

QBQ1354 - Biologia Molecular  
2023

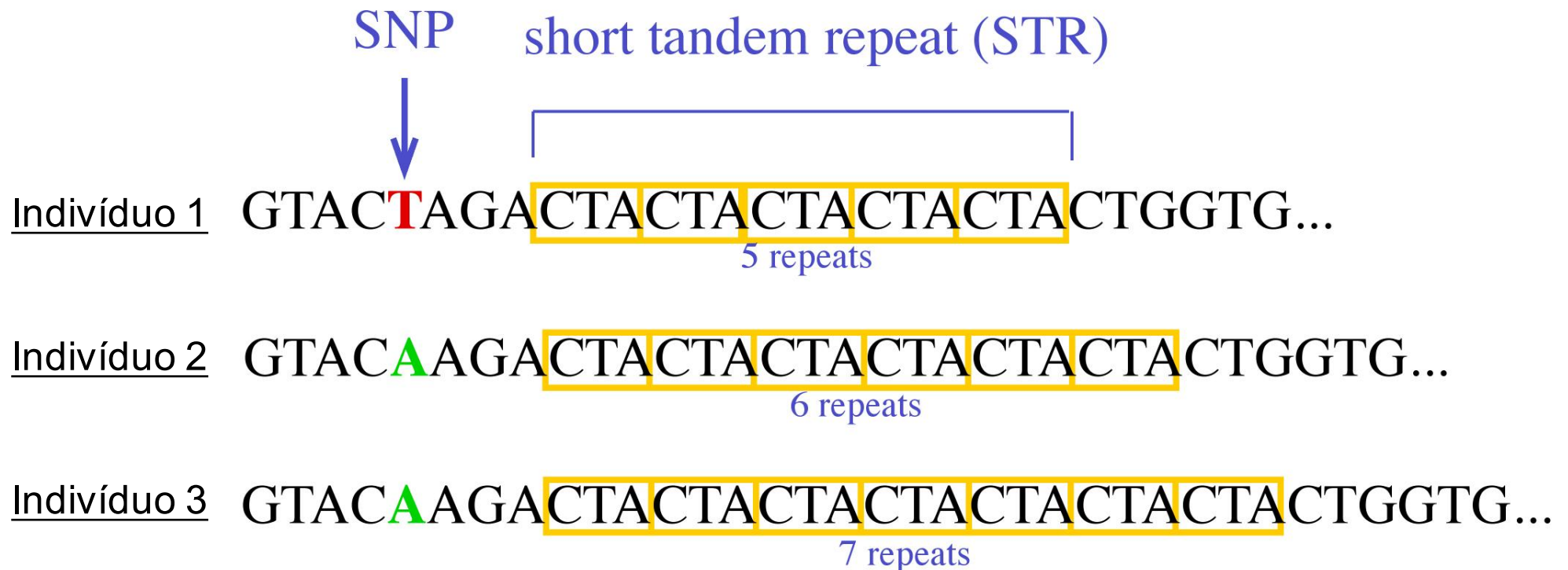
Mutação e Reparo do DNA

# Mutação do DNA

Toda modificação no DNA que se fixa no genoma do organismo que não é explicável pela variabilidade genética (**polimorfismos**) pré-existente na população

# Polimorfismo frequentes nos genomas das espécies (> 1%)

- Variações em uma única base:  
*Single Nucleotide Polymorphisms*, **SNPs**
- Variações que afetam múltiplas bases no genoma:  
Ex. Diferenças no número de trechos repetitivos no DNA (STRs)



# Tipos de mutação no DNA

## Quanto ao padrão de herança:

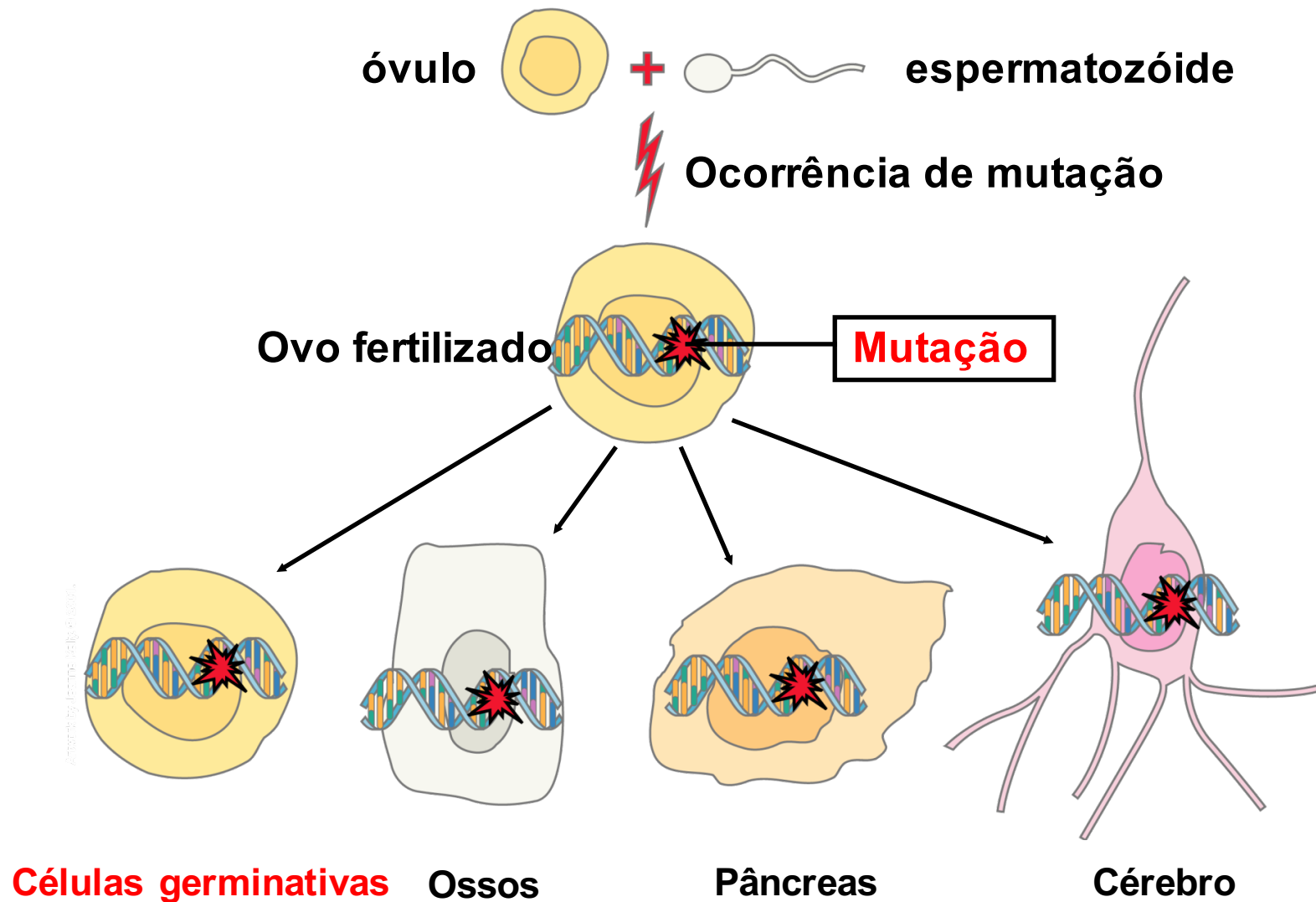
### ➤ **Mutação hereditária:**

- Ocorre na linhagem germinativa (óvulos/ espermatozóides).
- Transmitida entre gerações.

### ➤ **Mutação não-hereditária** (mutação adquirida ou somática):

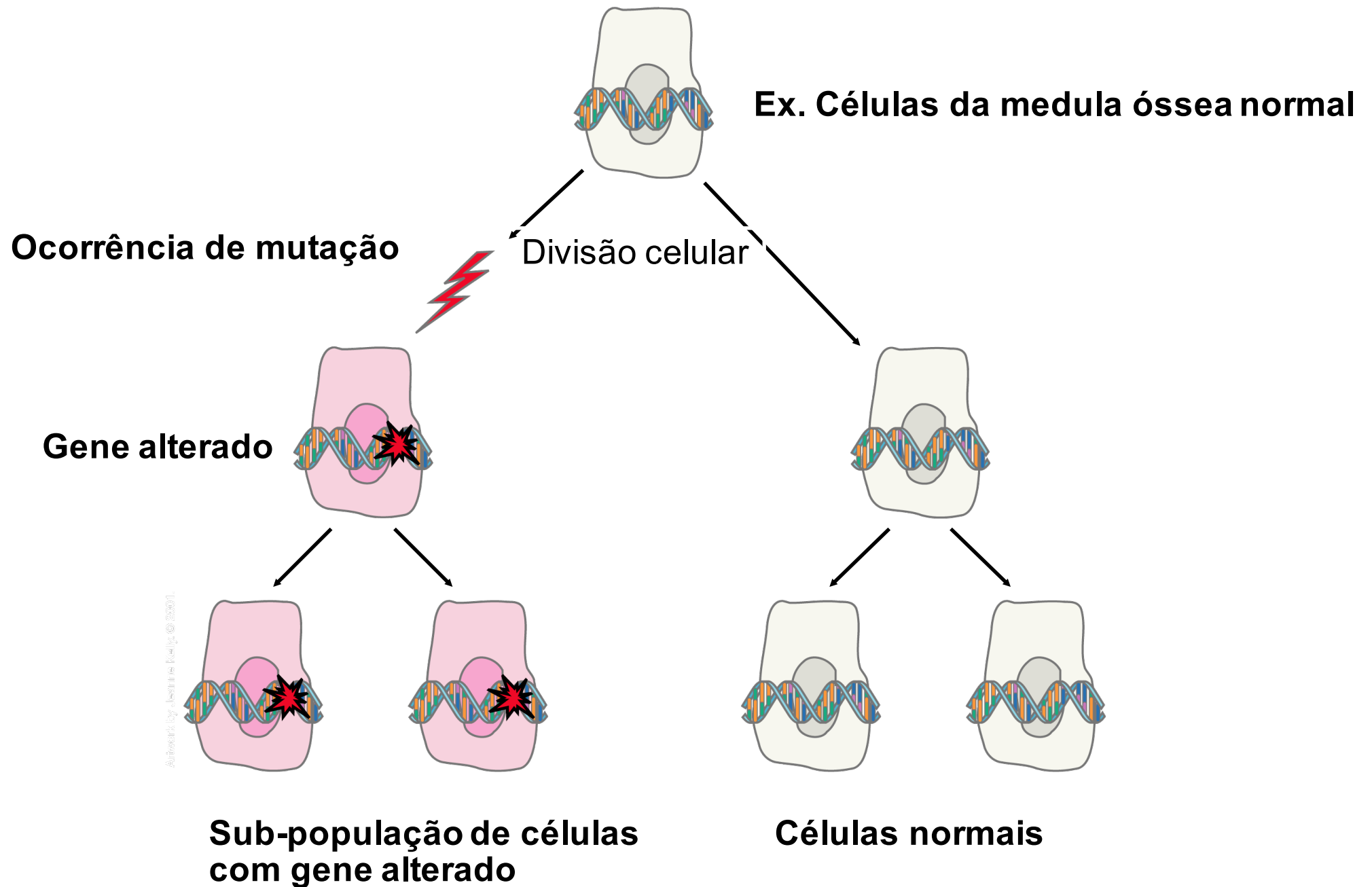
- Transmitida para células-filhas durante a divisão celular.
- Não é transmissível entre gerações.

# Mutações hereditárias



- Todas as células do organismo possuem a mutação.
- Transmitidas entre gerações

# Mutações adquiridas (= mutações somáticas)

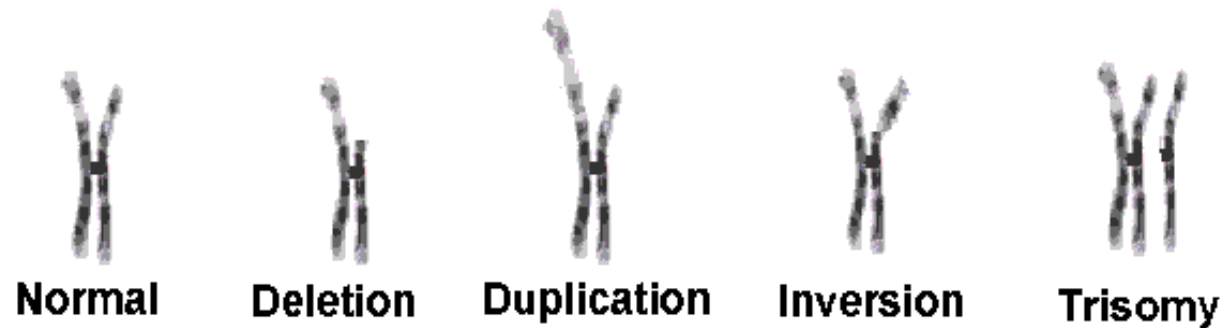


# Tipos de mutação do DNA

## Quanto a extensão:

### ➤ Aberrações cromossômicas:

ganhos, perdas, rearranjos de grandes trechos do DNA



### ➤ Mudanças em genes individuais:

mutações de ponto que afetam uma única base no DNA

Normal DNA Sequence: AGTCGA  
Codon 1 Codon 2

#### Point Mutations:

Base Substitution: AGTAGA  
Codon 1 Codon 2

#### Frameshift Mutations:

Insertion: ATGTCGA  
Codon 1 Codon 2 Codon 3

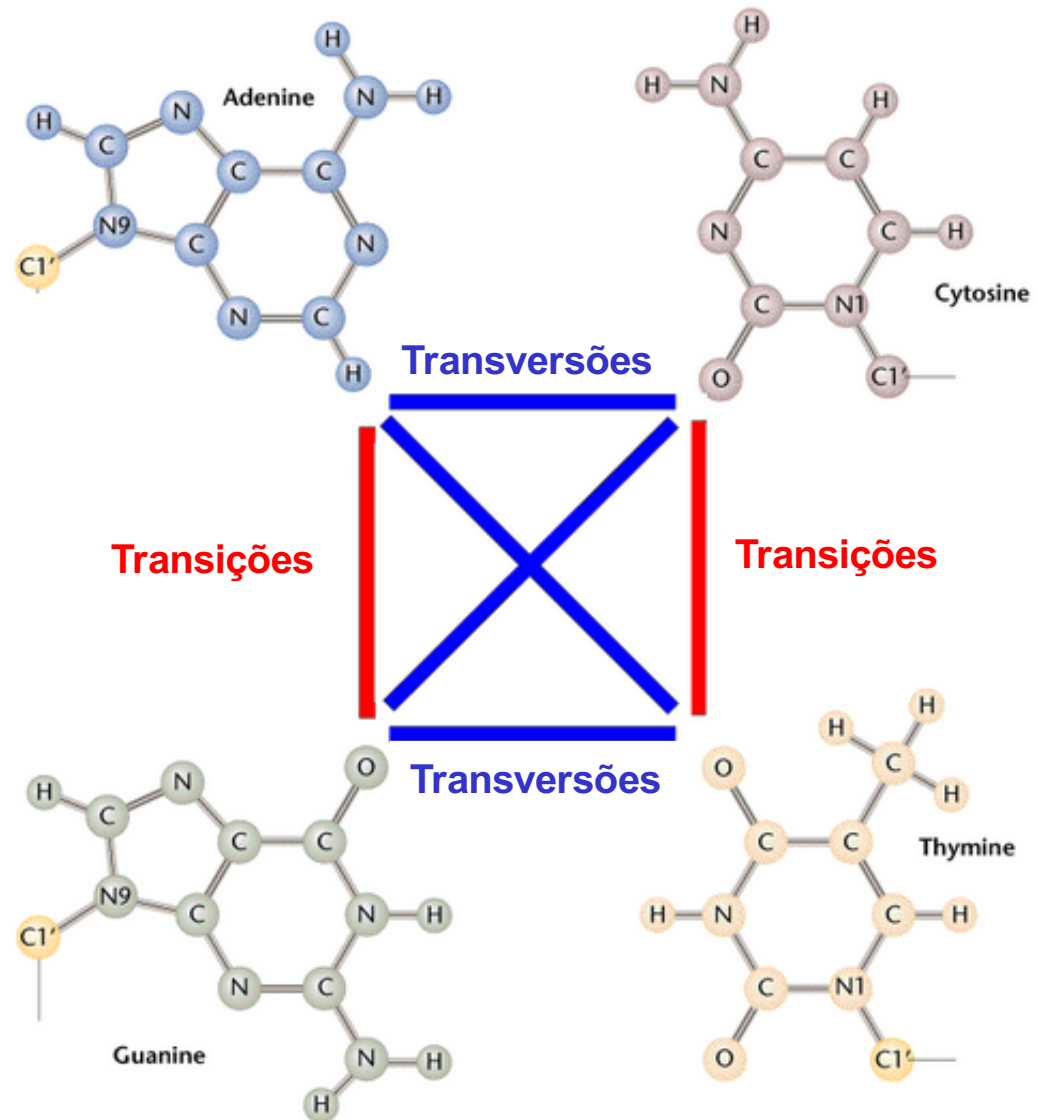
Deletion: ATCGA  
Codon 1 Codon 2

# Tipos de mutações de ponto

- ✓ Deleções
- ✓ Inserções
- ✓ Substituições

- Transições: troca de purinas ou pirimidinas por outra base da mesma categoria
- Transversões: troca de purinas por pirimidinas, ou vice-versa)

Transversões tem geralmente um impacto funcional maior. Por que?





