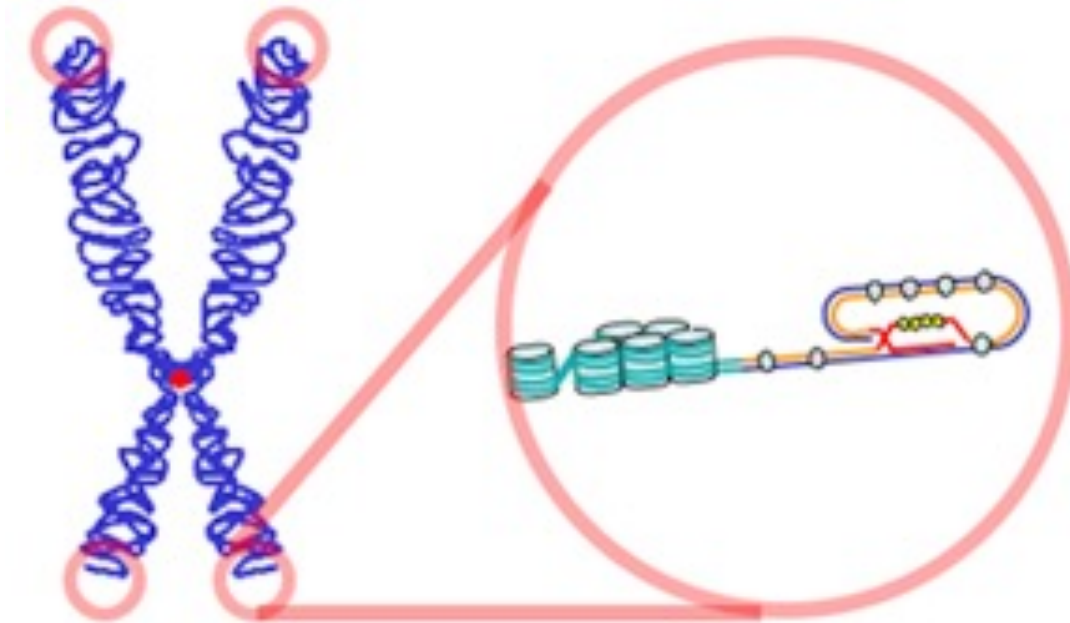


**Replicação de Telômeros  
Processos de Reparo de DNA  
e Mutagênese**

**Capítulos 4 GMB-GG  
Chapter 10 MBG Watson**

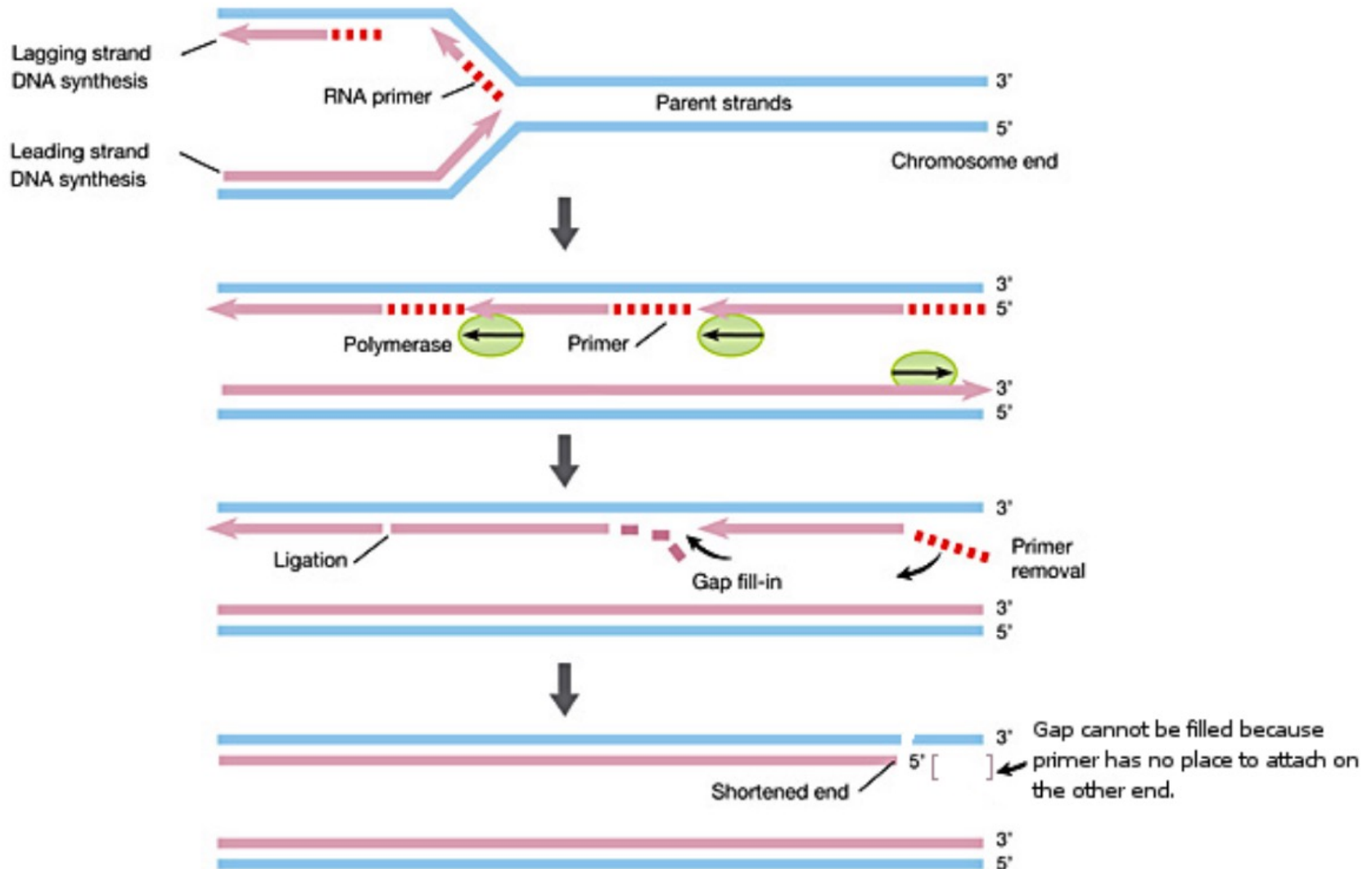
**Cromossomos lineares: como replicar as pontas?  
Como manter as pontas do mesmo tamanho????**



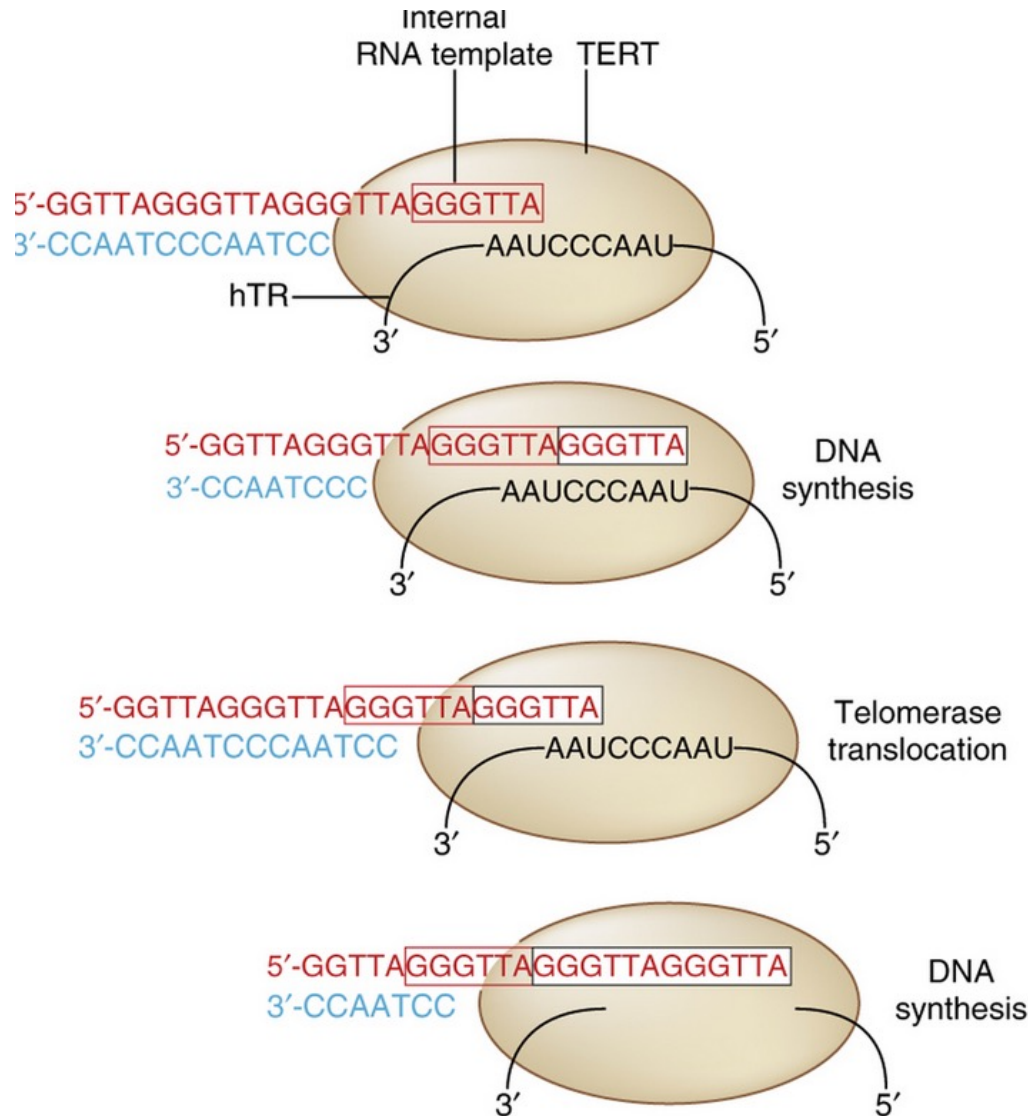
- **telômeros**

# Cromossomos lineares: como replicar as pontas?

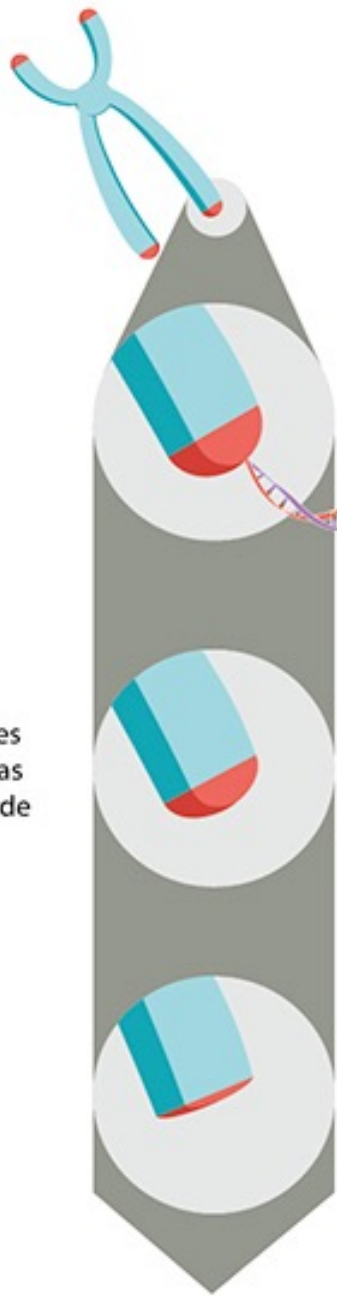
## Perdem as pontas a cada replicação por não completarem a lagging strand!



# Telomerase (TERT) na replicação de telômeros (vertebrados têm essa sequencia).



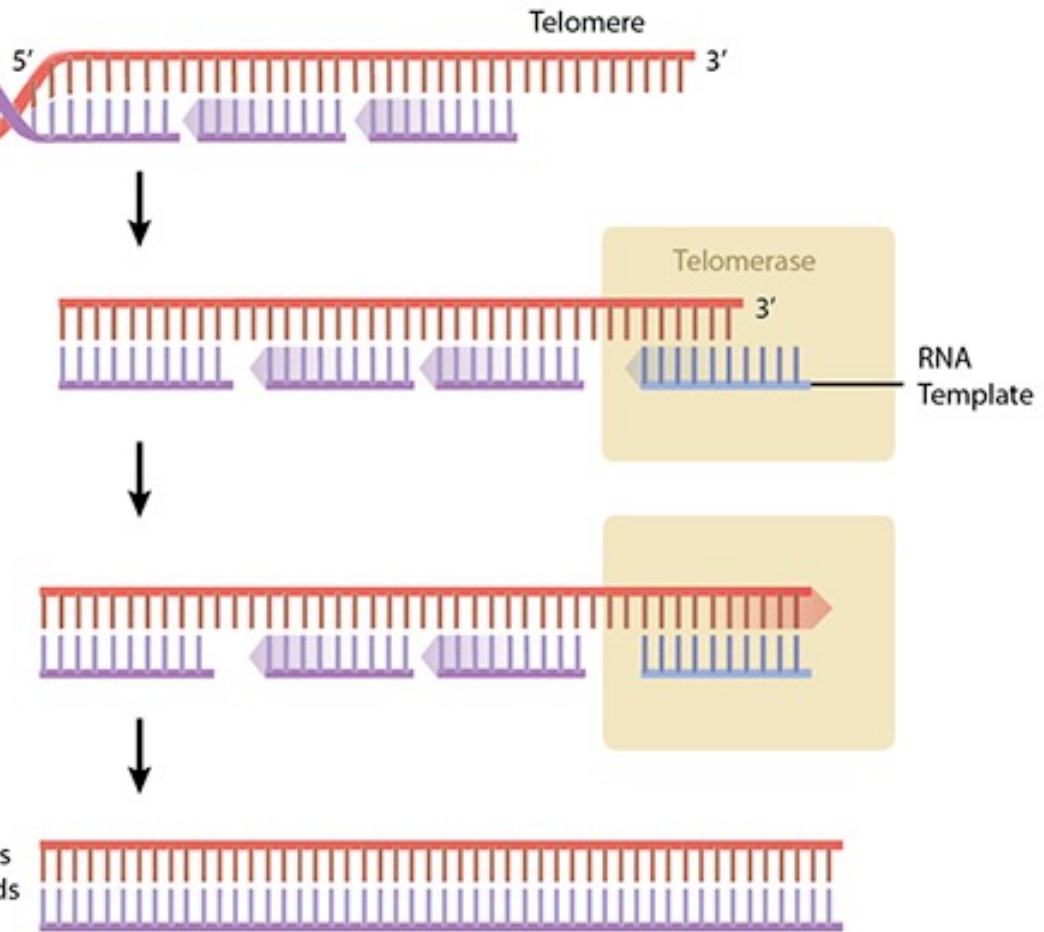
Telomeres shorten as cells divide



Telomerase binds to 3' end of the telomere sequence, along with an RNA template

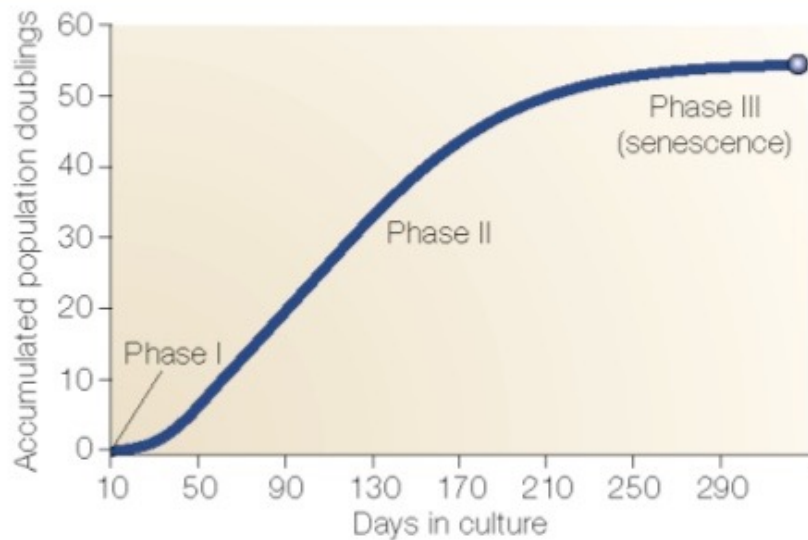
Telomerase catalyses the addition of bases, restoring the Telomere length.

DNA polymerase extends and seals the DNA strands



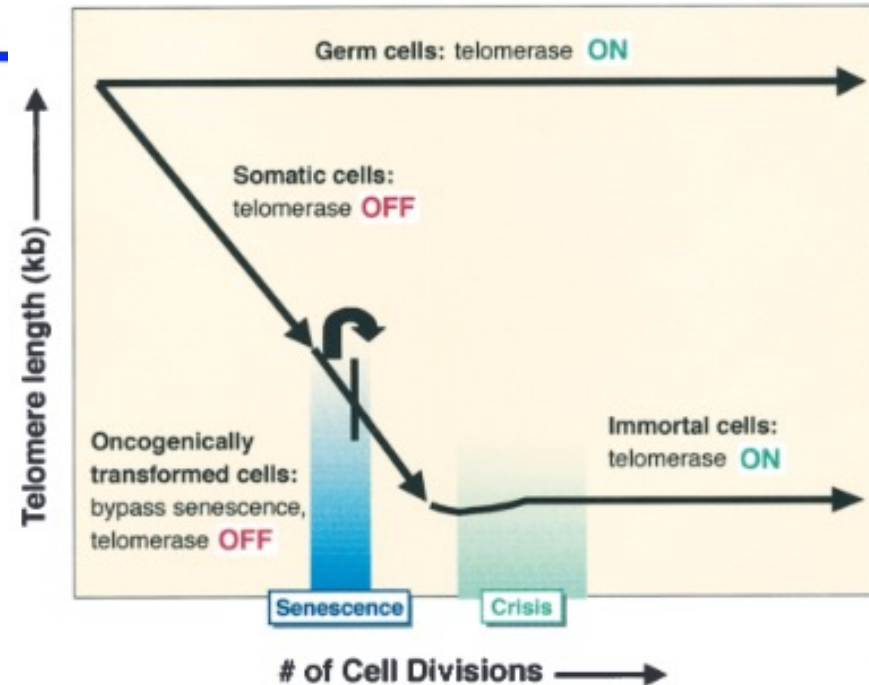
# Teoria de Hayflicks - crises na cultura de células! Devido a perdas de telômeros!

