

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

Faculdade de Farmácia

Disciplina de Estágio Curricular em Farmácia

**A, B e Z-DNA: Caracterização Conformacional
e Importância Biológica**

Clarisse Gravina Ricci

Porto Alegre, Junho de 2007

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

Faculdade de Farmácia

Disciplina de Estágio Curricular em Farmácia

A, B e Z-DNA: Caracterização Conformacional e Importância Biológica

Clarisse Gravina Ricci

Trabalho de Conclusão
da Disciplina de Estágio Curricular em Farmácia

Prof. Dr. Paulo Augusto Netz
Orientador

Porto Alegre, Junho de 2007

LISTA DE SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS

DNA	Ácido Desoxirribonucléico
RNA	Ácido Ribonucléico
(d)A	(desoxi)adenilato
(d)T	(desoxi)timidilato
(d)G	(desoxi)guanilato
(d)C	(desoxi)citidilato
3DNA	<i>Three-Dimensional Nucleic Acids</i>
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
HTP	<i>High Twist Profile</i>
LTP	<i>Low Twist Profile</i>
P	Ângulo de pseudorrotação da (desoxi)ribose
$\alpha, \beta, \gamma, \delta, \epsilon, \zeta$	Ângulos torcionais da cadeia principal
χ	Ângulo torcional da ligação glicosídica
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
UV	Ultravioleta
SASP	<i>Soluble Small Acid Proteins</i>
TBP	<i>Tata-box Binding Protein</i>
CRP	<i>Cyclic AMP Receptor Protein</i>
ADAR1	<i>Double-stranded RNA adenosine deaminase</i>
hADAR1	<i>Human double-stranded RNA adenosine deaminase</i>
pb	Pares de bases
Z α _{ADAR1}	Domínio de ligação a Z-DNA da enzima ADAR1

RESUMO

Atualmente está muito bem estabelecido que o DNA pode adotar mais de um tipo de conformação. A conformação B é a mais estudada por ser a predominante no meio celular. As formas A e Z podem ser induzidas por uma série de fatores ambientais ou estruturais, ou pela ligação de moléculas indutoras. Desde a comprovação da ocorrência dessas formas *in vivo*, se busca compreender quais os seus possíveis papéis biológicos. Há dados na literatura que apontam para envolvimento dessas conformações em processos celulares como transcrição gênica e recombinação homóloga, bem como em alguns estados patológicos. O presente trabalho, além de caracterizar estruturalmente as formas A, B e Z-DNA e de descrever os parâmetros utilizados na diferenciação entre elas, reúne as principais evidências existentes na literatura que justificam a importância biológica destas conformações.

1. Introdução

A descoberta de que o ácido desoxirribonucléico (DNA) ocorre em mais de uma conformação se deu antes mesmo que a sua estrutura fosse desvendada. Em 1951, Rosalind Franklin, com o objetivo de aprimorar imagens do padrão de difração de raios-X de diversas amostras de DNA realizou estudos onde a umidade relativa dos meios de cristalização era variada. Ela observou que, em 75% de umidade, o DNA encontrava-se no estado cristalino que já havia sido observado (e que ela chamou de forma A). No entanto, quando a umidade era elevada para aproximadamente 92%, as fibras de DNA assumiam um estado *para*-cristalino, se tornando mais alongadas e finas (forma B) e produzindo imagens mais nítidas (Franklin & Gosling, 1953).

Foi a partir de uma imagem da forma B do DNA obtida por Franklin, a qual Watson e Crick tiveram acesso através de meios no mínimo questionáveis (Maddox, 2003), que a dupla propôs em 1953 o famoso modelo de dupla hélice e pareamento específico das bases, pelo qual ganharam o prêmio Nobel de Fisiologia em 1962 (Watson & Crick, 1953). Nas décadas seguintes, esse modelo tornou-se bem estabelecido tanto para a forma B como para forma A, sendo que todas as fibras analisadas por difração de raios-X foram classificadas em A- ou B-DNA (revisado por Dickerson, 1992).

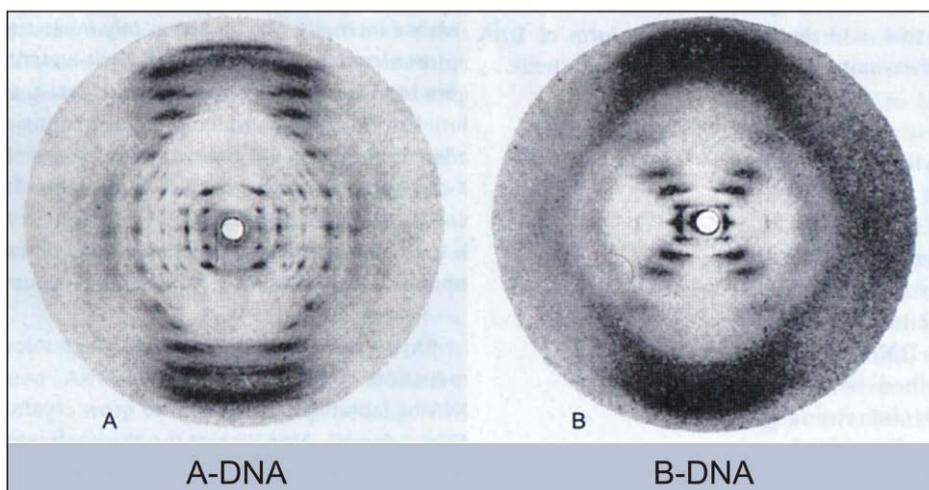


Figura 1. Padrão de difração de raios-X das formas A e B (produzidos por Rosalind Franklin). Fonte: Clayton, 2003.

Até então, os estudos de difração de raios-X com ácidos nucleicos eram baseados em amostras extraídas diretamente de tecidos, ou seja, amostras impuras, que continham fibras de DNA heterogêneas tanto em tamanho como em seqüência. Os padrões de difração obtidos permitiam apenas a proposição de um modelo estrutural idealizado, que representava a média de todas as estruturas altamente heterogêneas presentes. Não possibilitava, portanto, a análise de um determinado par de bases, ou mesmo de um tipo específico de par de bases (Dickerson *et al.*, 1982).

A partir da década de 1970, foram desenvolvidos métodos de síntese de DNA (Itakura *et al.*, 1975; Aretzen & Reese, 1977), que tornaram possível a obtenção de pequenos fragmentos puros de DNA - de seqüência definida e pré-determinada - em quantidades suficientes para se produzir cristais. Assim, tiveram início os primeiros estudos de DNA por cristalografia de difração de raios-X de monocristal (*single-crystal X-ray diffraction*). Essa técnica, que já vinha sendo aplicada a proteínas desde 1960 (Dickerson *et al.*, 1982 apud Kendrew *et al.*, 1960; Perutz *et al.*, 1960), possibilitaria que, finalmente, o modelo proposto por Watson e Crick fosse efetivamente comprovado.

Nesse contexto, criou-se uma expectativa quanto à conformação adotada pelo primeiro segmento de DNA a ser analisado a partir de um monocristal de DNA. Foi de fato surpreendente quando, em 1979, o primeiro hexâmero a ter sua estrutura desvendada, de seqüência poli(dC-dG)₃, adotou uma conformação nova e inusitada, com inversão do sentido da dupla hélice em relação às formas A e B (Wang *et al.*, 1979). Nessa conformação, além das hélices possuírem sentido de mão esquerda ao invés do sentido de mão direita, a cadeia principal possui um formato em zigue-e-zague, razão pela qual a conformação foi chamada de Z-DNA (Rich & Zhang, 2003).

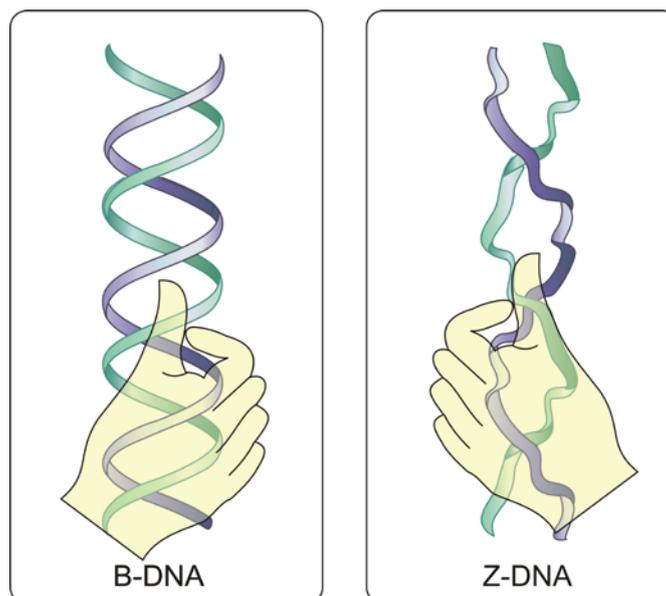


Figura 2. Representação esquemática de duplas hélices nas conformações B- e Z-DNA.

À medida que aumentava a quantidade de estruturas de DNA analisadas por cristalografia de raios-X, tornou-se bem estabelecido que a forma mais representativa *in vivo* é a forma B. Por sua vez, observou-se que a adoção das formas A e Z podia ser induzida por uma série de fatores, ambientais ou estruturais. Os primeiros desses fatores a se tornarem bem conhecidos foram os ambientais: baixa umidade relativa, percentual de álcoois em solução ou presença de contra-íons (Franklin & Gosling, 1953; Pohl & Jovin, 1972; Thamann *et al.*, 1981). Como as condições ambientais favoráveis às formas A ou Z (ou ambas) eram características dos meios de cristalização, a ocorrência dessas formas *in vivo* foi encarada inicialmente com ceticismo, especialmente no caso da forma Z-DNA. Essa conformação, por ser tão diferente estruturalmente da forma B, por um longo período foi pouco investigada por não se acreditar que possuísse algum papel fisiológico (Rich & Zhang, 2003).

No entanto, posteriormente foram sendo descobertos outros fatores indutores das conformações A ou Z, que não estão restritos aos meios experimentais, como a seqüência de pares de bases (Calladine & Drew, 1984), a presença de poliaminas (Thomas & Messner, 1986; Thomas *et al.*, 1991; Thomas & Thomas, 1994) ou o estresse topológico (Nordheim *et al.*, 1982; Peck *et al.*, 1982). Enquanto que a seqüência de pares de bases é uma

característica intrínseca da molécula, a presença de poliaminas, bem como o estresse topológico, são de ocorrência freqüente no meio celular.

Portanto, a hipótese de que o DNA poderia assumir as conformações A e Z *in vivo* ganhou força. Mais recentemente, foram descobertas proteínas e enzimas capazes de reconhecer de forma específica ou induzir determinadas conformações, sugerindo o envolvimento dessas conformações em processos celulares (Kim *et al.*, 1993a; Herbert *et al.*, 1995; Ivanov *et al.*, 1995; Dóstal *et al.*, 1998; Brandt & Jacobs, 2001; Schwartz *et al.*, 2001).

Portanto, as questões levantadas e ainda abertas até hoje são:

- a) Qual o papel dessas conformações *in vivo*?
- b) Elas possuem alguma função biológica além da estabilização estrutural do DNA em determinadas condições ambientais e topológicas?
- c) Qual a importância do estudo dessas conformações?

Nesse contexto, o presente trabalho consiste em uma revisão bibliográfica com os objetivos de:

- 1) Caracterizar estruturalmente as conformações A, B e Z.
- 2) Definir os parâmetros utilizados na análise conformacional de ácidos nucléicos, correlacionando-os com as propriedades que permitem diferenciar as formas A, B e Z.
- 3) Justificar a importância do estudo das formas A e Z, com base em evidências encontradas na literatura de possíveis papéis biológicos para essas conformações.

2. Conformações dos Ácidos Desoxirribonucléicos

Os ácidos nucleicos são biopolímeros cujas unidades básicas, os nucleotídeos, consistem em um fosfato (1), uma pentose (2) e uma base nitrogenada (3). No caso do ácido desoxirribonucléico (DNA), o açúcar é uma β -2'-desoxi-D-ribose, ou seja, o grupamento hidroxila do carbono-2' presente na D-ribose é substituído por um hidrogênio. Já as bases nitrogenadas são derivadas de dois compostos: a purina e a pirimidina, sendo as de principal ocorrência no DNA adenina e guanina (púricas) e timina e citosina (pirimídicas) (Nelson & Cox, 2002).

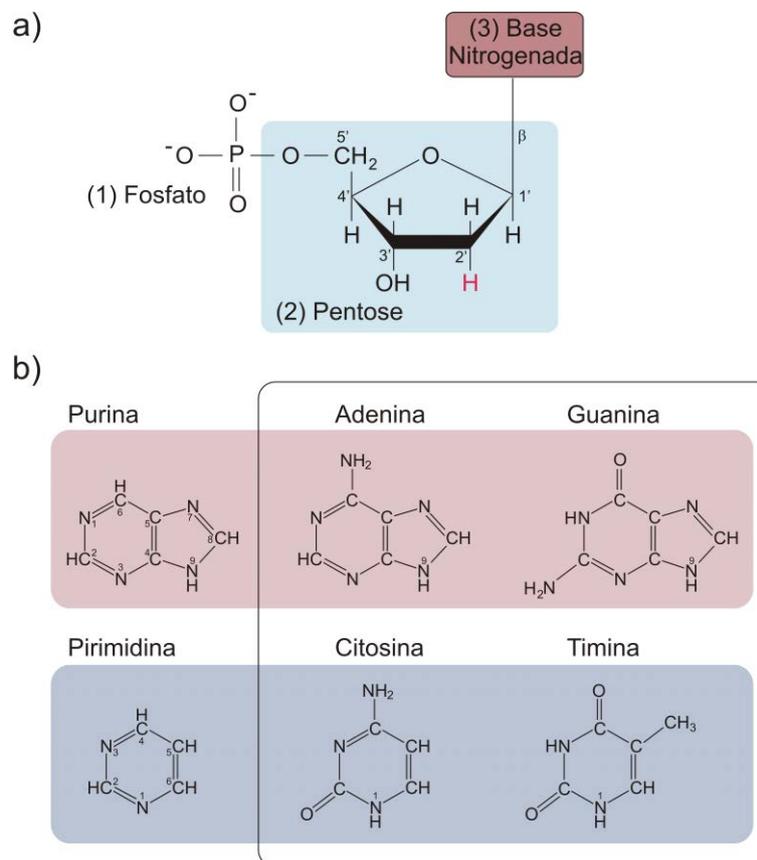


Figura 3. Composição básica do DNA. (a) Estrutura geral de um desoxirribonucleotídeo, mostrando a convenção da numeração do anel (desoxi)ribose. O carbono-2' está ligado a um hidrogênio (em vermelho) ao invés do grupamento hidroxila que está presente nos ácidos ribonucléicos (RNA). (b) Estrutura das bases nitrogenadas e dos compostos dos quais derivam, mostrando a convenção das numerações.

A estrutura dessa macromolécula foi elucidada em 1953, por Watson e Crick, que propuseram um modelo de duas fitas em forma de hélice de mão direita, compartilhando do mesmo eixo central, porém orientadas em sentidos contrários (figura 4a). Cada fita, ou cadeia, é formada por grupamentos fosfatos e açúcares alternados, unidos por ligações fosfodiéster, sempre no sentido da hidroxila ligada ao carbono C3' para a hidroxila ligada ao carbono C5' da (desoxi)ribose. Cada (desoxi)ribose, por sua vez, encontra-se ligada a uma base nitrogenada através de uma ligação β -glicosídica entre o carbono C1' do anel (desoxi)ribose e um dos nitrogênios das bases (N1 nas pirimidícas e N9 nas púricas) (figura 4b).

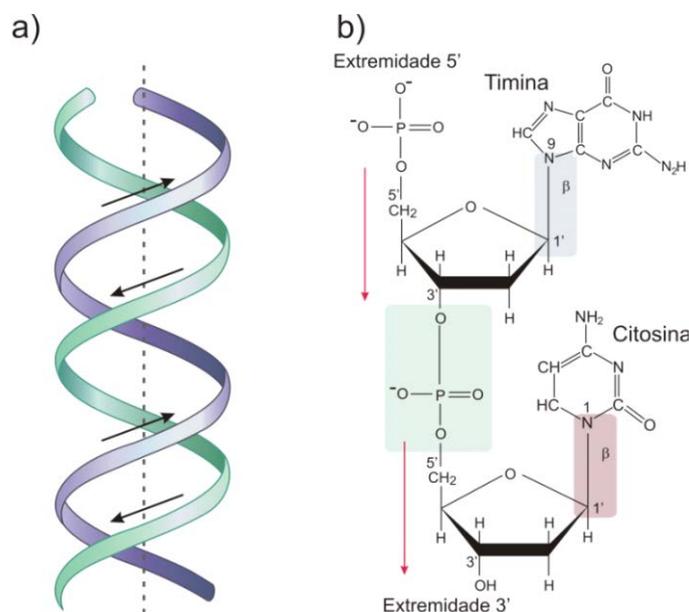


Figura 4. Estrutura do DNA. a) Desenho esquemático do modelo de dupla fita proposto por Watson e Crick em 1953. b) Ligação fosfodiéster entre (desoxi)ribose e fosfato na cadeia principal e ligações β -glicosídicas entre (desoxi)riboses e bases nitrogenadas.

Os fosfatos e açúcares localizam-se na parte externa da hélice, enquanto as bases nitrogenadas se projetam para a parte interna. Este arranjo possibilita que as bases de uma cadeia formem ligações de hidrogênio com as bases da cadeia complementar, mantendo as duas hélices unidas. Considerando-se que os pares são sempre formados por uma base púrica e outra pirimídica, a área ocupada por cada par se mantém aproximadamente a mesma independentemente da seqüência, *garantindo* diâmetro constante ao longo da fibra de DNA. Além disso, as ligações de hidrogênio entre as bases

são complementares, permitindo apenas um tipo de pareamento: adenina com timina ou guanina com citosina, mostrados na figura 5 (Watson & Crick, 1953). Sendo assim, a seqüência de uma das fitas pode ser deduzida através da seqüência da fita complementar. Portanto, ao desvendarem o pareamento específico dos pares de base, Watson e Crick concomitantemente decifraram o mecanismo de replicação do material genético.

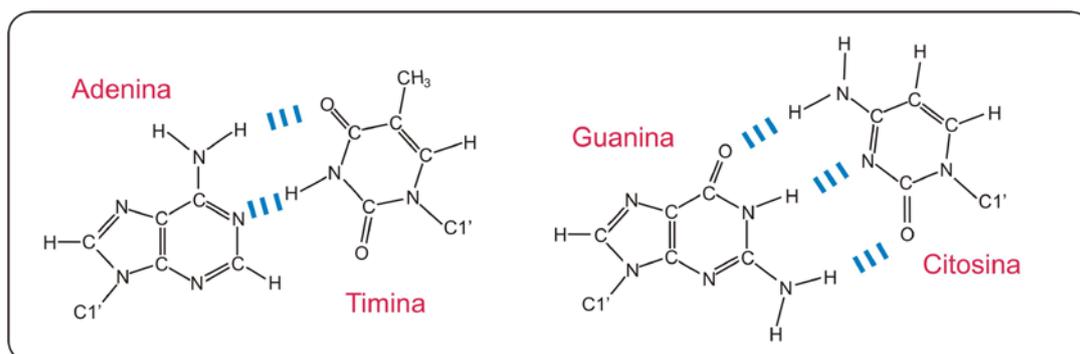


Figura 5. Padrões de ligações de hidrogênio entre pares de bases. As ligações de hidrogênio estão representadas por conjuntos de linhas azuis.

Devido ao fato de possuir uma estrutura “trançada”, rica em ligações de hidrogênio entre as bases e em grupamentos carregados negativamente no seu esqueleto covalente, o DNA é considerado uma molécula de elevada polaridade e rigidez. De fato, se gasta 50 vezes mais energia para dobrar uma dupla hélice de DNA em um círculo do que para realizar a mesma operação com uma molécula de DNA de fita simples (Bustamante *et al.*, 2003).

