecção a ser realizada pelo método de fosfato de cálcio (Graham e Van Der Eb, 1973). Em cada poço, foram aplicados um preparado contendo: 1 mL de tampão HEPES pH 7,1; 3μg do vetor pCMV-βgal e 20μL de cloreto de cálcio 2,5M.

A reação foi realizada em um tubo cônico de 15 mL e a solução de cloreto de cálcio foi adicionada gota a gota sob agitação. A mistura foi incubada a temperatura ambiente por 30 minutos, permitindo a formação dos microprecipitados de fosfato de cálcio/DNA. Em seguida

foi distribuída sobre as células. Após a incubação por 6h a 37°C na estufa de CO₂, o meio foi aspirado e substituído pelo meio de cultura contendo 2% SFB.

3.2.1.2 Transfecção de células MCF-7 pelo método de eletroporação

As células MCF-7 foram coletadas por centrifugação a 1300 rpm por 8 minutos, contadas na Câmara de Neubauer, e $1,2 \times 10^6$ células foram suspensas em 500µL de solução PBS contendo 0,1% de dextrose. Estas células foram, então misturadas com 3µg do vetor pCMV-βgal. Esta mistura foi transferida para uma cubeta de 0,4 cm e eletroporadas utilizando-se Gene Pulser II (BioRad) com voltagem de 300mV e 950µF de capacitância. Após a eletroporação, as células foram ressuspensas em meio RPMI, e distribuídas em placas de 6 poços.

3.2.1.3 Transfecção de células MCF-7 com lipídeos catiônicos

As células MCF-7 foram semeadas em placas de culturas de 6 poços, a uma quantidade de 2×10^5 células/poço, no dia anterior à transfecção. No dia seguinte, o procedimento de transfecção foi realizado com o reagente *LipofectamineTM LTX* (Invitrogen), com 3µg do vetor pCMV-βgal e 10µL do lipídeo. Os procedimentos foram os mesmos indicados pelo fabricante do reagente, especificamente para células MCF-7 e estão descritos em <http://tools.invitrogen.com/downloads/Human_breast_cancer.pdf>

3.2.2 Imunofluorescência de células em cultura transfectadas com o vetor pMACIA

scFvZ22NLS

Para esta estratégia, foi utilizado uma etapa prévia de transfecção das células MCF-7 com o vetor pMACIA scFVZ22NLS, que continha a informação para codificação de um fragmento de anticorpo anti-Z-DNA.

3.2.2.1 Transfecção de células MCF7 com uso do kit Lipofectamine™ LTX

Com uma pinça estéril, as lamínulas foram posicionadas nos poços. Em seguida, aplicou-se 2×10^5 células/poço em uma placa de 6 poços, para atingir 80% de confluência no momento da transfecção. Seguiu-se com o procedimento de transfecção, com o reagente Lipofectamine LTX e o vetor pMACIA scFVZ22NLS, recomendado pelo fabricante do kit. As placas foram mantidas por 48h na estufa de CO₂.

3.2.2.2 Imunofluorescência

A expressão dos fragmentos de anticorpo anti Z-DNA e a ligação ao núcleo das células MCF-7 foram validadas por imunocitoquímica. Neste processo, as preparações fixadas e permeabilizadas foram incubadas com IgG de coelho que se liga a cauda de proteína A de *S. aureus* (Anticorpo IgG Coelho, Sigma Cat. N. I 8140) – e este foi considerado, então, o anticorpo secundário. A localização dos anticorpos secundários foi feita com anticorpos terciários conjugados com o fluoróforo isotiocianato de fluoresceína (FITC- anticorpo anti IgG de Coelho (H+L) produzido em Cabra conjugado com FITC , KPL Cat. N. 02-15-06) . As preparações foram observadas por microscopia de fluorescência.

Depois de uma breve lavagem com PBS, as células transfectadas foram fixadas com formaldeído 3,7% e permeabilizadas com 0,2% de Triton X-100 em PBS, durante 10 minutos cada. Procedeu-se, em seguida, ao bloqueio dos locais de ligação não específicos dos anticorpos secundários, durante uma hora, por incubação das células com 5% BSA da espécie animal em que foi produzido o anticorpo secundário utilizado.

Após a incubação com os anticorpos secundários, diluídos em PBS contendo BSA a 0,5%, durante 2 horas e à temperatura ambiente. Seguiram-se três lavagens de 5 minutos com PBS contendo BSA 0,5%. Paralelamente foram feitos controles em que se omitiu o anticorpo secundário. A incubação com os anticorpos terciários, ligados ao fluoróforo FITC e diluídos em PBS contendo BSA 0,5%, foi feita durante 1 hora, à temperatura ambiente e no escuro. Repetiu-se a lavagem (três lavagens de 5 minutos com PBS contendo BSA 0,5%). Para visualização do núcleo usou-se DAPI diluído 1:1000 por 10 minutos. Para retirada do excesso de DAPI, lavou-se as lamínulas 3 vezes com PBS e procedeu-se à montagem das lamínulas sobre lâminas.

A observação da fluorescência nas preparações foi feita num microscópio de fluorescência Zeiss Axioskop com um filtro 450-490, FT 510, LP520 (Zeiss).

3.2.3 Transfecção de células e imunoprecipitação de cromatina com uso de formaldeído como agente fixador (X-ChIP)

O protocolo de CHIP foi adaptado de Huang et 2006, com uso do kit comercial. Partiu-se de amostras de MCF-7 transfectadas com o vetor *pMACIA scFvZ22NLS*. A seguir, o descritivo de cada etapa é apresentado.

3.2.3.1 Preparação das placas

Foram montadas onze placas de cultura de seis poços para cada tipo celular (linhagem MCF-7 ou linhagem A549), com 2×10^5 células/poço. Essas placas foram divididas em cinco grupos:

- a) **Grupo 1**- três placas do *grupo tratamento* (sofreram transfecção com o vetor que codifica o fragmento de anticorpo anti Z-DNA);
- b) **Grupo 2**- três placas do *grupo controle negativo do CHIP*;
- c) **Grupo 3**- três placas referentes ao *grupo controle positivo do CHIP*;
- d) **Grupo 4**- uma placa do *grupo controle da eficiência da transfecção* e
- e) **Grupo 5**- uma placa do *grupo controle da fragmentação da cromatina*.

As células foram mantidas em uma incubadora com condições controladas (37°C, 5% CO₂, 70% de umidade).

3.2.3.2 Transfecção

Após testes preliminares, o método escolhido foi a formação de complexos DNA-lipossomo com o uso do kit Lipofectamine LTX™ (Invitrogen), conforme recomendações do fabricante. Para cada tipo celular, as três placas do *grupo tratamento* foram transfectadas com o vetor *pMACIA scFvZ22NLS* e a placa do *grupo controle eficiência da transfecção*, com o vetor *pCMV-Bgal* (Clontech) e incubadas em condições controladas (37°C, 5% CO₂, 70% de umidade) por 48 horas. As sete placas restantes para cada tipo celular (*grupos controle negativo, controle positivo de CHIP e controle da fragmentação da cromatina*) sofreram apenas troca do meio de cultura.

Após 48h de transfecção, a placa referente ao grupo *controle da eficiência da transfecção* foi submetida ao ensaio da β galactosidase. Somente iniciou-se o experimento de CHIP quando a eficiência da transfecção foi superior a 60%.

3.2.3.3 Ensaio da imunoprecipitação de cromatina com uso de agente fixador

As próximas etapas foram realizadas com os reagentes e as recomendações do kit para ensaio de Imunoprecipitação de cromatina (Millipore, n. catálogo 17-295 e n. de lote DAM1560176), com algumas modificações.

3.2.3.3.1 **Cross-linking** mediada pelo formaldeído, lise das células, sonicação e remoção das ligações inespecíficas de proteína A.

As placas foram incubadas por 10 minutos a temperatura ambiente e agitação constante com solução de formaldeído adicionado diretamente ao meio de cultura a uma concentração final de 3,7%, para **promover a fixação das células e ligação cruzada entre o fragmento de anticorpo anti Z-DNA** (também provoca ligação cruzada entre outras proteínas que interagem com o DNA, como os fatores de transcrição). O meio foi então removido e as células, já fixadas, foram lavadas duas vezes com tampão PBS 1x na temperatura a 4°C, com contendo inibidores de protease adicionados nesta etapa do experimento (fluoreto de fenilmetilsulfonil-PMSF 1mM, aprotinina 1 μ g/ μ L e pepstatina A 1 μ g/ μ L). Com um tratamento utilizando tripsina/EDTA, as células foram recuperadas de cada placa de cultivo, coletadas em microtubos (uma placa/microtubo) e centrifugadas a 2000 rpm por 4 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado.

A **lise das células** foi feita pela incubação dos microtubos por 10 minutos e no gelo em 200µL de *tampão de lise SDS*⁸ (1% SDS, 10mM EDTA, 50mM Tris, pH 8,1) contendo inibidores de protease nas mesmas concentrações descritas anteriormente.

A **fragmentação da cromatina** por sonicação foi realizada, em seguida, com o uso do aparelho *Vibra Cell Ultrasonic Processor* (Sonics and Materials, INC) com a programação para pulsos de ultrassom de 59 segundos, com intervalo de 15 segundos, por 15 min (por microtubo). Durante a sonicação, as amostras foram mantidas no gelo.

Para se verificar a eficiência desta fragmentação, no microtubo referente ao *grupo controle da fragmentação da cromatina*, foram adicionados 8µL da *solução 5M de NaCl*⁵, e reversão da ligação cruzada proteínas-cromatina a 65°C por 4 horas. A recuperação do DNA foi feita por extração fenol/clorofórmio e a corrida em gel de agarose 2% para visualização do tamanho dos fragmentos produzidos.

Os demais microtubos (três do *grupo tratamento*, três do *grupo controle negativo de CHIP*, e três do *grupo controle positivo de CHIP*, para cada tipo celular) foram centrifugados a 13000 rpm por 10 minutos a 4°C, para precipitação dos restos celulares. O sobrenadante de cada microtubo, contendo o DNA fragmentado, foi dividido em uma alíquota de 200µL e outra de 20µL. Cada alíquota de 20µL foi identificada como *input* e armazenada a -20°C, e serviu como controle da quantidade inicial de DNA utilizado no ensaio de CHIP. Por outro lado, as alíquotas de 200µL foram diluídas 10 vezes com o *tampão de diluição do CHIP*⁵ (SDS 0,01%; Triton X-100 1,1%; EDTA 1,2mM; Tris-HCl 16,7mM, pH 8,1; NaCl 167 mM), contendo inibidores de protease nas concentrações já descritas anteriormente.

Para a **remoção de ligações inespecíficas de proteína A**, os sobrenadantes diluídos foram adicionados 75 µL de *proteína A agarose/DNA de espermatozóide de Salmão*⁵ seguida por

⁸ Presente no Kit de ensaio de CHIP (Millipore)

agitação dos microtubos a 4°C durante a noite.

3.2.3.3.2 Recuperação do complexo anticorpo-proteína-cromatina e lavagem da cromatina imunoprecipitada.

No dia seguinte, os microtubos foram centrifugados a 1200 rpm por 5 minutos a 4°C , e o sobrenadante transferido para um novo microtubo.

A **imunoprecipitação da cromatina** na qual se liga o fragmento de anticorpo scFv anti-Z-DNA Z22 (grupo *tratamento*) foi feita pela adição de 2µg do anticorpo policlonal *His-probe* (Santa Cruz, cat. N. sc-804), IgG ant- *his tag* produzida em coelho. Para o grupo *controle positivo do CHIP*, colocou-se 2 µg do anticorpo policlonal anti- histona H3 (Abcam, cat. N. ab 1791), outra IgG produzida também em coelho. Estes microtubos foram incubados por 1 hora a 4°C num agitador. Não houve adição de reagente aos microtubos do grupo *controle negativo*, mas foram incubados nas mesmas condições.

Para a **recuperação do complexo anticorpo-proteína-cromatina** foram adicionados em todos os microtubos (incluindo o *grupo controle negativo*) 60 µL de *proteína A agarose/DNA de esperma de Salmão*⁵ seguida por agitação dos microtubos a 4°C durante a noite, e na manhã seguinte, submetidos pela centrifugação a 1000 rpm por 1 minuto a 4°C. O sobrenadante foi cuidadosamente descartado por pipetagem.

A **lavagem da cromatina imunoprecipitada** foi realizada com quatro soluções salinas de estringência crescente. Primeiramente, 1 mL de *tampão com baixa concentração de sal*⁵ (SDS 0,1%; Triton X-100 1%; EDTA 2mM; Tris-HCl 20mM, pH 8,1; NaCl 150mM) foi adicionado aos tubos. As amostras foram incubadas por 5 minutos a 4°C e agitação constante, centrifugadas a 1000 rpm por 1 minuto a 4°C e o sobrenadante foi removido

cuidadosamente por pipetagem. Em seguida, 1 mL de *tampão com alta concentração de sal*⁵ (SDS 0,1%; Triton X-100 1%; EDTA 2mM; Tris-HCl 20mM, pH 8,1; NaCl 500mM) foi adicionado. As amostras foram incubadas, centrifugadas e o sobrenadante foi removido como descrito anteriormente. Depois, 1 mL do terceiro tampão de lavagem, a *solução de cloreto de lítio*⁵ (LiCl 0,25M; IGEPAL-CA630 1%; deoxicolato de sódio 1%; EDTA 1mM; Tris-HCl 10mM pH 8,1) foi adicionado e realizado o mesmo procedimento antes até a remoção do sobrenadante. Por fim, foi feita a lavagem com 1 mL do *tampão TE*⁵ (Tris-HCl 10 mM, pH 8,0; EDTA 1mM) repetindo o processo de incubação, centrifugação e remoção do sobrenadante. Esta última etapa de lavagem foi feita duas vezes.

3.2.3.3.3 Eluição da cromatina, reversão do *cross-linking* e extração da cromatina

A **eluição da cromatina precipitada** foi feita pela adição de 250 µL do tampão de eluição (NaHCO₃ 0,1M; 1% SDS), preparado no momento do experimento. Os tubos foram vortexados por 1 minutos, incubados a 15 minutos em temperatura ambiente sob constante agitação e centrifugados a 5000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi cuidadosamente removido por pipetagem e removido para um novo tubo. Este procedimento de eluição foi repetido no tubo com sedimento de bilhas de agarose, e os sobrenadantes acumulados, para garantia de maior recuperação de material imunoprecipitado.

A **ruptura da ligação** (reversão *do cross-link*) entre a proteína e a região genômica de interesse foi feita pela incubação das amostras contendo a cromatina eluída e das amostras *input* com 200 mM de NaCl a 65°C por 8 horas.

Para a **remoção de proteínas contaminantes**, as amostras foram incubadas com 2µL de Proteinase K 10 mg/mL, 10 µL de EDTA 0,5 M e 20 µL de Tris-HCl 1M, pH 6,5, por 1h a

45°C.

A **extração de DNA** foi feita pela adição de 500 µL de clorofane às amostras, vortex por 1 min, centrifugação a 13000 rpm por 5 minutos a temperatura ambiente e transferência da fase superior contendo DNA para um novo tubo. Foram adicionados 500 µL de clorofil seguido pela centrifugação efetuada como antes. A fase superior, onde se encontrava o DNA, foi transferida para um novo tubo.

A **precipitação do DNA** foi feita em seguida pela adição de acetato de sódio 0,3M, pH 5,2, etanol absoluto a 4°C, 20µg de glicogênio e incubação das amostras -80°C por 2 horas. Após centrifugação a 13000 rpm por 30 minutos a 4°C, a **lavagem do DNA** foi feita adição de etanol a 70%. As amostras foram centrifugadas a 15000rpm por 15 minutos a 4°C e ressuspensas em 20µL de água Milli-Q.

Cada amostra foi dividida em quatro partes iguais de 5µL, que compuseram os experimentos de clonagem no vetor pGEM T easy, PCR mediada por ligação (LM-PCR), PCR qualitativo (apenas as amostras *inputs*) e PCR em tempo real.

