



UNIVERSIDADE
DE SÃO PAULO
85 ANOS
1934 · 2019



MECANISMOS DE REPARO DE DNA

Aparecida Maria Fontes

Ribeirão Preto – Outubro/ 2020

aparecidamfontes@usp.br



Departamento de Genética
USP Ribeirão Preto-FMRP

BIBLIOGRAFIA:

- ❑ The Basic Science of Oncology. Tannock, Hill, Bristow and Harrington. (2013). 5ª Edição. Editora McGraw Hill.
- ❑ Concepts of Genetics. Klug, Cummings, Spencer, Palladino e Killian. (2019). 12ª Edição. Editora Pearson.
- ❑ Genetics: from Gene to Genomes. Hartwell, Goldberg, Fischer e Hood. (2018). 6ª Edição. Editora McGraw Hill.
- ❑ The Human Genome in Health and Disease: A Story of four letters. Samuelson, T. (2019). 1ª Edição. Editora CRC.
- ❑ Managing Health in the Genomic Era. Henrich, V.C.; Orlando, L.A. And Shirts, B.H. (2020). 1ª Edição. Editora Elsevier e Academic Press.

Principais Tópicos

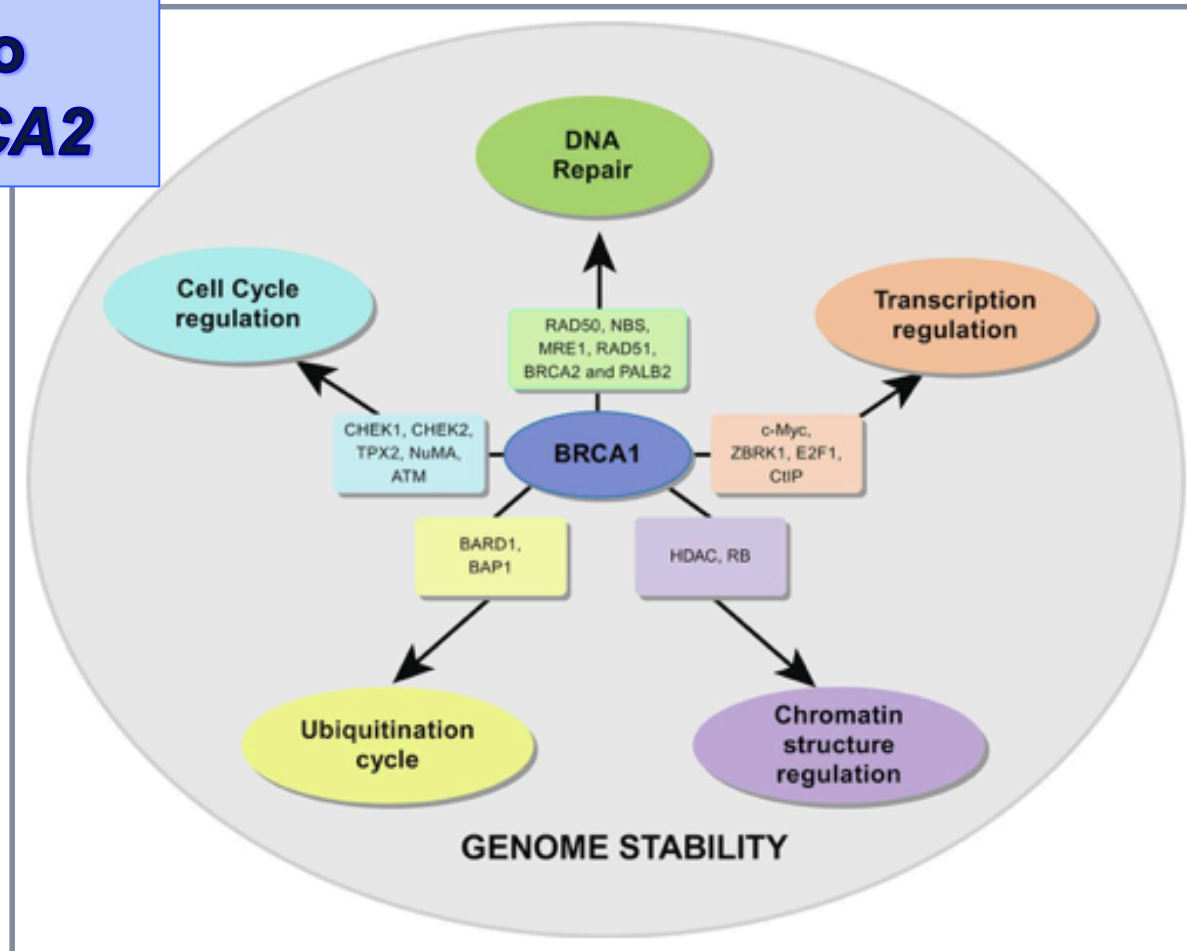
1. A importância dos sistemas de reparo.
2. Definição e Tipos de Sistemas de Reparo de DNA
3. Etapas gerais dos mecanismos de reparo
4. Reparo Direto (MGMT)
5. Reparo de malpareamento ou pareamento errôneo (MMR)
6. Reparo por excisão de bases (BER) ou nucleotídeos (NER)
7. Reparo de quebra de fita-dupla de DNA
8. Exercícios