Ainda assim, o DNA é também uma molécula adaptável e capaz de assumir uma variedade de conformações (Franklin & Gosling, 1953; Pohl & Jovin, 1972; Wang *et al.*, 1979; Premilat & Albiser, 1986; Dickerson *et al.*, 1992). A figura 6 mostra as três conformações canônicas mais estudadas atualmente: A-, B- e Z-DNA, sendo a forma B a mais conhecida e estudada, por ser a predominante em condições fisiológicas (Nelson & Cox, 2002). As formas A e Z podem ser induzidas e/ou estabilizadas por fatores ambientais ou estruturais, que serão descritos mais detalhadamente no item 4. Simplificadamente, seqüências ricas em adenina e timina tendem a favorecer a forma B enquanto que seqüências ricas em guanina e citosina favorecem a

forma A (Calladine & Drew, 1984; Hunter, 1993). Já a ocorrência da forma Z está praticamente restrita a seqüências que alternam purinas e pirimidinas, especialmente, seqüências poli(dG-dC) (Rich & Zhang, 2003).

A comparação dessas três estruturas mostra claramente diferenças nas hélices de cada conformação, que hoje estão bem estabelecidas (Dickerson *et al.*, 1982; Calladine & Drew, 1984; Dickerson, 1992). Em primeiro lugar, a forma Z possui hélices de mão esquerda ao invés das hélices de mão direita que ocorrem nas formas A e B. Também é possível perceber que as três estruturas da figura 6, que possuem o mesmo número de pares de bases, diferem em diâmetro e em comprimento. Na forma A, as bases estão comprimidas ao longo do eixo central, caracterizando hélices achatadas e largas em relação à forma B. Por outro lado, a forma Z apresenta hélices extremamente alongadas e estreitas. Na forma B, os planos das bases encontram-se praticamente perpendiculares ao eixo central, enquanto que, na forma A, os planos estão bastante inclinados.

Na figura 7, observa-se que o B-DNA apresenta dois sulcos diferentes em largura (sulco maior e sulco menor), porém semelhantes em profundidade. No A-DNA, a diferença de largura entre os sulcos não é tão evidente quando no B-DNA. No entanto, eles diferem em profundidade, sendo o sulco maior mais profundo e o sulco menor mais raso (Dickerson *et al.*, 1982). No caso do Z-DNA, as bases estão posicionadas de tal forma que existe apenas um sulco, análogo em largura ao sulco menor do B-DNA. No lugar do sulco maior, as bases estão tão próximas à superfície que já não se pode considerar a região como um sulco. O desaparecimento do sulco maior no Z-DNA é, no entanto, compensado por um aumento em profundidade no sulco menor, que o torna ainda mais profundo (Rich & Zhang, 2003).

A vista axial das três estruturas (figura 8) evidencia a diferença de diâmetro que existe entre as formas A, B e Z. Na forma A, as bases estão mais afastadas do eixo central, criando uma cavidade interna característica da forma A (Dickerson, 1992). Na forma B, as bases estão localizadas próximas ao eixo central, ocupando todo o espaço interno das hélices. Na forma Z, as bases pirimídicas localizam-se internamente, próximas ao eixo central como na forma B, enquanto as bases púricas localizam-se quase na parte externa das hélices.

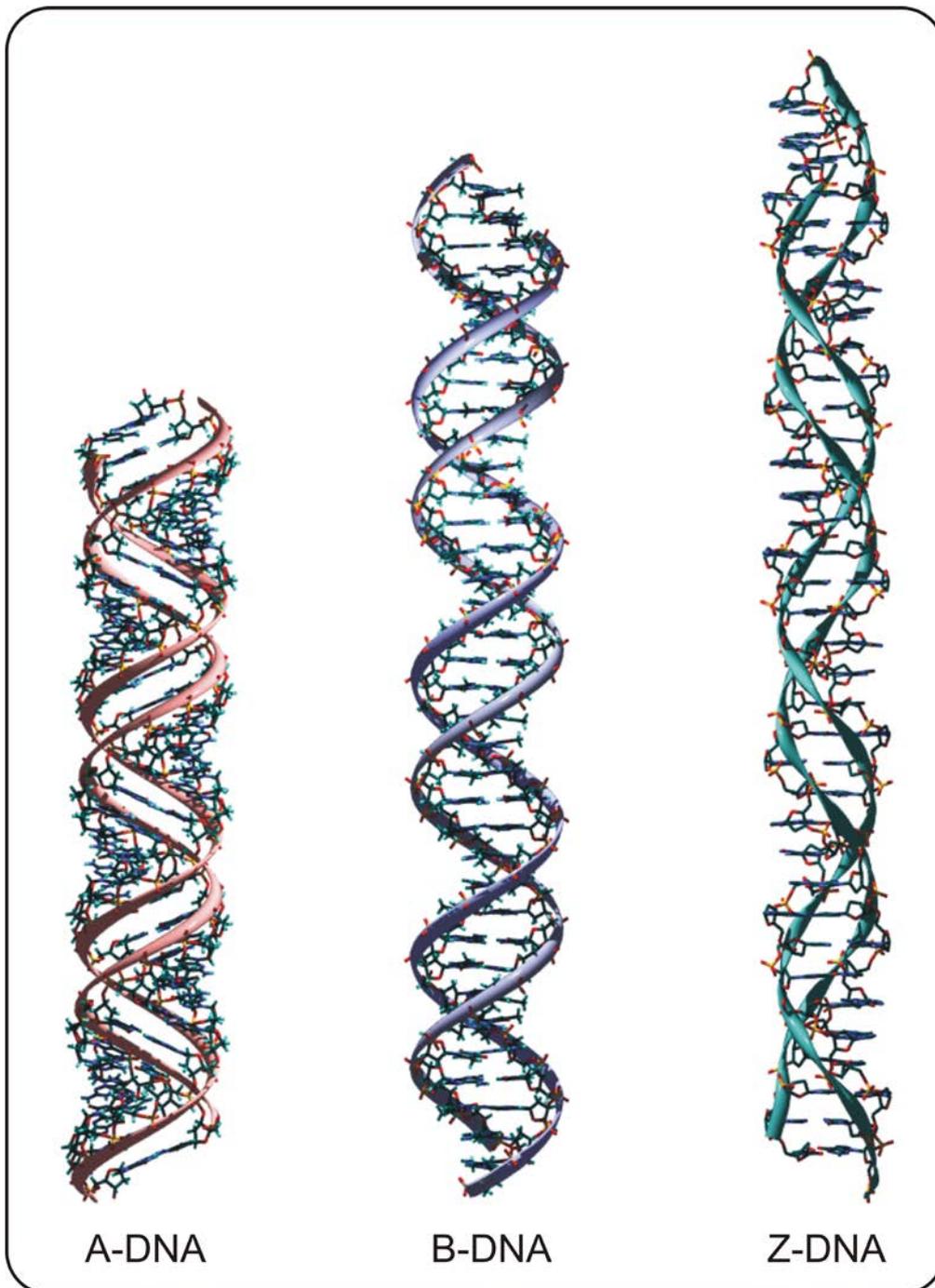


Figura 6. Comparação entre diferentes formas do DNA. A-DNA (rosa), B-DNA (lilás) e Z-DNA (azul). As estruturas foram geradas através do programa 3DNA, cada uma contendo 36 pares de bases. As formas A e Z possuem seqüência poli(dC-dG) e a forma B possui seqüência poli(dA-dT).

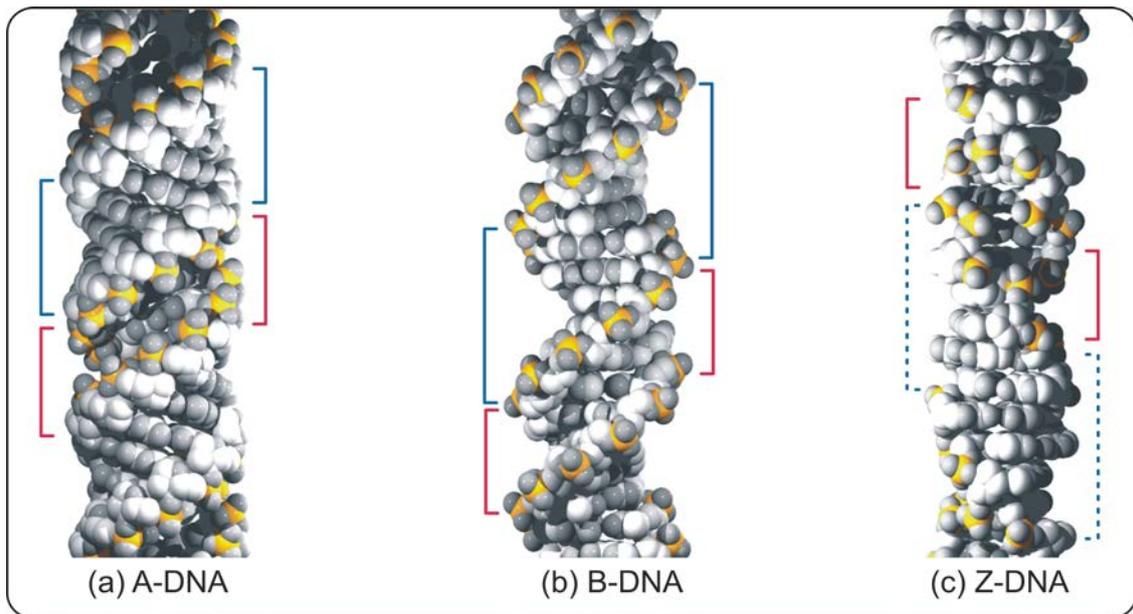


Figura 7. Comparação entre diferentes formas do DNA (sulcos). (a) A-DNA, (b) B-DNA e (c) Z-DNA. Os fosfatos estão destacados em amarelo para identificação das cadeias principais. Os sulcos menores estão indicados em vermelho e os sulcos maiores em azul. No Z-DNA, só existe um sulco, indicado pela linha vermelha contínua. O local reservado ao segundo sulco está indicado por uma linha azul tracejada.

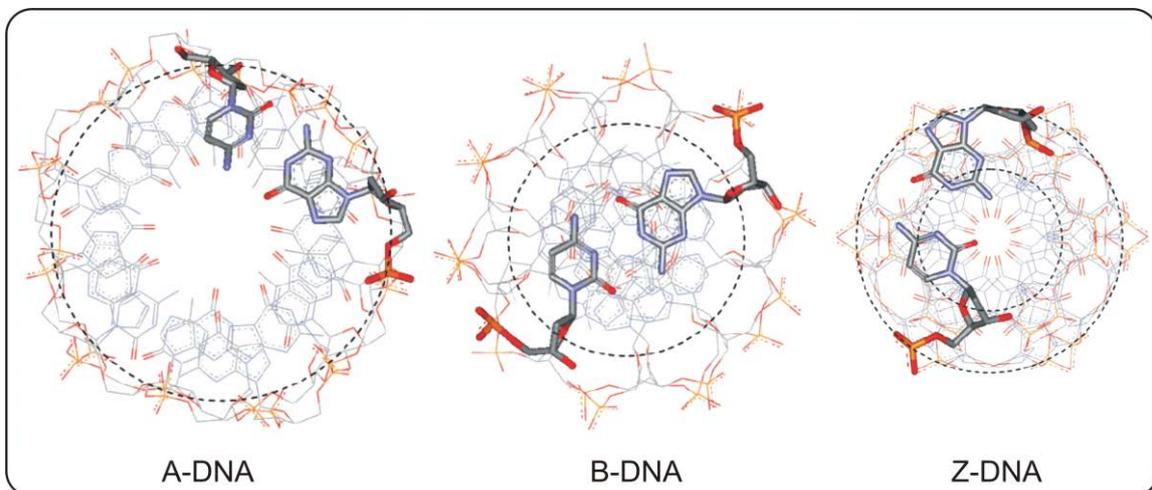


Figura 8. Comparação entre diferentes formas do DNA (vista axial). Fonte: Fuertes *et al.*, 2006.

Outra peculiaridade da forma Z refere-se ao formato em zigue-e-zague da cadeia principal (figura 9). Diferentemente do B-DNA, em que todas as bases encontram-se na conformação *anti*, no Z-DNA, algumas bases, de forma alternada, giram em torno da ligação glicosídica, adotando a conformação *sin*.

Essa reorientação das bases se transmite ao anel da pentose e à cadeia principal, que também alteram as suas conformações (ver item 3.2). O resultado é uma estrutura mista, contendo nucleotídeos em conformações *sin* e *anti*, alternadamente (Rich & Zhang, 2003). As conformações *sin* e *anti* da cadeia principal estão detalhadas no item 3.2.

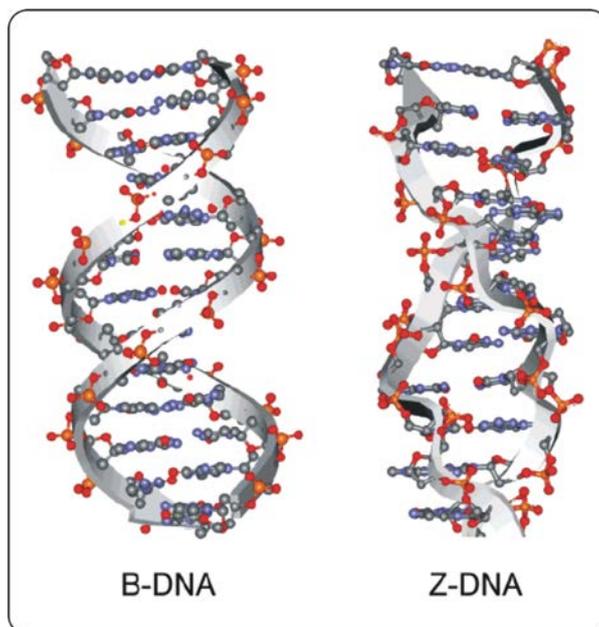


Figura 9. Comparação entre diferentes formas do DNA (cadeia principal). Vista lateral de um segmento de B-DNA (esquerda) e outro de Z-DNA (direita). Em ambos, a cadeia principal está ilustrada por fitas que acompanham os grupamentos fosfatos das cadeias. Fonte: Fuertes *et al.*, 2006.

A Tabela 1 resume as propriedades das estruturas A, B e Z-DNA mostradas nas figuras 3, 4 e 5. Apresentadas desta forma, as diferenças estruturais entre A-, B-, e Z-DNA são bastante evidentes, e a diferenciação entre elas pode parecer relativamente simples. No entanto, é importante salientar alguns fatores que dificultam a análise. Em primeiro lugar, nem sempre as transições ocorrem em seqüências extensas de nucleotídeos. Atualmente, os estudos de ácidos nucléicos, através de cristalografia de raios-X (Martin *et al.*, 2004; Miao *et al.*, 2005), modelagem molecular (Spacková *et al.*, 2003; Babin *et al.*, 2006) ou ressonância magnética nuclear (RMN) (Yang *et al.*, 1999; Kumar *et al.*, 1998) se restringem a seqüências curtas, que costumam variar de 10 a 12 pares de bases. Além disso, no caso de transições

conformacionais induzidas pela ligação de outras moléculas (proteínas ou fármacos, por exemplo), a transição deve ocorrer no local da interação e eventualmente se propagar por pares de bases adjacentes. Considerando-se que a maioria desses ligantes se ligam a um dos sulcos (Reddy *et al.*, 2001) e que cada sulco não expõe mais do que três ou quatro pares de bases, dificilmente a transição nesses casos ocorrerá em seqüências longas. Nesses casos, diferenças estruturais como diâmetro, número de pares bases por volta ou comprimento da hélice não são indicativos suficientemente precisos de conformação.

Em segundo lugar, o DNA pode sofrer transições parciais de conformação, resultando em estruturas mistas que apresentam propriedades de mais de um tipo de hélice (Trantírek *et al.*, 2000; Ivanov *et al.*, 2003; Dostál *et al.*, 2004). O A e o B-DNA estão longe de serem duas conformações isoladas, e, embora seja fácil identificar os protótipos de cada um (chamados de formas *canônicas*), a classificação de formas intermediárias (*não-canônicas*) depende em grande parte da escolha dos critérios de análise (Dickerson & Ng, 2001).

Finalmente, os estudos por cristalografia, por RMN, ou por outros métodos como a dinâmica molecular, geram uma estrutura final que representa a média das estruturas presentes no cristal ou solução, ou a média das estruturas geradas durante a trajetória da dinâmica. Essas estruturas podem ser heterogêneas em alguns aspectos da conformação, dificultando a classificação da estrutura final.

Logo, pelas razões apresentadas acima, a análise conformacional do DNA não é óbvia como pode parecer a princípio. Pelo contrário, determinar em que conformação encontra-se um segmento de DNA é uma tarefa que exige, em primeiro lugar, o conhecimento dos parâmetros úteis na análise e, em segundo, interpretação da parte do pesquisador.

Tabela 1. Parâmetros de dupla hélice para as formas canônicas A-, B- e Z-DNA.

Propriedade	Hélices		
	A	B	Z
Unidade de Repetição	CG	AT	CG
Sentido da hélice	mão direita	mão direita	mão esquerda
Diâmetro	(~26Å) ¹	(~20 Å) ¹	(~18 Å) ¹
Pares de base por volta da hélice	11,8 (11) ¹	10,0 (10) ²	11,3 (12) ^{1,2}
Rotação média par de bases	30,49° (31°) ²	35,93° (36°) ²	-31,97° (-60°) ²
Inclinação das bases em relação ao eixo central	22,59	2,77	-11,49
Degrau de hélice por par de bases	3,29 Å (2,6 Å) ¹	3,36 Å (3,4 Å) ¹	3,59 Å (3,7 Å) ¹
Extensão dos Sulcos			
Sulco menor	11,1 (11,5) ²	11,7 (8,8) ²	9,8
Sulco maior	16,7	17,2	17,5

Os valores médios e as informações resumidas na tabela foram obtidos a partir da análise das estruturas das figuras 3, 4 e 5 pelo programa 3DNA, exceto os valores em negrito entre parênteses, que são dados da literatura para as respectivas formas canônicas.

¹ Nelson & Cox, 2002

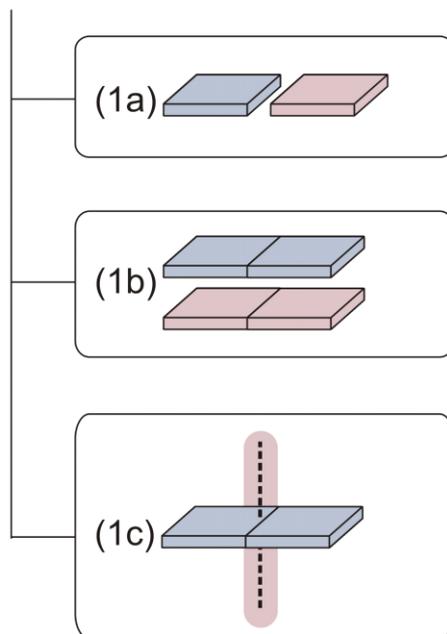
² Dickerson, 1992.

3. Análise conformacional do DNA

Basicamente, a estrutura adotada por uma hélice de DNA depende de dois tipos de fatores: os ambientais e os intrínsecos ou estruturais (Foloppe & MacJerell Jr., 1999). Em 1984, Calladine e Drew propuseram que eram as interações “ π -stacking” entre as bases que guiavam os segmentos de DNA a assumir uma determinada conformação, e que a cadeia principal, sendo relativamente flexível, apenas se ajustaria aos movimentos dos pares de bases. No entanto, apesar de ser idêntica para qualquer seqüência, a cadeia principal também deve ser considerada na análise pelas seguintes razões: primeiro, o fato de a cadeia possuir comprimento finito restringe o espaço conformacional acessível às bases. Ou seja, embora a cadeia principal seja capaz de se ajustar até certo ponto, além desse ponto ela passa a limitar os movimentos dos pares de bases. Em segundo lugar, a cadeia principal une as propriedades de cada base em uma seqüência. Isso implica que as estruturas adotadas por um mesmo par de bases sejam diferentes dependendo da seqüência em que ele se encontra inserido (Yanagi *et al.*, 1991 apud Packer & Hunter, 1998). Portanto, considerando-se apenas os fatores intrínsecos, o padrão adotado por uma determinada seqüência de nucleotídeos é induzido pelas interações entre os pares de base, mas também restringido pelas conformações energeticamente possíveis da cadeia principal.

Por essa razão, os parâmetros estabelecidos para a análise e classificação estrutural do DNA podem ser divididos em duas categorias (figura 10): (1) os que descrevem as bases e (2) os que descrevem a cadeia principal. O primeiro grupo (1) consiste em parâmetros rotacionais e translacionais que descrevem: (1a) cada base em relação à base complementar do par, (1b) cada par de bases em relação ao par de bases vizinho e (1c) cada par de bases com relação ao eixo central da hélice (1c). O segundo grupo (2) consiste nos ângulos torcionais das ligações da cadeia principal e da ligação glicosídica entre pentose e base nitrogenada, e na conformação adotada pelo anel do açúcar (Dickerson *et al.*, 1982; Dickerson *et al.*, 1989; Dickerson, 1992).