# Como o DNA adquire mutações ?

- Erros da polimerase às vezes escapam revisão
- Substâncias químicas causam dano ao DNA
- Radicais livres causam dano ao DNA
- Radiações (luz UV, raios X) causam dano ao DNA

# Tipos de mutação do DNA

Quanto a origem:

## ➤ **Mutações Espontâneas**

- Frequência Baixa

Frequência de mutação por par de bases, por geração:

Eucariotos:  $10^{-4}$  to  $10^{-6}$

Procariotos:  $10^{-8}$

Virus de DNA:  $10^{-4}$  to  $10^{-6}$

Virus de RNA:  $10^{-3}$  to  $10^{-5}$

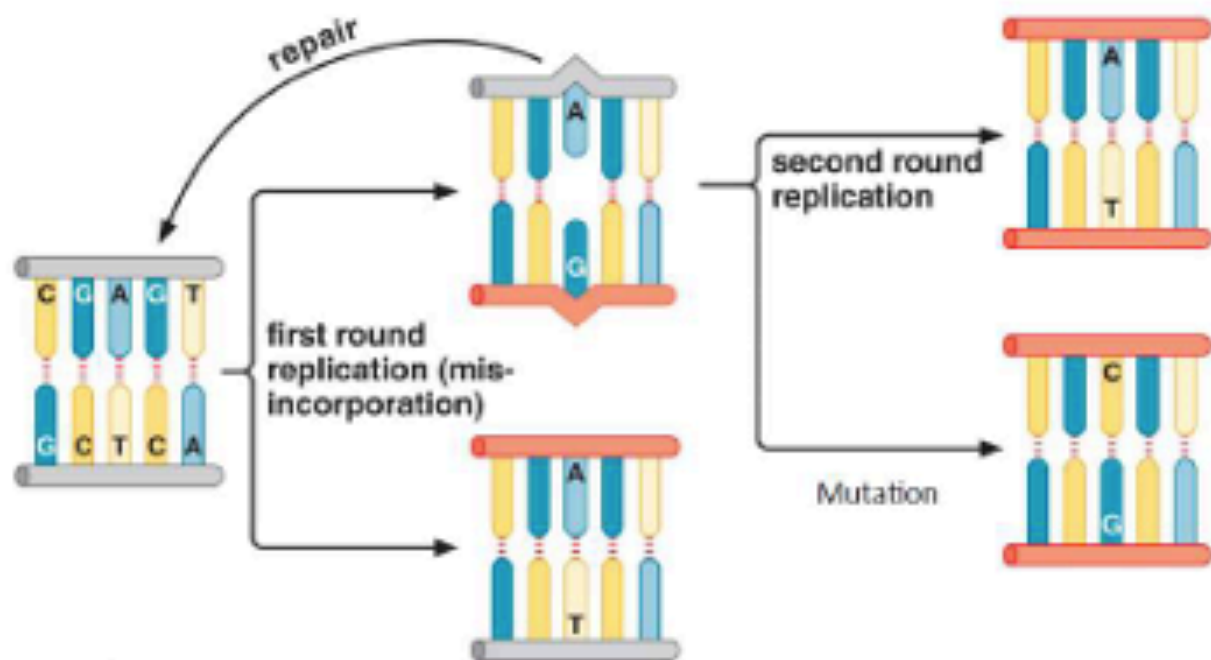
## ➤ **Mutações Induzidas:**

- Causadas por agentes mutagênicos.
- Podem acontecer com uma frequência mais alta do que as mutações espontâneas.

# Causas de mutações de ponto no DNA

- **Alterações químicas nas bases do DNA**
  - **modificações químicas das bases:**
    - desaminação de citosinas**
    - alquilação de guaninas**
  - **incorporação de análogos mutagênicos: 5-bromouracil**
  - **formação de dímeros de pirimidinas induzidos por U.V.**
- **Incorporação incorreta de bases durante a replicação**

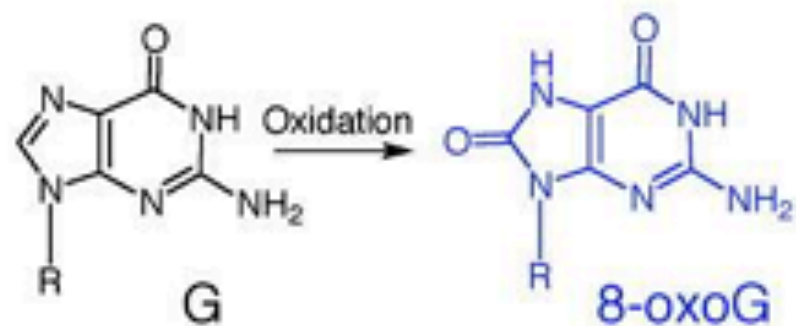
## Como um erro vira uma mutação ?



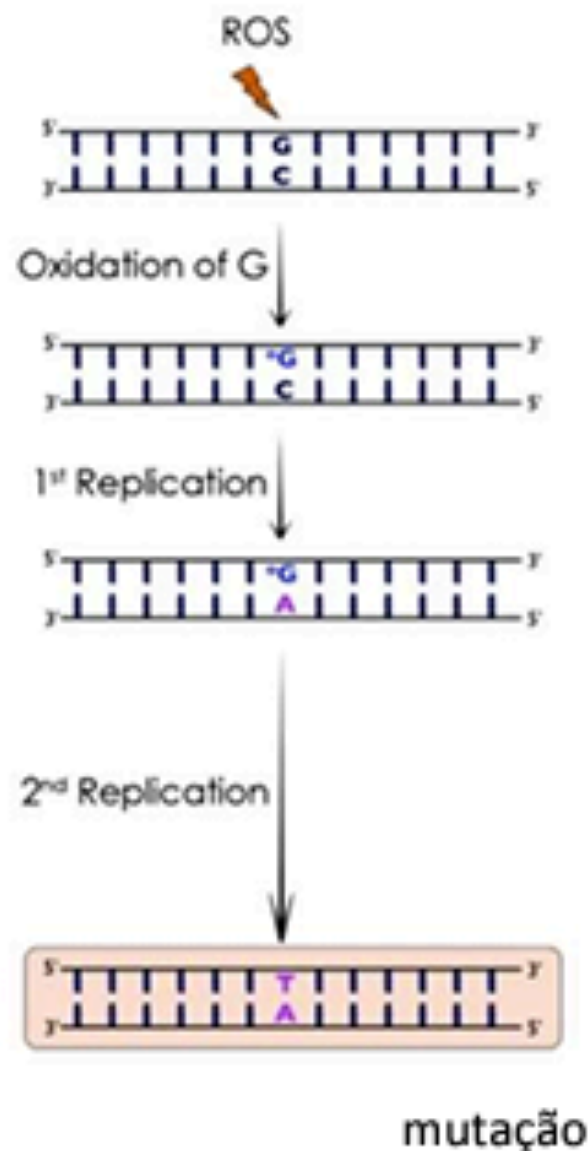
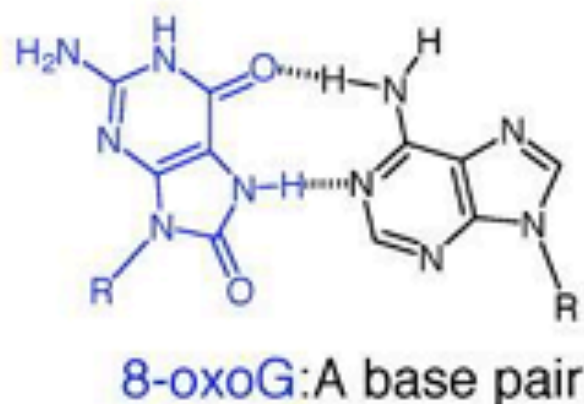
É necessário haver uma rodada de replicação usando a fita com erro como molde para que a mutação se “fixe”!

*Erros ou dano ao DNA só causarão mutações em células que se replicam ativamente!*

# Como alterações químicas das bases causam mutação ?



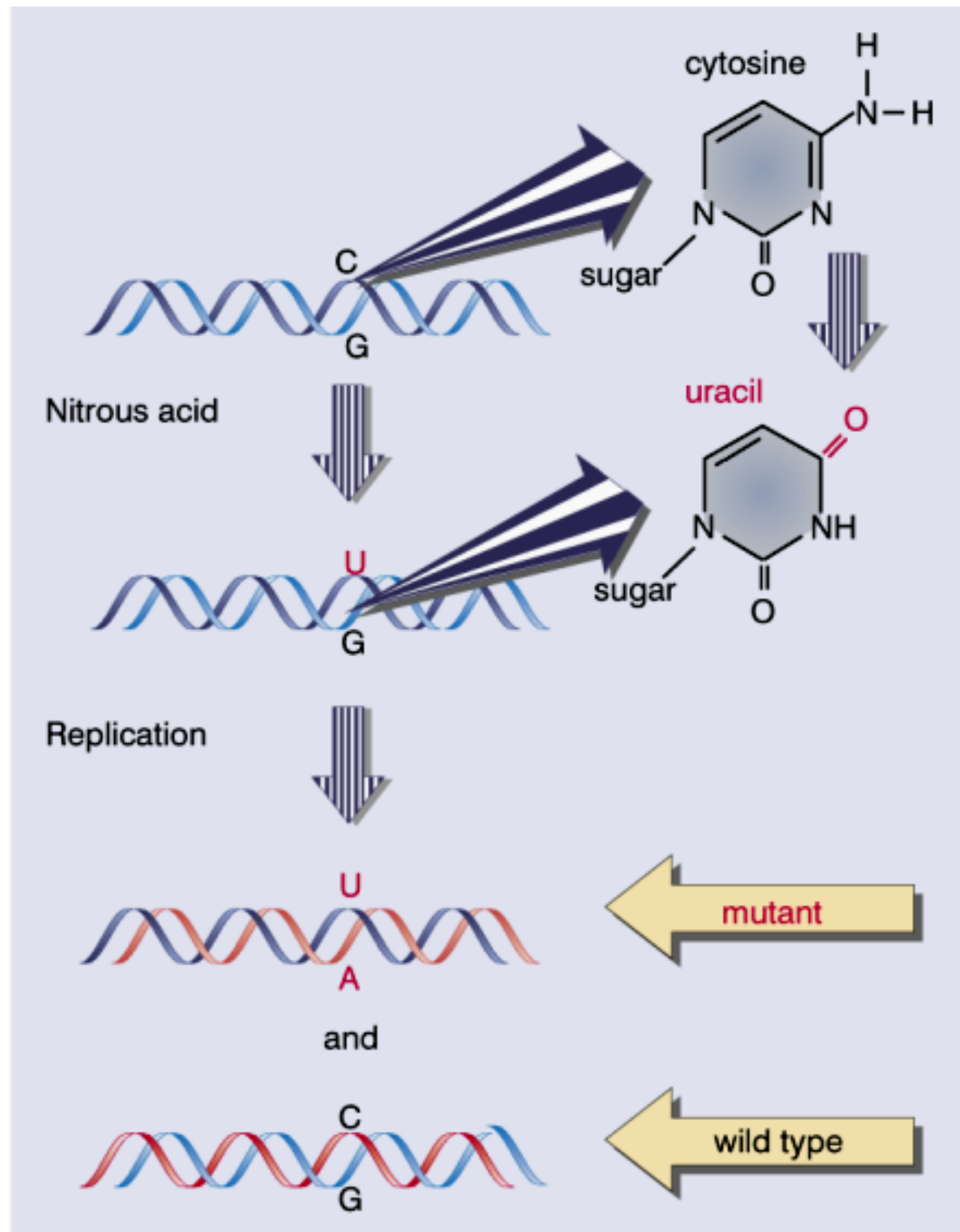
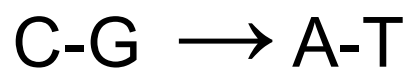
*2800 eventos de oxidação/célula/dia!*