3.2.4 Imunoprecipitação de cromatina nativa (N-ChIP)

A estratégia seguinte foi adaptada de O'Neill e Turner (2003), com o passo enzimático sugerido por Kang, Vieira e Bungert (2002)

Foram montadas onze garrafas de cultura de 150 cm² para cada tipo celular (linhagem MCF-7 ou linhagem A549), para atingirem a quantidade de aproximadamente 1 X 10⁶ células/mL. Essas garrafas foram divididas em cinco grupos: três garrafas do *grupo tratamento* (foi utilizado no ChIP o anticorpo monoclonal anti Z22 –mAbZ22); três garrafas do *grupo controle negativo do ChIP*; três garrafas referentes ao *grupo controle positivo do ChIP*;

e uma garrafa do grupo *controle da fragmentação da cromatina*. As células foram mantidas em uma incubadora com condições controladas (37°C, 5% CO₂, 70% de umidade).

O meio de cultura foi removido, e as células, foram lavadas duas vezes com tampão PBS 1x na temperatura a 4°C, contendo inibidores de protease adicionados no momento do experimento (fluoreto de fenilmetilsulfonil-PMSF 1mM, aprotinina 1µg/µL e pepstatina A 1µg/µL). Com um tratamento utilizando tripsina/EDTA, as células foram recuperadas de cada garrafa de cultivo, coletadas em microtubos (uma garrafa/microtubo) e centrifugadas a 2000 rpm por 4 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado.

O sedimento foi ressuspensionado em 500 µL de tampão TBS e 500 µL de tampão TBS/Tween (1% Tween 40, TBS) com contendo inibidores de protease adicionados no momento do experimento (fluoreto de fenilmetilsulfonil-PMSF 1mM, aprotinina 1µg/µL e pepstatina A 1µg/µL). As amostras foram mantidas no gelo por 1 hora.

Em seguida, cada amostra foi cuidadosamente homogeneizada, e centrifugada a 10000 rpm por 20 minutos a 4°C. Uma alíquota de 10µL foi retirada, e uma lâmina foi montada para checar se os núcleos permaneceram intactos. A observação foi realizada em um microscópio de luz visível.

O sedimento foi ressuspensionado em 800 µL de tampão TBS/sacarose 1 (sacarose 25%, TBS) e 400 µL de tampão TBS/sacarose 2 (sacarose 50%, TBS) com contendo inibidores de protease adicionados no momento do experimento (fluoreto de fenilmetilsulfonil-PMSF 1mM, aprotinina 1µg/µL e pepstatina A 1µg/µL). Cada amostra foi cuidadosamente homogeneizada, e centrifugada a 10000 rpm por 20 minutos a 4°C. O sedimento foi ressuspensionado em 1000 µL de tampão TBS/sucrose 1 (sucrose 25%, TBS). Cada amostra foi cuidadosamente homogeneizada, e centrifugada a 10000 rpm por 25 minutos a 4°C.

A **fragmentação da cromatina** foi realizada submetendo-se o núcleo à digestão

enzimática. Primeiramente, o sedimento contendo núcleos foi ressuspenso em 100 µL de tampão de digestão contendo 10 µL do tampão de digestão O (10 X, Fermentas), 10 µL de sacarose 3,2 M, 10 µL do coquetel de inibidores de protease e 20 U da enzima *PstI* (Fermentas). O sistema de digestão foi mantido por 4h a 37°C. Após esse período, foram acrescentados 10U da enzima. O novo sistema foi mantido a 37°C por 16h adicionais.

A **lise nuclear** foi feita pela incubação dos microtubos por 10 minutos e no gelo em 200µL de *tampão de lise SDS* (1% SDS, 10mM EDTA, 50mM Tris, pH 8,1) contendo inibidores de protease nas mesmas concentrações descritas anteriormente.

Para se verificar a eficiência desta fragmentação, no microtubo referente ao *grupo controle da fragmentação da cromatina*, foram adicionados 8µL da *solução 5M de NaCl*, e reversão da ligação cruzada proteínas-cromatina a 65°C por 4 horas. A recuperação do DNA foi feita por extração fenol/clorofórmio e a corrida em gel de agarose 2% para visualização do tamanho dos fragmentos produzidos. A análise da eficiência da fragmentação da cromatina revelou que o procedimento de sonicação foi o suficiente para gerar fragmentos de DNA nos tamanhos entre 500 e 2000 pb, adequados para este experimento.

Os demais microtubos (três do *grupo tratamento*, três do *grupo controle negativo de CHIP*, e três do *grupo controle positivo de CHIP*, para cada tipo celular) foram centrifugados a 13000 rpm por 10 minutos a 4°C, para precipitação dos restos celulares. O sobrenadante de cada microtubo, contendo o DNA fragmentado, foi dividido em uma alíquota de 200µL e outra de 20µL. Cada alíquota de 20µL foi identificada como *input* e armazenada a -20°C para posterior ruptura da ligação proteínas-DNA e extração dos fragmentos de cromatina, e serviu como controle da quantidade inicial de DNA utilizado no ensaio de CHIP. Por outro lado, as alíquotas de 200µL foram diluídas 10 vezes com o *tampão de diluição do CHIP* (SDS 0,01%; Triton X-100 1,1%; EDTA 1,2mM; Tris-HCl 16,7mM, pH 8,1; NaCl 167 mM), contendo

inibidores de protease nas concentrações já descritas anteriormente.

Para a **remoção de ligações inespecíficas de proteína A**, os sobrenadantes diluídos foram adicionados 50 μL de *proteína A agarose* (Roche) seguida por agitação dos microtubos a 4°C durante a noite. No dia seguinte, os microtubos foram centrifugados a 1200 rpm por 5 minutos a 4°C, e o sobrenadante transferido para um novo microtubo.

A **imunoprecipitação da cromatina** do *grupo tratamento* foi feita pela adição de 2 μg do anticorpo monoclonal Z22 (Möller et al, 1982), uma IgG produzida em camundongo. Para o *grupo controle positivo do CHIP*, colocou-se 2 μg do anticorpo policlonal anti- histona H3 (Abcam, cat. N. ab 1791), outra IgG produzida em coelho. Estes microtubos foram incubados por 1 hora a 4°C num agitador. Não houve adição de reagente aos microtubos do *grupo controle negativo*, mas foram incubados nas mesmas condições.

As demais etapas do experimento de Imunoprecipitação de cromatina nativa foram executadas nas mesmas condições da Imunoprecipitação de cromatina com uso de agente fixador, com a ressalva que todas as soluções foram preparadas no laboratório, e não fornecidas por um kit comercial.

As amostras contendo os fragmentos de CHIP ressuspensas em 20 μL de água Milli-Q, e cada amostra foi dividida em quatro partes iguais de 5 μL , que compuseram os experimentos de clonagem no vetor pGEM T easy, PCR mediada por ligação (LM-PCR), PCR qualitativo (apenas as amostras *inputs*) e PCR em tempo real.

3.2.5 Clonagem no Vetor pGEM-T easy®

3.2.5.1 Reação de reparo das extremidades dos fragmentos de DNA

A reação de reparo das extremidades dos fragmentos de CHIP foi realizada para que este pudesse ser ligado ao vetor pGEM-T, já que a sonicação ou a digestão por *Pst*I gera fragmentos com extremidades coesivas .

Nessa reação foi usado 5 μ L de material *input* (70ng/ μ L) ou 5 μ L de material *output*, 2 μ L de Tampão NEB2 10X (BioLabs), 2 μ L BSA 100X 10mg/mL (BioLabs), 1 μ L DNTP's 10 mM (Fermentas) e 0,5 μ L de T4 Polymerase 3U/ μ L (BioLabs), completando o volume para 20 μ L com água ultra- pura. Em seguida, a reação foi incubada a 12°C por 15 minutos, após essa incubação foi adicionada a 5 μ L da enzima Klenow 5U/ μ L (BioLabs) e foi incubado novamente mas a 37°C por 30 minutos e 75°C por 20 minutos para a inativação da enzima. Estes procedimentos de incubação foram realizados no termociclador *Techne* modelo TC-512.

3.2.5.2 Adenilação dos fragmentos de DNA

A adenilação, ou seja, a adição de deoxiadenosinas (dATP) às extremidades dos fragmentos de DNA amplificadas foi realizada para garantir e também aumentar a eficiência da ligação dos mesmos ao vetor de clonagem.

Para esta reação, foram utilizados 2 μ L de tampão 10x (100mM de Tris e 500mM de KCl), 0,7 μ L de MgCl₂ (50mM), 1,0 μ L de dATP (2,5mM), 0,5 μ L de Taq-Polimerase (Cenbiot, 5U/ μ L), 10 μ L de fragmentos de CHIP submetido ao reparo das extremidades completando com água Milli-Q para um volume final de 20 μ L por reação. A adenilação de cada amostra foi realizada em uma temperatura de 72°C, durante 1 hora, em um termociclador *Techne* modelo TC-512, sem a utilização de ciclos.

3.2.5.3 Ligação dos fragmentos de DNA aos vetores de clonagem

Após a adenilação os fragmentos de DNA foram ligados a vetores de clonagem especiais de 3000pb (pGEM[®]-T easy), os continham uma deoxitimidina (T) em cada uma das suas extremidades 3'. Os marcadores de seleção presentes no vetor eram o gene de resistência a ampicilina e o gene *lacZ*. A ligação dos fragmentos de CHIP foi realizada pela ação da enzima T4 DNA-ligase e todo o processo foi executado de acordo com as instruções do fabricante pGEM[®]-T easy (Promega). Cada mistura de ligação foi preparada empregando-se o volume final de 16µL constituídos por 5µL dos fragmentos adenilados, 1 µL da solução contendo pGEM-T easy a 50 ng/µL. Água Milli-Q foi utilizada para completar o volume final. Esta reação foi mantida a 16°C por 24 horas. As misturas de ligação foram utilizadas na transformação por eletroporação de células competente XL1Blue(Stratagene).

3.2.5.4 Transformação da bactéria *Escherichia coli* XL1Blue com plasmídeos pGEM-T easy recombinantes

As ligações foram misturadas com 100µL de suspensões de células competentes XL1Blue, produzidas no momento de uso ou estocadas a -80°C , e foram mantidas no gelo por 5 minutos e eletroporadas com o auxílio do aparelho Gene Pulser II (BioRad), nas seguintes condições: cuvetas de 0,2cm, low range de 200 Ohms, capacitância de 25 µF e voltagem de 2,5 kV. Após recuperação das células transformadas com adição de 1 mL de meio SOC líquido, durante 1 hora a 37°C e agitação de 200 rpm, estas foram plaqueadas em meio LB Agar, contendo ampicilina a 200 µg/mL, X-Gal (80 µg/mL) e IPTG (40 µg/mL), mantidas a 37°C por 16 horas.

As colônias brancas resistentes (possíveis recombinantes ou clones positivos) foram

repicadas em meio LB líquido contendo ampicilina a 100 µg/mL e submetidas a extração plasmidial por dois métodos: por meio de lise alcaline (AUSUBEL et al, 1995), para análise prévia de restrição enzimática a fim de verificar a presença dos fragmentos CHIP ligados aos vetores e confirmar os clones positivos; e pelo kit QIAprep Spin Miniprep Kit, para análise destes DNAs por seqüenciamento.

Ambos os métodos proporcionaram materiais adequados para os procedimentos seguintes, porém a extração por kit proporcionou materiais livres de contaminantes como DNA genômico, RNA, proteínas e macromoléculas, mais adequados aos procedimentos de sequenciamento. O produto final da quantificação, independente do método, foi quantificado em gel de agarose a 0,8%.

A confirmação da inserção do inserto foi realizada por digestão com a enzima *EcoRI* (Biolabs), que cliva regiões do vetor pGEM-T Easy que flanqueiam o fragmento inserido, provocando a liberação do mesmo. Esta reação foi montada na seguinte condição, para um volume final de 20µL: 200ng de DNA plasmidial, 2 µL do tampão de digestão (10 X) para *EcoRI*, 1 µL da enzima *EcoRI* (10 U), estes últimos fornecidos pelo fabricante (Biolabs). Esta reação foi mantida em banho maria (37°C) por 3 horas. Os produtos de digestão foram analisados em gel de agarose a 1%, sendo que a presença de dois ou mais fragmentos na corrida (sendo um deles de 3000 pb) eram indício de clone positivo.

Dos clones positivos identificados, quatorze clones contendo fragmentos CHIP de interesse foram selecionados e tiveram seu DNA plasmidial purificado por kit, quantificado e submetido ao seqüenciamento automático.

3.2.5.5 Sequenciamento

As reações de seqüenciamento foram realizadas no seqüenciador automático MegaBACE 1000 (Molecular Dynamics). Foram utilizados cerca de 200 ng de DNA plasmidial, 5 nmoles dos oligonucleotídeos apropriados a cada cDNA e o kit comercial DyEnamic ET DYE Terminator Cycle Sequencing (MJ Research, INC).

O *pipeline* de análise das seqüências foi feito no programa PHPH, <<http://helix.biomol.unb.br/phph/index.html>> e envolveu análise de qualidade superior a 20 e montagem de contigs pelo CAP3. Posteriormente, a análise de alinhamentos locais foi feita pelo emprego do programa BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), contra a base de dados do GeneBank.

3.2.5.6 Análise das seqüências potencialmente formadoras de Z-DNA

3.2.5.6.1 Programa Z-Hunt

Para análise das seqüências potenciais formadoras de Z-DNA, foi utilizado primeiramente o programa Z Hunt < <http://gac-web.cgrb.oregonstate.edu/zDNA/>>. Uma seqüência potencial formadora de Z-DNA é definida como um segmento contíguo de DNA com propensão a formar Z-DNA (chamado de Z-DNA no ZHunt) maior ou igual a um limiar pré-definido, que pode ser interpretado como “o número de seqüências aleatórias em que uma seqüência de probabilidade igual ou maior de formar Z pode ocorrer”. O padrão de *cutoff* (mínimo) do *Z-score* para seqüências com potencial formação de Z-DNA é de 700. Este foi determinado como um valor mínimo razoável para a capacidade de uma seqüência formar Z-DNA de acordo com a documentação do programa ZHunt. Para se ter uma idéia

prática do valor *Z-Score*, um *score* de 500 corresponde a uma sequência contígua de alternância CA/TG, com o tamanho de 12pb, que já foi demonstrado experimentalmente formar Z-DNA sob condições razoáveis de *supercoiling* negativo (Johnston, Ohara e Rich, 1988). Uma sequência típica de formar Z-DNA de 24pb de nucleotídeos d(CG)₁₂ devolve um Z score de valor máximo ($4,1 \times 10^8$).

3.2.5.6.2 Programa Z-Catcher

O programa Z-Hunt possui algumas limitações: não é aplicável a estudos genômicos de larga escala, uma vez que só aceita sequências consulta inferior a 1 Mbp. Além disso, o programa não oferece uma função de busca que usa a densidade da superhélice de DNA (σ) como um preditor. Portanto, com base em princípios biofísicos utilizados no Z-Hunt, foi desenvolvido um programa de computador, o Z-catcher, que é capaz de manipular sequências, sem limitações de tamanho, e outras características biofísicas. O programa foi adquirido *on-line* em <http://vhp.ntu.edu.sg/zdna/Z_Catcher.zip>.

Um fragmento de DNA é considerado como alto potencial de formação de Z-DNA (ZDRs) se for susceptível de ser transformado a partir de sua conformação do DNA-B padrão para a conformação Z-DNA. O consumo de energia de uma transição de DNA B-para-Z é fornecida pela energia liberada a partir do relaxamento do supercoiling negativo da dupla-hélice (Ho *et al.*, 1986). Com Z-catcher, o potencial de formação para Z-DNA é medido por meio do cálculo da energia livre necessária para a sua transição B-para-Z e então esta tradução de energia livre para a densidade da superhélice negativa poderia fornecer a mesma quantidade de energia livre quando o supercoiling está relaxado. Fragmentos exigindo menos (maior em valor numérico desde que a densidade é negativa) supercoiling têm maior potencial de formação de Z.