Variante patogênica com elevada penetrância e remoção cirúrgica profilática.

1. A importância dos sistemas de reparo

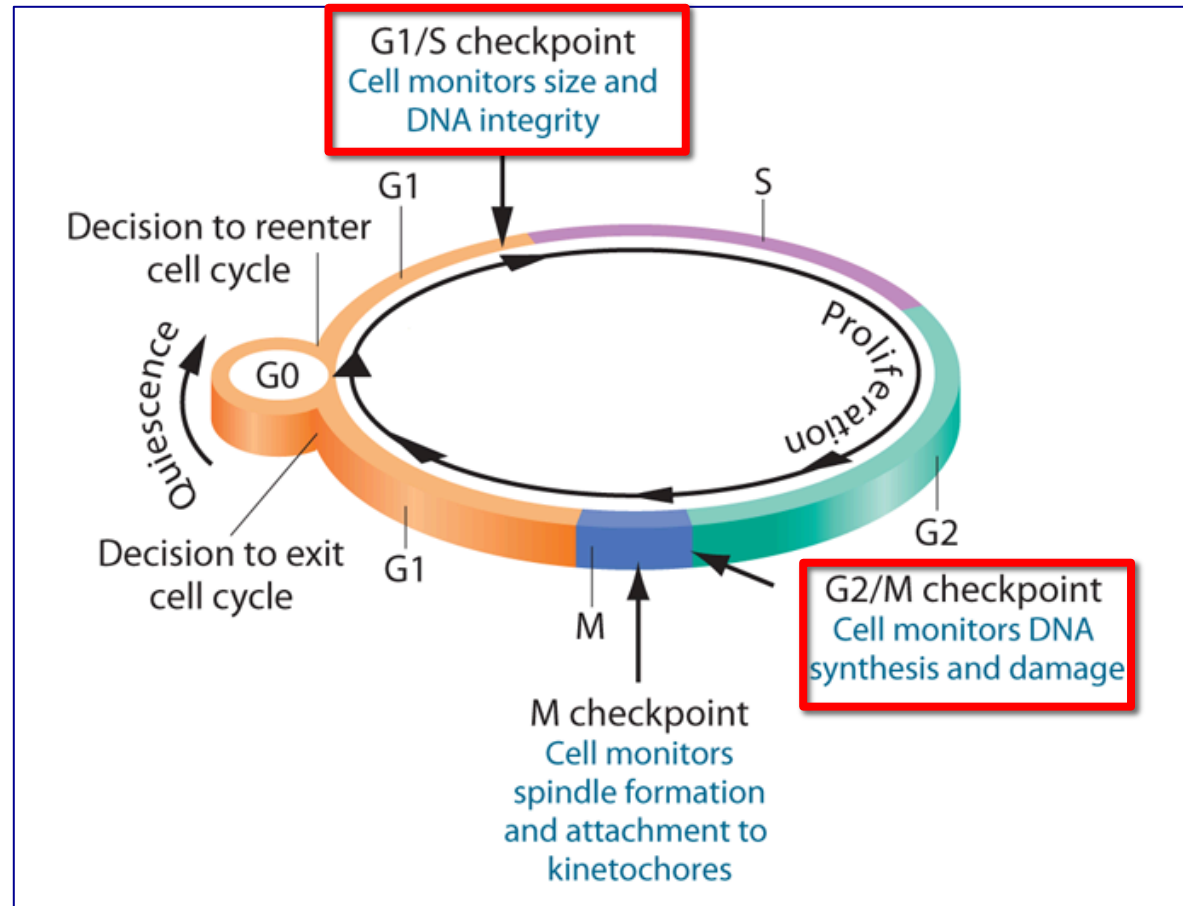
O exemplo **BRCA1/BRCA2**



A proteína **BRCA1** tem um papel central no **reparo por recombinação homóloga** em resposta a um dano no DNA. Também **interage** com muitas outras proteínas exercendo **influências** em vários outros **eventos celulares**

