

# Aula de **Bioquímica II**

**Tema:**

**DNA:**

**Replicação, Reparo e Recombinação**

**Prof. Dr. Júlio César Borges**

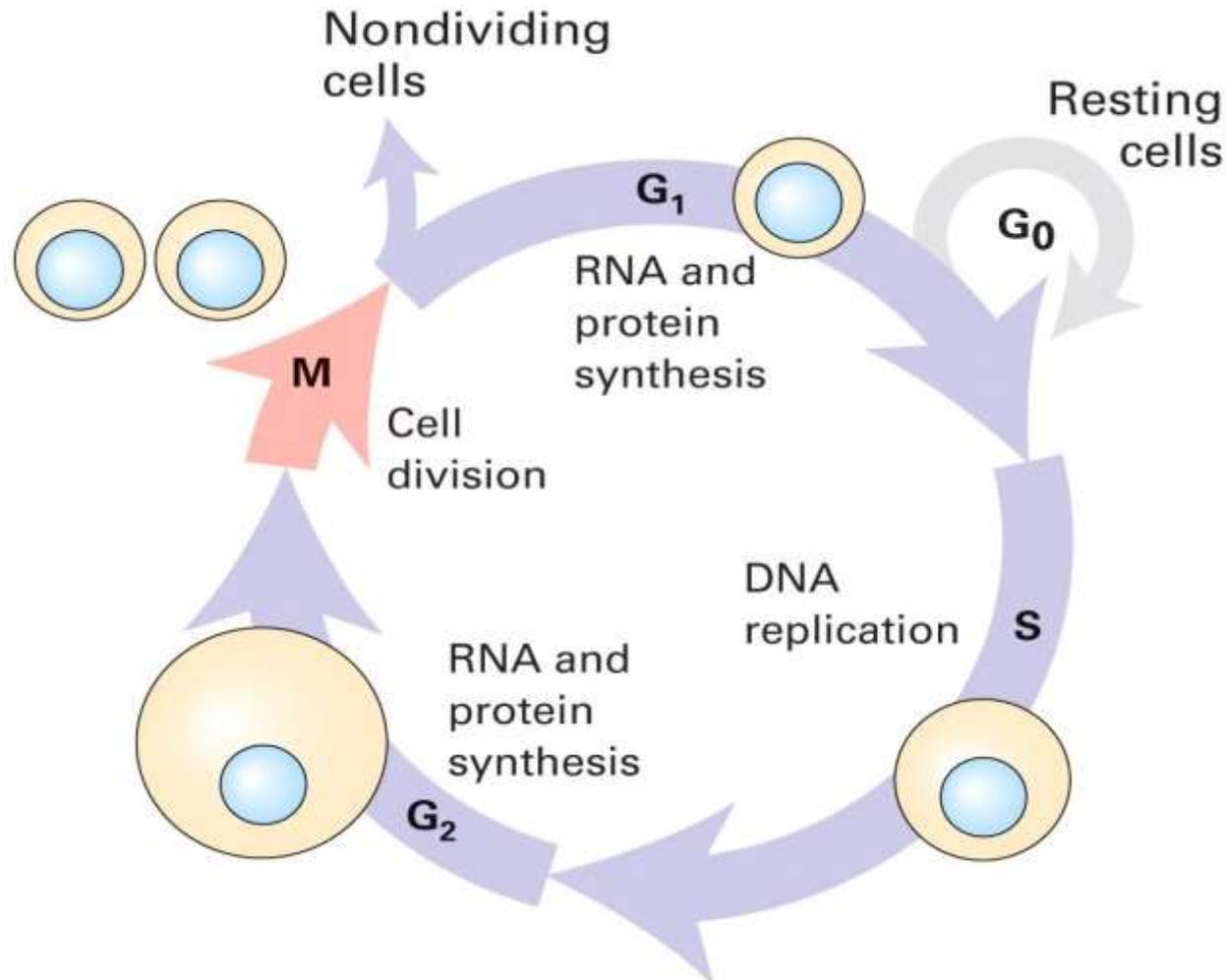
*Depto. de Química e Física Molecular – DQFM*

*Instituto de Química de São Carlos – IQSC*

*Universidade de São Paulo – USP*

*E-mail: [borgesjc@iqsc.usp.br](mailto:borgesjc@iqsc.usp.br)*

**A síntese de DNA celular ocorre numa fase específica do ciclo celular**

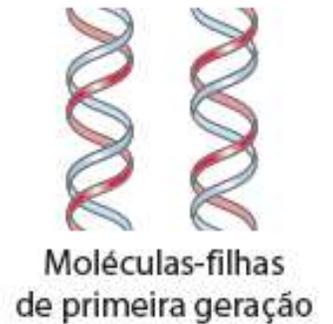
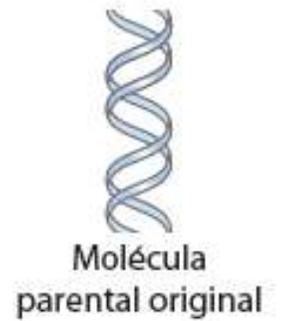
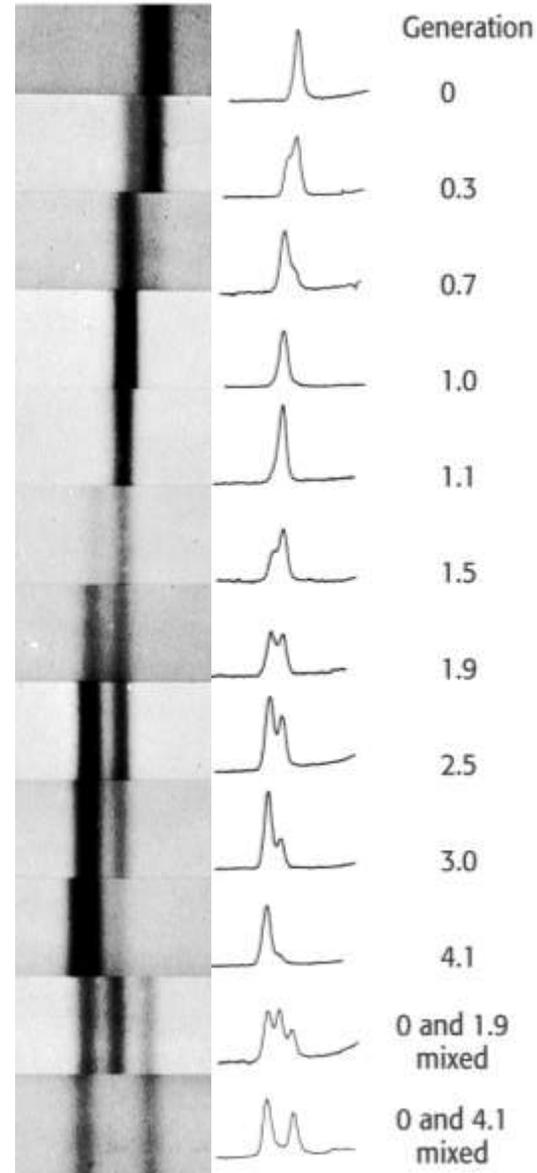
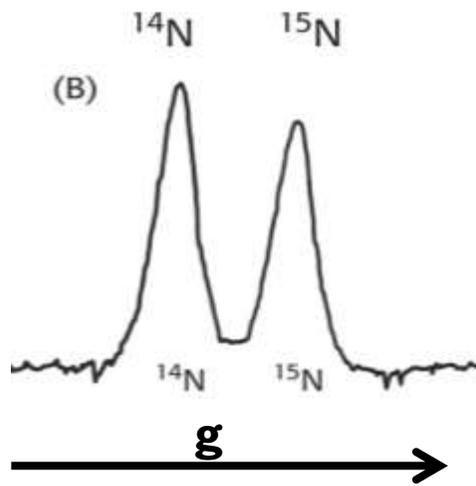
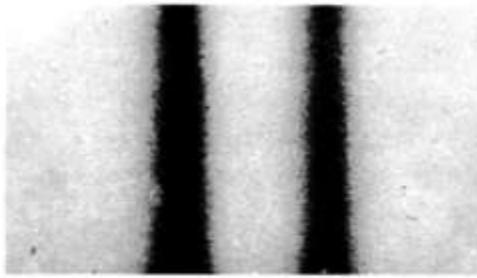
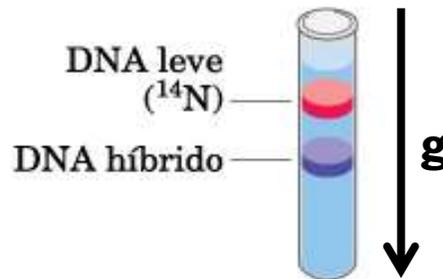
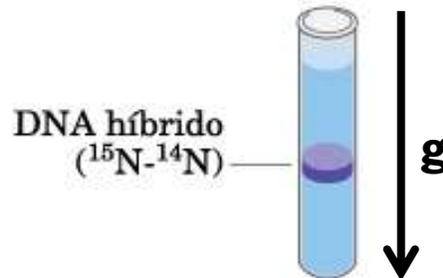
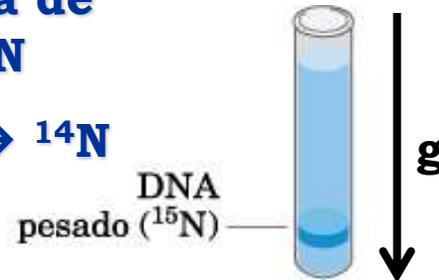


# Replicação do DNA

**Replicação do DNA é semi-conservativa: Meselson & Stahl (1958)**

**1º) Crescimento em meio mínimo na presença de Radioisótopos  $^{15}\text{N}$**

**2º) Após marcação  $\rightarrow$   $^{14}\text{N}$**



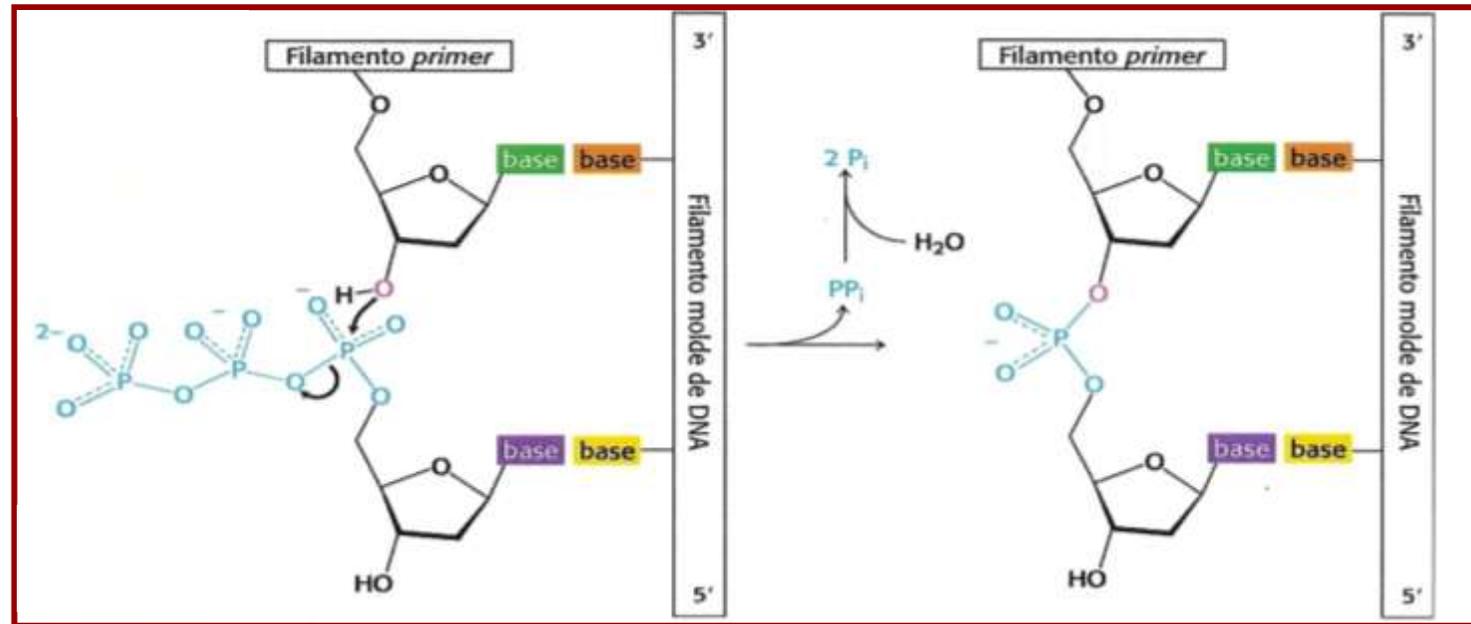
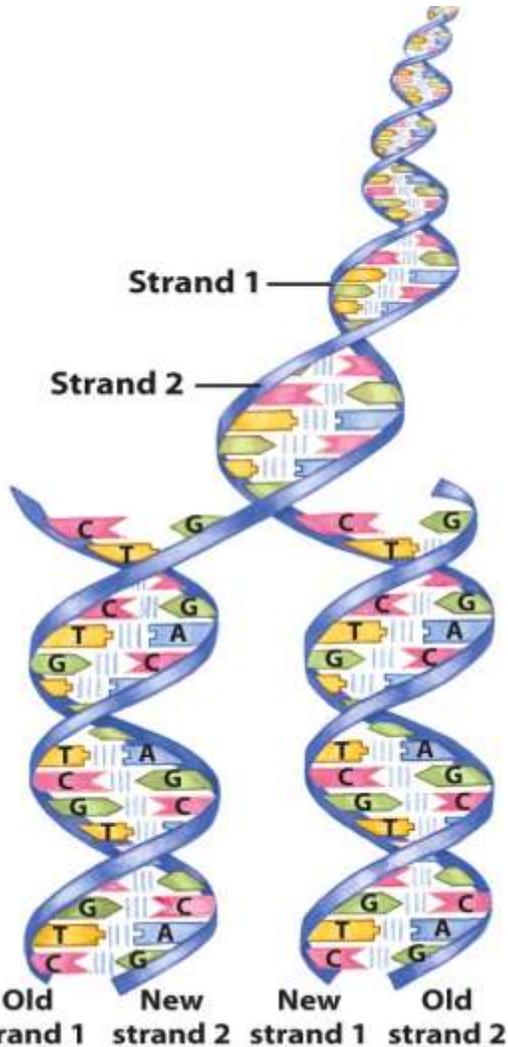
# Replicação do DNA

→ Síntese dirigida por complementaridade → DNA-polimerase DNA-dependente

- É dirigido pelo pareamento de bases complementares livres com a fita molde parental

→ Requer a separação das fitas parentais

→ Síntese ocorre no sentido 5' → 3'

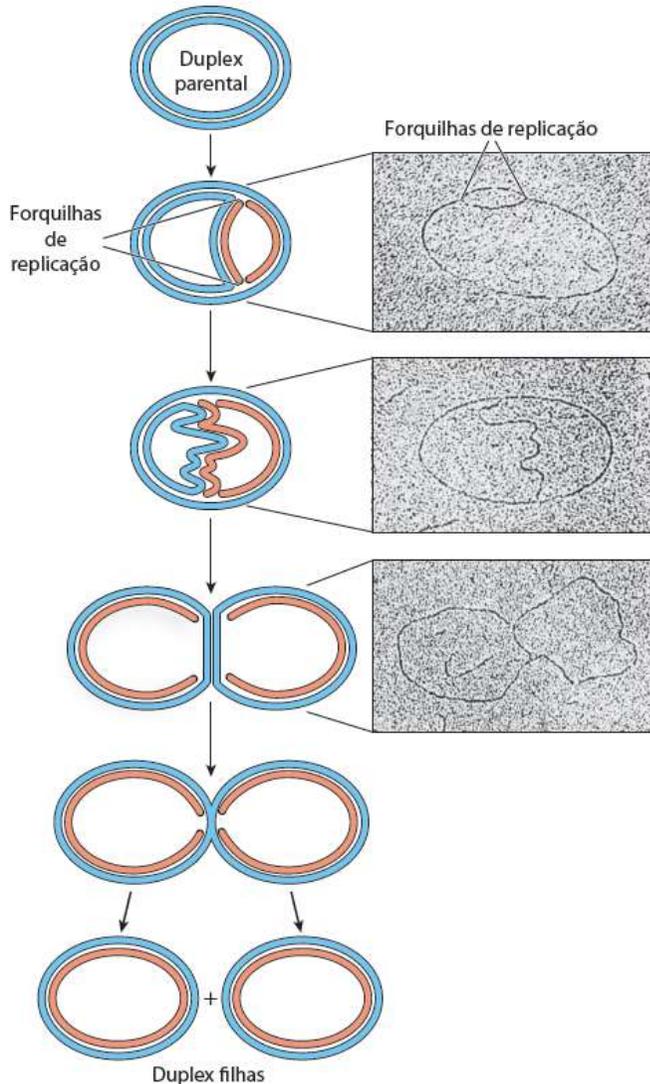


Coordenada da Reação

# Replicação do DNA

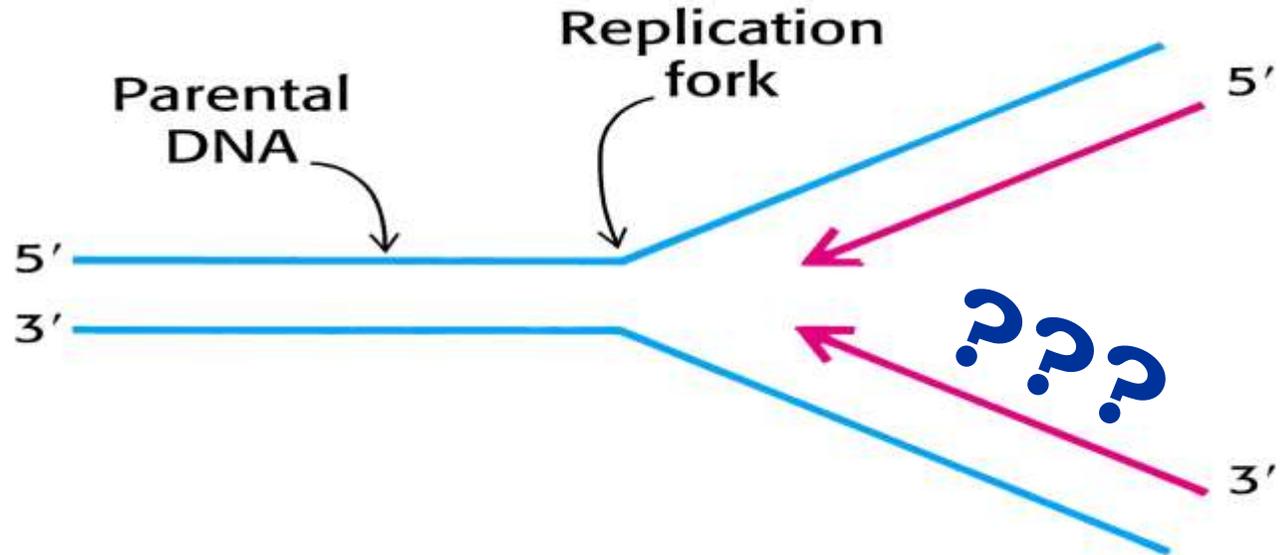
→ Síntese do DNA obedece direcionamento 5' → 3'

→ **Forquilha de replicação** → abertura da fita-dupla parental para a síntese das fitas “filhas”



- Síntese a partir do molde 3' ← 5' envolve o empecilho da forquilha devido à natureza antiparalela do DNA

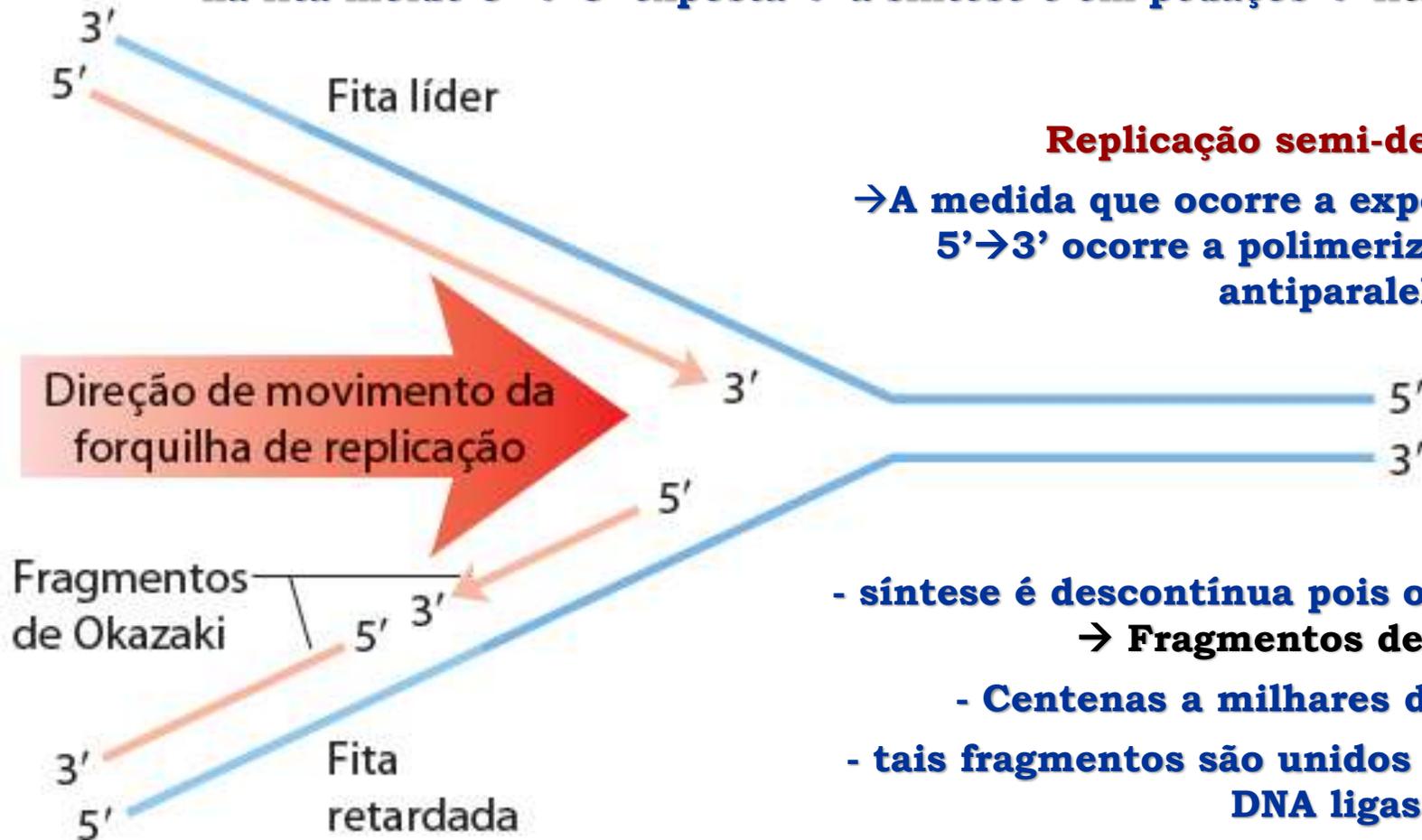
→ Sentido do crescimento 5' → 3' da fita filha



→ Não catalisa o crescimento em cabeça → no sentido 3' → 5' → nucleotídeo adicionado não está ativado

## Replicação do DNA

- Estrutura em **Y** contendo dois aparatos multi-enzimáticos com a DNAPol
- Natureza antiparalela do DNA fita dupla impõe empecilhos
  - uma das fitas deve ser sintetizada no sentido 3' → 5'
- na fita molde 3' → 5' exposta → a síntese é contínua → fita líder ou contínua
- na fita molde 5' → 3' exposta → a síntese é em pedaços → fita descontínua



### Replicação semi-descontínua

→ A medida que ocorre a exposição da fita molde 5' → 3' ocorre a polimerização na direção antiparalela

- síntese é descontínua pois ocorre em fragmentos → Fragmentos de Okasaki
- Centenas a milhares de nucleotídeos
- tais fragmentos são unidos posteriormente pela DNA ligase

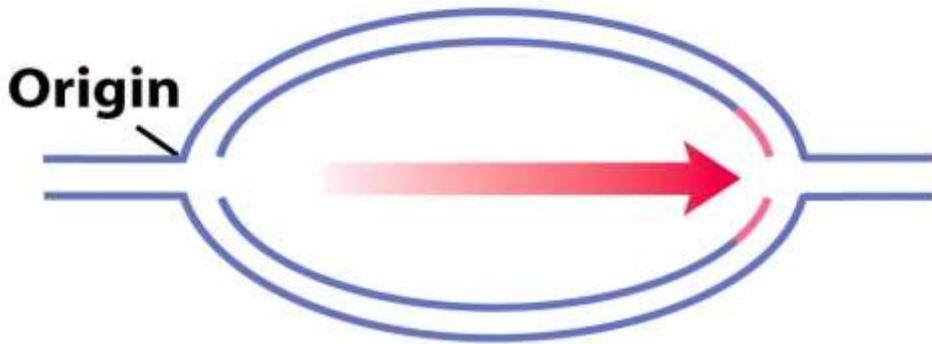
# Replicação do DNA

→ Bolha de replicação

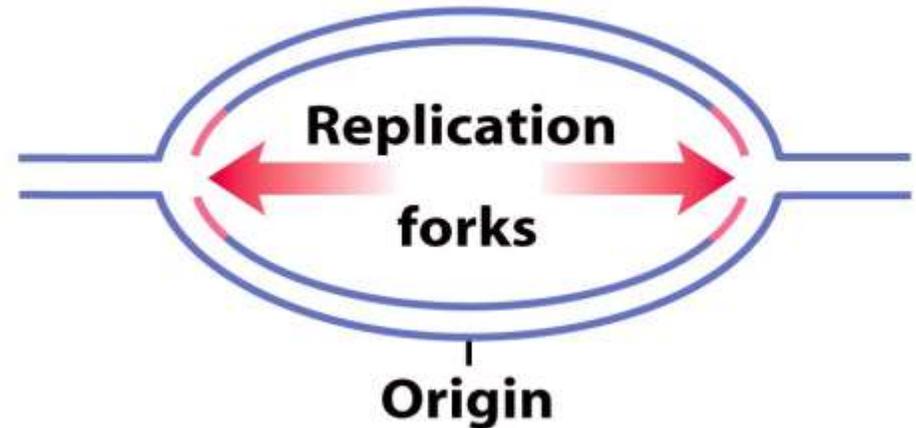
→ Origem de replicação;