A composição de nucleotídeos de um fragmento de DNA determina a energia necessária para a sua transição B-para-Z. O programa Z-catcher lê uma sequência de consulta como blocos dinucleotídeo e atribui julgamentos de conformação anti-Syn- ou um Syn-anti o para cada dinucleotídeo. A energia livre necessária para estabilizar um fragmento de DNA-Z é a soma do requisito de energia para estabilizar os dinucleotídeos.

As regiões potenciais formadoras de Z-DNA tem valores de σ entre -0,090 a -0,055.

3.2.5.7 *Análise de sequências repetitivas nos clones com fragmentos de CHIP-Z-DNA*

Para identificar elementos repetitivos nas sequências dos clones com Z-Score >700, foi utilizado o programa *Repeat Masker* disponível em <http://www.repeatmasker.org/>.

3.2.6 **PCR mediada por ligação (LM-PCR)**

A técnica LM-PCR, introduzida por Muller; Wold (1989) consiste na fragmentação do DNA genômico, seguido de ligação de adaptadores e a amplificação da região de interesse. Neste trabalho foi utilizada a adaptação descrita por Lee, Johnstone e Young (2006).

Para início desta PCR são necessários dois procedimentos prévios: o reparo das extremidades dos fragmentos de CHIP (conforme descrito anteriormente) e o preparo dos adaptadores.

O preparo dos adaptadores (mix) foi feito em alíquotas de 50 μ L (15mM), partindo-se de uma solução estoque, montada no momento do experimento, contendo: 250 μ L de Tris-HCl 1M (pH 8,0), 375 μ L de uma solução 40 μ M do oligo oJW102 (5'

GCGGTGACCCGGGAGATCTGAATTC 3') e 375 μ L de uma solução 40 μ M do oligo oJW103 (5' GAATTCAGATC 3'). As alíquotas foram colocadas no termociclador *Techne* modelo TC-512 e incubadas no seguinte programa: 95°C por 5 minutos; 70°C por 1 minuto, rampeamento para 4°C (0,4°C/min). Os adaptadores foram guardados imediatamente e estocados a -20°C. Durante o uso, as alíquotas foram mantidas sempre no gelo e não foram recongeladas.

Após o reparo das extremidades dos fragmentos de CHIP, 5 μ L de acetato de sódio e 0,2 μ g de glicogênio foram adicionados, seguidos por uma extração de fenol/clorofórmio, e precipitação com etanol absoluto e lavagem do sedimento com etanol 70% (mesmos procedimentos descritos para extração do DNA em CHIP). O material foi ressuspenso em 25 μ L de água ultra-pura, e foi denominado "amostra pós reparo".

A ligação dos adaptadores ocorreu em reação de 50 μ L nas seguintes concentrações finais: 200 U de T4 DNA ligase (Invitrogen), tampão da ligase 1x, 2mM do mix de adaptadores adicionados aos 25 μ L da amostra pós reparo. Este material foi incubado por 16h em um banho a 16°C. O material foi então precipitado, sedimentado e lavado nas mesmas condições que a amostra pós-reparo. Finalmente, o sedimento foi ressuspendido cuidadosamente em 25 μ L de água ultra-pura, e esta amostra foi denominada amostra "pós ligação".

A reação de PCR ocorreu de forma assimétrica (contendo apenas um iniciador). Foram montados, inicialmente e no gelo, o mix A, contendo reagentes nas seguintes concentrações finais: tampão da enzima Taq 1x, 250 μ M cada dNTP, 1 mM do oligo oJW (40 μ M) e água ultra-pura para completar um volume de 15 μ L; e o mix B: com tampão da enzima Taq 1x; 0,5 μ L de Taq-Polimerase (Cenbiot, 5U/ μ L); e água ultra-pura para completar um volume de 10 μ L.

Adicionou-se 15 μ L de LMPCR Mix A para cada 25 μ L de amostra pós ligação, no gelo. Os tubos foram então transferidos para o termociclador *Techne* modelo TC-512. As condições

de termociclagem foram: desnaturação inicial a 55°C por 4 minutos e anelamento inicial a 72°C por 3 minutos, desnaturação a 95°C por 2 minutos e 25 ciclos de desnaturação a 95°C por 30 segundos, seguida de 60°C por 30 segundos, para o anelamento dos oligonucleotídeos e 72°C por 30 segundos para a extensão dos fragmentos, uma desnaturação complementar de 72°C por 5 minutos. Porém, ao iniciar-se o programa, na metade da etapa de desnaturação inicial, o programa foi pausado para adição do mix B. O produto da PCR foi visualizado num gel de agarose a 1%.

3.2.7 PCR qualitativo e PCR quantitativo em tempo real

3.2.7.1 Desenho dos oligonucleotídeos para a PCR em tempo real

Após a seleção das regiões potencialmente formadoras de Z-DNA, foram desenhados os oligonucleotídeos para a quantificação das amostras produzidas após a imunoprecipitação de cromatina.

Com a descrição das sequências referentes às regiões específicas para uma dada região genômica recuperadas após o seqüenciamento das amostras da imunoprecipitação de cromatina ou das sequências descritas por Li et al (2009), foram desenhados oligonucleotídeos usando o programa Primer 3 Plus <<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>>. Os parâmetros utilizados para a construção dos *primers* estão na listados na tabela 3.

Tabela 3 – Distribuição dos limites mínimos e máximos para a construção dos oligonucleotídeos segundo o parâmetro.

Parâmetro	Limite mínimo	Limite máximo
Temperatura de anelamento	58°C	62°C
Conteúdo de GC no oligonucleotídeo	20%	80%
Tamanho do Oligonucleotídeo	18 bases	27 bases
T _m do amplicon	75°C	85°C
Tamanho do amplicon	80 bases	120 bases

Após selecionar os pares de oligonucleotídeos que atendiam a essas condições, foi utilizado o programa Oligo Analyzer da Integrated DNA Technologies (IDT), também disponível online <<http://www.idtdna.com/analyzer/applications/oligoanalyzer/>> para verificar a formação de dímeros, dobramento (hairpin) e ΔG de formação de híbridos.

3.2.7.2 PCR qualitativo

O PCR qualitativo foi utilizado para verificar se ocorria amplificação da amostra eficientemente antes do início dos testes em PCR quantitativo em tempo real. O material utilizado foi o input da imunoprecipitação de cromatina.

As condições de termociclagem foram 50°C por 2 minutos, 95°C por 2 minutos e 40 ciclos de desnaturação a 95°C por 15 segundos, seguida de 60°C por 30 segundos, para o anelamento dos oligonucleotídeos e 72°C por 30 segundos para a extensão dos fragmentos. O equipamento utilizado foi termociclador Techne modelo TC-512.

Foram utilizados 2,5µL de tampão 10x (10mM de Tris e 50mM de KCl), 0,7 µL de MgCl₂, 1,5 µL de dNTPs (2,5mM), 0,5 µL de Taq-Polimerase (Cenbiot, 5U/µL), 1,5µL de oligonucleotídeos forward e reverse (10µM), completando com água Milli-Q para um volume final de 25 µL por reação.

3.2.7.3 PCR em tempo real

As reações de amplificação em tempo real foram realizadas com o aparelho 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems). A amplificação das regiões genômicas alvo foi realizada utilizando-se a metodologia SYBR Green. Como referência endógena foi utilizado o gene GAPDH. A amplificação das regiões alvos e da referência endógena foi realizada em diferentes tubos, na mesma placa de reação.

A amplificação de cada sistema foi avaliada antecipadamente a fim de que a eficiência das sequências alvo e a referência endógena se mostrassem semelhantes.

A eficiência da amplificação é medida pela fórmula: $E = (10^{-1/slope}) - 1$, onde o slope indica a inclinação da reta, cujo valor próximo a -3,3 indica uma eficiência aproximada de 100%. Após verificar a eficiência, foi possível decidir a diluição da amostra de imunoprecipitação de cromatina e a concentração dos oligonucleotídeos adequadas para preparar as reações de quantificação relativa.

Assim, as reações eram preparadas em um volume final de 10 µL com: 2 µL de amostras com DNA do input/output CHIP; 0,2 mM de cada *primer*; 5 µL do tampão Fast SYBR Green PCR 2x Master mix (Applied Biosystems), que possui todos os componentes imprescindíveis à amplificação (as enzimas uracil N-glicosilase-UDG⁹ e AmpliTaq® Fast DNA Polymerase, MgCl₂, DNTPs, KCl e os fluoróforos SYBR® Green I e ROXTM Passive Reference¹⁰) e 2,6µL de água Milli-Q.

Em cada placa, foram amplificadas também as amostras controle, compostas por todos os reagentes necessários à amplificação, exceto DNA. As condições de termociclagem

⁹ UDG também é conhecida como uracil-N-glicosilase (UNG), e o tratamento com esta enzima pode prevenir a reamplificação de produtos de transição da PCR, por remover qualquer uracil incorporado a *amplicons* de fita simples ou dupla.

¹⁰ O fluoróforo ROXTM fornece uma referência interna para que o sinal do corante repórter seja normalizado na análise de dados. Esta normalização é necessária para corrigir as flutuações devidas a mudanças na concentração ou no volume.

foram 95°C por 20 segundos, para ativação da enzima AmpliTaq® Fast DNA; e 40 ciclos de desnaturação a 95°C por 3 segundos, seguida de 60°C por 30 segundos, para o anelamento dos oligonucleotídeos e amplificação. Ao final dos 40 ciclos de amplificação, um período adicional de 30 minutos, com elevação gradual da temperatura de 60°C para 94°C foi utilizado para aquisição da curva de dissociação.

3.2.7.4 Análise dos dados da PCR em tempo real

Para a análise dos dados, foi necessário normalizar o Ct referente a cada fragmento de DNA obtido pela estratégia de ChIP (obtida com anticorpo anti Z-DNA) em relação ao Ct do input para a mesma região genômica no ensaio de qPCR (ΔCt). Esta conversão foi imprescindível para adequar os cálculos às diferenças de preparo da mesma amostra nuclear inicial. Assim

$$\Delta Ct[\textit{normalização do ChIP}] = (Ct[\textit{ChIP}] - (Ct[\textit{Input}] - \log_2(\textit{Fator Diluição do Input})))$$

Em que

$$\textit{Fator de diluição do Input} = \frac{1}{\textit{quantidade de Input}}$$

O padrão de diluição da amostra input nos experimentos de ChIP é 1%, que resulta em um fator de diluição de 100 ou 6,644 ciclos (corresponde a $\log_2 100$). Portanto, subtraiu-se 6,644 do valor do Ct[Input] como mencionado na equação acima. Em seguida, como os experimentos de ChIP foram feitos em triplicata, calculou-se a média dos ΔCt s.

Para o cálculo da % input para cada fração de ChIP (conversão linear do ΔCt para o experimento de ChIP normalizado) foi utilizada a fórmula

$$\%Input = 2^{[-\bar{x}_{\Delta Ct(normalização\ do\ ChIP)}]}$$

Finalmente, o ΔCt referente ao experimento de ChIP normalizado pode ser ajustado em relação o ΔCt do experimento controle negativo (amostra sem o anticorpo anti Z-DNA)

$$\Delta\Delta Ct[ChIP/CN] = \Delta Ct[normalização\ do\ ChIP] - \Delta Ct[normalização\ do\ CN]$$

O cálculo do *fold enrichment* da fração imunoprecipitada sobre o respectivo controle negativo (conversão linear do $\Delta\Delta Ct$) foi feito pela seguinte fórmula

$$Fold\ enrichment = 2^{[-\Delta\Delta Ct[ChIP/CN]]}$$

A montagem das placas seguiu o seguinte delineamento experimental: cada experimento de ChIP foi gerado em triplicata (3 placas), por tratamento, e os experimentos de ChIP, que seja com o uso de agente fixador, ou nativo, foi realizado em três experimentos independentes. O cálculo do Ct era feito por cada placa analisada. Este tipo de estratégia permite a análise da variância intra-experimento e inter-experimento, e permite verificar a repetibilidade experimental.

3.2.8 Análise estatística

A análise da eficiência da transfecção e a comparação do enriquecimento da cromatina recuperada após ChIP para diferentes estratégias ChIP e tipos celulares, nas diversas regiões formadoras de Z-DNA foi feita por meio de um teste para comparação entre médias entre 3 grupos ou mais. Para a escolha do tipo de estatística apropriada- paramétrica ou não- foi executado o teste de normalidade dos resíduos de Shapiro-Wilk, com o nível de significância adotado de 5%. Se o teste de normalidade resultou em $p > 0,05$, executou-se a Análise de Variância (ANOVA), seguida pelo pós teste de Tukey (quando o teste de homogeneidade das variâncias devolveu $p > 0,05$) ou de teste T2 de Tamhane (caso contrário);

por outro lado, teste de normalidade com significância inferior a 5%, remeteu a escolha da estatística não paramétrica, então, o teste H de Kruskal-Wallis (também conhecido como ANOVA não paramétrica) com pós teste de Dunn foram realizados. Para o pós teste, também foi adotado o nível de significância de 5%. Os cálculos foram feitos no programa SPSS, versão 17.0 e os gráficos das análises no programa GraphPrism versão 5.0

Resultados e Discussão

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 *A padronização da transfecção apontou a lipofecção como estratégia adequada para transfecção de células MCF-7*

A padronização da transfecção das células em cultura foi uma etapa importante para obtenção de um número adequado de células que receberam o vetor com a informação genética para expressão do fragmento de anticorpo anti Z-DNA, e para a reprodutibilidade experimental, garantindo que a variância experimental não interferisse na validação por PCR em tempo real.

Os testes de eficiência foram realizados em células MCF-7, considerada uma linhagem de difícil transfecção (Manual Lipofectamine LTX, Invitrogen). Os protocolos testados foram a co-precipitação do DNA com fosfato de cálcio (Jordan, Schallhorn e Wurm, 1996), a eletroporação das células em cultura (Melkonyan, Sorg e Klempt, 1996) e a transfecção mediada por lipídeos catiônicos (Lipofectamine LTX, Invitrogen).

O vetor utilizado, pCMV- β gal, foi transfectado isoladamente do vetor *pMACIA scFvZ22NLS*. Para o cálculo da eficiência da transfecção, os experimentos foram realizados em triplicata. A estimativa foi pela contagem do número de células azuis em relação ao número de células presentes em um quadrante representativo da placa de cultivo, e o resultado apresentado em porcentagem (figura 12). A distribuição dos dados mostra que a transfecção mediada por lipídeo resultou em uma melhor eficiência, e foi a selecionada para os demais experimentos.

A transfecção das células MCF-7 geralmente não é eficiente por qualquer método. Porém, o fabricante da Lipofectamine LTX sugere uma concentração maior de amostra a ser

transfectada em relação aos protocolos anteriores. Este ajuste foi importante na eficiência da transfecção.