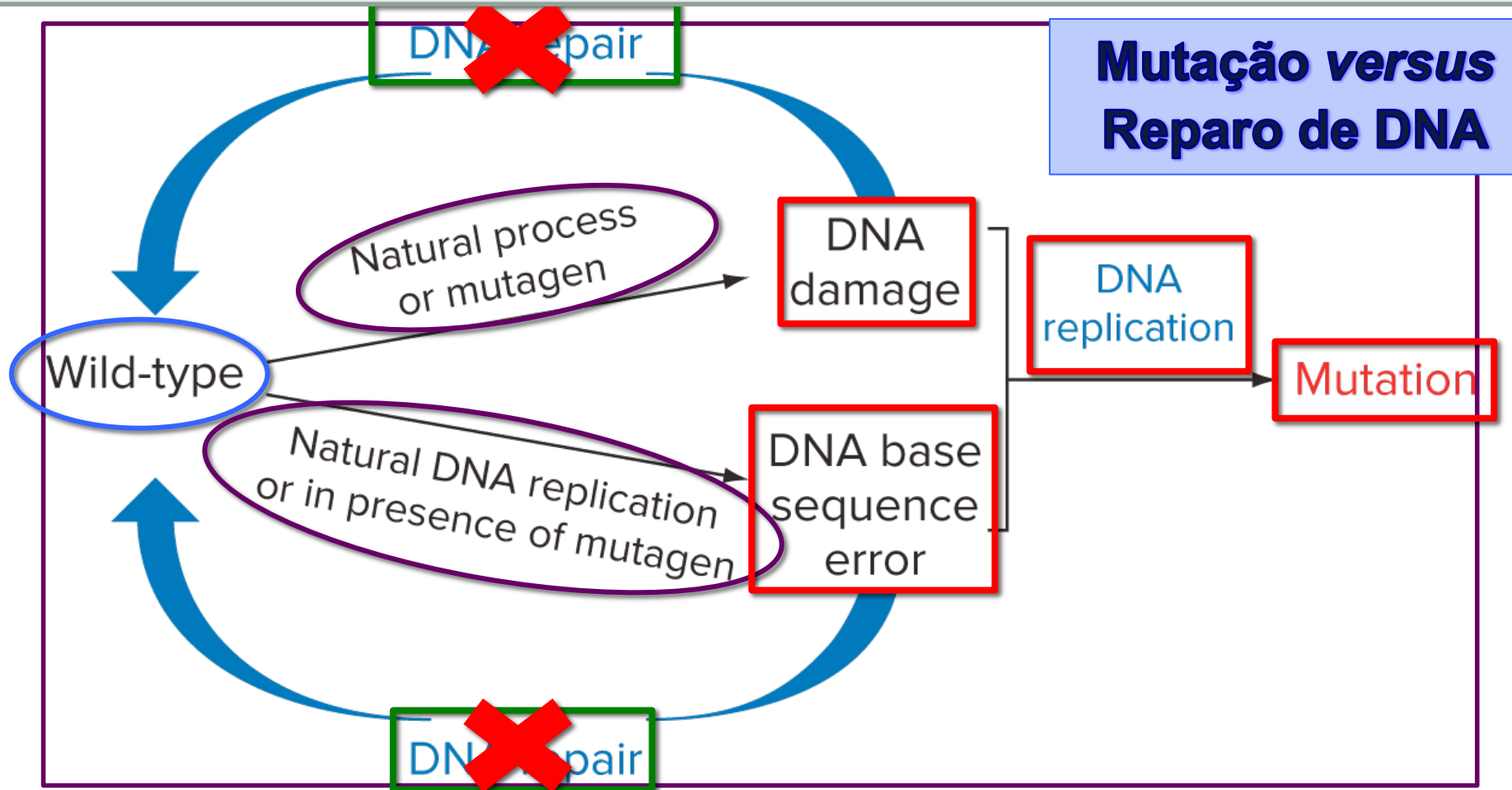
1. A importância dos sistemas de reparo

Ciclo celular versus Reparo de DNA



No ciclo celular há 2 checkpoints **G1/S** e **G2/M** em que a célula monitora a integridade do DNA. Se o DNA estiver lesionado, o ciclo celular é interrompido, o sistema de reparo ativado antes que o ciclo celular prossiga.