→ Direção da replicação (uni ou bi)

## Unidirectional

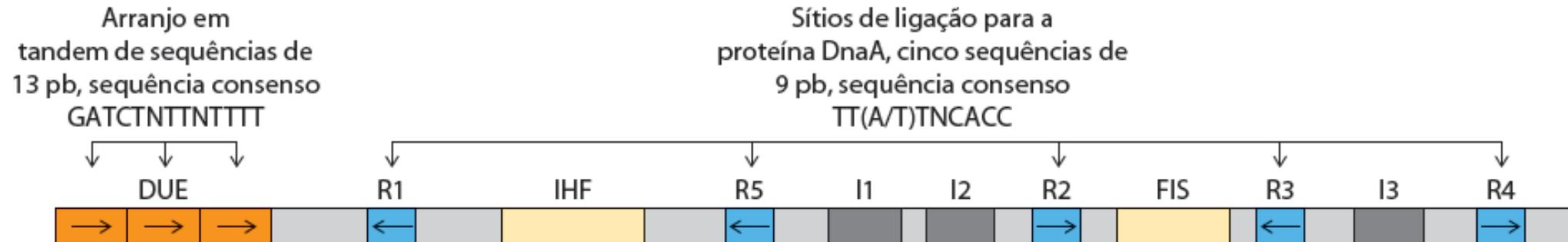


## Bidirectional



→ Replicação começa em um sítio *oriC* desenrolado

→ **DUE: elemento de desenrolamento do DNA**



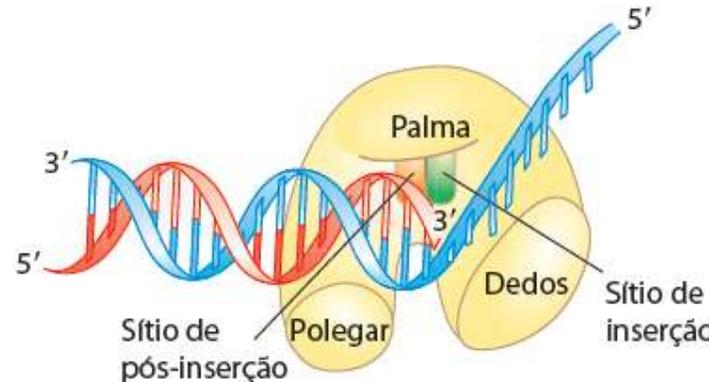
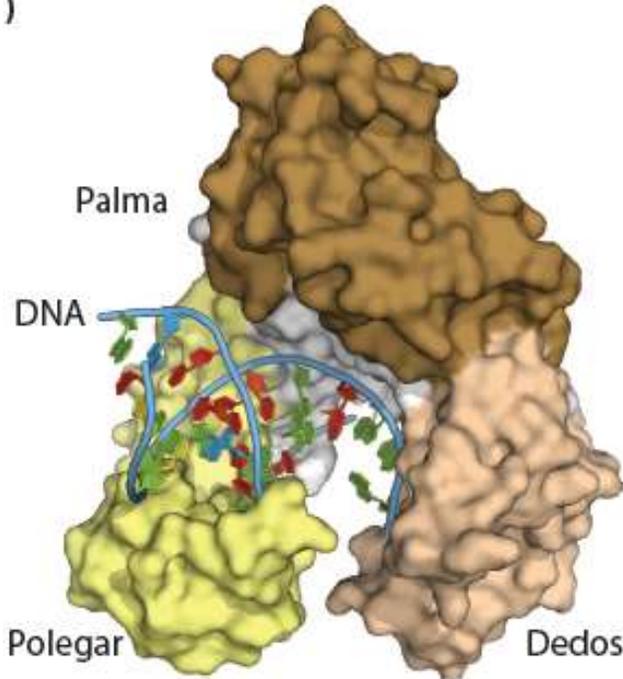


# DNA-Polimerases

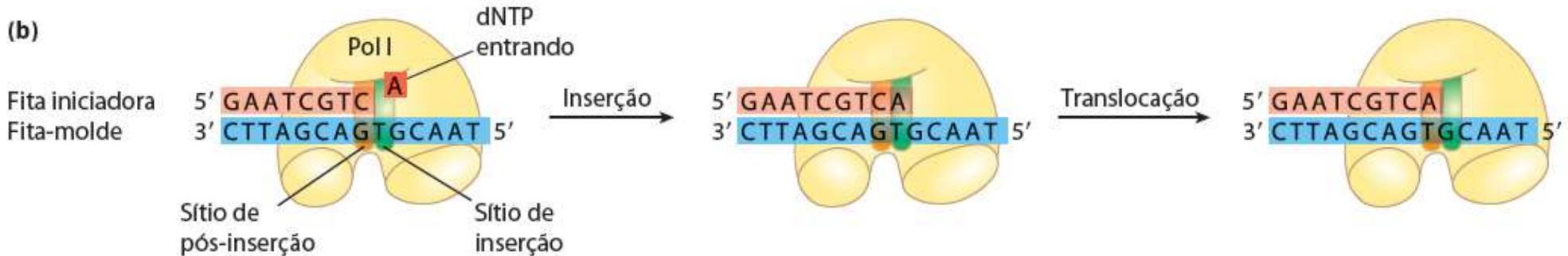
## → Estrutura de DNA-Pol I

**DNA polimerase I (*E. coli*): 928 resíduos  
-1957, Arthur Kornberg**

**-DNA liga na 'palma' e mudanças conformacionais fazem com que o 'dedão' se feche sobre ele**



**A fita de DNA molde se mostra como fita simples**  
**Processo cíclico de:**  
**1) inserção e**  
**2) Translocação**  
**→ Tem alta processividade**



**Após inserção, a DNAPol pode "dissociar-se" ou "translocar"**

**A dissociação e reassociação limita a velocidade do processo → não processivo**

# DNA-Polimerases

## Altíssima Fidelidade

→ A fidelidade da replicação → 1 erro a cada  $1 \times 10^9 - 10^{10}$  de nucleotídeos incorporadas

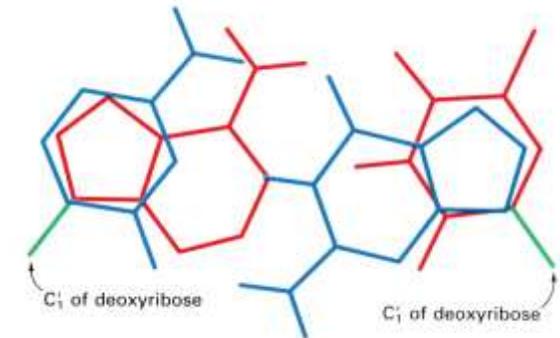
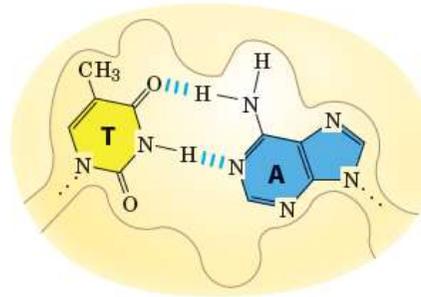
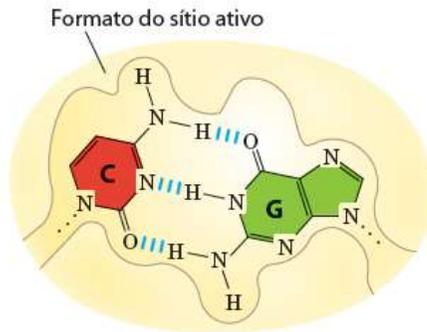
- Em *E. coli* com genoma de  $4,6 \times 10^6$  pb → 1 erro a cada 1.000-10.000 replicações

- Em humanos, menor de 1 erro por replicação

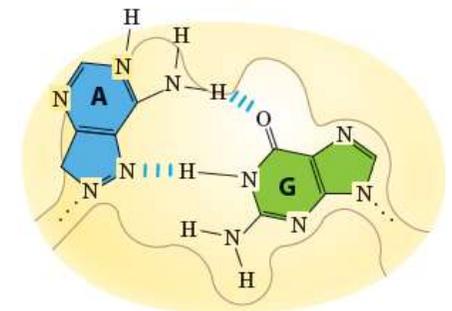
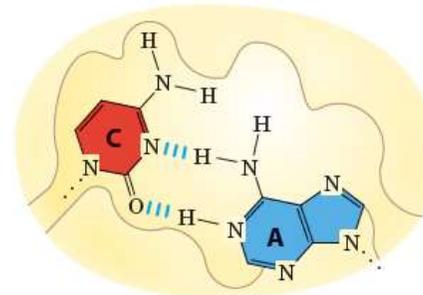
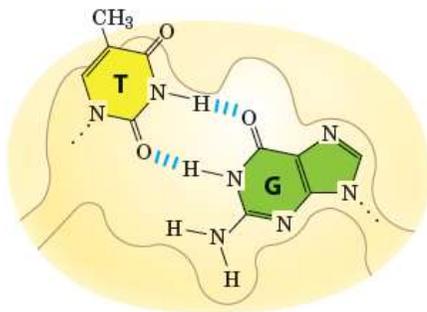
→ Processo de seleção de bases

- As ligações de H e geometria entre as bases complementares contribuem para a fidelidade

**Pareamentos corretos → geometria correta**



**Pareamentos incorretos → geometria incorreta**



→ Entretanto, a taxa de erro MENOR do que esperado pela precisão do pareamento

## DNA-Polimerases

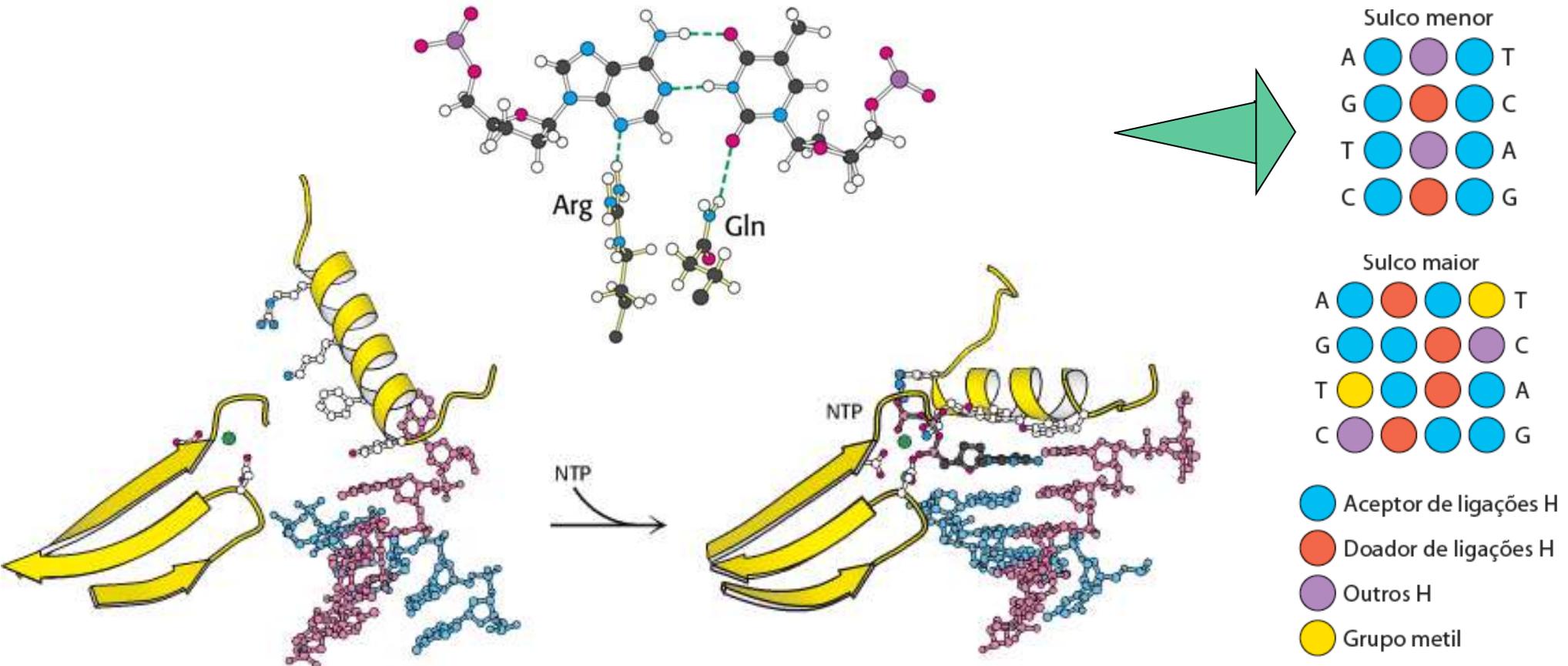
1) O pareamento correto é checado pela DNAPol

- apenas o nucleotídeo correto se liga com alta afinidade ao complexo

DNA-molde-DNAPol

2) A DNAPol I verifica a geometria do sulco menor do pareamento antes de catalisar a reação

- Complexo ativado se monta após averiguação da geometria do pareamento correto



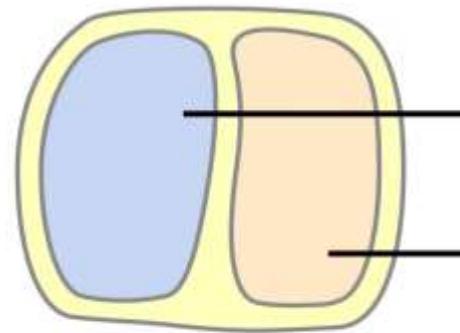
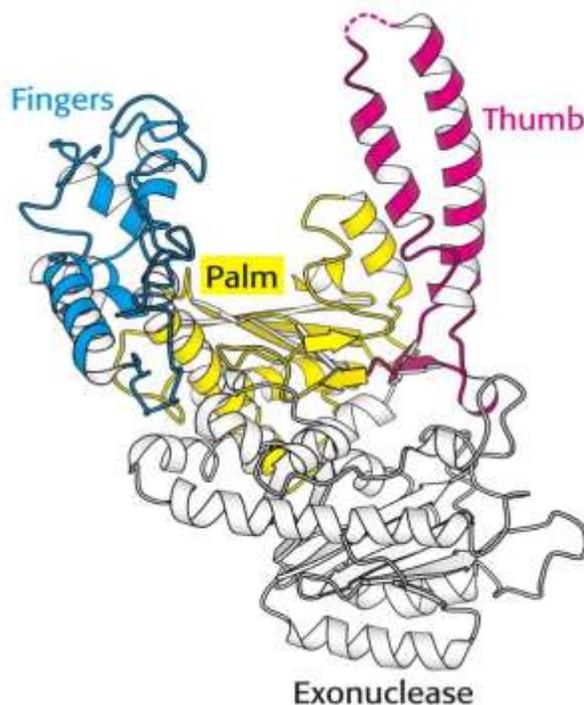
## DNA-Polimerases

- *In vitro*, DNAPol tem taxa de erro de 1 a cada  $\sim 1 \times 10^4$  inserções
- Tautomerização das bases nitrogenadas aumentam taxa de erros
- mecanismos de correção de nucleotídeos mal pareados

→ Mecanismo de autocorreção/revisão

→ Tem atividade 3'→5' exonuclease → tem atividade 5'→3' exonuclease → remove primers dos fragmentos de Okasaki

→ Aumenta a exatidão para 1 erro a cada  $\sim 10^7$  inserções



DNA polymerase I  
DNA polymerase active site  
3'→5' (proofreading) exonuclease active site

→ Existem mecanismos adicionais (Reparos de danos ao DNA → *Mismatch repair*) para assegurar fidelidade da replicação → 1 erro a cada  $1 \times 10^9 - 10^{10}$  de nucleotídeos incorporadas

## DNA-Polimerases

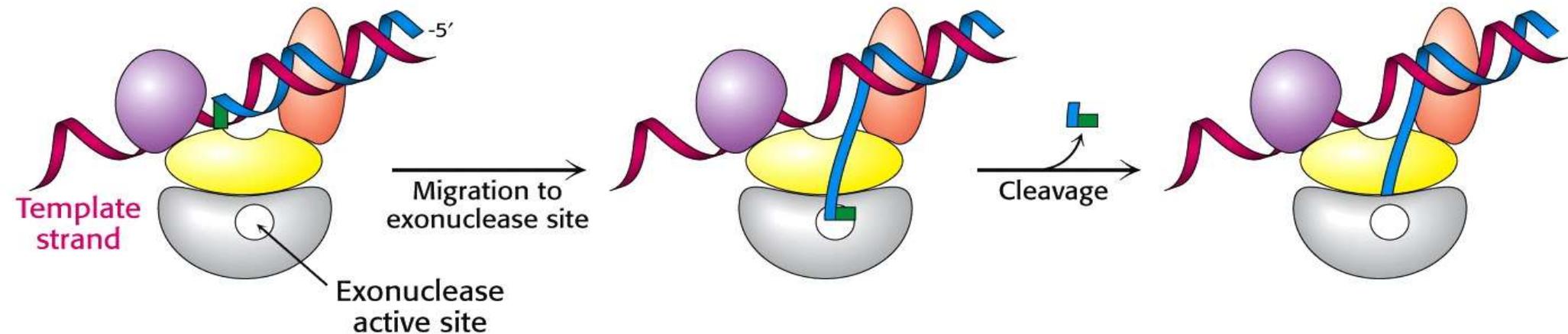
→ Correção exonucleotídica 3'→5'

- Se o nucleotídeo incorreto é adicionado ele pode ser retirado pela ação 3'→5' exonuclease da DNAPol

→ DNAPol é dependente de um primer

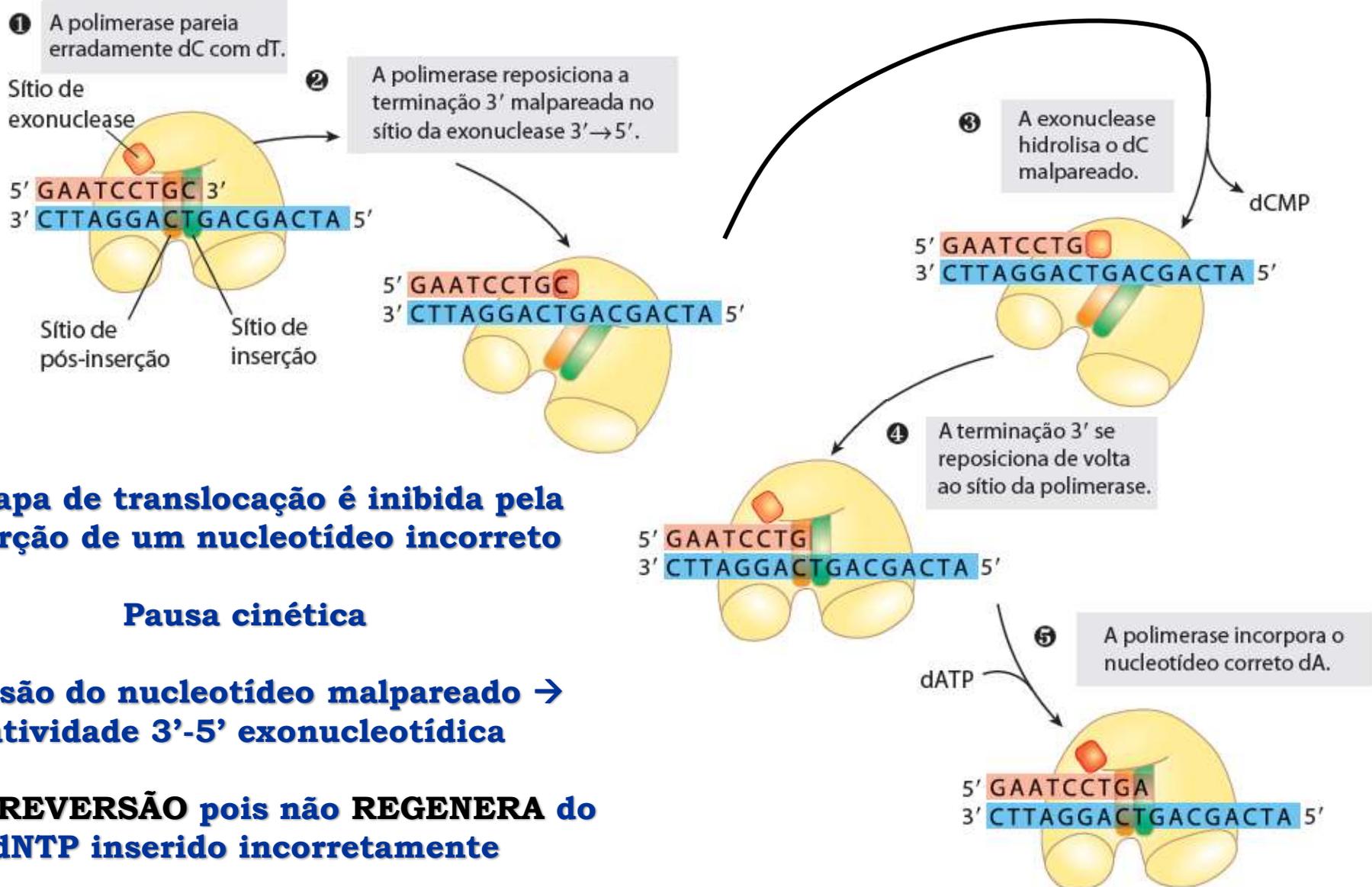
- nucleotídeos mal pareados não fornecem uma boa OH 3' para o ataque nucleofílico da reação

→ DNAPol executa uma ação de “autocorreção” ou “revisão”



# DNA-Polimerases

## → Correção exonucleotídica 3'→5'



**A etapa de translocação é inibida pela inserção de um nucleotídeo incorreto**

**Pausa cinética**

**Excisão do nucleotídeo malpareado → atividade 3'-5' exonucleotídica**

**Não é REVERSÃO pois não REGENERA do dNTP inserido incorretamente**

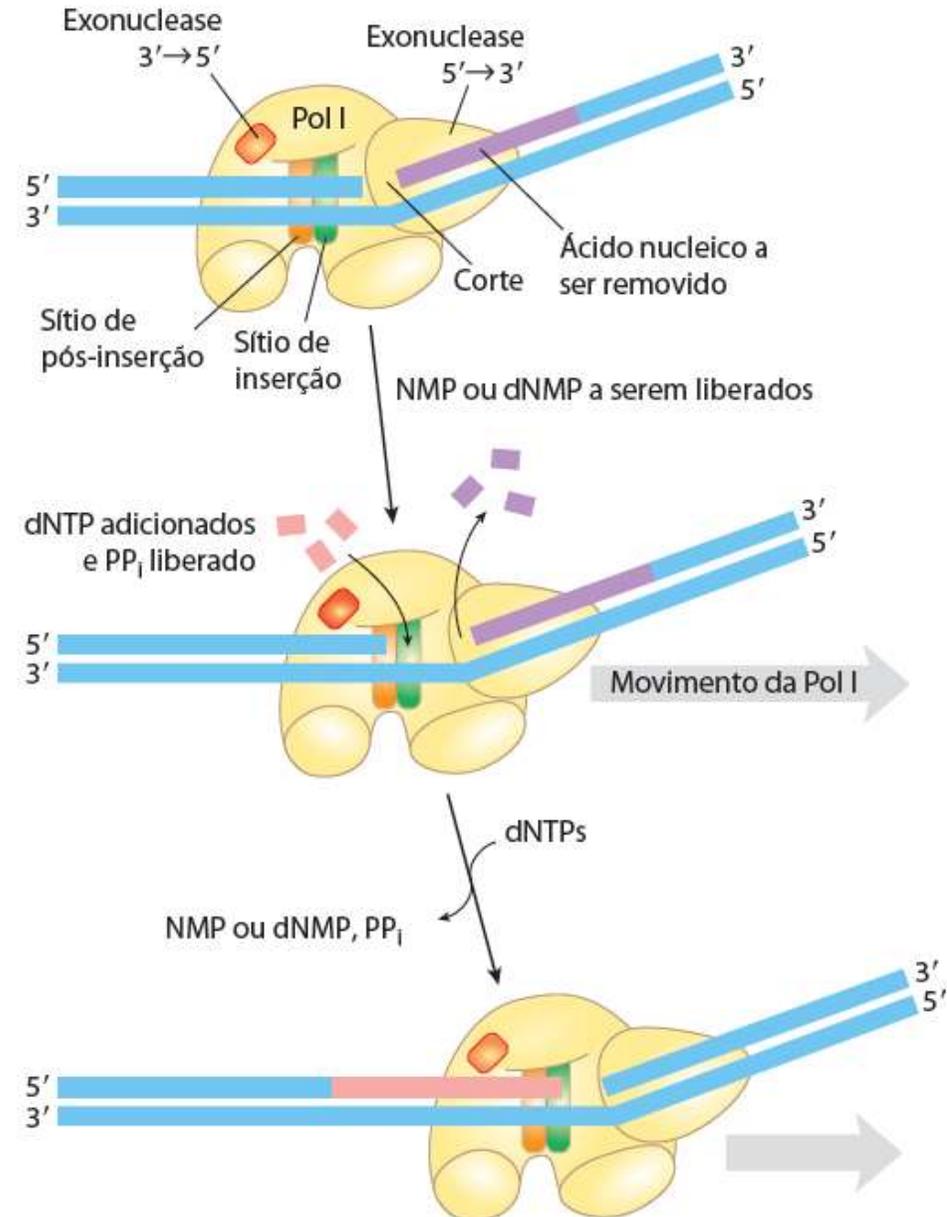
## DNA-Polimerases

### → Correção exonucleotídica da DNApol I

#### Função 5'→3' exonucleotídica:

→ Retira os *primers* de RNA nos fragmentos de Okazaki e substitui por DNA

→ Atua onde 3'→5' falha, reconhece um nucleotídeo não-pareado e cliva além (até 10 resíduos), simultaneamente completando a polimerização → sistemas de reparo