# Mutações induzidas por modificação química de uma base do DNA

Ácido nitroso provoca desaminação da citosina e sua conversão em uracila

No próximo ciclo de replicação a uracila pareia com adenina

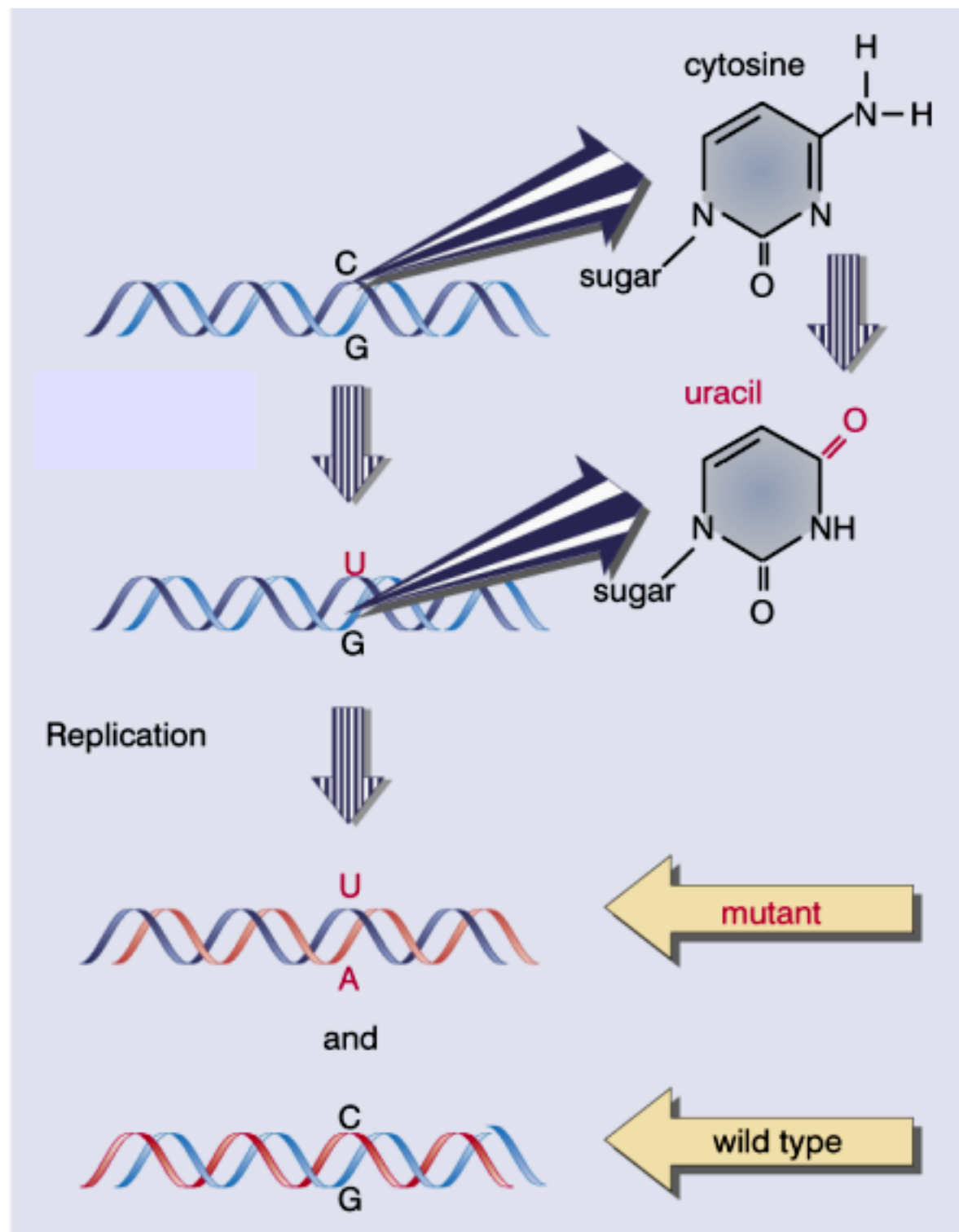


## Desaminação espontânea da Citosina em Uracila

Citosina é a base com mais alta taxa de deaminação espontânea

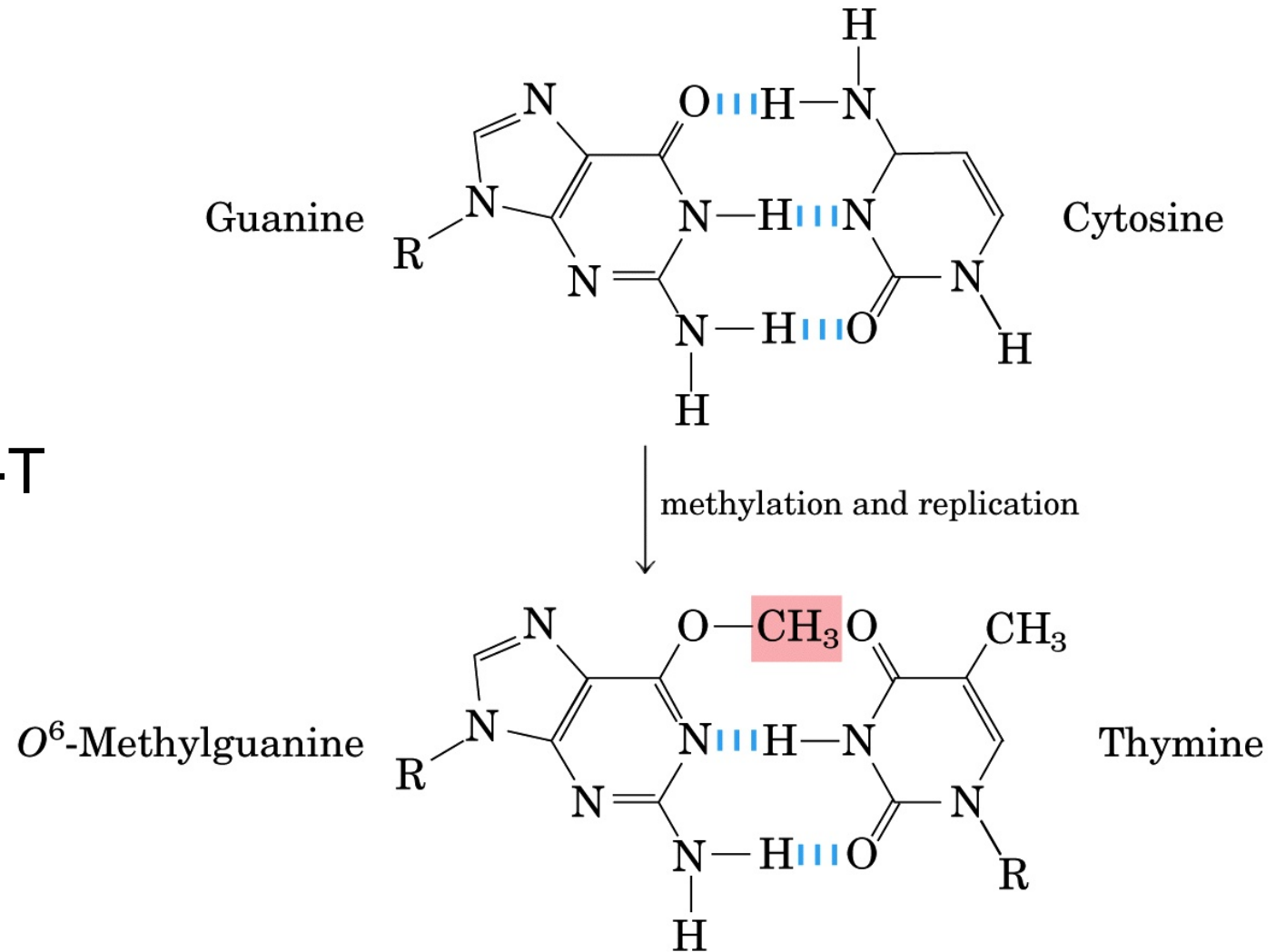
~ 200 eventos de deaminação/célula/dia

O que isso pode ter a ver com o fato que DNA tem T e RNA tem U?



# Metilação de guanina por metil-nitrosoguanidina

C-G → A-T

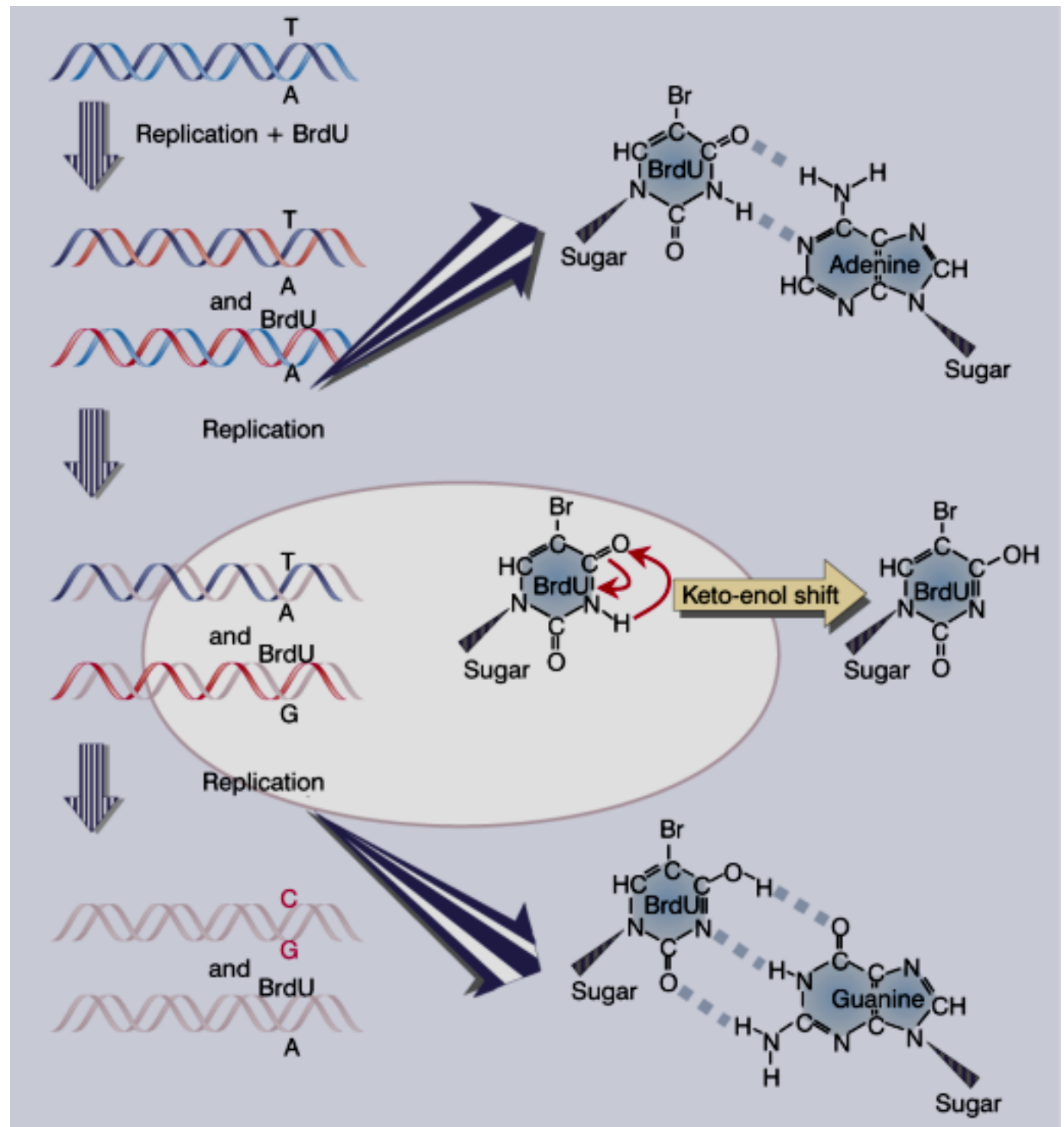


(a)



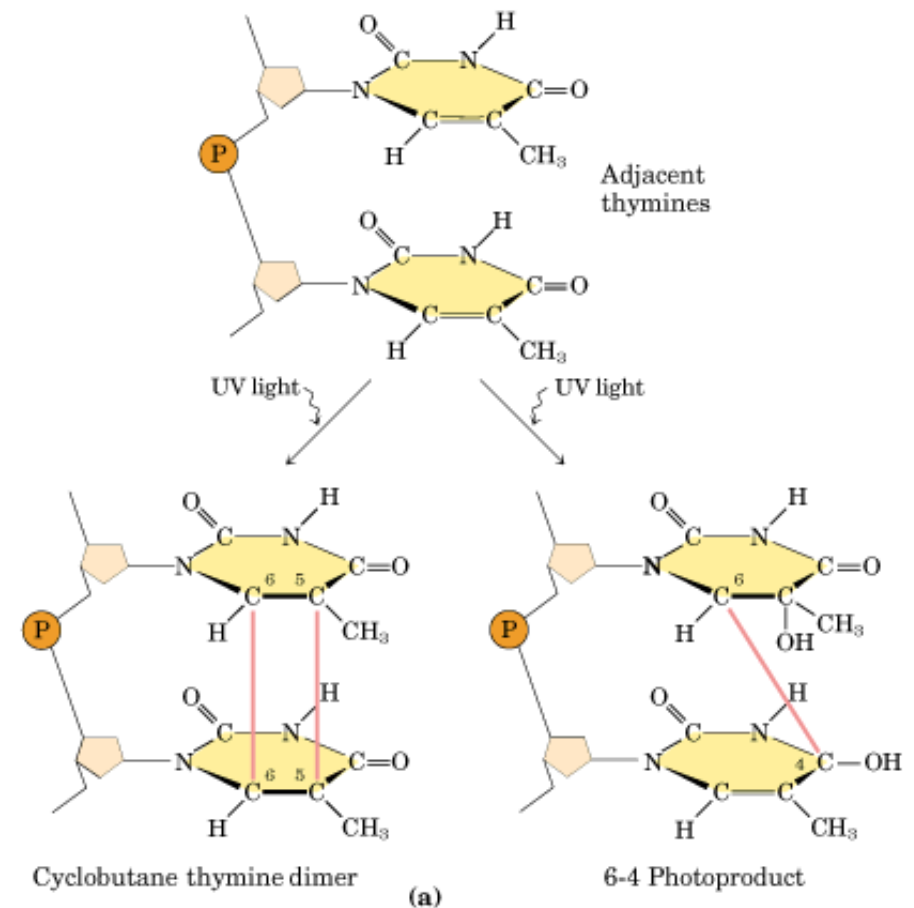
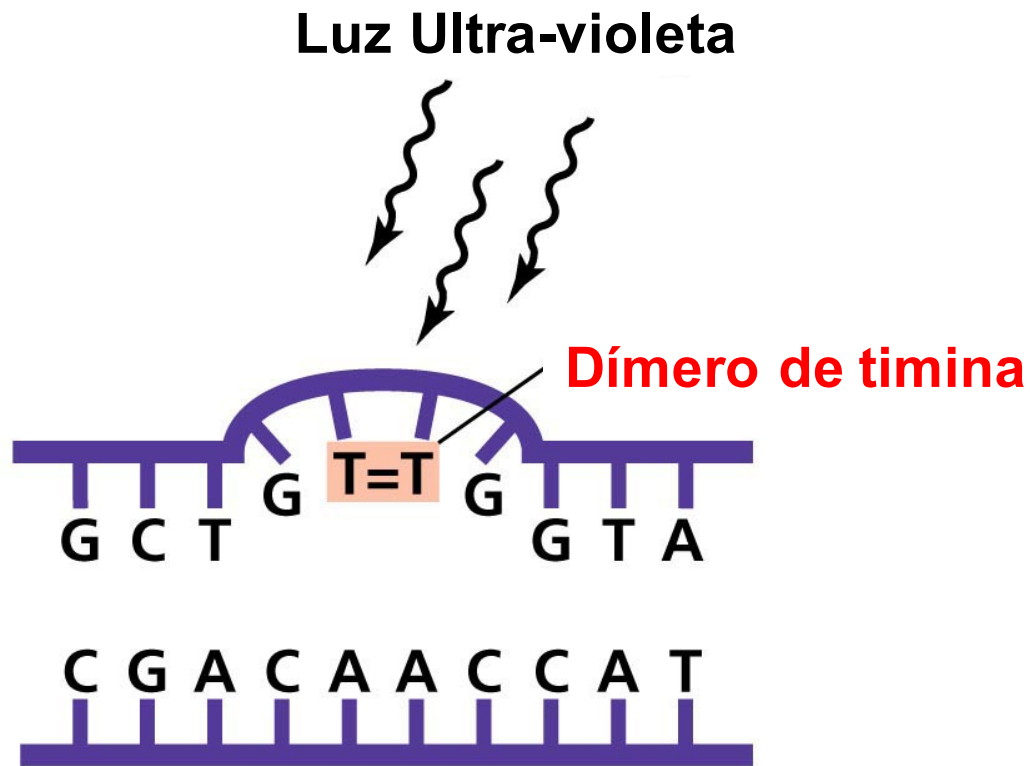
# Mutação induzida pela incorporação de análogos das bases

5-bromouracil é um análogo da timina, que normalmente pareia com a adenina, mas o tautômero enol do 5-BrU pareia com a guanina, causando a transição  $AT \leftrightarrow GC$

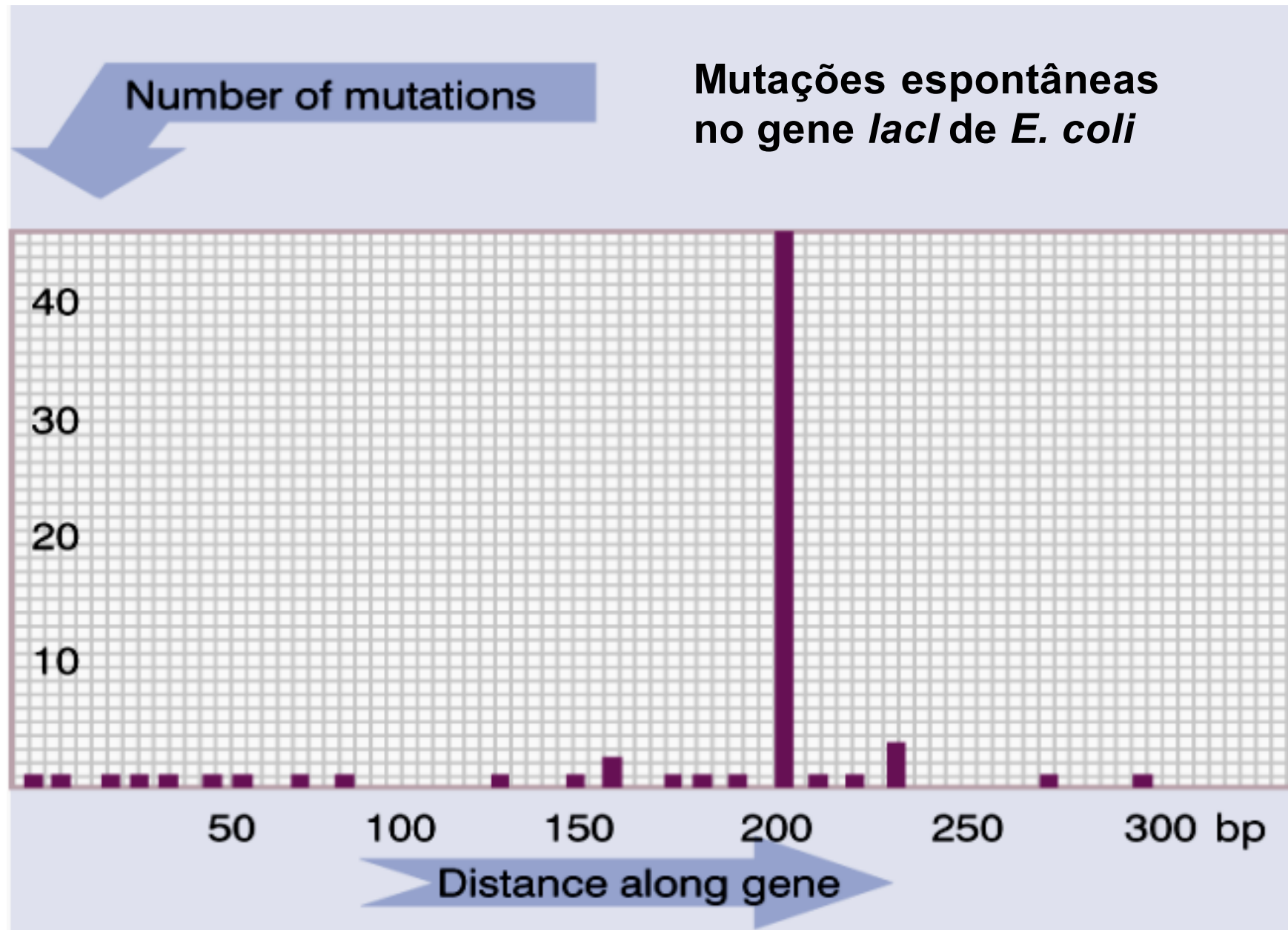


# Mutações induzidas por luz U.V.

Dímeros de pirimidinas: lesões que causam alterações na conformação do DNA e impedem sua replicação