1. A importância dos sistemas de reparo



Mutação no DNA   estabelecida somente se os sistemas de reparo de DNA não corrigirem a lesão do DNA antes do próximo ciclo de replicação do DNA.

1. A importância dos sistemas de reparo

The Nobel Prize in Chemistry 2015



© Nobel Media AB. Photo: A. Mahmoud

Tomas Lindahl

BER



© Nobel Media AB. Photo: A. Mahmoud

Paul Modrich

MMR



© Nobel Media AB. Photo: A. Mahmoud

Aziz Sancar

NER

2. Definição e Tipos de Sistemas de Reparo

Processos celulares essenciais para a manutenção da integridade genética do organismo.

Há seis principais mecanismos de reparo do DNA.

Variantes patogênicas em genes envolvidos nesses sistemas de reparo aumentam o risco do desenvolvimento de câncer ao longo da vida.

Entretanto, um indivíduo que herdou uma variante potencialmente patogênica de um dos pais, via de regra, herda uma variante normal e funcional do outro parental.

2. Definição e Tipos de Sistemas de Reparo

1. Reparo Direto: MGMT

2. Reparo de malpareamento ou pareamento errôneo (MMR)

3. Reparo de Excisão de Base (BER)

4. Reparo de Excisão de Nucleotídeo (NER)

5. Reparo de quebra da fita-dupla de DNA

5.1. Reparo por junção das extremidades não homólogas (NHEJ)

5.2. Reparo por recombinação homóloga (HRR)

2. Definição e Tipos de Sistemas de Reparo