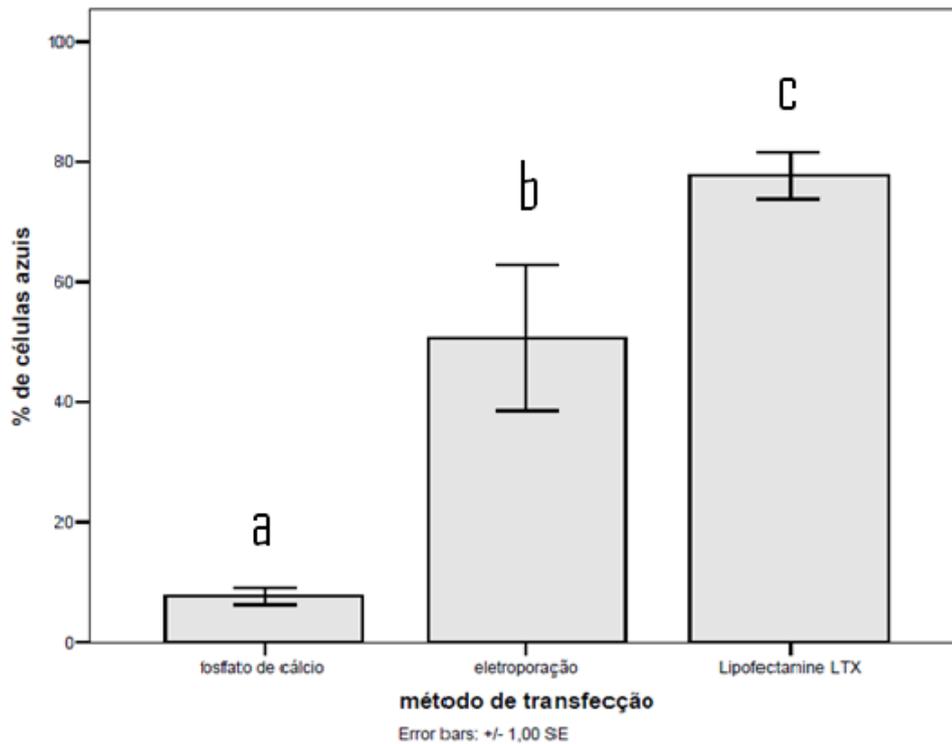
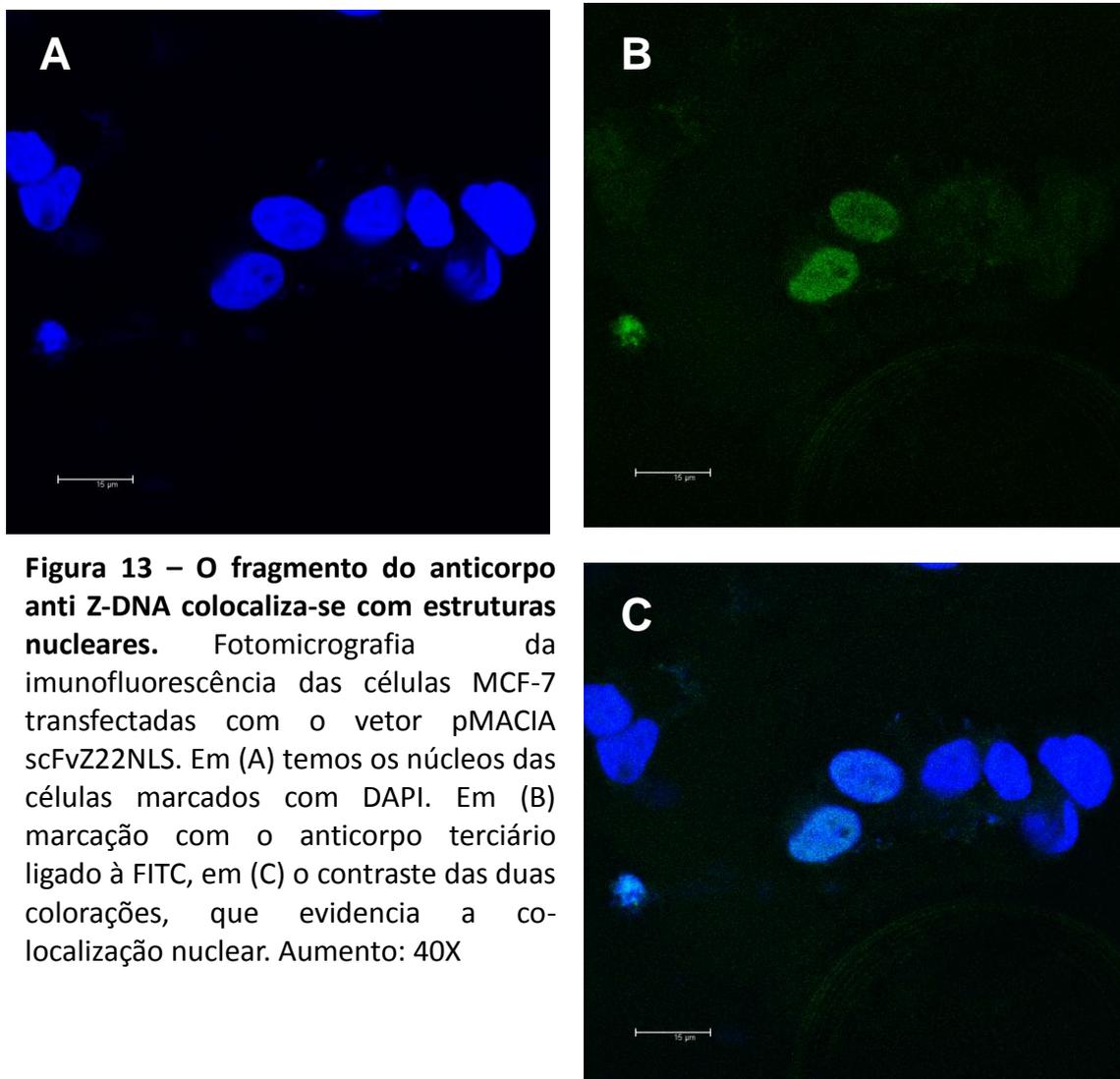


Figura 12 – O método de transfecção com lipofectamine LTX parece ser mais eficiente e reprodutível em experimentos que utilizam células MCF-7. Eficiência da transfecção transiente da linhagem celular MCF-7 segundo a atividade da β -galactosidase. As letras diferentes (a, b e c) denotam diferença estatística ($p < 0,05$, ANOVA com *post test de Tukey*)

Devido ao fato de que as células A549 não serem de difícil transfecção, foi mantido o mesmo protocolo de transfecção escolhido para MCF-7, afim de se manter as mesmas condições experimentais.

4.2 O fragmento de anticorpo anti Z-DNA, expresso a partir do vetor pMACIA scFvZ22NLS, colocaliza-se com estruturas nucleares

Inicialmente, o objetivo foi testar se o fragmento de anticorpo expresso a partir do vetor pMACIA scFvZ22NLS, adequadamente reconhecia regiões nucleares. Sendo assim, as células MCF-7 foram transfectadas com o vetor e, para identificar o núcleo, as células também foram coradas com o DAPI. Com isto, foi possível verificar que o anticorpo se ligava às regiões nucleares, em presença do agente fixador formaldeído (que induz a ligação cruzada). Embora Suka *et al* (2001) mostrassem que a validação dos anticorpos por outras estratégias pode não se aplicar aos resultados de CHIP, o perfil da Imunofluorescência apoia a hipótese de que o anticorpo ligou-se ao núcleo possivelmente em regiões em Z. As imagens de microscopia estão na figura 13.



4.3 A análise de sequências obtidas pelo CHIP revelou a presença de sequências potenciais formadoras de Z-DNA e com sequências repetitivas

Os fragmentos de Z-DNA oriundos de células MCF-7 e obtidos por X-ChIP foram diretamente clonados no vetor *pGEM-T Easy* (Promega), e posteriormente sequenciados. A montagem das sequências foi feita por meio programa BioEdit. Neste trabalho foi possível obter quatorze clones, com o sequenciamento realizado com os *primers* universal e reverso. Os dados obtidos do sequenciamento encontram-se nos APÊNDICES 1 e 2.

Para análise das sequências potenciais formadoras de Z-DNA, foram utilizados o programas *Z-Hunt* e *Z-Catcher*. O padrão de *cutoff* (mínimo) do Z-score para sequências com potencial formação de Z-DNA é de 700 (para o programa *Z-Hunt*) e -0,09 para o *Z-Catcher*.

Dos quatorze clones seqüenciados apenas quatro atendiam aos parâmetros de *Z-Hunt* e *Z-Catcher* ao mesmo tempo. Os dados das análises destes clones selecionados encontram-se na tabela 4.

Para identificar elementos repetitivos nas sequências dos clones com Z-Score >700, foi utilizado o programa *Repeat Masker*. Verificou-se que duas sequências, apresentavam elementos repetitivos, porém as sequências formadoras de Z não estavam nestas regiões; Zhou; Zhou e Xu (2009), em um estudo computacional, também observaram que as sequências potenciais formadoras de Z-DNA não seguem a ocorrência de elementos repetitivos em *Arabidopsis* e arroz, no estudo do genoma inteiro destas espécies. A tabela 4 também lista o tipo de repetições encontradas nos clones.

Tabela 4– Distribuição do tamanho, localização genômica, sequência potencial formadora de Z-DNA, Z-Score¹, σ ², das sequências preditas formadoras de Z-DNA segundo a Região Z obtida por CHIP, em experimento com células MCF-7.

Região Z	Tamanho (bp)	Cromossomo	Sequência potencial formadora de Z-DNA	Z Score	σ	Tipo de sequência repetitiva
Z5.1	199	Crom.12	TCAACGCGTGCGAGCTC	1387,04	-0,09	Rica em AT
Z7.2	565	Crom.1	CACATGCATGCAGGTACACACACACACACCCC	2452,36	-0,09	SINE/Alu
Z1.1	312	Crom.1	GACAGCAGAGCCTGGAAAGCAGTAG	1443,09	-0,09	-----
Z1	138	Crom. 1	ACACACACACACACACACGCGCACACACACT	70385,48	-0,07	-----

Nota: Para esta análise, foram retiradas as sequências putativas de contaminantes dos vetores.

¹Calculado pelo programa Z-Hunt, sendo o valor limite igual a 700.

²Calculado pelo programa Z-Catcher, sendo o intervalo aceitável entre -0,090 e -0,055.

4.4 Desenho de oligonucleotídeos para reações de amplificação *in vitro* de regiões formadoras de Z-DNA

Para verificar se houve recuperação diferencial dos clones obtidos na estratégia ChIP nas linhagens celulares MCF-7e A549, foram desenhados oligonucleotídeos para real Time PCR que seriam utilizados para amplificação das regiões obtidas por ChIP.

Com intuito de comparar com outras regiões potencial formadoras de Z, foram desenhados outros oligos que amplificariam regiões potenciais formadoras de Z-DNA cuja a busca foi efetuada *in silico* (utilizando-se sequências do genoma humano submetida ao programa Z-Hunt); ou com base em sequências descritas por Li et al., (2009), em um experimento de ChIP com células A549.

Também foram utilizados oligos para sítios do genoma humano que, ao serem submetidas aos programas de busca de regiões potenciais formadoras de Z-DNA não atingiram os critérios estabelecidos TNFalfa e hGAPDH.

A descrição dos oligos, a avaliação de amplificação da região formadora de Z-DNA, e o método de obtenção da sequência estão descritos na tabela 5. A tabela 6 descreve a anotação das regiões potenciais formadoras de Z-DNA.

Tabela 5 - Características dos oligonucleotídeos desenhados para os experimentos de PCR quantitativo em tempo real.

Região Z	Cromossomo	Oligonucleotídeo	Sequência	%GC	Potencial formação de Z-DNA e método de obtenção da região potencial formadora de Z-DNA
Z5.1	12	ChIP 5.1 <i>forward</i>	5' ACC CTA GTA AGA CCA AGC CCA CTC A 3'	52,0	Região com $\sigma = -0,09$
		ChIP 5.1 <i>reverse</i>	5' AGC GTG GTT CCG TTT GAT TTT TGT TTG 3'	40,7	Amplifica fragmento obtido por ChIP
Z7.2	1	ChIP 7.2r <i>forward</i>	5' AGC CCC GTC TCG TGC TTA 3'	61,0	Região com $\sigma = -0,09$
		ChIP 7.2r <i>reverse</i>	5' CTC CCG CAA CAC ACA CAA AC 3'	55,0	Amplifica fragmento obtido por ChIP
Z1.1	1	ChIP 1.1r <i>forward</i>	5' GGG GGA CAG CAG AGCCTG GAA 3'	66,6	Região com $\sigma = -0,09$
		ChIP 1.1r <i>reverse</i>	5' TGG TGT CTG AAC CCT GTC GTG CC 3'	60,8	Amplifica fragmento obtido por ChIP
Z4	4	Cromos. 4 <i>forward</i>	5' CTG TTC CTG CCC CCA CAG 3'	66,6	Região com $\sigma = -0,09$
		Cromos. 4 <i>reverse</i>	5' CAC CTC TTT CCC ACC ACC AG 3'	60,0	Amplifica fragmento por busca <i>in silico</i>
Z1	1	Cromos. 1 <i>forward</i>	5' GCG CAC ACA CAC ACT CCT TC 3'	60,0	Região com $\sigma = -0,07$
		Cromos. 1 <i>reverse</i>	5' GGT GCA GAC ATG ATT AGG AAA CC 3'	47,8	Amplifica fragmento obtido por ChIP
Z2	2	Cromos. 2 <i>forward</i>	5' GGA AAG ACG GTG CTG TGT GA 3'	55,0	Região com $\sigma = -0,09$
		Cromos. 2 <i>reverse</i>	5' CCA GAA AGG AGGG AGGT GGT GAG T 3'	54,5	Amplifica fragmento por busca <i>in silico</i>
Z22	22	Cromos. 22 <i>forward</i>	5' CTT CAT GGC AGC AGT TGG AC 3'	55,0	Região com $\sigma = -0,09$
		Cromos. 22 <i>reverse</i>	5' CTT CAT GGC AGC AGT TGG AC 3'	55,0	Amplifica fragmento descrito por Li et al (2009)
Z19	19	Cromos. 19 <i>forward</i>	5' GCC AAA CGC AGA AAA GCA A 3'	47,3	Região com $\sigma = -0,09$
		Cromos. 19 <i>reverse</i>	5' TGA ACG CAC ACA GCA CAG AG 3'	55,0	Amplifica fragmento descrito por Li et al (2009)
ZX	X	Cromos. X <i>forward</i>	5' GCC CCT GGA GTA GGA AGA AGA 3'	57,1	Região com $\sigma = -0,09$
		Cromos. X <i>reverse</i>	5' TGA GGA GGA ATG AGC AAG CA 3'	50,0	Amplifica fragmento descrito por Li et al (2009)
TNFalfa	6	TNF alfa <i>forward</i>	5' GTA CCT CAT CTA CTC CCA GGT CCT CT 3'	53,9	Região com Z score <700 e sem σ^1
		TNF alfa <i>reverse</i>	5' AGG AGG TTG ACC TTG GTC TG 3'	55,0	Gentilmente cedida por Laura Gonçalves (UnB)
hGAPDH	12	hGAPDH <i>forward</i>	5' CAA TTC CCC ATC TCA GTC GT 3'	50,0	Região com Z score <700 sem σ^1
		hGAPDH <i>reverse</i>	5' TAG TAG CCG GGC CCT ACT TT 3'	55,0	Oligo para análise ChIP (Sigma ®)

¹ O programa Z-Catcher não calculou σ para esta região.

Tabela 6- Anotação das sequências potenciais formadoras de Z-DNA, obtidas por experimentos de CHIP ou *in silico* amplificadas por Real Time PCR

Região Z	Localização citogenética	Região genômica (Accession number)	Anotação
Região intergênica			
Z5.1	12q23	NT_019546	Região 5' localiza-se à 18,5kb do gene que codifica proteína supressora de citocina de sinalização 2 (SOCS2) Região 3' localiza-se a 84,9kb do gene que codifica um domínio de CASP1 e RIPk1 que contém um adaptador para as vias de morte celular (CRADD)
Região intragênica			
Z7.2	1q32	NT_004487	Localiza-se no segundo íntron do gene TMCC2- que codifica a proteína cerebral n. 11
Região intergênica			
Z1.1	1p34.1	NT_032977	Região 5' localiza-se à 28,5kb do gene que codifica proteína WD repeat domínio 65 (WDR65) Região 3' localiza-se a 37,7kb do gene que codifica a proteína transmembrana 125 (TMEM125)
Região intragênica			
Z4	4q35	NT_022792.17	Localiza-se no 9° íntron do gene WWC2 (BOMB)
Região intergênica			
Z1	1q12	NT_113796.2	Região 5' localiza-se à 17,9kb do gene que codifica proteína similar a FLJ00310 Região 3' localiza-se a 117,3kb do gene que codifica uma proteína hipotética
Região intergênica			
Z2	2q37	NT_005403.16	Região 5' localiza-se à 8,8kb do gene que codifica a protomosina, isoforma alfa 2 (PTMA) Região 3' localiza-se a 11,2kb do gene da fosfodiesterase 6D (PDE6D)
Região intergênica			
Z22	22q11.2	NT_011519.10	Região 5' localiza-se à 37,6 kb do gene que codifica a proteína hipotética XP_002344230 Região 3' localiza-se a 11,8kb do gene 6 associado a Síndrome de DiGeorge (DGCR6)
Região intergênica			
Z19	19p11	NT_011109.15	Região 3' localiza-se a 1.963,7 kb do gene ubiquinol-citocromo c redutase (UQCRFS1)
Região intragênica			
ZX	Xq26	NT_011786.15	Localiza-se no íntron do gene da heparan sulfato 6-O-sulfotransferase 2, isoforma S (HS6ST2)

4.5 Teste de amplificação com oligonucleotídeos

Antes de se iniciar as análises de PCR em tempo real, foi feito um teste de amplificação dos oligonucleotídeos por meio de uma PCR convencional. Para realizar este teste utilizou-se amostra *input* proveniente de células MCF-7 provenientes do experimento de imunoprecipitação com uso de agente fixador.