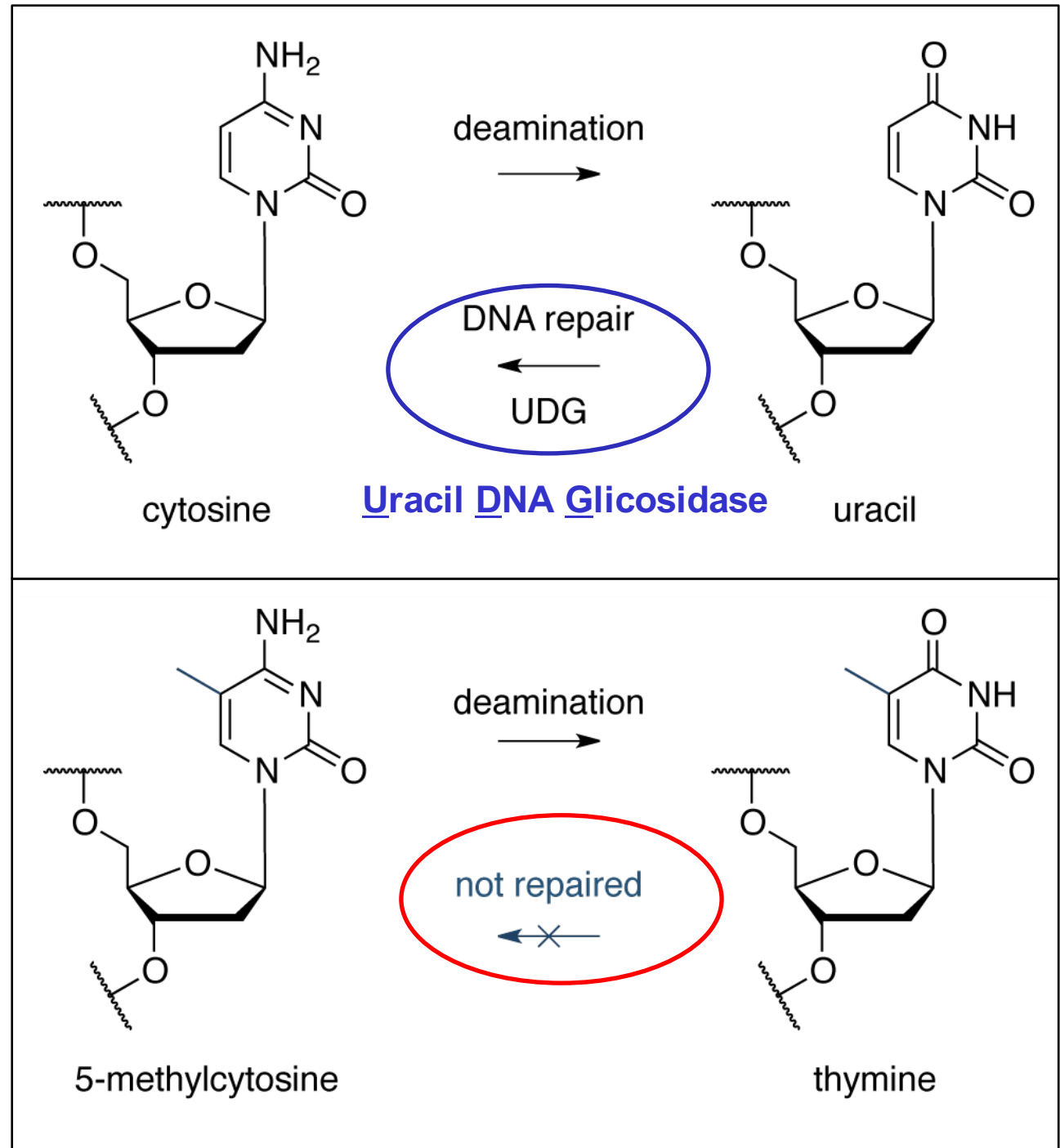
# “Hot spots”: Pontos do genoma que concentram mutações



**Sítios contendo metil-citosina comportam-se como “hot spots” para mutações espontâneas**

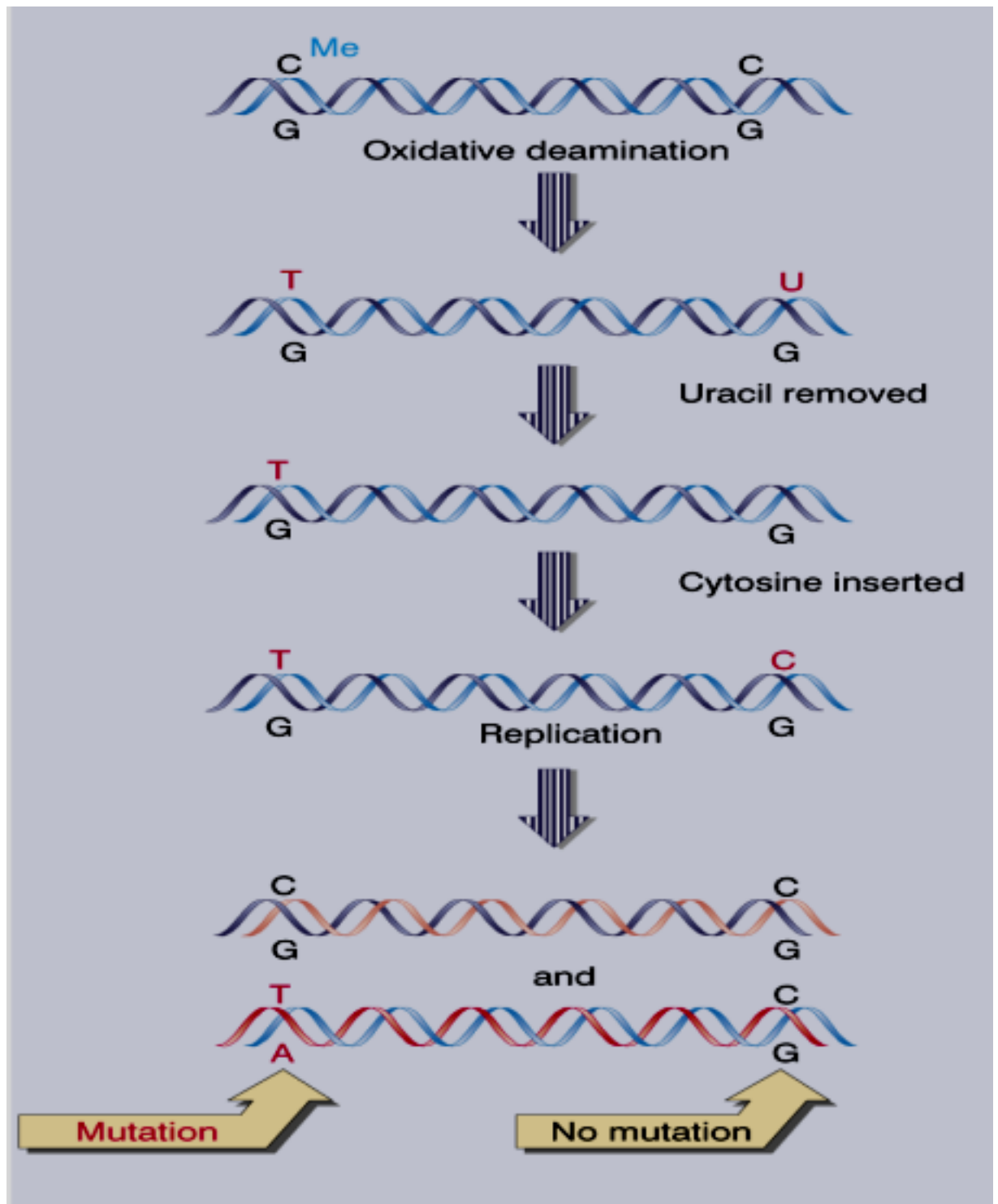
Os sistemas de reparo de erro da célula identificam a desaminação da Citosina em Uracila e corrigem o DNA.

Porém o mesmo não acontece com a desaminação da metil-citosina em Timina



Sítios contendo metil-citosina comportam-se com “hot spots” para mutações espontâneas

A metil-citosina, sofre **desaminação** espontânea que converte a metil-citosina em timina, causando a transição **CG ↔ TA**



# Consequências das mutações no DNA

- Mutações neutras → mutações silenciosas. Sem efeito na célula/organismo
- Mutações deletérias → causam perda de potencial de adaptação ou morte da célula/organismo. Tendem a ser eliminadas da população.
- Mutações benéficas → conferem vantagem adaptativa a célula/organismo. Tendem a se fixar na população

**Mutações não são todas deletérias !**

São também essenciais para o surgimento de novas características e a evolução das espécies !

# Mutação no genoma do HIV e resistência a drogas

- alta taxa de replicação viral: 10 bilhões de cópias/dia
- ausência de atividade revisora na enzima transcriptase reversa

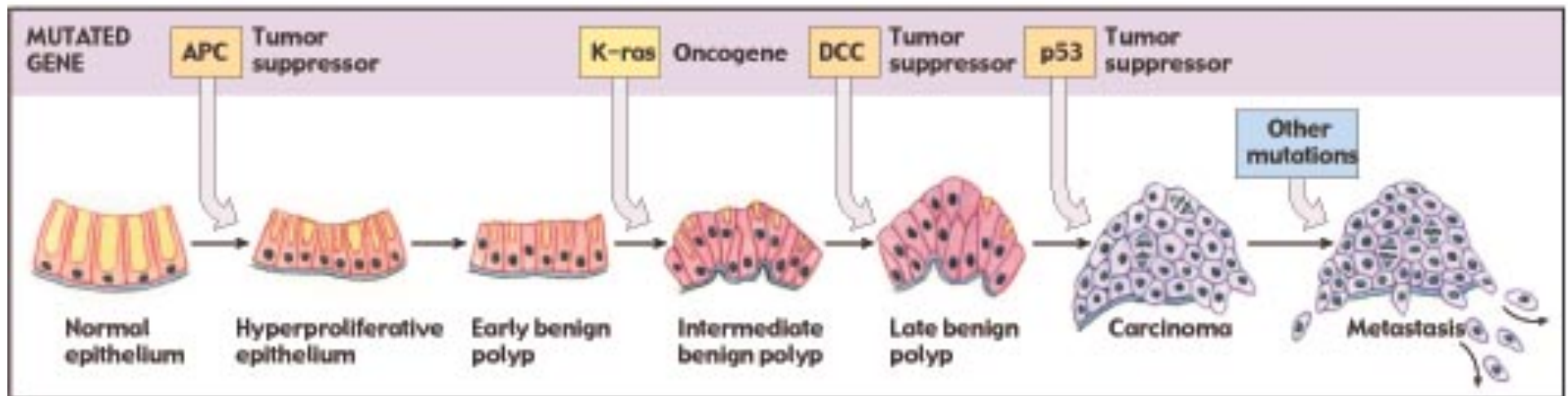


- introdução de erros (mutações) no genoma viral com alta frequência.
- essas alterações podem gerar mutantes resistentes às drogas
- Estratégia terapêutica: utilizar uma combinação de drogas que atuem em diferentes proteínas virais:
  - inibidores da transcriptase reversa (análogos de nucleosídeos, ex. AZT)
  - inibidores da protease
  - inibidores da integrase



# O acúmulo de mutações está associado ao surgimento de câncer em mamíferos

mutações que **inativam genes supressores de tumor** ou que **ativam oncogenes** são necessários para o desenvolvimento dos tumores malignos

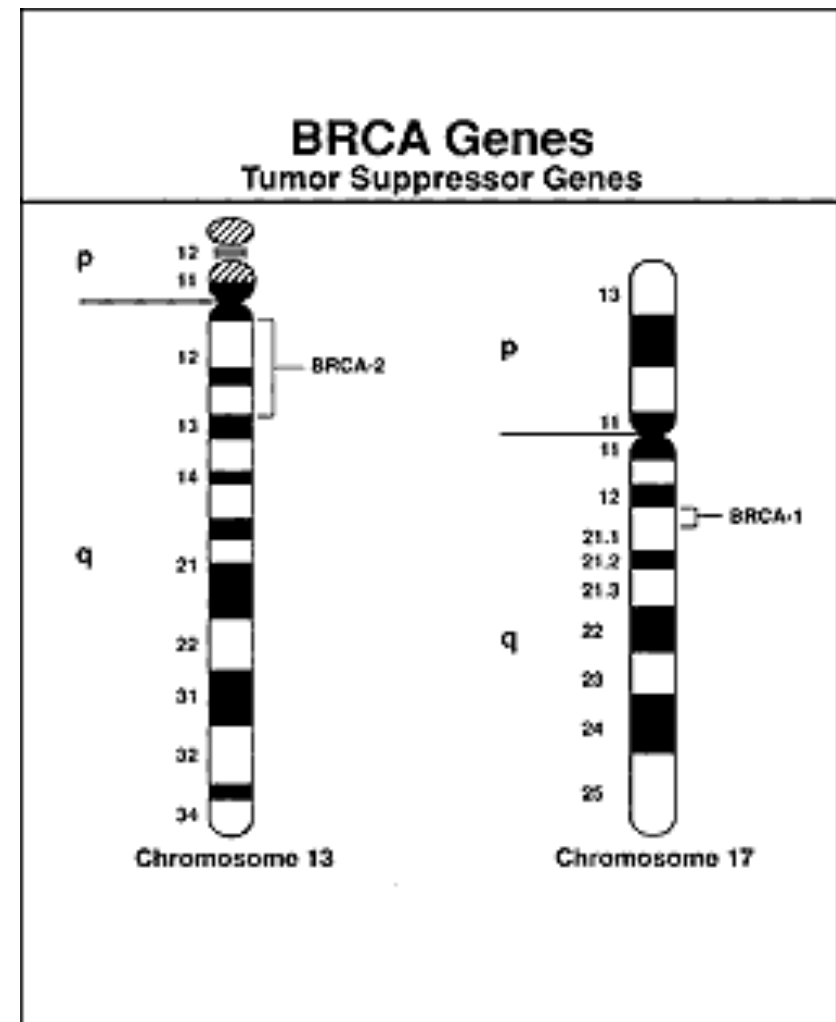


Linha de tempo do surgimento e evolução do câncer de cólon



# Mutação nos genes BRCA1 e BRCA2 e predisposição ao câncer

- Genes de susceptibilidade ao câncer de Mama e Ovário
- Proteínas codificadas pelos genes estão envolvidas no reparo de DNA (genes supressores de tumor)
- mais de 600 mutações já foram identificadas nestes genes.
- Mutações hereditárias com prevalência elevada em certos grupos humanos (ex. Judeus asquenazes)
- Identificáveis a partir de PCR e sequenciamento do DNA.



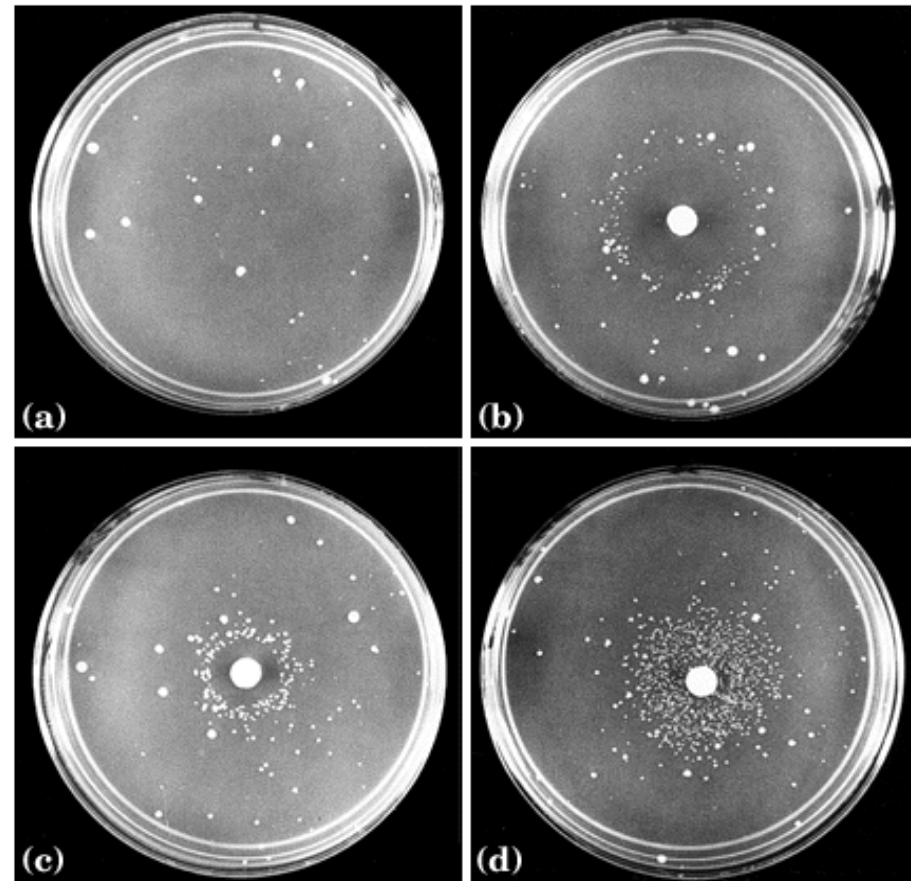
# Teste de Ames para avaliar **potencial carcinogênico** de drogas baseando-se em seu **potencial mutagênico**

Cepa de *Salmonella typhimurium* com **mutação pontual** que a torna **incapaz de crescer na ausência de histidina**

(a) meio sem histidina: pouco crescimento, mutações espontâneas

(b, c, d) disco no centro da placa contendo **agente mutagênico** em diferentes concentrações.