Endogenous or environmental

- SAM
- Nitrosated amines and bile acids
- Dietary nitrosamines

- ROS
- SAM
- Natural IR
- Base deamination or loss
- Trapped TOPOI

- ROS
- UV
- Tobacco smoke
- Aflatoxin

- Replication errors
- SAM
- Base deamination

- ROS
- Natural IR
- Trapped TOPOII

Unrepaired single strand lesions

Lesion

10-30

O⁶-methyl-guanine

10,000-100,000

- 8-oxoguanine
- N⁷-meG
- N³-meA
- Uracil
- Hypoxanthine
- Xanthine
- SSB

- 6-4 photo-products
- Cyclopurines
- Bulky adducts

Base mismatches

DNA double-strand breaks

10-50

Stalled replication forks

Therapeutic

- TMZ
- Alkylating agents
- Nitrosoureas

- TMZ
- IR
- Radiomimetics
- TOPOI poisons
- Antimetabolites

- Cisplatin
- Carboplatin
- Nitrosoureas

- TMZ
- Nucleoside analogues

- IR
- Radio-mimetics
- TOPOI poisons

- TMZ
- TOPOI poisons
- Anti-metabolites

Repair pathway

Direct repair

- BER
- SSBR

NER

MMR

NHEJ

HRR

3. Etapas gerais de uma via de reparo

1. RECONHECIMENTO

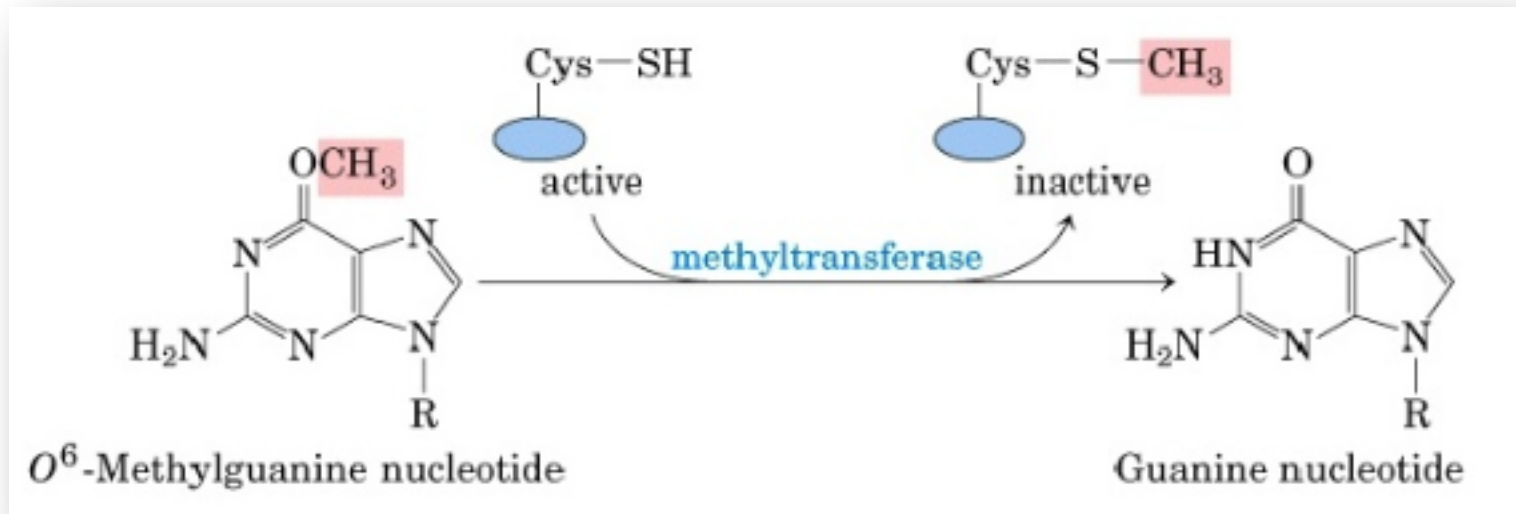
2. EXCISÃO

3. SÍNTESE DE DNA

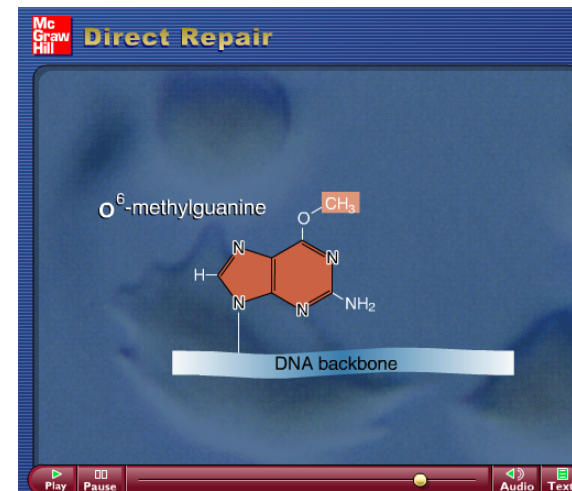
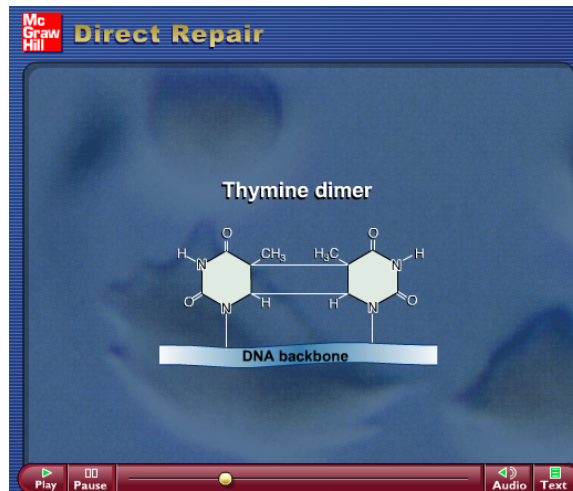
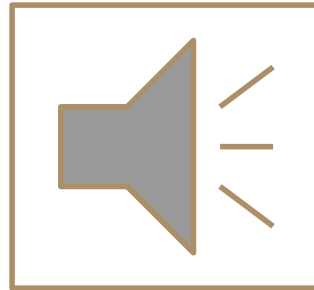
4. LIGAÇÃO

4. Reparo Direto: MGMT

Reação realizada por uma única enzima que reconhece a base modificada e transfere a lesão para o seu sítio ativo.