## Enzimas e Proteínas da Replicação

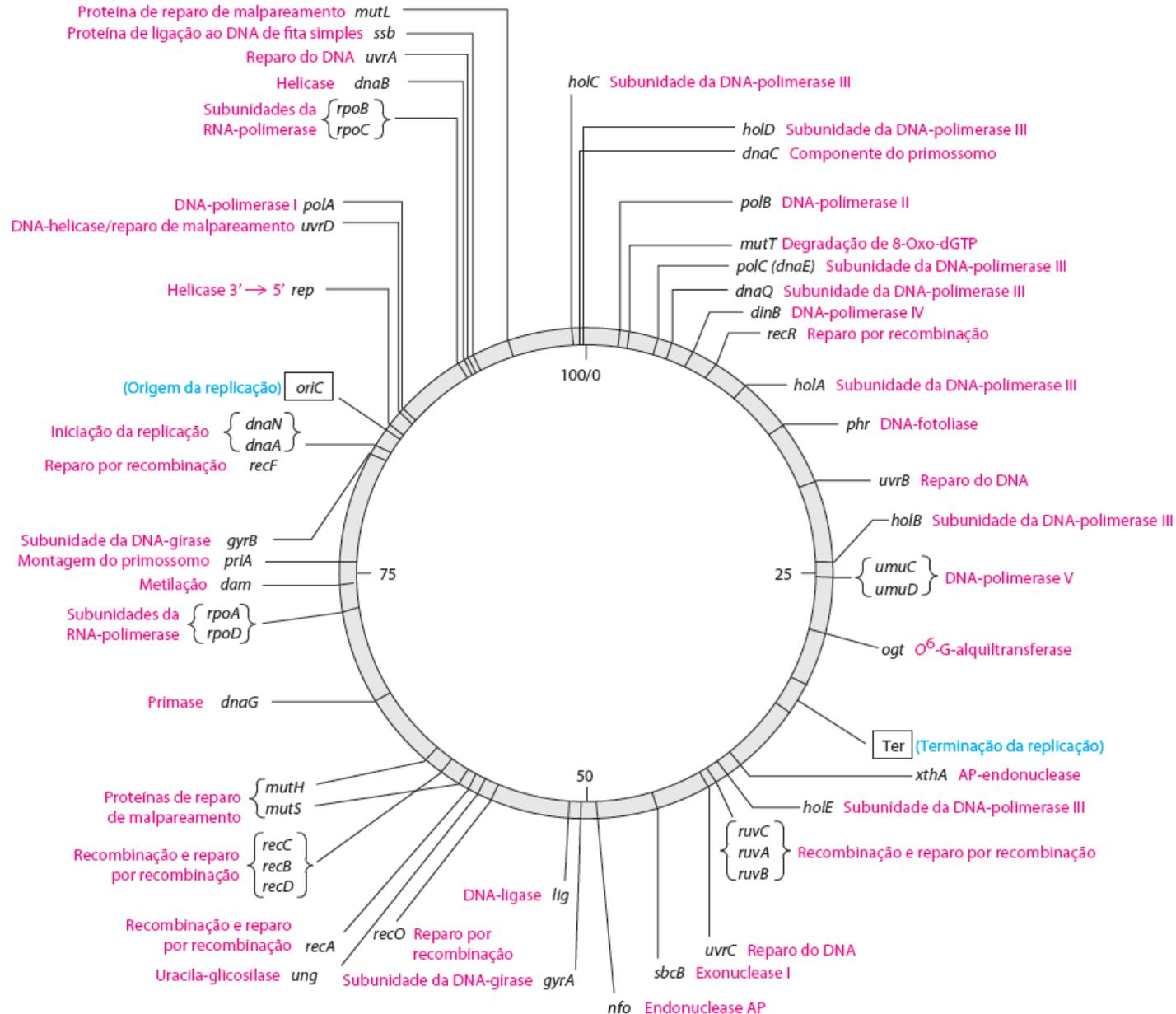
- 1) **Helicases** → separação das cadeias
- 2) **Proteínas que previnem o re-anelamento antes da replicação** → SSB
- 3) **DNA topoisomerase (DNA-girase)**
- 4) **RNA-polimerase DNA-dependente** → Primase
- 5) **DNA-polimerases DNA-dependentes**
- 6) **Enzima removedora dos primers de RNA**
- 7) **DNA ligase**

### Proteínas necessárias para a iniciação da replicação em *E. coli*

Proteína	$M_r$	Número de subunidades	Função
Proteína DnaA	52.000	1	Reconhece a sequência ori; abre o duplex em sítios específicos na origem
Proteína DnaB (helicase)	300.000	6*	Desenrola o DNA
Proteína DnaC	174.000	6*	Necessária para a ligação da DnaB na origem
HU	19.000	2	Proteína semelhante à histona; proteína de ligação do DNA; estimula a iniciação
FIS	22.500	2*	Proteína de ligação do DNA; estimula a iniciação
IHF	22.000	2	Proteína de ligação do DNA; estimula a iniciação
Primase (proteína DnaG)	60.000	1	Sintetiza iniciadores de RNA
Proteína de ligação ao DNA de fita simples (SSB)	75.600	4*	Liga-se ao DNA de fita simples
DNA girase (DNA-topoisomerase II)	400.000	4	Alivia a tensão de torção gerada pelo desenrolamento do DNA
Dam metilase	32.000	1	Metila as sequências (5')GATC em <i>oriC</i>

\*As subunidades nesses casos são idênticas.

# É mais complicado do que parece!!!!



## DnaA

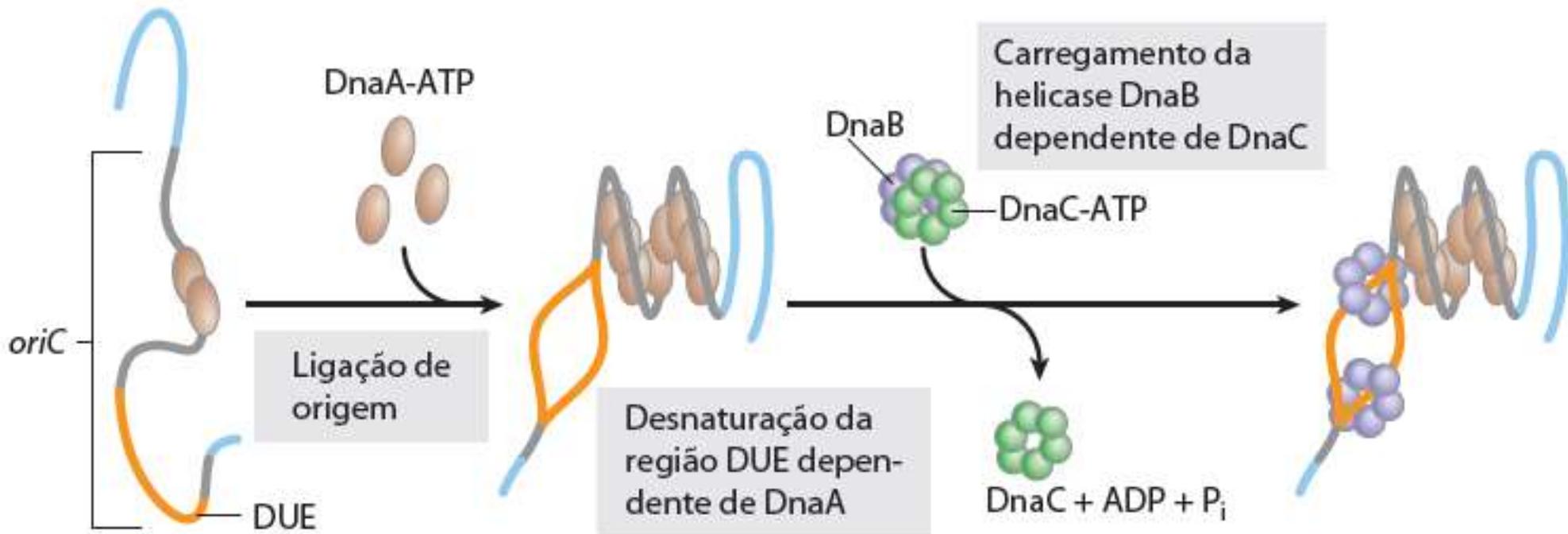
### Interage com o sítio *OriC*

→ Ligação de proteínas DnaA desenrolam o DNA no DUE

- As DnaA formam uma espiral ligando o DNA e a tensão criada no DUE leva-o a desanelar

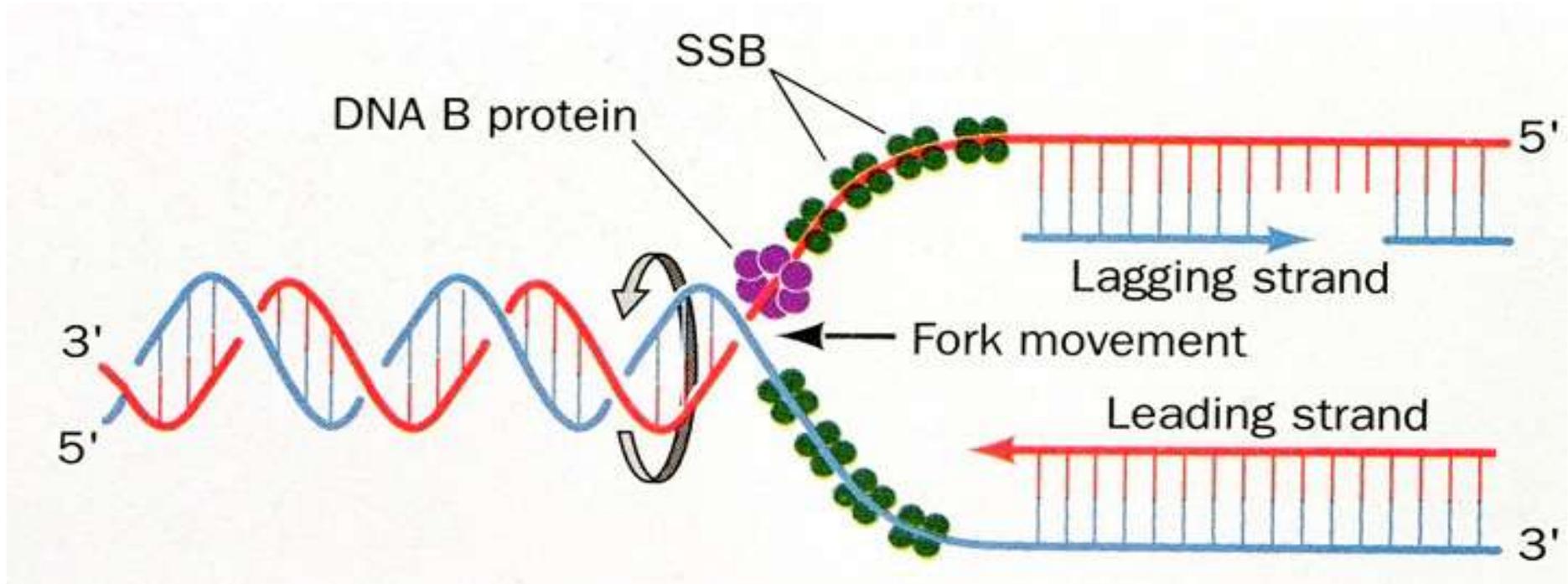
→ Recruta a DnaB para o DUE

→ 1 DnaB para cada fita de DNA → fita descontínua → 5'-3' no sentido da forquilha



## DNA-Helicase - DnaB

- **Hexâmero que forma um anel entorno da fita de DNA simples**
  - **Catalisam a separação da dupla hélice à frente da forquilha de replicação**
  - **Disponibiliza as fitas parentais em fitas simples para a síntese da fita filha**
  - **A DNA helicase age sobre a fita 5'→3' envolvida na replicação descontínua**
  - **A helicase fornece um suporte adicional para a DNAPol**
- **Proteínas SSB (single stranded binding proteins) previnem re-anelamento**

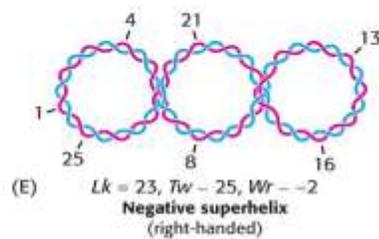
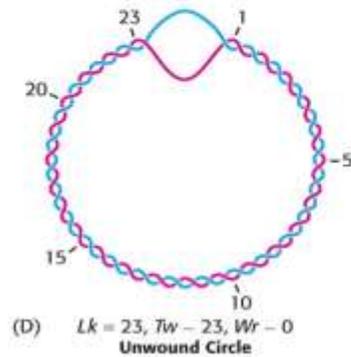
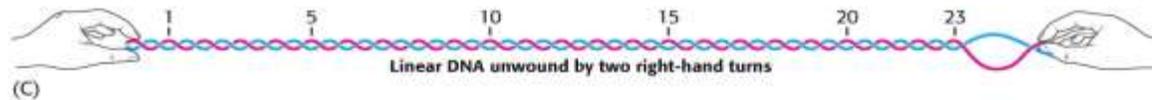
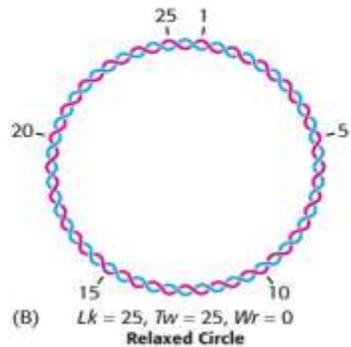


# DNA-topoisomerase – Dna girase

Linearização do DNA é um obstáculo topológico

Estresse topológico criado pelo avanço da Helicase

→ A replicação do DNA criam o problema do “enrolamento” do eixo da dupla hélice pelo avanço do Primossomo



→ A topoisomerase é um nuclease reversível que “tira” o enrolamento adicional da dupla-hélice

## DNA-topoisomerase – Dna girase

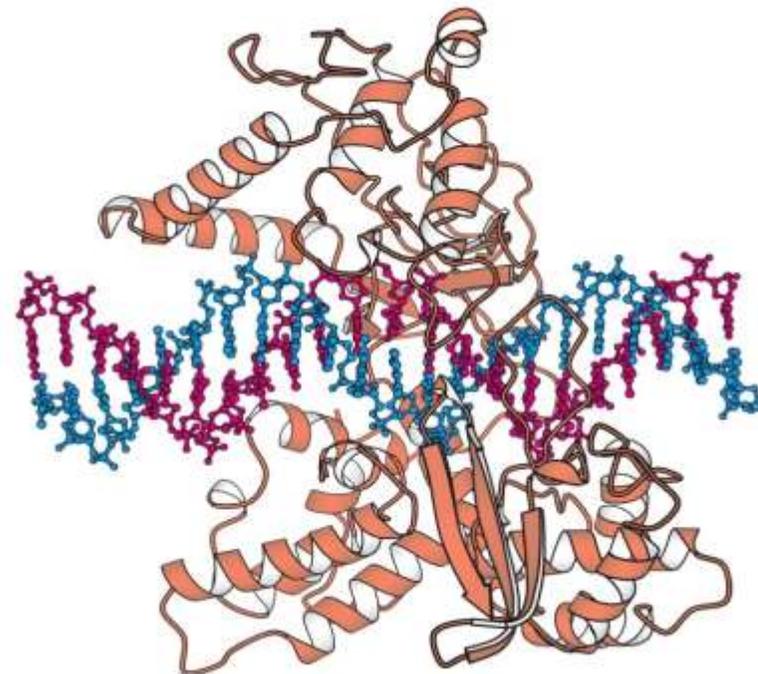
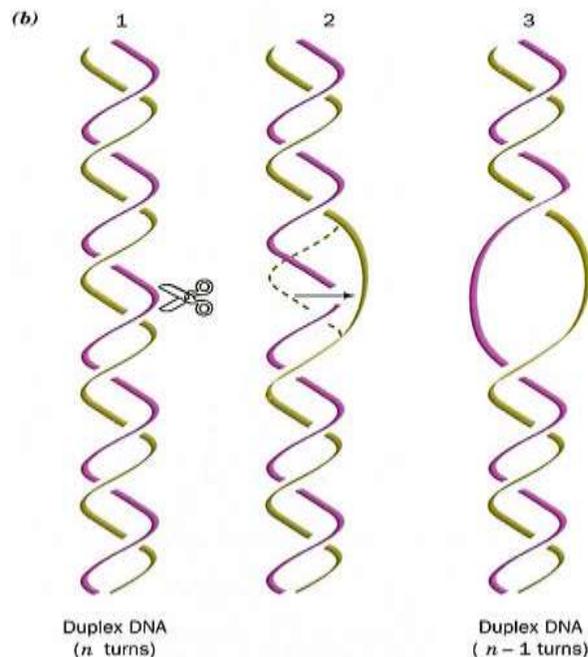
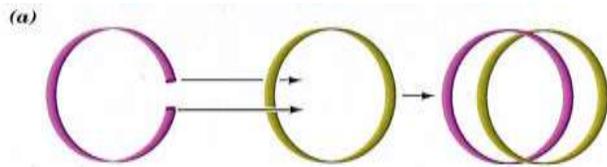
→ A topoisomerase é um nuclease reversível que relaxa estruturas de DNA superespiraladas

1) ele insere um Tyr na ligação fosfodiéster, clivando uma das fitas → que permanece ligada à enzima

2) permite que uma fita gire livremente entorno da outra → a fita não clivada serve de suporte

3) Regenera a ligação fosfodiéster

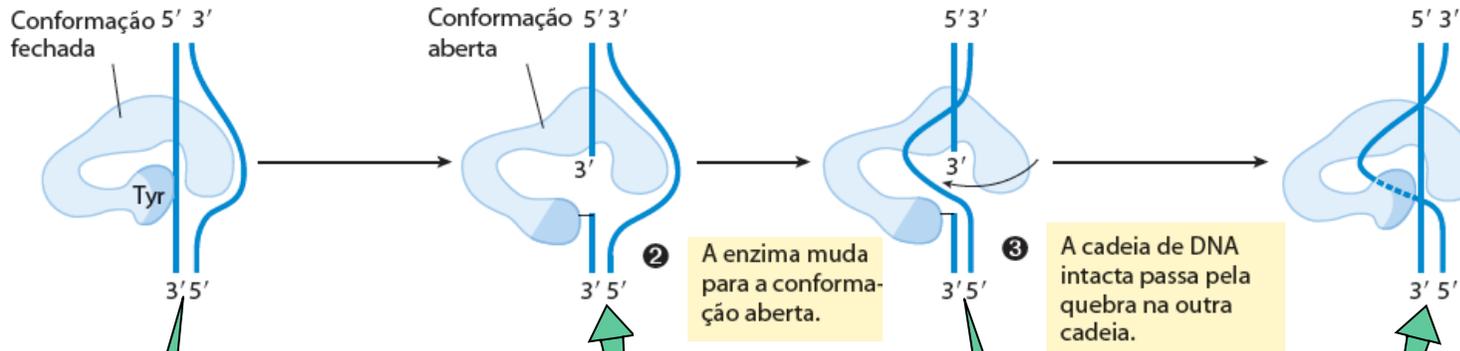
- A tensão da dupla-hélice dita o giro



# DNA-topoisomerase – Dna girase

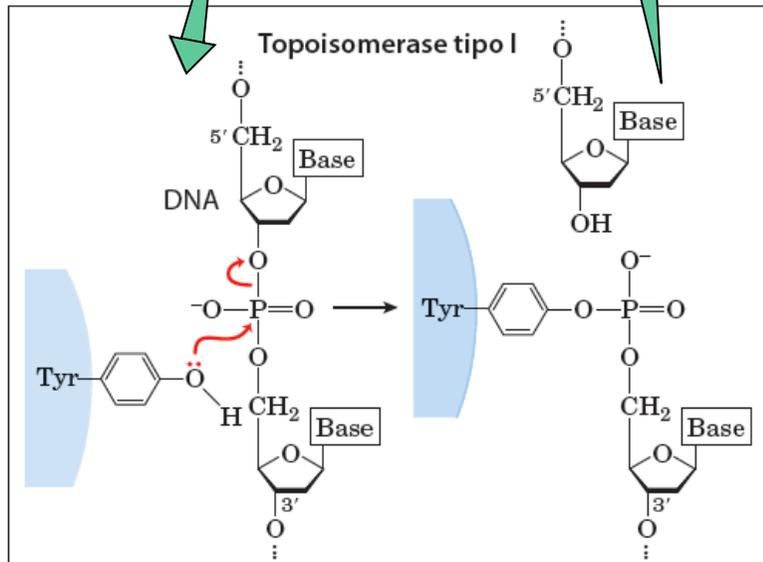
→ As Topoisomerases I não necessitam de incremento de energia  
- ligam-se a apenas uma das fitas

→ Ataque nucleofílico de uma Tyr ao átomo de P de uma fosfodeoxiribose

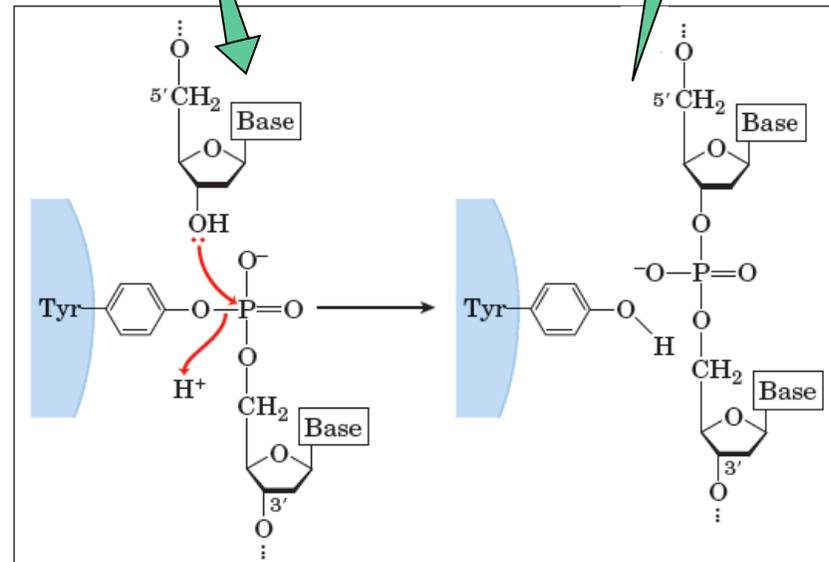


2 A enzima muda para a conformação aberta.

3 A cadeia de DNA intacta passa pela quebra na outra cadeia.



1 A Tyr do sítio ativo ataca a ligação fosfodiéster de uma das cadeias de DNA, clivando-a e criando uma ligação covalente 5'-fosfotirosil proteína-DNA.



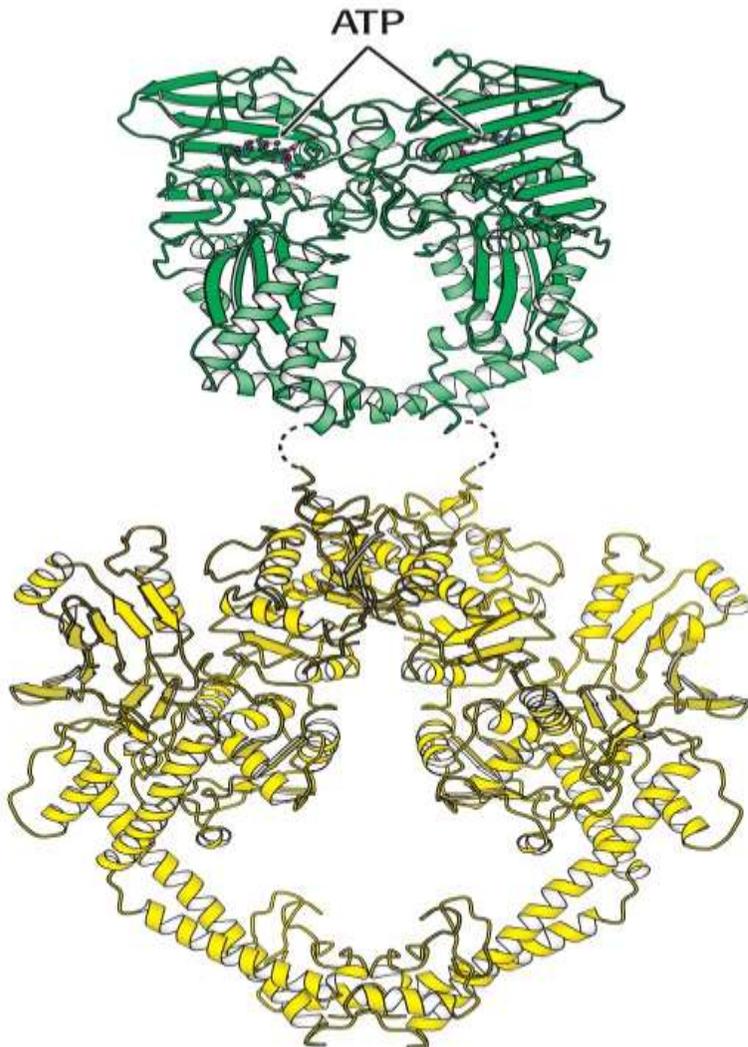
4 Enzima na conformação fechada; o 3'-OH liberado ataca a ligação 5'-fosfotirosil proteína-DNA, ligando novamente a cadeia de DNA que havia sido quebrada.