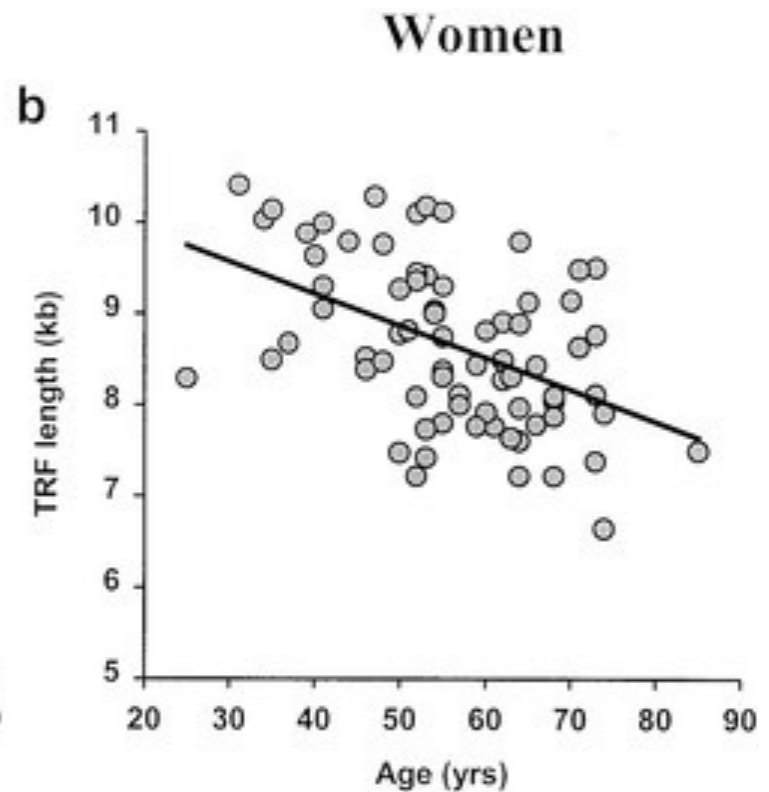
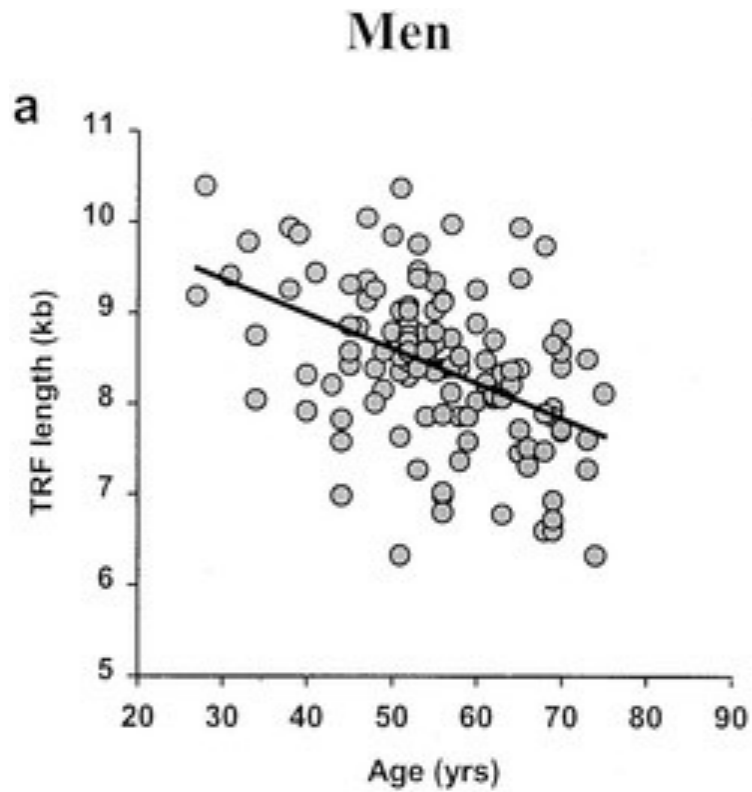
## Hayflick's Limit



Nature Reviews | Molecular Cell Biology

[http://www.nature.com/nrm/journal/v1/n1/fig\\_tab/nrm1000\\_072a\\_F3.html](http://www.nature.com/nrm/journal/v1/n1/fig_tab/nrm1000_072a_F3.html)





**Questão 1: As DNA polimerases são fiéis!**

**O que é fidelidade de replicação?**

**1.É o fato de que as duas fitas de DNA nunca se separam.**

**2.A enzima DNA polimerase é fiel quando coloca nucleotídeos com emparelhamento correto.**

**3.A enzima DNA polimerase é fiel enquanto não se separa do DNA.**

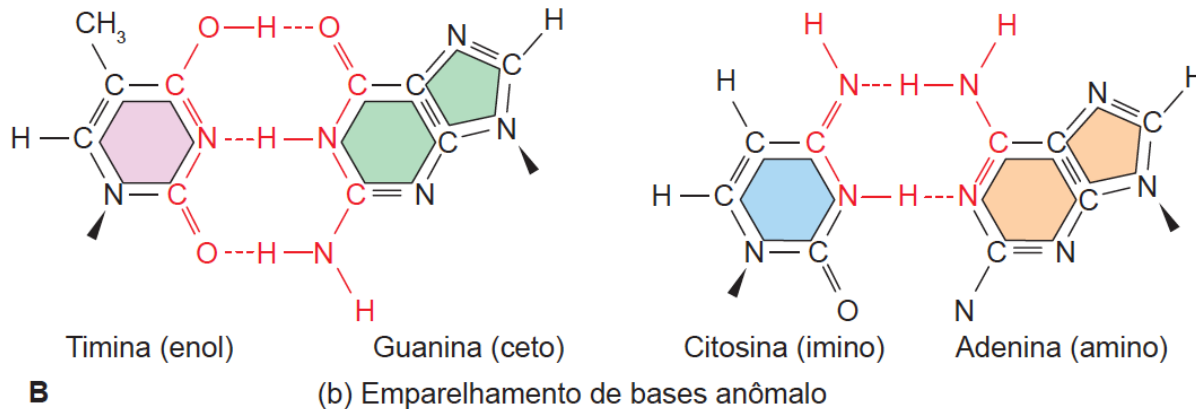
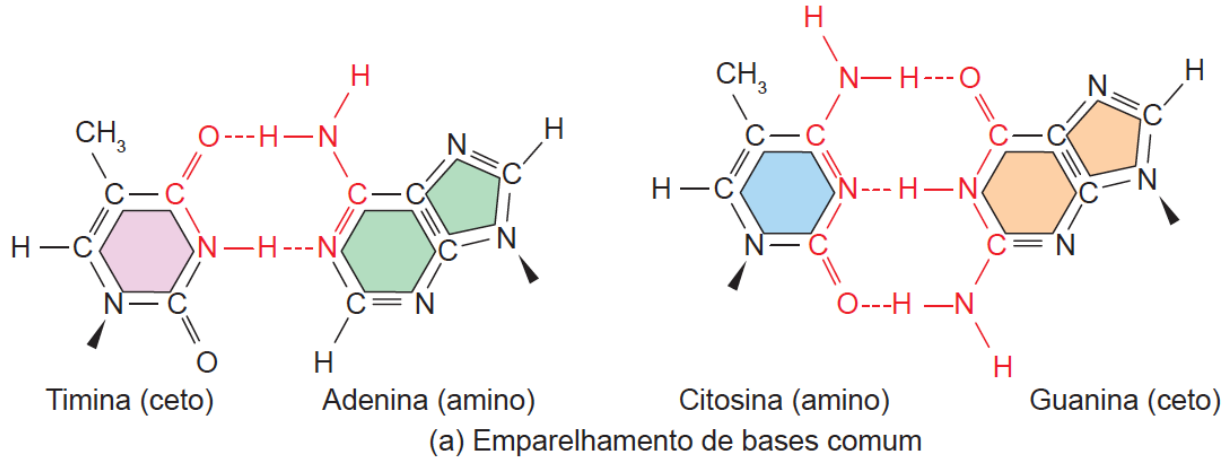


- **que é fidelidade de replicação????**
- **A DNA polimerase III (*E.coli*) erra um nucleotídeo a cada  $10^6$  nucleotídeos inseridos.**

**Cada ciclo de replicação em *E.coli* pode ter um erro em cada  $10^9$  nucleotídeos!**

**COMO EXPLICAR ESSA DIFERENÇA????**

# Erros podem ser resultado de apenas pareamento errado!!!! Tautômeros geram isso, e precisam ser corrigidos na replicação!

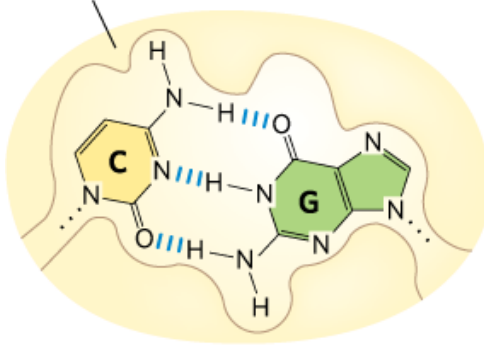


O que esse pareamento pode resultar na célula?

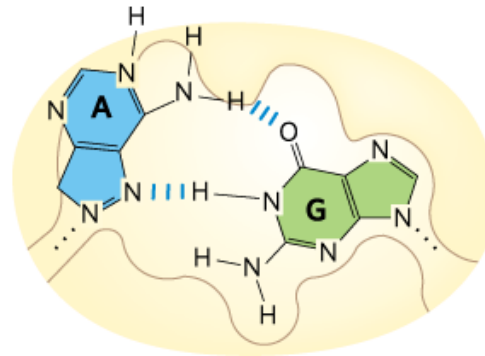
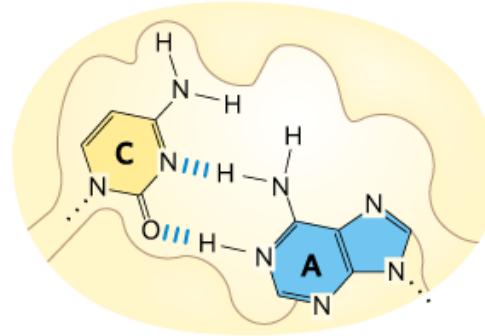
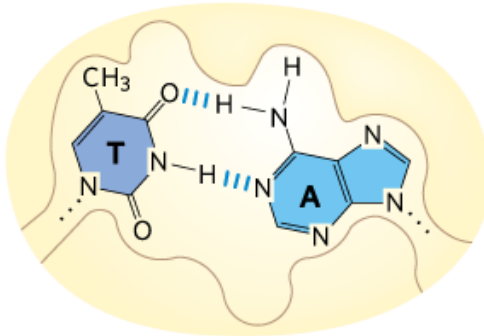
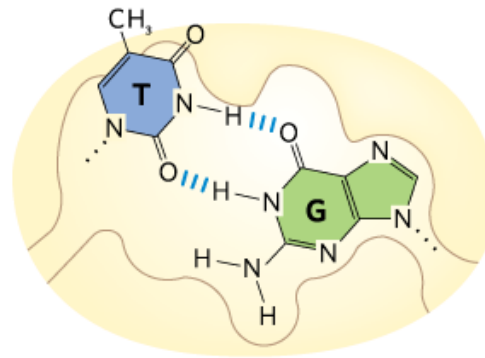
# Mas pode haver pareamento errado... como a DNA polimerase consegue distinguir?

(a) Pareamento de bases correto

Formato do sítio ativo na forma fechada



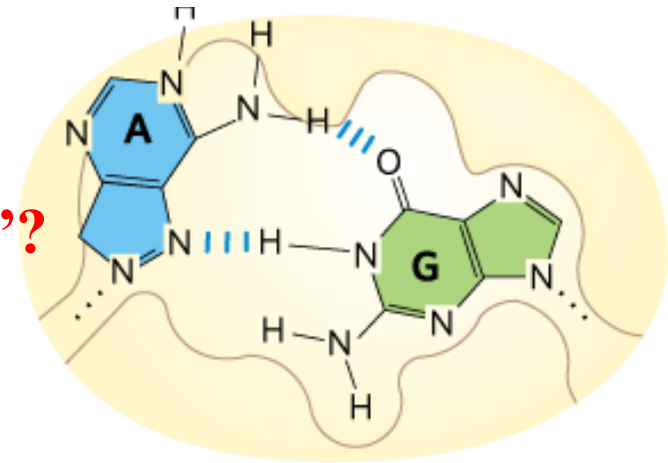
(b) Pareamento de bases incorreto



**FIGURA 11-10** Pareamento de bases na cavidade do sítio ativo de Pol I. (a) O formato do sítio ativo na conformação fechada. Pares de bases corretos  $G \equiv C$  e  $A = T$  ajustam-se dentro do sítio ativo. (b) Pareamentos de bases incorretos não se encaixam no sítio.

Mas o que vai ocorrer se houver um pareamento errado como esse?

Em que momento esse erro vai ser “fixado”?



5'-GCTAA**T**CGATCAA-3'

3'-CGATT**A**GCTAGTT-5'

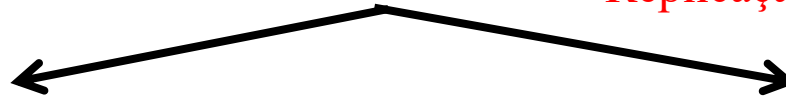
Troca da base



5'-GCTAA**G**CGATCAA-3'

3'-CGATT**A**GCTAGTT-5'

Replicação! Fixou a mutação!



5'-GCTAA**T**CGATCAA-3'

3'-CGATT**A**GCTAGTT-5'

5'-GCTAA**G**CGATCAA-3'

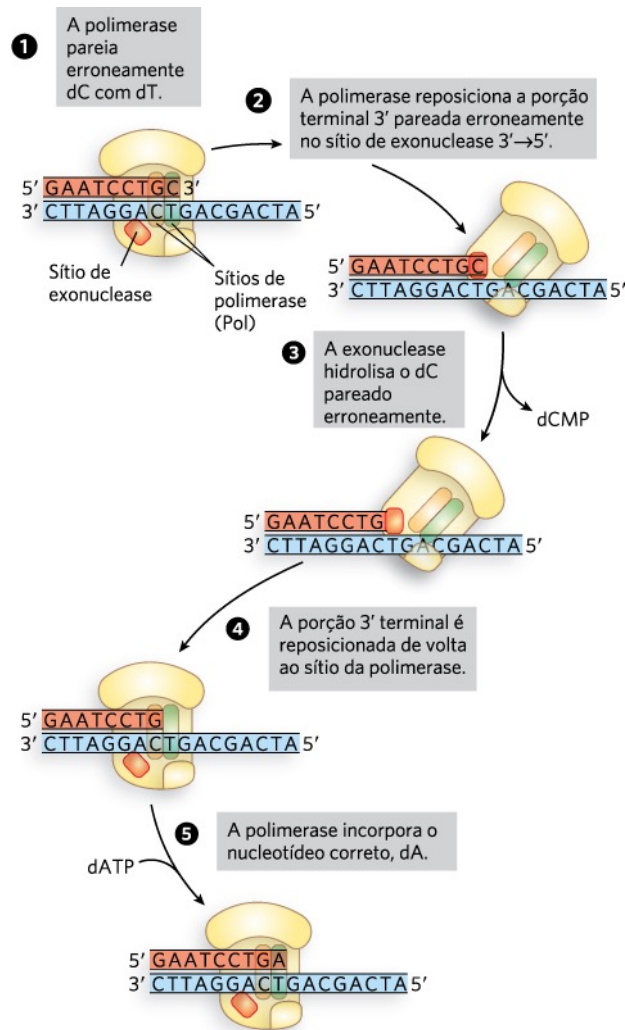
3'-CGATT**C**GCTAGTT-5'

## Questão 2:

**A fidelidade das DNA polimerases ocorre também porque:**

- 1.A enzima DNA polimerase pode ter uma atividade editorial (*proof reading*), graças a sua atividade exonuclease 5'-3'.**
- 2.A enzima DNA polimerase pode ter uma atividade editorial (*proof reading*), graças a sua atividade exonuclease 3'-5'.**
- 3.A enzima DNA polimerase pode ter uma atividade de correção após o DNA ser replicado totalmente.**

# a DNA polimerase insere um nucleotídeo errado a cada $10^5$ a $10^6$ nucleotídeos.... E a diferença?

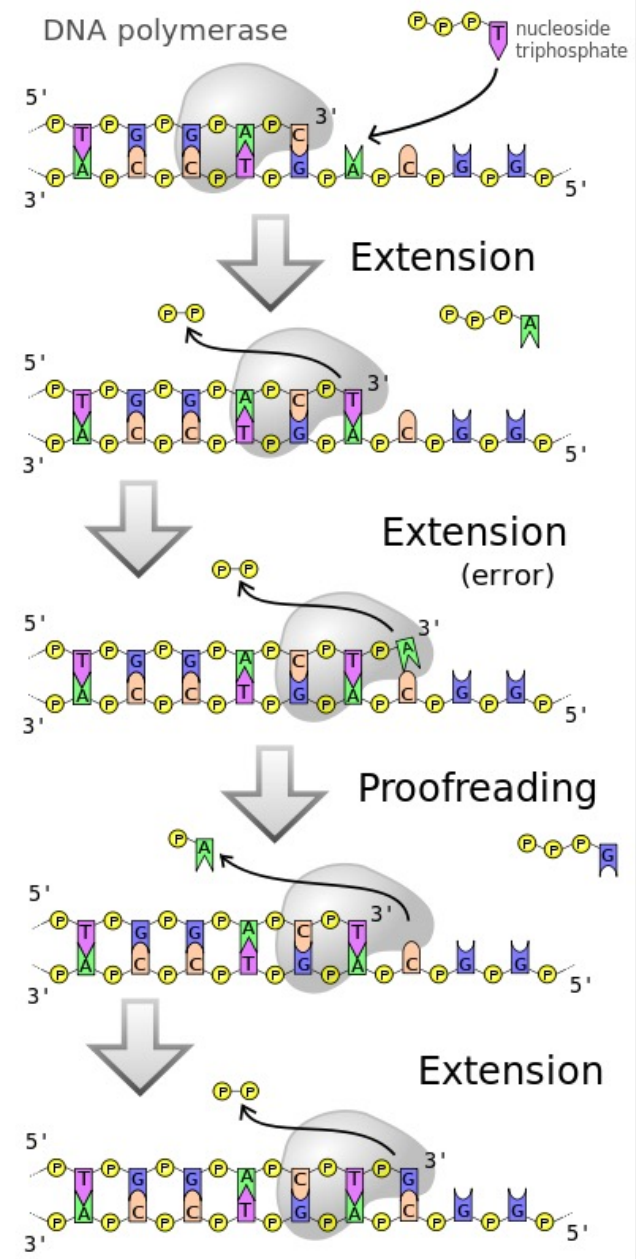


A atividade exonuclease 3'-5' faz a função “editorial” ou *Proofreading*.

o que dá uma fidelidade cerca de 100 vezes maior!

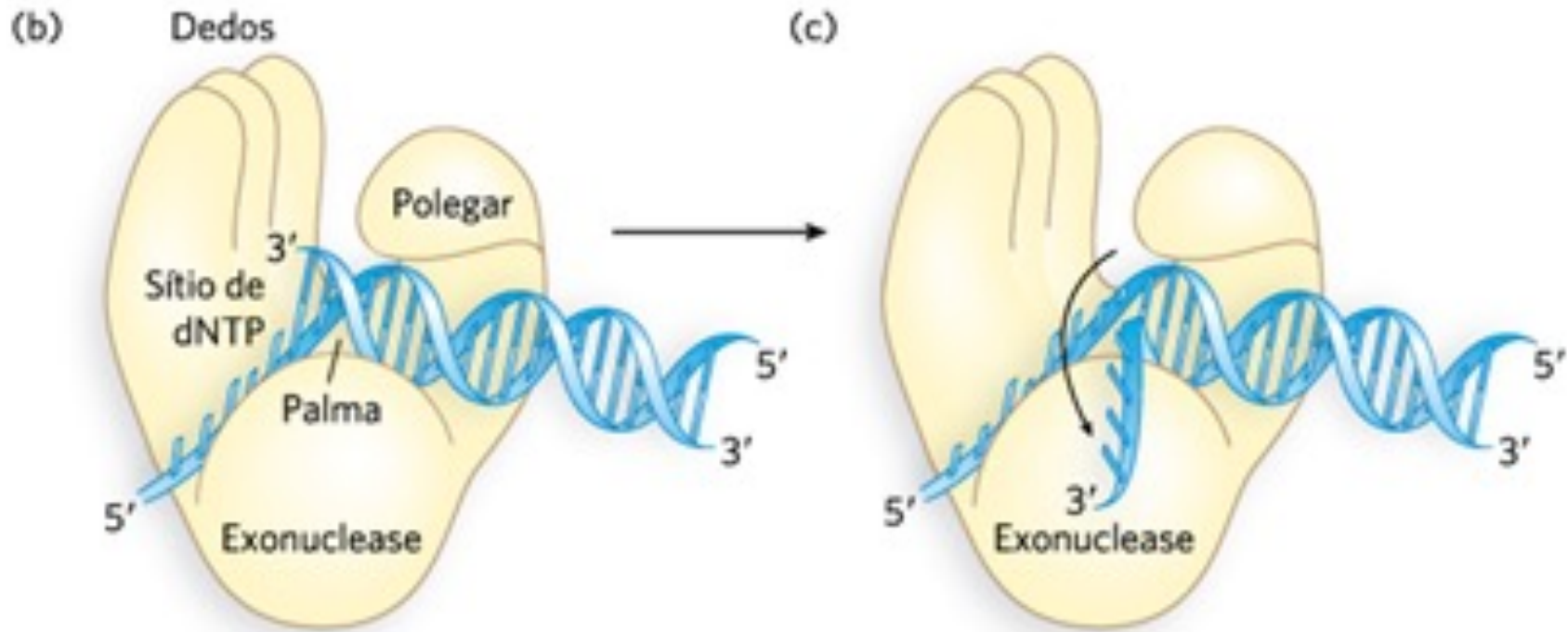
**FIGURA 11-6** A atividade de exonuclease 3'→5' de correção de erro das DNA-polimerases. O sítio ativo da exonuclease 3'→5' é distinto do sítios de polimerização e revisa o produto da DNA-polimerase.

**Veja de novo a atividade  
proofreading, exonuclease 3'-5'**



DNA polymerase with proofreading ability

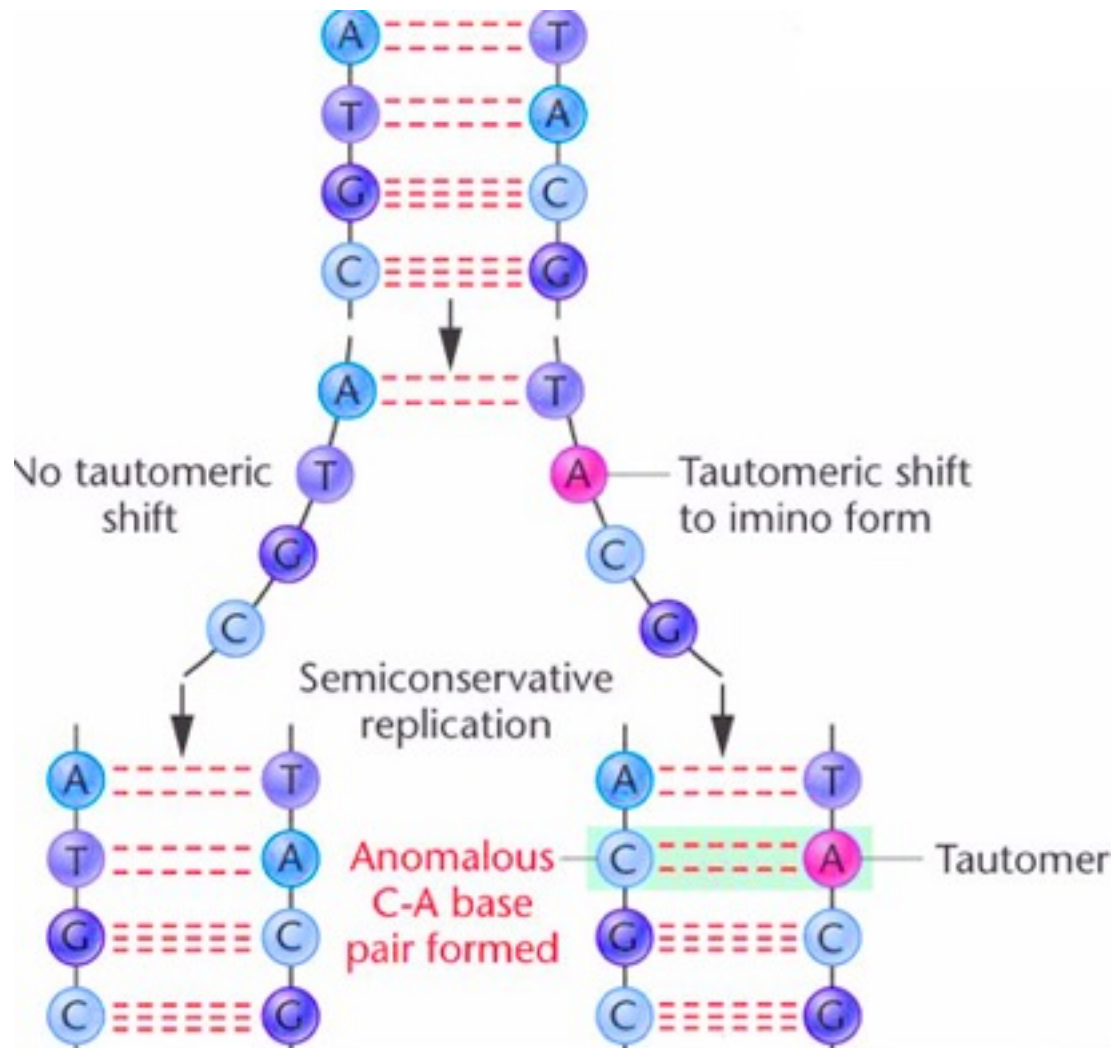
# Para a atividade editorial a DNA polimerase leva a fita errada para o domínio de exonuclease.....