3. Reparo Direto: MGMT

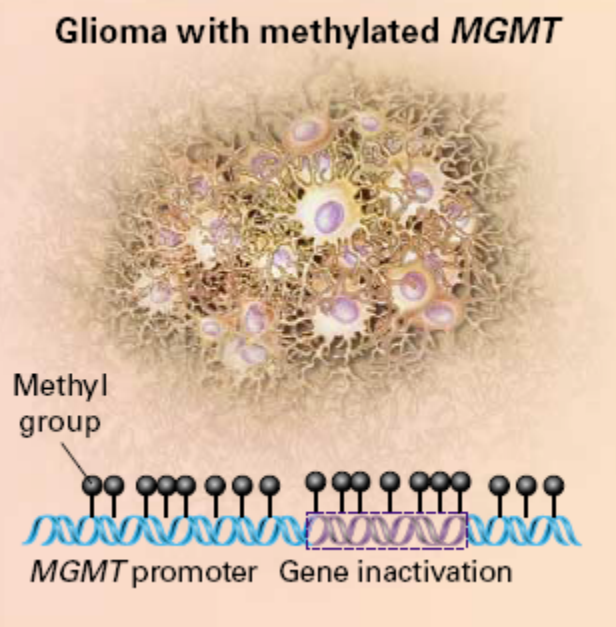


<http://highered.mheducation.com/sites/dl/free/0072835125/126997/animation32.html>

4. Reparo Direto: MGMT

Silenciamento de MGMT em tumores cerebrais

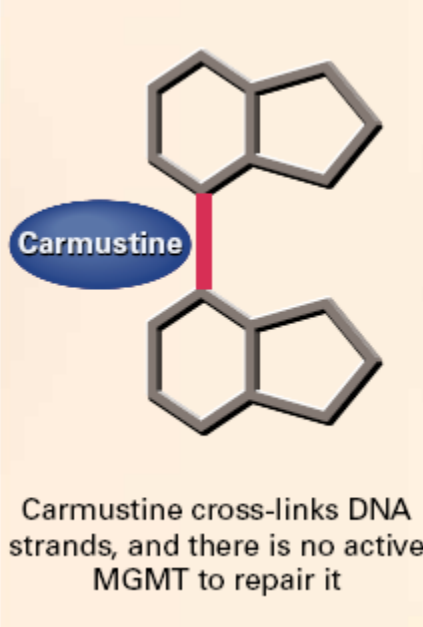
Glioma with methylated MGMT



Methyl group

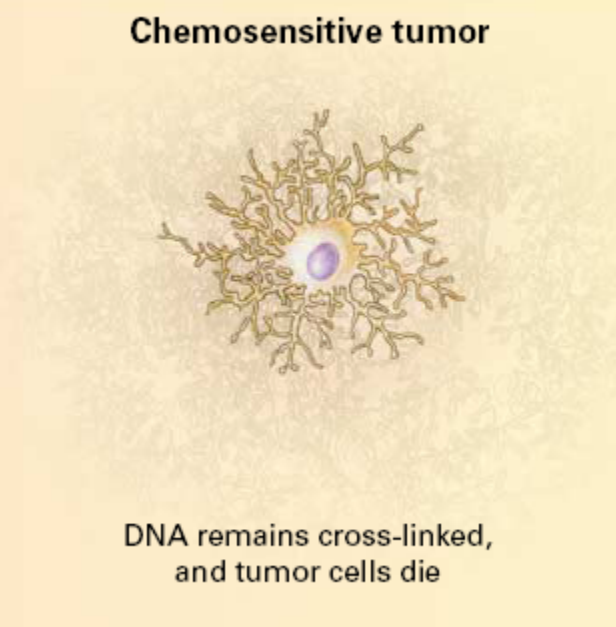
MGMT promoter Gene inactivation

Carmustine



Carmustine cross-links DNA strands, and there is no active MGMT to repair it

Chemosensitive tumor



DNA remains cross-linked, and tumor cells die

- **Metilação da região promotora do gene MGMT em gliomas confere uma boa resposta a agentes alquilantes**

5. Reparo de malpareamento (MMR)

❖ É acionado quando durante a replicação do DNA:

1) uma base é incorporada erroneamente .

2) é criada uma distorção da dupla-hélice devido a deleção e/ou inserção de uma base em regiões de microsatélite.