## DNA-topoisomerase II – Dna girase

→ As Topoisomerases II gastam ATP e se ligam a ambas as fitas da hélice

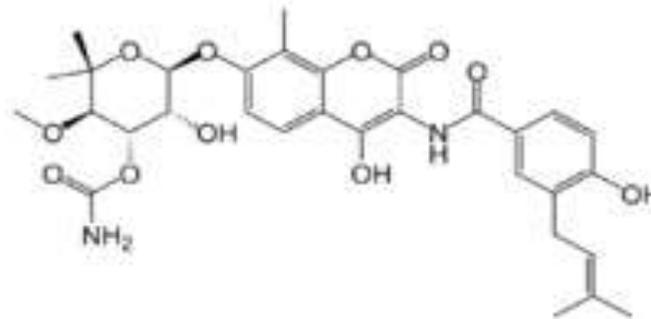
→ quebra temporária na hélice

- evitam a formação de laços ou nós nas longas fitas de DNA cromossomal



Topoisomerase II bacteriana é alvo de antibióticos que inibem a enzima procariótica muito mais do que a enzima eucariótica

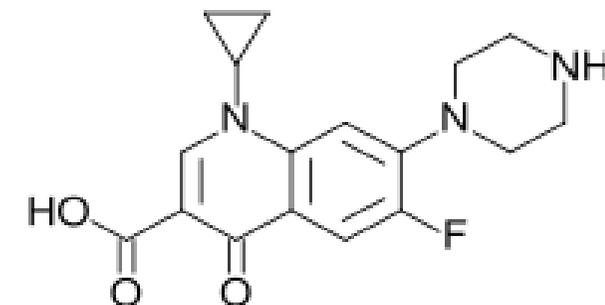
**Novobiocina**



**Ácido Nalidíxico**

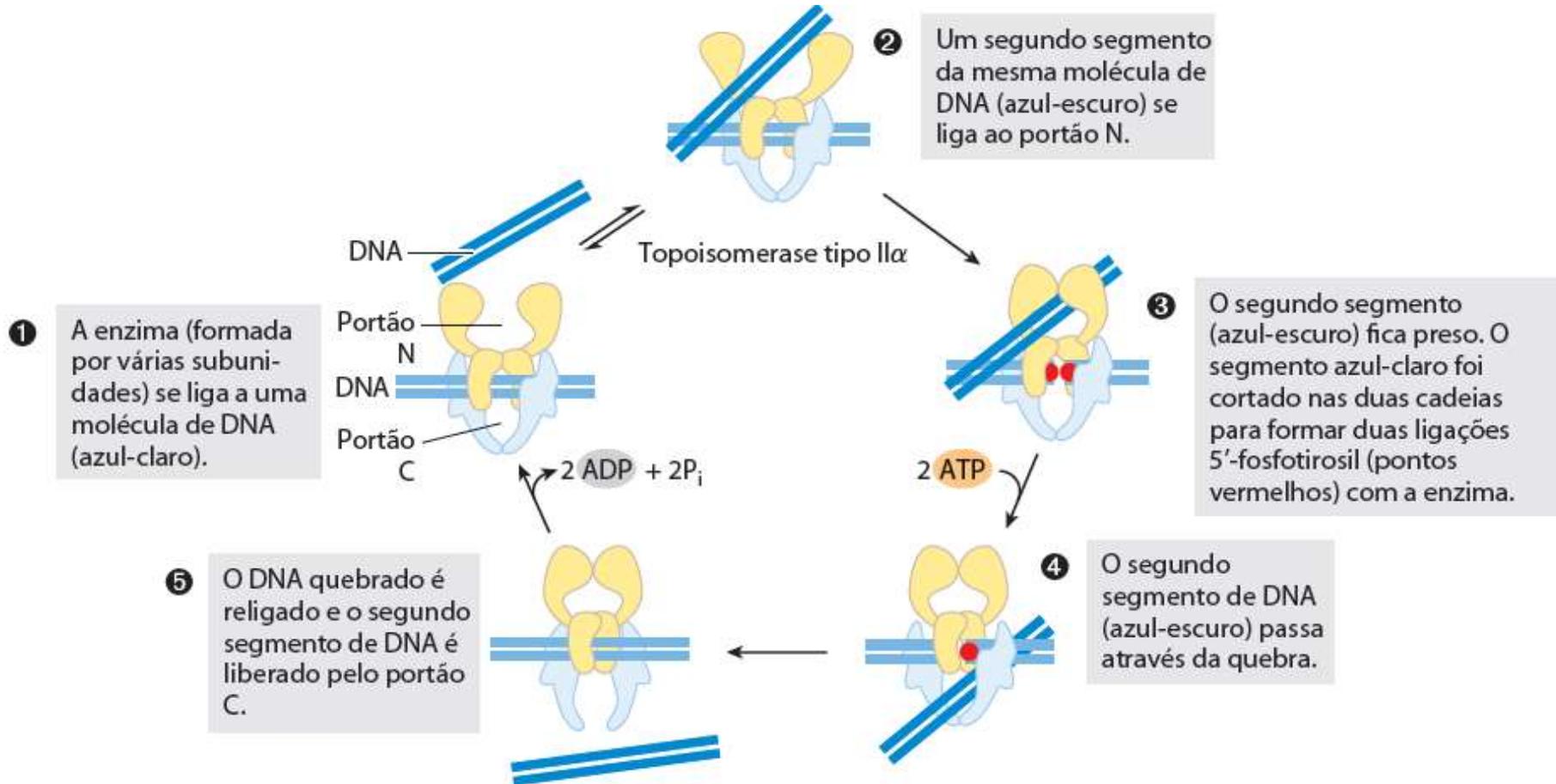


**Ciprofloxacina**



## DNA-topoisomerase II – Dna girase

- 1) **Ligação ao DNA**
- 2) **Segundo segmento de DNA se liga a enzima**
- 3) **Clivagem reversível da dupla hélice → criam uma “abertura” no DNA**
- 4) **O segmento não clivado passa pela abertura**
- 5) **Religa as fitas da abertura**



## DNA-Primase – RNA-pol DNA-dependente

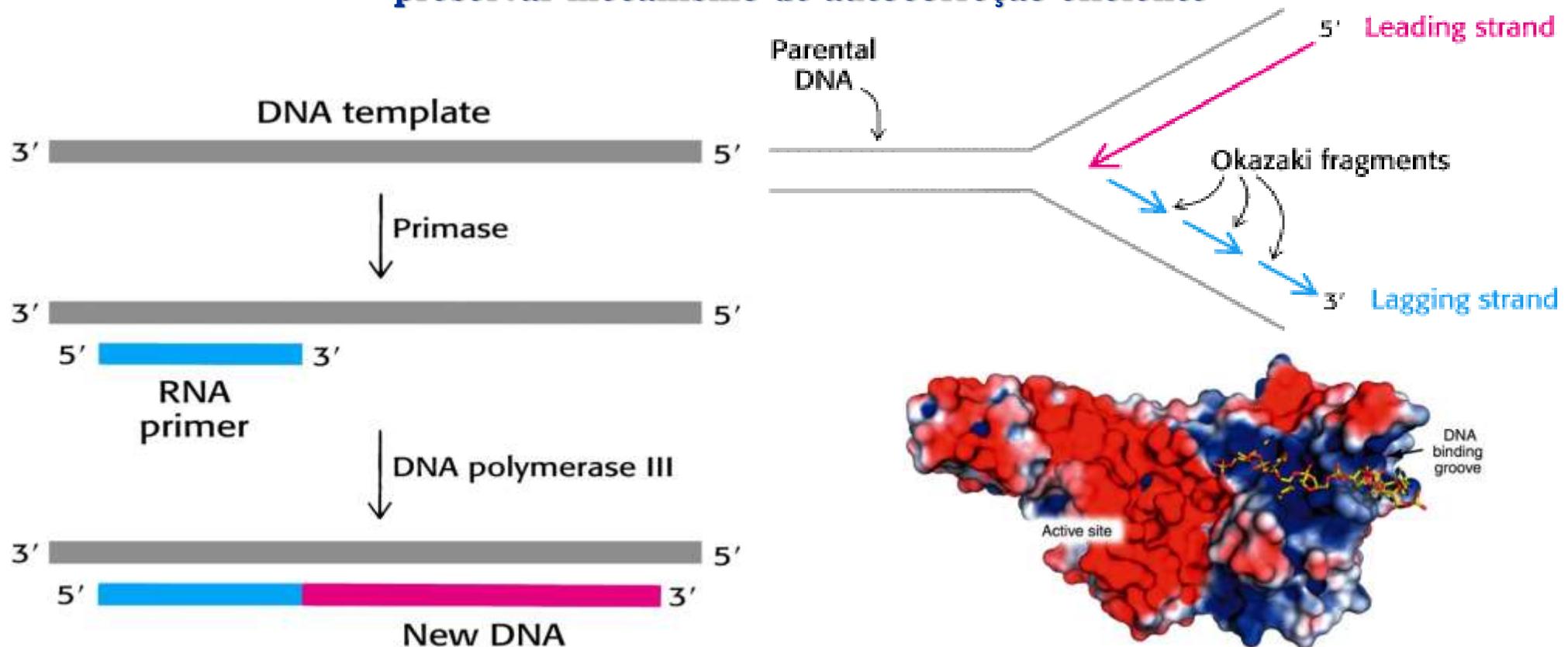
Enzima responsável pela síntese de primers de RNA na forquilha de replicação

- Primers de 10-60 nucleotídeos necessários → DNAPol requer uma OH 3' disponível

→ A replicação da fita descontínua sempre precisa de um novo primer regularmente

- a autocorreção da DNAPol não permite que ela inicie a síntese *de novo* da fita complementar

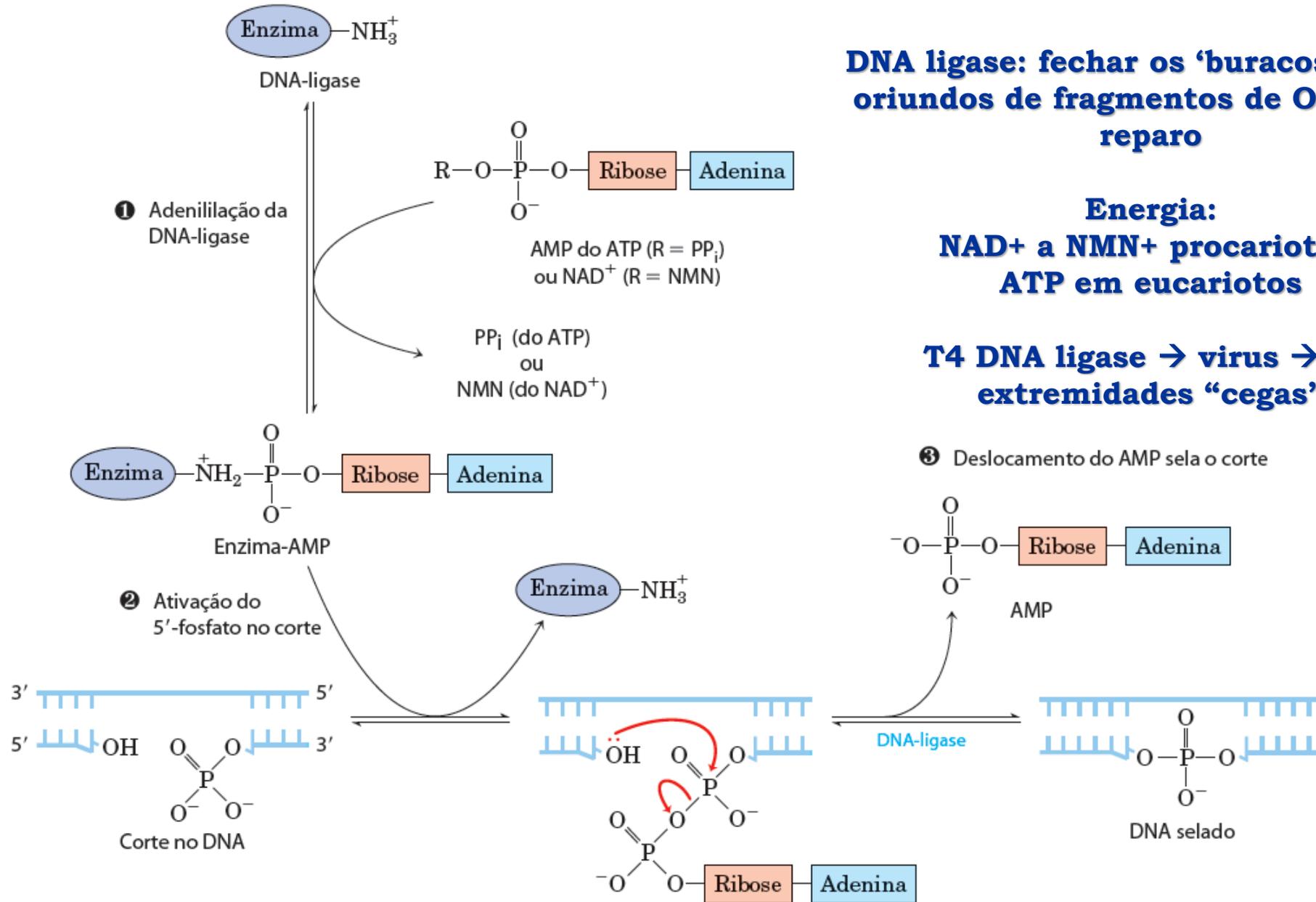
- preservar mecanismo de autocorreção eficiente



**DNA ligase: fechar os 'buracos' (nicks) oriundos de fragmentos de Okasaki e reparo**

**Energia:**  
**NAD<sup>+</sup> a NMN<sup>+</sup> procaríotos;**  
**ATP em eucariotos**

**T4 DNA ligase → virus → une extremidades "cegas"**



## DNA-Polimerases

### Diferentes tipos de DNA-Pol em *E. coli*

- **DNApol I: Substitui os fragmentos de Okazaki e trabalha em sistemas de reparo**
- **DNApol II: Trabalha em sistemas de reparo**
- **DNApol III: É a Replicase → alta taxa de polimerização e processividade**

	DNA-polimerase		
	I	II	III
Gene estrutural*	<i>polA</i>	<i>polB</i>	<i>polC (dnaE)</i>
Subunidades (número de tipos diferentes)	1	7	≥10
$M_r$	103.000	88.000 <sup>†</sup>	791.500
Exonuclease 3'→5' (revisão)	Sim	Sim	Sim
Exonuclease 5'→3'	Sim	Não	Não
Taxa de polimerização (nucleotídeos/s)	10-20	40	250-1.000
Processividade (nucleotídeos adicionados antes que a polimerase se dissocie)	3-200	1.500	≥500.000

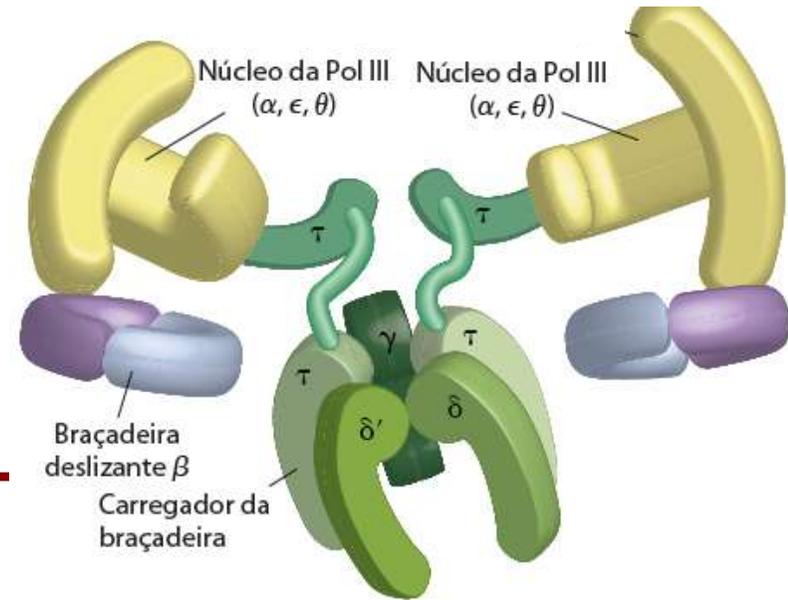
\*Para enzimas com mais de uma subunidade, o gene listado aqui codifica a subunidade com atividade de polimerização. Observe que *dnaE* é uma designação anterior para o gene agora chamado de *polC*.

<sup>†</sup>Apenas subunidade de polimerização. A DNA-polimerase II compartilha várias subunidades com a DNA-polimerase III, incluindo as subunidades  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\delta'$ ,  $\chi$  e  $\Psi$  (ver Tabela 25-2).

**Possui alta processividade e taxa catalítica**

**→ é a replicase**

- **Tem atividade 3'→5' exonucleotídica**
- **Sem atividade 5'→3' exonucleotídica**
- **Complexo multienzimático**



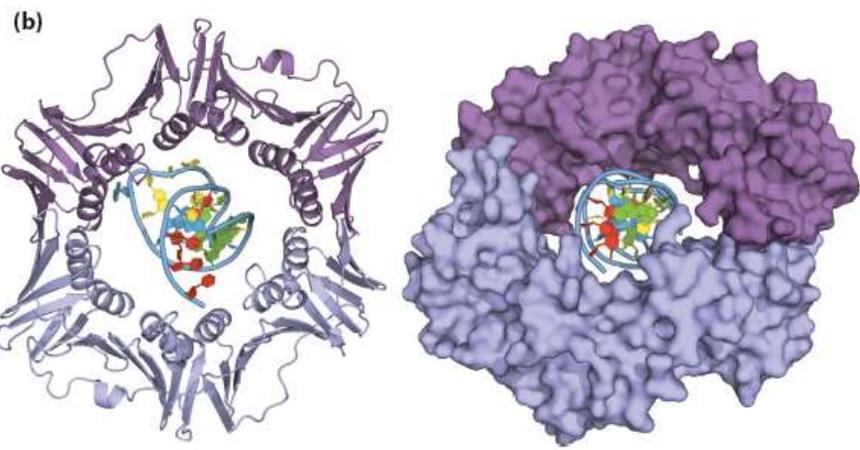
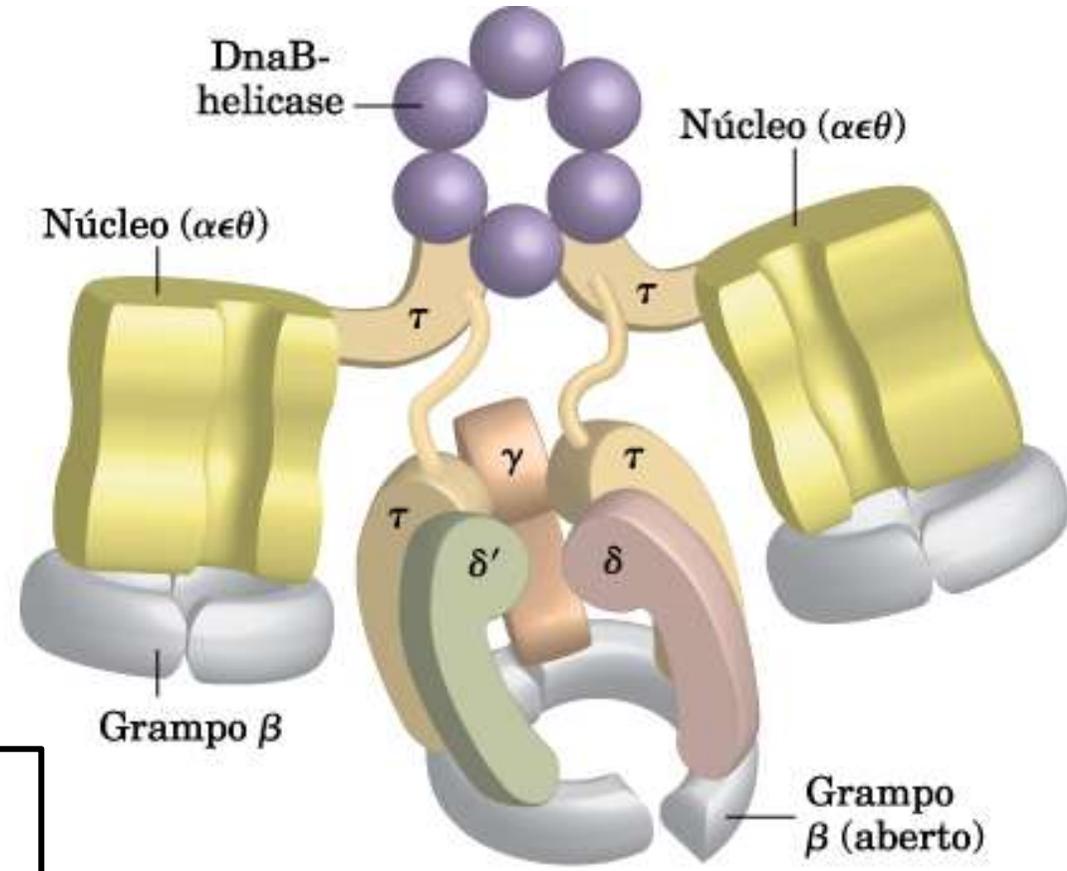
Subunidade	Número de subunidades por holoenzima	$M_r$ da subunidade	Gene	Função da subunidade	
$\alpha$	2	129.900	<i>polC (dnaE)</i>	Atividade de polimerização	} Núcleo da polimerase
$\epsilon$	2	27.500	<i>dnaQ (mutD)</i>	Exonuclease de revisão 3'→5'	
$\theta$	2	8.600	<i>holE</i>	Estabilização da subunidade $\epsilon$	
$\tau$	2	71.100	<i>dnaX</i>	Ligação ao molde estável; dimerização do núcleo enzimático	} Complexo carregador de braçadeiras ( $\gamma$ ) que carrega as subunidades $\beta$ na fita retardada em cada fragmento de Okazaki
$\gamma$	1	47.500	<i>dnaX*</i>	Carregadora de braçadeira	
$\delta$	1	38.700	<i>holA</i>	Abridor de braçadeira	
$\delta'$	1	36.900	<i>holB</i>	Carregadora de braçadeira	
$\chi$	1	16.600	<i>holC</i>	Interação com SSB	
$\psi$	1	15.200	<i>holD</i>	Interação com $\gamma$ e $\chi$	
$\beta$	4	40.600	<i>dnaN</i>	Grampo de DNA necessário para processividade ótima	

# DNA-Polimerases III

## DNA-Pol III

O complexo multienzimático

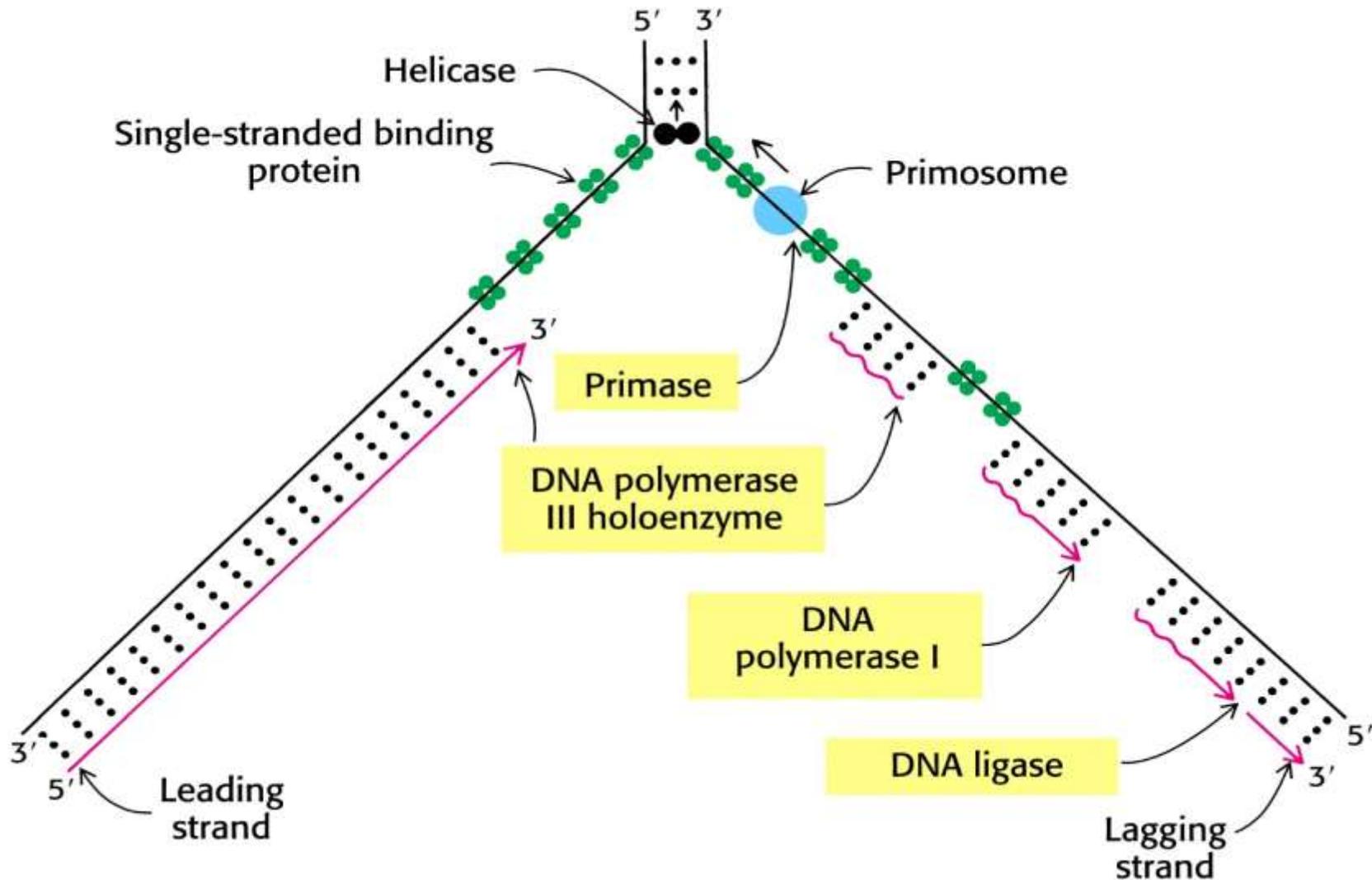
- A síntese de DNA funciona pela ação conjunta das diversas proteínas
- Formação da alça de replicação