A corrida em gel revelou fragmentos de tamanho esperado para todos os oligonucleotídeos (aproximadamente 100 pb).

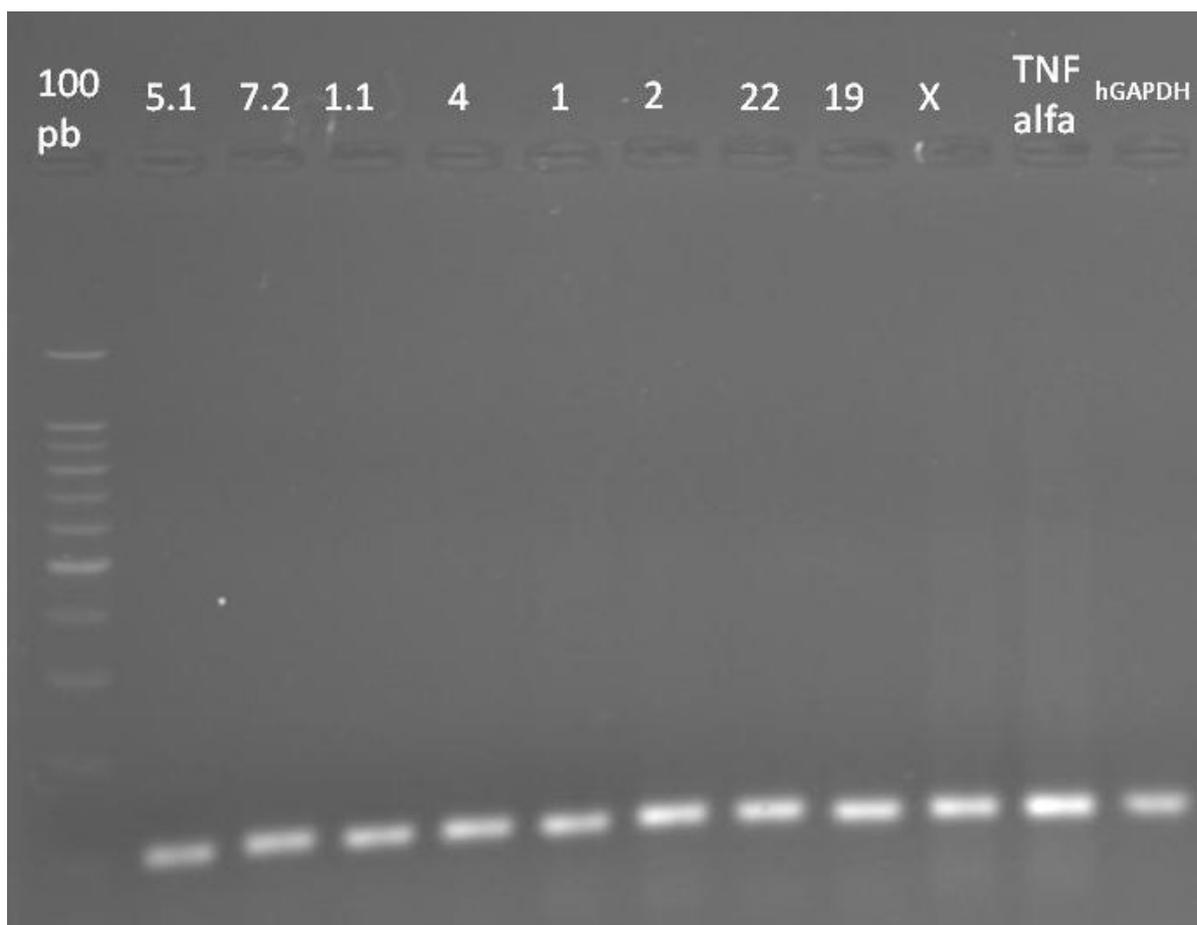


Figura 14- Análise eletroforética em gel de agarose a 1% do teste da amplificação dos oligonucleotídeos. Na primeira raia foi aplicado o marcador 100pb (Promega). Os números na parte superior indicam os pares de oligonucleotídeos descritos na tabela 5.

4.6 PCR em tempo real para quantificação do enriquecimento da cromatina recuperada

Para comparar o enriquecimento da cromatina produzido por ChIP, com uso de anticorpo anti Z-DNA, em diferentes regiões genômicas com Z score > 700 em relação ao controle hGAPDH (região com Z score <700) e entre duas regiões com Z score <700 (TNF alfa e hGPAH), nas linhagens MCF-7 e A549, foi calculada a estatística descritiva de três experimentos independentes de imunoprecipitação de cromatina nativa ou com uso de agente fixador, e as comparações foram realizadas por meio do teste H de Kruskal-Wallis com pós teste de Dunn. Os resultados, expressos por meio de gráficos com média e erro padrão da média, estão expressos nas figuras 15 (somente oligos obtidos por análise de seqüenciamento com os fragmentos obtidos por ChIP comparados com o controle negativo); 16 (somente com oligos construídos por informações das regiões Z obtidas por análise computacional ou pela literatura comparados com o controle negativo) e 17 (comparação entre os controles negativos).

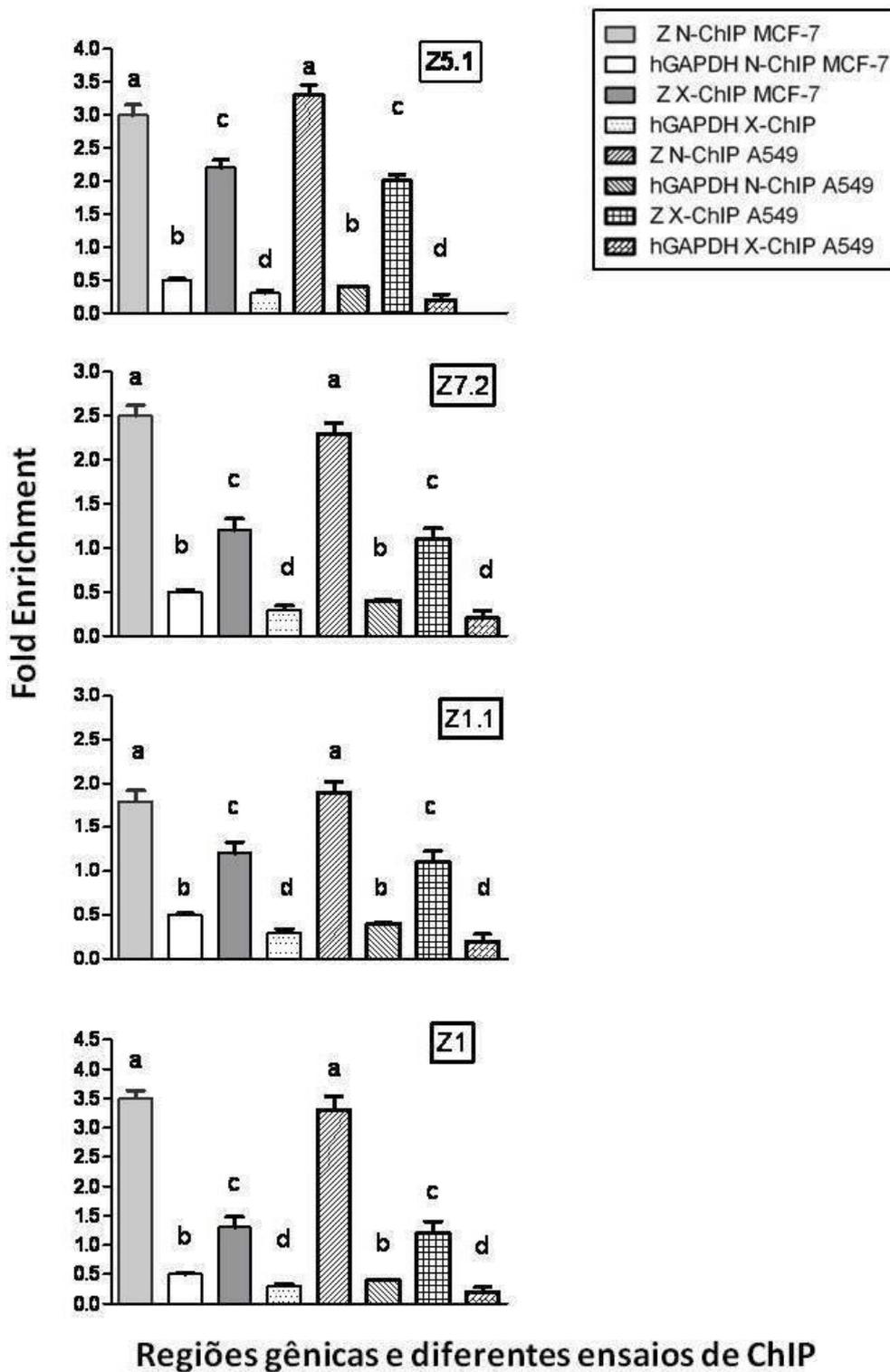
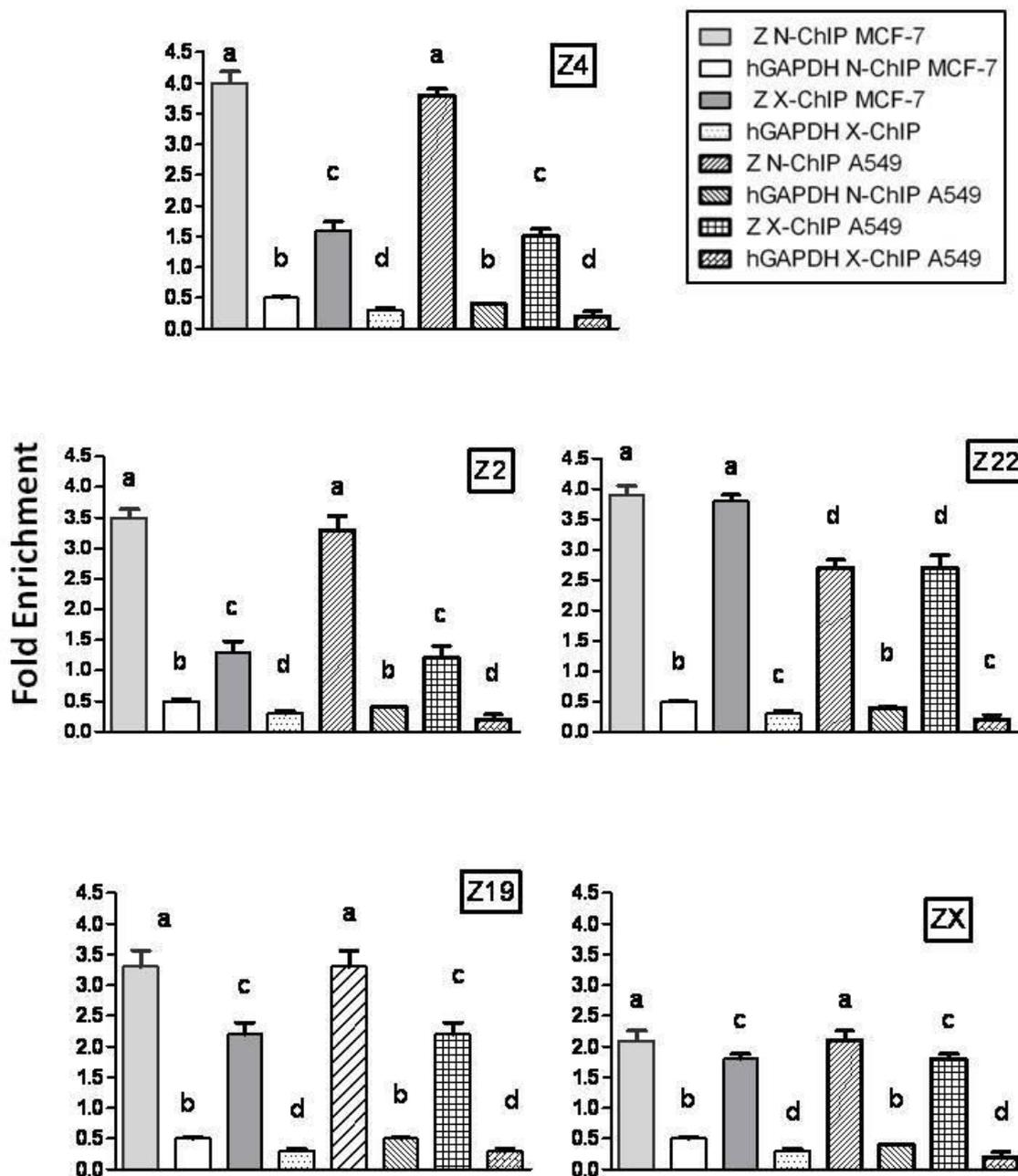


Figura 15- Fragmentos ChIP de regiões gênicas potenciais formadoras de Z-DNA são recuperados significativamente por ChIP quando comparados com a amplificação da sequência controle negativo (hGAPDH). Distribuição das regiões gênicas potenciais formadoras de Z-DNA (5.1,7.2,1.1 e 1), obtidas após análise de seqüenciamento dos fragmentos ChIP e diferentes ensaios de ChIP segundo o *fold enrichment*. As barras representam a média e o erro padrão da média. Em cada gráfico, as quatro primeiras barras representam o experimento realizado em células MCF-7, e as quatro últimas, nas células A549. Letras minúsculas diferentes representam diferença estatística ($p < 0,05$). X-ChIP: amostra obtida por ChIP com uso de fixador; N-ChIP: amostra obtida por ChIP sem o uso de agente fixador.



Regiões gênicas e diferentes ensaios de ChIP

Figura 16- Fragmentos ChIP de regiões gênicas potenciais formadoras de Z-DNA são recuperados significativamente por ChIP quando comparados com a amplificação da sequência controle negativo (hGAPDH). Distribuição das regiões gênicas potenciais formadoras de Z-DNA (4,2, 22, 19 e X), cujos oligos foram desenhados por informação de regiões Z extraída da literatura (Li et al, 2009) ou por análise computacional e diferentes ensaios ChIP de segundo o *fold enrichment*. As barras representam a média e o erro padrão da média. Em cada gráfico, as quatro primeiras barras representam o experimento realizado em células MCF-7, e as quatro últimas, nas células A549. Letras minúsculas diferentes representam diferença estatística ($p < 0,05$). X-ChIP: amostra obtida por ChIP com uso de fixador; N-ChIP: amostra obtida por ChIP sem o uso de agente fixador.