Diluição até doses sub-letais aumentam a **frequência de mutação**



Importante: algumas substâncias tornam-se mutagênicas apenas após metabolizadas no organismo. Ex.: Benzopireno

A integridade do DNA é essencial para sobrevivência das células e preservação da espécie (transmissão entre gerações)

### Como garantir ?

1. replicação de alta fidelidade
2. sistemas de reparo

o DNA é a única molécula que ao ser danificada pode ser reparada dentro da célula

## Quem contribui para a fidelidade da replicação ?

	<u>taxa de erro</u>
discriminação dos nucleotídeos pela polimerase	$2 \times 10^{-5} - 2 \times 10^{-6}$
atividade revisora da polimerase	$\sim 10^{-2}$
reparo	$\sim 10^{-2}$
<hr/>	
Total	$10^{-9}$ a $10^{-10}$

*um erro em um bilhão/dez bilhões de nucleotídeos copiados!*

# Sistemas de Reparo do DNA

- 1) Reparo direto – reverte um tipo específico de lesão – dímeros de pirimidina
- 2) Reparo de pareamento errôneo (*mismatch*) – corrige os erros da polimerase que escaparam revisão
- 3) Reparo de excisão de base – corrige bases danificadas
- 4) Reparo de excisão de nucleotídeo - corrige bases danificadas não corrigidas por 3)
- 5) Reparo de quebras duplas no DNA – restaura a integridade das fitas

*Garantem a integridade da informação genética e/ou sobrevivência da célula*

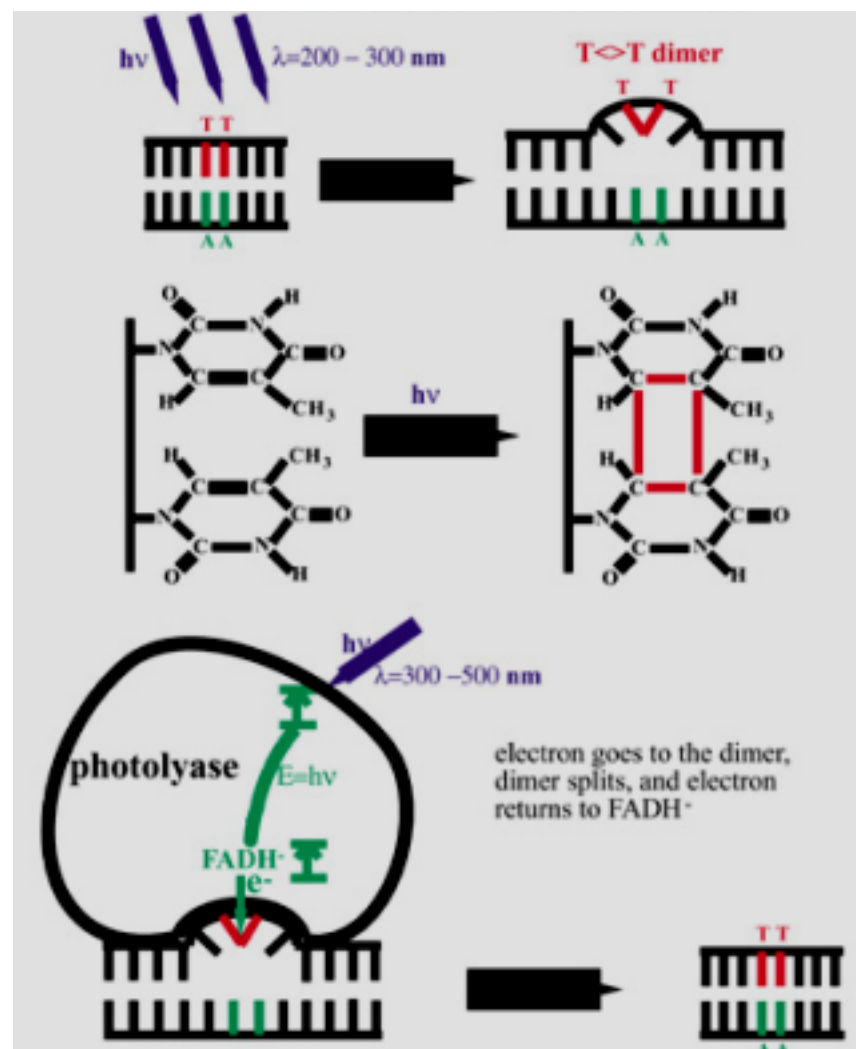
# Mecanismo de reparo direto

## Reparo por foto-reativação enzimática de dímeros de pirimidina

- Encontrada em procariotos e eucariotos. Não é funcional em mamíferos
- Não envolve a substituição de bases ou nucleotídeos

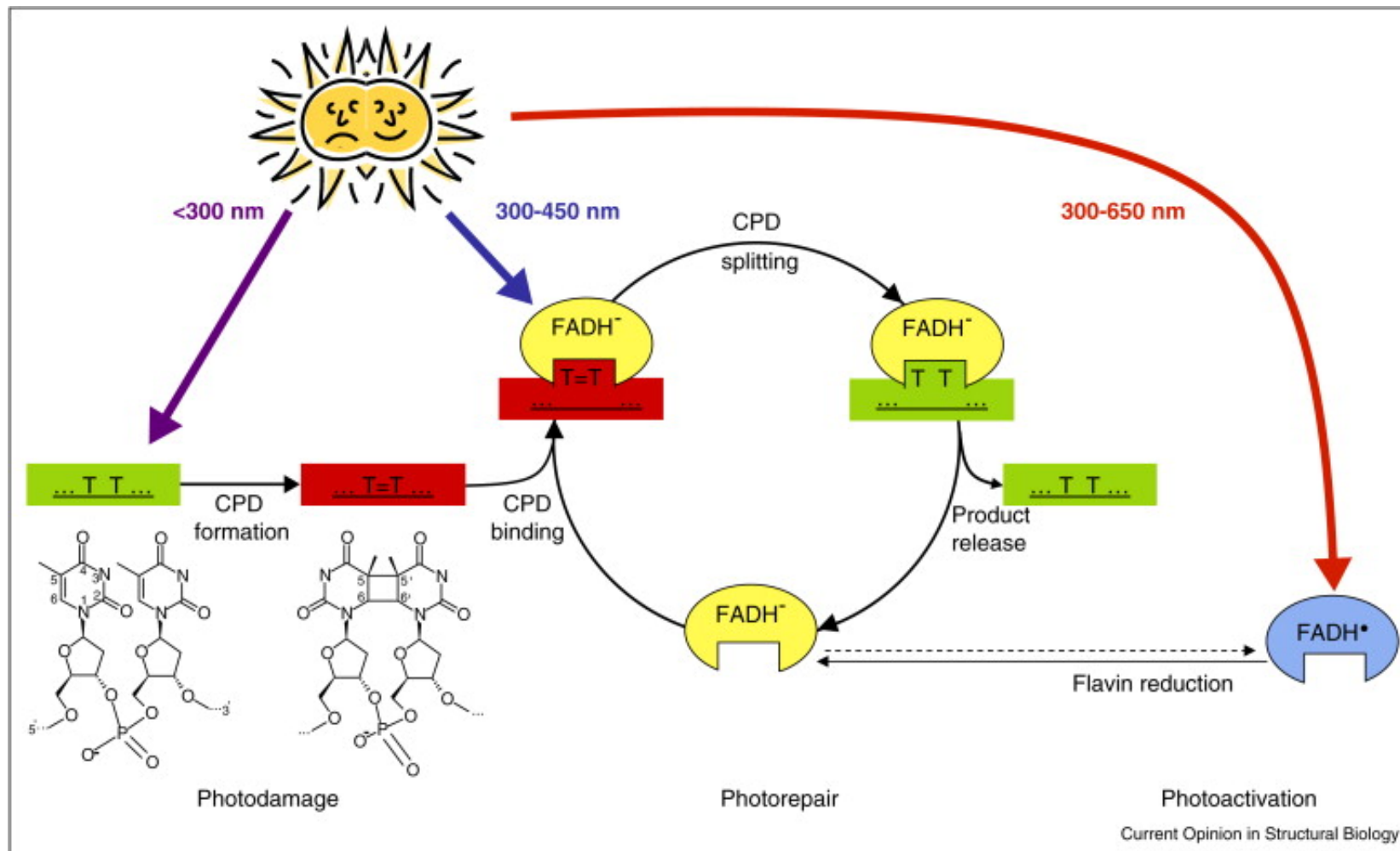
Fotoliasas: enzimas que catalizam a fotoreativação de dímeros de pirimidina utilizando energia derivada de luz absorvida.

As fotoliasas possuem co-fatores (FADH, folato) que absorvem luz visível e convertem a energia do fóton em potencial redutor que regenera os monômeros de pirimidina



# Mecanismo de reparo direto

## Reparo por foto-reativação enzimática de dímeros de pirimidina



CPD = "cyclobutane pyrimidine dimers"



# Reparo de bases pareadas incorretamente

Correção de erros que escapam da atividade revisora da DNA polimerase durante a replicação → resultam no aumento na fidelidade de replicação em 100 a 1.000 vezes

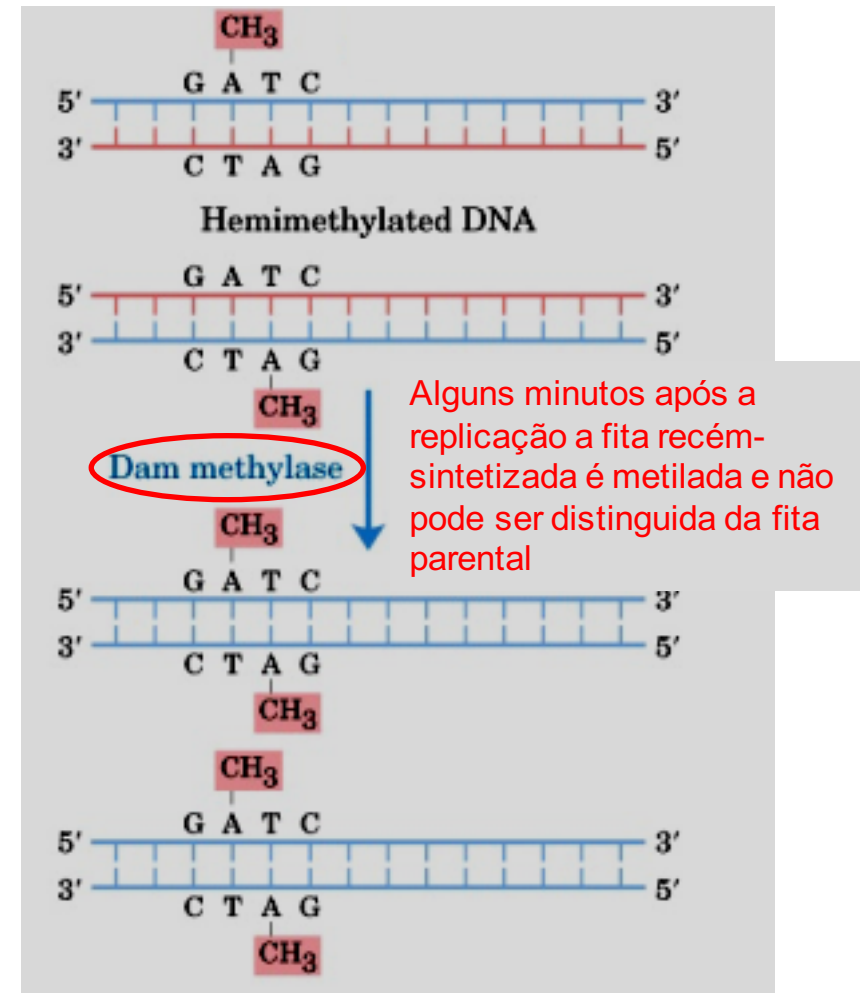
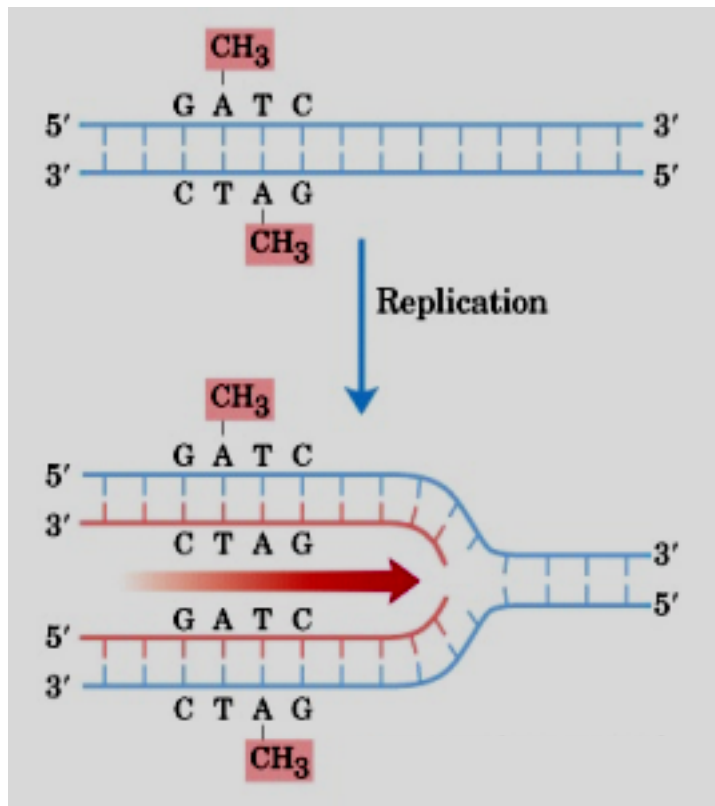




# Reparo de bases pareadas incorretamente

Como determinar qual a fita de DNA que contem a base pareada incorretamente?

**Metilação da adenina no sítio GATC da origem de replicação** identifica qual é a fita a parental e qual é a fita filha



**Metilação** da fita parental garante que a fita a ser reparada seja a fita "filha"

# Reparo de bases pareadas incorretamente em procariontos **em procariontos**

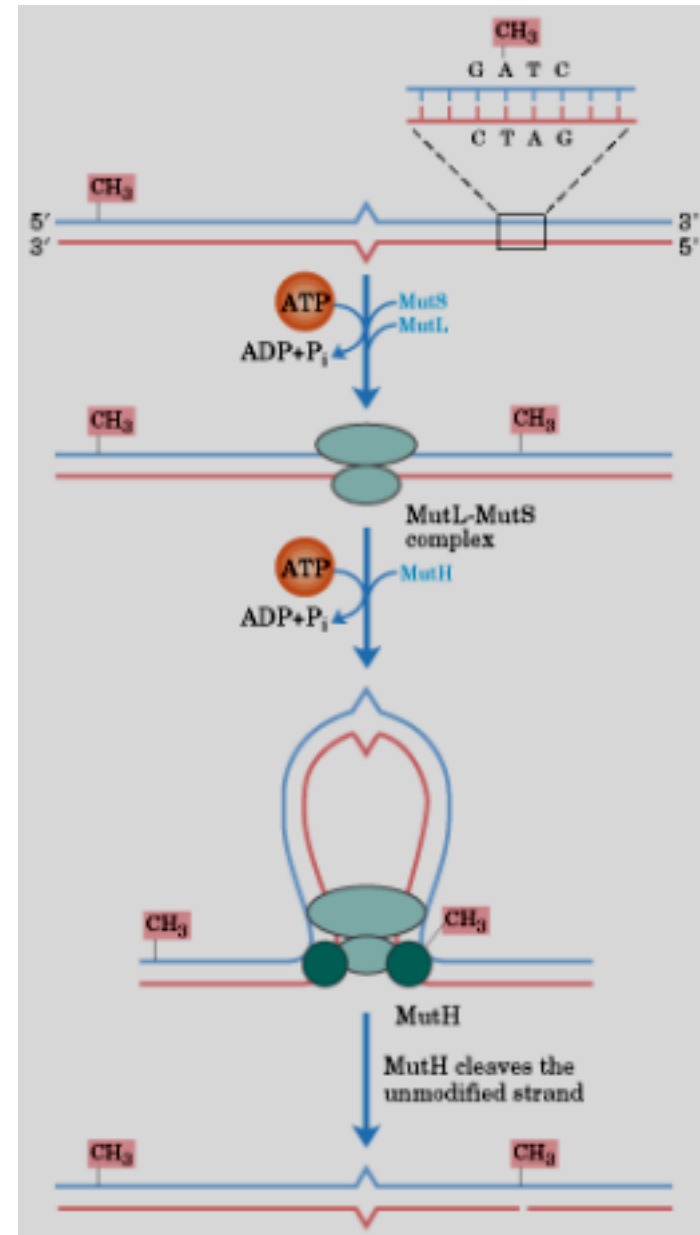
## Passo 1: Identificação da lesão e clivagem do DNA

- Sistema de reparo composto por ~ 12 proteínas (*E.coli*).