- Em bactérias → primossomo
- Força propulsora do complexo → hidrólise de ATP

# Replicação do DNA

**Ação coordenada de várias enzimas/proteínas com a DNAPol III**  
**Complexo multi-enzimático na forquilha de replicação**



## DNA-Polimerase III

→ Cinta deslizante - Braçadeira

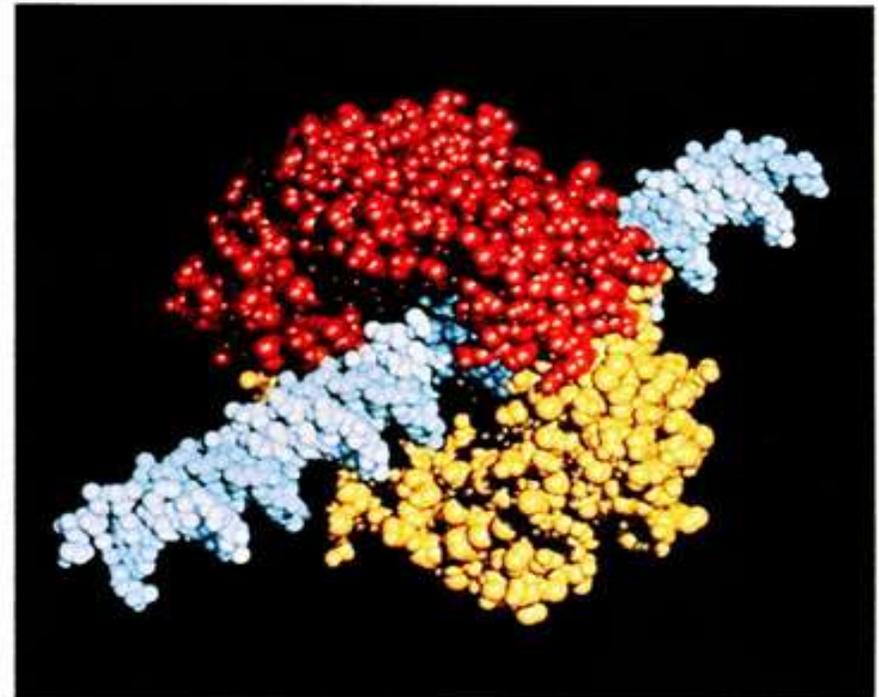
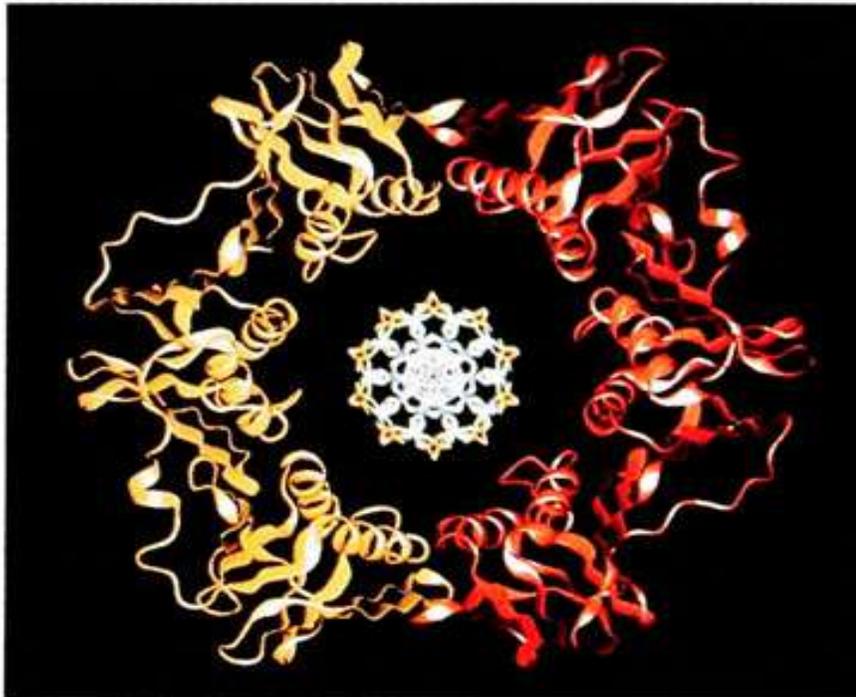
→ A DNAPol III por si só apresenta baixa afinidade pela fita simples e é capaz de sintetizar apenas pequenos trechos

→ Uma proteína móvel age como uma cinta reguladora que “prende” a DNAPol na fita de DNA molde

→ Subunidade  $\beta$  (dímero) forma um anel em torno no DNA

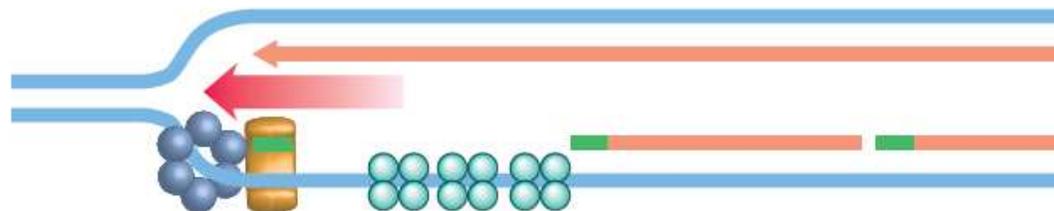
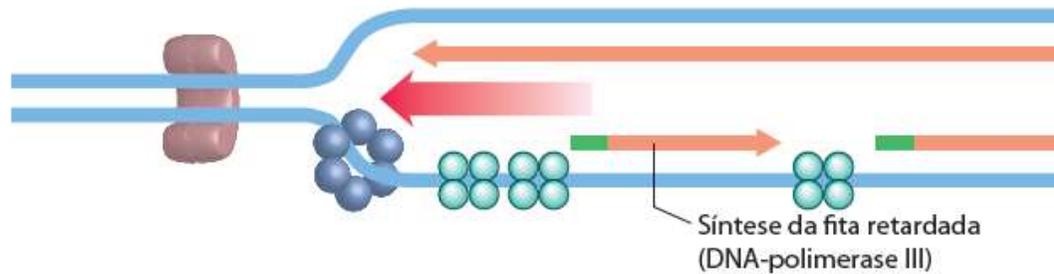
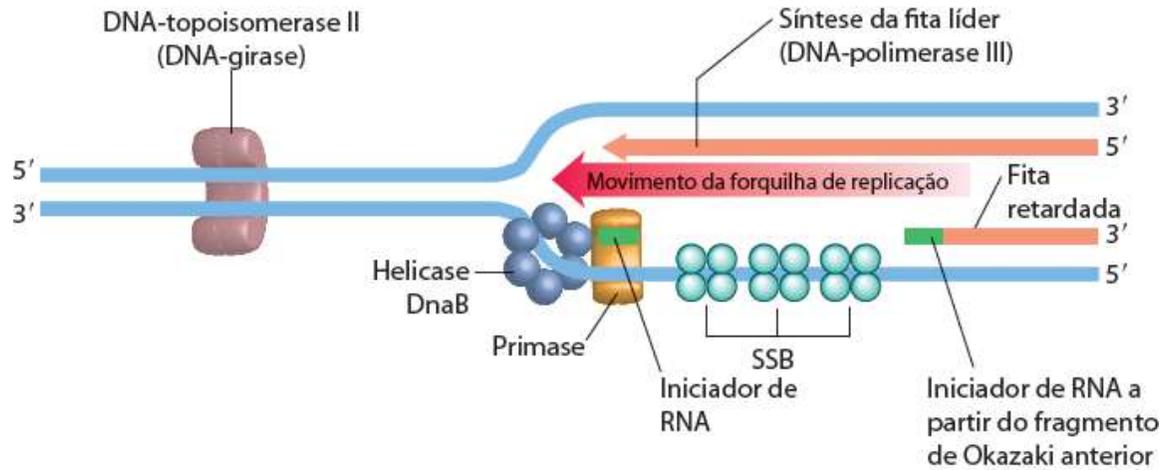
- aumenta a eficiência da polimerização em 500.000 vezes

- libera a DNAPol quando encontra DNA fita dupla



# Replicação do DNA

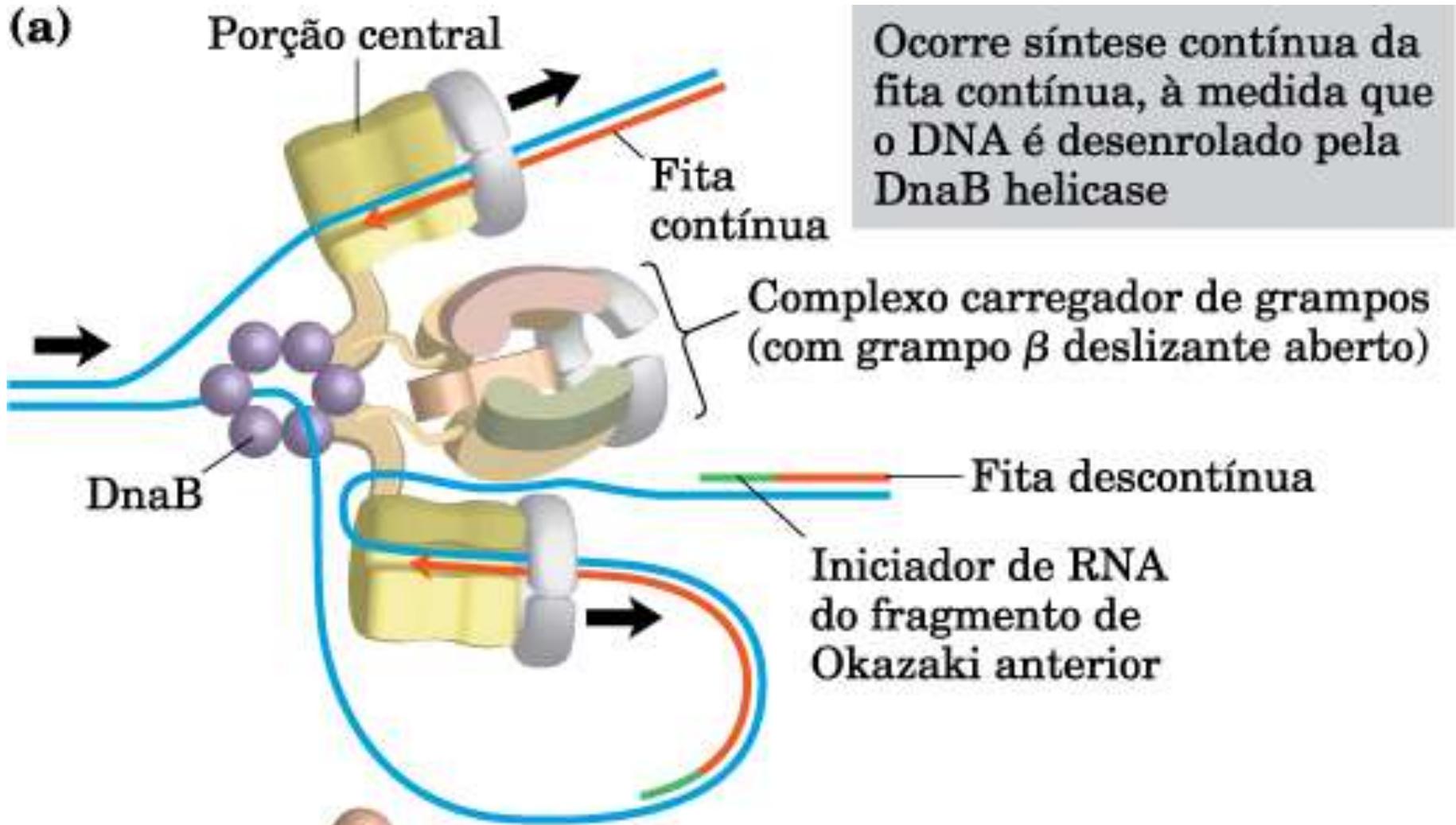
## Complexo multi-enzimático na forquilha de replicação