(c) Uma porção terminal 3' pareada erroneamente abre o espaço de cerca de 4 nucleotídeos para inserir-se dentro do sítio de exonuclease 3'→5'.  
[Fonte: (a) PDB ID 4KTQ.]



**E se depois da DNA polimerase completar a replicação, ainda ficar um erro? Como esse?**



**Isto é um emparelhamento errado ou mismatch!!!**

# O Mismatch também pode formar por recombinação homóloga:

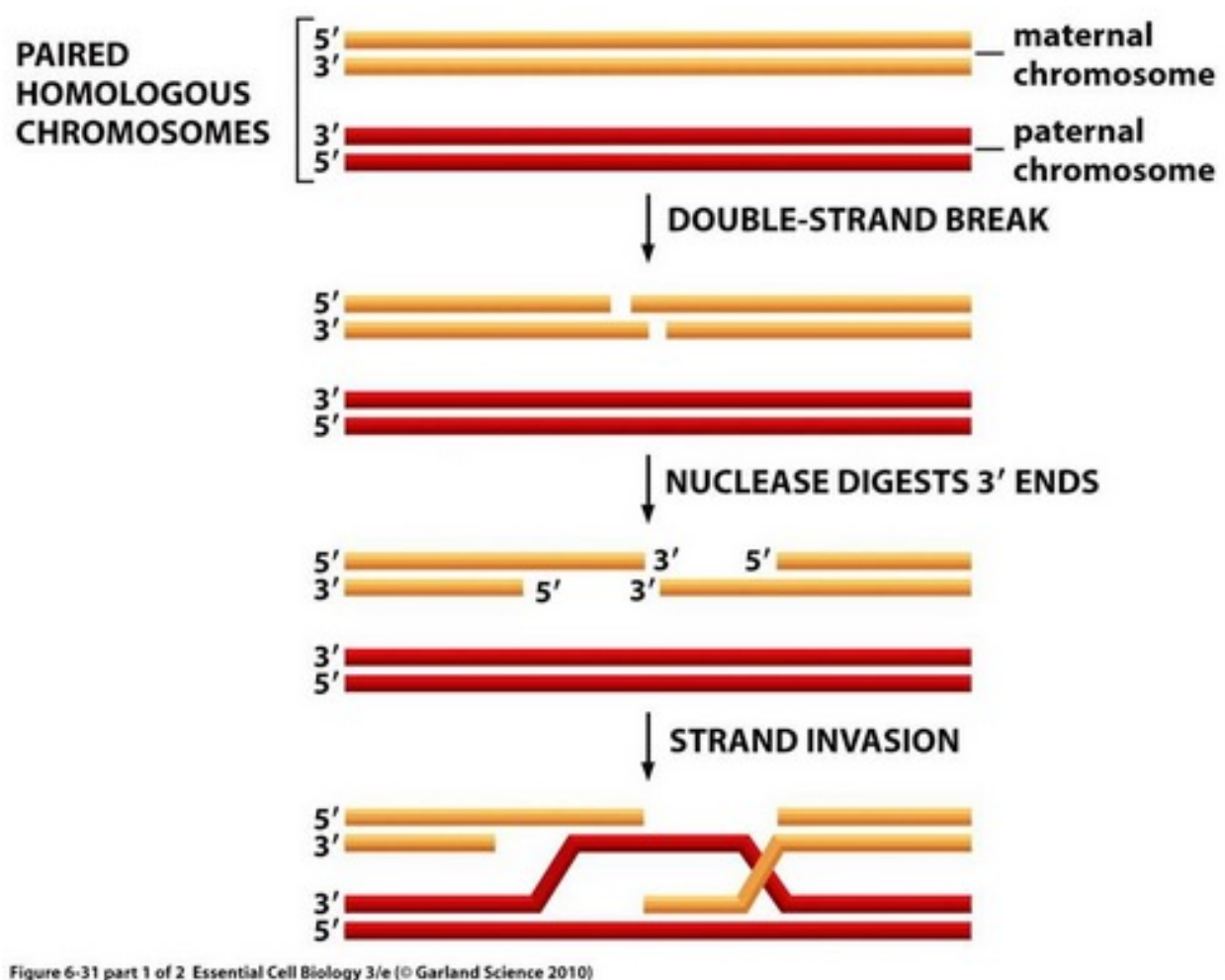
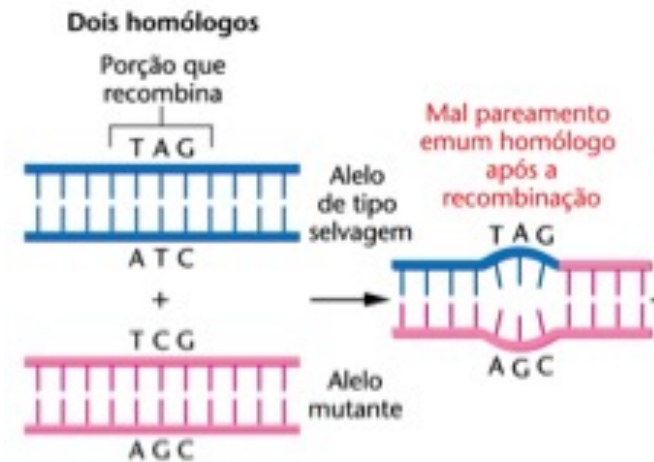
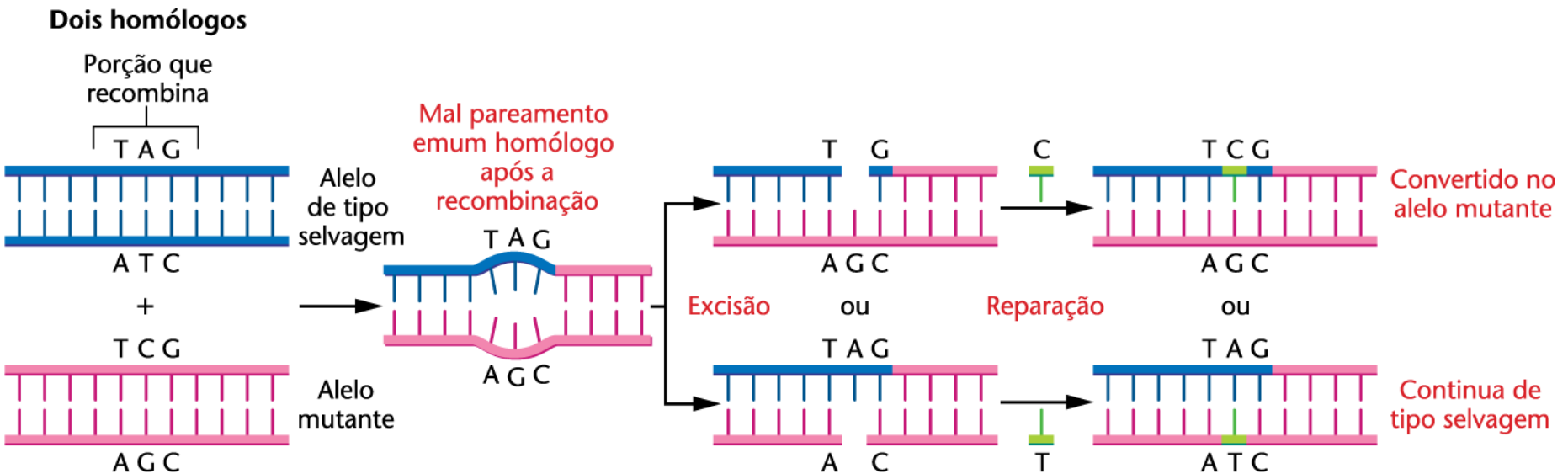


Figure 6-31 part 1 of 2 Essential Cell Biology 3/e (© Garland Science 2010)



Como corrigir esses erros?

# Após a replicação ainda há possibilidade de correção de erro: por um sistema de reparo de *mismatch*!



**FIGURA 11-19** Proposta de um mecanismo responsável pelo fenômeno da conversão gênica durante a recombinação na meiose. Ocorre o mal pareamento de um par de bases em um homólogo recombinante (devido à presença de um alelo mutante) durante a formação do heterodúplex. Durante a reparação por excisão, uma das duas bases mal pareadas é removida, e o complemento é sintetizado. Em um caso, o par de bases mutante é preservado; quando é subsequentemente incluído em um esporo recombinante, o genótipo mutante será mantido. No outro caso, o par de bases mutante é convertido na sequência de tipo selvagem. Quando incluído em um esporo recombinante, o genótipo de tipo selvagem será expresso, causando uma proporção de troca não recíproca.

**Esse sistema de reparo mismatch reduz ainda mais o erro de replicação do DNA!**

**O que acontece quando sua célula da pele  
“toma sol” na praia?**

**•Que são lesões no DNA?**

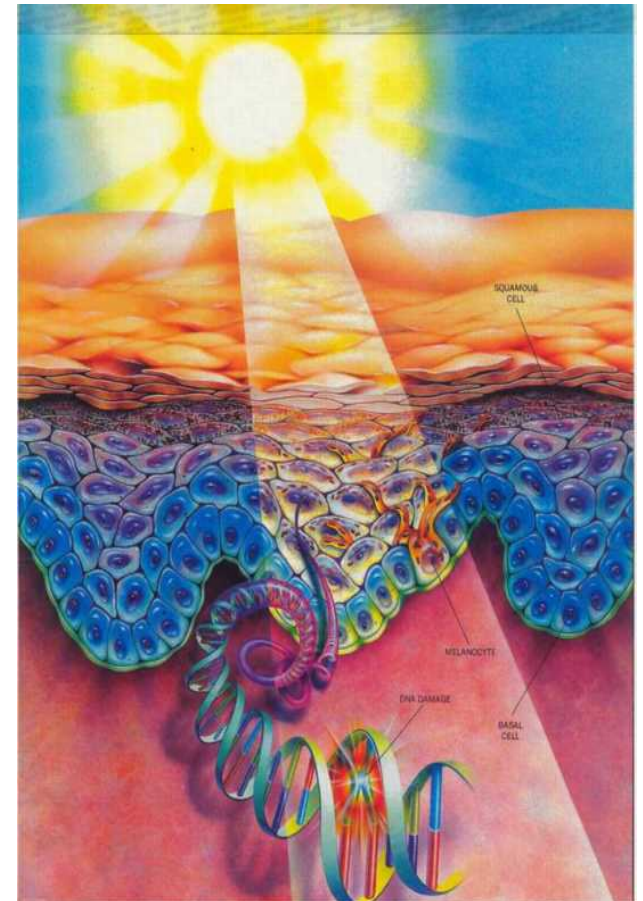
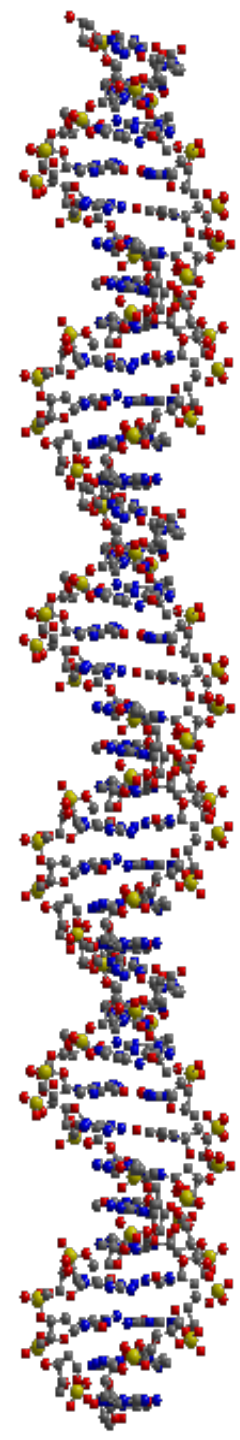
**•O que são mutações no DNA????**

## **Questão 3:**

**Quando você toma sol na praia:**

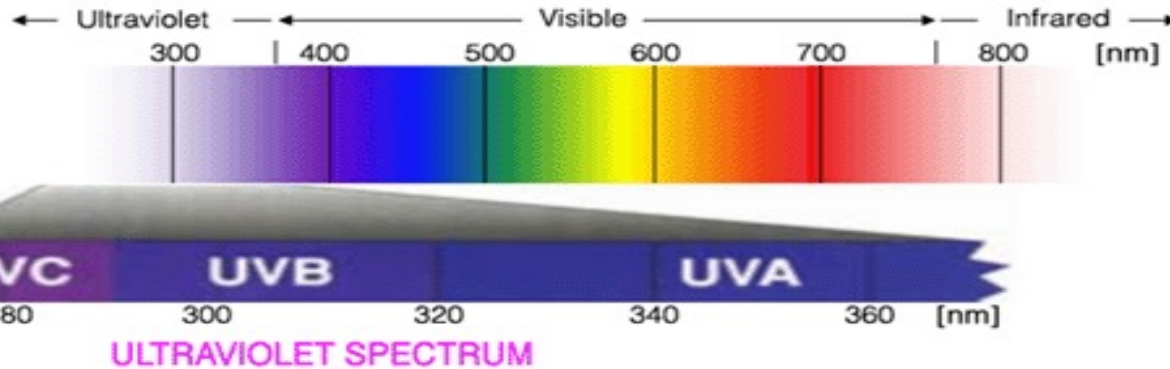
- 1.O DNA imediatamente sofre mutações provocadas pela luz UV do Sol.**
- 2.A luz do sol atinge nosso DNA e nosso corpo fica bronzeado.**
- 3.O DNA sofre alterações estruturais, lesões, provocadas pela luz UV do Sol.**

# A luz UVA e UVB da luz solar lesam o DNA de células da pele!!!



# Luz Ultravioleta(UV)

## ELECTROMAGNETIC SPECTRUM

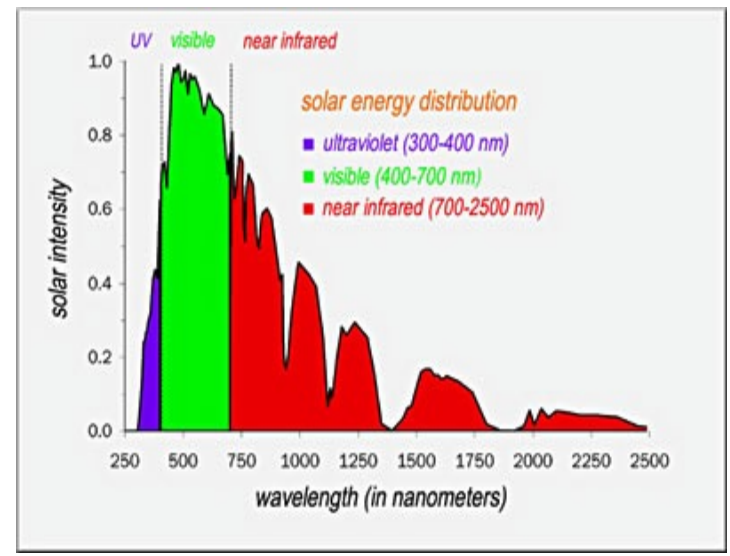


Ozone absorption

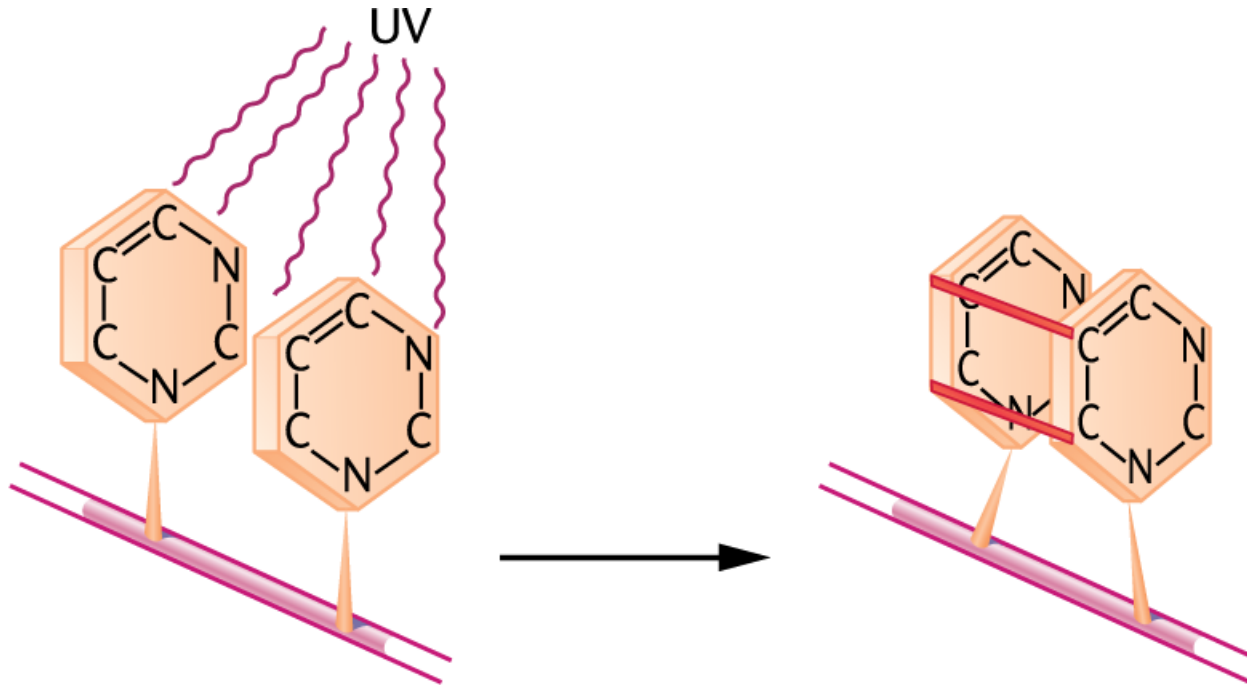
Transmitted by normal glass

Luz UV que chega na superfície da Terra!

UV\_TERRESTRE!



# Isso é uma lesão provocada pela luz UV!!!!



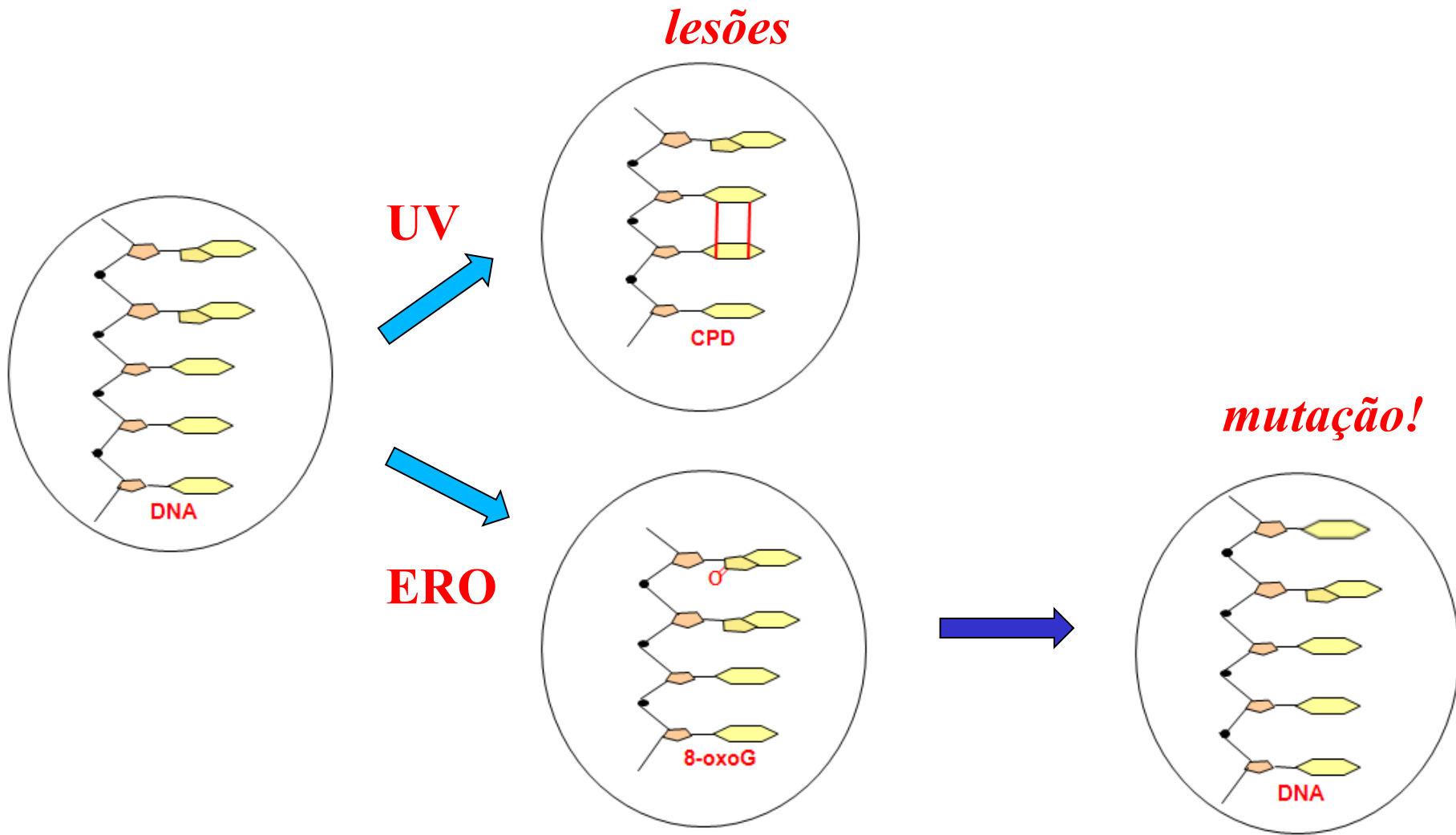
Dímero formado entre resíduos adjacentes de timidina em uma fita de DNA

**FIGURA 16-8** Indução de um dímero de timina por radiação UV, levando à distorção do DNA. As ligações covalentes ocorrem entre os átomos do anel pirimidínico.