(1) Bases



(2) Cadeia principal

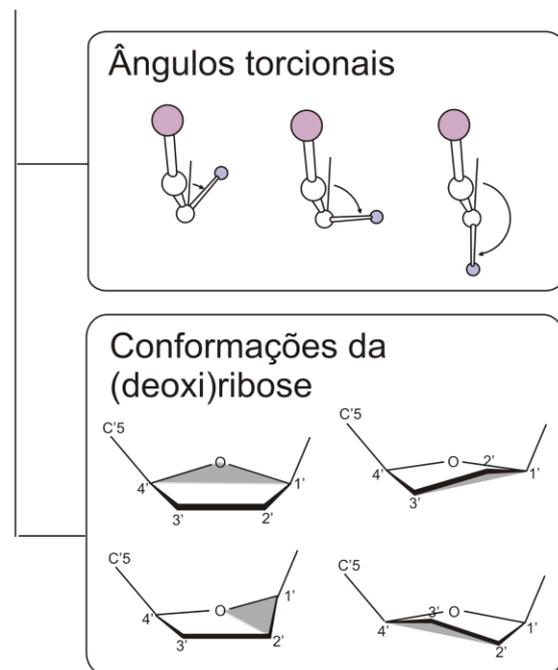


Figura 10. Parâmetros de análise do DNA. (1) Representação esquemática das bases nitrogenadas segundo o modelo Calladine-Drew. (2) Representação dos ângulos torcionais da cadeia principal e de conformações possíveis para o anel (desoxi)ribose.

A seguir, serão definidos os parâmetros contidos em cada grupo, com destaque para aqueles que permitem melhor diferenciação entre as conformações A-, B- e Z-DNA. Considerando que a forma Z se distingue das formas A e B pelo sentido e conformação das cadeias, os parâmetros referentes às bases têm maior importância para diferenciação entre formas A e B. Estas, por serem mais parecidas entre si, necessitam de maior número de parâmetros para que sejam diferenciadas de forma precisa. Por essa razão, o item 3.1 será mais voltado à diferenciação entre as formas A e B.

3.1 Parâmetros relativos às bases

A convenção dos eixos, bem como os parâmetros relativos ao movimento das bases, estão definidos nas figuras 11 e 12, de acordo com Dickerson *et al* (1989).

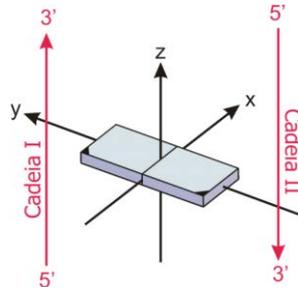


Figura 11. Definição dos eixos. Representação das bases através do modelo Calladine-Drew. As duas cadeias principais estão representadas esquematicamente em vermelho. Os vértices sombreados nas bases representam o ponto em que estão ligadas à cadeia principal.

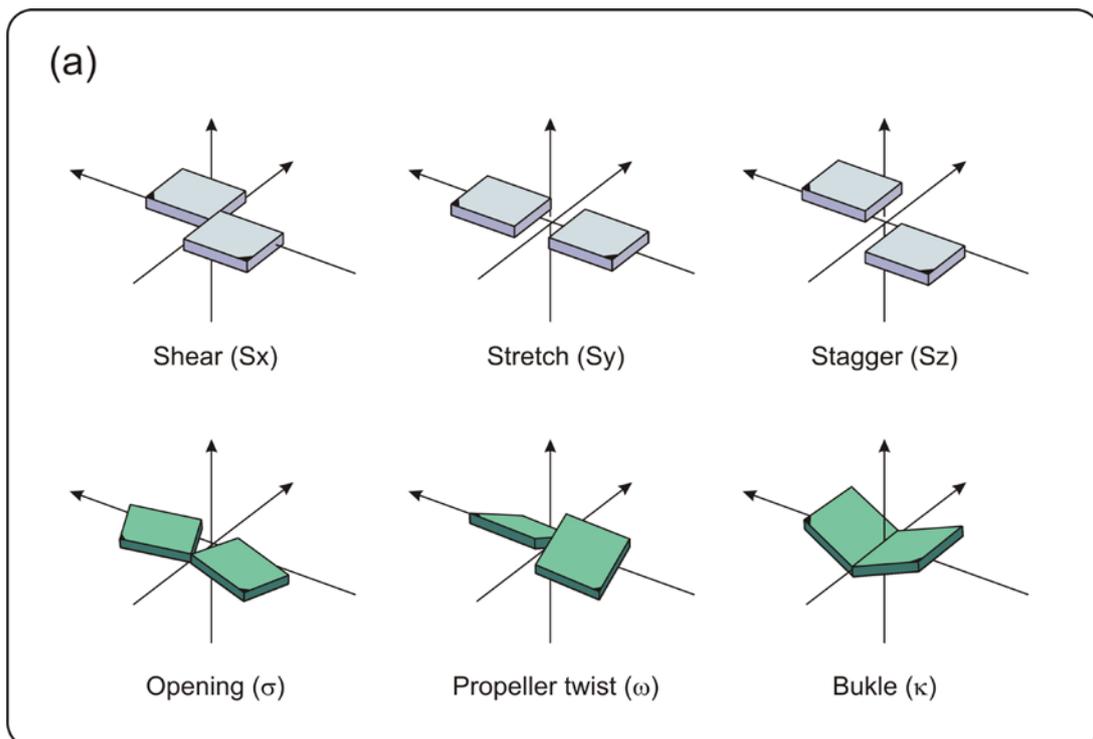


Figura 12. Definições dos movimentos relativos às bases. (a) translações (lilás) e rotações (verde) das bases que compõem um par isolado.

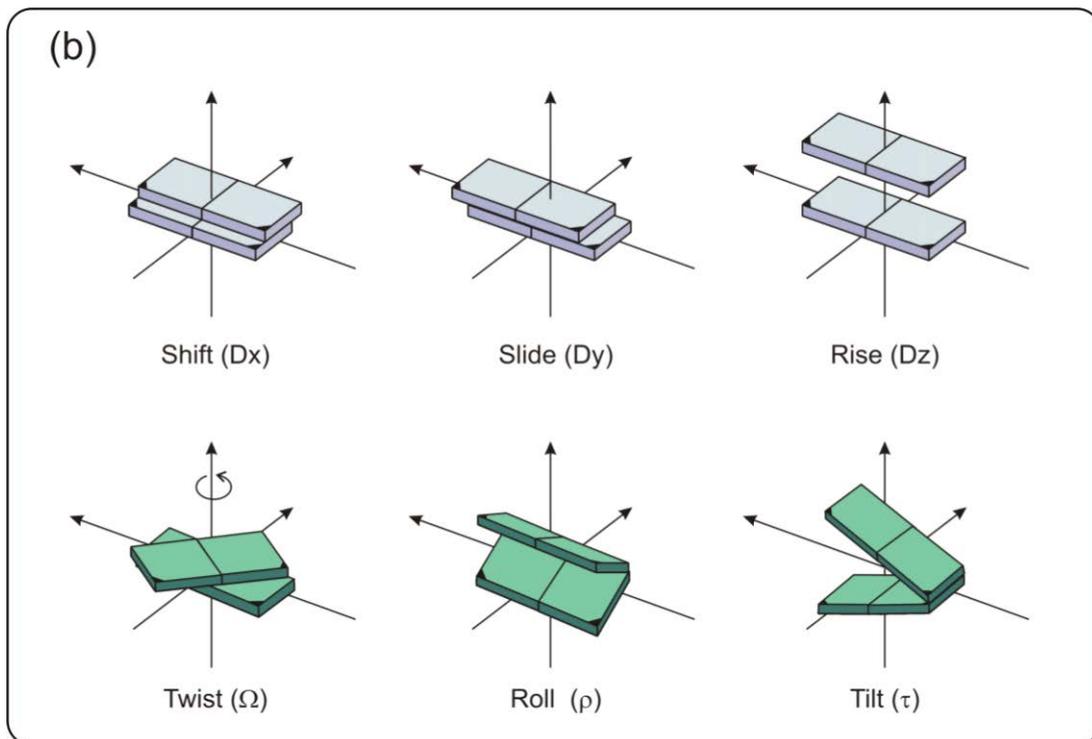


Figura 12. Definições dos movimentos relativos às bases. (b) translações (lilás) e rotações (verde) de pares de bases consecutivos.

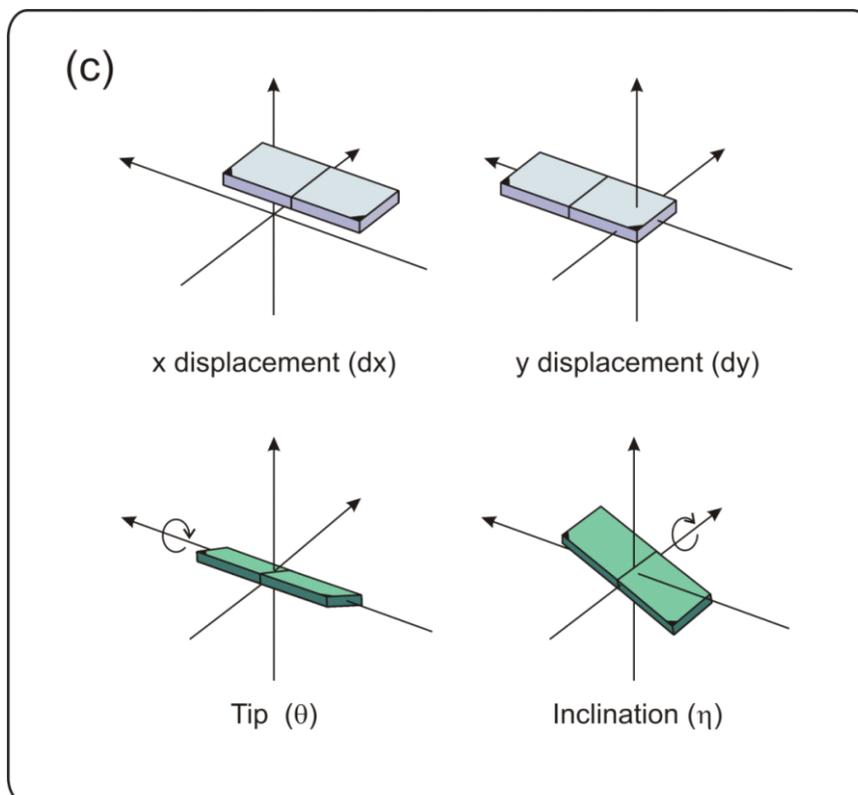


Figura 12. Definições dos movimentos relativos às bases. (c) translações (lilás) e rotações (verde) das bases em relação ao eixo central da hélice

A combinação dos movimentos apresentados acima confere ao DNA parte das diferenças estruturais entre as formas A, B e Z, apresentadas nas figuras 4, 5, 6 e 7. Está bem descrito, por exemplo, que o parâmetro translacional *X-displacement*, está relacionado com o tamanho da cavidade interna do DNA na vista axial (Dickerson & Ng, 2001). Relações como esta, embora não citadas explicitamente na literatura, podem ser feitas para outros parâmetros. É possível inferir que o parâmetro translacional *Slide*, que representa o afastamento entre dois pares de bases ao longo do eixo Y, influencia no diâmetro da dupla hélice. Já o parâmetro translacional *Rise*, que representa a distância entre duas bases consecutivas ao longo do eixo Z, pode ser relacionado com o comprimento da hélice, enquanto que o parâmetro *Twist*, que indica o grau de rotação de um par de bases em relação ao par anterior, é utilizado para calcular o número de pares de bases por volta em uma hélice.

As relações entre os parâmetros citados acima e as propriedades de cada hélice são facilmente compreendidas. Outras, como por exemplo as contribuições dos parâmetros *Roll* e *X-displacement* para as dimensões dos sulcos em cada conformação, não são tão óbvias e estão ilustradas nas figuras 13 e 14. A Figura 13 mostra que variações em *Roll* interferem com a largura dos sulcos (Dickerson & Ng, 2001; Dickerson, 1992). Valores positivos de *Roll* favorecem em largura o sulco menor, enquanto que valores negativos de *Roll* favorecem o sulco maior. Ou seja, valores positivos de *Roll* (A-DNA), tendem a tornar os dois sulcos mais simétricos em largura.

A Figura 14 demonstra que variações em *X-displacement* interferem tanto com a profundidade quanto com a largura dos sulcos (Reddy *et al.*, 2003). Valores positivos de *X-displacement* aumentam a profundidade do sulco menor e diminuem a profundidade do sulco maior, diminuindo a assimetria em largura entre ambos. Por outro lado, valores negativos de *X-displacement* correspondem a um sulco menor mais raso e um sulco maior profundo, como ocorre no A-DNA. O B-DNA apresenta valores nulos ou levemente positivos de *X-displacement* e, portanto, apresenta sulcos mais simétricos em profundidade se comparado ao A-DNA.

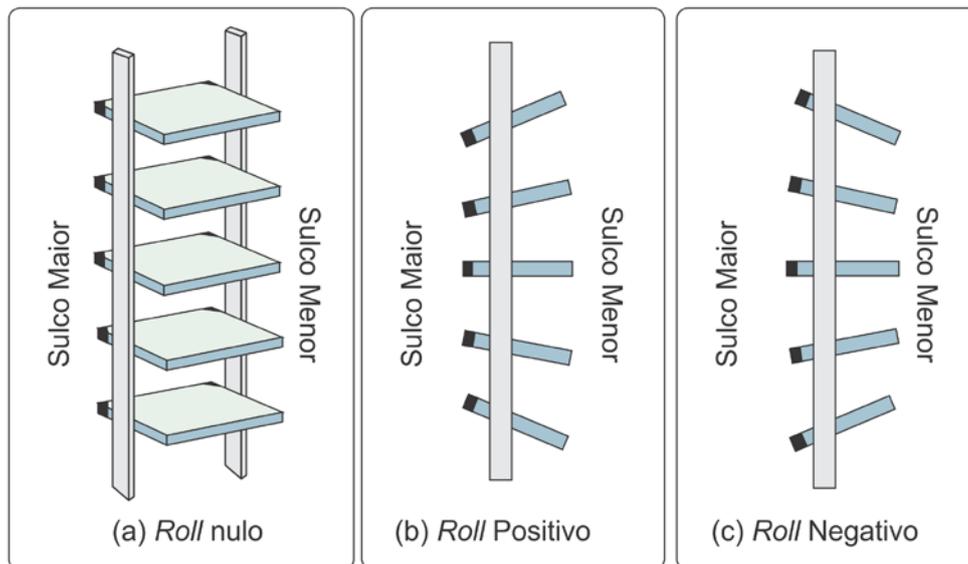


Figura 13. Efeito das variações em *Roll* na largura dos sulcos. Vista lateral das hélices estendidas. Cada par de bases está representado por um retângulo. Os vértices sombreados indicam a posição em que as bases estão ligadas às cadeias principais (representadas esquematicamente por fitas cinzas). (a) bases com valor nulo de *Roll*, (b) bases com valor positivo de *Roll* e (c) bases com valor negativo de *Roll*.

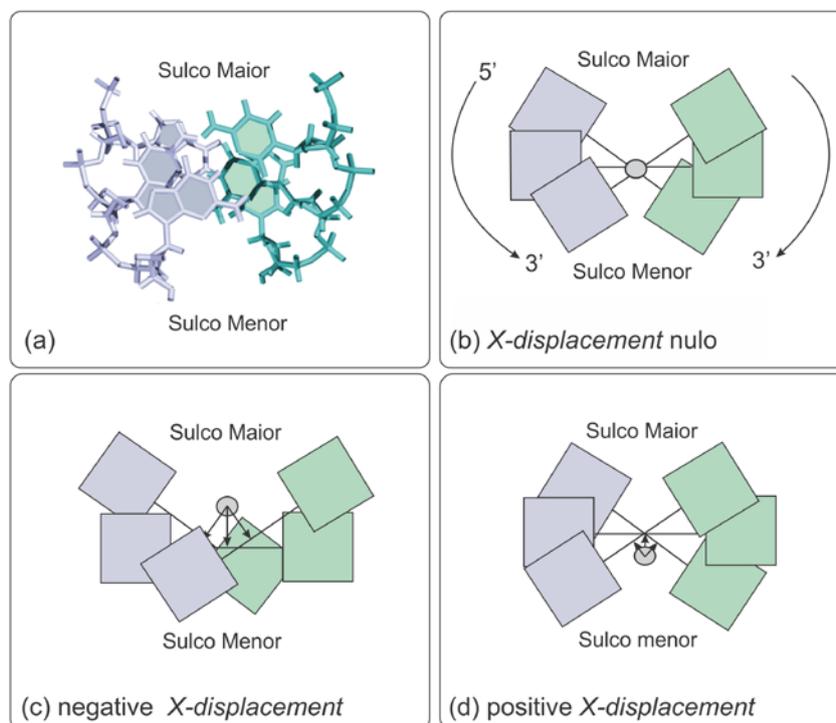


Figura 14. Efeito de variações em *X-displacement* na profundidade dos sulcos. Vista axial de uma trinca de pares de bases (a). Em (b), (c) e (d), cada base está representada esquematicamente por um quadrado, e o eixo da hélice indicado por um círculo cinza. (b) bases com valor nulo de *X-displacement*, (c) bases com valor negativo de *X-displacement* e (d) bases com valor positivo de *X-displacement*.

Há diversas vantagens em se decompor as transições conformacionais do DNA em uma série de movimentos específicos referentes a um ou no máximo dois pares de bases. Primeiramente, esse tipo de análise permite a identificação do tipo de hélice adotado por cada dois pares de bases consecutivos e não mais pela seqüência como um todo. Possibilita, por exemplo, identificar a transição B para A de dois pares de bases centrais em uma seqüência, mesmo que o restante da estrutura permaneça na forma B (o que não seria possível utilizando critérios como o número de pares de base por volta). Além de detalhar a análise, esses parâmetros também facilitam a identificação dos fatores que desencadeiam ou que estão envolvidos nos processos de transição, por meio da proposição de modelos teóricos.

Como exemplo, a figura 15 resume um dos modelos propostos por Calladine e Drew para a transição de B-DNA para A-DNA, através da variação dos parâmetros *Slide* e *Roll* (Calladine & Drew, 1984). Segundo os autores, em uma hélice tipo B (15a), a aplicação uniforme de *Slide* afastaria as bases do eixo central, criando a cavidade interna característica de uma hélice tipo A (15b). Alternativamente, a aplicação uniforme de *Roll* conferiria inclinação às bases, sem deslocá-las em relação ao eixo central (15c). A aplicação de *Roll* e de *Slide* concomitantemente resultaria em uma hélice familiar, que lembra muito a forma A, visto que as bases estão ao mesmo tempo afastadas e inclinadas em relação ao eixo central (15d).

É importante salientar que, embora constem nos programas de análise, nem todos os parâmetros definidos pela figura 12 são igualmente úteis na classificação conformacional de um fragmento de DNA. Ao contrário de *Slide* e *Roll*, há parâmetros que não se correlacionam significativamente com as propriedades conformacionais de cada tipo de hélice. *Tip* e *Opening*, por exemplo, não fornecem nenhuma contribuição para a estrutura adotada pela hélice (Dickerson, 1992). Outros parâmetros, como o parâmetro *Propeller Twist*, estão altamente correlacionados com a seqüência, e não tanto com a conformação (Calladine, 1982). Finalmente, mesmo entre os parâmetros correlacionados com a conformação (*Slide*, *Roll*, *Inclination*, *Twist*, *Rise*, entre outros), alguns podem se mostrar, na prática, fracos indicadores de conformação.