# Replicação do DNA

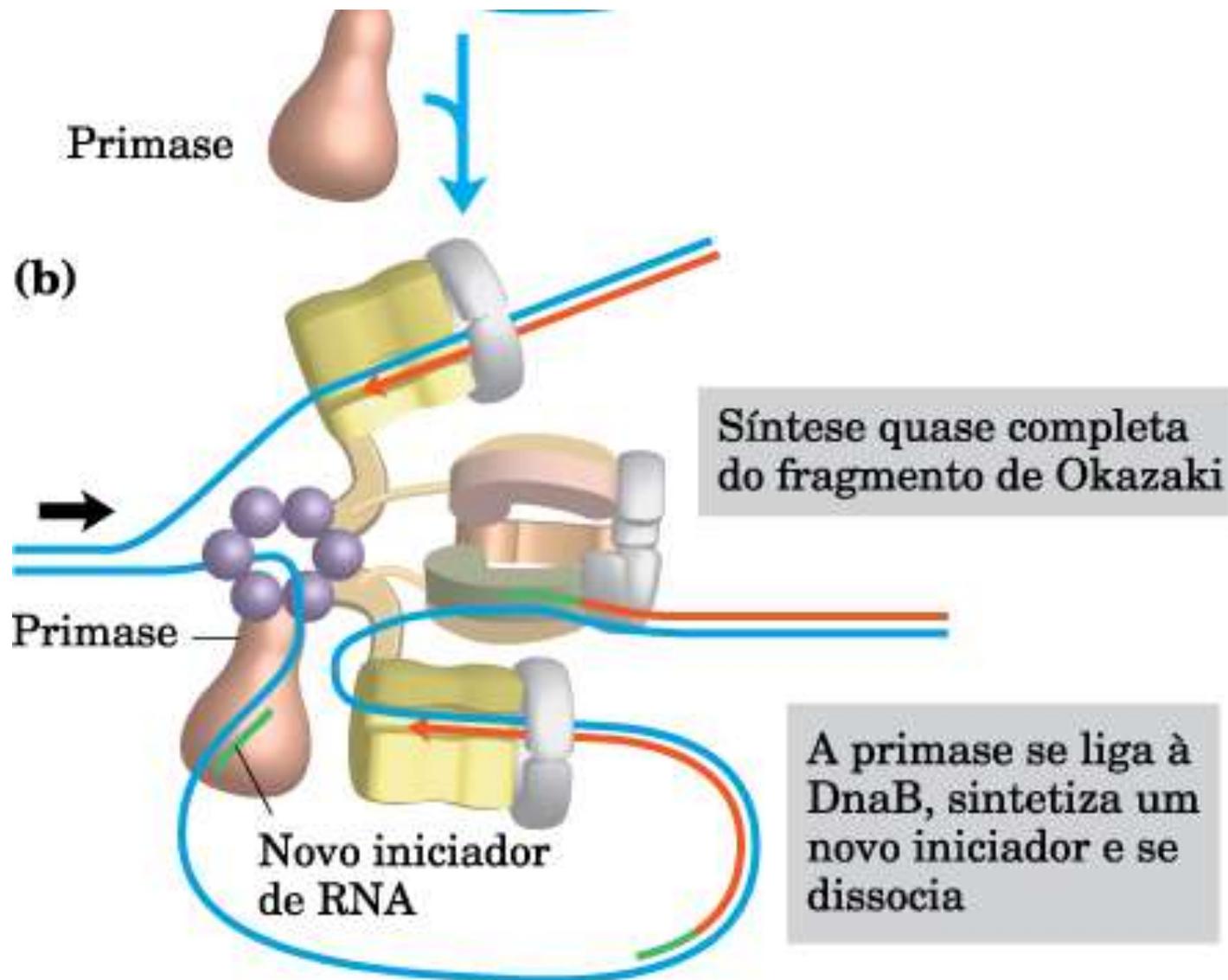
## DNA-Pol III

→ modelo em trombone



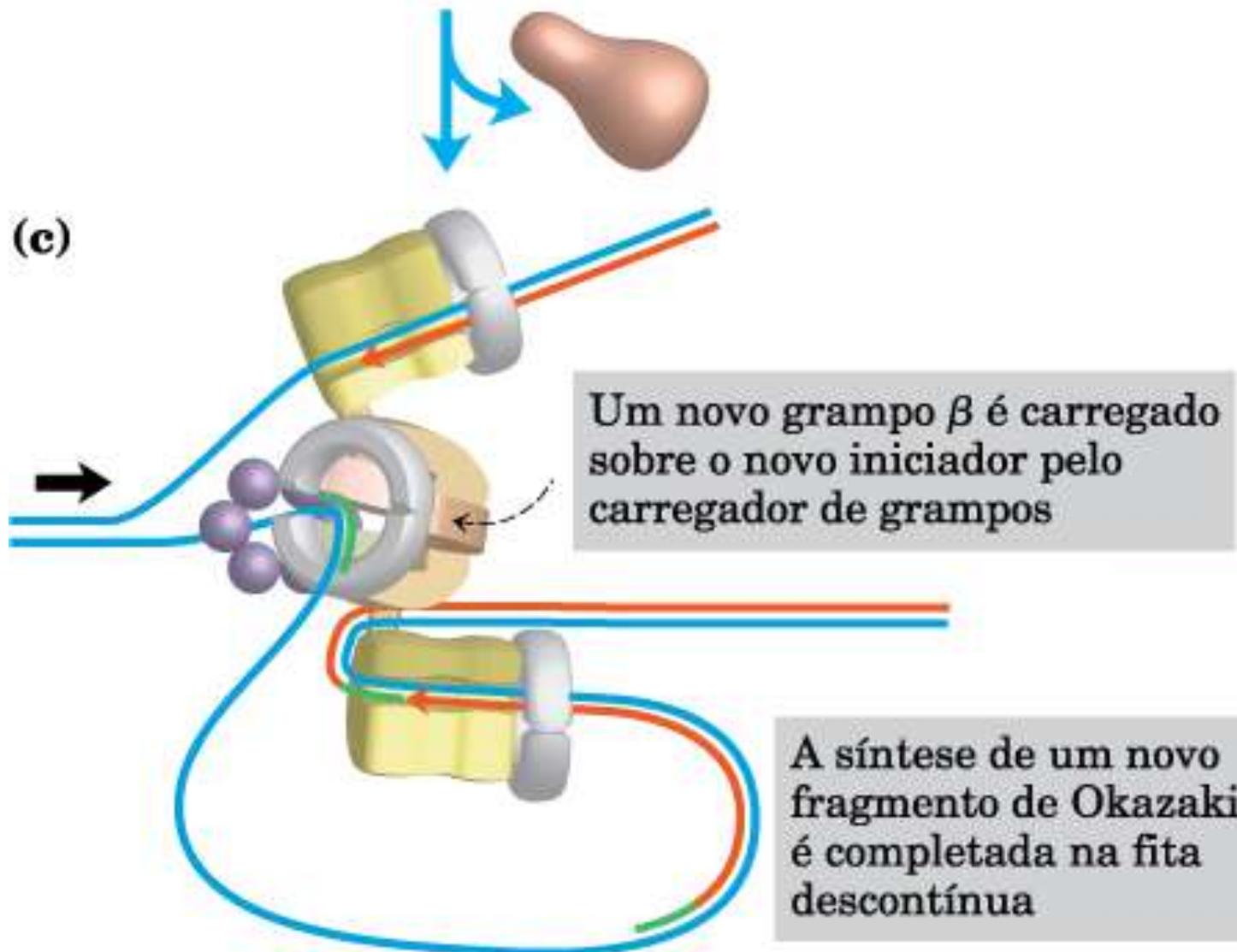
# Replicação do DNA

## DNA-Pol III



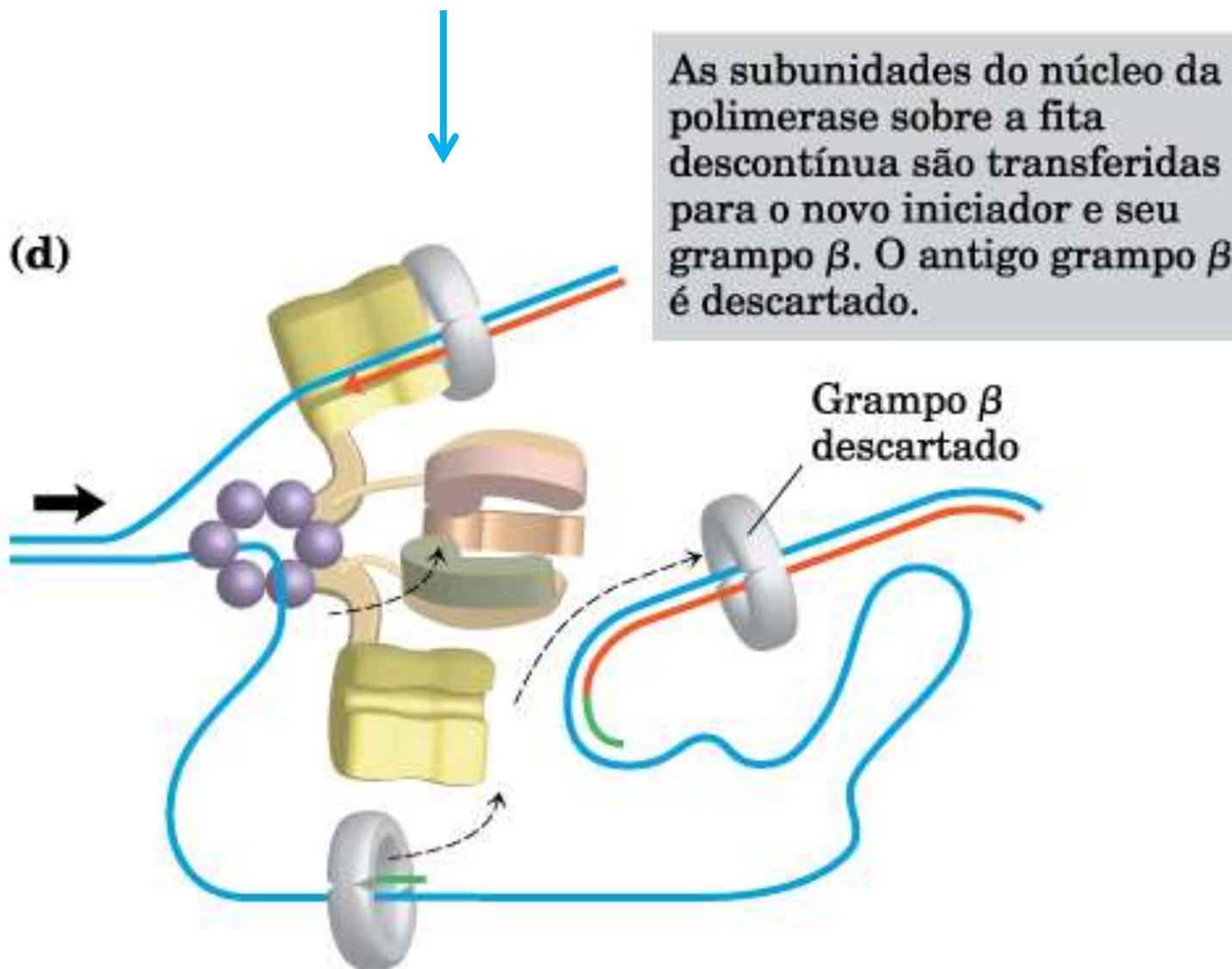
# Replicação do DNA

## DNA-Pol III



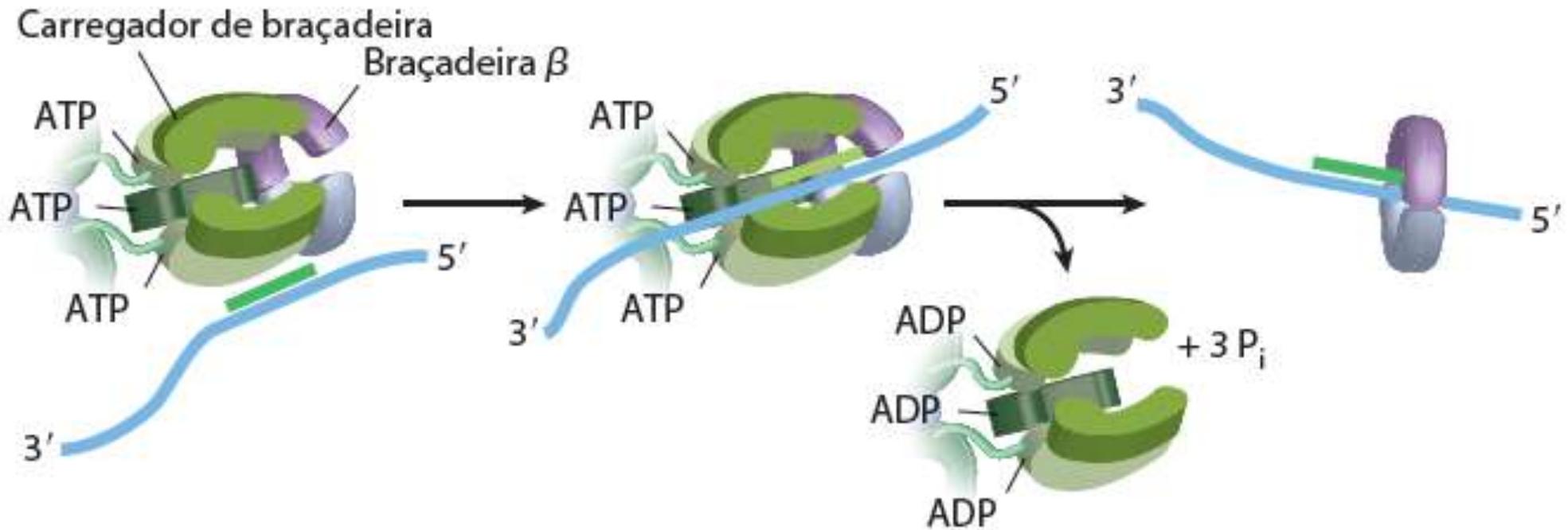
# Replicação do DNA

## DNA-Pol III



Recarregamento do braçadeira  $\beta$

Depende do encontro do duplex de DNA-RNA com o fator carregador

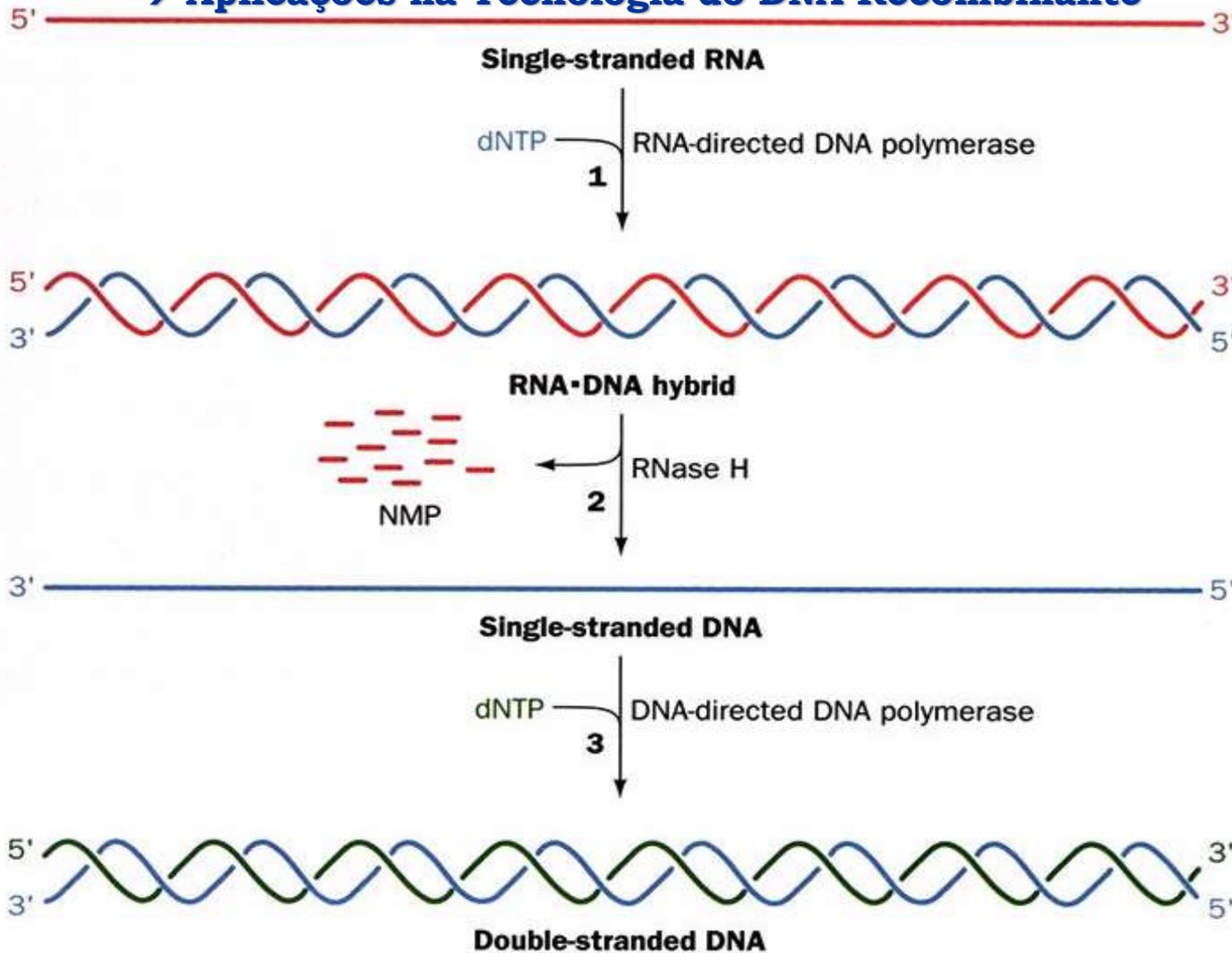


# Transcriptase Reversa

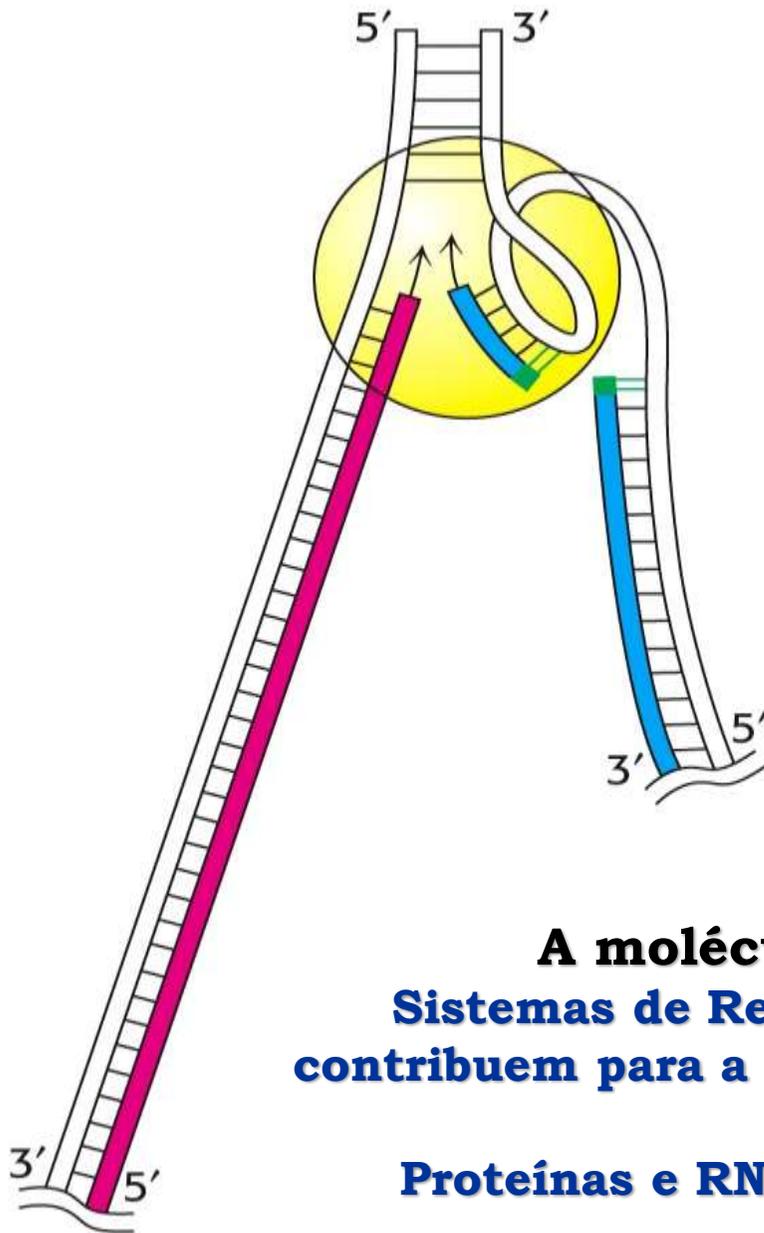
DNA-polimerase RNA-dependente

→ Vírus de RNA

→ Aplicações na Tecnologia do DNA Recombinante



## Fidelidade da Replicação



### Vários fatores influentes

- 1) Níveis de dNTPs balanceado
- 2) DNAPol
- 3) Ação exonucleotídica
- 4) Várias enzimas adicionais
- 5) Início por primer (chance de pareamento errado no início é maior)
- 6) Presença do co-fator  $Mg^{2+}$

**A molécula de DNA é, em si, insubstituível**

**Sistemas de Reparo aumentam a fidelidade da replicação e contribuem para a manutenção do DNA → Imperativo para a célula**

**Proteínas e RNA danificados são rapidamente substituídas**

## **Evolução Molecular**

**→ O DNA não é tão inerte quanto parece.  
- Sofre modificações**

**→ A fidelidade do processo de replicação do DNA realizada pelas DNA-pol e suas funções de correção de leitura são essenciais para a transmissão e estabilidade da informação genética durante a divisão celular.**

**→ Existem sistemas de reparo e controle de qualidade para manter a estabilidade de um genoma proporcionando ao mesmo tempo sua evolução**

**→ A evolução ocorre em saltos → pequenas mutações no DNA → grandes passos evolucionários**

**→ A evolução depende, principalmente, de acidentes e erros**

**- Falhas nos mecanismos de replicação e de reparo dos genomas**

**- Falhas na replicação, recombinação ou no reparo de DNA podem ocasionar diversos tipos de alterações**

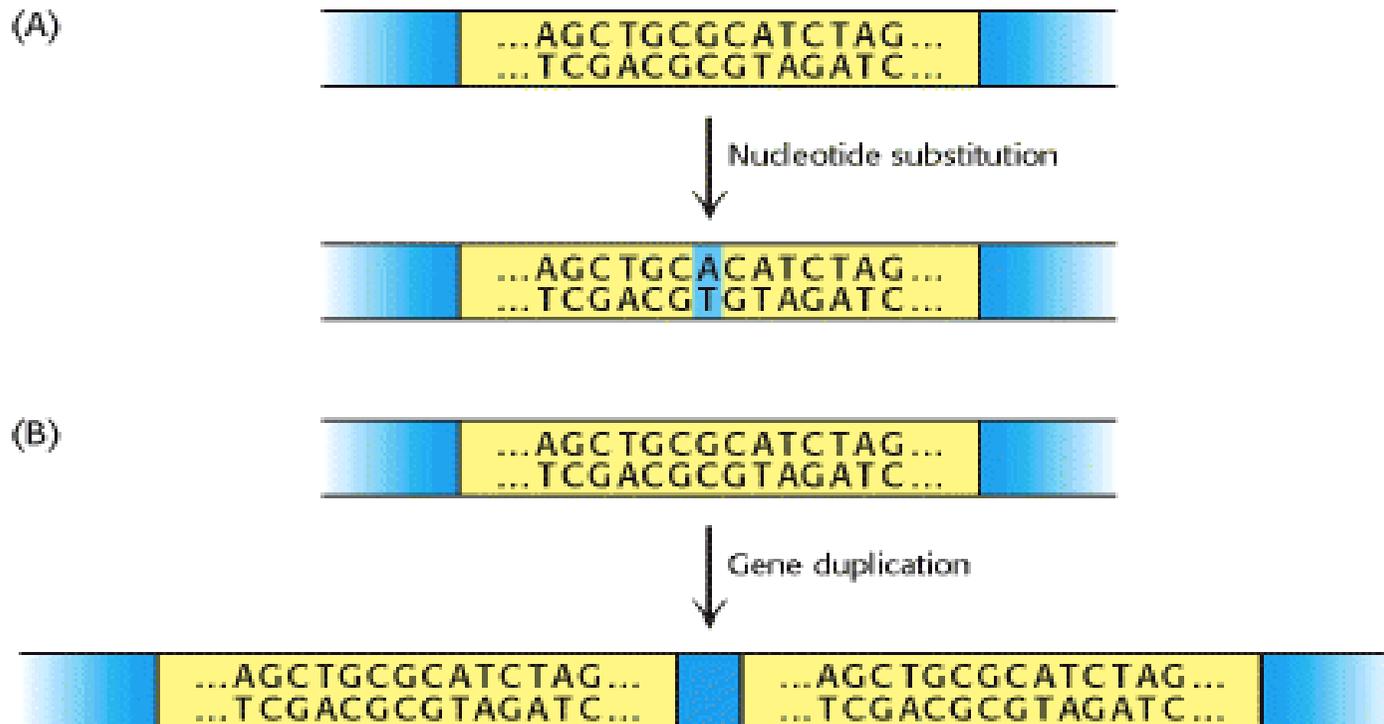
## Evolução Molecular

### → Tipos de falhas

- Falhas simples → substituição, inserção ou deleção de um par de bases

- Falhas com rearranjos genômicos → deleções, duplicações, inversões e translocações de seqüências

- As taxas de erros estão em equilíbrio aceitável entre estabilidade e alterações.



## Danos ao DNA

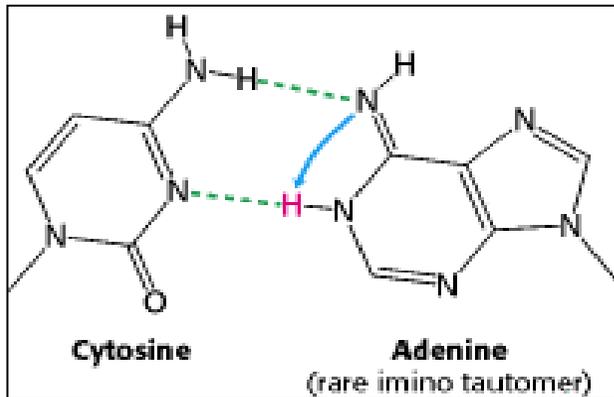
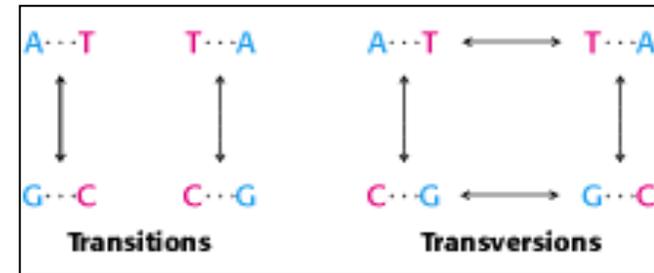
→ Causas de danos ao DNA:

- 1) Meio reativo celular;
- 2) Substâncias tóxicas;
- 3) Danos por radiação UV;
- 4) Radiação ionizante;
- 5) Erros na polimerização que não são corrigidos pela maquinaria;

→ Mutações de ponto (+ Comuns) → troca de bases → podem ser silenciosas ou semiconservativas

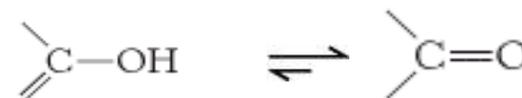
→ Tipo transições ( $A \leftrightarrow G$  ou  $C \leftrightarrow T$ )

→ Tipo transversões (Purinas por pirimidinas)



→ Os nucleotídeos formam tautômeros que permitem pareamentos não Watson-Crick

- Taxa do tautômero  $1 \cdot 10^{-4}$

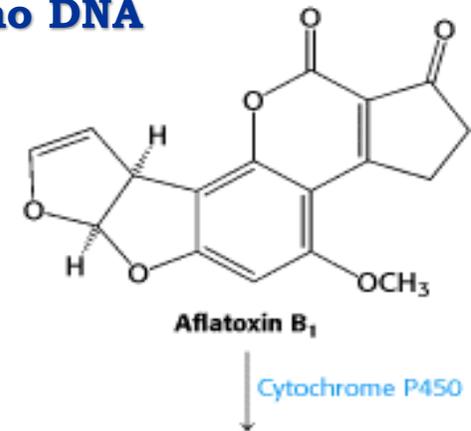
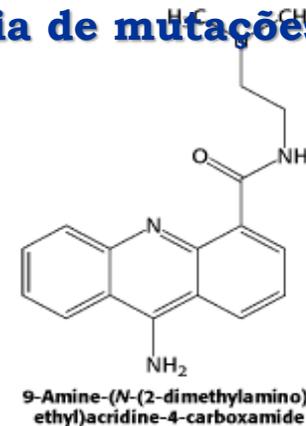
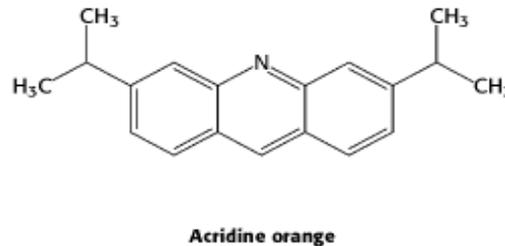
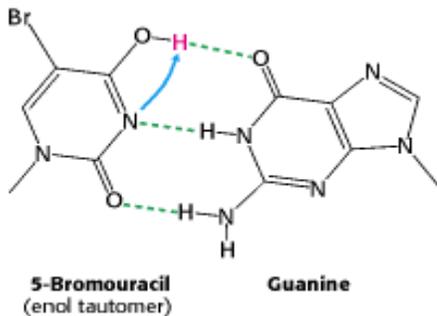


→ Mutações de inserções/deleções → mudam a fase de leitura

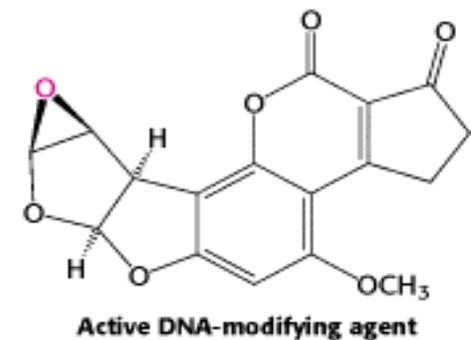
## Danos ao DNA

### → Mutágenos

- Induzem mitose → aumenta a frequência de mutações no DNA



Cytochrome P450



### → Carcinógenos

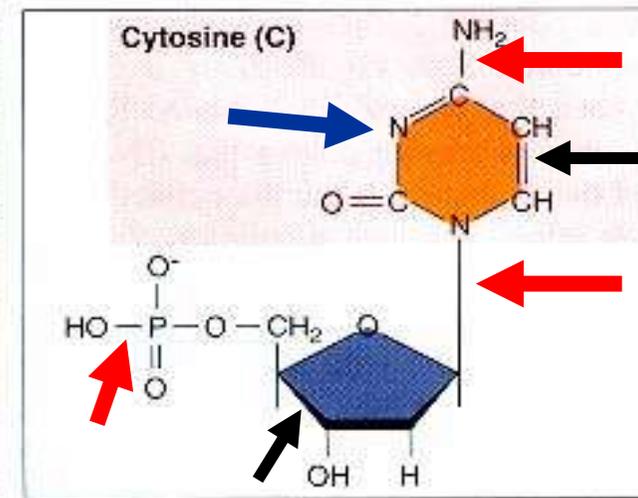
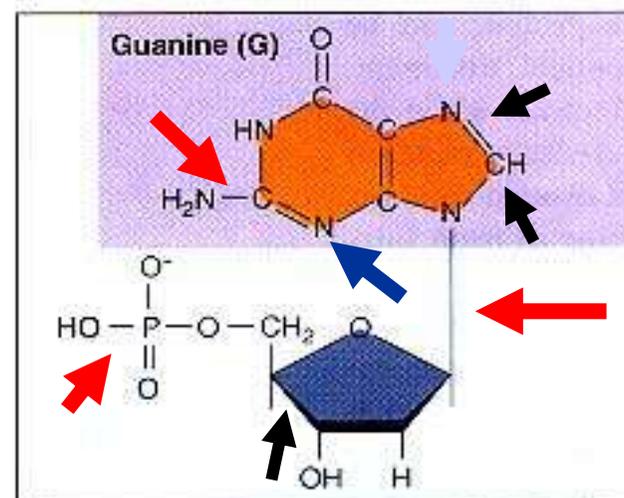
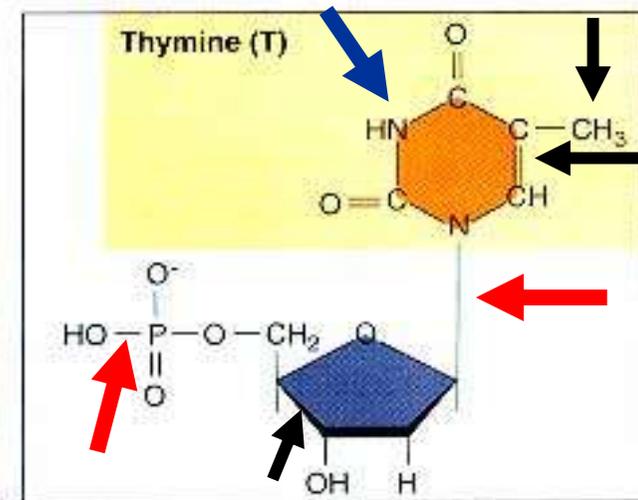
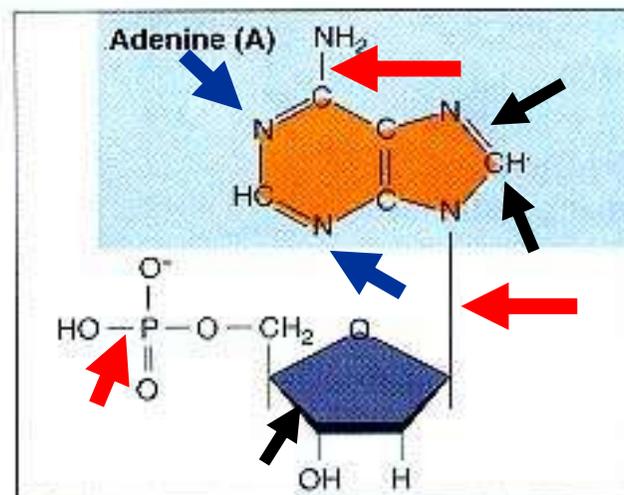
- danificam diretamente o DNA ou indiretamente por interferir no sistema de reparo

→ Progressão do dano depende da linhagem celular

- Em linhagens germinativas → alterações hereditárias na progêne
- Em linhagens somáticas → perda de função, apoptose, câncer.