E quais as consequências dessas lesões?

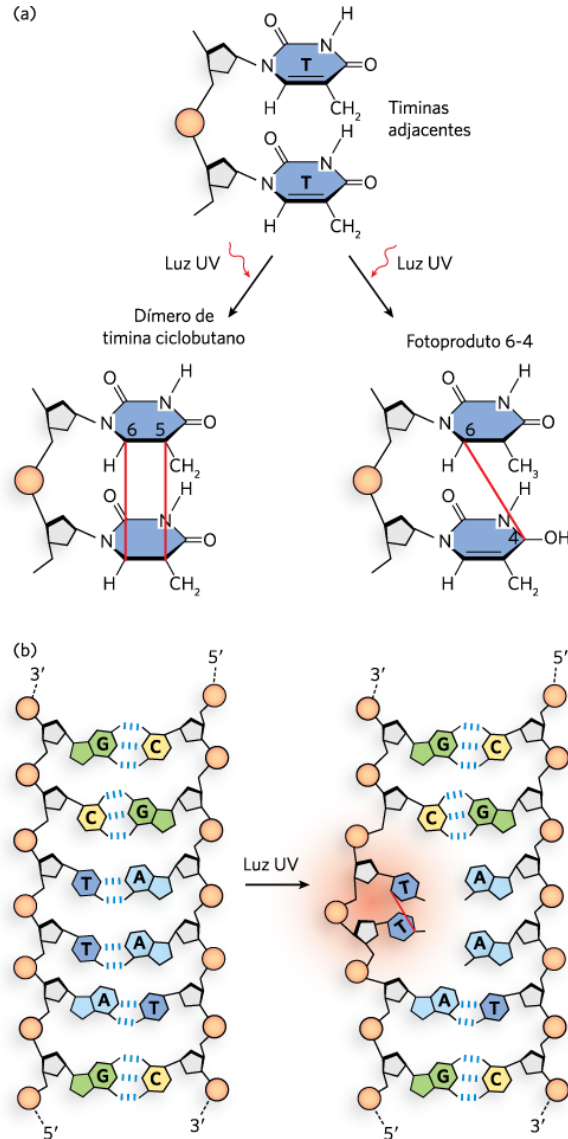


# Essas lesões no DNA são mutações? O que são mutações?



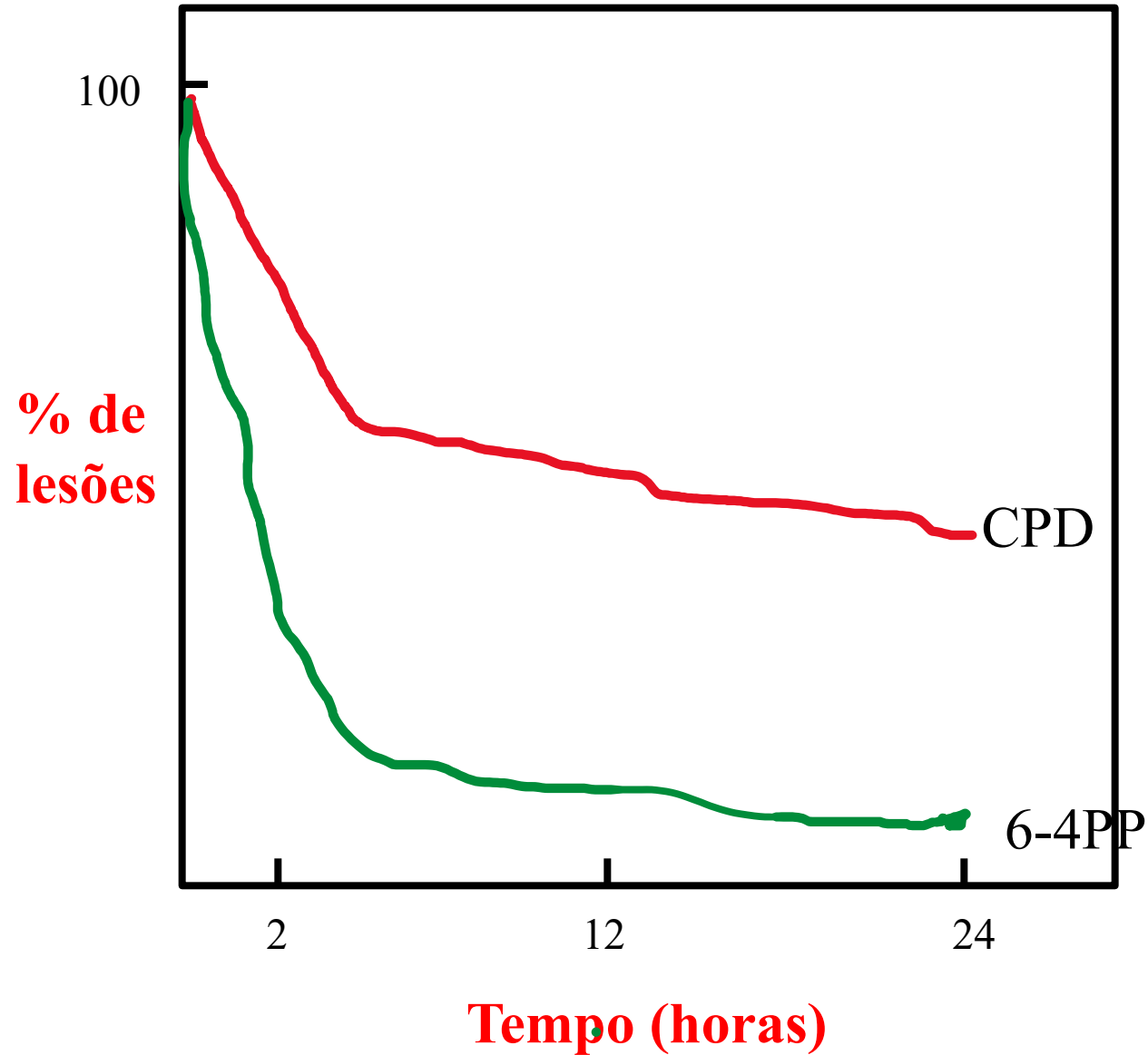
**ERO= espécies radicais de oxigênio!**

# O DNA consegue replicar? Ou transcrever?



**FIGURA 12-15** Dímeros de pirimidina e seus efeitos no duplex de DNA. (a) Um tipo de reação causada pela luz UV resulta em um anel ciclobutano, que envolve átomos C-5 e C-6 de bases pirimídicas adjacentes (timina, neste caso). Uma reação alternativa resulta em um fotoproduto 6-4 que liga os átomos C-6 e C-4 de pirimidinas adjacentes. (b) A formação de um dímero de pirimidina introduz uma curvatura ou torção no DNA.

# Mas as lesões podem ser reparadas nas células humanas!

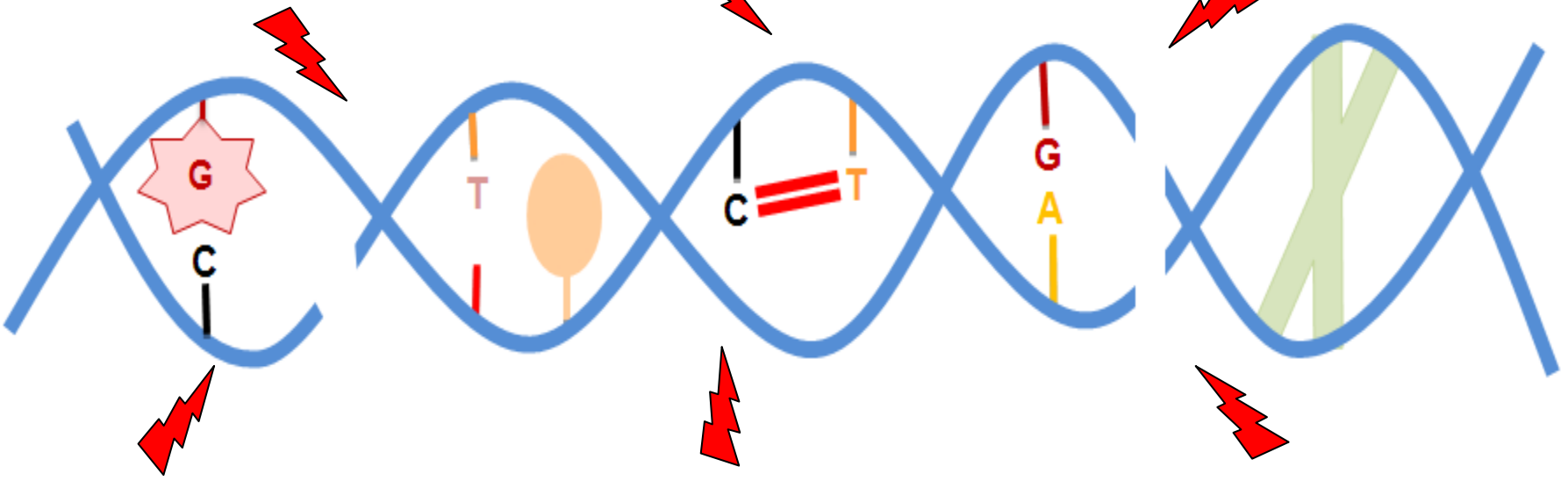


**Mas outras lesões podem ser provocadas também por outros eventos!!**

Respiração:  
radicais de oxigênio

Ultravioleta do SOL

mutágenos  
químicos

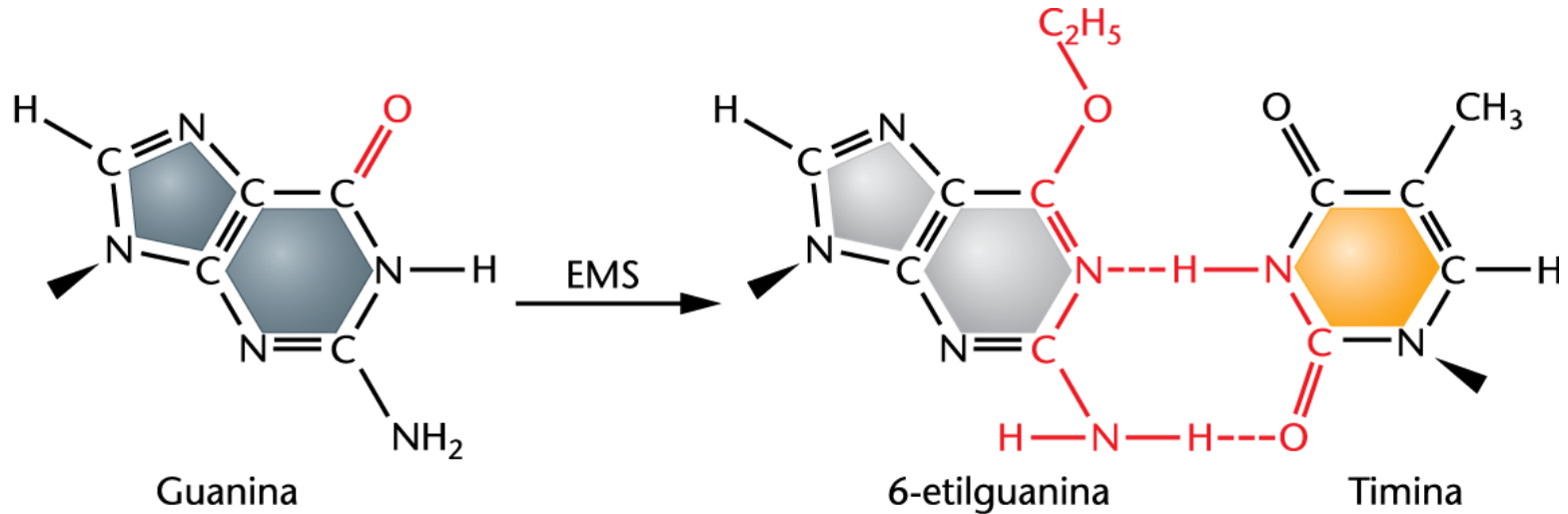


Cigarro

poluição

Drogas  
quimioterapicas  
para cancer...

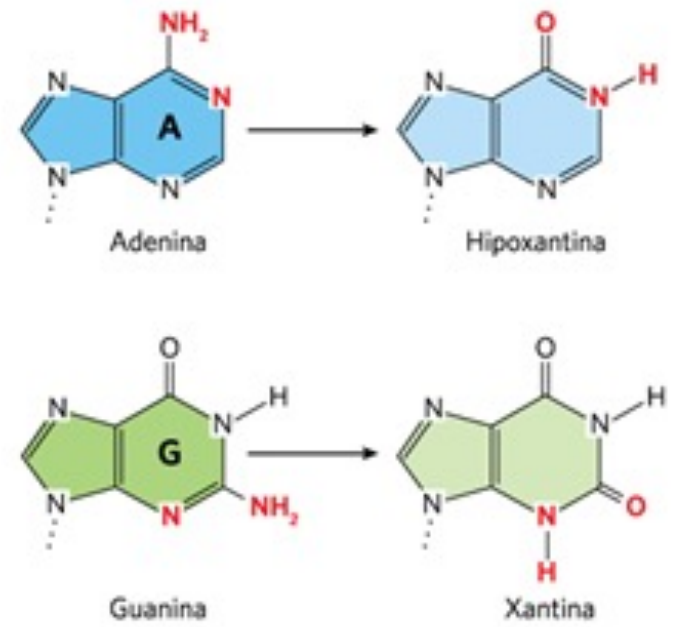
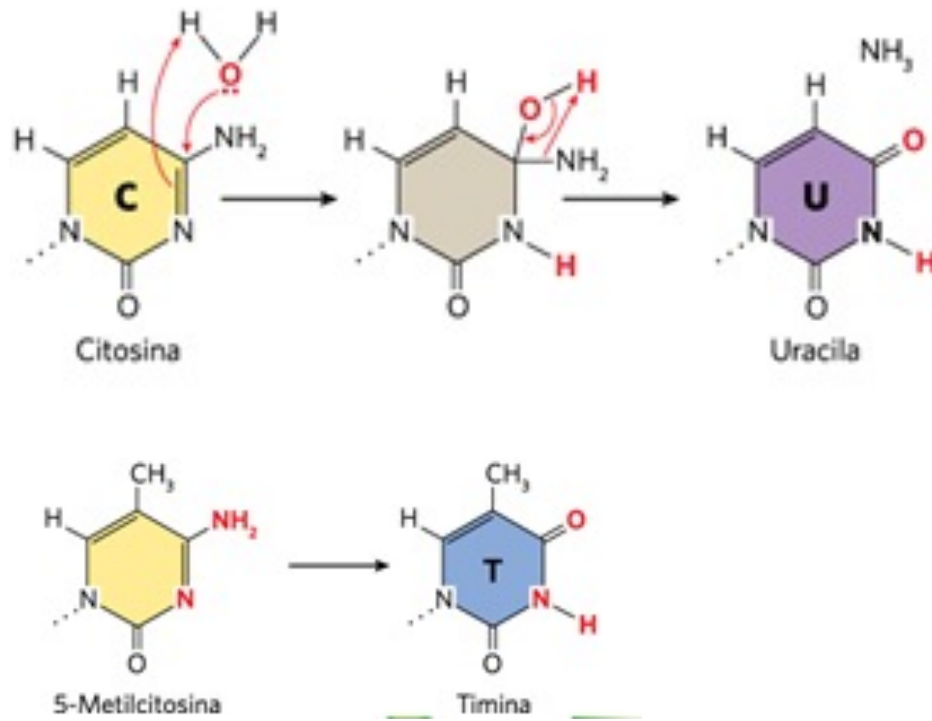
# Essa é uma outra lesão provocada por agente químico!!!!



**FIGURA 16-6** Conversão da guanina em 6-etilguanina pelo agente alquilante etilmetanossulfonato (EMS). A 6-etilguanina pareia com a timina.

Que tipo de consequência você vê aqui?

# Mas as lesões podem ser espontâneas!!!!

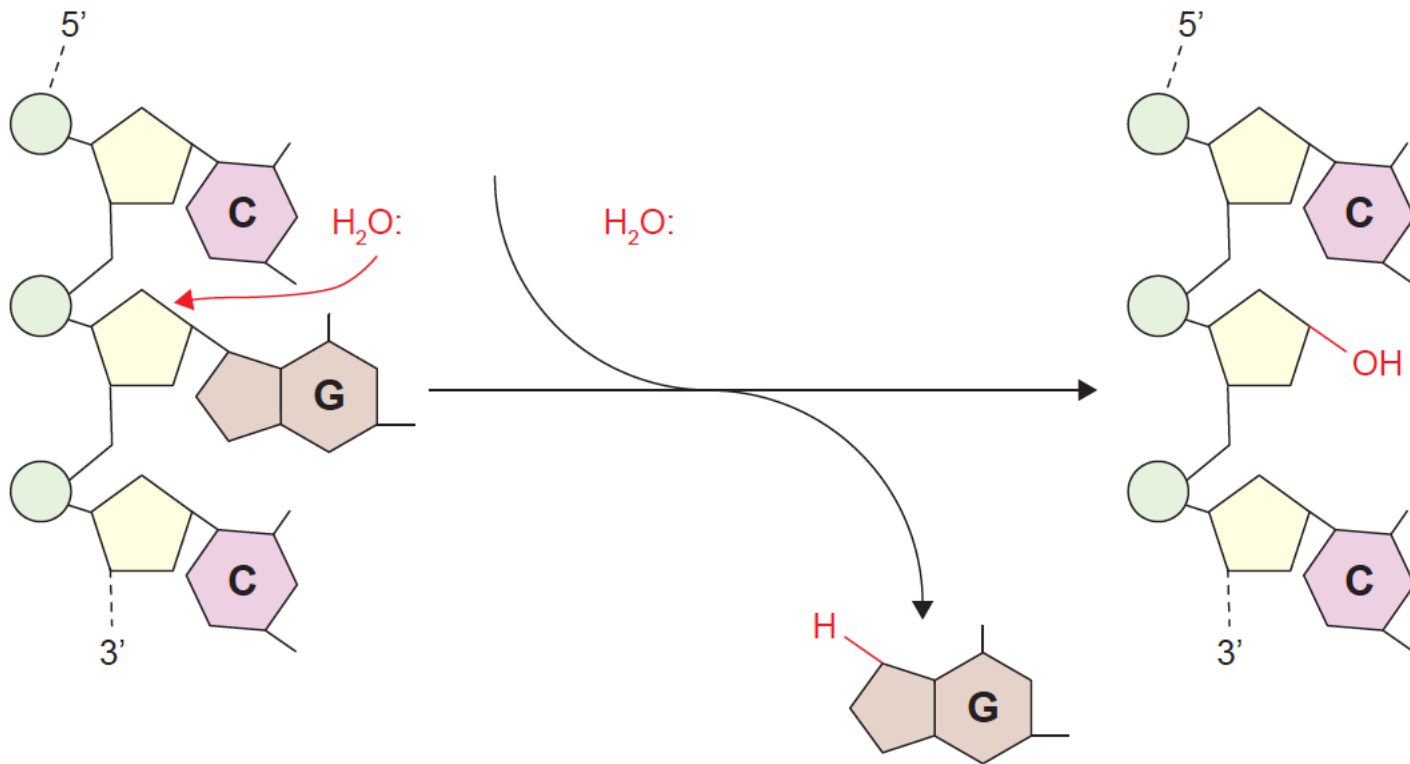


**FIGURA 12-8** Desaminação de bases nucleotídicas pela hidrólise espontânea. Nessas reações de desaminação, somente a base é apresentada para cada resíduo de nucleotídeo. (a) Uma reação de hidrólise em que a água é adicionada à citosina, resultando na desaminação à uracila e amônia. Um mecanismo similar ocorre em outras desaminações. (b) Reações de desaminação comuns resultantes da hidrólise de nucleotídeos no DNA.

Qual o problema de você trocar uma citosina por uma uracila ou timina?