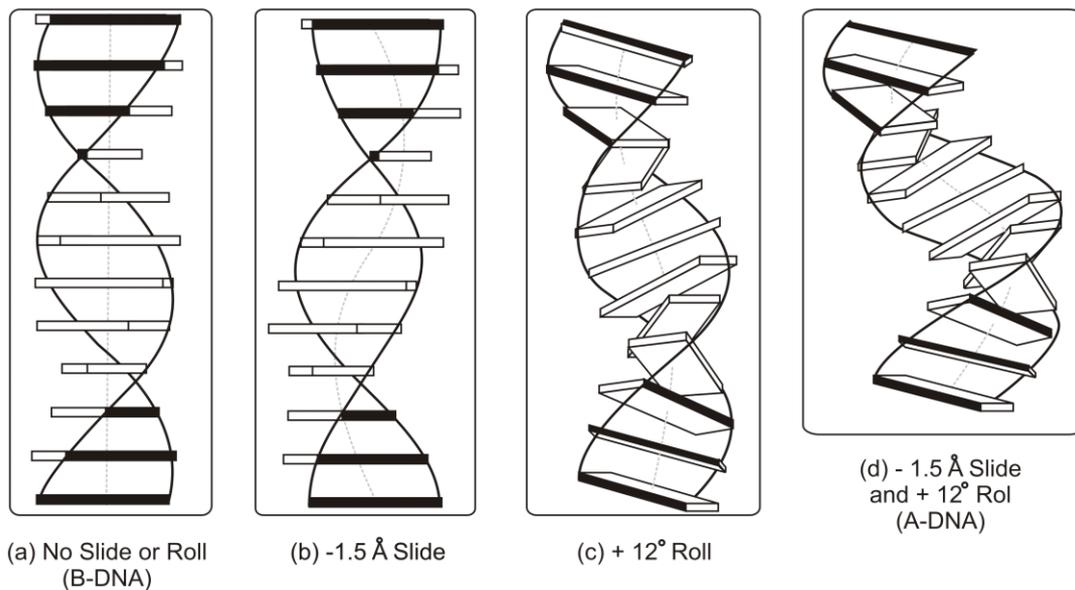


Figura 15. Conversão de uma hélice B em uma hélice A. (a) B-DNA idealizado. (b) estrutura intermediária após aplicação uniforme de -1.5 Å de *Slide*. (c) estrutura intermediária, após aplicação uniforme de +12° de *Roll*. (d) A-DNA idealizado após aplicação concomitante de -1.5 Å de *Slide* e +12° de *Roll*. Fonte: Dickerson & Ng, 2001.

De fato, durante os primeiros estudos cristalográficos de oligodinucleotídeos sintéticos, observou-se que, embora os valores médios para parâmetros de hélice se adequassem aos valores esperados para cada tipo de conformação, havia uma ampla variação em torno do valor médio (Dickerson, 1992). Essas variações decorrem do fato de o DNA não ser uma molécula estática e nem tão rígida como haviam sugerido as primeiras imagens de difração de raios-X. Em realidade, a estrutura está constantemente experimentando torções, distensões e curvaturas locais, sem que a estrutura global sofra mudanças significativas (Nelson & Cox, 2002).

Sendo assim, o parâmetro ideal seria aquele que cumpre os seguintes requisitos:

- considerando-se seqüências diferentes em uma mesma conformação, apresente a menor variação possível;
- considerando-se uma seqüência idêntica em conformações diferentes, apresente uma grande magnitude de variação entre as conformações.

O parâmetro *Twist*, por exemplo, varia de 35° a 45° nas hélices tipo B e de 30° a 33° nas hélices tipo A. A alta variação na conformação B (10°), se comparada à diferença que existe entre as médias das duas conformações (40°-31,5° = 8,5°), dificulta a identificação do tipo de hélice através do parâmetro *Twist* (Reddy *et al.*, 2003).

A tabela 2 apresenta os valores dos parâmetros referentes às bases para as formas canônicas A, B e Z. Os valores da tabela provêm da análise pelo 3DNA de três dodecâmeros (gerados pelo próprio programa) e da literatura.

Os parâmetros mais associados com a diferenciação entre as formas A e B consistem em: *X-displacement*, *Rise*, *Slide*, *Roll* e *Twist*. (Calladine & Drew, 1984; Dickerson *et al.*, 1992; Dickerson & Ng, 2001; Reddy *et al.*, 2003) O parâmetro *Inclination* também pode ser um bom indicador de conformação, visto que os pares de bases no B-DNA estão perpendiculares ao eixo da hélice e, no A-DNA, inclinados na faixa de 15° a 20°. No entanto, na análise de oligodinucleotídeos (segmentos curtos), o parâmetro *Inclination* é facilmente confundido com a curvatura local (Dickerson & Ng, 2001).

O *X-displacement* é especialmente citado na literatura por duas razões. Em primeiro lugar, porque ele torna o B-DNA uma “pilha” de pares de bases ao longo do eixo central hélice (com valor quase nulo de *X-displacement*) e confere ao A-DNA (com alto valor negativo *X-displacement*) a sua tão característica cavidade central (Dickerson & Ng, 2001). Em segundo, porque os valores de *X-displacement* influenciam diretamente nas dimensões dos sulcos maior e menor. Tanto a cavidade interior como as dimensões dos sulcos são características específicas de cada hélice, o que é reforçado pelo fato de que não costumam ocorrer valores intermediários de *X-displacement* nas análises cristalográficas de DNA (Dickerson, 1992).

Tabela 2. Comparação dos parâmetros referentes às bases para as formas canônicas A, B e Z.

Parâmetros	Formas canônicas		
	A-DNA	B-DNA	Z-DNA
(a)			
<i>Shear</i> (Sx) (Å)	0,00	0,00	0,00
<i>Stretch</i> (Sy) (Å)	-0,18	-0,10	-0,17
<i>Stagger</i> (Sz) (Å)	0,07	0,09	0,05
<i>Opening</i> (σ) ($^{\circ}$)	-1,29	-1,87	1,29
<i>Propeller Twist</i> (ω) ($^{\circ}$)	-10,52	-15,13	8,29
<i>Buckle</i> (κ) ($^{\circ}$)	0,00	0,00	0,00 *
(b)			
<i>Shift</i> (Dx) (Å)	0,00	0,00	0,00
<i>Slide</i> (Dy) (Å)	-1,36 (-1,7) ¹	0,45 (+0,4) ¹	1,57 *
<i>Rise</i> (Dz) (Å)	3,29 (2,56) ¹	3,36 (3,37) ¹	3,59
<i>Twist</i> (Ω) ($^{\circ}$)	30,49 (30$^{\circ}$-33$^{\circ}$) ¹	35,93 (35$^{\circ}$-45$^{\circ}$) ¹	-31,97 *
<i>Roll</i> (ρ) ($^{\circ}$)	12,44	1,71	-0,30 *
<i>Tilt</i> (τ) ($^{\circ}$)	0,00	0,00	0,00
(c)			
<i>X-displacement</i> (dx) (Å)	-4,42	0,48	-15,76 *
<i>Y-displacement</i> (dy) (Å)	0,00	0,00	0,00
<i>Tip</i> (θ) ($^{\circ}$)	0,00	0,00	0,00
<i>Inclination</i> (η) ($^{\circ}$)	22,59 (15$^{\circ}$ a 20$^{\circ}$) ²	2,77 (~0) ²	-11,49 *

Os valores médios resumidos na tabela são resultado de análises feitas pelo programa 3DNA. Três dodecâmeros foram analisados: um poli(dC-dG) na forma canônica A, um poli(dA-dT) na forma canônica B e um poli(dC-dG) na forma canônica Z. Os valores em negrito entre parênteses são dados da literatura para as respectivas formas canônicas.

(a) parâmetros referentes a duas bases complementares de um mesmo par.

(b) parâmetros referentes a dois pares de bases consecutivos.

(c) parâmetros referentes a um par de bases em relação ao eixo central.

* Valores médios que resultam de oscilações alternadas nos valores de pares de bases consecutivos, causadas pela forma em zigue-e-zague da cadeia principal do Z-DNA.

¹ Reddy *et al.*, 2003.

² Dickerson & Ng, 2001.

O parâmetro *Rise* também é descrito como um bom parâmetro de identificação por diferir significativamente entre a achatada forma A (2,56Å) e a alongada forma B (3,37Å), juntamente com o parâmetro *Slide*, cujos valores também diferem entre a forma A (-1,7 Å) e B (+0,4 Å), e que está correlacionado com o parâmetro *Twist* (Reddy *et al.*, 2003).

O parâmetro *Twist*, embora não seja um bom indicador individualmente, está altamente correlacionado com outros parâmetros relativos a pares de bases consecutivos. *Twist* correlaciona-se com *Rise* e *Roll* com coeficientes de correlação linear superiores a 0,90. Por essa razão, estabeleceram-se dois padrões que podem ser adotados pelas hélices de DNA: High *Twist* Profile (HTP), correspondente a altos valores de *Twist*, baixos valores de *Rise* e valores negativos de *Roll*; e Low *Twist* Profile (LTP), correspondente a baixos valores de *Twist*, altos valores de *Rise* e valores positivos de *Roll* (Yanagi *et al.*, 1991). Essas correlações se devem, em grande parte, ao comprimento finito da cadeia principal e por isso não ocorrem de forma significativa entre parâmetros relativos a pares de bases individuais (Dickerson, 1992).

Adicionalmente, *Twist* e *Roll* têm, segundo Dickerson o efeito de reorientar substancialmente potenciais aceptores e doadores de ligações de hidrogênio das bases que formam o interior dos sulcos. Sendo assim, podem também ter importância durante o processo de reconhecimento específico do DNA por fármacos e proteínas (Dickerson, 1992).

Quanto à forma Z, a sua identificação pode ser feita através de alguns dos parâmetros de base, como *Inclination* e *Twist*, cujos valores negativos indicam o sentido contrário das hélices em relação às formas A e B (tabela 2). No entanto, o fato de as bases púricas e pirimídicas adotarem no Z-DNA, as conformações *sin* e *anti* alternadamente (ver item 3.2) interfere com alguns dos parâmetros de bases. Os valores de *Slide*, *Twist* ou *Roll* para os pares GC/GC são diferentes dos valores para os pares de bases CG/CG (tabela 3). O resultado são valores distintos que se alternam ao longo da seqüência, sendo o valor médio não significativo. Por essa razão, as transições B→A e vice-versa em geral necessitam da análise dos parâmetros de base (Cheatham & Kollman, 1996; Feig & Pettitt, 1998) enquanto que as transições B→Z

costumam ser identificadas através das características da cadeia principal (Lim & Feng, 2005; Kastenholz *et al.*,2006), descritas no item 3.2.

Tabela 3. Valores de *Slide*, *Twist* e *Roll* para pares de bases em uma hélice Z.

Pares de bases	Parâmetros		
	<i>Slide</i> (Å)	<i>Roll</i> (°)	<i>Twist</i> (°)
1 GC/GC	-1,90	-5,13	-51,37 (-50) ¹
2 CG/CG	5,73	5,51	-8,71 (-10) ¹
3 GC/GC	-1,90	-5,13	-51,37 (-50) ¹
4 CG/CG	5,73	5,51	-8,71 (-10) ¹
5 GC/GC	-1,90	-5,13	-51,37 (-50) ¹
6 CG/CG	5,73	5,51	-8,71 (-10) ¹
7 GC/GC	-1,90	-5,13	-51,37 (-50) ¹
8 CG/CG	5,73	5,51	-8,71 (-10) ¹
9 GC/GC	-1,90	-5,13	-51,37 (-50) ¹
10 CG/CG	5,73	5,51	-8,71 (-10) ¹
11 GC/GC	-1,90	-5,13	-51,37 (-50) ¹
Valor médio	1,57	-0,30	-31,97

Os valores da tabela provêm de análises feitas pelo programa 3DNA para um dodecâmero poli(dC-dG) na forma canônica Z. Os valores em negrito entre parênteses são dados da literatura para seqüências poli(dC-dG) na forma Z.

¹ Dickerson, 1992.

3.2 Parâmetros relativos à cadeia principal

Embora a análise do DNA possa ser feita considerando apenas as bases de forma isolada, como no item anterior, o fato é que cada uma delas encontra-se ligada à cadeia principal. Portanto, quando duas bases ou mais bases se deslocam ou giram em torno de um de seus eixos, a cadeia principal sofre alterações a fim de se acomodar ao novo posicionamento das bases. Dessa forma, a estrutura do DNA também pode ser analisada através dos ângulos das ligações da cadeia principal e da conformação dos açúcares. A figura 16 apresenta os seis ângulos torcionais da cadeia principal propriamente dita (α , β , γ , δ , ϵ , ζ), o ângulo torcional da ligação glicosídica entre a base e o açúcar (χ) e a conformação do anel (desoxi)ribose, indicada pelo ângulo de pseudorrotação (P).

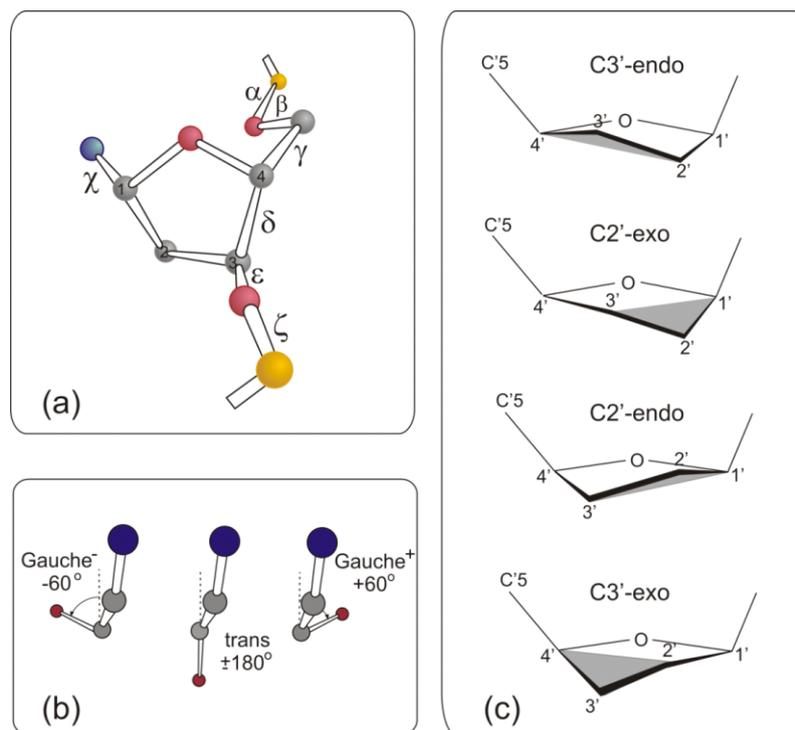


Figura 16. Definição dos ângulos relativos à cadeia principal e das conformações da (desoxi)ribose. (a) Localiza os ângulos torcionais da cadeia principal (de α a ζ) e da ligação glicosídica (χ). O ângulo χ envolve os átomos O1', C1', N9 e C4 no caso das bases púricas e O1', C1', N1, C2 no caso das pirimídicas. (b) Definição das posições *gauche*⁻ (em torno de -60°), *trans* (em torno de 180°) e *gauche*⁺ (em torno de 60°). (c) Conformações mais comuns para anel da (desoxi)ribose. Adaptado de: Dickerson *et al.*, 1982.

Os ângulos torcionais são classificados convencionalmente em três configurações: *gauche⁻* (em torno de -60°), *trans* (em torno de 180°) e *gauche⁺* (em torno de 60°), sendo que, no B-DNA, a configuração da cadeia principal é: $g^- (\alpha)$, $t (\beta)$, $g^+ (\gamma)$, $t (\delta)$, $t (\epsilon)$ e $g^- (\zeta)$, como está representada na figura 11a. (Dickerson & Drew, 1981). Na (desoxi)ribose, quatro dos cinco átomos encontram-se em um mesmo plano e o quinto átomo está no mesmo lado (endo) ou no lado oposto (exo) ao plano relativo ao carbono-5' (Nelson & Cox, 2002). As conformações são denominadas Xn' -endo ou Xn' -exo, em que Xn' identifica o átomo que se encontra fora do plano do anel (Dickerson et al., 1982).

Como foi observado por Dickerson *et al.* (1992), o fato de a estrutura da cadeia principal dos ácidos nucleicos ser definida por seis ângulos torcionais (α , β , γ , δ , ϵ , ζ) torna a sua análise conformacional mais complexa do que a de proteínas, que envolve apenas dois ângulos torcionais (ϕ e ψ). Por essa razão, não é factível plotar todos os ângulos torcionais dos ácidos nucleicos de forma análoga ao gráfico de Ramachandran que existe para proteínas.

No entanto, como ocorre nos parâmetros relativos às bases, também na cadeia principal há parâmetros mais relevantes que outros durante a diferenciação das conformações, pelas mesmas razões discutidas no item 3.1. Novamente, a identificação dos parâmetros mais correlacionados com o tipo de hélice facilita a análise. Na literatura, os parâmetros de cadeia mais citados para a classificação do tipo de hélice são: a conformação do açúcar e o ângulo torcional da ligação glicosídica (χ). (Dickerson *et al.*, 1982; Dickerson, 1992; van Wijk *et al.*, 1992; Dickerson & Ng, 2001; Reddy *et al.*, 2003; Foloppe & MacKerell Jr., 1999). É bem descrito também que o ângulo torcional δ (entre $C5'-C4'-C3'-O3$) está fortemente correlacionado com a conformação do anel da (desoxi)ribose (Prive *et al.*, 1991) e com o ângulo torcional da ligação glicosídica (χ) (Dickerson & Drew, 1981; Drew *et al.*, 1981). Portanto, conhecendo-se essas correlações, os valores de δ podem complementar a análise, especialmente quando a conformação do açúcar ou o ângulo χ não apontarem claramente para uma das formas (A, B e Z).

Tradicionalmente, o A-DNA apresenta o anel (desoxi)ribose nas conformações C3'-endo, enquanto que o B-DNA apresenta o anel (desoxi)ribose nas conformações C2'-endo. É importante salientar que a conformação C3'-endo é facilmente convertida na conformação C2'-exo: basta que a ligação C3'-C2' seja empurrada para baixo para que o C3' fique no plano do anel e o C2' abaixo (ou seja, no lado oposto ao plano do carbono-5') (Dickerson, 1992). Pelo mesmo mecanismo, a conformação C3'-exo pode ser obtida a partir da C2'-endo (ver figura 16c). Dessa forma, se considera que o anel (desoxi)ribose no A-DNA está constantemente alternando entre as conformações C3'-endo/C2'-exo e, no B-DNA, entre as conformações C2'-endo/C3'-exo. No Z-DNA, as (desoxi)riboses encontram-se em duas conformações distintas: C3'-endo nos resíduos púricos e C2'-endo nos resíduos pirimídicos. (Fuentes *et al.*, 2006). A figura 17 apenas ilustra como a mudança de conformação do açúcar se reflete no posicionamento da cadeia principal e das bases.

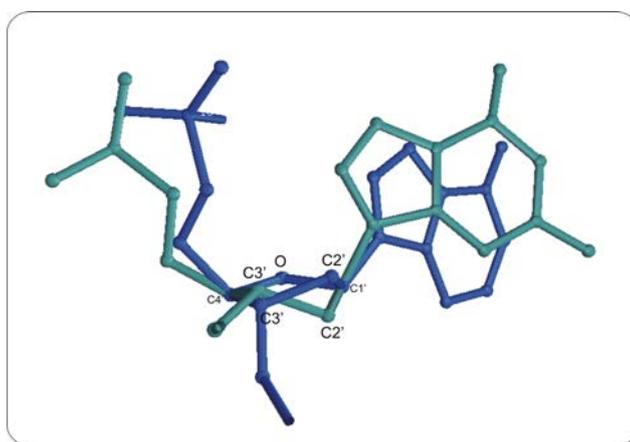


Figura 17. Sobreposição de nucleosídeos em diferentes conformações no anel (desoxi)ribose. Em lilás, nucleotídeo de uma hélice tipo B, com a (desoxi)ribose na conformação C2'-endo/C3'-exo. Em verde, nucleotídeo de uma hélice tipo A, com a (desoxi)ribose na conformação C3'-endo/C2'-exo. As duas estruturas foram alinhadas nos átomos C1', O e C4'.

O ângulo torcional χ é especialmente útil na identificação do Z-DNA, além de explicar algumas das propriedades únicas dessa conformação. A figura 18a mostra a conformação *anti* adotada pela ligação glicosídica nas

formas A e B-DNA ($\chi \sim 60^\circ$). A figura 18b mostra a conformação *sin* adotada pelas bases caso ambas girem aproximadamente 180° em torno da ligação glicosídica ($\chi \sim 210^\circ$). Observa-se, neste caso, que houve inversão do sentido das cadeias principais, que agora apresentam o sentido correto de uma hélice tipo Z.