Tipos e sítios de danos químicos aos nucleotídeos:

- ➔ **Ataque oxidativo**
- ➔ **Hidrólise espontânea**
- ➔ **Metilação não-enzimática por S-adenosil Met**



## Mecanismos de Reparo do DNA

→ **Reparo é importante para manter integridade da informação (celular e/ou herdada)**

→ **Em *E. coli*, apenas 1 em  $1.10^{10}$  eventos de danos ao DNA não é evitado → os mecanismos de reparo são eficientes**

→ **130 genes em humanos → alta redundância funcional**

→ **Taxa de mutações aumentam quando um mecanismo de reparo é desativado → Doenças humanas – cânceres**

- **Grande variedade de mecanismos sugere a sua importância → investimento celular é alto → proporcional à importância**

- **O DNA possui cópia para o reparo imediato → a fita complementar é o molde direto**

- **Vírus de DNA simples e RNA são mais susceptíveis à mutações → sucesso evolutivo pela quantidade e adaptabilidade**

**TABELA 25-5** Tipos de sistemas de reparo de DNA em *E. coli*

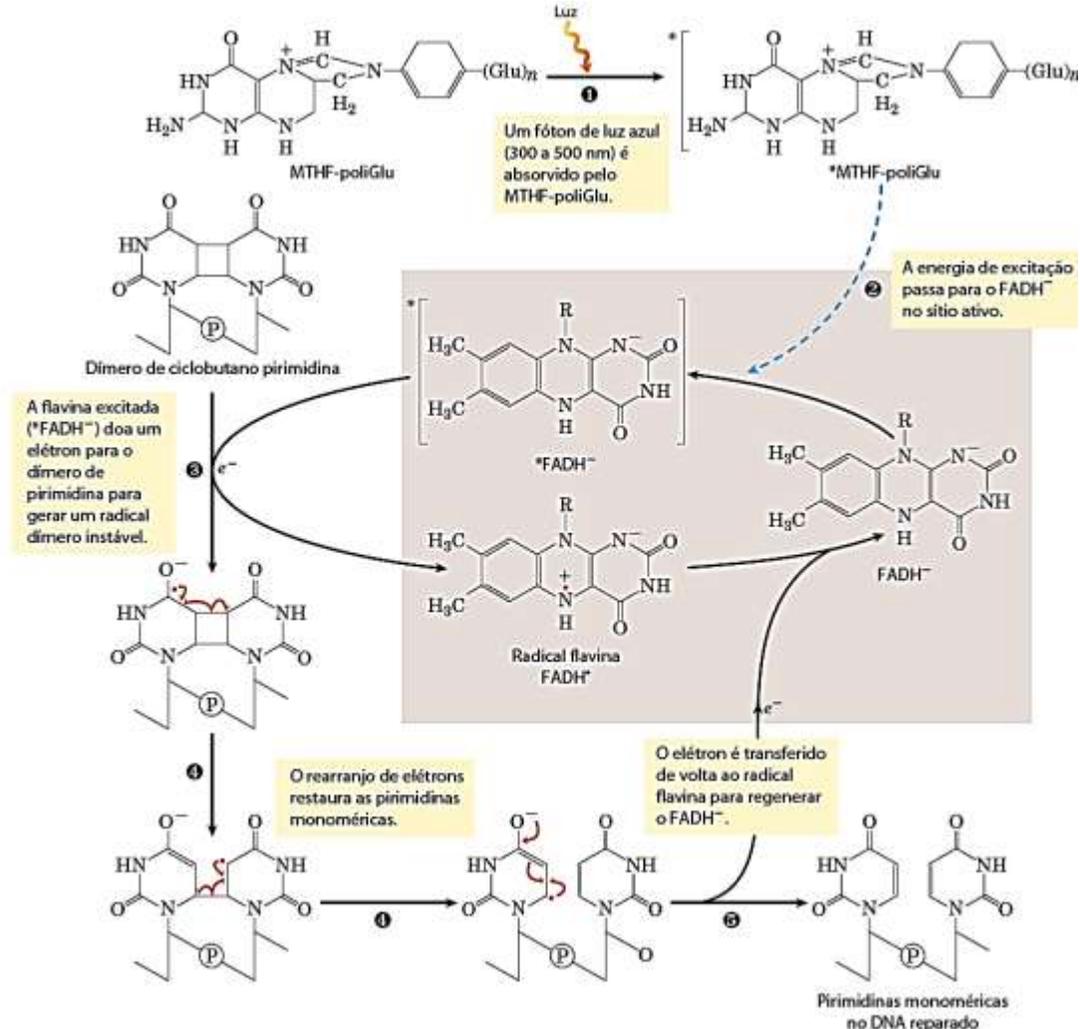
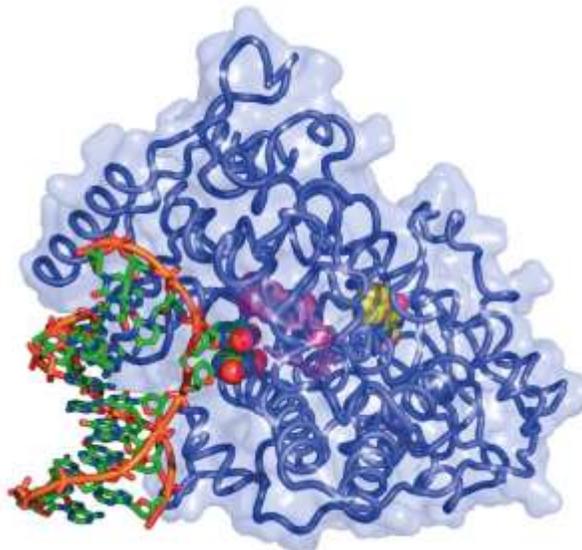
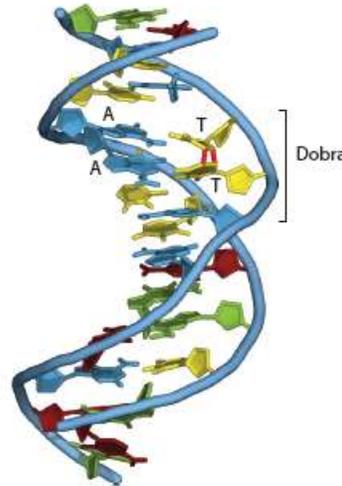
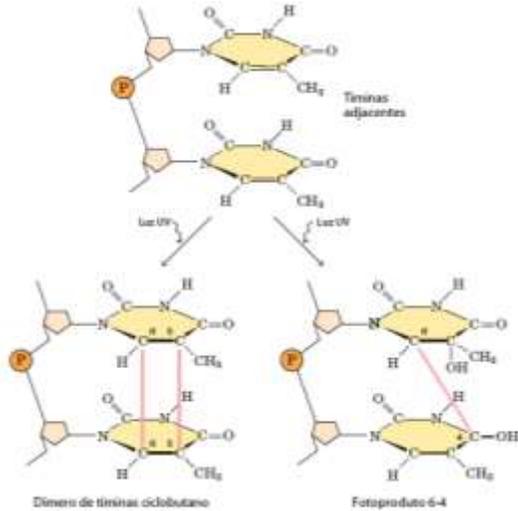
Enzimas/proteínas	Tipo de dano
<b>Reparo de malpareamento</b>	
Dam metilase	} Malpareamentos
Proteínas MutH, MutL, MutS	
DNA-helicase II	
SSB	
DNA-polimerase III	
Exonuclease I	
Exonuclease VII	
Nuclease RecJ	
Exonuclease X	
DNA-ligase	
<b>Reparo por excisão de bases</b>	
DNA glicosilases	} Bases anormais (uracila, hipoxantina, xantina); bases alquiladas; em alguns outros organismos, dímeros de pirimidina
Endonucleases AP	
DNA-polimerase I	
DNA-ligase	
<b>Reparo por excisão de nucleotídeo</b>	
Excinuclease ABC	} Lesões de DNA que causam grandes mudanças estruturais (p. ex., dímeros de pirimidina)
DNA-polimerase I	
DNA-ligase	
<b>Reparo direto</b>	
DNA-fotoliasas	Dímeros de pirimidina
O <sup>6</sup> -Metilguanina-DNA-metiltransferase	O <sup>6</sup> -Metilguanina
Proteína AlkB	1-Metilguanina; 3-metilcitosina

# Danos ao DNA

## Reparo Direto

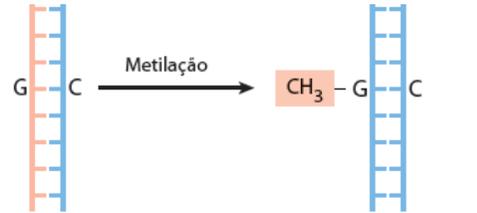
→ Radiação UV (200-300nm)

→ Dímero de Pirimidina (T/C) causa distorção na dupla-hélice que bloqueia a transcrição e a replicação

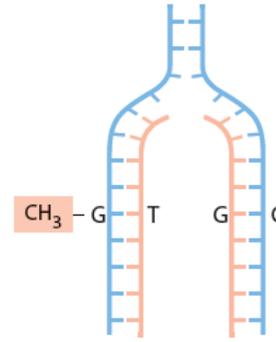


**Reparo Direto**

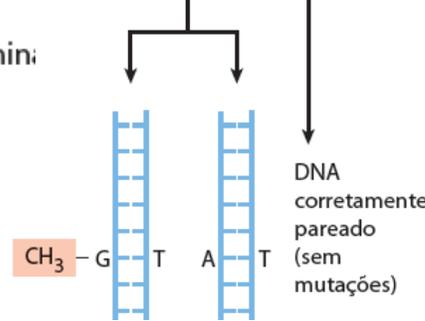
→ Reversão da alquilação do DNA → O<sup>6</sup>-metilguanina



Replicação



Replicação



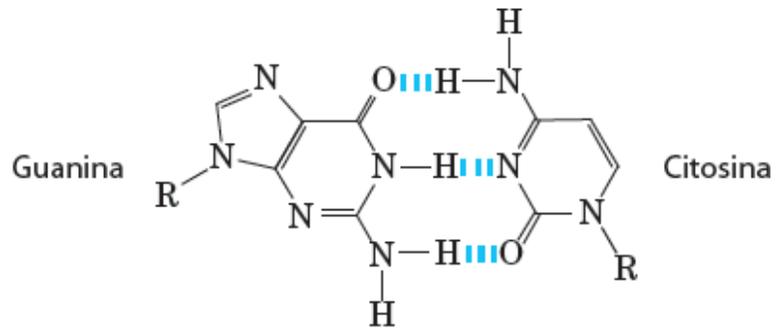
→ Realizado pela O<sup>6</sup>-metilguanina-DNA metiltransferase

- Transfere o grupo metil da Guanina para uma Cys

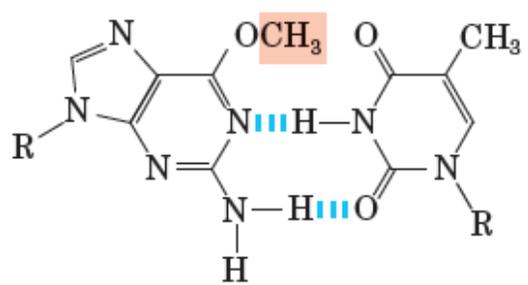
- Inativa a proteína

- Investimento de uma proteína para reverter o dano ao DNA → exemplo da importância do processo

(a)



Metilação e replicação



O<sup>6</sup>-metilguanina

Timini:

DNA corretamente pareado (sem mutações)

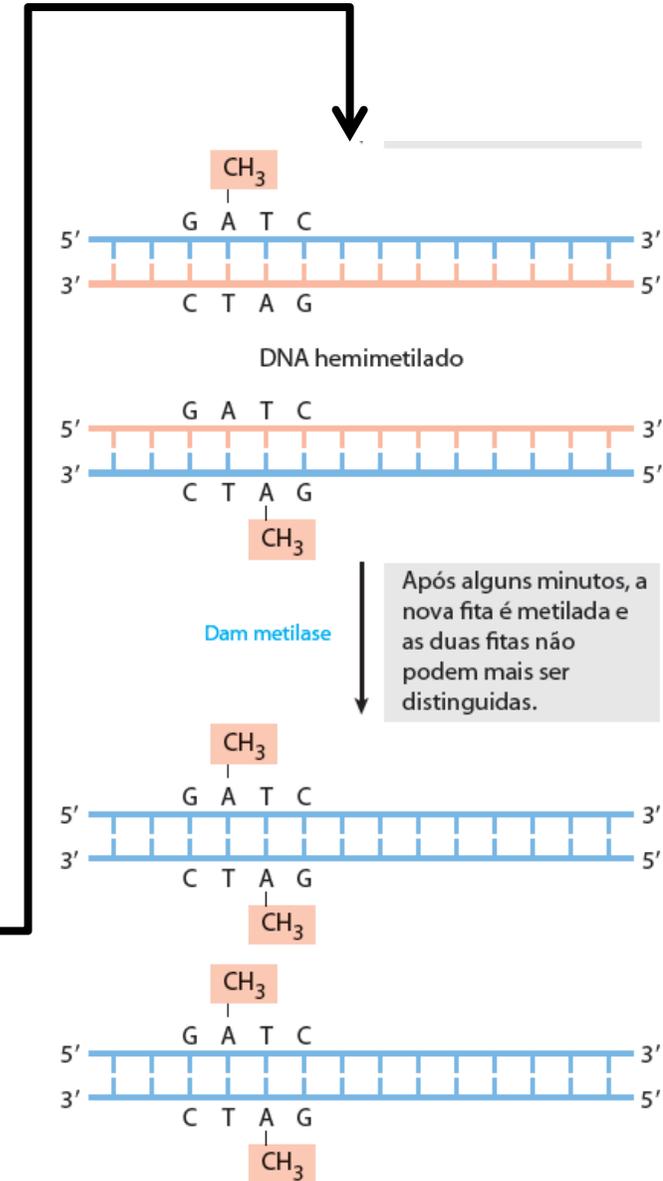
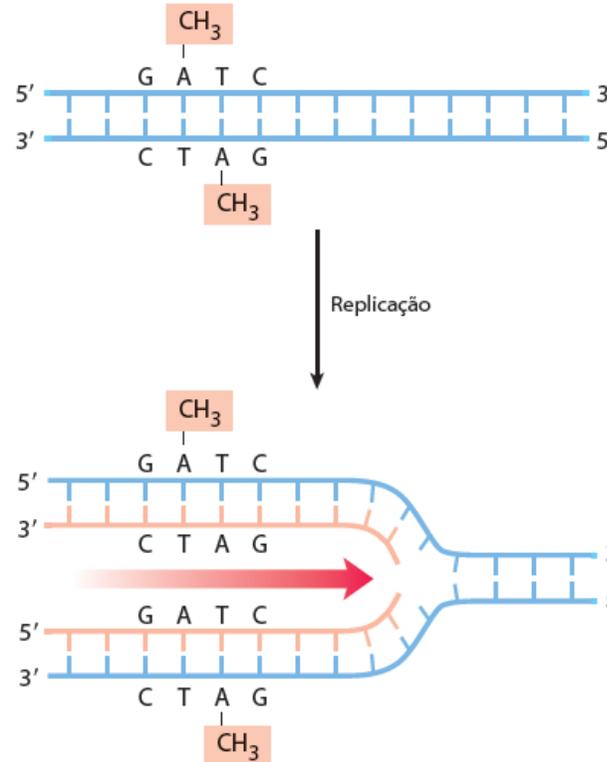
# Mecanismos de Reparo do DNA

## → Reparo de nucleotídeos malpareados - *Mismatch repair*

- Provenientes de falhas da replicação → incremento na fidelidade de  $10^2-10^3$
- Baseia-se na informação da fita parental

**Dam Metilase → marca a fita parental**  
Nº da A → 5'GATC

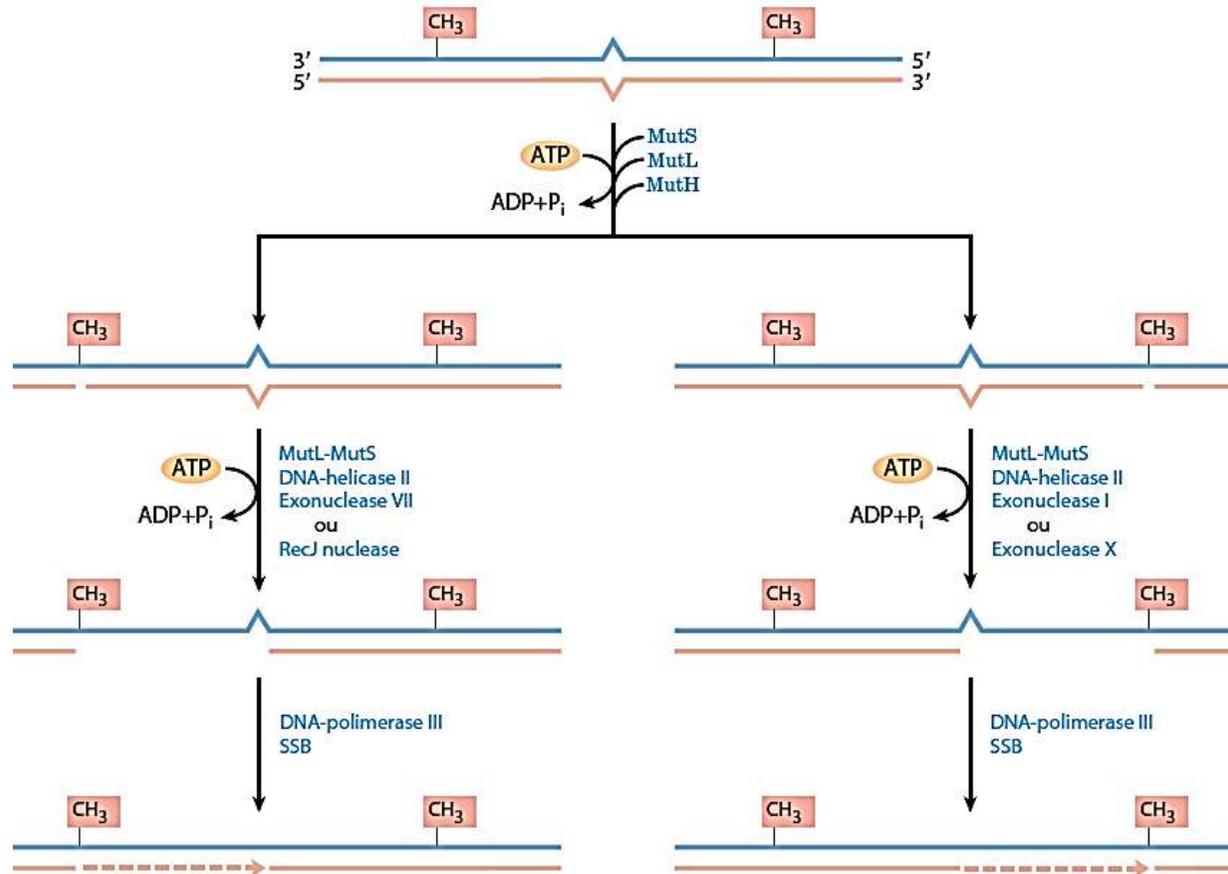
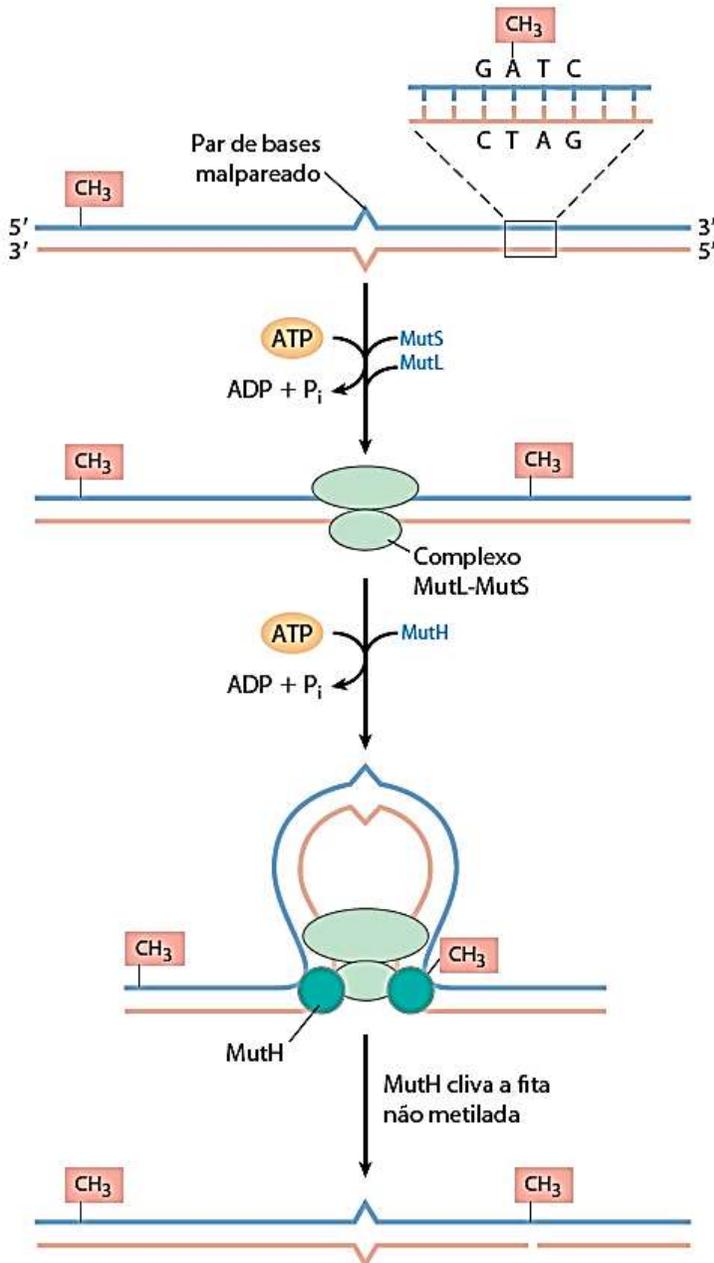
**O malperamento em fita hemimetiladas recruta o complexo MutL-MutS**



# Mecanismos de Reparo do DNA

O complexo MutL-MutS recruta uma endonuclease inativa → MutH

A MutH se torna ativa quando liga a DNA hemimetilado e cliva a sequência GATC hemimetilado



## Mecanismos de Reparo do DNA

### → Reparo por Remoção de Bases

→ Existem várias glicosidases que reconhecem bases danificadas e a extirpa do DNA clivando a ligação glicosídica

- Gera um ponto AP (Apurínico ou apirimídico)

- Endonuclease AP reconhece este sítio e cliva a fosfodeoxiribose

- A DNA-pol I preenche a lacuna

- DNA-ligase funde os fragmentos

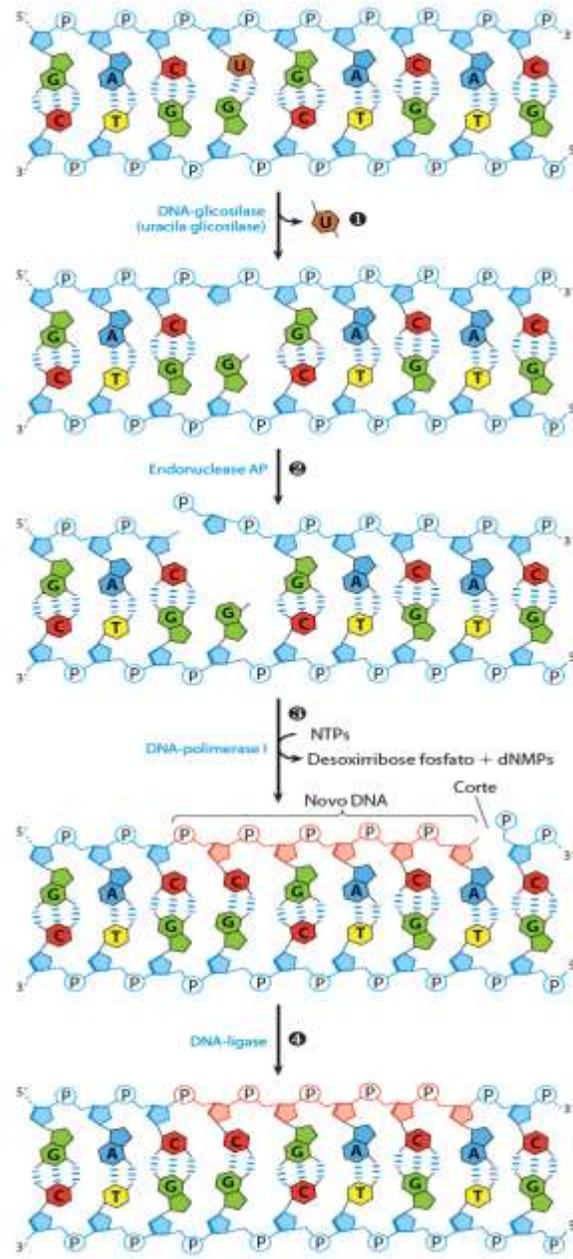
**Ex: Uracila DNA-glicosidase**

- C sofre deaminação formando U

→ altíssima seletividade em relação a Citosina

- 1 em E. coli

- 4 em humanos



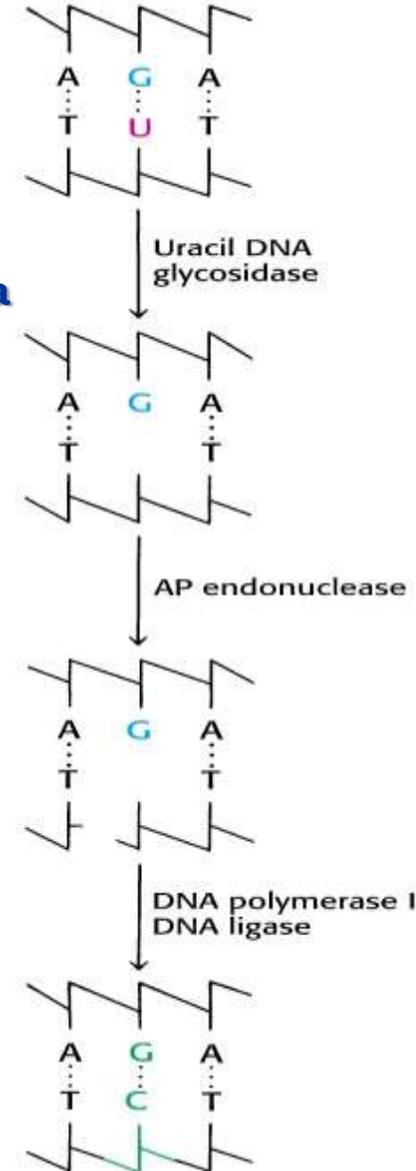
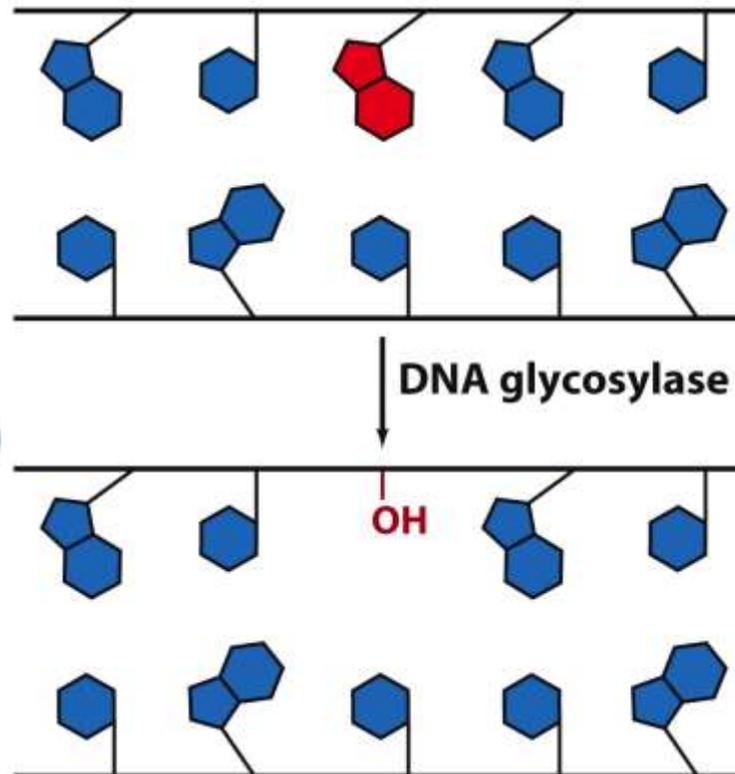
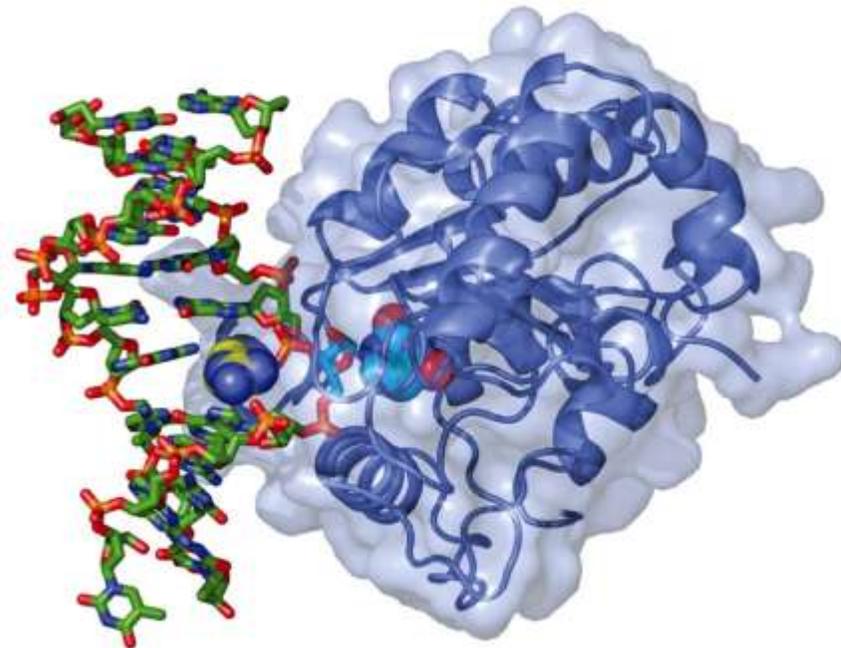
## Mecanismos de Reparo do DNA