### Complexo protéico mutS/mutL

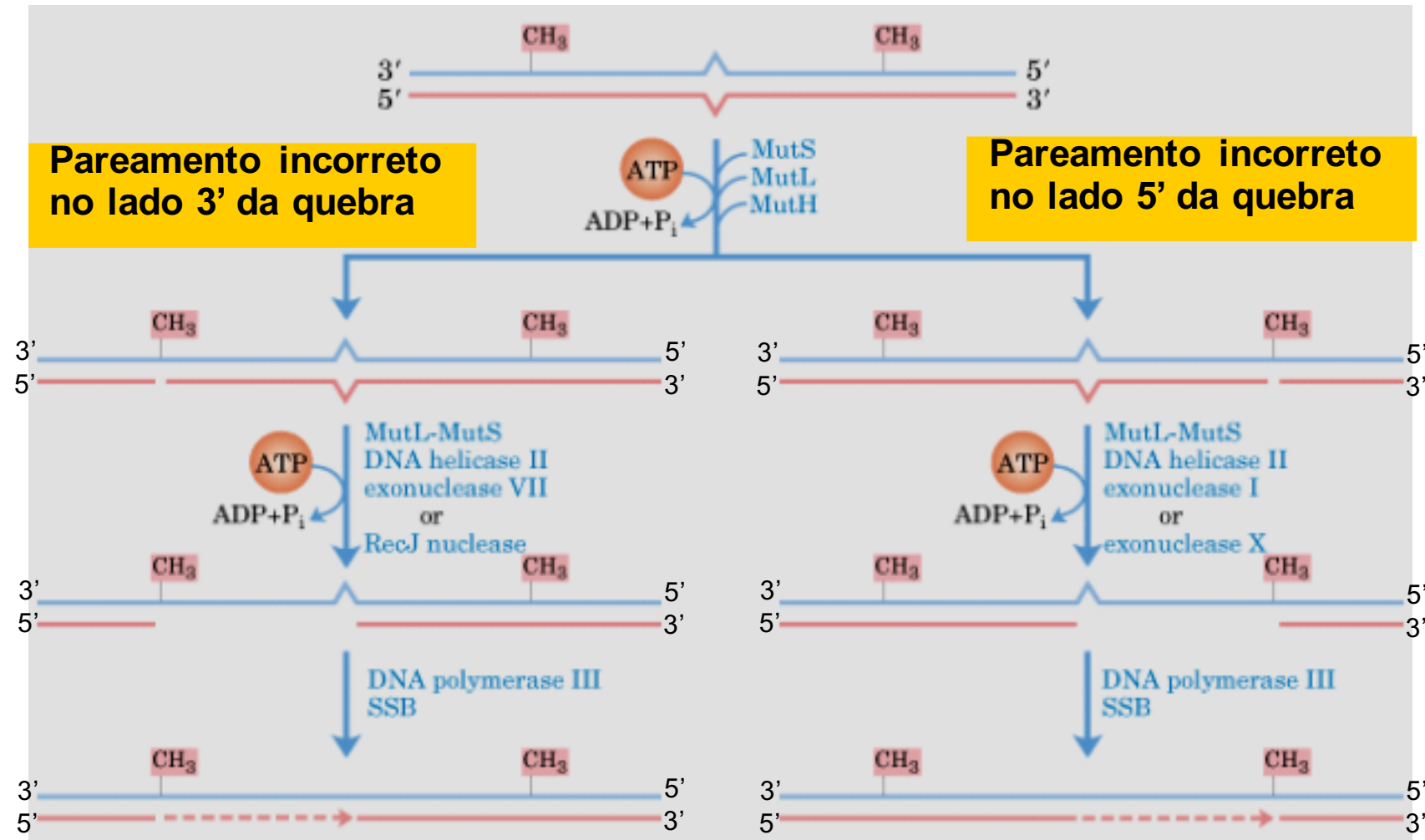
reconhece o DNA com pareamento incorreto, e se desloca até o sítio GATC hemi-metilado.

**MutH** possui atividade endonuclease que cliva a fita não-metilada.



# Reparo de bases pareadas incorretamente

## Passo 2: remoção da base incorreta e reparo da fita de DNA



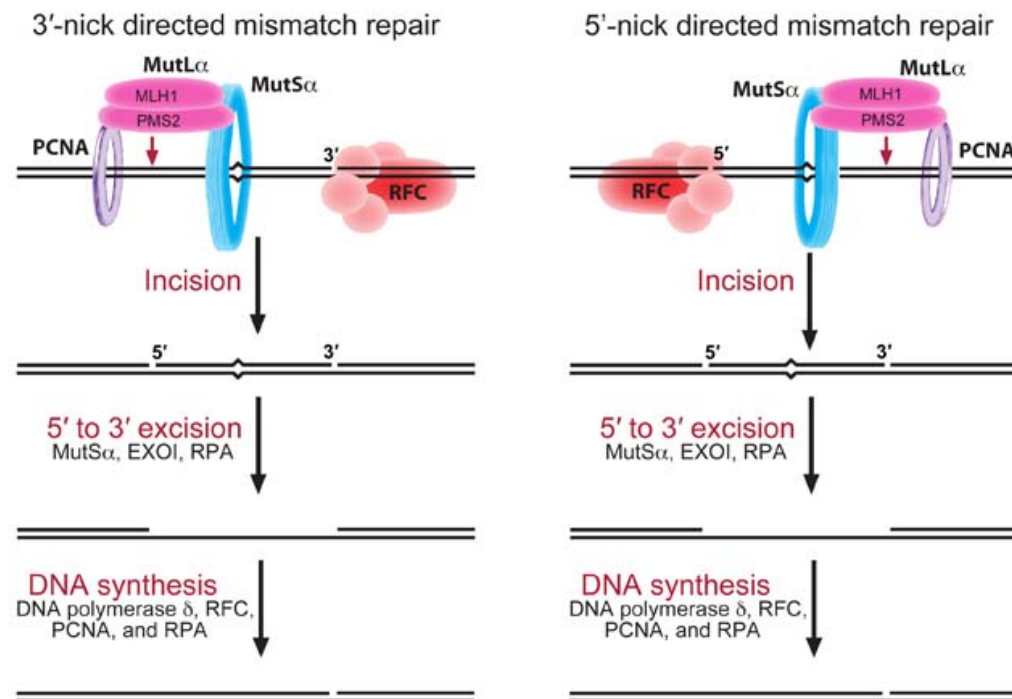
**Exonucleases de reparo** degradam e reconstituem o trecho da fita “filha” que contem o pareamento incorreto.

**DNA helicases** (desenovelamento da dupla fita de DNA) e **DNA Polimerases** (síntese das fitas corretas) participam no processo.

# Reparo de bases pareadas incorretamente em eucariotos

Proteínas de reparo homólogas às de procaríotos (homologia = mesma origem evolutiva)

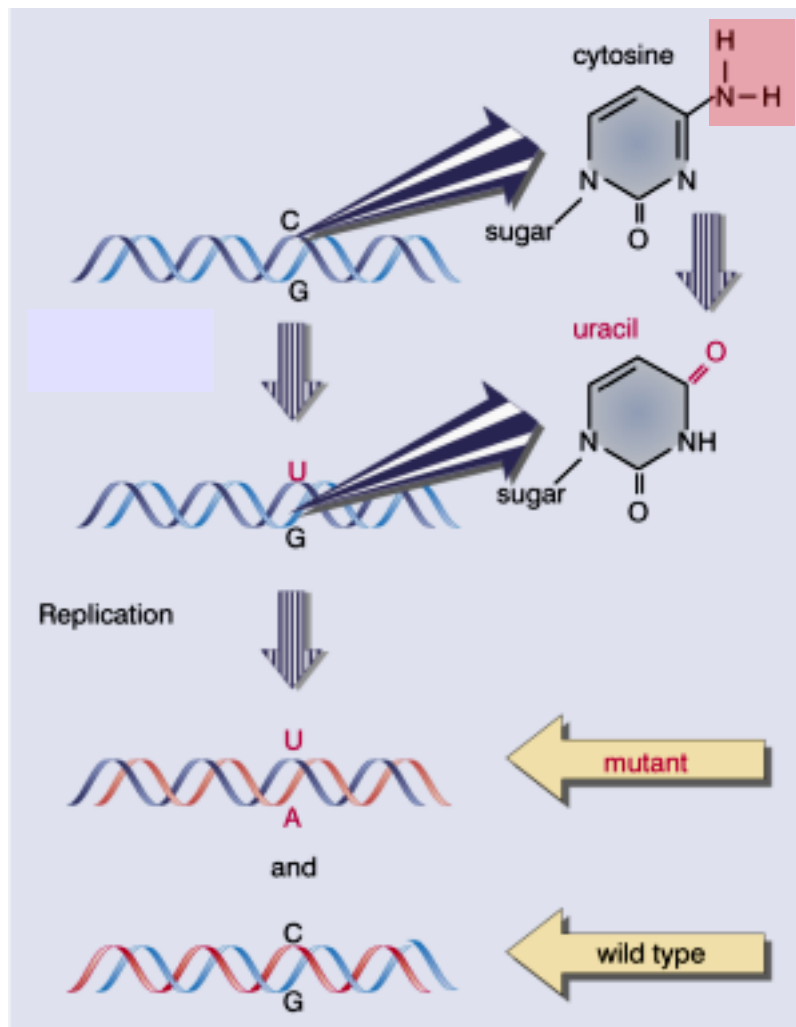
	Eucariotos	Procaríotos
Identificação da base pareada incorretamente, ativação da EXO1	complexo MutS $\alpha$ (Msh2/Msh6)	MutS
Atividade endonuclease	complexo MutL $\alpha$ (MLH1/PMS2)	MutL
Atividade exonuclease	Exonuclease 1 (EXO1)	MutH
Síntese de novo trecho de DNA	DNA polimerase delta	DNA Pol III
Proteínas auxiliaadoras da DNA Polimerase	PCNA, RFC, RPA	



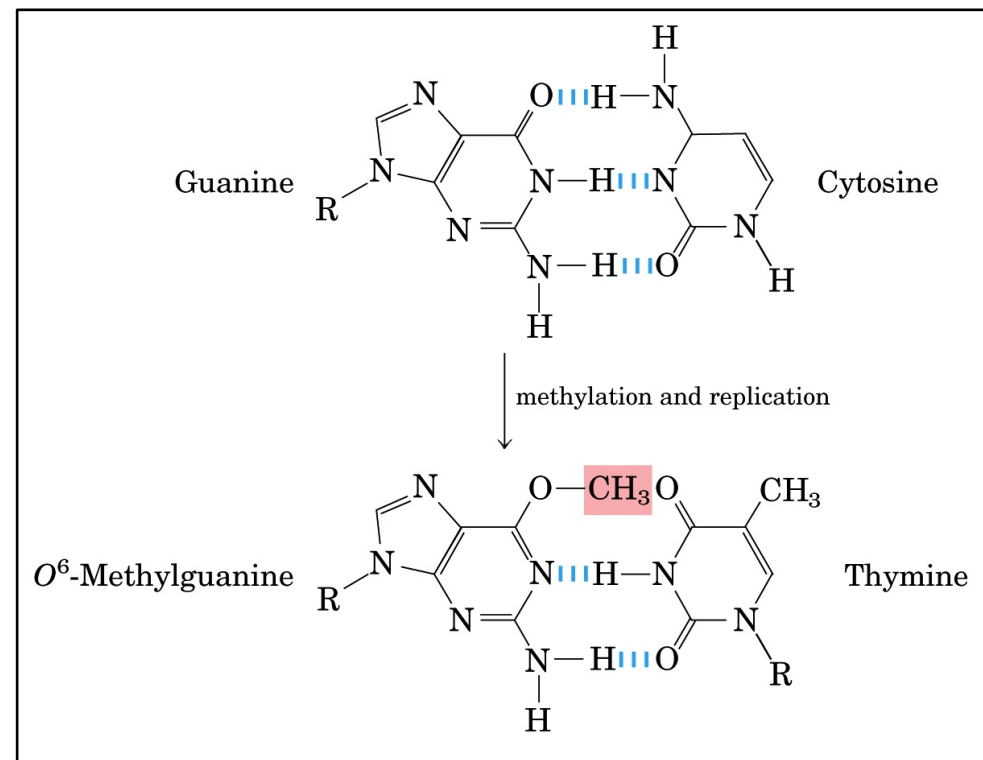
# Reparo por excisão de Bases

Reparo de lesões envolvendo alteração química das bases

Exs.: deaminação de citosinas

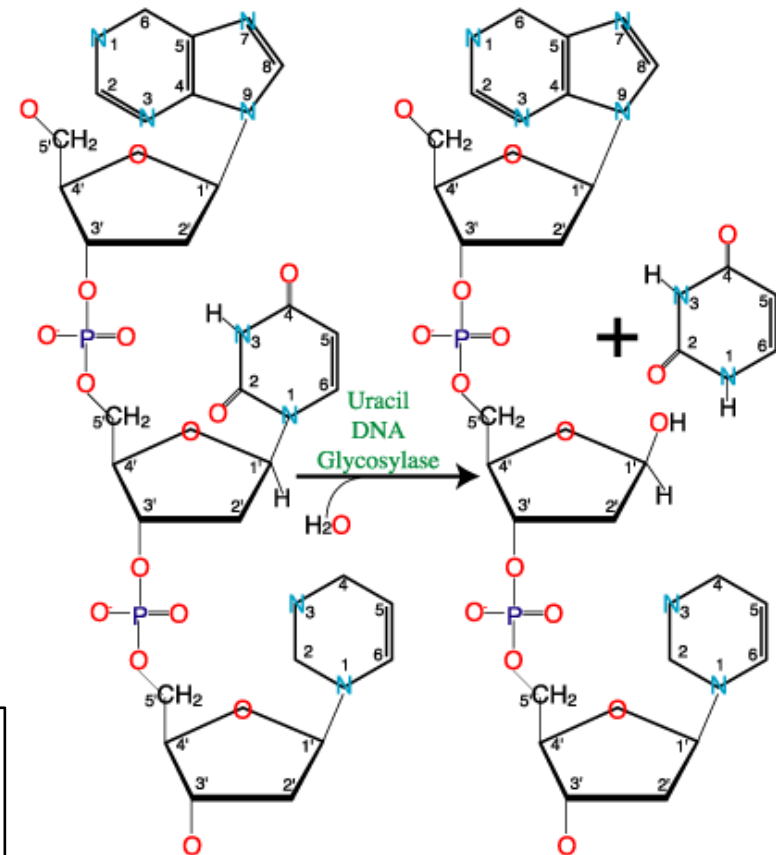
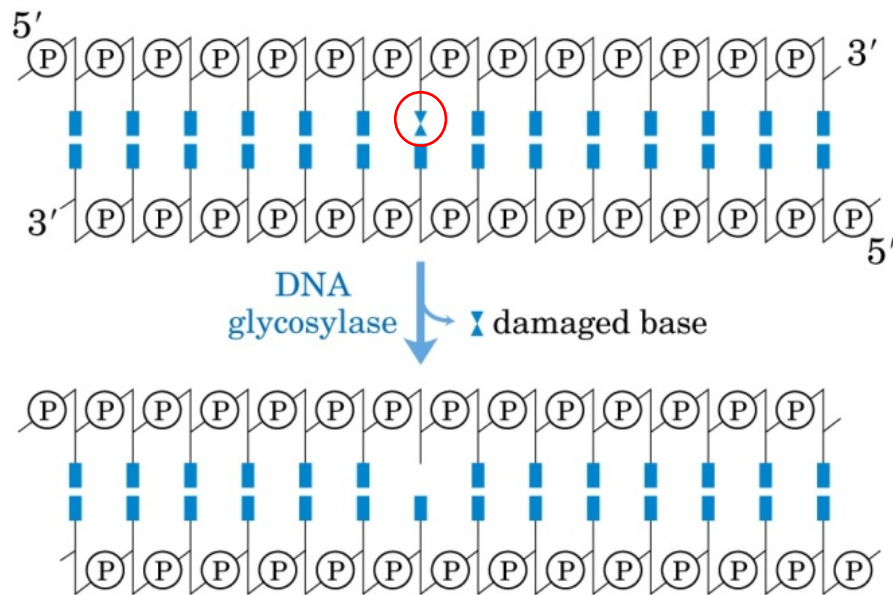


alquilação de guanosinas



# Reparo por excisão de Bases

**Passo 1: DNA glicosilases** específicas para cada base (ex. uracil DNA glicosidase) removem a base alterada e geram um sítio abásico.