# Outras lesões podem ser espontâneas!!!!-

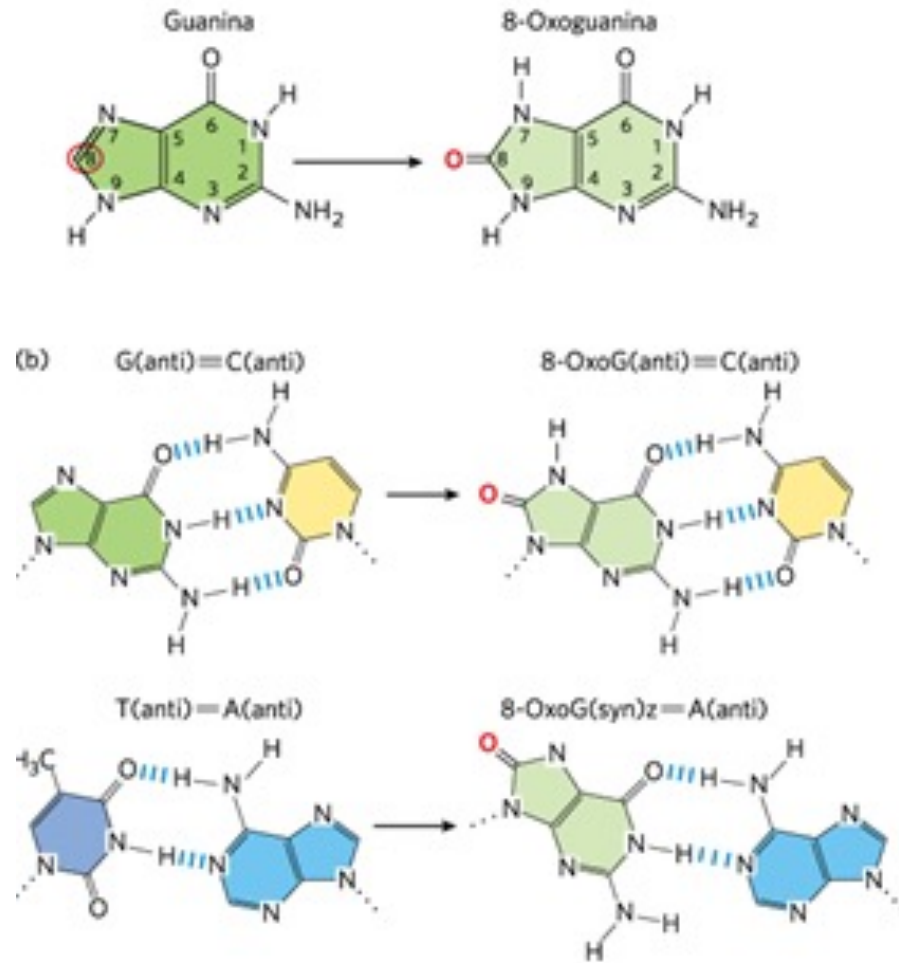
## Sítios abásicos ou apurínicos e apirimidínicos



A

Mais de 10.000 reações dessas ocorrem em uma célula, por dia a 37°C!

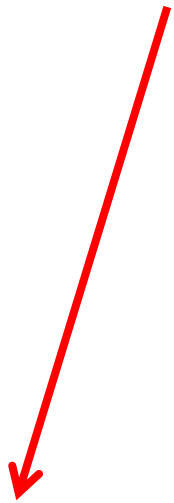
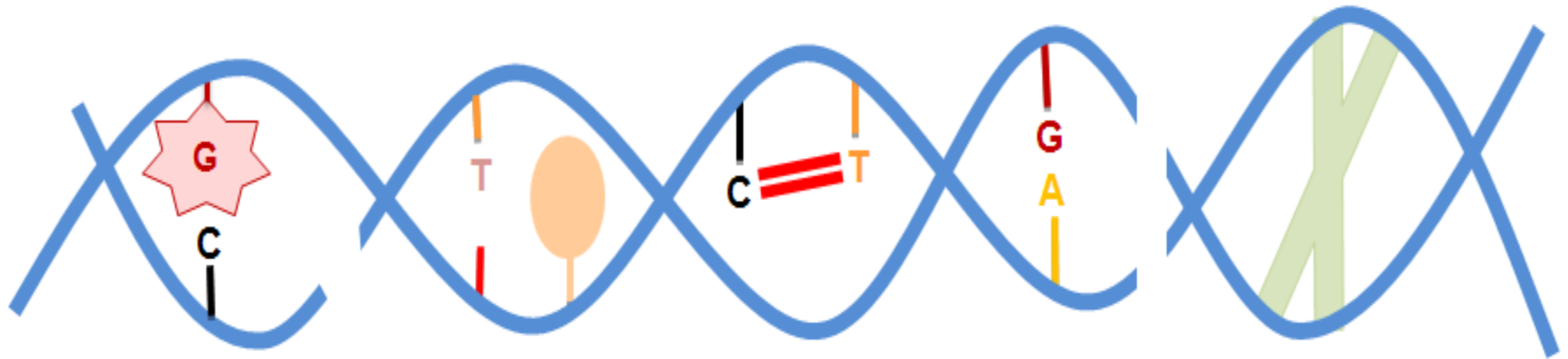
# O oxigênio que respiramos pode oxidar o DNA!!!!



O que esse pareamento pode resultar na célula?



## E a célula tem como se defender dessas lesões?



**Reparo Excisão de nucleotídeo (NER)**



**Reparo Excisão de base (BER)**



**Reparo de Mismatch (MMR)**

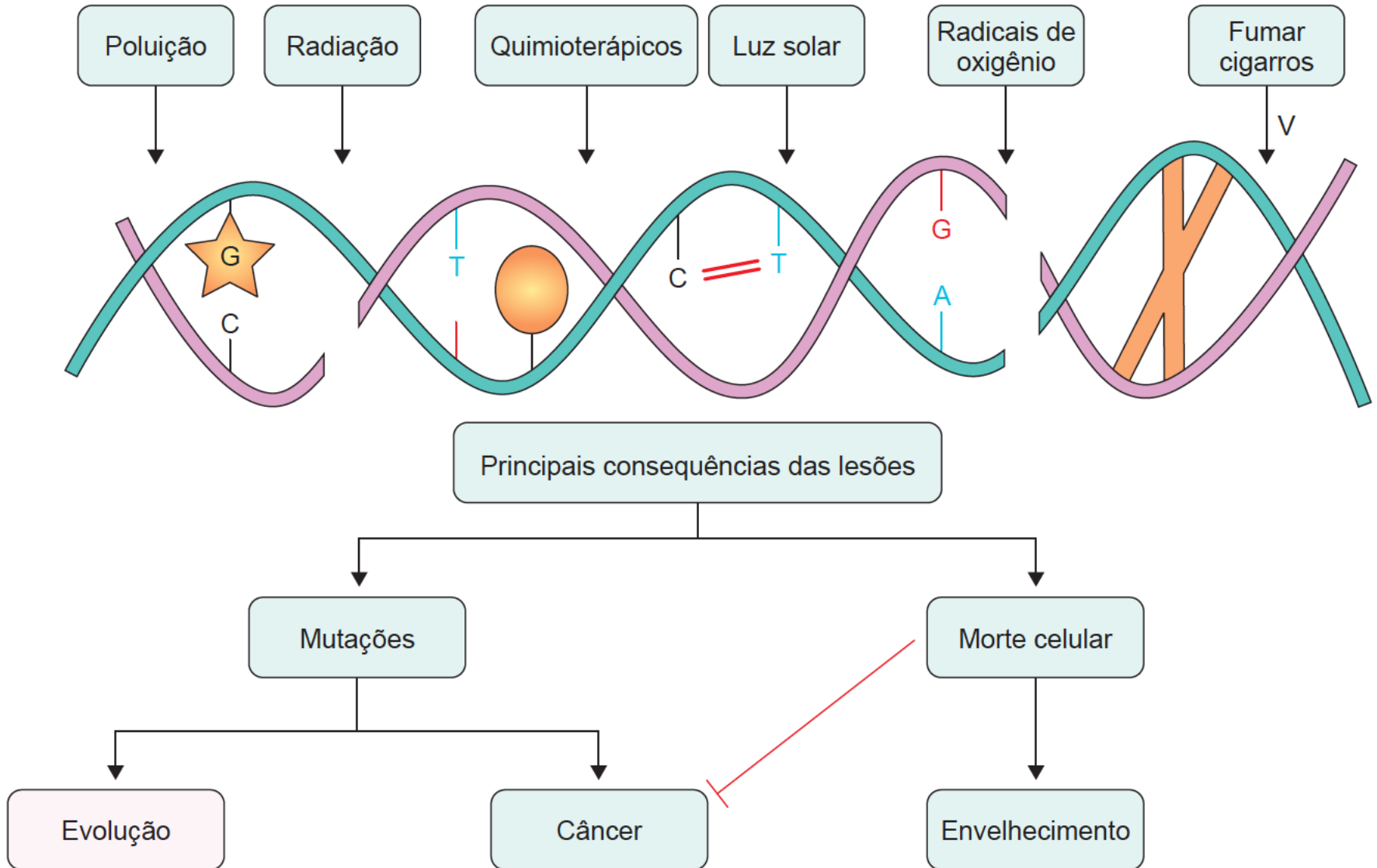


**Recombinação Homóloga (HR)**



**Reparo de extremidade Não homólogas (NHEJ)**

# E se as lesões não forem reparadas?

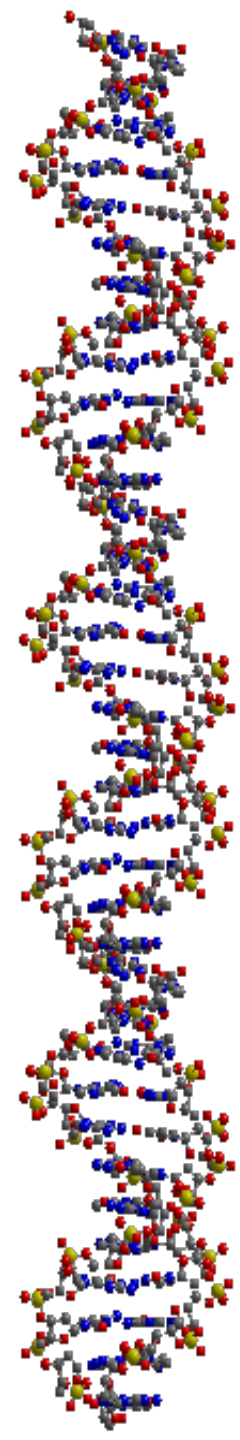
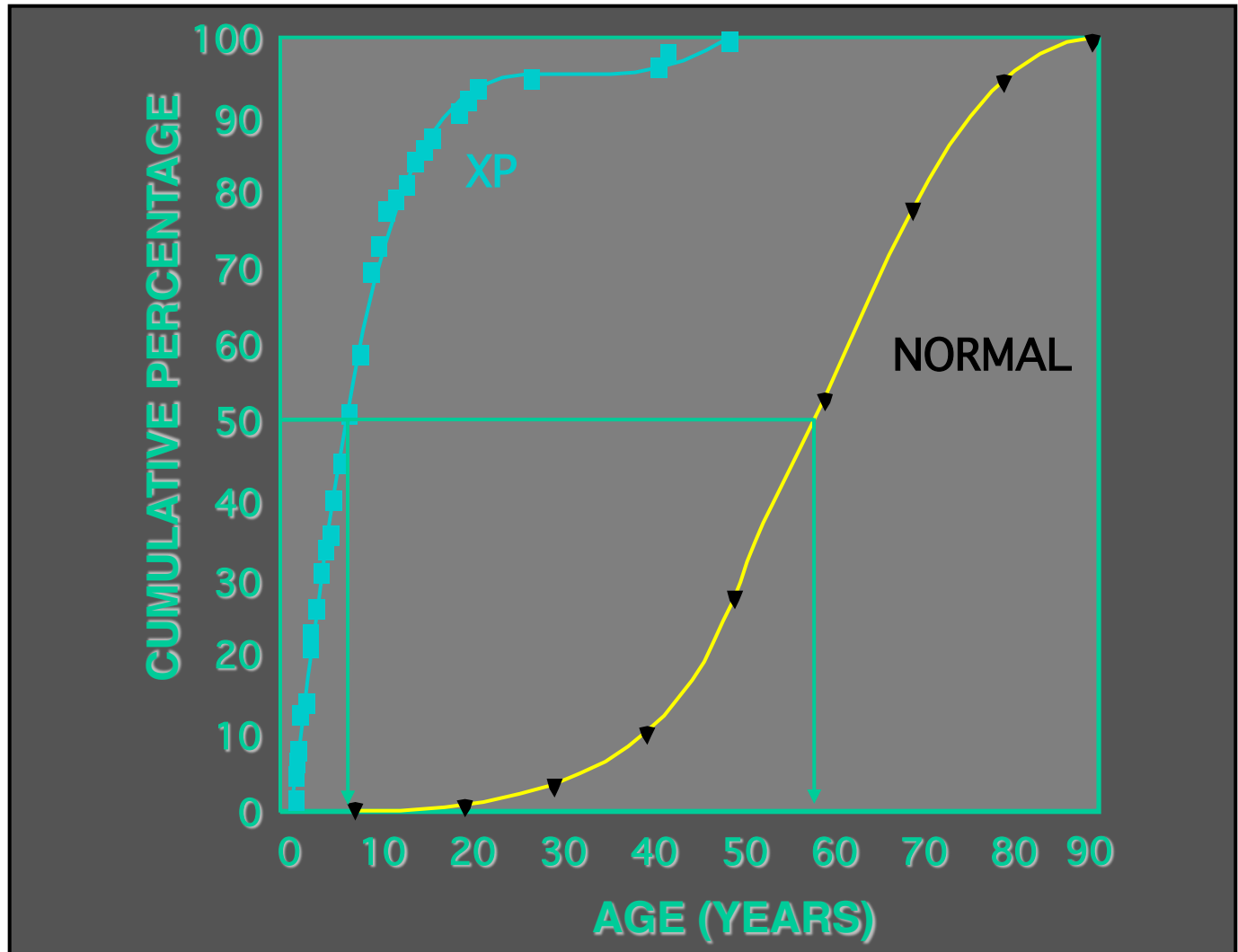


**Xeroderma pigmentosum (XP) – *pele seca e pigmentada (nas regiões expostas a luz do sol)***

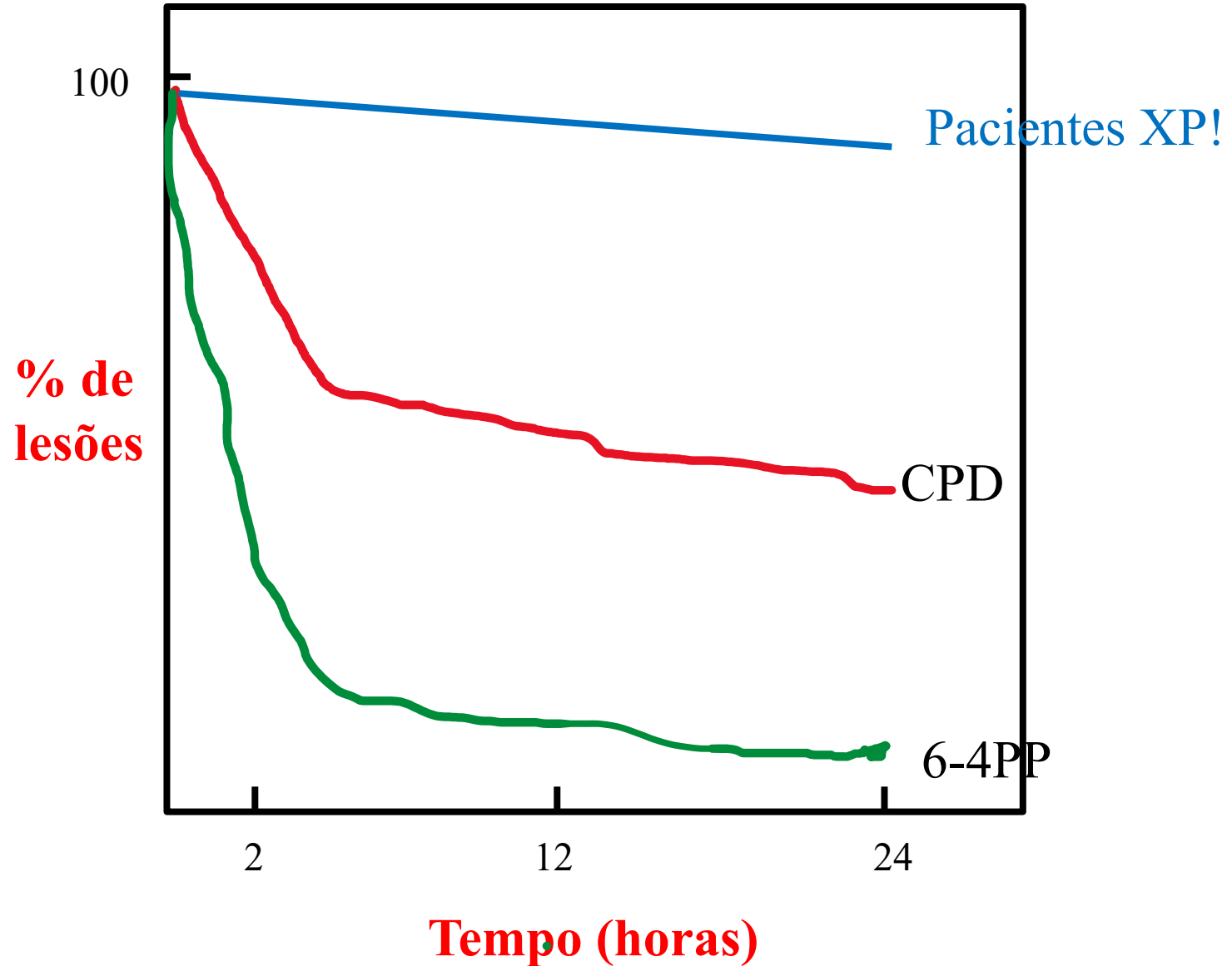
**Doença genética primeiramente descrita em 1874 por Moritz Kaposi e Ferdinand von Hebra**



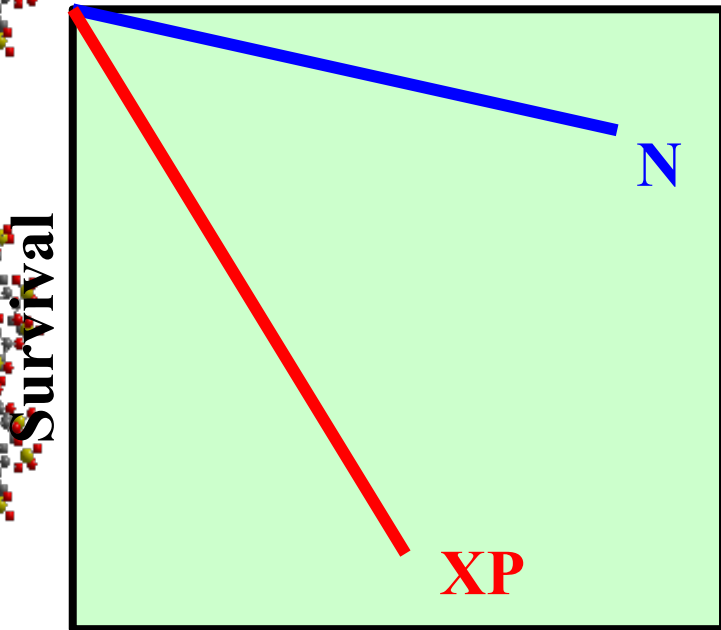
# pacientes XP apresentam câncer de pele Muito cedo na vida!.



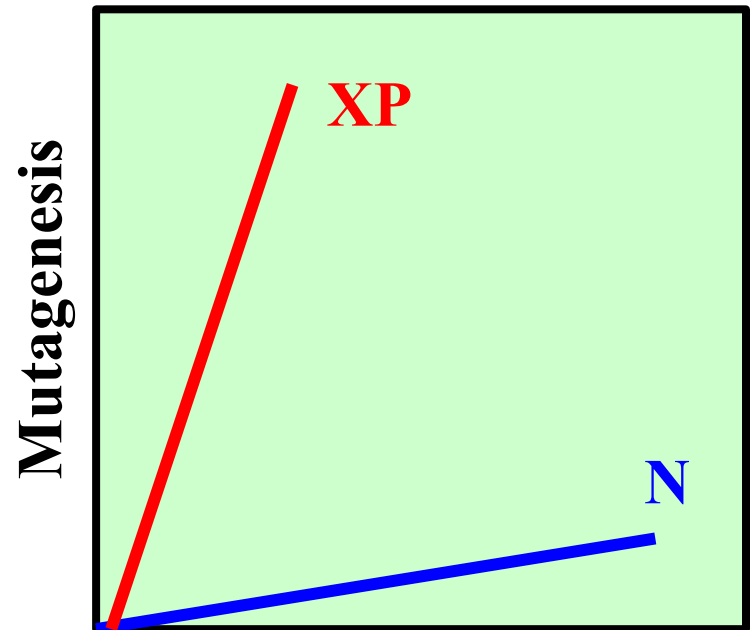
# Células de pacientes Xeroderma Pigmentoso (XP) não reparam lesões UV!



# Células XP são hiper sensíveis e Hipermutáveis após UV.



UV dose



UV dose

Por que esses pacientes XP tem cancer de pele?

Lesões no DNA-> mutações-> câncer!