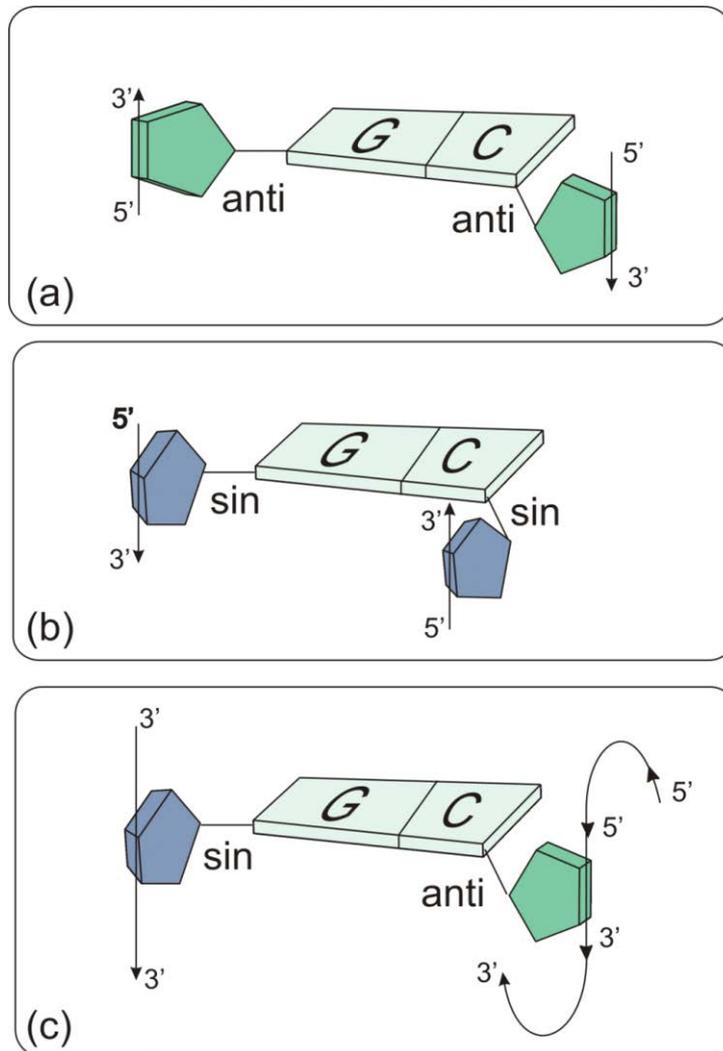


Figura 18. Relação entre a conformação da ligação glicosídica e o sentido das cadeias principais. (a) Ligações glicosídicas na conformação *anti*, com o sentido ($5' \rightarrow 3'$) da cadeia principal apontando para cima na esquerda e para baixo na esquerda (A- e B-DNA). (b) Ligações glicosídicas na conformação *sin*, após os anéis (desoxi)ribose girarem em 180° em torno da ligação glicosídica. O sentido da cadeia principal foi invertido: para baixo na esquerda e para cima na direita. Esse é o sentido da forma Z-DNA. (c) Ligações glicosídicas nas conformações *sin* (guanina) e *anti* (citosina). Há uma alteração local do sentido da cadeia direita, mas o sentido global das cadeias é: para baixo na esquerda, para cima na direita (Z-DNA). Modificado de: Dickerson, 1992.

No entanto, as citosinas não adotam a conformação *sin* devido ao conflito estérico que ocorre entre o açúcar e o anel de seis membros da base, ao qual está ligado. Nas guaninas isso não acontece, pois estão ligadas ao açúcar por um anel de cinco membros. Sendo assim, na forma Z-DNA (figura 18c), as guaninas encontram-se na conformação *sin*, enquanto que as citosinas encontram-se na conformação *anti*. Isso gera uma inversão local do sentido da hélice nas citosinas, que é o responsável pelo formato em zigue-e-zague da cadeia (Dickerson, 1992). Portanto, o ângulo torcional χ torna evidente uma razão pela qual o Z-DNA só ocorre em seqüências que alternam purinas e pirimidinas, mas não explica porque necessariamente em seqüências poli(dC-dG) e não seqüências poli(dA-dT).

Tanto a conformação do açúcar como o ângulo torcional χ podem ser relacionados com alguns dos parâmetros de bases, demonstrando como a cadeia principal se ajusta ao movimento das bases. Dickerson et al (2001) observaram que a conformação do açúcar correlaciona-se bem com o parâmetro de base *Slide* (ver item 3.1). Segundo eles, hélices com altos valores negativos de *Slide* adotam a conformação C3'-endo, associada à forma A-DNA, enquanto que hélices com valores baixos ou nulos de *Slide* tendem a adotar a conformação C2'-endo (ou C3'-exo). A figura 19 mostra que a base, ao sofrer *Slide* negativo, força o anel (desoxi)ribose contra o grupamento fosfato. Segundo os autores, a pressão gerada pode ser aliviada se o carbono C3' se afastar do plano do anel na direção contrária ao grupamento fosfato, ou seja, para o lado do plano do carbono 5' (lado endo) (Dickerson & Ng, 2001).

A figura 20 ilustra como o ângulo torcional χ está relacionado com o parâmetro de base *Roll* (ver item 3.1). Considerando que as ligações glicosídicas (C1'-N) estão inclinadas em relação ao plano do anel (desoxi)ribose devido à geometria tetraédrica do carbono-1', quando os anéis (desoxi)ribose do par de bases (2) giram em torno das ligações glicosídicas (figura 20b), a extremidade N das ligações são empurradas para baixo. Isso significa que o par de bases (2) se inclina, com a lateral mais próxima do sulco maior se distanciando do par de bases (1) (*Roll* positivo) e se aproximando do par de bases (3) (*Roll* negativo) (Dickerson & Drew, 1981). O efeito oposto

seria obtido se a variação de χ fosse negativa na cadeia da esquerda e positiva na cadeia da direita (ao contrário da figura 20b).

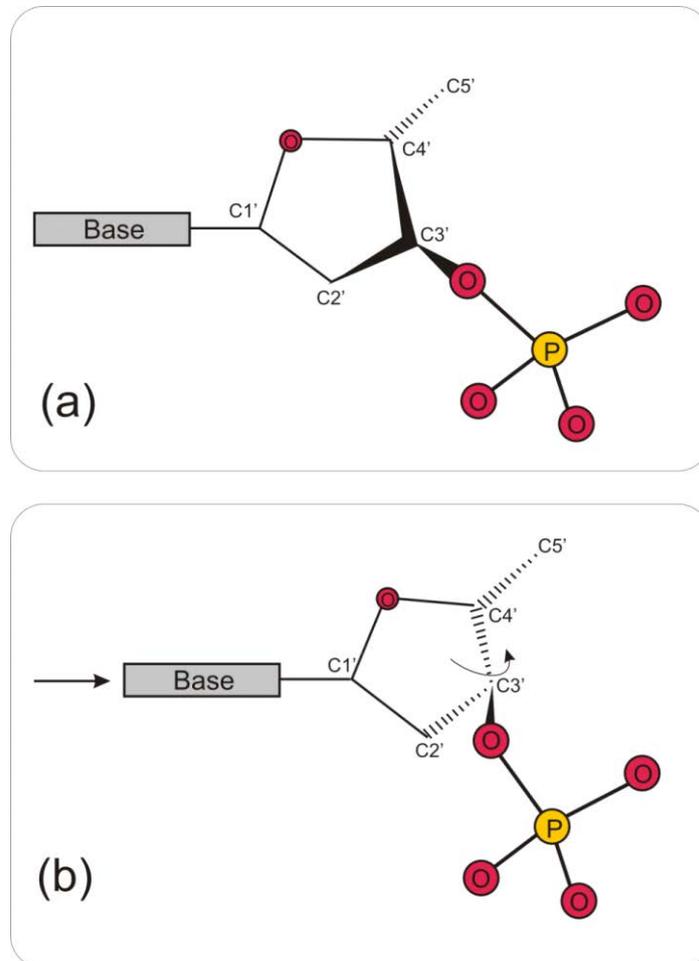


Figura 19. Correlação entre a conformação do anel (desoxi)ribose e o parâmetro de base *Slide*. (a) Nucleotídeo na conformação B-DNA, com valor praticamente nulo de *Slide* e com o anel da (desoxi)ribose na conformação C3'-exo. (b) O valor negativo de *Slide* força o anel (desoxi)ribose contra o grupamento fosfato. A pressão é aliviada permitindo que o carbono-3' se mova para trás, se afastando do fosfato e adotando a conformação C3'-exo.

A tabela 4 apresenta os valores dos ângulos torcionais da cadeia principal, bem como as conformações adotadas pelo anel da desoxi(ribose) nas formas canônicas A, B e Z. Os dados contidos na tabela provêm da análise pelo 3DNA para os mesmos três dodecâmeros analisados na tabela 2 e da literatura. Devido à irregularidade da hélice Z, os dados para nucleotídeos púricos e pirimídicos estão especificados em colunas distintas.

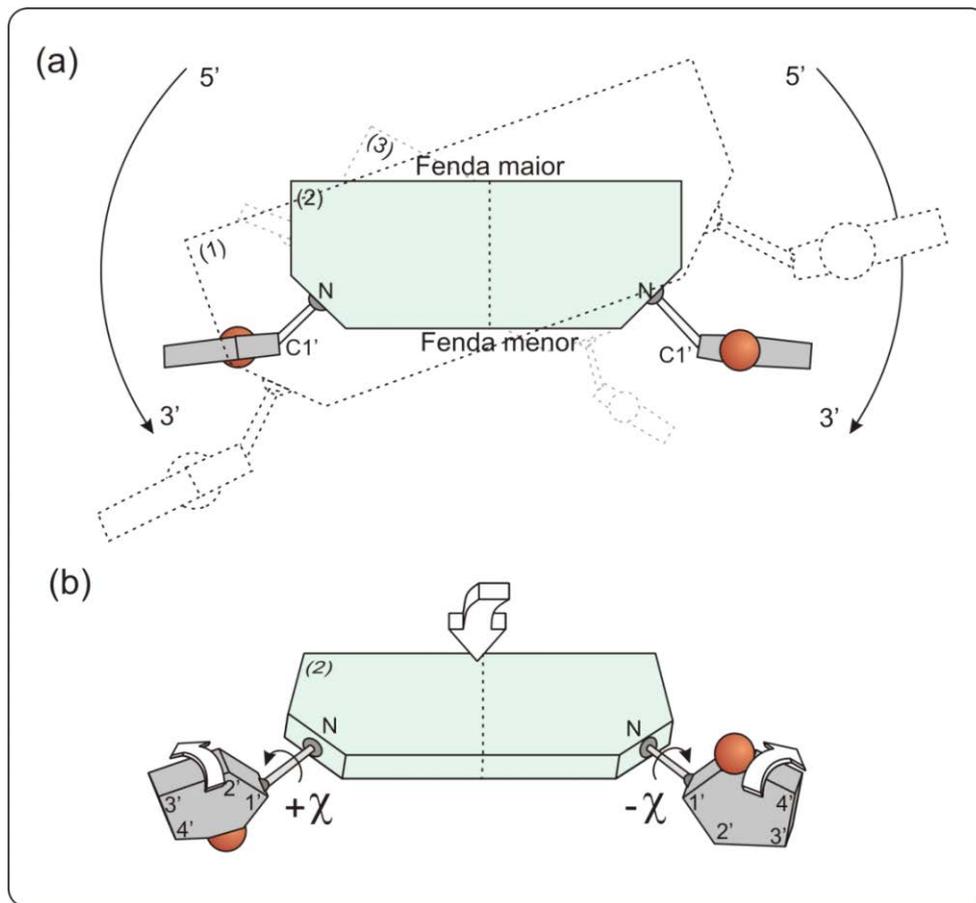


Figura 20. Conseqüências da variação de χ no parâmetro de base *Roll*. (a) Vista axial de uma trinca de pares de bases representados esquematicamente. O par de bases (1) encontra-se acima (saindo da página) e o par de bases (3) encontra-se abaixo (entrando na página) do par de bases (2). As flechas indicam direção 5'→3' das cadeias principais. Os oxigênios do anel (desoxi)ribose estão representados por esferas vermelhas. (b) Os anéis (desoxi)ribose giram em torno da ligação glicosídica (χ positivo na cadeia da esquerda e χ negativo na cadeia da direita). Devido à geometria tetraédrica de C1', a extremidade N das ligações glicosídicas são empurradas para baixo (entrando na página). O par de bases (2) inclina-se de forma que a lateral mais próxima do sulco maior se encontra agora mais distante do par (1) (*Roll* positivo) e mais próxima do par (3) (*Roll* negativo). Modificado de: Dickerson & Ng, 2001.

Tabela 4. Comparação dos parâmetros referentes à conformação da cadeia principal para as formas canônicas A, B e Z.

Parâmetros	Formas canônicas			
	A-DNA	B-DNA	Z-DNA*	
			Púricas (G)	Pirimídicas (C)
Cadeia principal				
α (°)	-51,7	-29,9	52,0	-139,5
β (°)	174,8	136,4	179,0	136,7
γ (°)	41,7	31,1	-173,8	50,9
δ (°)	79,0 (83) ²	143,3 (144) ²	94,9	137,6
ε (°)	-47,8	-140,8	-103,6	-96,5
ζ (°)	-75,1	-160,5	-64,8	82,0
Ligação glicosídica				
χ (°)	-157,2	-98,0	58,7 (60,0)	-154,3
Conformação	(<i>Anti</i>) ^{1,2}	(<i>Anti</i>) ^{1,2}	(<i>Sin</i>) ^{1,2}	(<i>Anti</i>) ^{1,2}
Anel (desoxi)ribose				
P (°)	8,0 (18,0) ²	153,9 (162,0) ²	27,5 (-1) ²	150,1 (152) ²
Conformação	C'3-endo	C2'-endo	C3'-endo	C2'-endo

Os dados resumidos na tabela resultam de análises feitas pelo programa 3DNA. Três dodecâmeros foram analisados: um poli(dC-dG) na forma canônica A, um poli(dA-dT) na forma canônica B e um poli(dC-dG) na forma canônica Z. Os dados em negrito entre parênteses são dados da literatura para as respectivas formas canônicas.

* Devido à irregularidade da hélice Z - os nucleotídeos púricos e pirimídicos alternados assumem conformações diferentes - os dados para nucleotídeos púricos e pirimídicos estão especificados em colunas distintas.

¹ Dickerson et al., 1982

² Dickerson, 1992

4. Ocorrência e papel biológico das formas A e Z

Após as evidências de que o DNA poderia adotar mais de uma conformação, alguns fatores ambientais logo se tornaram conhecidos por induzir e/ou estabilizar as principais conformações. Em 1953, Franklin identificou o primeiro desses fatores, ao observar que a diminuição da umidade relativa (em torno de 75%) favorecia a forma A-DNA, enquanto que o aumento da umidade relativa (em torno de 92%) favorecia a ocorrência da forma B (Franklin & Gosling, 1953). Uma das hipóteses que explicam esse fenômeno se baseia no fato de que o aumento do percentual de água no meio força o DNA a adotar uma conformação na qual as bases nitrogenadas (hidrofóbicas) tenham menor contato com o solvente. A diminuição da superfície acessível ao solvente pode ser obtida com a diminuição de *Twist* e *Slide*, ou seja, com a adoção da forma B-DNA (Hunter, 1993).

Já em 1972, Pohl e Jovin descobriram que, em soluções com altas concentrações de íons (NaCl, 4 M), o DNA podia assumir uma nova conformação, que mais tarde ficou conhecida como Z-DNA. Logo se tornou evidente que a sua ocorrência no meio de cristalização se devia à presença de íons em solução (Wang *et al.*, 1979; Thamann *et al.*, 1981). Devido à forma em zigue-e-zague da cadeia principal, os fosfatos encontram-se mais próximos uns dos outros na forma Z (em média 5,1 Å) do que ocorre na forma B (6,6 Å) ou na forma A (5,3 Å) (Barciszewski *et al.*, 1999). A repulsão eletrostática entre esses grupamentos carregados negativamente torna a conformação Z menos estável em solução aquosa do que as formas A e B. No entanto, na presença de altas concentrações de cátions, a repulsão entre os fosfatos é minimizada, estabilizando a conformação Z (Rich & Zhang, 2003).

A intensidade das interações eletrostáticas também varia de acordo com a constante dielétrica do meio. Na presença de solventes cujas constantes dielétricas são menores do que a da água, o efeito hidrofóbico das bases - que força a transição A→B com o aumento da umidade relativa - torna-se menos relevante (Hunter, 1993). Por outro lado, intensifica-se a atração eletrostática entre os grupamentos fosfatos do DNA e os cátions em solução, o que

favorece e estabiliza a conformação Z (Ivanov & Kyylov, 1992). De fato, estudos mostraram que a presença de álcoois em solução é um fator que favorece tanto a forma A como a forma Z-DNA (Thamann *et al.*, 1981).

Sendo assim, os primeiros fatores ambientais indutores e/ou estabilizadores das formas A e Z consistiam em: diminuição da umidade relativa; altas concentrações de íons; e presença de álcoois em solução. Considerando que estas são condições características dos meios de cristalização (e não do meio celular), tornou-se bem estabelecido que o B-DNA é a forma mais representativa *in vivo*, enquanto a ocorrência das formas A e Z foi inicialmente encarada com ceticismo, por parecer restrita aos meios de cristalização.

No entanto, à medida que os estudos com ácidos nucléicos avançavam, se tornou evidente que a ocorrência das formas A e Z dependia também de fatores estruturais, além dos ambientais. Em 1984, Calladine e Drew estabeleceram que a forma adotada por um segmento de DNA dependia da seqüência dos pares de bases: seqüências poli(dA)•poli(dT) permaneciam na forma B-DNA, mesmo em condições de muito baixa umidade relativa; seqüências poli(dA-dT)•poli(dA-dT) ou poli(dG-dC)•poli(dG-dC) sofriam transições de B para A com a diminuição da umidade relativa e; por fim, seqüências poli(dG)•poli(dC) favoreciam a forma A, mesmo com a umidade relativa elevada. Ou seja, alguns tipos de seqüências determinam uma propensão local à adoção de certas conformações. A forma Z-DNA está praticamente restrita a seqüências que alternem purinas e pirimidinas, especialmente, poli(dG-dC)•poli(dG-dC) (Rich & Zhang, 2003; Fuertes *et al.*, 2006).

Outros fatores estruturais como estresse topológico causado pelo superespiralamento negativo das hélices ou alterações químicas dos nucleotídeos também podem diminuir a estabilidade da forma B-DNA e estabilizar a forma Z-DNA (Rich & Zhang, 2003; Fuertes *et al.*, 2006). A metilação da citosina, que é de ocorrência comum no DNA de eucariotos, estabiliza a forma Z, diminuindo a concentração de íons necessária para a transição B→Z. Dessa forma, polinucleotídeos metilados poli(dG-m⁵dC)•poli(dG-m⁵dC) são capazes de adotar a forma Z em condições próximas

às do meio celular, o que não ocorre com polinucleotídeos poli(dG-dC)•poli(dG-dC) (Behe & Felsenfeld, 1981).

Considerando-se que a seqüência é uma propriedade intrínseca da molécula, e que o estresse topológico, bem como algumas modificações químicas, são eventos que ocorrem *in vivo*, a hipótese de que a existência das formas A e Z se restringia às condições de cristalização perdeu força. Nesse período, foram também descobertas moléculas presentes no meio celular que são capazes de induzir transições conformacionais. Algumas poliaminas como espermina, espermidina e putrescina, por serem cátions polivalentes, são excelentes promotores da conversão B→Z em seqüências propensas a adotar a forma Z-DNA (Thomas & Messner, 1986; Thomas *et al.*, 1991; Thomas & Thomas, 1994). A espermina e a espermidina são capazes também de induzir a transição de B→A, possivelmente por razões estereoquímicas, segundo os autores (Minyat *et al.*, 1979).

A ocorrência da forma Z-DNA *in vivo* foi confirmada em 1983. Em um estudo com DNA plasmidial de células de *Escherichia coli*, observou-se que seqüências poli(dG-dC)•poli(dG-dC) adotavam a conformação Z quando a síntese de proteínas estava inibida. Na ausência de inibidores de síntese protéica, por outro lado, as seqüências permaneciam na conformação B usual (Haniford & Pulleyblank, 1983).

A partir de então, foi aceito o fato de que certas seqüências são capazes de adotar, mesmo *in vivo*, conformações não usuais do DNA. A questão que já havia sido levantada e que continua em aberto até hoje é: qual a função dessas conformações *in vivo*?

A tabela 5 resume as principais evidências encontradas na literatura atualmente para (1) envolvimento das conformações A e Z em eventos celulares; (2) reconhecimento específico e/ou indução dessas conformações por outras moléculas; e (3) envolvimento dessas conformações em processos patológicos, que serão todas discutidas a seguir.

Tabela 5. Evidências da literatura para possíveis papéis biológicos das formas A e Z.