→ Reparo por Remoção de Bases

- Uracil no DNA e altamente mutagênico
  - pois C pode deaminar a U → o par seria GC ou AT?
- Uracil-DNA glicosidase **puxa** uracil para fora do DNA

Timina é usada no DNA para aumentar a fidelidade da mensagem genética

- Se tem U no DNA → está errado



# Mecanismos de Reparo do DNA

## → Reparo por Remoção do Nucleotídeo

→ **Complexo multi-enzimático reconhece alterações e distorções na estrutura da dupla hélice do DNA**

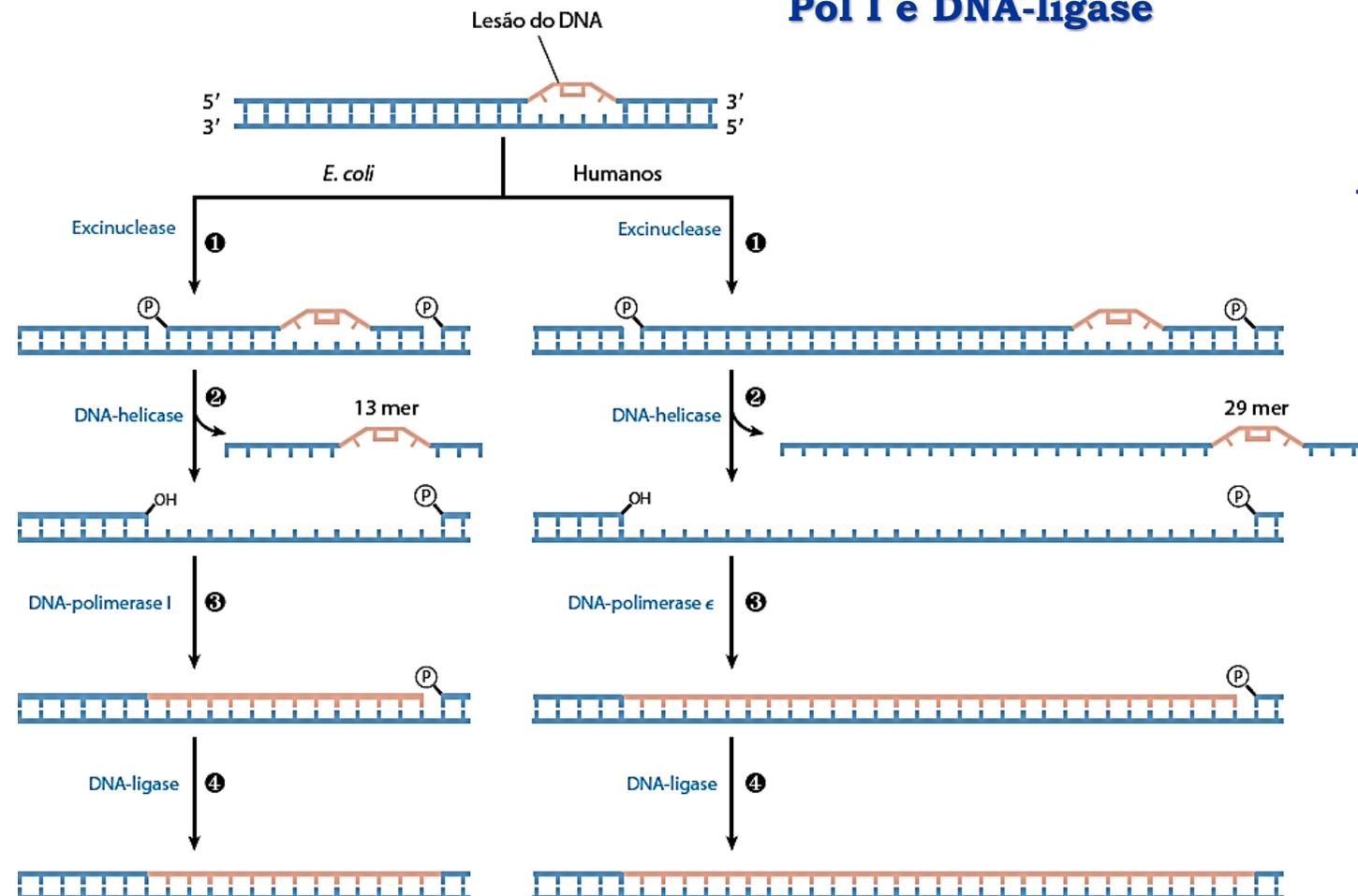
- **Dímeros de pirimidinas podem ser reparados por excisão e a lacuna preenchida pela DNA-Pol I e DNA-ligase**

- **clivagem por um complexo dependente de ATP na sétima e quarta base na extremidade 5' e 3' do dano**

- **Clivagem dupla específica → característica única**

→ **Defeito neste sistema de reparo gera a Xerodermia pigmentosa**

- **doença autossômica recessiva → luz solar**



## Mecanismos de Reparo do DNA

→ **Reparo Propenso a Erro: TLS (síntese de DNA por transleção propenso a erro)**

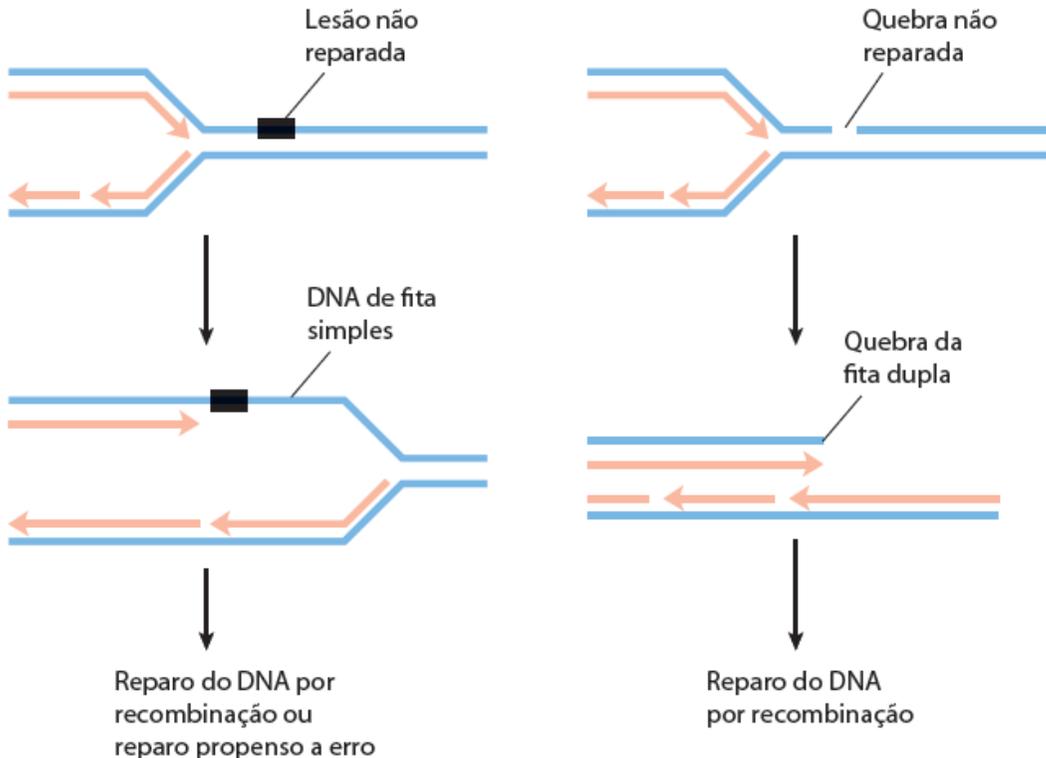
- **Resposta SOS (em bactérias)**

- **Ocorre com danos/quebras ao DNA na replicação → radiação ionizante**

- **Gera lacunas na forquilha de replicação → sem fita complementar para codificar reparo**

→ **Resulta na síntese de DNA com baixa fidelidade**

→ **Resposta “desesperada”: Antes isto do que nada → visa dar uma chance de sobrevivência → depende da região danificada**



**Pode envolver um grande número de proteínas**

- **Outras DNAPol**

- **Pode envolver recombinação**

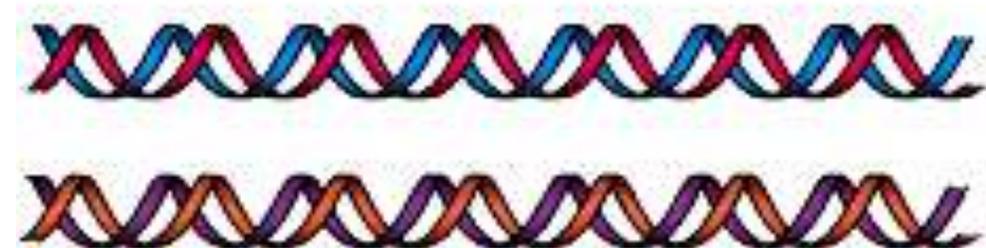
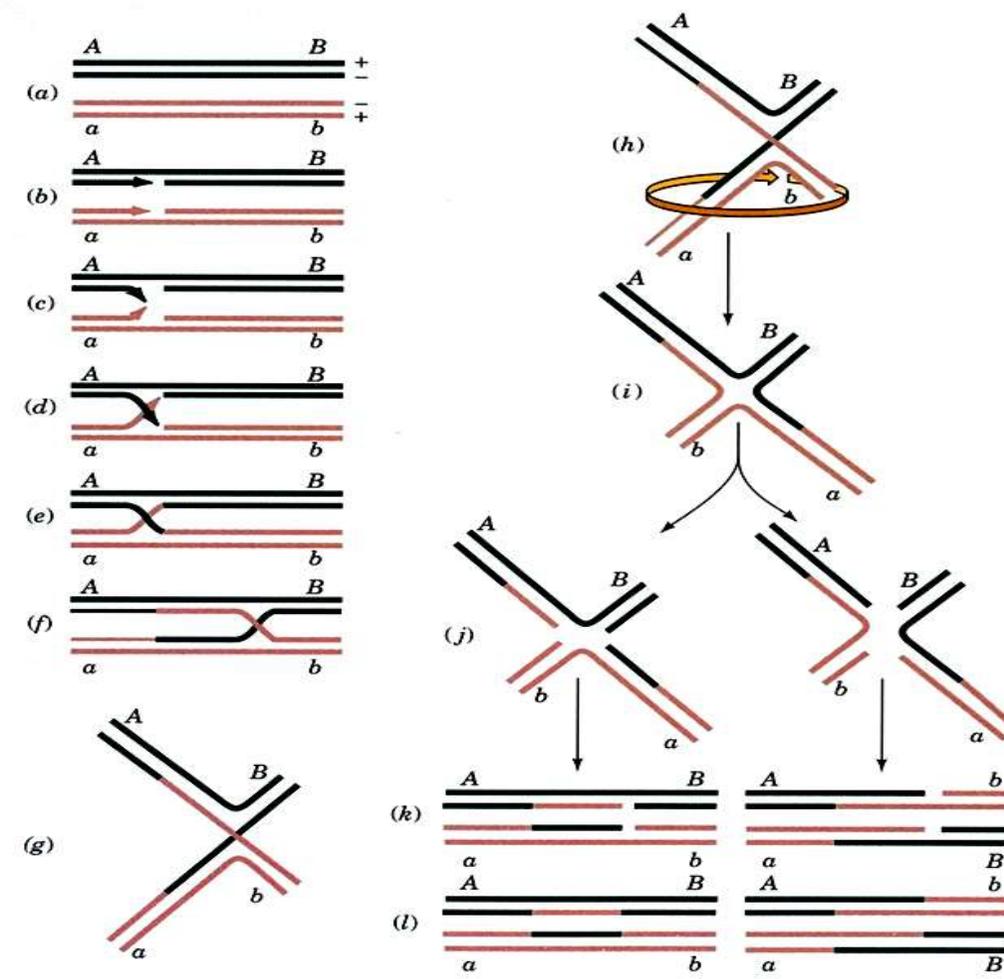
- **Pode envolver regiões homólogas para fornecer um molde similar**

## Recombinação Homóloga ou geral

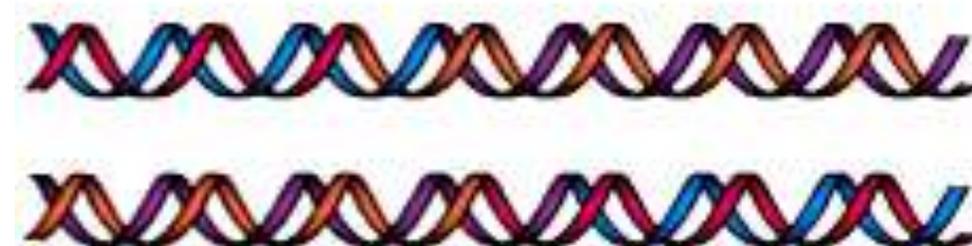
→ **Recombinação Geral** ocorre entre segmentos de DNA com extensa identidade

→ **Mecanismo** envolvido no reparo de DNA em células em replicação

→ **Mecanismo** envolvido na segregação cromossômica → **crossing-over** – entrecruzamento  
- **formação de cromossomas recombinantes**



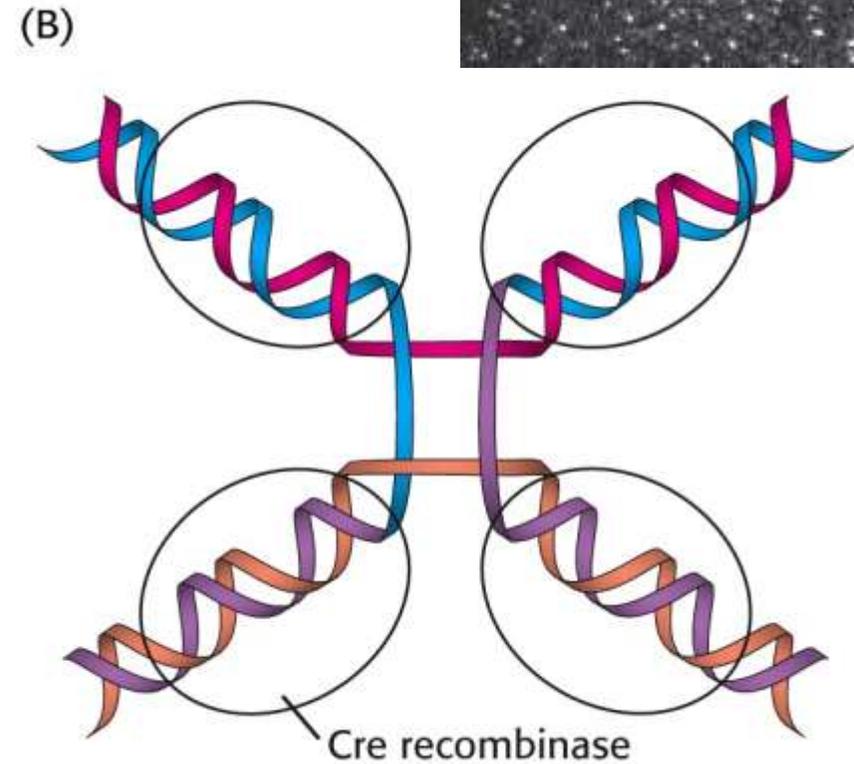
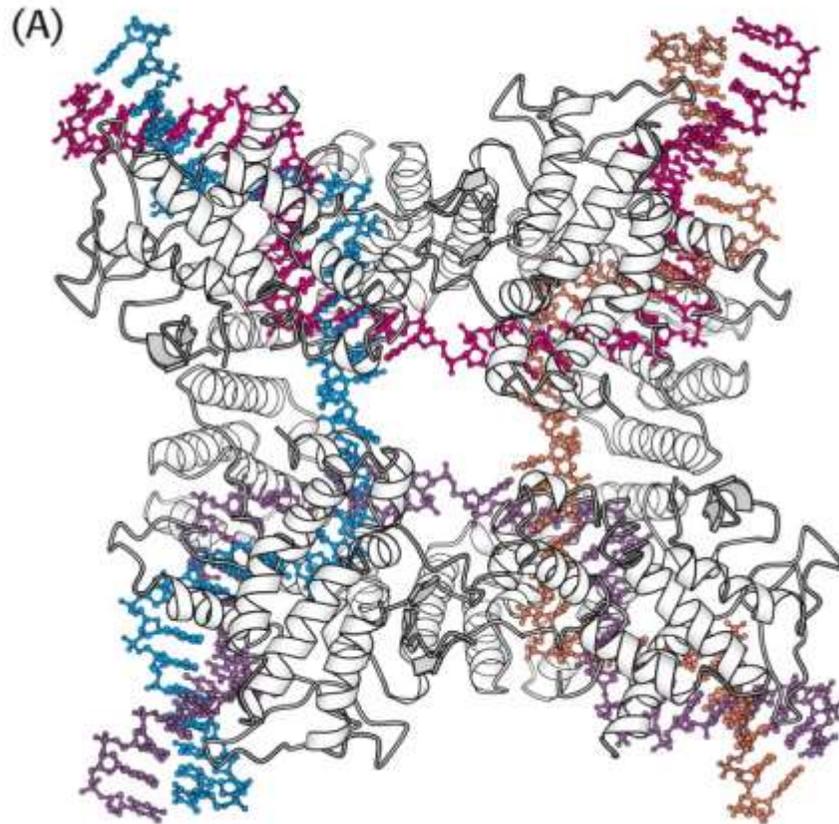
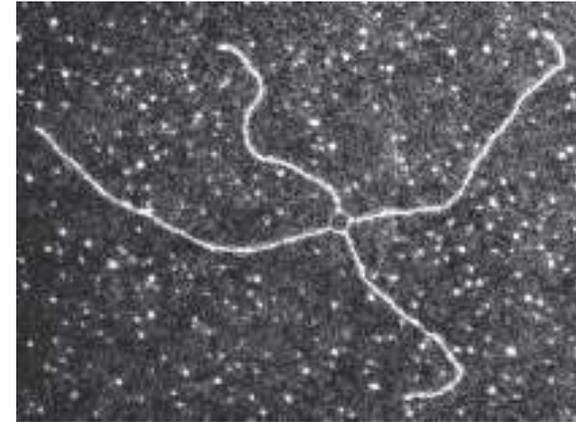
**Recombinação**



# Recombinação Homóloga ou geral

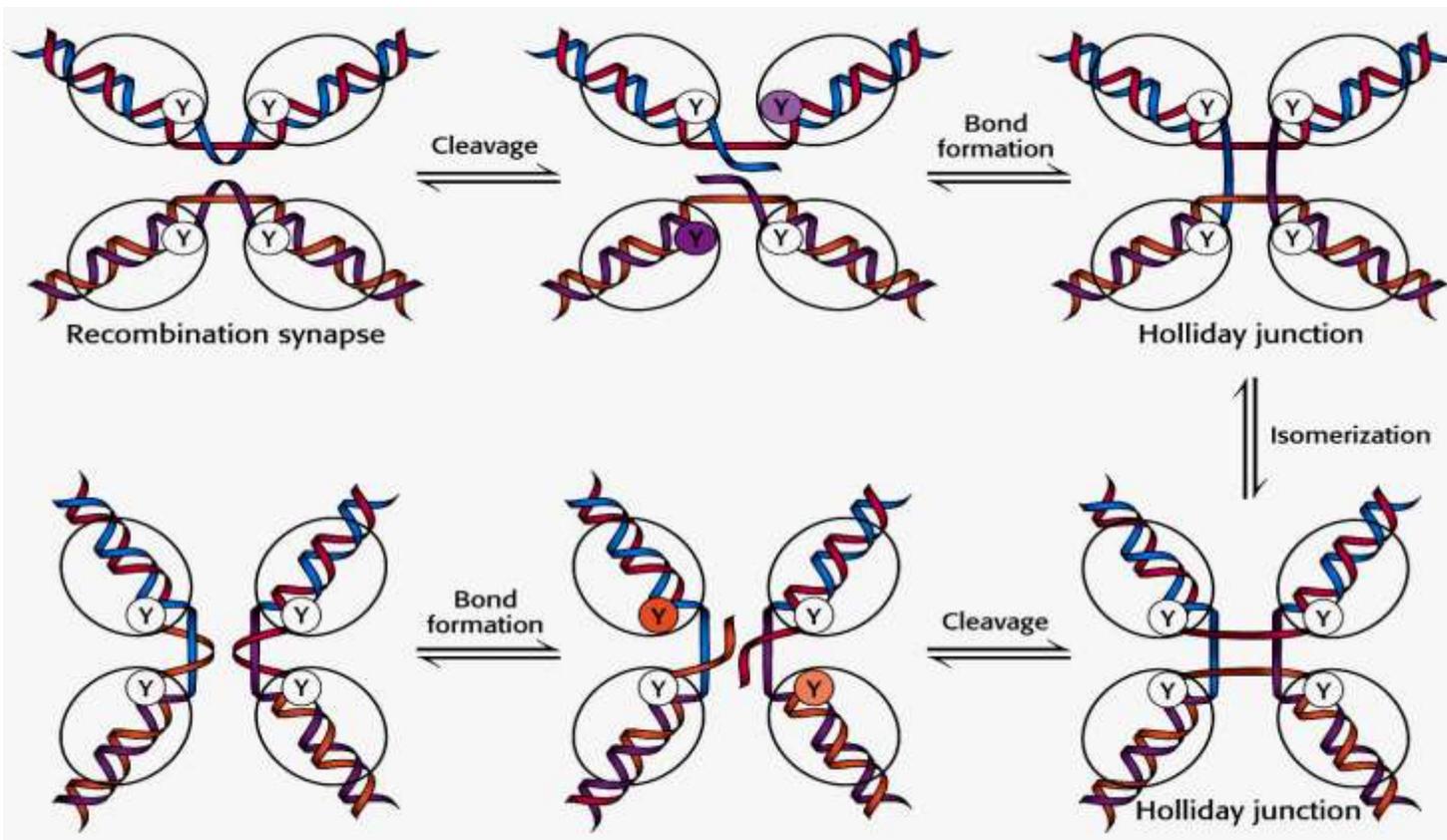
## Sistema de Recombinação homóloga

### Junção Holliday



## Recombinação Homóloga ou geral

- 1) 4 fitas de DNA se pareiam e são cortadas para formarem um novo pareamento
- 2) As fitas quase complementares no duplo-homólogo formam um segmento de DNA heterólogo



- 3) O segmento heterólogo é selado → Formação do crossing-over de 4 fitas de DNA → Junção Holliday → fitas entrecruzadas de heteroduplex
- 4) migração de ramificações em ambas as direções
- 5) Resolução ou Quebra da junção Holliday

## Recombinação Homóloga ou geral

- 1) Responsável pela diversidade genética da população
- 2) Responsável pela geração de anticorpos
- 3) Estratégia usada por vírus para a sua integração ao genoma do hospedeiro
- 4) Importante metodologia biotecnologia para a geração de organismos transgênicos

→ Muitas enzimas/proteínas envolvidas na replicação atuam na recombinação