**Alguns (20 a 30%) desses pacientes tem problemas neurológicos e envelhecimento precoce!**

**Exemplo de uma paciente XPA- (XP12BE)**



**4 yr**



**17 yr**



**37 yr**

# Outro exemplo de paciente XPG



**4 months**



**18 months**



**6 years old**





# No Brasil devemos ter entre 200 a 1000 pacientes, mas em Goiás temos uma comunidade inteira afetada, devido a casamentos consanguíneos



# Doenças genéticas com alta frequência de cancer podem estar Relacionadas a reparo de DNA!!!!

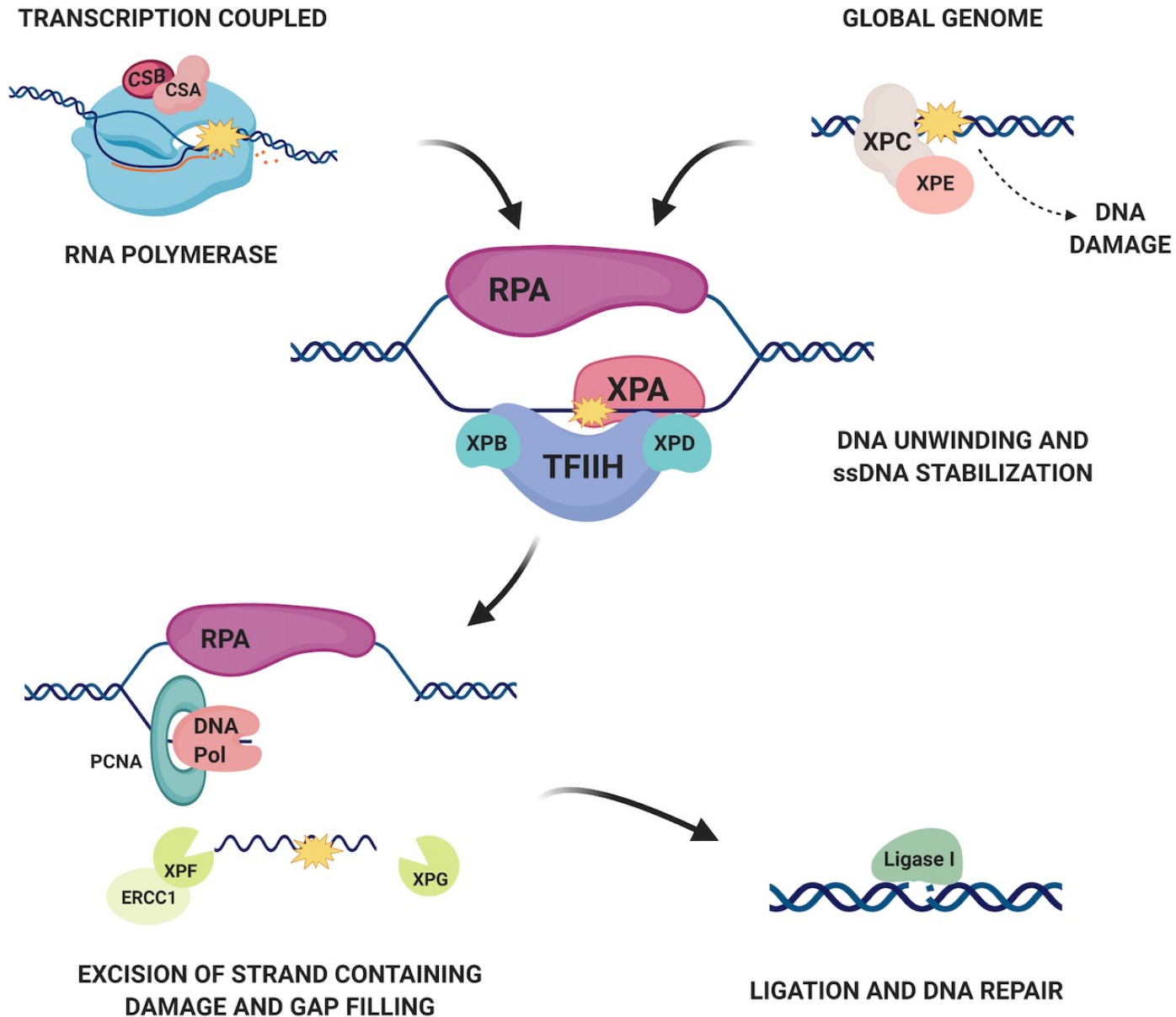


**FIGURA 16-15** Dois indivíduos com xeroderma pigmentosa. O garoto de 4 anos de idade, à esquerda, apresenta nítidas lesões cutâneas, induzidas pela luz solar. São visíveis as pintas avermelhadas (eritema) e as mudanças irregulares na pigmentação, em resposta a lesões celulares. Em seu nariz há dois cânceres nodulares. A garota de 18 anos de idade, à direita, foi cuidadosamente protegida da luz solar desde seu diagnóstico de xeroderma pigmentosa, na infância. Vários cânceres foram removidos e ela obteve sucesso trabalhando como modelo.

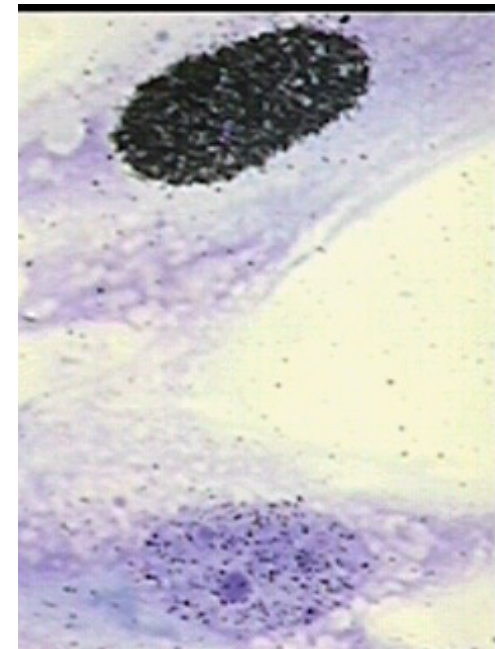
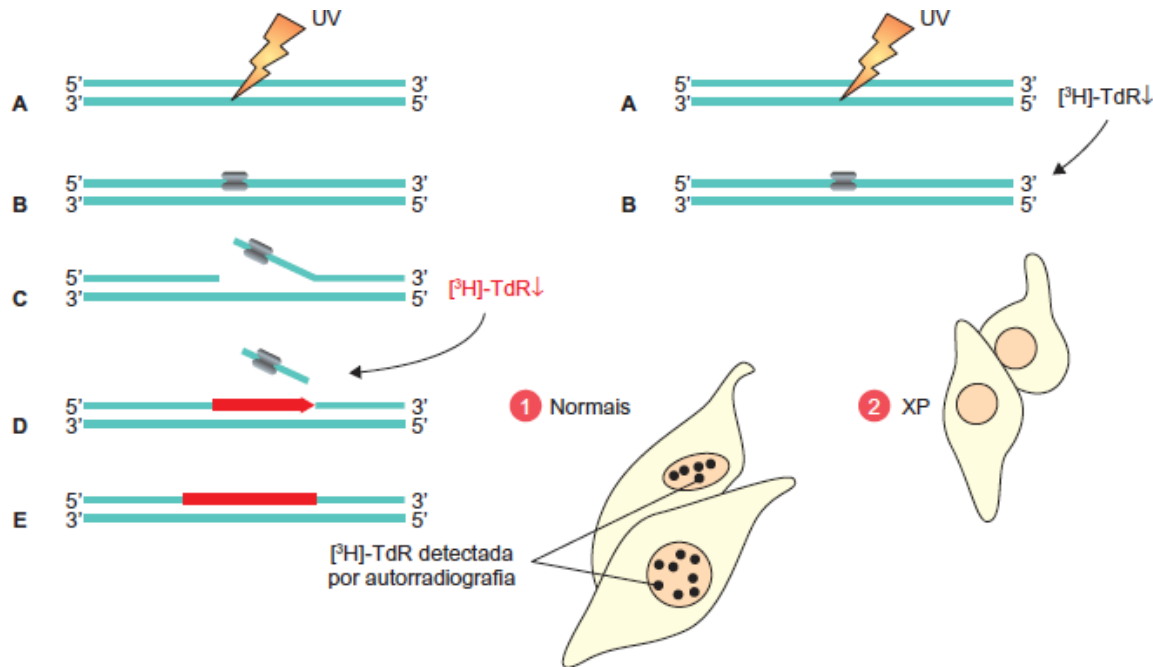
Descoberto em 1968, por James Cleaver!

# Reparo excisão de nucleotídeos

## NUCLEOTIDE EXCISION REPAIR



# Células de pacientes XP não tem síntese de reparo de DNA!!!!



**Figura 4.10** O teste conhecido como UDS torna possível verificar, por autorradiografia, a síntese de DNA (por incorporação de timidina- $^3\text{H}$ , ou  $^3\text{H}\text{-Tdr}$ ) que ocorre em células irradiadas com luz UV, mesmo naquelas que não estão na fase S do ciclo celular. Células provenientes de pacientes XP, por apresentarem deficiência em processos de reparo de DNA, não apresentam essa síntese UDS.

Exceto pela XP variante! Defeito na replicação da lesão!

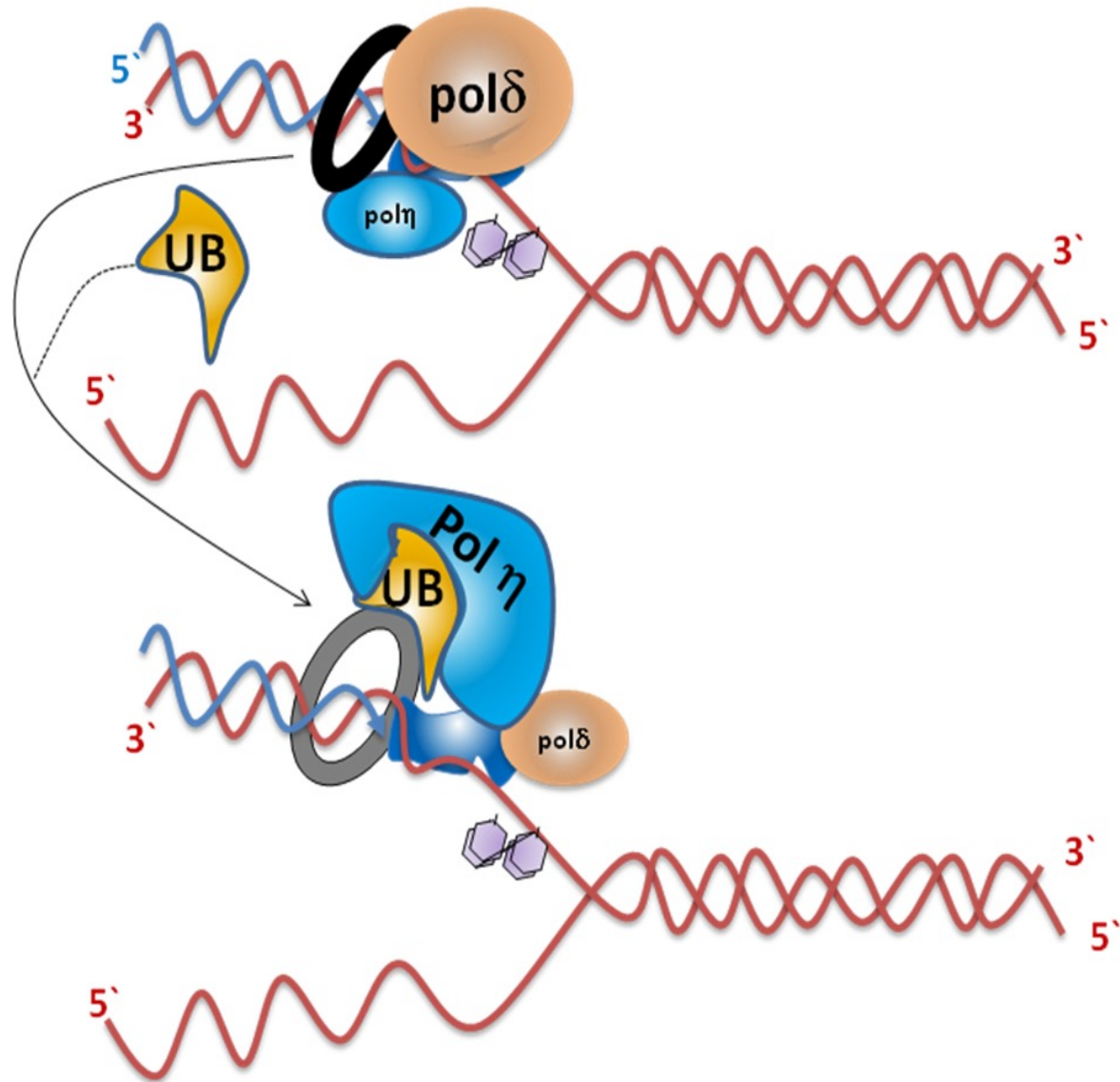
Células XP são sensíveis a luz UV e mutam após UV!  
Primeira correlação clara entre mutação e cancer!

## **Questão 4:**

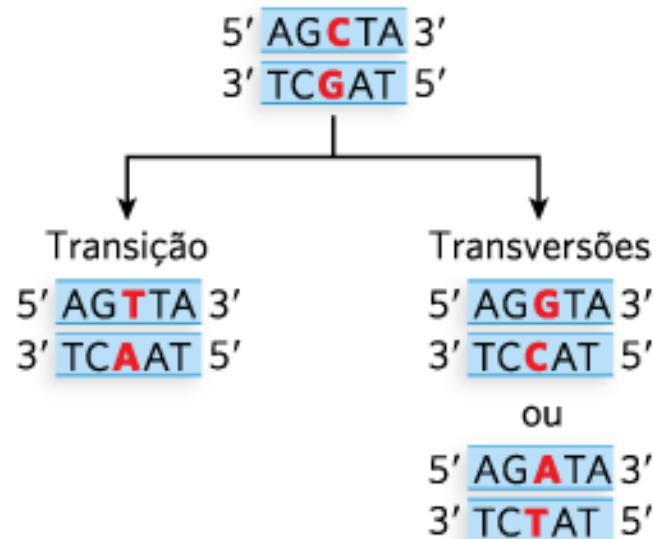
**Como lesões não reparadas podem resultar em mutações?**

- 1. Ao replicar a lesão pode haver incorporação de um nucleotídeo errado, provocando mutações.**
- 2. A lesão já é uma mutação e se não for reparada vai passar para a fita filha durante a replicação.**
- 3. A lesão é sempre reparada, pois o sistema de reparo é perfeito, sem erro.**

# A lesão pode ser replicada com erro!



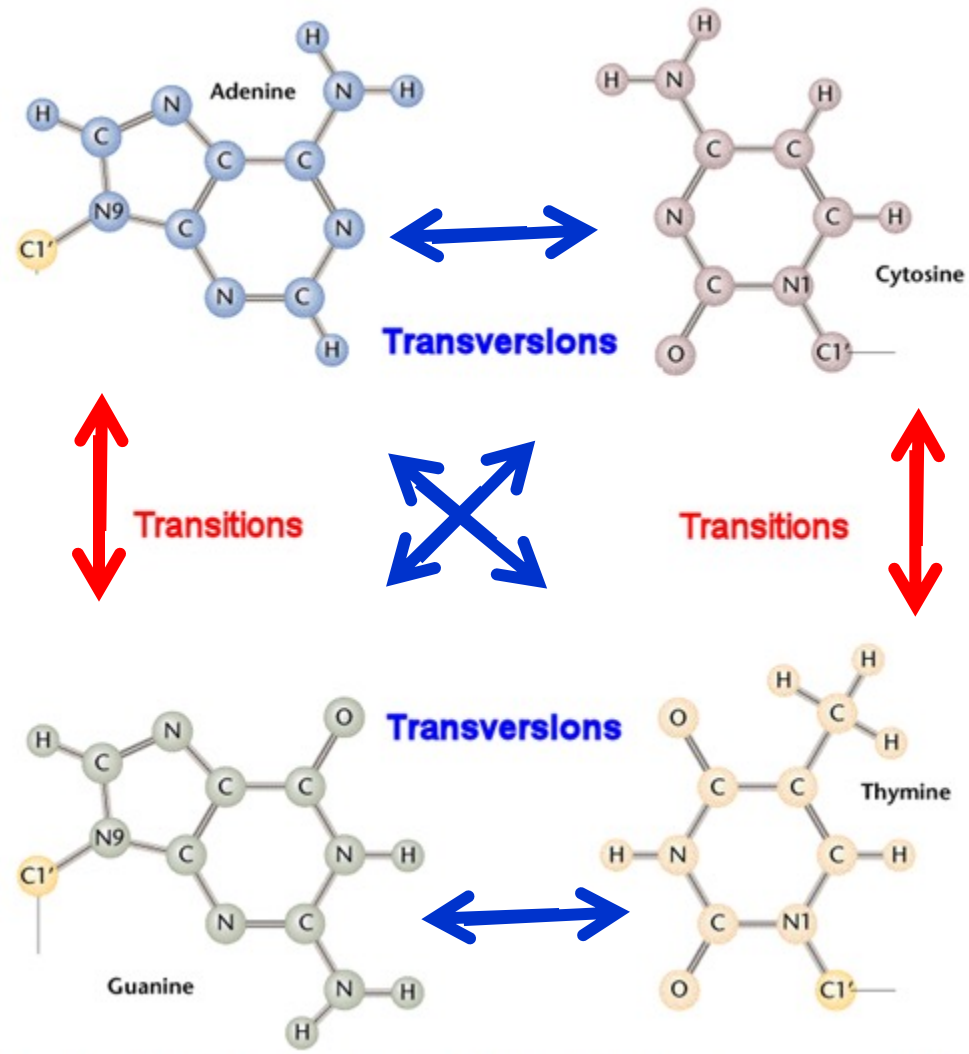
## E o que são mutações????? Elas podem ser pontuais:



**FIGURA 12-1** Mutações pontuais de transição e transversão. O DNA parental (topo) contém um par de bases C≡G. Existem duas mutações pontuais possíveis: uma transição (à esquerda), em que uma purina (G, nesse caso) é modificada por outra diferente (A), produzindo na replicação um par de base T=A, ou uma transversão (à direita), em que uma pirimidina (C, nesse caso) é modificada por uma purina (G ou A) para produzir um par de base G≡C ou A=T. (Para revisar a ligação de hidrogênio entre os pares de base, ver Figura 1-3.)

O que são mutações: transição e transversão ?

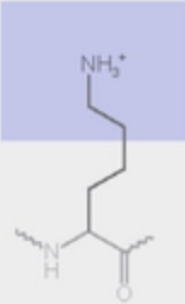
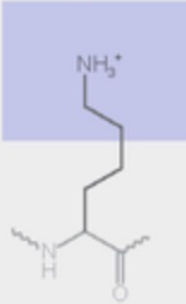
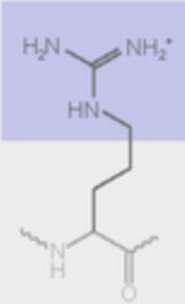
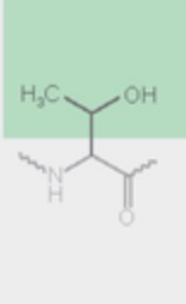
# Transições e transversões... Qual deve ser mais comum?