Evidências	A-DNA	Z-DNA
(1)	Transcrição gênica ¹ (híbridos RNA-DNA) Proteção contra radiação UV ^{2,3}	Transcrição Gênica ^{10,11,12} Regulação da transcrição Gênica ^{13,14} Recombinação genética ^{15,16,17} Mutagênese ^{18,19}
(2)	Poliaminas ⁴ SASP ^{2,3} (<i>Small Soluble-Acid Protein</i>) TBP ^{5,6} (<i>TATA-box Binding Protein</i>) CRP ⁷ (<i>Cyclic AMP Receptor Protein</i>) Neomicina ⁸ Sac7d ⁹	Poliaminas ^{20,21,22} <i>Anticorpos</i> ^{23,24} RecA ^{25,26} Rec1 ^{17,27} ADAR1 ^{28,29,30,31} (<i>double-stranded RNA adenosine deaminase</i>) DML1 ³² E3L ^{29,33,34}
(3)		Lupus eritematoso sistêmico ^{35,36} Doenças associadas a instabilidades cromossomais ¹⁹ (leucemias e linfomas) ¹⁸ Doença de Alzheimer ³⁷

(1) envolvimento em processos celulares

(2) moléculas capazes de reconhecer especificamente e/ou induzir as conformações

(3) participação em estados patológicos

¹ Ivanov & Krilov, 1992.

² Nicholson *et al.*, 1991

³ Mohr *et al.*, 1991

⁴ Minyat *et al.*, 1979

⁵ Kim *et al.*, 1993a

⁶ Kim *et al.*, 1993b

⁷ Ivanov *et al.*, 1995

⁸ Robinson & Wang, 1996

⁹ Dóstal *et al.*, 1998

¹⁰ Wittig *et al.*, 1991

¹¹ Rich & Zhang, 2003

¹² Fuertes *et al.*, 2003

¹³ Herbert & Rich, 1999

¹⁴ Oh *et al.*, 2002

¹⁵ Bullock *et al.*, 1986

¹⁶ Treco & Arnheim, 1986

¹⁷ Wahls *et al.*, 1990

¹⁸ Wang *et al.*, 2006

¹⁹ Wells, 2007

²⁰ Thomas & Messner, 1986

²¹ Thomas *et al.*, 1991

²² Thomas & Thomas, 1994

²³ Lafer *et al.*, 1981

²⁴ Moller *et al.*, 1982

²⁵ Blaho & Wells, 1987

²⁶ Kim *et al.*, 1989

²⁷ Kmiec *et al.*, 1985

²⁸ Herbert *et al.*, 1995

²⁹ Herbert *et al.*, 1997

³⁰ Berger *et al.*, 1998

³¹ Schwartz *et al.*, 1999

³² Schwartz *et al.*, 2001

³³ Brandt & Jacobs, 2001

³⁴ Schwartz *et al.*, 2001

³⁵ Thomas *et al.*, 1988

³⁶ Thomas *et al.*, 1990

³⁷ Suram *et al.*, 2002

As primeiras evidências de um papel biológico da forma Z-DNA se deram com a descoberta de que esta conformação é induzida *in vivo* por super-espiralamento negativo (Nordheim *et al.*, 1982; Peck *et al.*, 1982), em seqüências que alternam bases púricas e pirimídicas (poli(dG-dC)_n, poli(dA-dT)_n ou poli(dC-dA)_n). O super-espiralamento negativo, por sua vez, pode ser causado pela ligação de proteínas ao DNA, entre elas, enzimas envolvidas no processo de transcrição. As RNA polimerases, por exemplo, ao avançarem por um segmento de DNA geram super-espiralamento positivo à frente (3') e super-espiralamento negativo atrás (5') (Liu & Wang, 1987). A formação do Z-DNA ameniza o super-espiralamento negativo, e a energia liberada é utilizada para estabilizar a conformação Z (Fuentes *et al.*, 2006; Wells, 2007).

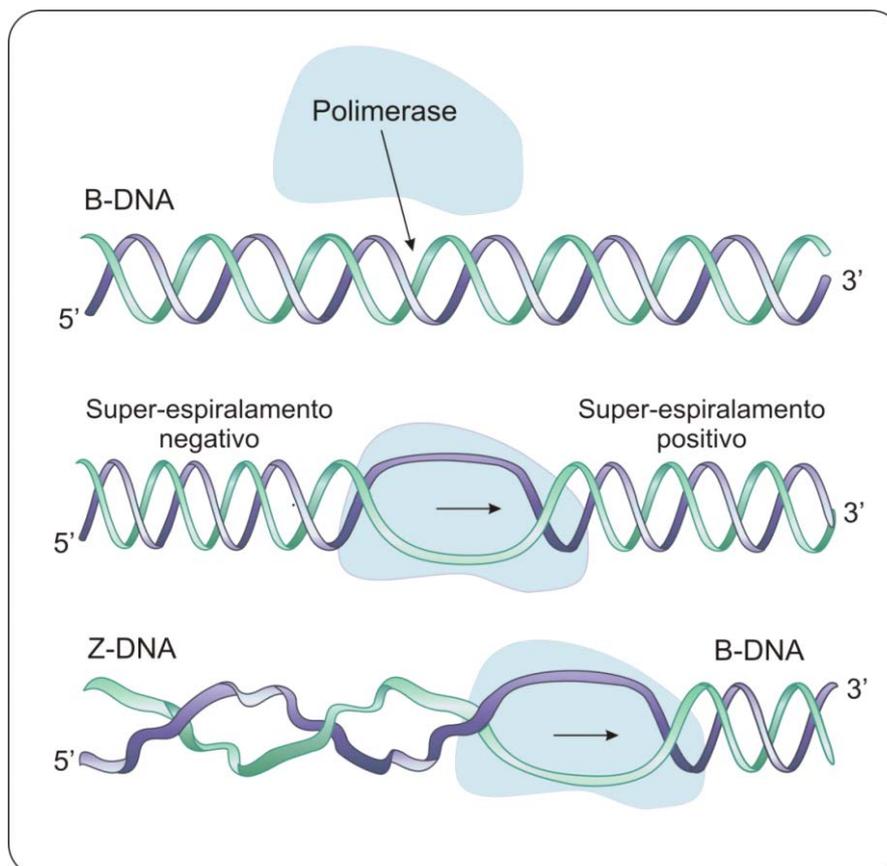


Figura 21. Formação de Z-DNA induzida por superespiralamento negativo. Ilustração esquemática mostrando que uma polimerase, ao avançar por um segmento de DNA (no sentido 5' → 3'), provoca super-espiralamento nas regiões adjacentes ao local de ligação (positivo à frente e negativo atrás). A energia do super-espiralamento negativo é utilizada para estabilizar a forma Z-DNA, que diminui o estresse torcional.

Tanto o super-esprialamento negativo, como as seqüências que favorecem o Z-DNA, estão relacionados com o processo transcrição gênica. Nas bactérias, já está bem estabelecido que o super-esprialamento do DNA é um dos principais fatores que regulam a transcrição gênica (Travers & Muskhelishvili, 2007). Segundo os autores, é bastante provável que o mesmo ocorra para os eucariotos, visto que o super-esprialamento interfere com o nível de torção das hélices (*Twist*) que, por sua vez é um fator fundamental de regulação da transcrição, comum em procariotos e eucariotos (o aumento de *Twist* está associado ao enovelamento da cromatina e silenciamento da transcrição, enquanto que a diminuição de *Twist* promove desenovelamento da cromatina e capacidade de transcrição).

As seqüências indutoras da conformação Z, além de amplamente dispersas no DNA de eucariotos, incluindo o genoma humano (Hamada *et al.*, 1982; Hamada & Kakunaga, 1982), parecem ocorrer de forma não-randômica. Em um estudo com 98 genes que apresentavam seqüências formadoras de Z-DNA, observou-se que essas seqüências específicas são em torno de dez vezes mais freqüentes nas regiões 5' dos genes do que nas regiões 3'. Ou seja, as seqüências formadoras de Z-DNA se localizam especialmente onde se inicia o processo de transcrição e também onde o super-esprialamento negativo é mais intenso (Schroth *et al.*, 1992).

Em 1991, estudos em células de mamíferos com *anticorpos* específicos para Z-DNA comprovaram que altas proporções de Z-DNA estão associadas a altos níveis de transcrição. No entanto, durante a replicação celular (em que os níveis de transcrição são baixos), praticamente não ocorre formação de Z-DNA. Foi também constatado que, quando a transcrição é impedida por inibidores de transcrição, a proporção de Z-DNA cai consideravelmente (o que não ocorre com inibidores da replicação) (Wittig *et al.*, 1991).

Considerando-se, portanto, que o Z-DNA ocorre durante a transcrição gênica, existe a hipótese de que essa conformação atue como um regulador negativo desse processo. A RNA polimerase de *E. coli*, por exemplo, não é capaz de transcrever segmentos de DNA quando estes adotam a conformação Z. Ou seja, a formação de Z-DNA na porção recém transcrita por uma RNA

polimerase (5'), impede que uma segunda RNA polimerase transcreva novamente aquele trecho do gene (ao menos até que uma topoisomerase alivie o superespiralamento) (Herbert & Rich, 1999 apud Peck & Wang, 1985).

Além disso, a formação do Z-DNA também pode aliviar o estresse topológico que ocorre durante processos de recombinação genética, quando duas ou mais hélices de diferentes segmentos de DNA são entrelaçadas, como é o caso das junções Holliday (Wahls *et al.*, 1990; revisado por Herbert & Rich, 1999). Um possível mecanismo para essa estabilização de hélices heterogêneas está exemplificado na figura 22.

De fato, seqüências poli(dG-dT)•poli(dA-dC) e poli(dG-dC)•poli(dG-dC) são conhecidas por induzir recombinação genética *in vivo* entre segmentos homólogos de DNA (Bullock *et al.*, 1986; Treco & Arnheim, 1986; Wahls *et al.*, 1990). Estudos com enzimas envolvidas no processo de recombinação genética reforçam essa hipótese. A enzima *rec1*, de *Ustilago maydis*, se liga cerca de 75 vezes mais intensamente em segmentos Z do que em segmentos B-DNA e é capaz de promover o pareamento homólogo entre duas duplas fitas contendo Z-DNA. Além disso, há evidências de que *rec1* induz a formação de Z-DNA nas junções entre segmentos distintos de DNA durante o processo de recombinação (Wahls *et al.*, 1990 apud Kmiec *et al.*, 1985). Também no caso da enzima *recA*, de *E. coli*, a ligação ao DNA aumenta quando segmentos B-DNA são substituídos por segmentos Z-DNA (Blaho & Wells, 1987; Kim *et al.*, 1989).

Adicionalmente, sabe-se que a formação de estruturas não-B (cruciformes, triplex, tetraplex, entre outras) incluindo o Z-DNA são mutagênicas e estão correlacionadas com pontos de instabilidade cromossomal que, por sua vez, estão associados a uma série de doenças genéticas, neurológicas e psiquiátricas (Wells, 2007). Segundo Wang *et al.*, seqüências formadoras da conformação Z-DNA induzem altos níveis de instabilidade genética, tanto em bactérias como em células de mamíferos, que resultam em deleções e translocações características de certas leucemias e linfomas (Wang *et al.*, 2006). Portanto, por ser recombinogênico, o Z-DNA pode estar envolvido também em processos patológicos.

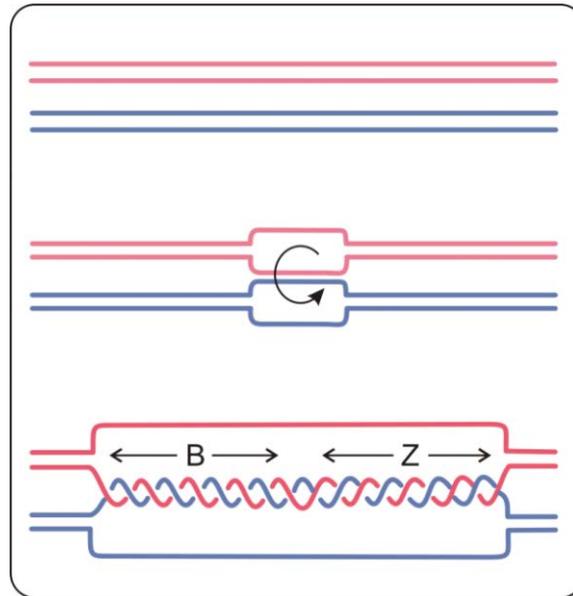


Figura 22. Mecanismo pelo qual o Z-DNA pode promover recombinação homóloga. Representação esquemática de duas duplas fitas homólogas de DNA. A formação de Z-DNA pode aumentar a extensão da junção entre os segmentos homólogos por rotação compensatória das fitas envolvidas. Isso permite que a extensão da junção aumente, sem aumentar o estresse topológico ou requerer rotação livre das moléculas de DNA envolvidas. Adaptado de: Wahls *et al.*, 1990.

Em contraste com a forma Z-DNA, muito pouco se sabe acerca da ocorrência *in vivo* da forma A-DNA. É suposto que ela também ocorra transitoriamente durante a transcrição, pois a conformação A é a mais estável para o RNA em condições fisiológicas (no anel ribose de RNA, a hidroxila extra do carbono-2' não se ajusta adequadamente ao pequeno espaço destinado a ela na conformação B). Por essa razão, em duplas hélices híbridas (RNA-DNA), a fita de DNA é forçada a adotar a conformação A, induzida pela fita complementar de RNA (Ivanov & Krylov, 1992). No entanto, diferentemente do caso do Z-DNA, os dados até agora referentes ao A-DNA não sugerem nenhum papel de regulação na transcrição gênica ou em qualquer outro evento celular. No entanto, é bastante provável que a conformação A-DNA possua algum papel de proteção ao material genético, por ser mais resistente a alguns danos causados por radiação ultravioleta (UV) do que a conformação B (a conformação A dificulta, por exemplo, a formação de dímeros de timina por questões estéricas) (Nicholson *et al.*, 1991).

Em 1991, estudos com proteínas do esporo de *Bacillus subtilis* (Small-Acid Soluble Proteins, ou SASP's) demonstraram que essas proteínas se ligam e induzem uma transição conformacional B→A no DNA bacteriano. As SASP, que constituem cerca de 20% do material protéico do esporo maduro, conferem aos esporos elevada resistência à radiação UV que, segundo os autores, decorre justamente da formação do A-DNA (Mohr *et al.*, 1991; Nicholson *et al.*, 1991). Estas foram as primeiras proteínas descobertas capazes de induzir e estabilizar a conformação A-DNA.

A descoberta de proteínas capazes de se ligar ao Z-DNA já havia ocorrido em meados de 1980, quando se descobriu que era possível produzir anticorpos que reconheciam especificamente Z-DNA (Lafer *et al.*, 1981; Moller *et al.*, 1982). Esses anticorpos se ligavam mais intensamente a genes ativamente transcritos, reforçando o envolvimento da forma Z na transcrição (revisado por Rich & Zhang, 2003). A existência de anticorpos anti-Z-DNA, além de possibilitar a identificação do Z-DNA *in vivo* através de imuno-ensaios (Jimenez-Ruiz *et al.*, 1991; Wittig *et al.*, 1991), sugere a participação dessa conformação também em doenças autoimunes.

De fato, os anticorpos no soro de pacientes com lúpus eritematoso sistêmico são altamente específicos para polinucleotídeos na forma Z-DNA (Thomas *et al.*, 1988; Thomas *et al.*, 1990). A possibilidade de um caráter patológico dessa conformação (ou de suas moléculas indutoras) foi reforçada quando o Z-DNA foi associado à doença de Alzheimer (Suram *et al.*, 2002). Suram *et al.* observaram que o DNA extraído do hipocampo de cérebros severamente afetados pela doença adota o padrão característico da forma Z-DNA (com inversão do sentido das hélices), enquanto que, em cérebros jovens e não afetados, o DNA adota a conformação B usual. Segundo os autores, a conformação alterada do DNA teria sérias implicações durante a expressão gênica. De fato, Oh *et al.* demonstraram que algumas proteínas que se ligam ao Z-DNA são efetoras da expressão gênica *in vivo*, e que apenas a formação de Z-DNA já é suficiente para aumentar os níveis de transcrição gênica (Oh *et al.*, 2002).

Atualmente, sabe-se da existência de uma série de proteínas capazes de ligar especificamente a Z-DNA, que reforçam o envolvimento dessa

conformação em processos de transcrição gênica e de recombinação genética, muitas vezes associada também a estados patológicos. A mais estudada é uma enzima nuclear capaz de editar RNA, chamada *double-stranded RNA adenosine deaminase* ou ADAR1, descoberta em 1995 (Herbert *et al.*, 1995). Inicialmente, essa enzima foi isolada do tecido pulmonar de galinhas, porém, hoje se sabe que uma enzima homóloga (*hADAR1*) existe em humanos e está presente em uma ampla variedade de tecidos (Berger *et al.*, 1998).

A ADAR1 se liga em duplas fitas de RNA e catalisa uma reação de desaminação hidrolítica no carbono-6 das adenosinas, convertendo-as em inosina (figura 23). Considerando que os ribossomos interpretam inosina como guanosina, será alterada a seqüência de aminoácidos da proteína expressa a partir de um gene editado pela ADAR1. Ou seja, enzimas editoras de RNA como ADAR1 são capazes de aumentar a diversidade de proteínas que podem ser transcritas a partir de um mesmo locus (Rich & Zhang, 2003).

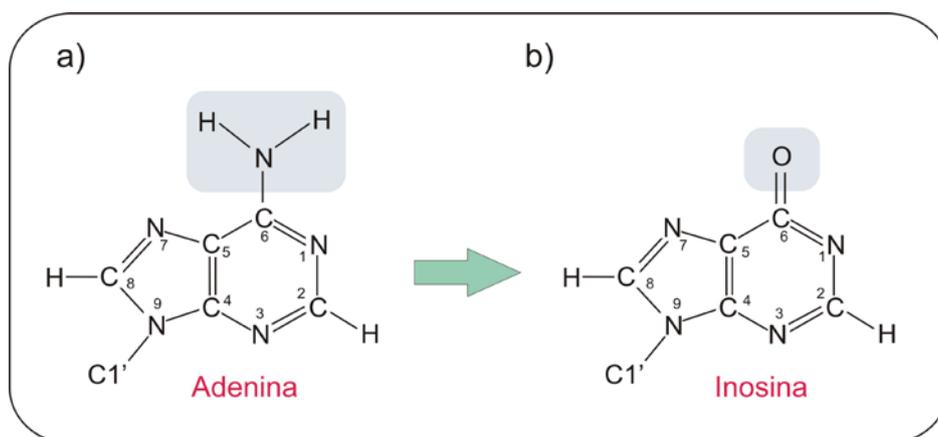


Figura 23. Estrutura química das bases nitrogenadas adenina e inosina. A conversão de adenina (a) em inosina (b) pode ser obtida pela substituição do grupamento amina em C6 por um grupamento carbonila.

Com a descoberta de que a ADAR1, além de se ligar ao Z-DNA, é também capaz de estabilizar trechos de DNA nessa conformação (Berger *et al.*, 1998), hipóteses foram propostas visando compreender de que forma a especificidade pela conformação Z poderia contribuir para a atividade dessa enzima. A primeira delas supõe que a especificidade por Z-DNA seja um meio

de “endereçar” rapidamente a ADAR1 para trechos de DNA ativamente transcritos (em que ocorre maior formação de Z-DNA). Além disso, a estabilização de um segmento de DNA na conformação Z pela energia de ligação da enzima pode ser um mecanismo de impedir que aquele trecho seja novamente transcrito até que termine o processo de edição (Herbert *et al.*, 1995). Em ambas hipóteses, a atividade enzimática de ADAR1 estaria sendo modulada pela formação de Z-DNA.

Em estudos posteriores, foi localizado o domínio específico da ADAR1 responsável pela ligação ao Z-DNA, que foi chamado de $Z\alpha_{ADAR1}$ e está localizado próximo à região N-terminal (Herbert *et al.*, 1997). Em 1999, quando esse domínio foi co-cristalizado com o hexâmero poli(dC-dG)₃, a conformação adotada pelo DNA mostrou-se idêntica à do primeiro fragmento de Z-DNA, descoberto em 1979 (Wang *et al.*, 1979). Observou-se que a interação entre $Z\alpha$ e o DNA ocorre principalmente através dos fosfatos da cadeia principal, ao passo que há uma única interação entre o domínio $Z\alpha$ e uma das bases nitrogenadas (uma guanina na posição *sin*) (Schwartz *et al.*, 1999). Considerando-se que o formato em zigue-e-zague da cadeia principal, bem como a orientação *sin* das guaninas, são características da conformação Z, tornou-se evidente que a especificidade da enzima ADAR1 é pela conformação em si, e não pela seqüência.