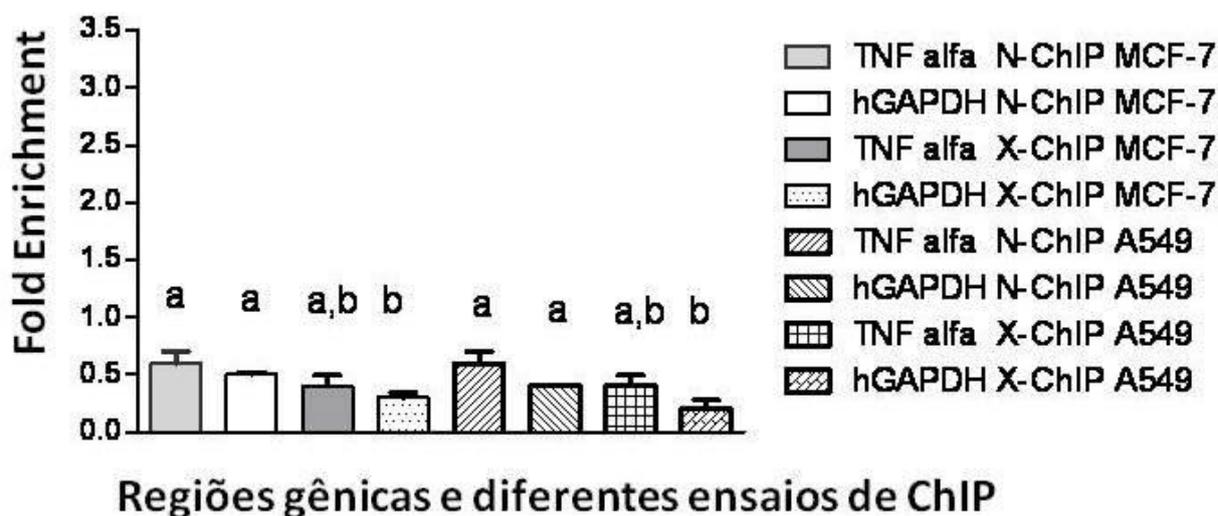


Figura 17- Fragmentos CHIP de regiões gênicas sem potencial formação de Z-DNA predita não são recuperadas após CHIP. Distribuição das regiões gênicas TNF alfa e hGAPDH em diferentes ensaios ChIP de segundo o *fold enrichment*. As barras representam a média e o erro padrão da média. Em cada gráfico, as quatro primeiras barras representam o experimento realizado em células MCF-7, e as quatro últimas, nas células A549. Letras minúsculas diferentes representam diferença estatística ($p < 0,05$). X-ChIP: amostra obtida por CHIP com uso de fixador; N-ChIP: amostra obtida por CHIP sem o uso de agente fixador.

A análise dos dados revelou que todas as regiões genômicas preditas serem formadoras de Z-DNA tiveram enriquecimento superior a 1, e indica que a imunoprecipitação de cromatina eficientemente recuperou as regiões potenciais formadoras de Z-DNA. Por outro lado, foi possível observar que regiões com Z score inferiores a 700 não obtiveram enriquecimento (valores inferiores a 1), o que pode ser um indício que o anticorpo utilizado no ensaio de ChIP ligou-se preferencialmente a regiões formadoras de Z-DNA.

Também foi possível observar que, de maneira geral, o experimento de ChIP nativo obteve um enriquecimento da cromatina superior aquele que utiliza um agente fixador. Jackson et al (1988) relataram que em *Drosophila*, experimentos para identificar presença de Z-DNA em cromossomos politênicos tem resultados de identificação alterada, quando o formaldeído é utilizado. Provavelmente, o formaldeído induz ligação de outras proteínas que se ligam ao Z-DNA, desfavorecendo a ligação do anticorpo anti Z-DNA ao alvo.

A estratégia utilizada por Li et al (2009) para obtenção de sequências de Z-DNA envolveu um experimento de imunoprecipitação de cromatina com uso de agente fixador, seguido pelo reconhecimento a região Z-DNA por intermédio de um domínio ligante a DNA Z alfa em células A549. Neste experimento, os pesquisadores obtiveram 186 sequências formadoras de Z-DNA. Porém é válido ressaltar que a aplicação do agente fixador, anterior a proteína que reconhece a conformação Z pode alterar a conformação do Z-DNA (Jackson et al, 1988). Este cuidado foi considerado em nosso delineamento experimental, e mesmo assim, foi possível amplificar as quatro regiões selecionadas descritas pelos pesquisadores.

A exceção a esta diferença entre os experimentos - com a presença e sem a presença de agente fixador - ocorreu em relação ao par de oligos Z22. Esta região corresponde ao gene *DGCR2*, associada a síndrome de DiGeorge, causada por microdeleção no braço longo do cromossomo 22. Possivelmente, essa região seja uma fortemente potencial formadora de Z-DNA, independente do

tratamento realizado nas células. A associação de regiões do genoma com deleção e presença de Z-DNA já vem sendo discutida na literatura. Foi observado que a formação de Z-DNA tem sido estimulada pela recombinação homóloga pela liberação do nível de superenovelamento do DNA em células humanas em cultura. A formação de Z-DNA pode induzir pequenas deleções em bactérias (Freund, Bichara e Fuchs, 1989) e também em células de mamíferos; porém em mamíferos, preferencialmente ocorrem mutações larga escala. Estudos realizados por (Wang e Vasquez, 2006) sugerem que a formação de Z-DNA pode ser um fator de risco para a translocações gênicas encontradas em leucemias e linfomas e que certas condições celulares como a ativação da transcrição também podem ser correlacionadas a instabilidade genética provocada pelo Z-DNA.

Por outro lado, um estudo realizado por (Champ *et al.*, 2004) verificou a correlação entre a presença de regiões que possuem sítios de ligação do fator de transcrição NFI e regiões formadoras de Z-DNA. Neste estudo foi descrita a região do gene *DGCR2*, encontrada também no estudo descrito por (Li *et al.*, 2009).

Outras regiões estudadas neste trabalho estão relacionadas com pontos quentes de mutação cromossômica que foram associados a doenças.

A região Z7.2 está localizada na região 1q32- esta região está relacionada com a síndrome de Van der Woud (Lees *et al.*, 1999), já a região Z1 , está localizada em 1q22, nesta região foi descrito uma instabilidade genética associada ao linfoma non-Hodgkin de células B (Itoyama *et al.*, 2002).

Os dados mostraram também que diferentes regiões formadoras de Z-DNA foram recuperadas diferencialmente em relação a outras regiões. Este fato pode ser constatado quando se compara os resultados da PCR quantitativa das regiões cujos oligos foram obtidos por análise do resultado do seqüenciamento de fragmentos obtidos pela estratégia ChIP. O *fold enrichment* foi menor na região Z 1.1 e superior na região Z1. Possivelmente, as regiões com maiores *fold enrichment* tem um maior potencial de formação de Z-DNA, e especialmente a análise

computacional destas duas regiões mostra que a região Z1 possui maior Z-score ($Z=70385,3$) que a região Z1.1 ($Z= 1443,09$).

Outro dado importante foi a presença de Z-DNA em região intrônica de um gene que codifica uma proteína cerebral (*TMCC2*), localizado no cromossomo 1. Estudos envolvendo alguns genes com informação para proteínas expressas no hipocampo envolvidas na Doença de Alzheimer (AD) apontam a presença de Z-DNA na região promotora de genes associados a doença, como o que codificam a proteína precursora amilóide, a Presenilina e a ApoE (Vasudevaraju *et al.*, 2008). Porém, todos os mecanismos que correlacionam o Z-DNA com a presença da doença ainda permanecem não esclarecidos, e podem até estarem relacionados à presença de alumínio, sintoma da DA, que estabiliza Z-DNA.

Um estudo envolvendo a expressão do gene *UQCERS1* (cromossomo 19) mostrou que a expressão deste gene parece estar envolvida com o câncer de mama agressivo. No nosso estudo, a linhagem utilizada MCF-7 trata-se de um câncer não agressivo (Ohashi *et al.*, 2004), e encontrou-se formação de Z-DNA em sua região intrônica. Seria interessante futuramente executar estudos comparando o nível de formação de Z-DNA, entre duas linhagens uma de câncer de mama agressivo (por exemplo, a MDA-MB231) e a MCF-7.

4.7 A imunoprecipitação de cromatina recuperou fragmentos de diferentes tamanhos

Como o número de clones obtidos pela clonagem direta dos fragmentos de imunoprecipitação de cromatina foi abaixo do esperado, tentou-se amplificar a quantidade de material obtido pela estratégia de LM-PCR.

O DNA das células MCF-7 imunoprecipitado com o fragmento de anticorpo anti Z-DNA foi utilizado na PCR para amplificação das regiões formadoras de Z-DNA (figura 18). Também foi utilizado fragmentos imunoprecipitados com o anticorpo anti-histona H3 (controle positivo).

Pela corrida em gel de agarose, foi possível observar que foram produzidos fragmentos de diferentes tamanhos, porém uma grande quantidade desses fragmentos tinham 200 pb, o que condiz com um tamanho produzido por uma fragmentação do material nuclear por sonicação (Spencer *et al.*, 2003). Como esperado, não houve amplificação da amostra resultante de CHIP na ausência de anticorpo (controle negativo).

O experimento aqui descrito trata-se dos resultados obtidos a partir de células MCF-7, utilizando-se a estratégia de X-ChIP. O mesmo perfil foi encontrado para as células A549 (dados não mostrados). Porém, não foi possível obter resultados a partir da estratégia de imunoprecipitação de cromatina nativa, para qualquer uma das linhagens.

Futuramente, estes fragmentos amplificados serão analisados em um seqüenciamento em larga escala (ChIP-Seq)

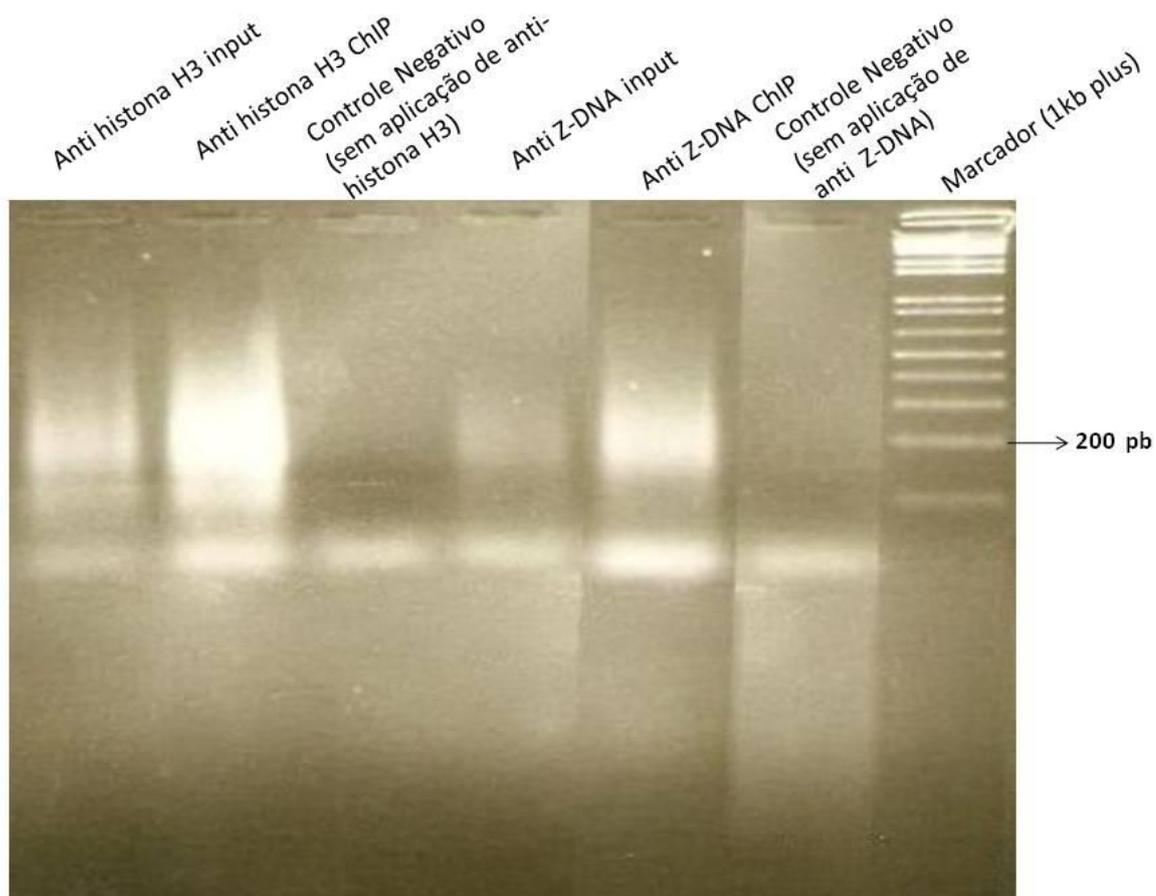


Figura 18- Análise eletroforética em gel de agarose a 1% da amplificação, por LM-PCR dos fragmentos de Z-DNA obtidos por CHIP. Corrida em gel de agarose a 1%. No último poço do gel mostrado verifica-se o marcador molecular 1kb plus da Invitrogen. No Gel foi aplicado 1/10 do volume final obtido da PCR.

Conclusão e Perspectiva

5 CONCLUSÃO E PERSPECTIVA

Como resultado geral deste trabalho, foram obtidas sequências de Z-DNA em células MCF-7 e A549. Estas sequências foram anotadas e a recuperação dos fragmentos pela estratégia de imunoprecipitação de cromatina foi quantificada por PCR quantitativo em tempo real.

De maneira geral foi possível observar que independentemente do tipo celular (MCF-7 ou A549) a recuperação da cromatina conformação Z imunoprecipitada é quantitativamente equivalente; e, experimentos com imunoprecipitação de cromatina nativa recuperam uma maior quantidade de cada sequência formadora de Z-DNA que experimentos que utilizam agentes fixadores. Os valores diferenciados do *fold enrichment* entre as diferentes regiões Z parecem reforçar que a formação de Z-DNA é região específica.

Também foi possível verificar regiões já descritas claramente na literatura como potencial formadora de Z-DNA, como é o caso da região Z22, porém uma região levantada exclusivamente neste trabalho (a Z7.2) parece estar reforçando a participação do Z-DNA em vias de proteínas cerebrais.

Portanto, uma tecnologia para recuperação de Z-DNA, em células não submetidas a tratamento, foi estabelecida; porém poucas sequências foram estudadas. Estes dados sugerem a presença de sequências potenciais formadoras de Z-DNA que podem ser investigadas como potenciais elementos regulatórios. Posteriormente, as amostras serão submetidas a tecnologia CHIP-Seq, e espera-se que um número maior de sequências seja obtidos, e assim contribuir para a elucidação da participação do Z-DNA nas vias biológicas.

Referências Bibliográficas

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BEATTIE, E. et al. Host-range restriction of vaccinia virus E3L-specific deletion mutants. **Virus Genes**, v. 12, n. 1, p. 89-94, 1996.

BEHE, M.; FELSENFELD, G. Effects of methylation on a synthetic polynucleotide: the B \rightarrow Z transition in poly(dG-m5dC).poly(dG-m5dC). **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 78, n. 3, p. 1619-23, Mar 1981.

BOEHM, T. et al. Alternating purine-pyrimidine tracts may promote chromosomal translocations seen in a variety of human lymphoid tumours. **EMBO J**, v. 8, n. 9, p. 2621-31, Sep 1989.

BORDE, V.; DUGUET, M. The mapping of DNA topoisomerase sites in vivo: a tool to enlight the functions of topoisomerases. **Biochimie**, v. 80, n. 3, p. 223-33, Mar 1998.

BOWATER, R. P.; WELLS, R. D. The intrinsically unstable life of DNA triplet repeats associated with human hereditary disorders. **Prog Nucleic Acid Res Mol Biol**, v. 66, p. 159-202, 2001.

BRANDT, T. et al. The N-terminal domain of the vaccinia virus E3L-protein is required for neurovirulence, but not induction of a protective immune response. **Virology**, v. 333, n. 2, p. 263-70, Mar 15 2005.

BRANDT, T. A.; JACOBS, B. L. Both carboxy- and amino-terminal domains of the vaccinia virus interferon resistance gene, E3L, are required for pathogenesis in a mouse model. **J Virol**, v. 75, n. 2, p. 850-6, Jan 2001.

BRIGIDO, M. M.; STOLLAR, B. D. Two induced anti-Z-DNA monoclonal antibodies use VH gene segments related to those of anti-DNA autoantibodies. **J Immunol**, v. 146, n. 6, p. 2005-9, Mar 15 1991.

BUESA, R. J. Histology without formalin? **Ann Diagn Pathol**, v. 12, n. 6, p. 387-96, Dec 2008.

CHAMP, P. C. et al. Distributions of Z-DNA and nuclear factor I in human chromosome 22: a model for coupled transcriptional regulation. **Nucleic Acids Res**, v. 32, n. 22, p. 6501-10, 2004.