A **uracil DNA glicosidase** repara mais de 10.000 bases danificadas por dia em uma célula humana

## DNA glicosilases humanas e suas especificidades

Glycosylase	Specificity
MBD4	U and T opposite G
MPG	3-MeA, 7-MeG, 3-MeG ethenoA, hypoxanthine
MYH	A opposite 8-OxoG
NEIL1	Formamidopyrimidines oxidised pyrimidines (e.g. thymine glycol)
NEIL2	5-Hydroxyuracil; 5-hydroxycytosine
NEIL3	Fragmented and oxidised pyrimidines
NTH1	Ring-saturated, oxidised and fragmented pyrimidines
OGG1	8-OxoG paired with C, T and G
SMUG1	Uracil
TDG	U, T or ethenoC, opposite G T opposite G, C and T
UNG	Uracil

*Tipos diferentes de bases lesionadas requerem enzimas diferentes.*

*Notem quantas reconhecem uracila*



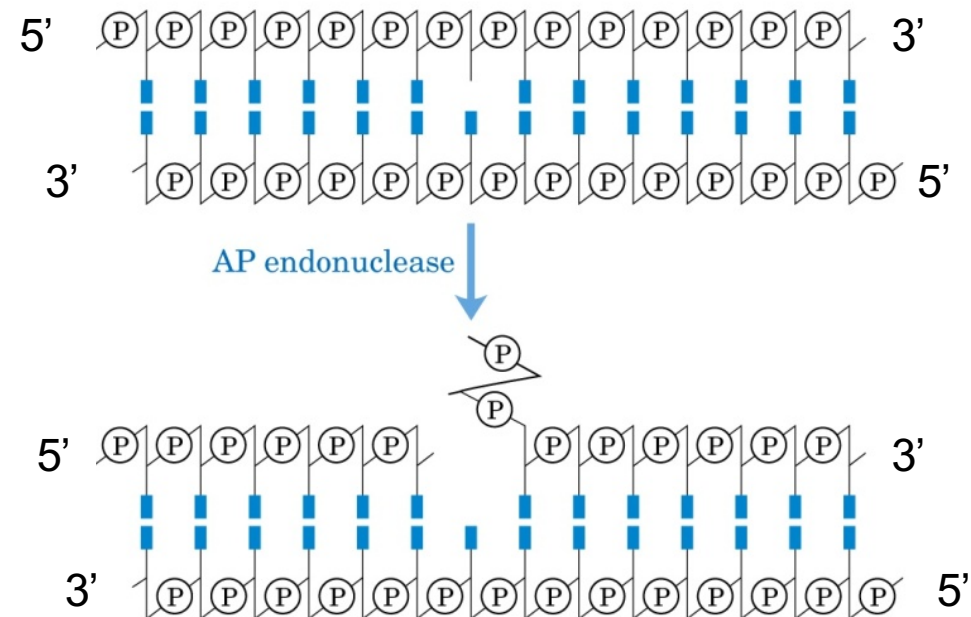
# Reparo por excisão de Bases

**Passo 2:** uma enzima **AP endonuclease**

(“Apurínica/Apirimidica”) quebra a ligação

fosfodiéster que flanqueia o nucleotídeo

danificado na extremidade 5'

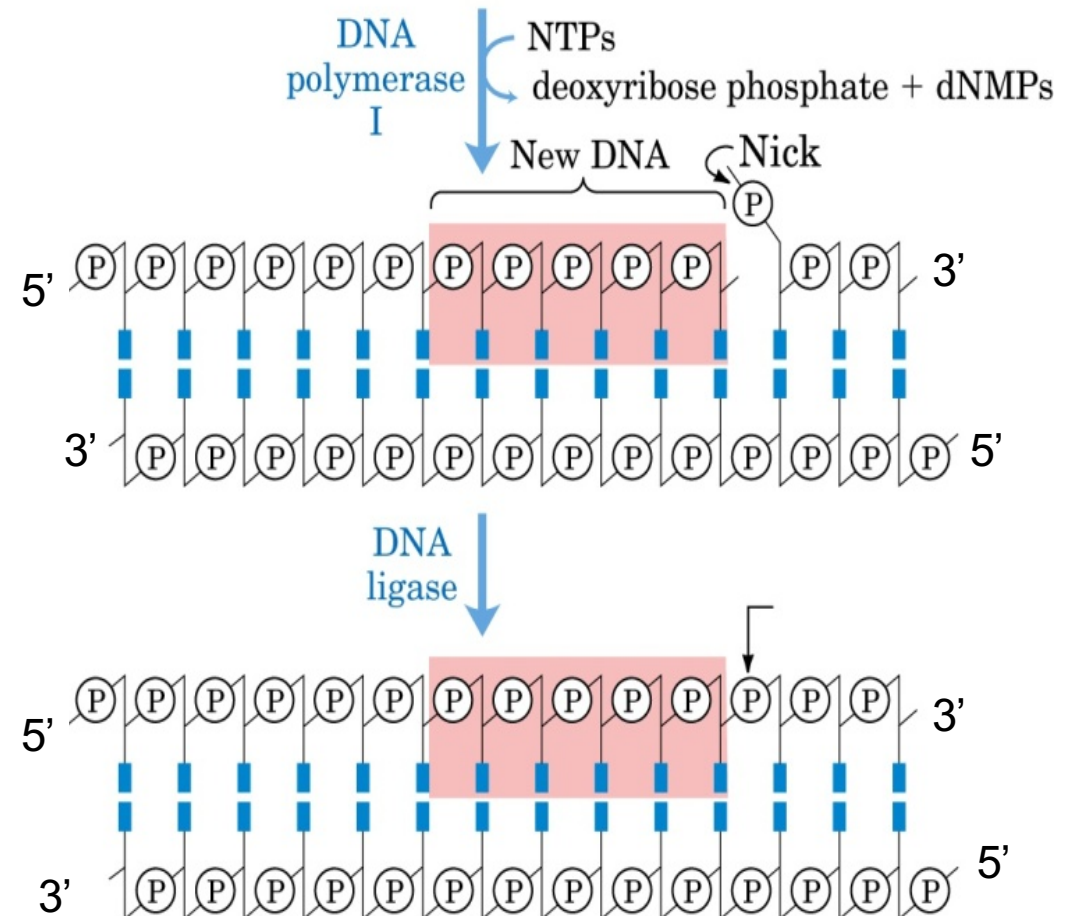




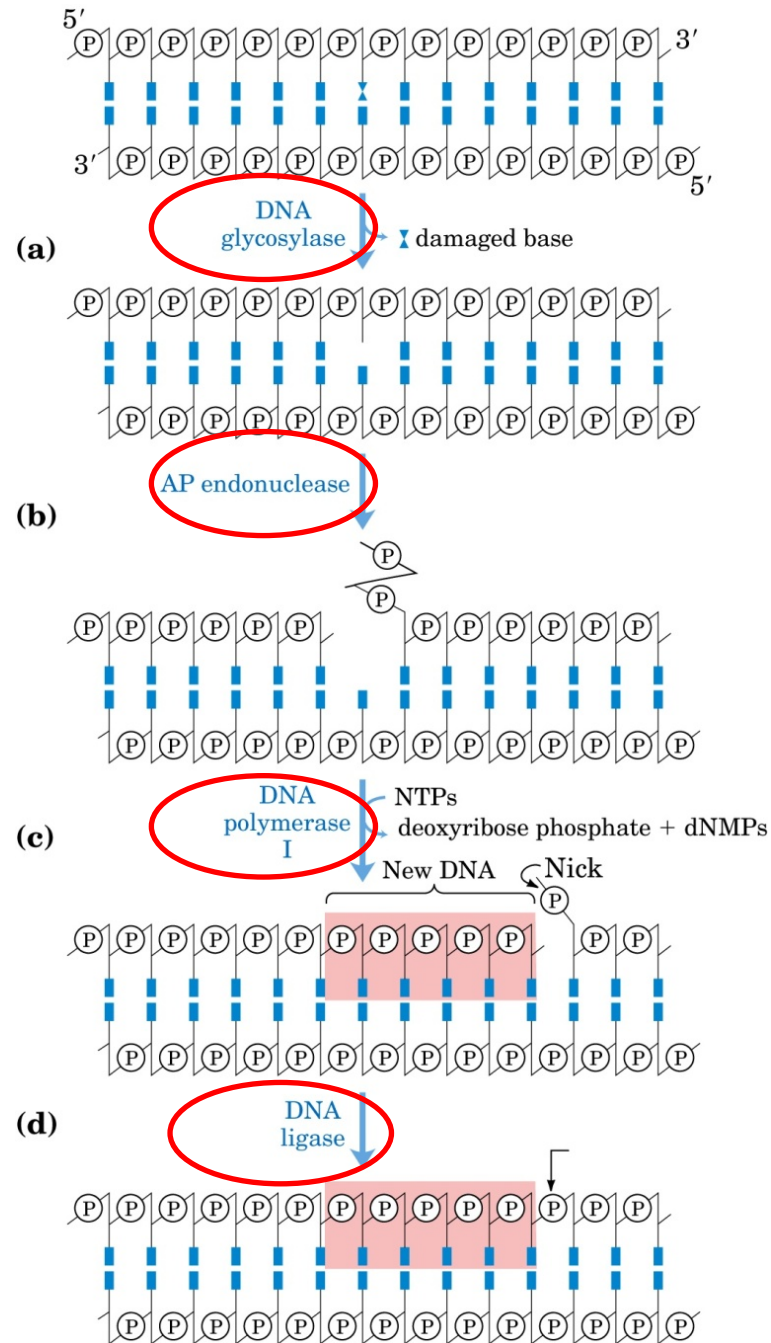
# Reparo por excisão de Bases

**Passo 3:** a DNA polimerase I (Pol I) sintetiza uma nova cadeia a partir do 3'-OH livre no ponto de quebra reparando a fita de DNA.

**Passo 4:** Uma DNA ligase fecha o ponto de quebra deixado pela DNA Pol I.

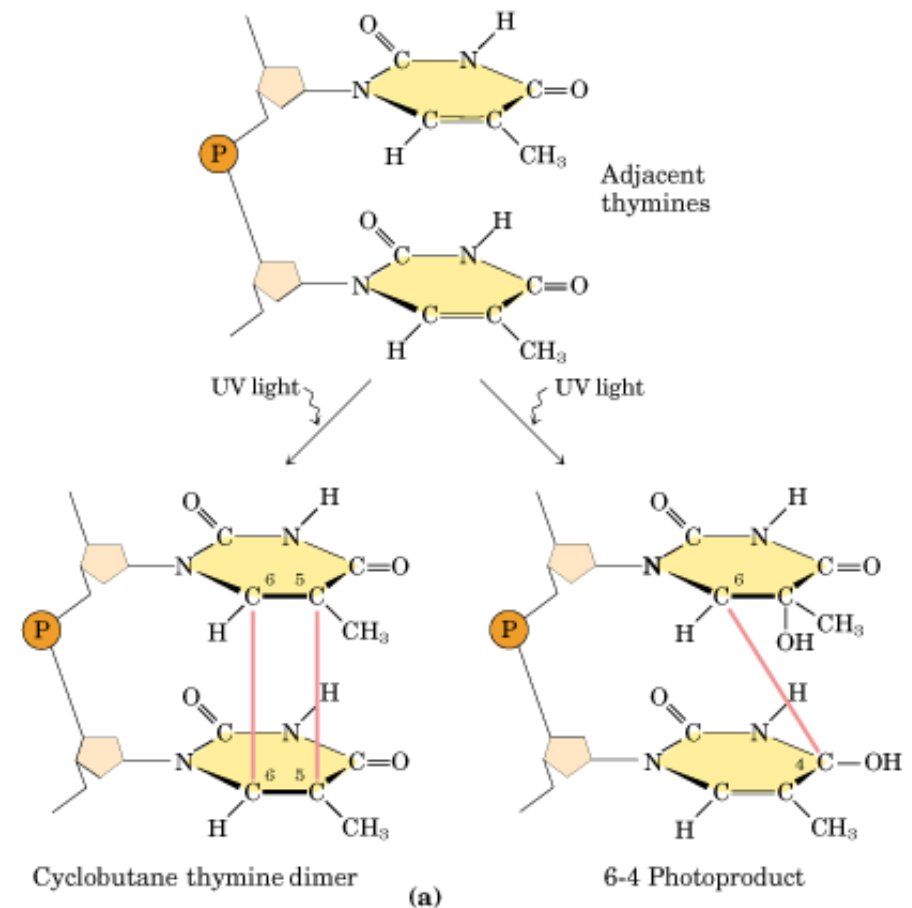
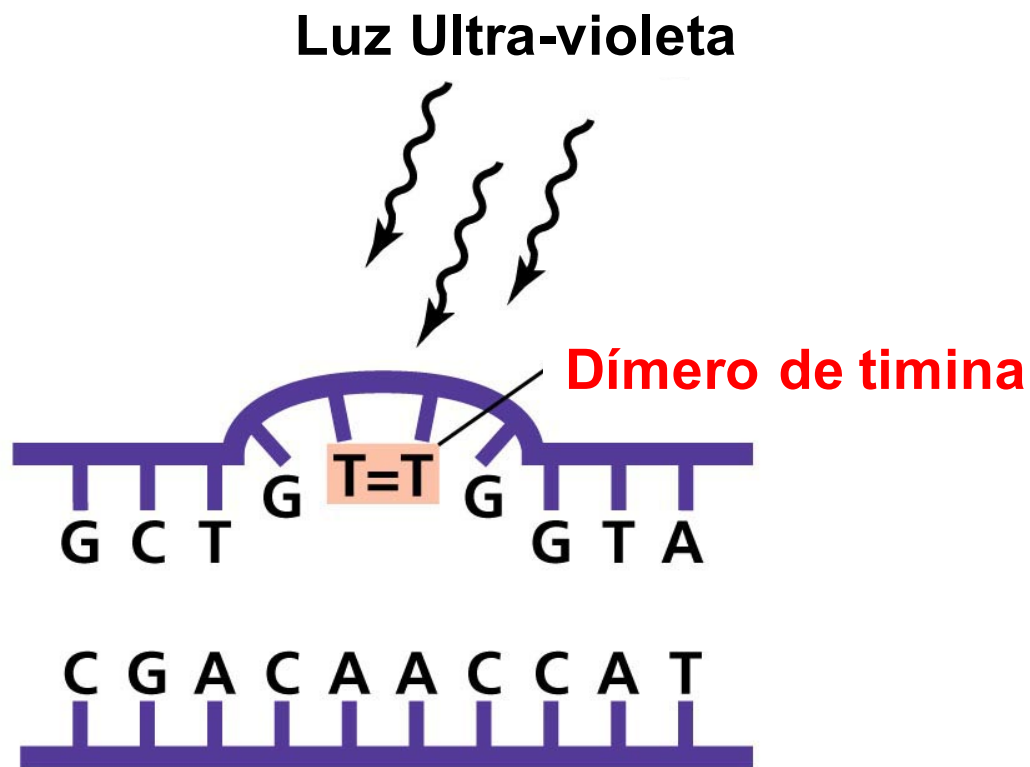


# Reparo por excisão de Bases



# Reparo por excisão de nucleotídeos

Reparo de lesões que causam grandes alterações na conformação do DNA  
ex: dímeros de pirimidinas



# Reparo por excisão de nucleotídeos

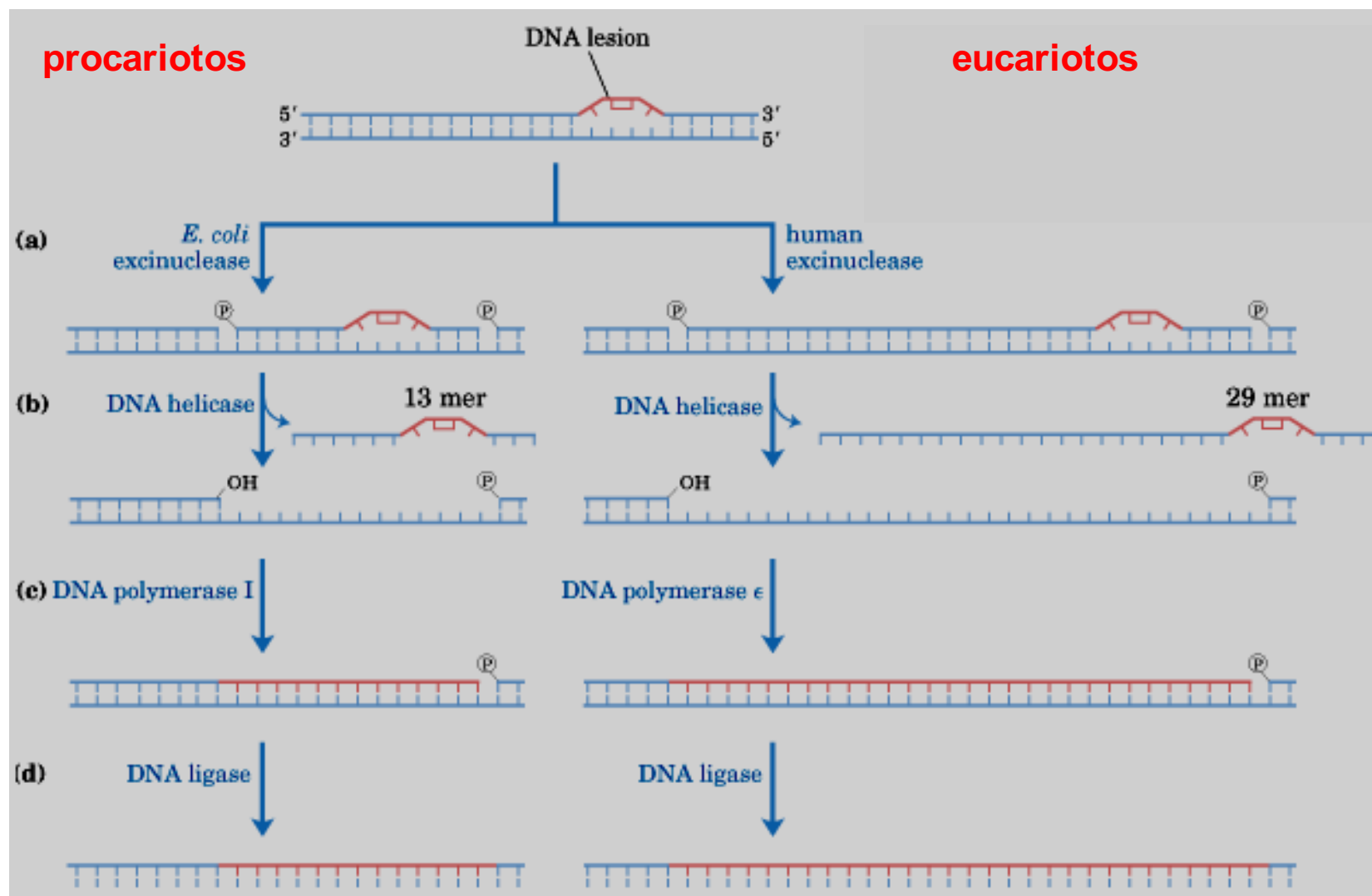
**Passo 1:** Clivagem da fita danificada a 5' e 3' da lesão por endonucleases