Finalmente, foi descoberto que o domínio $Z\alpha$ da ADAR1, ao se ligar a duplas hélices de RNA, também induz o RNA a adotar a conformação Z (transição A→Z), de forma muito semelhante do que ocorre com o DNA (Brown *et al.*, 2000). Nesse mesmo trabalho, os autores mencionam que alguns vírus de RNA, ao invadirem as células do hospedeiro, provocam o aumento da expressão de enzimas como a ADAR1. Segundo os autores, interferindo no sistema de replicação do vírus, a ADAR1 induz hipermutações no RNA viral, que podem vir a ser prejudiciais ao vírus. Dessa forma, servindo de alvo à ADAR1, a conformação Z-DNA pode ter um papel importante na defesa celular contra infecções virais.

Além da importância biológica, a caracterização do domínio $Z\alpha_{ADAR1}$ também facilitou a identificação, por homologia de seqüências, de outras

proteínas ligantes de Z-DNA. Em 2001, descobriu-se que uma proteína chamada DML1, que é altamente expressa em tecidos em contato com tumores, contém um domínio de elevada similaridade com o domínio $Z\alpha_{ADAR1}$ (Schwartz *et al.* 2001). Os autores ainda mostraram que a DML1 é capaz de se ligar ao Z-DNA de modo muito semelhante a ADAR1, indicando um mecanismo genérico de reconhecimento dessa conformação e sugerindo a existência de uma família de proteínas que compartilham um motivo comum de ligação a Z-DNA

Outras proteínas que possuem homologia com o domínio $Z\alpha_{ADAR1}$ são as proteínas E3L, características de vírus do gênero *Orthopoxvirus*, incluindo o vírus vaccinia e o vírus da varíola (Herbert *et al.*, 1997). As proteínas E3L conferem resistência à resposta imunológica do hospedeiro mediada por interferons, além de serem fundamentais para a replicação do DNA viral em uma ampla gama de células (Brandt & Jacobs, 2001 apud Beattie *et al.*, 1996). Em 2001, Brandt e Jacobs demonstraram através experimentos *in vivo* que a proteína E3L (incluindo a região N-terminal, que possui homologia com $Z\alpha_{ADAR1}$) é fundamental para a patogenicidade do vírus vaccinia. Em um estudo posterior, Kim *et al.* comprovaram que a porção N-terminal de E3L é de fato capaz de se ligar a Z-DNA (Kim *et al.*, 2003). Segundo os autores, a interação entre a região N-terminal de E3L e os segmentos Z-DNA do hospedeiro pode inibir a transcrição de alguns genes importantes para a resposta imunológica da célula. Neste caso, servindo de alvo às proteínas E3L, o Z-DNA possui um papel prejudicial à defesa celular (diferentemente do papel favorável que lhe foi proposto no caso de ADAR1).

Em comparação com a forma Z, pouco se sabe acerca de moléculas presentes *in vivo* capazes de reconhecer ou induzir a formação de A-DNA. Um estudo interessante foi feito com a proteína receptora de AMP cíclico (CRP), de *E. coli*, que controla a iniciação da transcrição em inúmeros operons (Ivanov *et al.*, 1995 apud Kolb *et al.*, 1993). Essa proteína se liga a dois sítios de reconhecimento no DNA, simetricamente invertidos (TGTGA:TCACA) que, na maioria dos casos, encontram-se espaçados por seqüências de 6 pares de bases. Nestes casos, a ligação de CRP aos sítios de reconhecimento não costuma provocar nenhuma transição conformacional no DNA. No entanto,

Ivanov *et al.* observaram que, quando as seqüências TGTGA:TCACA estão separadas por seqüências espaçadoras mais longas (8 pares de bases), pelo menos uma volta das hélices sofre transição para a forma A-DNA. Considerando-se que a forma A é mais achatada e menos torcida (menores valores de *Twist*) do que a forma B, a transição de B para A *garantiria* que a extensão e o ângulo de torção entre os sítios de reconhecimento no DNA se *mantivessem* constantes, mesmo com espaçadores de 8 pares de bases (Ivanov *et al.*, 1995). A figura 24 ilustra que um fragmento de 12 pares de bases na forma A-DNA pode ter a mesma extensão que um fragmento de 10 pares de bases na forma B-DNA - o que permite acomodar os sítios de ligação da CRP aos sítios de reconhecimento do DNA, mesmo quando estes estão separados por uma seqüência espaçadora mais longa. Este é um eficaz mecanismo de ajuste de complexos proteína-DNA, que pode ser comum a várias outras proteínas com mais de um sítio de ligação ao DNA.

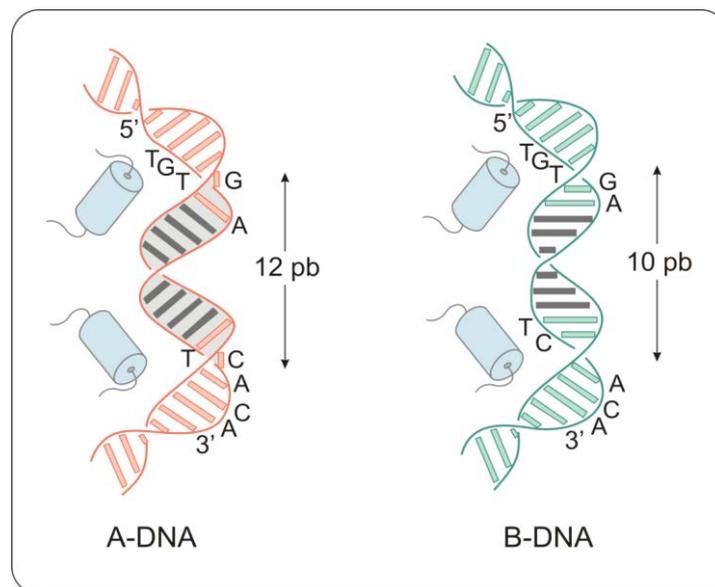


Figura 24. Modelos de encaixe CRP-DNA. Representação esquemática mostrando que um segmento de 12 pares de bases na forma A-DNA (área sombreada) tem a mesma extensão que um segmento de 10 pares de bases na forma B-DNA. A adoção da forma A no segmento entre os sítios de reconhecimento da CRP permite o encaixe entre CRP e o DNA, mesmo quando o espaçador central contém 8 pares de bases. Quando os sítios de reconhecimento estão separados por 6 pares de bases, o DNA permanece na forma B. Os sítios de reconhecimento da CRP (α -hélices) estão representados por cilindros, e os pares de bases (pb) que compõem a seqüência espaçadora estão representados em cinza. Adaptado de: Ivanov *et al.*, 1995.

Em 1993, a co-cristalização da proteína de ligação a TATA (*TATA-box binding protein* ou TBP) com segmentos de DNA contendo seqüências TATA, mostrou que a ligação de TBP a essas seqüências promove uma curvatura intensa do DNA sobre o sulco maior. Essa curvatura ocorre apenas nos 8 pares de bases que compõem a seqüência TATA e faz com que, em alguns parâmetros, o DNA se aproxime da conformação A: o sulco maior se torna profundo, enquanto o sulco menor se torna exposto e raso, o que é confirmado por valores positivos de *Roll* e pela diminuição da distância entre os fosfatos da cadeia principal. Além disso, a curvatura faz com que os valores de torção das hélices (*Twist*) diminuam, facilitando a interação de TBP com o sulco menor, que é exposto ao solvente (Kim *et al.*; 1993a; Kim *et al.*, 1993b). No entanto, é mais provável que a alteração desses parâmetros resulte da curvatura em si, e não de uma transição conformacional.

Outra molécula de importância biológica que mostrou-se capaz de induzir a conformação A-DNA em seqüências poli(dG)•poli(dC) é o *antibiótico* neomicina, da classe dos aminoglicosídeos (Robinson & Wang, 1996). Os *antibióticos* desta classe atuam por se ligar a moléculas de RNA, impedindo a síntese de proteínas bacterianas (Range *et al.*, 2003). Considerando-se que o RNA costuma adotar a forma A, faz sentido que *antibióticos* com esse mecanismo de ação possuam maior afinidade pela conformação A e sejam capazes de estabilizá-la. Robinson & Wang também ressaltaram que a neomicina compartilha propriedades moleculares com outros compostos indutores da forma A-DNA, como o íon $\text{Co}(\text{NH}_3)_6^{+3}$ e algumas poliaminas. As três classes são compostas por moléculas altamente carregadas positivamente e ricas em grupamentos doadores de ligações de hidrogênio (aminas), distribuídos em uma estrutura rígida (figura 25). Segundo os autores, estas podem ser as características necessárias para o reconhecimento e indução da forma A, e a identificação dessas características possibilitaria o planejamento de ligantes de RNA ainda mais potentes e específicos.

Mais recentemente, Dóstal *et al.* apresentaram evidências de que proteína Sac7d, da archea *Sulfolobus*, é capaz de induzir uma transição parcial B→A no DNA. A proteína Sac7d pertence a uma família de proteínas pequenas, básicas e abundantes, que se ligam de forma não-específica ao

DNA, e que parecem ser importantes para a organização e manutenção do DNA nas archeas, de forma análoga às histonas nas bactérias e nos eucariotos. Segundo os autores, quando essa proteína Sac7d se liga ao decâmero $d(G-A-G-G-C-G-C-C-T-C)_2$, dois a seis pares de bases sofrem transições parciais $B \rightarrow A$, com inversão da conformação do açúcar de C2'-endo para C3'-endo (Dóstal *et al.*, 2004). Anteriormente, complexos entre essas proteínas e DNA já haviam mostrado que o DNA tende a adotar conformações que em alguns aspectos se assemelham ao A-DNA (Dóstal *et al.*, 2004 apud Gao *et al.*, 1998; Robinson *et al.*, 1998; Sue *et al.*, 2000). No entanto, devido ao alto nível de perturbação estrutural que a ligação dessas proteínas causa no DNA, torna-se difícil discernir as alterações que refletem uma real transição conformacional daquelas que refletem apenas alterações locais.

Em suma, embora não sejam as únicas descritas na literatura, estas são as principais evidências que sustentam a importância biológica das conformações A e Z.

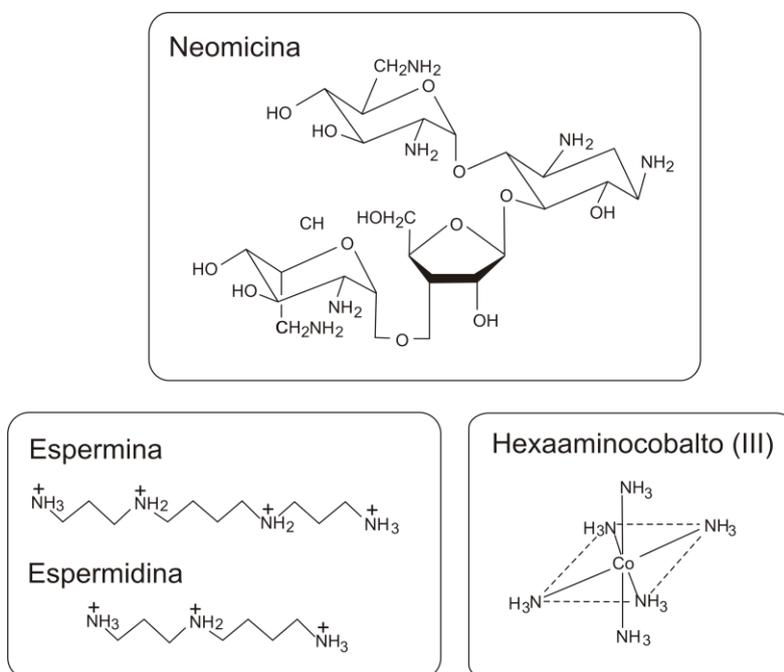


Figura 25. Estruturas químicas dos compostos neomicina, espermina, espermidina e hexaaminocobalto (III)

5. Conclusões

O DNA, embora muitas vezes erroneamente considerado uma biomolécula “rígida”, pode assumir mais de um tipo de conformação. As conformações diferem na geometria e na força de interação entre as bases (razão pela qual são, em parte, dependentes da seqüência) e também quanto aos ângulos torcionais adotados pela cadeia principal, que se ajusta aos movimentos das bases. O conjunto dessas propriedades relacionadas a pares de bases individuais confere aos protótipos de cada conformação propriedades *de hélice* bem distintas, tais como comprimento, diâmetro e número de pares de base por volta. Embora sejam nítidas as diferenças entre conformações canônicas, a classificação de formas intermediárias ou mistas, ou ainda de segmentos contendo poucos pares de bases, não é um processo simples. Para isso, é necessário discernir as alterações que refletem perturbações locais daquelas que refletem transições conformacionais, o que exige conhecimento e interpretação da parte do pesquisador.

Entre as conformações conhecidas, a forma B é a mais estudada por ser a de ocorrência freqüente no meio celular. As formas A e Z podem ser induzidas por fatores ambientais, estruturais ou pela ligação de moléculas indutoras. A compreensão dos fatores que favorecem essas formas não-usuais é importante porque fornece indícios da ocorrência dessas conformações no ambiente celular, bem como de possíveis papéis biológicos. A identificação das poliaminas como indutoras das formas A e Z, por exemplo, foi determinante para que a possibilidade de ocorrência *in vivo* dessas conformações ganhasse força. De forma análoga, a identificação das seqüências que favorecem o Z-DNA e do super-esprialamento negativo como o seu principal fator indutor *in vivo* constituíram os primeiros passos para a suposição, atualmente bem aceita, de que o Z-DNA possui algum papel de regulação na transcrição gênica.

Por sua vez, a comprovação de que essas conformações podem participar de processos celulares é um indicativo de que elas também podem estar envolvidas em estados patológicos. As evidências de que o Z-DNA facilita

processos de recombinação genética, por exemplo, torna provável que ele também esteja por trás de uma série de doenças causadas por mutações prejudiciais em alguns genes.

Finalmente, a identificação de proteínas e enzimas capazes de induzir ou reconhecer especificamente uma conformação também são de suma importância por reforçarem a ocorrência *in vivo* dessas conformações e corroborarem as hipóteses de papéis biológicos que não apenas a estabilização estrutural do DNA. A descoberta de que algumas enzimas envolvidas no processo de recombinação gênica possuem afinidade por Z-DNA reforçou o papel recombinogênico dessa conformação. De forma análoga, a descoberta das SASP em esporos bacterianos reforça o papel protetor da conformação A contra radiação UV, assim como a descoberta da especificidade da enzima ADAR1 por Z-DNA consolida a importância dessa conformação durante a transcrição gênica.

Além disso, a pesquisa por enzimas conformação-específicas pode vir a desvendar as bases moleculares que garantem a ligação específica de uma molécula a uma determinada conformação. A compreensão do modo com que o domínio $Z\alpha$ de ADAR1 se liga a segmentos de Z-DNA, por exemplo, comprova a existência de moléculas com especificidade pela conformação, e não pela seqüência. Atualmente, um dos principais problemas envolvendo fármacos ligantes a DNA (quimioterápicos, *anti-virais* e *antibióticos*) é a toxicidade (Reddy *et al.*, 2001), portanto, torna-se interessante o planejamento de fármacos com afinidade não apenas por determinadas seqüências, mas também por uma determinada conformação.

No caso de fármacos quimioterápicos, a especificidade de um agente intercalador por Z-DNA *garantiria* uma ação mais efetiva deste fármaco em células com elevados níveis de transcrição gênica, ou seja, células tumorais. Por outro lado, se o Z-DNA facilita o processo de recombinação gênica, é possível que ele esteja presente em maiores proporções no DNA viral e que seja um dos fatores responsáveis pelos altos níveis de mutação. Portanto, um agente intercalador com especificidade por Z-DNA também pode ser interessante do ponto de vista do desenvolvimento de fármacos *anti-virais*.

Finalmente, é importante considerar que as transições conformacionais geram alterações estruturais que interferem com a ligação de moléculas ao DNA. É o caso da curvatura do DNA provocada pela proteína TBP, que provoca a abertura do sulco menor, cujas bases se tornam altamente expostas, facilitando a interação com o sítio de ligação da proteína. A variação nas dimensões dos sulcos, além de interferir com a acessibilidade às bases, reorienta os grupamentos doadores de ligações de hidrogênio das bases, muitas vezes os principais envolvidos na interação do DNA com outras moléculas. Até mesmo variações na extensão de um mesmo segmento devido a transições conformacionais podem ser úteis durante o reconhecimento do DNA por uma proteína com mais de um sítio de ligação, como é o caso da proteína CRP.

Sendo assim, é possível concluir que há indícios suficientes na literatura sustentando a ocorrência *in vivo* das formas A e Z, ainda que de forma transitória. Adicionalmente, embora muitas das hipóteses propostas ainda não estejam consolidadas, as evidências apontam para mais de um possível papel biológico dessas conformações, que não apenas a estabilização estrutural do DNA. Portanto, o estudo dessas conformações e dos seus fatores indutores pode ser importante tanto para a elucidação de mecanismos celulares ainda não bem conhecidos como para o desenvolvimento de novas moléculas e possíveis fármacos ligantes de DNA.

Referências bibliográficas

Arentzen, R.; Reese, C.B. *The Phosphotriester Approach to Oligonucleotide Synthesis: Preparation of Oligo- and Poly-Thymidylic Acids*. J. Chem. Soc., v. 4, p. 445-460. 1977.

Babin, V.; Baucom, J.; Darden, T.A.; Sagüi, C. *Molecular Simulations of DNA with Polarizable Force Fields: Convergence of an Ideal B-DNA Structure to the Crystallographic Structure*. J. Phys. Chem., v. 110, p. 11571-11581. 2006.

Barciszewski, J.; Jurczak, J.; Porowski, S.; Specht, T.; Erdmann, V.A. *The Role of Water Structure in Conformational Changes of Nucleic Acids in Ambient and High-Pressure Conditions*. Eur. J. Biochem., v. 260, p. 293-307. 1999.

Beattie, E.; Kauffman, E.B.; Martinez, H.; Perkus, M.E.; Jacobs, B.L.; Paoletti, E.; Tartaglia, J. *Host-Range Restriction of Vaccinia Virus E3L-Specific Deletion Mutants*. Virus Genes, v. 12, p. 89-94. 1996.

Behe, M.; Felsenfeld, G. *Effects of Methylation on a Synthetic Polynucleotide: The B-Z Transition in Poly(dG-m⁵dC)•poly(dG-m⁵dC)*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, v.78, p. 1619-1623. 1981.

Berger, I.; Winston, W.; Manoharan, R.; Schwartz, T.; Alfken, J.; Kim, Y-G.; Lowenhaupt, K.; Herbert, A.; Rich, A. *Spectroscopic Characterization of a DNA-Binding Domain, Z α , from the Editing Enzyme, dsRNA Adenosine Deaminase: Evidence for Left-Handed Z-DNA in the Z α -DNA Complex*.

Blaho, J.A.; Wells, R.D. *Left-Handed Z-DNA Binding by the RecA Protein of Escherichia coli*. J. Biol. Chem., v. 262, p. 6082-6088. 1987.

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, p. 850-856. 2001.

Brown II, B.A.; Lowenhaupt, K.; Wilbert, C.M.; Hanlon, E.B.; Rich, A. *The Z α Domain of the Editing Enzyme dsRNA Adenosine Deaminase Binds Left-Handed Z-RNA as well as Z-DNA*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, v. 97, p. 13532-12536. 2000.

Bullock, P.; Miller, J.; Botchan, M. *Effects of Poly[d(pGpT)•d(pApC)] and Poly[d(pCpG)•d(pCpG)] Repeats on Homologous Recombination in Somatic Cells*. Mol. Cell. Biol., v. 6, p. 3948-3953. 1986.

Bustamante, C.; Bryant, Z.; Smith, S.B. *Ten Years of Tension: Single-molecule DNA Mechanics*. Nature, v. 421, p. 423-427. 2003.

Calladine, C.R. *Mechanics of Sequence-dependent Stacking of Bases in B-DNA*. J. Mol. Biol., v. 161, p. 343-352. 1982.

Calladine, C.R.; Drew, H.R. *A Base Centred Explanation of the B-to-A Transition in DNA*. J. Mol. Biol., v. 178, p. 773-782. 1984.