DAHL, J. A.; COLLAS, P. Q2ChIP, a quick and quantitative chromatin immunoprecipitation assay, unravels epigenetic dynamics of developmentally regulated genes in human carcinoma cells. **Stem Cells**, v. 25, n. 4, p. 1037-46, Apr 2007.

_____. MicroChIP--a rapid micro chromatin immunoprecipitation assay for small cell samples and biopsies. **Nucleic Acids Res**, v. 36, n. 3, p. e15, Feb 2008.

EDMONDSON, D. G. et al. Site-specific loss of acetylation upon phosphorylation of histone H3. **J Biol Chem**, v. 277, n. 33, p. 29496-502, Aug 16 2002.

ELLISON, M. J. et al. Sequence-dependent energetics of the B-Z transition in supercoiled DNA containing nonalternating purine-pyrimidine sequences. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 82, n. 24, p. 8320-4, Dec 1985.

FEIGON, J. et al. Z-DNA forms without an alternating purine-pyrimidine sequence in solution. **Science**, v. 230, n. 4721, p. 82-4, Oct 4 1985.

FREUND, A. M.; BICHARA, M.; FUCHS, R. P. Z-DNA-forming sequences are spontaneous deletion hot spots. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 86, n. 19, p. 7465-9, Oct 1989.

FU, Y. et al. Cloning of DLM-1, a novel gene that is up-regulated in activated macrophages, using RNA differential display. **Gene**, v. 240, n. 1, p. 157-63, Nov 15 1999.

GAGNA, C. E.; LAMBERT, W. C. The halting arrival of left-handed Z-DNA. **Med Hypotheses**, v. 60, n. 3, p. 418-23, Mar 2003.

GRAHAM, F. L.; VAN DER EB, A. J. Transformation of rat cells by DNA of human adenovirus 5. **Virology**, v. 54, n. 2, p. 536-9, Aug 1973.

GREGORY, R. I. et al. DNA methylation is linked to deacetylation of histone H3, but not H4, on the imprinted genes *Snrpn* and *U2af1-rs1*. **Mol Cell Biol**, v. 21, n. 16, p. 5426-36, Aug 2001.

HANIFORD, D. B.; PULLEYBLANK, D. E. Facile transition of poly[d(TG) x d(CA)] into a left-handed helix in physiological conditions. **Nature**, v. 302, n. 5909, p. 632-4, Apr 14 1983.

HANLON, S. E.; LIEB, J. D. Progress and challenges in profiling the dynamics of chromatin and transcription factor binding with DNA microarrays. **Curr Opin Genet Dev**, v. 14, n. 6, p. 697-705, Dec 2004.

HANSFORD, J. R.; MULLIGAN, L. M. Multiple endocrine neoplasia type 2 and RET: from neoplasia to neurogenesis. **J Med Genet**, v. 37, n. 11, p. 817-27, Nov 2000.

HARING, M. et al. Chromatin immunoprecipitation: optimization, quantitative analysis and data normalization. **Plant Methods**, v. 3, p. 11, 2007.

HAWKINS, R. D.; REN, B. Genome-wide location analysis: insights on transcriptional regulation. **Hum Mol Genet**, v. 15 Spec No 1, p. R1-7, Apr 15 2006.

HECHT, J. L.; ASTER, J. C. Molecular biology of Burkitt's lymphoma. **J Clin Oncol**, v. 18, n. 21, p. 3707-21, Nov 1 2000.

HO, P. S. et al. A computer aided thermodynamic approach for predicting the formation of Z-DNA in naturally occurring sequences. **EMBO J**, v. 5, n. 10, p. 2737-44, Oct 1986.

HUANG, J. M. et al. An improved cloning strategy for chromatin-immunoprecipitation-derived DNA fragments. **Anal Biochem**, v. 356, n. 1, p. 145-7, Sep 1 2006.

ITOYAMA, T. et al. Molecular cytogenetic analysis of genomic instability at the 1q12-22 chromosomal site in B-cell non-Hodgkin lymphoma. **Genes Chromosomes Cancer**, v. 35, n. 4, p. 318-28, Dec 2002.

JACKSON, D. A.; YUAN, J.; COOK, P. R. A gentle method for preparing cyto- and nucleo-skeletons and associated chromatin. **J Cell Sci**, v. 90 (Pt 3), p. 365-78, Jul 1988.

JOHNSTON, B. H.; OHARA, W.; RICH, A. Stochastic distribution of a short region of Z-DNA within a long repeated sequence in negatively supercoiled plasmids. **J Biol Chem**, v. 263, n. 10, p. 4512-5, Apr 5 1988.

JORDAN, M.; SCHALLHORN, A.; WURM, F. M. Transfecting mammalian cells: optimization of critical parameters affecting calcium-phosphate precipitate formation. **Nucleic Acids Res**, v. 24, n. 4, p. 596-601, Feb 15 1996.

KIM, Y. G. et al. Evidence that vaccinia virulence factor E3L binds to Z-DNA in vivo: Implications for development of a therapy for poxvirus infection. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 101, n. 6, p. 1514-8, Feb 10 2004.

_____. A role for Z-DNA binding in vaccinia virus pathogenesis. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 100, n. 12, p. 6974-9, Jun 10 2003.

_____. A peptide with alternating lysines can act as a highly specific Z-DNA binding domain. **Nucleic Acids Res**, v. 34, n. 17, p. 4937-42, 2006.

KOERIS, M. et al. Modulation of ADAR1 editing activity by Z-RNA in vitro. **Nucleic Acids Res**, v. 33, n. 16, p. 5362-70, 2005.

KUO, M. H.; ALLIS, C. D. In vivo cross-linking and immunoprecipitation for studying dynamic Protein:DNA associations in a chromatin environment. **Methods**, v. 19, n. 3, p. 425-33, Nov 1999.

KWON, J. A.; RICH, A. Biological function of the vaccinia virus Z-DNA-binding protein E3L: gene transactivation and antiapoptotic activity in HeLa cells. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 102, n. 36, p. 12759-64, Sep 6 2005.

LAFER, E. M. et al. Antibodies specific for left-handed Z-DNA. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 78, n. 6, p. 3546-50, Jun 1981.

_____. Z-DNA-specific antibodies in human systemic lupus erythematosus. **J Clin Invest**, v. 71, n. 2, p. 314-21, Feb 1983.

LEES, M. M. et al. Popliteal pterygium syndrome: a clinical study of three families and report of linkage to the Van der Woude syndrome locus on 1q32. **J Med Genet**, v. 36, n. 12, p. 888-92, Dec 1999.

LI, H. et al. Human genomic Z-DNA segments probed by the Z alpha domain of ADAR1. **Nucleic Acids Res**, v. 37, n. 8, p. 2737-46, May 2009.

LIQUIER, J. et al. Spectroscopic studies of conformational transitions in double stranded DNAs in the presence of carcinogenic nickel compounds and an antitumoral drug (SOAZ). **Anticancer Res**, v. 4, n. 1-2, p. 41-4, Jan-Apr 1984.

LIU, R. et al. Regulation of CSF1 promoter by the SWI/SNF-like BAF complex. **Cell**, v. 106, n. 3, p. 309-18, Aug 10 2001.

MARTONE, R. et al. Distribution of NF-kappaB-binding sites across human chromosome 22. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 100, n. 21, p. 12247-52, Oct 14 2003.

MELKONYAN, H.; SORG, C.; KLEMP, M. Electroporation efficiency in mammalian cells is increased by dimethyl sulfoxide (DMSO). **Nucleic Acids Res**, v. 24, n. 21, p. 4356-7, Nov 1 1996.

MOLLER, A. et al. Monoclonal antibodies recognize different parts of Z-DNA. **J Biol Chem**, v. 257, n. 20, p. 12081-5, Oct 25 1982.

MORANGE, M. What history tells us IX. Z-DNA: when nature is not opportunistic. **J Biosci**, v. 32, n. 4, p. 657-61, Jun 2007.

NORDHEIM, A. et al. Antibodies to left-handed Z-DNA bind to interband regions of Drosophila polytene chromosomes. **Nature**, v. 294, n. 5840, p. 417-22, Dec 3 1981.

_____. Analysis of Z-DNA in fixed polytene chromosomes with monoclonal antibodies that show base sequence-dependent selectivity in reactions with supercoiled plasmids and polynucleotides. **J Biol Chem**, v. 261, n. 1, p. 468-76, Jan 5 1986.

NOWAK, D. E.; TIAN, B.; BRASIER, A. R. Two-step cross-linking method for identification of NF-kappaB gene network by chromatin immunoprecipitation. **Biotechniques**, v. 39, n. 5, p. 715-25, Nov 2005.

O'NEILL, L. P.; TURNER, B. M. Immunoprecipitation of native chromatin: NChIP. **Methods**, v. 31, n. 1, p. 76-82, Sep 2003.

OH, D. B.; KIM, Y. G.; RICH, A. Z-DNA-binding proteins can act as potent effectors of gene expression in vivo. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 99, n. 26, p. 16666-71, Dec 24 2002.

OHASHI, Y. et al. Ubiquinol cytochrome c reductase (UQCRC1) gene amplification in primary breast cancer core biopsy samples. **Gynecol Oncol**, v. 93, n. 1, p. 54-8, Apr 2004.

ORLANDO, V. Mapping chromosomal proteins in vivo by formaldehyde-crosslinked-chromatin immunoprecipitation. **Trends Biochem Sci**, v. 25, n. 3, p. 99-104, Mar 2000.

ORLANDO, V.; STRUTT, H.; PARO, R. Analysis of chromatin structure by in vivo formaldehyde cross-linking. **Methods**, v. 11, n. 2, p. 205-14, Feb 1997.

POHL, F. M.; JOVIN, T. M. Salt-induced co-operative conformational change of a synthetic DNA: equilibrium and kinetic studies with poly (dG-dC). **J Mol Biol**, v. 67, n. 3, p. 375-96, Jun 28 1972.

PUPPO, F. et al. Comparative genomic sequence analysis coupled to chromatin immunoprecipitation: a screening procedure applied to search for regulatory elements at the RET locus. **Physiol Genomics**, v. 23, n. 3, p. 269-74, Nov 17 2005.

- QUILICI, L. S. **Estudo de elementos moduladores da expressão gênica em diferentes linhagens de células de mamífero**. 2008. 132 Dissertação (Mestrado). Departamento de Biologia Celular, Universidade de Brasília, Brasília.
- REN, B. et al. Genome-wide location and function of DNA binding proteins. **Science**, v. 290, n. 5500, p. 2306-9, Dec 22 2000.
- RICH, A.; ZHANG, S. Timeline: Z-DNA: the long road to biological function. **Nat Rev Genet**, v. 4, n. 7, p. 566-72, Jul 2003.
- ROTHENBURG, S. et al. Complex regulation of the human gene for the Z-DNA binding protein DLM-1. **Nucleic Acids Res**, v. 30, n. 4, p. 993-1000, Feb 15 2002.
- SABOURIN, M. et al. Yeast recombination pathways triggered by topoisomerase II-mediated DNA breaks. **Nucleic Acids Res**, v. 31, n. 15, p. 4373-84, Aug 1 2003.
- SADOFSKY, M. J. The RAG proteins in V(D)J recombination: more than just a nuclease. **Nucleic Acids Res**, v. 29, n. 7, p. 1399-409, Apr 1 2001.
- SANFORD, D. G.; STOLLAR, B. D. Characterization of anti-Z-DNA antibody binding sites on Z-DNA by nuclear magnetic resonance spectroscopy. **J Biol Chem**, v. 265, n. 30, p. 18608-14, Oct 25 1990.
- SCHWARTZ, T. et al. Structure of the DLM-1-Z-DNA complex reveals a conserved family of Z-DNA-binding proteins. **Nat Struct Biol**, v. 8, n. 9, p. 761-5, Sep 2001.
- SOLOMON, M. J.; LARSEN, P. L.; VARSHAVSKY, A. Mapping protein-DNA interactions in vivo with formaldehyde: evidence that histone H4 is retained on a highly transcribed gene. **Cell**, v. 53, n. 6, p. 937-47, Jun 17 1988.
- SPENCER, V. A. et al. Chromatin immunoprecipitation: a tool for studying histone acetylation and transcription factor binding. **Methods**, v. 31, n. 1, p. 67-75, Sep 2003.
- SUKA, N. et al. Highly specific antibodies determine histone acetylation site usage in yeast heterochromatin and euchromatin. **Mol Cell**, v. 8, n. 2, p. 473-9, Aug 2001.
- SURAM, A. et al. First evidence to show the topological change of DNA from B-DNA to Z-DNA conformation in the hippocampus of Alzheimer's brain. **Neuromolecular Med**, v. 2, n. 3, p. 289-97, 2002.
- TAKAHASHI, K. et al. Promoter polymorphism of SLC11A1 (formerly NRAMP1) confers susceptibility to autoimmune type 1 diabetes mellitus in Japanese. **Tissue Antigens**, v. 63, n. 3, p. 231-6, Mar 2004.
- THANDLA, S. P. et al. ETV6-AML1 translocation breakpoints cluster near a purine/pyrimidine repeat region in the ETV6 gene. **Blood**, v. 93, n. 1, p. 293-9, Jan 1 1999.
- THOMSON, S.; CLAYTON, A. L.; MAHADEVAN, L. C. Independent dynamic regulation of histone phosphorylation and acetylation during immediate-early gene induction. **Mol Cell**, v. 8, n. 6, p. 1231-41, Dec 2001.

VASUDEVARAJU, P. et al. Role of DNA dynamics in Alzheimer's disease. **Brain Res Rev**, v. 58, n. 1, p. 136-48, Jun 2008.

WANG, A. H. et al. Molecular structure of a left-handed double helical DNA fragment at atomic resolution. **Nature**, v. 282, n. 5740, p. 680-6, Dec 13 1979.

WANG, G.; VASQUEZ, K. M. Non-B DNA structure-induced genetic instability. **Mutat Res**, v. 598, n. 1-2, p. 103-19, Jun 25 2006.

_____. Z-DNA, an active element in the genome. **Front Biosci**, v. 12, p. 4424-38, 2007.

WEINMANN, A. S. et al. Use of chromatin immunoprecipitation to clone novel E2F target promoters. **Mol Cell Biol**, v. 21, n. 20, p. 6820-32, Oct 2001.

WEINMANN, A. S.; FARNHAM, P. J. Identification of unknown target genes of human transcription factors using chromatin immunoprecipitation. **Methods**, v. 26, n. 1, p. 37-47, Jan 2002.

WITTIG, B.; DORBIC, T.; RICH, A. The level of Z-DNA in metabolically active, permeabilized mammalian cell nuclei is regulated by torsional strain. **J Cell Biol**, v. 108, n. 3, p. 755-64, Mar 1989.

_____. Transcription is associated with Z-DNA formation in metabolically active permeabilized mammalian cell nuclei. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 88, n. 6, p. 2259-63, Mar 15 1991.

WITTIG, B. et al. Transcription of human c-myc in permeabilized nuclei is associated with formation of Z-DNA in three discrete regions of the gene. **EMBO J**, v. 11, n. 12, p. 4653-63, Dec 1992.

WOLFL, S.; WITTIG, B.; RICH, A. Identification of transcriptionally induced Z-DNA segments in the human c-myc gene. **Biochim Biophys Acta**, v. 1264, n. 3, p. 294-302, Dec 27 1995.

WU, J. et al. ChIP-chip comes of age for genome-wide functional analysis. **Cancer Res**, v. 66, n. 14, p. 6899-902, Jul 15 2006.

ZENG, P. Y. et al. In vivo dual cross-linking for identification of indirect DNA-associated proteins by chromatin immunoprecipitation. **Biotechniques**, v. 41, n. 6, p. 694, 696, 698, Dec 2006.

ZHANG, Y.; ROWLEY, J. D. Chromatin structural elements and chromosomal translocations in leukemia. **DNA Repair (Amst)**, v. 5, n. 9-10, p. 1282-97, Sep 8 2006.

ZHOU, C.; ZHOU, F.; XU, Y. Comparative analyses of distributions and functions of Z-DNA in Arabidopsis and rice. **Genomics**, v. 93, n. 4, p. 383-91, Apr 2009.