**Passo 2:** Remoção da fita danificada por ação de DNA helicases

**Passo 3:** Síntese de nova fita por DNA polimerases de reparo

**Passo 4:** Fechamento do ponto de quebra por uma DNA ligase

**Presente em  
procariotos e  
eucariotos**



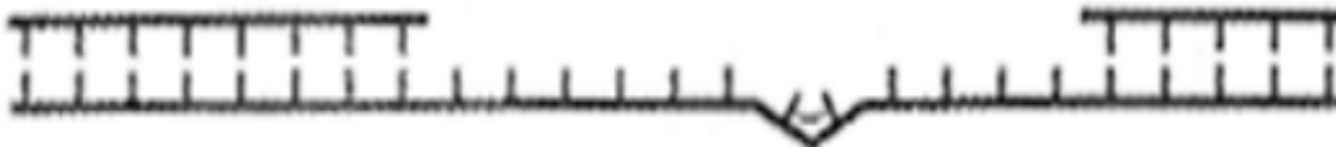
**Se as 2 fitas do DNA contiverem lesões não há um molde intacto para guiar o mecanismo de reparo**



**Quebra de dupla-fita de DNA**



**Ligação covalente entre fitas do DNA**



**Lesões de fita simples**

# Mecanismos de reparo quando ocorre lesão ou quebra de uma ou nas duas fitas do DNA

## ➤ **Reparo fiél (Plano A”)**

### Reparo por recombinação homóloga – (\*próxima aula)

Informação faltante é recuperada de outra cópia do cromossomo

## ➤ **Reparo sujeito a erro (“Plano B”)**

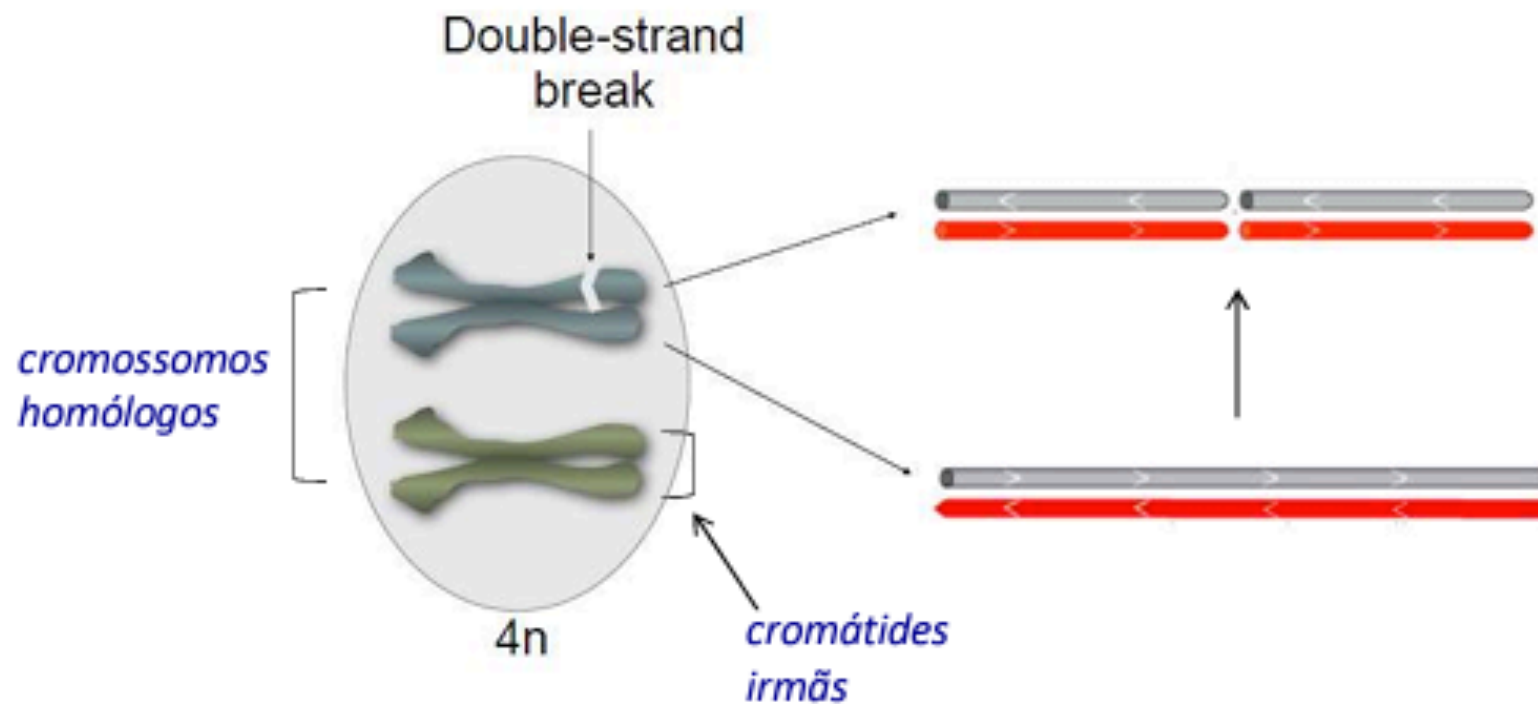
Mecanismos de reparo potencialmente mutagênicos

### Reparo não-homólogo por ligação de extremidades

### Resposta SOS

Ativada na ausência dos mecanismos de reparo por recombinação homóloga ou reparo sujeito a erro.

## Reparo de quebras duplas em geral obtém a informação da cromátide irmã

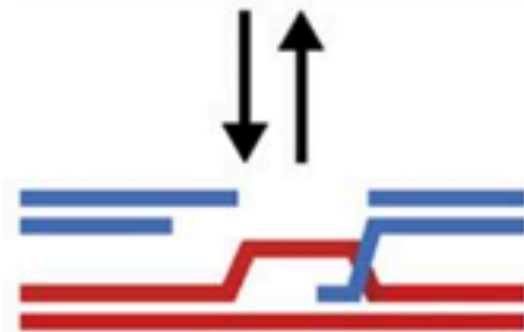


*Mas pode usar também o cromossomo homólogo, principalmente na meiose*

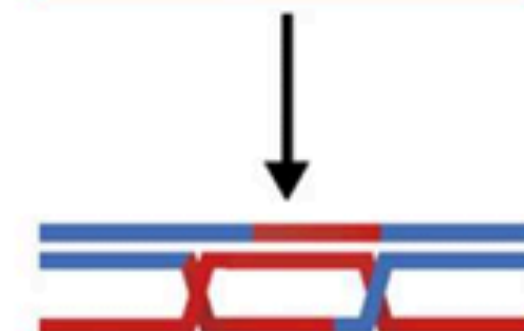
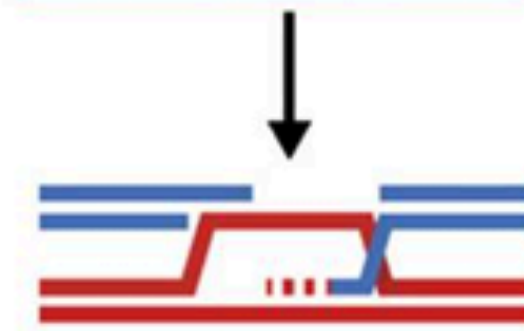
# Quebras duplas são reparadas por recombinação homóloga

5' 3' ← *Molécula de DNA com quebra dupla*  
3' 5'

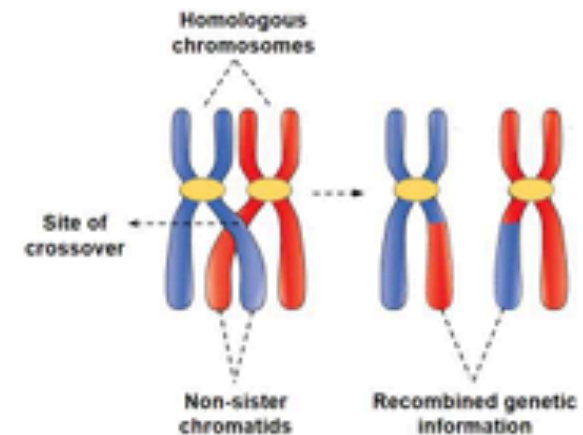
5' 3' ← *Molécula de DNA homóloga*  
3' 5'



*Usa informação de outra cópia da molécula de DNA. Fita da molécula quebrada invade a molécula íntegra para usá-la como molde*



Double Holliday junction



*"crossing over"*



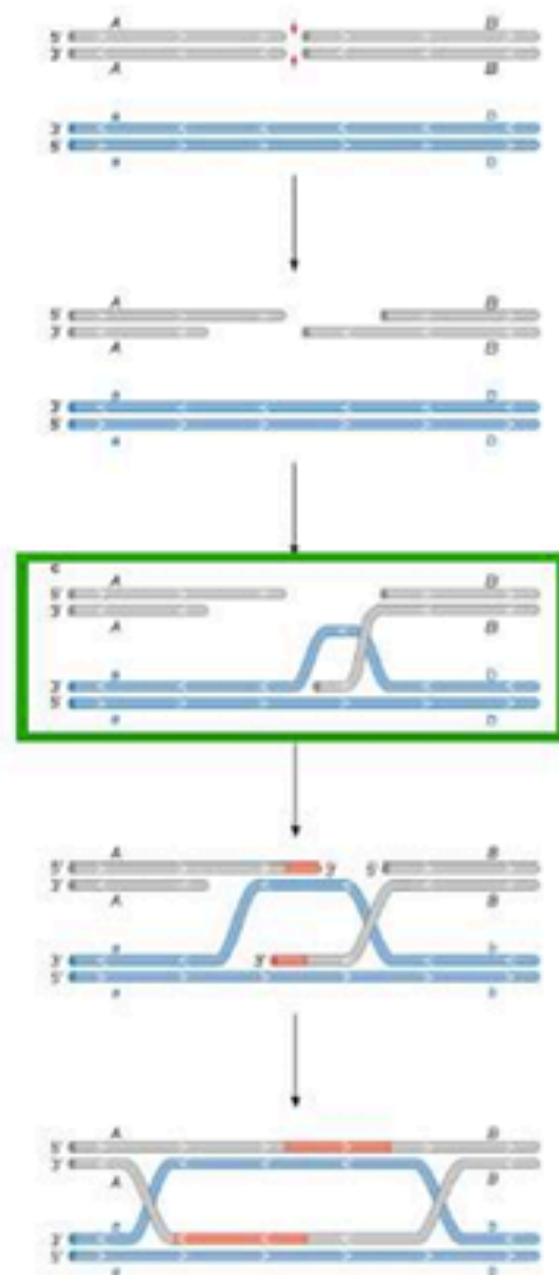


RecA é uma proteína fundamental no processo de recombinação homóloga



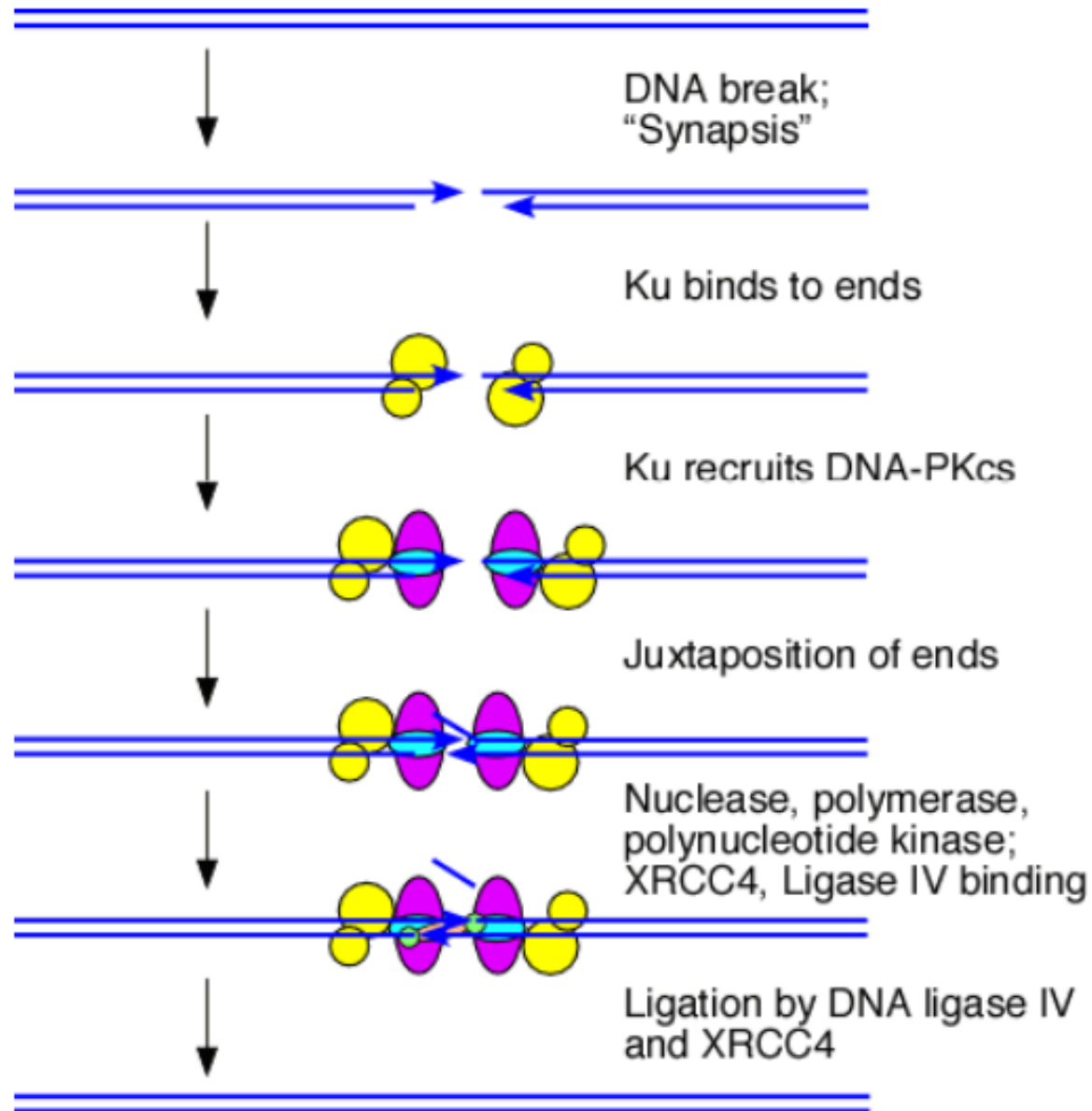
*Reconhece DNA fita-simples, se associa a ele e promove a invasão do outro duplex*

Rad51 em eucariotos



# Reparo não-homólogo sujeito a erro

Reparo potencialmente mutagênico



# Deficiências genéticas nos sistemas de reparo estão associadas ao surgimento de câncer

## Xeroderma pigmentosum

Doença genética que afeta o sistema de reparo por excisão. Causa predisposição ao câncer de pele induzido por luz solar e a anormalidades neurológicas

## Câncer Colo-retal hereditário sem polipose (HNPCC)

Síndrome genética associada a defeitos no sistema de reparo de bases pareadas incorretamente. Mutações nos genes humanos homologos a *MutL* e *MutS* (*hMLH1* e *hMSH2*, respectivamente) são as mais frequentemente encontradas em indivíduos com HNPCC