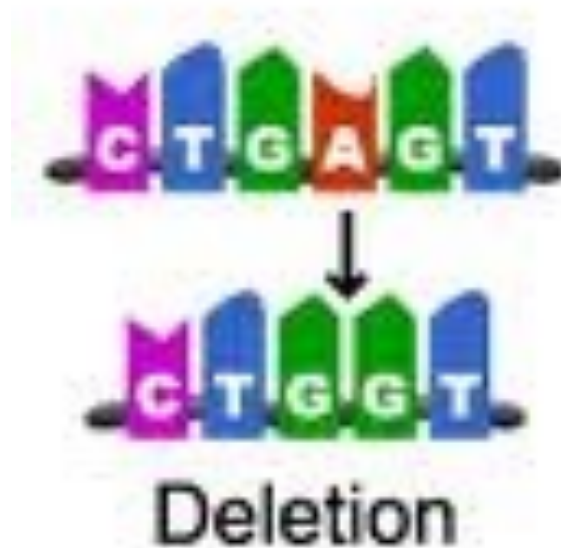
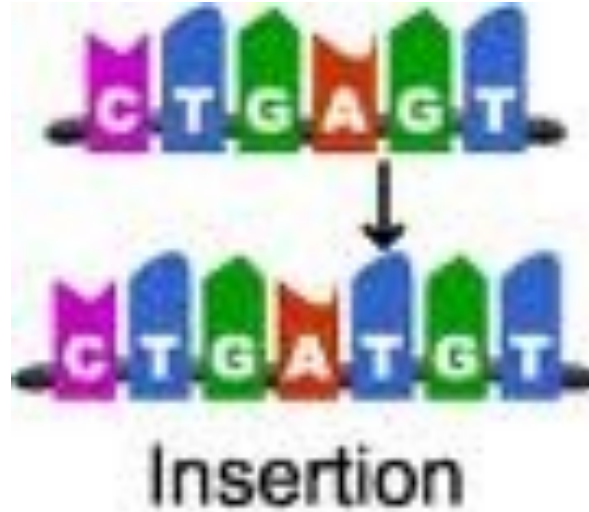
# Essas mutações pontuais podem ter efeito nas proteínas que são codificadas pelos genes:

Podem ser silenciosas, sem sentido ou perda de sentido

	Point mutations				
	No mutation	Silent	Nonsense	Missense	
				conservative	non-conservative
DNA level	TTC	TTT	ATC	TCC	TGC
mRNA level	AAG	AAA	UAG	AGG	ACG
protein level	<b>Lys</b>	<b>Lys</b>	<b>STOP</b>	<b>Arg</b>	<b>Thr</b>
					

basic  
polar

**Mas também podem acontecer Inserções e deleções!**



# Essas mutações também podem afetar a leitura de proteínas!

(a) Fase de leitura de códons em triplete com um códon de início ATG e um códon de parada TAG

ATG TCC AGTAGGGTAAGTTAC ATG CGAGCTTTT AGT TCC TAC GAGGTA AGT CCT CATAGGGAGGTA AGT CCC TAG  
Met Ser Ser Arg Pro Val Tyr Met Arg Ala Phe Ser Ser Tyr Glu Val Gly Pro His Arg Glu Val Ser Pro Parada

Sítio de deleções  
e inserções em (b)

(b)

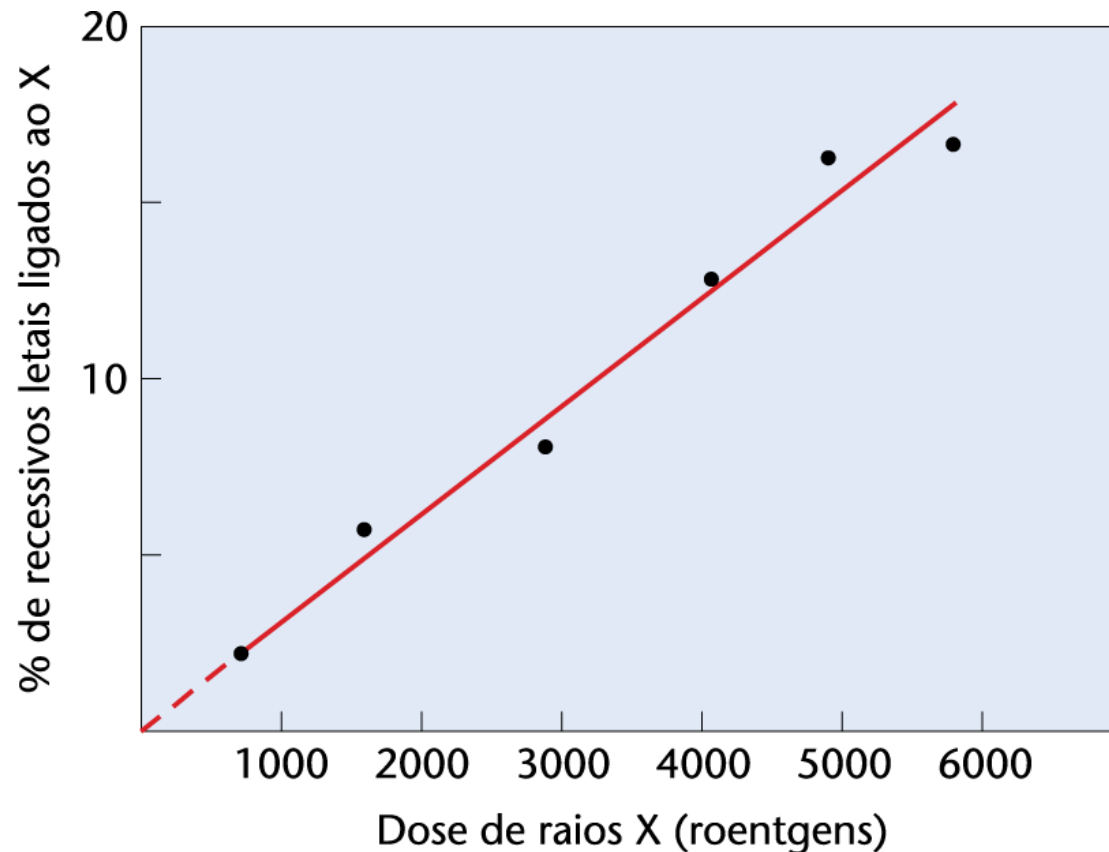
-1 Deleção (-A) ATG TCC AGTAGGGTAAGTTAC TGCGAGCTT TTA GTT CCT ACGAGG TAA GTC CTC ATA GGGAGGTAA GTC CCT AG  
Met Ser Ser Arg Pro Val Tyr Cys Glu Leu Leu Val Pro Thr Arg Parada

-2 Deleção (-AT) ATG TCC AGTAGGGTAAGTTAC GCGAGCTTT TAG TTC CTA CGAGGTAAGTCC TCA TAG GGAGGTAAGTCC CTA G  
Met Ser Ser Arg Pro Val Tyr Ala Ser Phe Parada

+1 Inserção (+C) ATG TCC AGTAGGGTAAGTTAC CATGCGAGCTTT TAG TTC CTA CGA GGT AAG TCC TCA TAG GGAGGTAAG TCC CTA G  
Met Ser Ser Arg Pro Val Tyr His Ala Ser Phe Parada

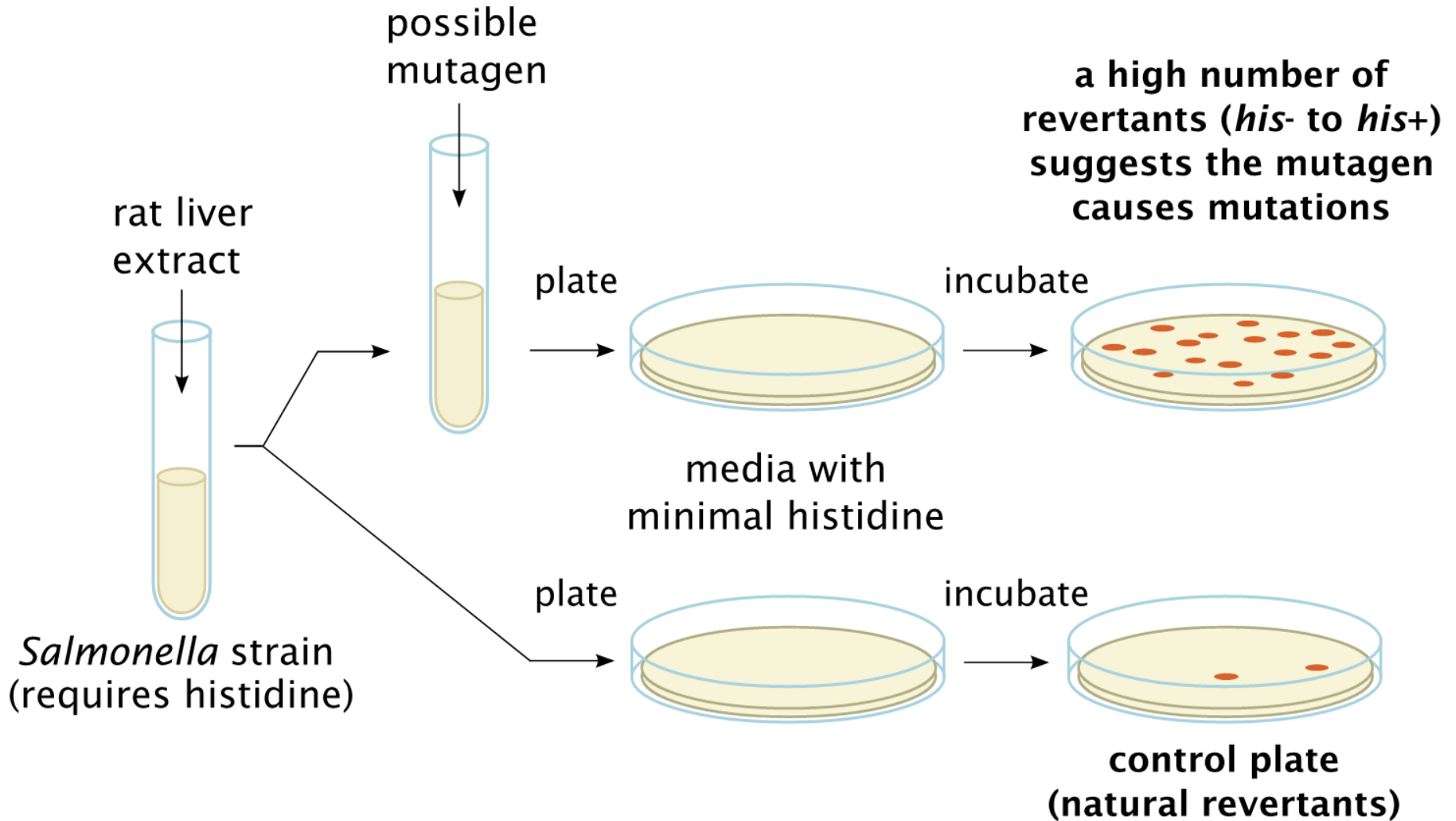
+2 Inserção (+CG) ATG TCC AGTAGGGTAAGTTAC CGA TGCGAGCTT TTA GTT CCT ACGAGG TAA GTC CTC ATA GGGAGGTAA GTC CCT AG  
Met Ser Ser Arg Pro Val Tyr Arg Cys Glu Leu Leu Val Pro Thr Arg Parada

**Essas mutações podem ser induzidas por agentes que lesam o DNA!**



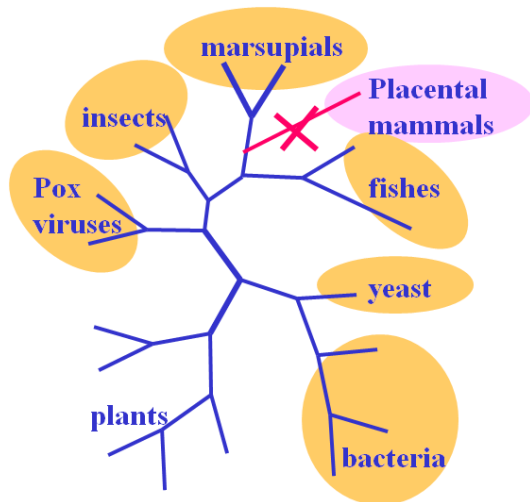
**FIGURA 16-9** Gráfico da porcentagem de mutações recessivas ligadas ao X induzidas em *Drosophila* por doses crescentes de raios X. O prolongamento do gráfico intercepta os eixos no zero, como é demonstrado pela linha tracejada.

# Teste AMES – testando substâncias mutagênicas em bactérias!

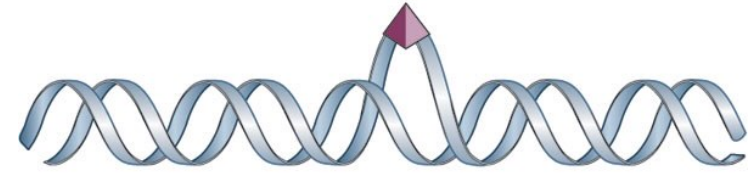


**Na década de 1940, foi descoberto que as células se defendem das lesões!**

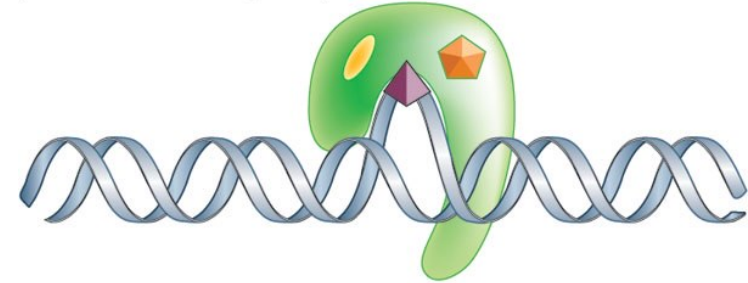
**Mecanismo de reparo dependente de Luz visível: fotorreativação!**



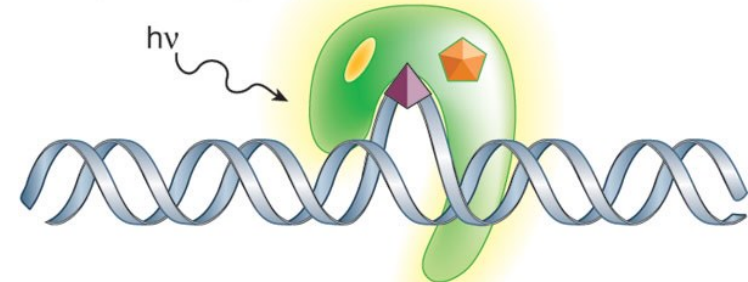
Pyrimidine dimer in UV-exposed DNA



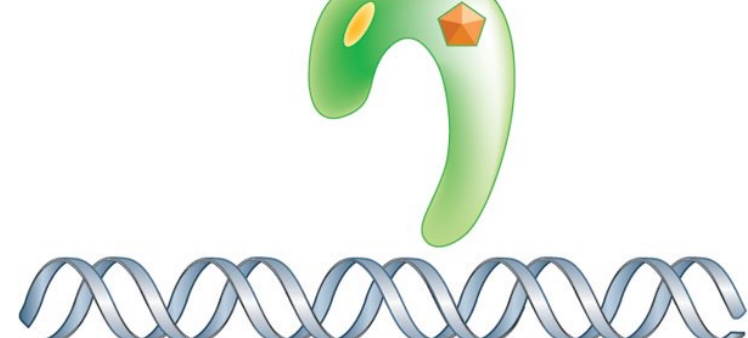
Complex of DNA with photoreactivating enzyme



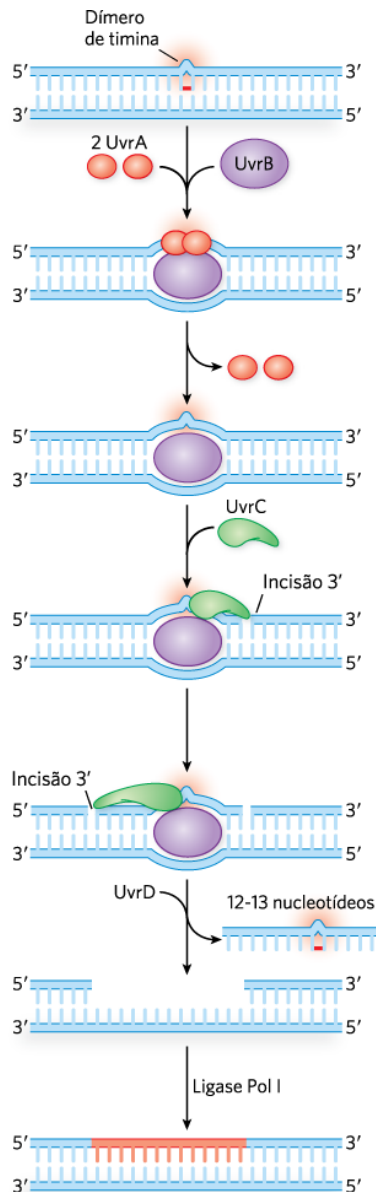
Absorption of light (>300 nm)



Release of enzyme to restore native DNA



# Com mutantes de *E.coli*, se descobriu que temos reparo no escuro!

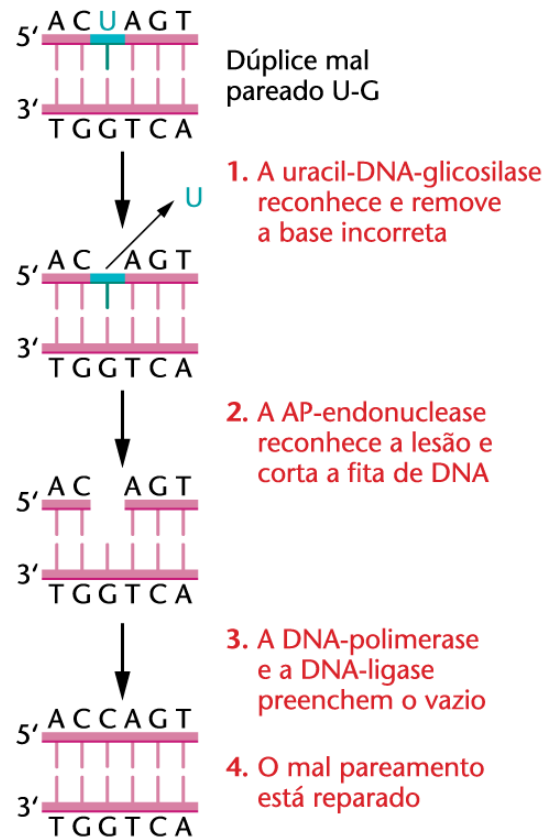


**A lesão é retirada da molécula de DNA,  
usando a fita complementar como molde!**

**FIGURA 12-24** **Reparo por excisão de nucleotídeos em *E. coli*.** A via NER utiliza diversas proteínas, inclusive UvrA (vermelho), UvrB (roxo) e UvrC (verde), que reconhecem a lesão e produzem incisões em cada um dos lados, permitindo que a UvrD (helicase II) desloque uma parte do DNA com lesão. A lacuna na fita simples é preenchida pela Pol I, e o DNA é selado pela ligase. Um caminho de reparo acoplado à transcrição (TCR) pode ainda ser seguido, quando a RNA-polimerase trava em uma lesão na fita codificante. Depois que a RNA-polimerase é deslocada, a reação procede como demonstrado aqui, utilizando de UvrA a UvrD, Pol I e ligase.

# Com mutantes de E.coli, se descobriu que temos reparo de bases alteradas!

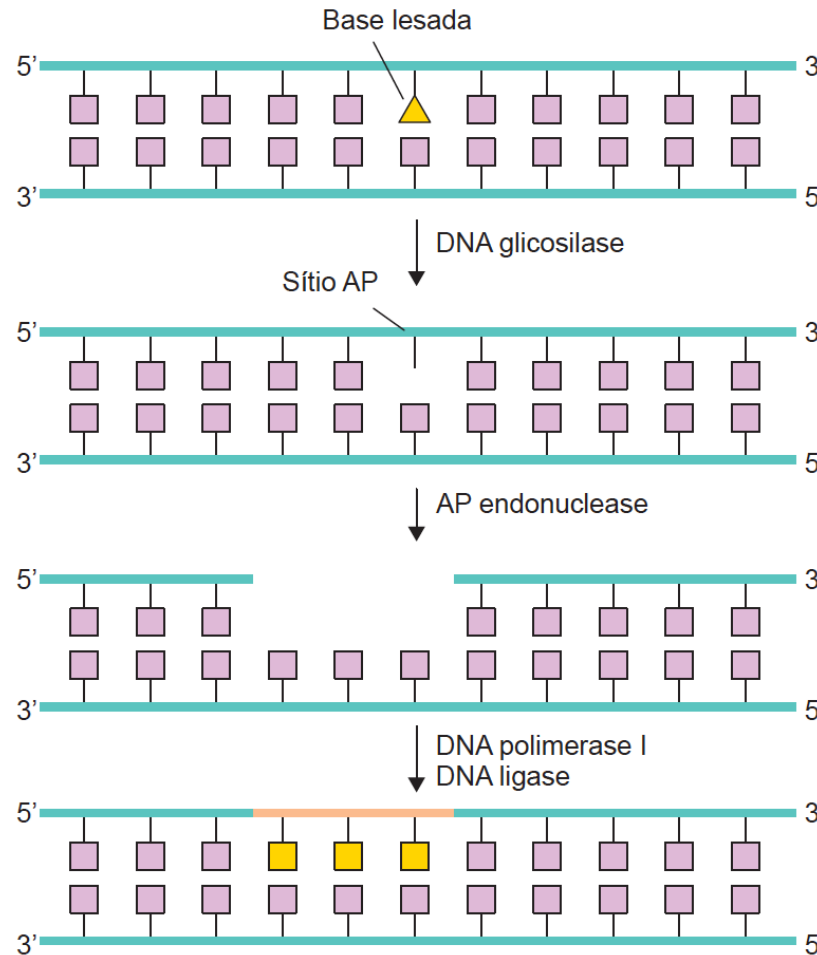
## Reparação por excisão de base



**FIGURA 16-13** Reparação por excisão de base (BER) completada pela uracil-DNA-glicosilase, pela AP-endonuclease, pela DNA-polimerase e pela DNA-ligase. A uracila é reconhecida como uma base não complementar, é removida e substituída pela base comple-