Cheatham, T.E., III; Kollman, P.A. *Observation of the A-DNA to B-DNA Transition during Unrestrained Molecular Dynamics in Aqueous Solution*. J. Mol. Biol., v. 259, p. 434-444. 1996.

Clayton, J. *The Triumph of 1953*. In: Clayton, J.; Dennis, C. (Ed). *50 Years of DNA*. Special edition. New York: Palgrave Macmillan, 2003. p. 12-25.

Dickerson, R.E. *DNA Structure from A to Z*. Methods Enzymol., v. 211, p. 67-110. 1992.

- Dickerson, R.E. *et al.* Definitions and Nomenclature of Nucleic Acid Structure Components. *Nucleic Acids Res.*, v. 17, p. 1797-1803. 2001.
- Dickerson, R.E.; Drew, H.R. *Kinematic Model for B-DNA*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 78, p. 7318-7322. 1981.
- Dickerson, R.E.; Drew, H.R.; Conner, B.N.; Wing, R.M.; Fratini, A.V.; Kopka, M.L. *The Anatomy of A-, B-, and Z-DNA*. *Science*, v. 216, p. 475-485. 1982
- Dickerson, R.E.; Ng, H.-L. *DNA Structure from A to B*. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, v. 98, p. 6986-6988. 2001
- Dostál, L.; Chen, C.-Y.; Wang, A.H.-J.; Wellfe, H. *Partial B-to-A DNA Transition upon Minor Groove Binding Protein Sac7d Monitored by Raman Spectroscopy*. *Biochemistry*, v. 43, p. 9600-9609. 2004.
- Drew, H.R.; Wing, R.M.; Takano, T.; Broka, C.; Tanaka, S.; Itakura, K.; Dickerson, R.E. *Structure of a B-DNA Dodecamer: Conformation and Dynamics*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 78, p. 2179-2183. 1981.
- Feig, M.; Pettitt, B.M. *Structural Equilibrium of DNA Represented with Different Force Fields*. *Biophys. J.*, v. 75, p. 134-149. 1998.
- Foloppe, N.; MacJerell Jr., A.D. *Intrinsic Conformational Properties of Deoxyribonucleosides: Implicated Role for Cytosine in the Equilibrium among the A, B, and Z forms of DNA*. *Biophys. J.*, v.76, p. 3206-3218. 1999
- Franklin, R.E.; Gosling, R.G. *Molecular Configuration in Sodium Thymonucleate*. *Nature*, v. 171, p. 749-741. 1953.
- Fuertes, M.A.; Cepeda, V.; Alonso, C.; Pérez, J.M. *Molecular Mechanisms for the B-Z Transition in the Example of Poly[d(G-C)•d(G-C)] Polymers. A Critical Review*. *Chem. Rev.*, v. 106, p. 2045-2064. 2006.
- Gao, Y.-G.; Su, S.-Y.; Robinson, H.; Padmanabhan, S.; Lim, L.; McCrary, B.S.; Edmondson, S.P.; Shriver, J.W.; Wang, A.H.-J. *The Crystal Structure of Hyperthermophile Chromosomal Protein Sso7d Bound to DNA*. *Nat. Struct. Biol.*, v. 5, p. 782-786. 1998.
- Hamada, H.; Kakunaga, T. *Potential Z-DNA Forming Sequences are Highly Dispersed in the Human Genome*. *Nature*, v. 298, p. 396-398. 1982.
- Hamada, H.; Petrino, M.G.; Kakunaga, T. *A Novel Repeated Element with Z-DNA-Forming Potential is Widely Found in Evolutionary Diverse Eukariotic Genomes*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 79, p. 6465-6469. 1982.
- Haniford, D.B.; Pulleyblank, D.E. *The in vivo Occurrence of Z-DNA*. *J. Biomol. Struct. Dyn.*, v. 1, p. 593-609. 1983
- Herbert, A.; Alfken, J.; Kim, Y-G.; Mian, S.I.; Nishikura, K.; Rich, A. *A Z-DNA Binding Domain Present in the Human Editing Enzyme, Double-Stranded RNA Adenosine Deaminase*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 94, p. 8421-8426. 1997.
- Herbert, A.; Lowenhaupt, K.; Spitzner, J.; Rich, A. *A Chicken Double-Strand RNA Adenosine Deaminase has Apparent Specificity for Z-DNA*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 92, p. 7550-7554. 1995.
- Herbert, A.; Rich, A. *Left-Handed Z-DNA: Structure and Function*. *Genetica*, v. 106, p. 37-47. 1999.

Hunter, C.A. *Sequence-dependent DNA Structure. The Role of Base Stacking Interactions*. J. Mol. Biol., v. 230, p. 1025-1054. 1993.

Itakura, K.; Katagiri, N.; Bahl, C.P.; Wightman, R.H.; Narang, S.A. *Improved Triester Approach for the Synthesis of Pentadecathymidylic Acid*. J. Am. Chem. Soc., v. 97, p. 7327-7332. 1975.

Ivanov, V.I.; Grzeskowiak, K.; Zocchi, G. *Evidence for an Intermediate State in B-to-Z Transition of DNA*. J. Phys. Chem., v. 107, p. 12847-12850. 2003.

Ivanov, V.I.; Krylov, D.Yu. *A-DNA in Solution as Studied by Diverse Approaches*. Methods Enzymol., v. 211, p. 111-127. 1992.

Ivanov, V.I.; Minchenkova, L.E.; Chernov, B.K.; McPhie, P.; Ryu, S.; Garges, S.; Barber, A.M.; Zhurkin, V.B.; Adhya, S. *CRP-DNA Complexes: Inducing the A-Like Form Binding Sites with an Extended Central Spacer*. J. Mol. Biol., v. 245, p. 228-240. 1995.

Kimenez-Ruiz, A.; Requena, J.M.; Lopez, M.C.; Alonso, C. *A Potential Z-DNA-Forming Sequence is Located Between Two Transcription Units Alternatively Expressed During Development of Drosophila hydei*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, v. 88, p. 31-35. 1991.

Kastenholz, M.A.; Schwartz, T.U.; Hünenberger, P.H. *The Transition between the B and Z Conformations of DNA Investigated by Targeted Molecular Dynamics Simulations with Explicit Solvation*. Biophys. J., v. 91, p. 2976-2990. 2006.

Kendrew, J.C.; Dickerson, R.E.; Strandberg, B.E.; Hart, R.G.; Davies, D.R.; Phillips, D.C.; Shore, V.C. *Structure of Myoglobin: A Three-Dimensional Fourier Synthesis at 2 Å Resolution*. Nature, v. 185, p. 422-427. 1960.

Kim, J.L.; Nikolov, D.B.; Burley, S.K. *Co-Crystal Structure of TBP Recognizing the Minor Groove of a TATA Element*. Nature, v. 365, p. 520-527. 1993b.

Kim, J.-I.; Heuser, J.; Cox, M.M. *Enhanced RecA Protein Binding to Z-DNA Represents a Kinetic Perturbation of a General Duplex DNA Binding Pathway*. J. Biol. Chem., v.264, p. 21848-21856. 1989.

Kim, Y.; Geiger, J.H.; Hahn, S.; Sigler, P.B. *Crystal Structure of a Yeast TBP/TATA-Box Complex*. Nature, v. 365, p. 512-520. 1993a.

Kim, Y.G.; Muralinath, M.; Brandt, T.; Percy, M.; Hauns, K.; Lowenhaupt, K.; Jacobs, B.L.; Rich, A. *A Role for Z-DNA Binding in Vaccinia Virus Pathogenesis*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, v. 100, p. 6974-6979. 2003.

Kmiec, E.B.; Angelides, K.J.; Holloman, W.K. *Left-Handed DNA and the Synaptic Pairing Reaction Promoted by Ustilago Rec1 Protein*. Cell, v. 40, p. 139-145. 1985. Abstract.

Kumar, S.; Reed, M.W.; Gamper Jr., H.B.; Gorn, V.V., Lukhtanov, E.A.; Foti, M.; West, J.; Meyer Jr., R.B.; Schwaitzer, B.I. *Solution Structure of a Highly Stable DNA Duplex Conjugated to a Minor Groove Binder*. Nucleic Acids Res., v. 26, p. 831-838. 1998.

Laffer, E.M.; Moller, A.; Nordheim, A.; Stolar, B.D.; Rich, A. *Antibodies Specific for Left-handed DNA*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, v. 78, p. 3546-3550. 1981.

Lim, W.; Feng, Y.P. *The Stretched Intermediate Model of B-Z DNA Transition*. Biophys. J., v. 88, p. 1593-1607. 2005.

Liu, L.F.; Wang, J.C. *Supercoiling of the DNA Template During Transcription*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, v. 84, p. 7024-7027. 1987.

Maddox, B. *Rosalind Franklin: The Dark Lady of DNA*. HapperCollins, 2003.

Martin, R.F.; Broadhurst, S.; Reum, M.E.; Squire, C.J.; Clark, G.R.; Lobachevsky, P.N.; White, J.M.; Clark, C.; Sy, D.; Spothem-Maurizot, M.; Kelly, D.P. *In Vitro Studies with Methylproamine: a Potent New Radioprotector*. *Cancer Res.*, v. 64, p. 1067-1070. 2004.

Miao, Y.; Lee, M.P.; Parkinson, G.N.; Batista-Parra, A.; Ismail, M.A.; Neidle, S.; Boykin, D.W.; Wilson, W.D. *Out-of-Shape DNA Minor Groove Binders: Induced Fit Interactions of Heterocyclic Dications with the DNA Minor Groove*. *Biochemistry*, v. 44, p. 14701-14708. 2005

Minyat, E.E.; Ivanov, V.I.; Kritzyn, A.M.; Minchenkova, L.E.; Schyolkina, A.K. *Spermine and Spermidine-Induced B to A Transition of DNA in Solution*. *J. Mol. Biol.*, v. 1979, p. 397-409. 1979. Abstract.

Mohr, S.C.; Sokolov, N.V.H.A.; He, C.; Setlow, P. *Binding of Small Acid-Soluble Spore Proteins from Bacillus subtilis Changes the Conformation of DNA from B to A*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 88, p. 77-81. 1991.

Moller, A.; et al. *Monoclonal Antibodies Recognize Different Parts of Z-DNA*. *J. Biol. Chem.*, v. 257, p. 12081-12085. 1982. Não tem online.

Nelson, D.L.; Cox, M.M. *Nucleotídeos e Ácidos Nucléicos*. In: Lehninger Princípios de Bioquímica, 3.ed, São Paulo: Sarvier, 2002. Cap. 10.

Nicholson, W. L.; Setlow, B.; Setlow, P. *Ultraviolet Irradiation of DNA Complexed with α/β -type Small, Acid Soluble Proteins from Spores of Bacillus or Clostridium Species Makes Spore Photoproduct but not Thymine Dimers*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 88, p. 8288-8292. 1991.

Nordheim, A.; Lafer, E.M.; Peck, L.J.; Wang, J.C.; Stollar, B.D.; Rich, A. *Negatively Supercoiled Plasmids Contain Left-Handed Z-DNA Segments as Detected by Specific Antibody Binding*. *Cell*, v. 31, p. 309-318. 1982.

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. USA*, v. 99, p. 16666-16671. 2002.)

Packer, M.J.; Hunter, C.A. *Sequence-dependent DNA Structure: the Role of Sugar-Phosphate Backbone*. *J. Mol. Biol.*, v. 280, p. 407-420. 1998.

Peck, L.J.; Nordheim, A.; Rich, A.; Wang, J.C. *Flipping of cloned $d(pGpC)n \cdot d(pCpG)n$ DNA Sequences from Right to Left-handed Helical Structure by Salt, Co(III), or negative supercoiling*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 79, p. 4560-4564. 1982b

Peck, L.J.; Wang, J.C. *Transcriptional Block Caused by a Negative Supercoiling Induced Structural Change in an Alternating CG Sequence*. *Cell*, v. 40, p. 129-137. 1985.

Perutz, M.F.; Rossmann, M.G.; Cullis, A.F.; Muirhead, H.; Will, G.; North, A.C.T. *Structure of Haemoglobin: A Three-Dimensional Fourier Synthesis at 5.5-Å. Resolution, Obtained by X-Ray Analysis*. *Nature*, v. 185, p. 416-422. 1960.

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, p. 375-396. 1972.

Premilat, S.; Albiser, G. *DNA Models for A, B, C, and D Conformations Related to Fiber X-Ray, Infrared and NMR Measurements*. *J. Biomol. Struct. Dyn.*, v. 3, p. 1033-1043. 1986.

Privé, G.G.; Yanagi, K.; Dickerson, R.E. *Structure of the B-DNA Decamer C-C-A-A-C-G-T-T-G-G and Comparison with Isomorphous Decamers C-C-A-A-G-A-T-T-G-G and C-C-A-G-G-C-C-T-G-G*. *J. Mol. Biol.*, v. 217, p. 177-199. 1991.

Rang, H.P.; Dale, M.M.; Ritter, J.M.; Moore, P.K. *Agentes Antibacterianos*. In: Farmacologia, 5.ed, Rio de Janeiro: Elsevier, 2003. Cap. 45.

Reddy, B.S.P.; Sharma, S.K.; Lown, J.W. *Recent Developments in Sequence Selective Minor Groove DNA Effectors*. *Curr. Med. Chem.*, v. 8, p. 475-508. 2001.

Rich, A.; Zhang, S. *Z-DNA: the Long Road to Biological Role*. *Nature Reviews (gen.)*, v. 4, p. 566-572. 2003.

Robinson, H.; Gao, Y.-G.; McCrary, B.S.; Edmondson, S.P.; Schriver, J.W.; Wang, A.H.-J. *The Hyperthermophile Chromosomal Protein Sac7d Sharply Kinks DNA*. *Nature*, v. 392, p. 202-205.

Robinson, H.; Wang, A.H.-J. *Neomycin, Spermine and Hexaamminecobalt(III) Share Common Structural Motifs in Converting B- to A-DNA*. *Nucleic Acids Res.*, v. 24, p. 676-682. 1996.

Schroth, G.P.; Chou, P.J.; Ho, P.S. *Mapping Z-DNA in the Human Genome. Computer-Aided Mapping Reveals a Non-Random Distribution of Z-DNA Forming Sequences in Human Genes*. *J. Biol. Chem.*, v.267, p. 11846-11855. 1992. procurar

Spacková, N.; Cheatham, T.E., III; Ryjáček, F.; Lankas, F.; van Meervelt, L.; Hobza, P.; Sponer, J. *Molecular Dynamics Simulations and Thermodynamics Analysis of DNA-Drug Complexes. Minor Groove Binding between 4', 6-diamino-2-phenylindole and DNA Duplexes in Solution*. *J. Am. Chem. Soc.*, v. 125, p. 1759-1769. 2003.

Su, S.-Y.; Gao, Y.-G.; Robinson, H.; Liaw, Y.-C.; Edmondson, S.P.; Shriver, J.W.; Wang, A.H.-J. *Crystal Structures of the Chromosomal Proteins Sso/d/Sac7d Bound to DNA Containing T-G Mismatched Base-Pairs*. *J. Mol. Biol.*, v. 303, p. 395-403. 2000.

Suram, A.; Rao, L.K.S.; Latha, K.S.; Viswamitra, M.A. *First Evidence to Show the Topological Change of DNA from B-DNA to Z-DNA Conformation in the Hippocampus of Alzheimer's Brain*. *Neuromol. Med.*, v.2, p. 289-297. 2002.

Schwartz, T.; Behlke, J.; Lowenhaupt, K.; Heineman, U.; Rich, A. *Structure of the DLM-1-Z-DNA Complex Reveals a Conserved Family of Z-DNA-Binding Proteins*. *Nat. Struct. Biol.*, v. 8, p. 761-765. 2001.

Schwartz, T.; Rould, M.A.; Lowenhaupt, K.; Herbert, A.; Rich, A. *Crystal Structure of the Za Domain of the Human Editing Enzyme ADAR1 Bound to Left-Handed Z-DNA*. *Science*, v. 284, p. 1841-1845. 1999.

Thamann, T.J.; Lord, R.C.; Wang, A.H.J.; Rich, A. S. *The High Salt Form of poly(dG-dC)•poly(dG-dC) is Left-Handed Z-DNA: Raman Spectra of Crystals and Solutions*. *Nucleic Acids Res.*, v. 9, p. 5443-5457. 1981.

Thomas, T.J.; Gunia, U.B.; Thomas, T. *Polyamine-induced B-DNA to Z-DNA Conformational Transition of a Plasmid DNA with (dG-dC)_n Insert*. *J. Biol. Chem.*, v. 266, p. 6137-6141. 1991.

Thomas, T.J.; Meryhew, N.L.; Messner, R.P. *DNA Sequence and Conformation Specificity of Lupus Autoantibodies. Preferential Binding to the Left-Handed Z-DNA Form of Synthetic Polynucleotides*. *Arthritis Rheum.*, v. 31, p. 367-377. 1988.

Thomas, T.J.; Meryhew, N.L.; Messner, R.P. *Enhanced Binding of Lupus Sera to the Polyamine-Induced Left-Handed Z-DNA form of Polynucleotides*. *Arthritis Rheum.*, v. 33, p. 356-365. 1990.

Thomas, T.J.; Messner, R.P. *A Left-Handed (Z) Conformation of Poly(dA-dC)•Poly(dG-dT) Induced by Polyamines*. *Nucleic Acids Res.*, v.14, p. 6721-6733. 1986.

Thomas, T.J.; Thomas, T. *Polyamine-Induced Z-DNA Conformation in Plasmids Containing (dA-dC)_n(dG-dT)_n Inserts and Increased Binding of Lupus Autoantibodies to the Z-DNA form of Plasmids.* Biochem. J., v.298, p. 485-491. 1994.

Trantirek, L.; Stefl, R.; Vorlickova, M.; Koca, J.; Sklenar, V.; Kypr, J. *An A-type Double Helix of DNA having B-type Puckering of the Deoxyribose Rings.* J. Mol. Biol., v. 297, p. 907-922. 2000.

Travers, A.; Muskhelishvili, G. *A Common Topology for Bacterial and Eukariotic Transcription Initiation?* EMBO Rep., v. 8, p. 147-151. 2007. Abstract.

Treco, D.; Arnheim, N. *The Evolutionarily Conserved Repetitive Sequence d(TG•AC)_n Promotes Reciprocal Exchange and Generates Unusual Recombinant Tetrads During Yeast Meiosis.* Mol. Cell. Biol., v. 6, p. 3943-3947. 1986.

Wahls, W.P.; Wallace, L.J.; Moore, P.D. *The Z-DNA motif d(TG)₃₀ Promotes Reception of Information During Gene Conversion Events while Stimulating Homologous Recombination in Human Cells in Culture.* Mol. Cell. Biol., v. 10, p. 785-793. 1990.

Wang, A.H.J.; Quigley, G.J.; Kolpak, F.J.; Crawford, J.L.; van Boom, J.H.; van der Marel, G.; Rich, A. *Molecular Structure of a Left-handed Double Helical DNA Fragment at Atomic Resolution.* Nature, v. 282, p.680-686. 1979.

Wang, G.; Christensen, L.A.; Vasquez, K.M. *Z-DNA-Forming Sequences Generate Large-Scale Deletions in Mammalian Cells.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA, v. 103, p. 2677-2682. 2006.

Watson, J.D.; Crick, F.H.C. *Molecular Structure of Nucleic Acids.* Nature, v. 171, p. 737-738. 1953.

Wells, R.D. *Non-B DNA Conformations, Mutagenesis.* Trends. Biochem. Sci. In press. 2007.

Wittig, B.; Dorbic, T.; Rich, A. *Transcription is Associated with Z-DNA Formation in Metabolically Active Permeabilized Mammalian Cell Nuclei.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA, v. 88, p. 2259-2263. 1991.

Van Wijk, J.; Huckriede, B.D.; Ippel, J.H.; Altona, C. *Furanose Sugar Conformations in DNA from NMR Coupling Constants.* Methods Enzymol., v. 211, p. 287-306. 1992.

Yanagi, K.; Privé, G.G; Dickerson, R.E. *Analysis of local Helix Geometry in three B-DNA Decamers and eight Dodecamers.* J. Mol. Biol., v. 217, p. 201-214. 1991.

Yang, X.L.; Kaenzig, C.; Lee, M.; Wang, A.H. *Binding of AR-1-144, a tri-imidazole DNA Minor Groove Binder, to CCGG Sequence Analyzed by NMR Spectroscopy.* Eur. J. Biochem., v. 263, p. 646-655. 1999.