1. RECONHECIMENTO

MutS, MutL e MutH

2. EXCISÃO

MutS e MutL

3. SÍNTESE DE DNA

DNA polimerase

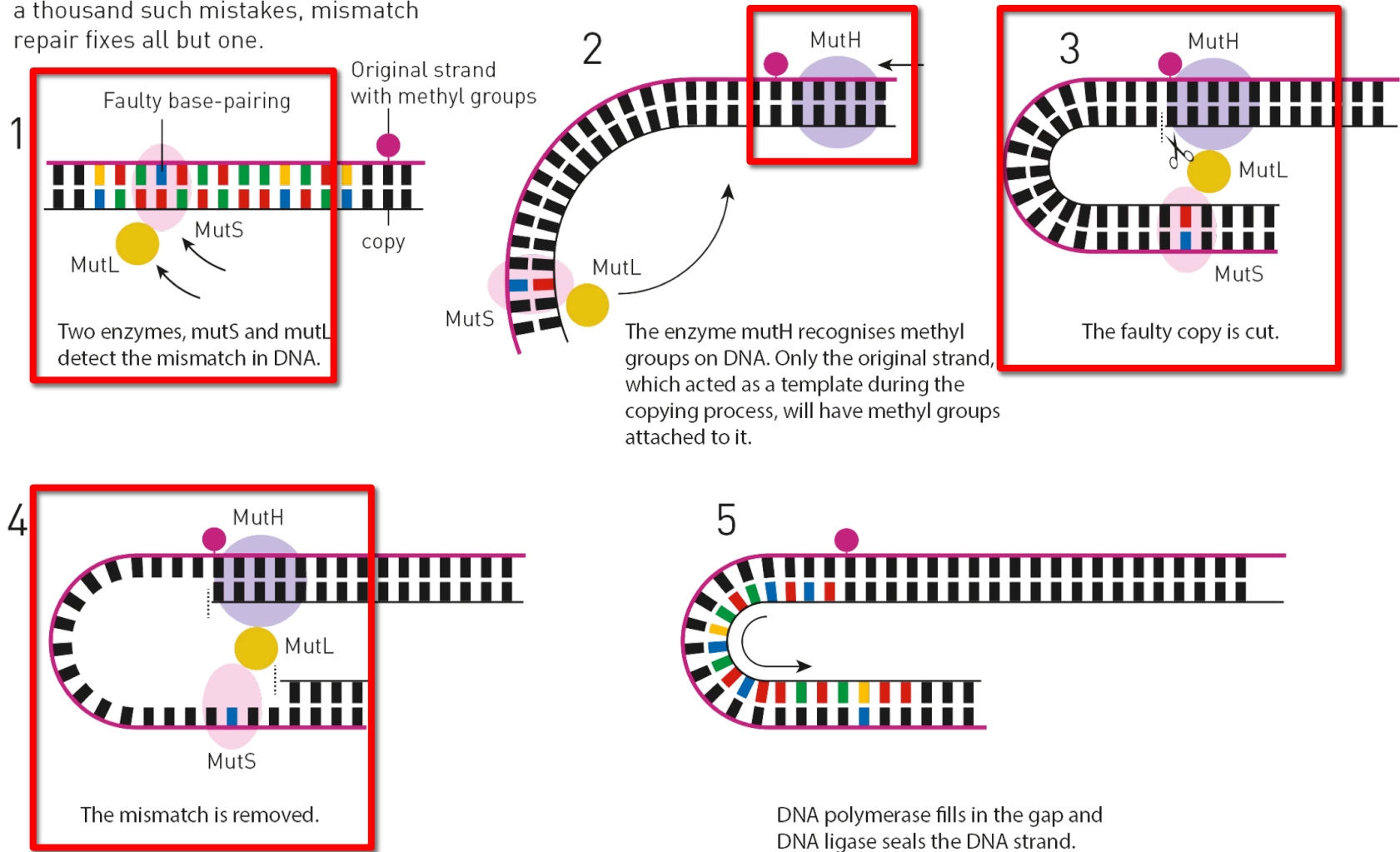
4. LIGAÇÃO

DNA ligase

5. Reparo de malpareamento (MMR)

Mismatch repair

When DNA is copied during cell division, mismatching nucleotides are sometimes incorporated into the new strand. Out of a thousand such mistakes, mismatch repair fixes all but one.