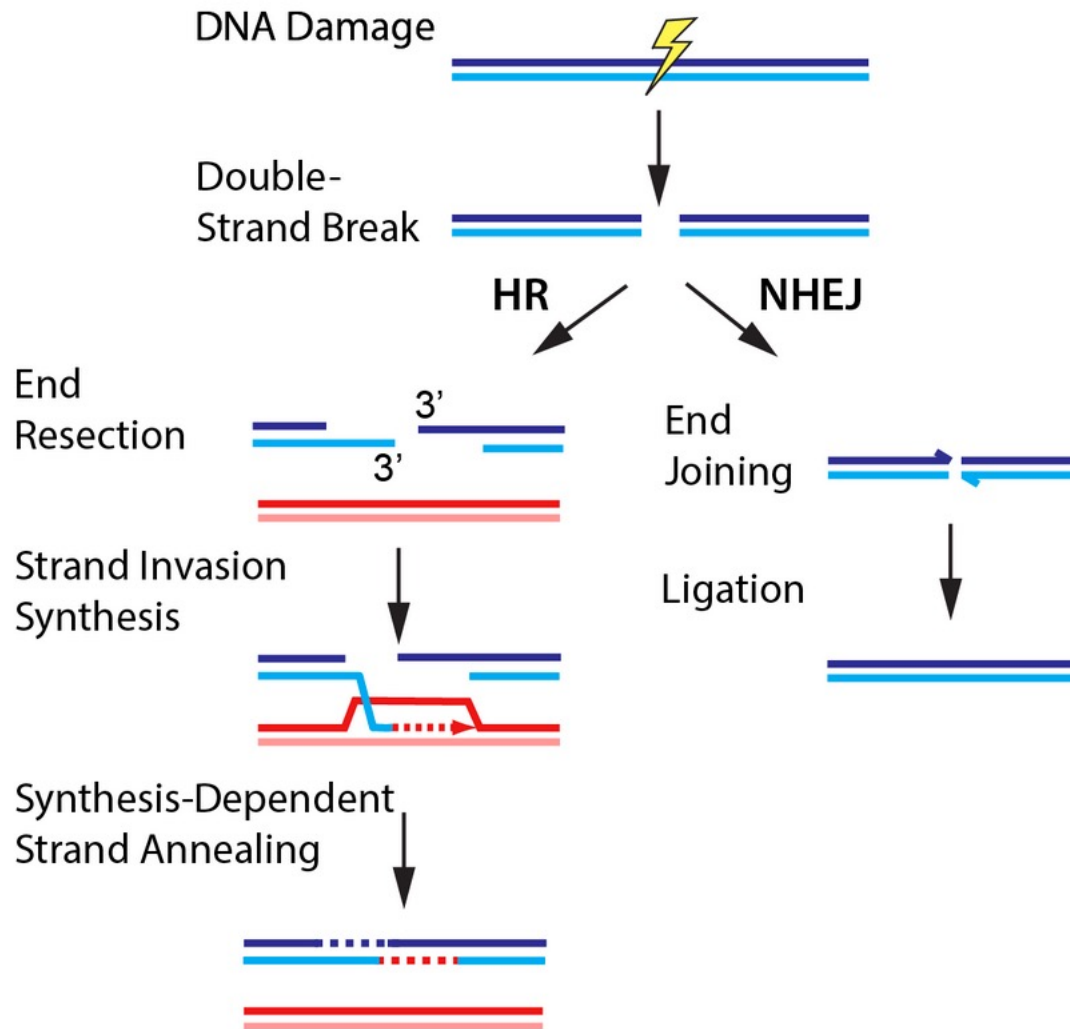


# Esse sistema remove bases pouco alteradas, e ficou conhecido como reparo excisão de bases!



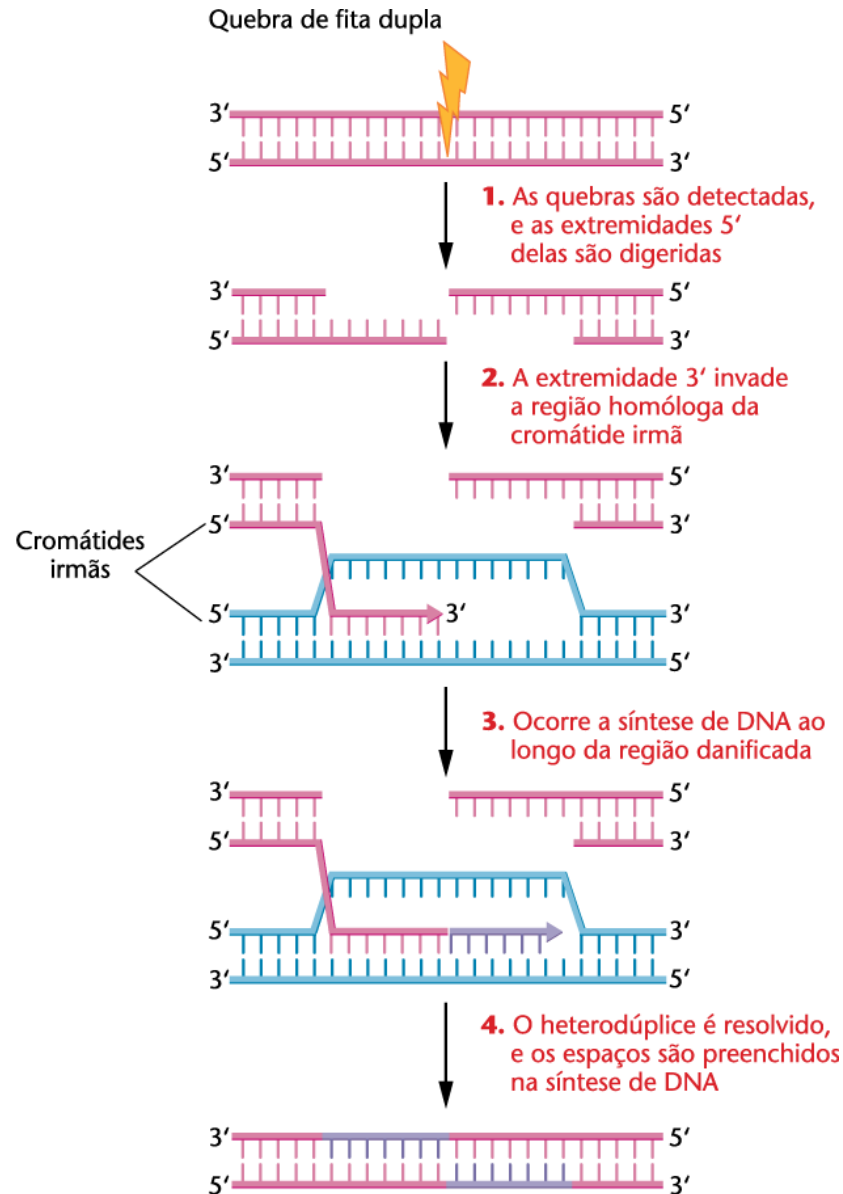
**Figura 4.12** O reparo excisão de base atua na identificação e remoção de bases com lesões que provocam pouca distorção na dupla-hélice. Inicialmente, a base lesada é retirada por meio de uma atividade glicolítica, e posteriormente o sítio AP formado sofre a ação de endonuclease. A lacuna formada é posteriormente preenchida por DNA polimerase e ligase.

# Processos podem reparar duplas quebras no DNA- Esse reparo é usado no Sistema CRISPR/CAS9 !!!!



**Figure 3. DNA break repair via homologous recombination (HR) or non-homologous end joining (NHEJ).**

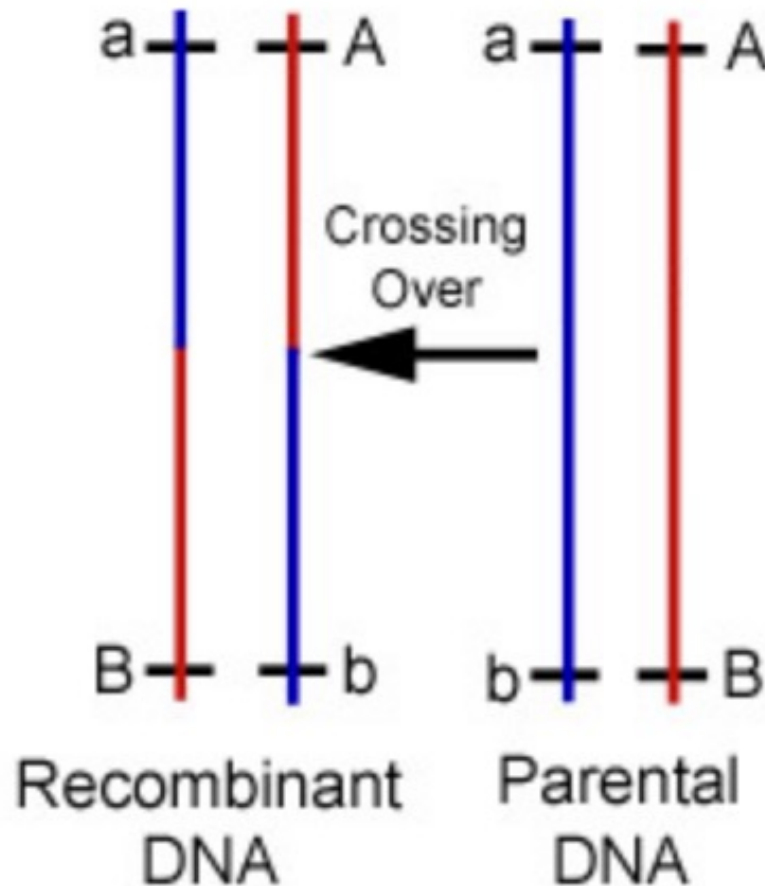
# Processos de recombinação também podem reparar o DNA!!!!



**FIGURA 16-16**

Etapas da reparação de quebras de fita dupla por recombinação homóloga.

**Processos de recombinação podem provocar Crossing over e também conversão gênica! Como?**



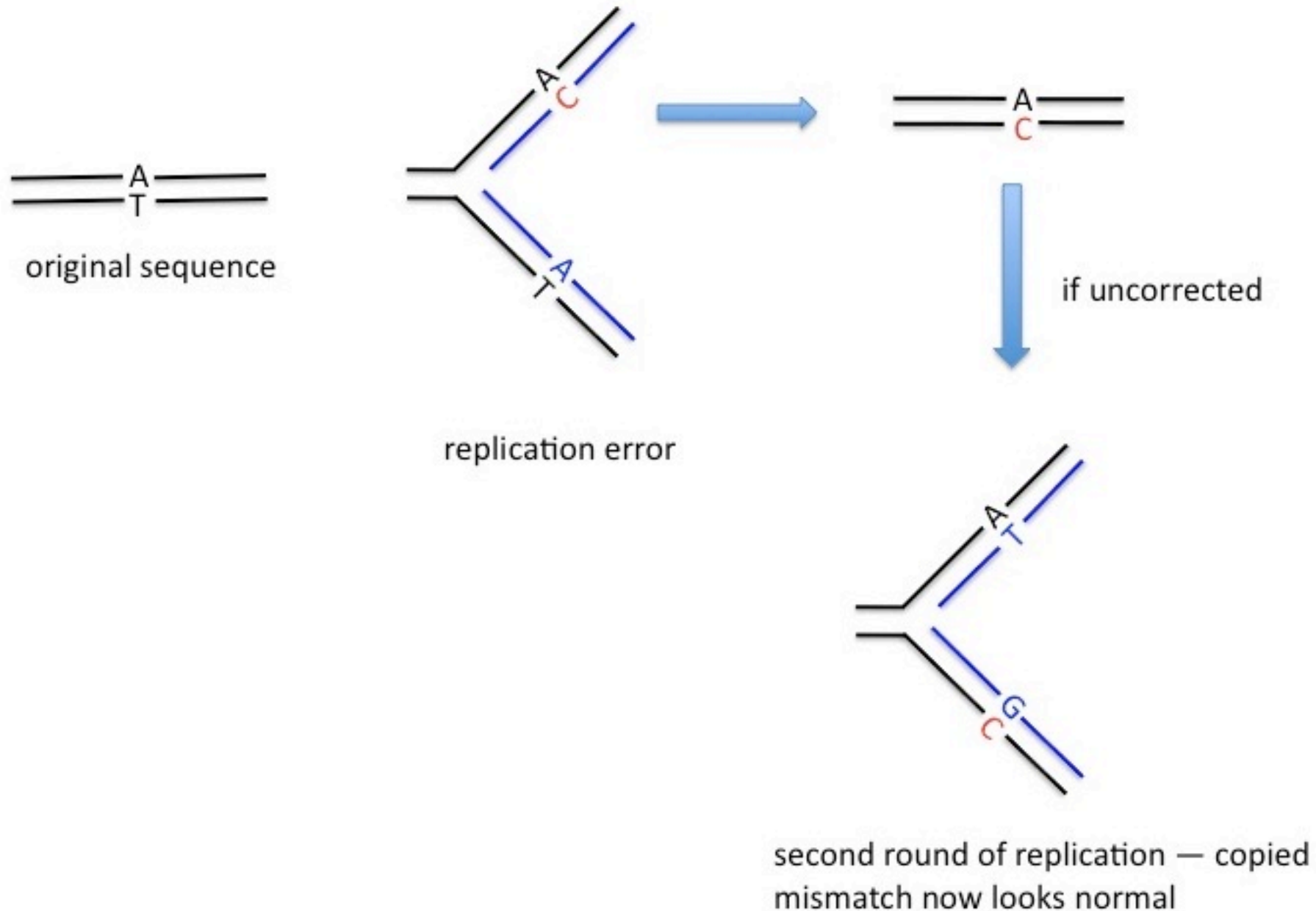
# Angelina Jolie tem defeito genético no gene BRCA1, que participa do reparo de recombinação homóloga!!!!



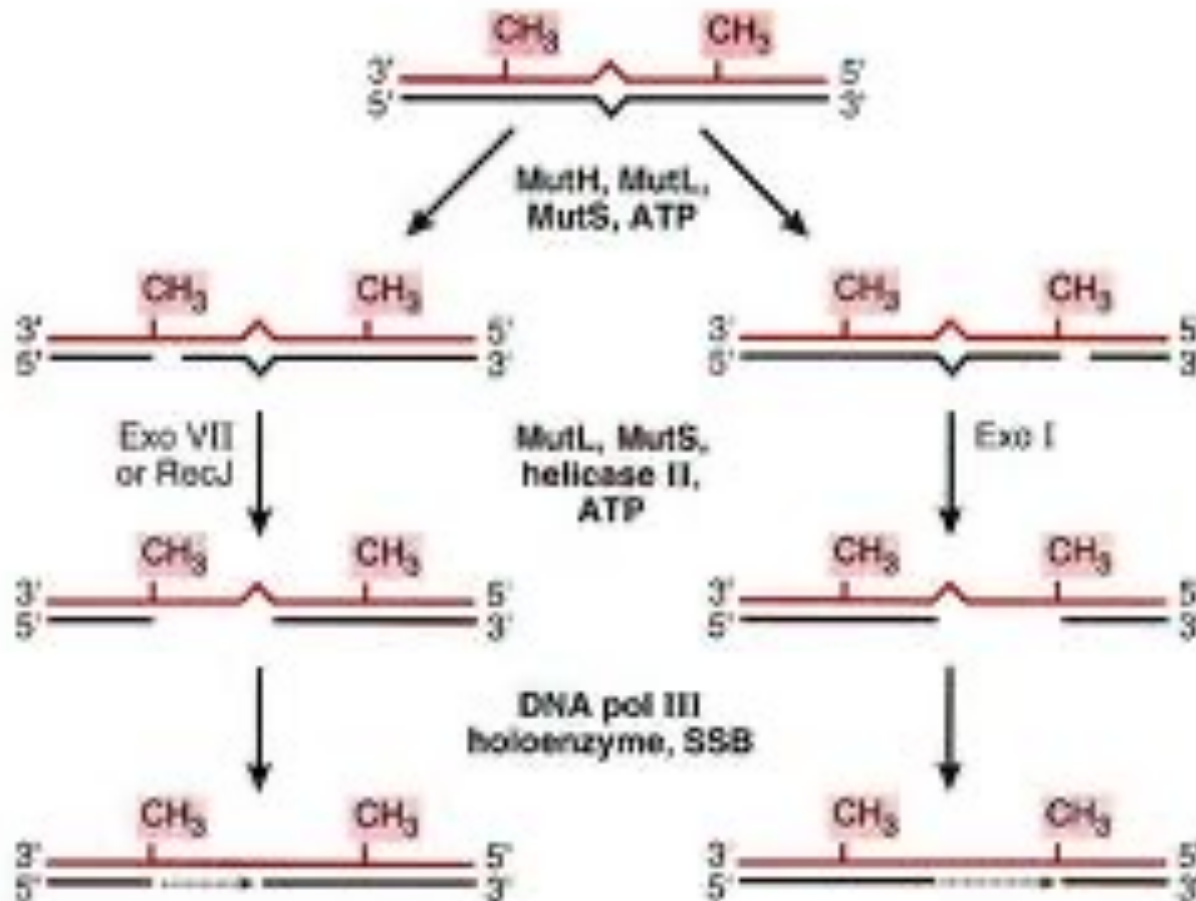
**A mutação que ela tem em BRCA1 é dominante (BRCA1+/-)**

**Mas nas células tumorais desses pacientes ela é (BRCA1-/-)**

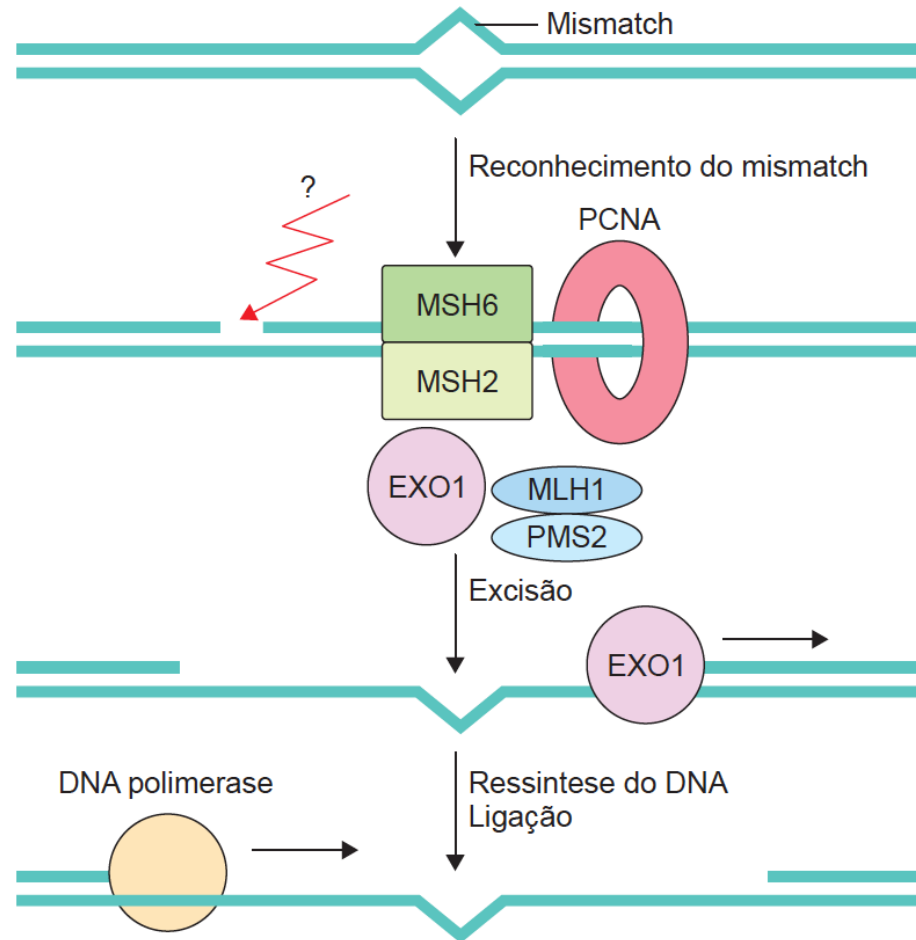
# E bases mal emparelhadas também podem ser reparadas!!!!



**Em algumas bactérias o DNA molde está metilado e com isso pode ser identificado!  
Veja o modelo de reparo de mismatch!**



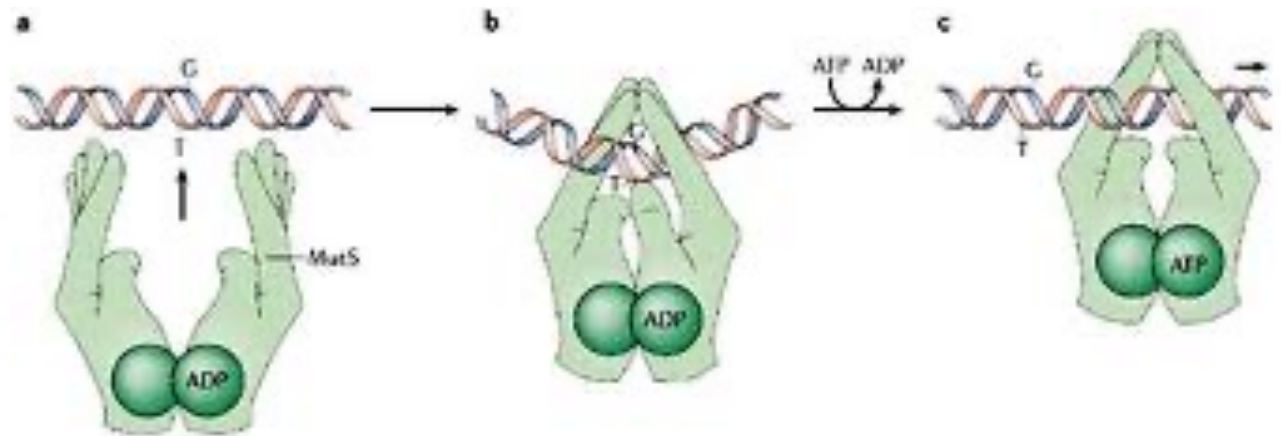
# O Reconhecimento pode ser distante do mismatch por proteínas “MutS” (altamente conservadas!!)



**Figura 4.13** Esquema que indica as principais etapas do reparo de *mismatch* em células humanas. Após o reconhecimento das bases mal emparelhadas, o sistema de reparo deve escolher a fita a ser eliminada, e esse mecanismo de escolha ainda não é claro para células humanas.



# As proteínas MutS funcionam como um dímero e parecem uma mão em reza!



## **Considerações sobre reparo de mismatch:**

**1. Genes humanos foram clonados por serem similares (homólogos) aos genes bacterianos!**

**2. Deficiências nesses genes pode levar o paciente a ter cancer de colo hereditário!**

**3. No reparo de um par G:T sempre é retirado o T, por que?**

# The Nobel Prize in Chemistry 2015



Photo: Cancer Research UK

**Tomas Lindahl**

**Prize share: 1/3**



Photo: K. Wolf/AP Images for HHMI

**Paul Modrich**

**Prize share: 1/3**



Photo: M. Englund, UNC-School of Medicine

**Aziz Sancar**

**Prize share: 1/3**



**Philip Hanawalt**

**Ele deveria estar na lista, por sua descoberta do reparo de DNA em bactérias em 1963!!**

The Nobel Prize in Chemistry 2015 was awarded jointly to Tomas Lindahl, Paul Modrich and Aziz Sancar *"for mechanistic studies of DNA repair"*.

## **XERODERMA PIGMENTOSUM-**

**Foto de Faina, Goiás, onde encontramos uma comunidade com  
Vários pacientes XP!  
Obrigado a esses pacientes!**