ZWELLING, L. A.; KERRIGAN, D.; LIPPMAN, M. E. Protein-associated intercalator-induced DNA scission is enhanced by estrogen stimulation in human breast cancer cells. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 80, n. 20, p. 6182-6, Oct 1983.

APÊNDICE 1

Sequências de clones obtidos pela estratégia ChIP que obtiveram Z score inferior a 700 e foram excluídos da validação por Real time PCR

>clone16r similar a ref|NT_008470.19|:38317019-38317354 Homo sapiens chromosome 9 genomic contig, GRCh37 reference primary assembly

TCAAAAAATTTCTGTCGTCAAGTGATACATGACTGTATATACACAACACTTTGCATCAGCTTAGAAGCTGAAGCT
GGGTTTGCATTAGGTCTCGATGAAGGTAGGCATATTAGAGTTTAAATAGAAGATAAATAATGGACCAAGACTG
GAGCTATTGGGTGGTCAGTATGAGAGAGGGGGCAAGAGTTGTGAGGGAGAGAGCTGTGAGACACGGCCCA
TTAACCAAACATGTAGTATCAGAGAGCAAAGGAGAAGAGGGGAATGCTGAGTGGTCAAGATATGTCCAGGCA
TTATGACACCTAAATAAAGGCTTTGAGGAGGGGAAAACACTAACTA

>clone 28r similar a ref|NT_022184.15|:67528731-67529319 Homo sapiens chromosome 2 genomic contig, GRCh37 reference primary assembly

GATCAAAGTGGCTTGGCCTCCCAGCCTACATCTTTTTCCCATGCTGGATGCTTCCTGCCCTCAAACATCGGACT
CCAAGTTCTTCAGCTTTAGAACTTGGACTGGCTTCCTTGCTCCTCAGCTTGCAGATGGACTATTCTAGAACCTG
TGATTGTGTAAGTTAATACTCCTTAATCAATTCCCCTTTTTATATACATCTATCCTATTAGTTCTGTCCCTCTAAAGA
ACCCTGACAGCCAGGCAAGGTGGCTCACGCCTGTAATCCCAGCACTTTGGGAGGCCAAGGCAGGTGGATCA
CCTGAGGTCAGGAGTTCGAGACCAGCCTTACCAACATTGTGAAATCCTGTCTCTACTAAAATAGTCGGAGGT
TGCAGTGAGCTGCGATTGCACCACTGCACTCTAGCCTGGGTGACAGAGCGAGACTCCATCTCAAACAACAA
CAAAGCCCCAAAAACAAAACAAAAGAGTAGCACCTCTAAAATATGACTCCATAGAACAGCAATAGAAAAGGT
ACTCAAAGCTTTGAAATCCTGAGTTCCTTAATTTGGTCCTCAGGAATTTGGTTTCTATTAGTAAAATACAAA

>Clone 29r similar a ref|NT_007592.15|:40371903-40372443 Homo sapiens chromosome 6 genomic contig, GRCh37 reference primary assembly

TTAGACTGTGAAACCCTCCAAAGCAAGGACTGGTGTGTTTTTCATTATTTTCTACTAGGATCTGGTGCAAAC
ATGGCCTAACCATTATATTTCTGATGAATCAATAGATTAATTAATTATAGCAGTGCTATGGTTTGAATGTATGCCT
TAAAGTTCATGTGTTGGAACTTAATCATCAATGCAACAATGTTGAGAGTTGGGACCTTTAAGGTGATTAGGTT
ATGATGAATTAATGCTGTTATGGTGGAGTAGGTTCTGATAAAGAATTAGTTGTCCACTCCCCTCCCCTTCA
GCCATGGGATGATGCAGCAAGAAGACCCTTGTGAGATGCAAGCCCCTTGACCTTGGGCTTCTCAGCTTCCAG
AACTGTAAGAGATAAATCTCTGTTTCTTATAAATTATCCACTCTCAGGTATTCTGTGATGGCAGCATAAAAGGAC
TAAGACAAGCAGACTCTGTTGGGTGTCTCACTCACACCCCTCAATGTCCACCATTCCCATGCATTCTGAGGGCT
TCCTGCCCCAAGCACATGTG

>clone 32r similar a ref|NT_022171.15|:10557957-10558100 Homo sapiens chromosome 2 genomic contig, GRCh37 reference primary assembly

ATGAGGATTTCTTTAATATCAACTTCTGAAATGAAATGCTAAAGGTGTAATAAAACCATCCTTAGTAACTGGA
CAAGGAAGAAAGTTACACAATTGCTTTTCTTATTTACAAAAGTAATTGTTGCTTGTCTGGCTGAGGCA

>clone 37r similar a ref|NT_010718.16|:3763926-3764099 Homo sapiens chromosome 17 genomic contig, GRCh37 reference primary assembly

TCACCATCAACTGCTACAGCTTGCTCTGACTTCCTTTCTTCCAATCCATCCTCTACACTGCAGTCATTTCCGCC
ATGCCTCACACAATTCCTGTTCTGTCGCTACCGTGGCTGATTCCTTTCCGGTAGTATCGCTCCATGAGTCTCAGAA
TAAAATCCAAATGCTGAACCAAT

> clone 38u similar a ref|NT_007592.15|:40371802-40372484 Homo sapiens chromosome 6 genomic contig, GRCh37 reference primary assembly

GCCCCATTCTAGACTGTGTTCCACCAATTCCCAGCTCAGGTCTCTACTACTACATTTACCACACTGCATTATAATG
ATTCATATGGGTCTATTCTTTCTTTAGACTGTGAAACCCTCCAAAGCAAGGACTGGTGTGTTTTTCATTATTTT
CTCACTAGGATCTGGTGCAAAACATGGCCTAACCATTCATATTTCTGATGAATCAATAGATTAATTAATTATAGCA
GTGCTATGGTTTGAATGTATGCCTTAAAGTTCATGTGTTGGAACTTAATCATCAATGCAACAATGTTGAGAGTT
GGGACCTTTAAGGTGATTAGGTTATGATGAATTAATGCTGTTATGGTGGAGTAGGTTCTGATAAAAGAATTAG
TTGTCCACTCCCCTCCCCTCAGCCATGGGATGATGCAGCAAGAAGACCCTTGTGAGATGCAAGCCCCTTG
ACCTTGGGCTTCTCAGCTTCCAGAACTGTAAGAGATAAATCTCTGTTCTTATAAATTATCCACTCTCAGGTATTC
TGTGATGGCAGCATAAAAGGACTAAGACAAGCAGACTCTGTTGGGTGTCTCACTCACACCCCTCAATGTCCAC
CATTCCCATGCATTCTGAGGGCTTCTGCCCAAGCACATGTGACTCTGCCTTCCGTGGCCACAAGAGTCAGT
GGGCTATGGAA

>clone 39r similar a ref|NT_007592.15|:40371291-40371857 Homo sapiens chromosome 6 genomic contig, GRCh37 reference primary assembly

CAGCTCTTTAGCGGAATCTCTACCTTCTCTGCCAGAGTTTTAAAGTGAGCAGTGATACTTACTCCACTCCATGT
TCCCTGCATTTCCCTGCATACATCATACTATTTCTTTCTTTCTATTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT
TCTCACTCTGTACCCAGGCTGGAGTGCAGTGGCACGATCACGGCTCACTGCAGCCTCAACCTTGGGCTG
AAGTGATCCTCCCACCTCAGCTTCACAAGTAGCTGAGACTACAGGCATGCACCACCGTGCCAGCTAAATTTT
TGTATTTTTGTAGAAACAGGGCTTCAACATGTTGCCAGGCTGGTCTTGAACCTCTGGGCTCATGCCATCACA
CCATTTCTTATCCATGTGTATTTGCTCATGCCTCCTTTCCACCTTGAACAATGACCTGCCTTTACCTGGCCAACTC
CTAATGTCCTTCAAGTGTTAACTCGGACTTTACTCTGCAGGAAGTCTTTCTGTTCTGTCTCTTAGCCCCATTCTA
GACTGTGTTCCACCAATTCCCAGCTCAGGTCTCTACTACTACT

>clone 42r similar a ref|NW_001838881.2|:10163873-10164068 Homo sapiens chromosome 3 genomic contig, alternate assembly (based on HuRef), whole genome shotgun sequence

CTCAGAAGGAAACAGGCTCAGATTTATCTCTAGTTCTTCCAACCTGGCTACACACAGAAGAAAAATTTACC
CAAGCTTTGGCCCTGGGACACAACACTGGCACAAGTTTACTTGGCAGAGCTCTCAACTGGGCCACGTAGCC
TGAGATTGGAATTAGACAGATGTTTCTACAACAAATGCTTCTTTAAAGTA

>clone 45r similar a ref|NT_022135.16|:13190113-13190979 Homo sapiens chromosome 2 genomic contig, GRCh37 reference primary assembly

TGTTTTAATATGATGTGAGAGAAAGGTCAAATTTATTTTTTTTGCATTGGATTGCCAGTTTTGCCAGCATCAT
TTATTGAAGAGATTATCTTTTCACTGTTGTGTGTTCTTGGTATTTTTGTCAAAAATCAGTTGACTATCAGCGTGT
GAATATTTCTAAGCTCTCTATTCTGTTCCATTGGTCCATATGACTGGTTCTATGTTAGTACCATAGTTTTTTATTA
CTATCGCTTACAATACATTTTAAAATGTGATGCCTTCAGCTTTATCCTTCTTGCTCAATATTGCTATGGGTATTT
GTGGTCTTTTGTGGTTCCAAATGAATTTAATTTTTTTTATCTCTGTAATGAATATCACTGAGATTTTGGAAAGGAA
TTGCATTGAATCTGTAGATCACTTTGGGTAGTATGGGCATTATAACAACATTAATTCTTTTGGATCCATGAGTGGA
GAATGTCTTTTATCTGTGCTTATGCAAAACAATATGGAACCTCTTTAAAAAATTAATAAGTACCATATG
ACTCAGAAATCCAATTTCTGGGTATATATCTGTATTAGTCCGTTTTTCATGCCTCTGATAAAGACATACCTGAGACT
GGGAAGAAAAAGAGGCTTAATTGGACTTACAGTTCCACATGGCTGGGGAGGCCTCAGAATCATGGCAGGAG
GCGAAAAGCACTTCTTACATGGCGGCAGCAAGAGAAAAATGAAGATGCAAAAAGTGGAAACCCCTGATAAAC
TATCAGATCTTGTGAGACTTATTACCTACCATGAGAACAGTGTGGGGGAAACTGCCTCCATGATTCAATTATCTC

CCACTGGGTCCTCCCAACATGTGGCGATTATGGGAGTAC

>clone f10 similar a ref|NT_025741.15|:13190113-13190979 Homo sapiens chromosome 6 genomic contig, GRCh37 reference primary assembly

CACTCTAGACTCGGGCTAGGATGCGAAGTAGGGATAAAGCAGATGTGGCGGGTGTGGCATGTCCCATGGACC
CAGGCTTGGCCTTGCGTCCCCTTCTCCCTGAAGCCGTTCTCCCACTTGCTTCTGGCTCCTTGGCCTCCCGC
TGTCGTCACCCTCTGAATCCTTTCTTCTCCTCCCCACCGAGCAGGCAGAGGGAGGCAACTCTCATCACAGCTC
AGGCCAGAGAGAGGAGTCCTAGGCCCTTGCTATTTTCAGAGCTAAAATTAAGCCCATGGTTTGCTTCCTCAG
CACTTAATTAGACTCCAGCGCCTCACAGGGCAGCCTCCTTCCCGCCCACCAGTGAAGGCCTGACCGGTGGGT
TTGGAAGCTGACGCCATGTTCTGGCAGGAGGGCTGGGGCCTGGGGTATTTTTACATATGAGAGGCTGTGGA
GAGCAAATGCTTGGCACTGAGCCAGTTAGACTAAATCAGTTGGGAGAGGGAGGGAGCAGGAAAGCTGTTA
TATCGTCCTTCTTCTTTGAACTGCACTATAAATCTGCTAGACAGGAAATGGGATTGGGAGGGTAGAGGAGGG
GGCTGTACAGTGAGGCTGGACTGGGGCCTGGGATAACCACCACCCTCGCAGCCTGGCTCAGGTGAGGCCCTG
CCCTGAAGGTGGGGTGAAGGGGGCCTCACTTGGGGCTGGGGGTGAGGCACACTGGTGGGTGTTTCAGAGTT
GTCTGGGTCAGCTAGGGTATGGGCTGACTGTATCTGCCCTCGTGTATTCTGGGCCCTTCAGATCCTCCAAC
TAAAACCACCATCGGTGGAACAGCTTTTAGGACTGGAAGAGACTTCAGAGACCCTGTAATTAGGGTTTTGAG

APÊNDICE 2

Sequências de clones obtidos pela estratégia ChIP que obtiveram Z score superior a 700 e foram incluídos na validação por Real time PCR

>clone 5.1 similar a ref|NT_029419.12|:56130757-56130955 Homo sapiens chromosome 12 genomic contig, GRCh37 reference primary assembly
 ATTACCTGCTTATCTGGAAAATAACCCTAGTAAGACCAAGCCCACTCATCCTGAAAACCTCATCTTAAATGAAGCC
 AAGTCAAGTCAGAATAAGATCTGGGTGTCAGCAAAAAGGAAAACAAACAAAATCAAACCGAACCAC
 GCTAAAATAAAAATAAATTTCCATTTAAAGTCTGAATCCCTTTGGCTT

>clone 7.2 similar a ref|NT_004487.19|:56720781-56721345 Homo sapiens chromosome 1 genomic contig, GRCh37 reference primary assembly
 GAATGCAAAAACCACAAACAGGATCTTGGTATCTCCACAGAGTGTTCCCTCAAGCACCCCCACCGCCTCCC
 GCAACACACACAAACCTTCTCTCTCTTGTCTGAGGTTTGCCACATGCATGCAGGTACACACACACACACC
 CCTAAGCACGAGACGGGGCTGGGTGGGCAAGTGGAGTCTGCATGGAGACCAGTGAGATTAAGGGTTACCTC
 CAGTGAGGAAGGCTGGAGATGCCACCGTGATGTCTTCAGAGGTGATTTTAAATGCTATGGCCAATATTTGGAC
 CTTTCTAAGGATTTGCACGCCCTCAGATATGGAGAAGGCAGGACGGGGCTGGGGAGAACTCCTTTCTTTTTTC
 CTTGCTCTCTCAGGGTGTA AAAACCCACAGTCTGGCCGAGTGCAGCTTGCTCAGGCCTGTAATCCCAGCACT
 TTAGGAGGCCAAGGCAAGAGGATTGCTTAAGCCCAGGAGTTTGAGACCAGCCTGGGCAACATGGCAAACC
 CTTTCTCTACAAAAAATACACAAATTAGCCAGGTGTGGTGGCATGTACCTGTAGTCC

>clone 1.1 similar a ref|NT_032977.9|:13676221-13676532 Homo sapiens chromosome 1 genomic contig, GRCh37 reference primary assembly
 TCAATGTGACCTCGGGACCCCTCGAACACAGGCCACCCAGAAAACATTTTGCAGGTAGCCCAACTTATACT
 TATTGGGAGTGTCTTGGCCATCATACTATGTGAGATATTGGAATGGAGGTGACATAAATGTGAGGGGGGACA
 GCAGAGCCTGGAAAGCAGTAGTCACGGAGGAGCAGGGCTCTTGATGGAGGCACGACAGGGTTCAGACA
 CCAGCTCTACCACTGAGATACGGCCTCAGTTTCTCACAAGGTTGGTGTAAAGGATGAACTGAGGGACTGTATG
 CATGCTGTTTGATACATTTGCGAG

>clone 1 similar a ref|NT_113796.2|:165666-165803 Homo sapiens chromosome 1 genomic contig, GRCh37 reference primary assembly
 CAAACACACACACACACACGCGCACACACACTCCTTCCTTCTGCGAGTTAGAAAATTGGTACGGGCCC
 CTGGGAGCTGCAGGTTTCTAATCATGTCTGCACCTAAGAACAGTAGGGTCTTGTCTGGCTCTTCT