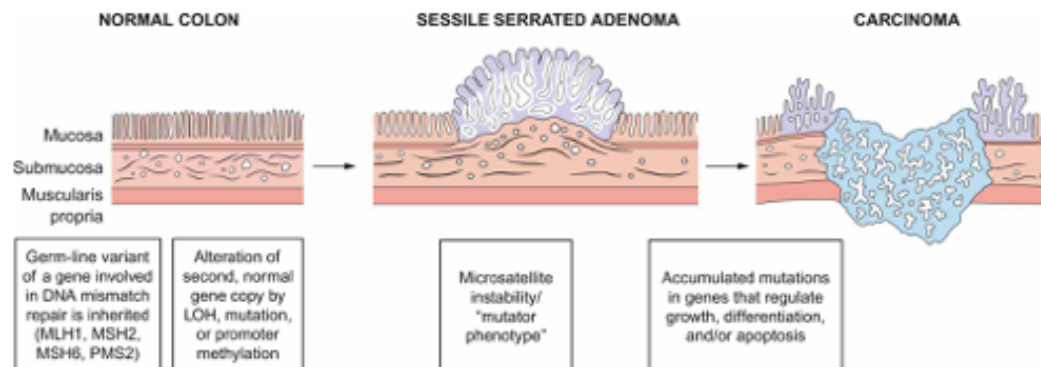


REPARO DE MALPAREAMENTO

Síndrome de *Lynch* ou Câncer
Colorretal Hereditário Não
Poliposo (HNPCC)

5. Reparo de malpareamento (MMR)

Síndrome de Lynch



Se o indivíduo herdar uma variante genética patogênica $MLH1^+MLH1^-$ nenhum efeito será observado, uma vez que a outra cópia parental é funcional.

❖ Se o segundo alelo é danificado ou inativado ($MLH1^-/MLH1^-$) é formado um adenoma, devido a incapacidade de reparar danos no DNA. A perda do segundo alelo funcional é conhecido como *perda da heterozigosidade*.

Como consequência, novas mutações podem surgir e a célula perde a capacidade de regular o ciclo celular resultando em carcinoma.

5. Reparo de malpareamento (MMR)

Síndrome de Lynch

Padrão de herança: autossômica dominante.

Fenótipo clínico: aumento nas taxas de mutações com acúmulo progressivo de mutações em APC, P53 e outros genes que contribuem para a condição maligna das células epiteliais do colo e reto.

Diagnóstico molecular: variantes patogênicas em diferentes genes do sistema de reparo MMR [MLH1 (50%), MSH2 (40%) e MSH6 (10%)].

❖ **Deficiência na replicação de regiões de microsatélite resultando em instabilidade de microsatélite com a presença de 4 a 40 repetições de mono ou dinucleotídeos TTTT ou CACACA ao longo do genoma.**

6. Reparos: BER e NER

Reparo por excisão de bases (BER)

1. RECONHECIMENTO

DNA Glicosilase

2. EXCISÃO

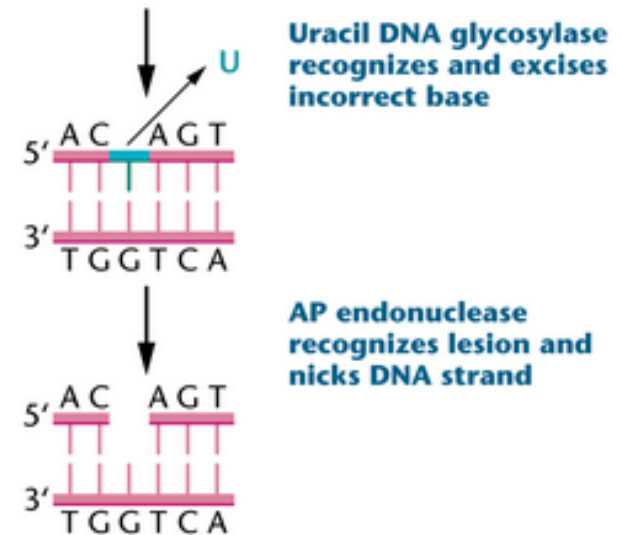
DNA Glicosilase e AP endonuclease

3. SÍNTESE DE DNA

DNA polimerase

4. LIGAÇÃO

DNA ligase

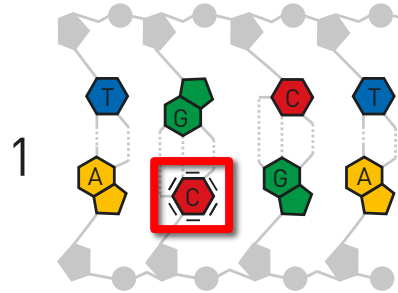


6. Reparos: BER e NER

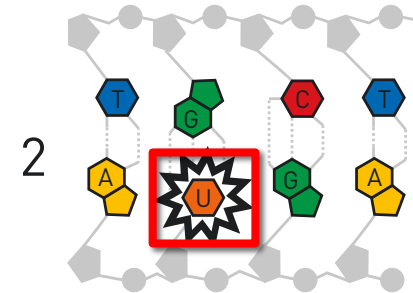
Reparo por excisão de bases (BER)

Base excision repair

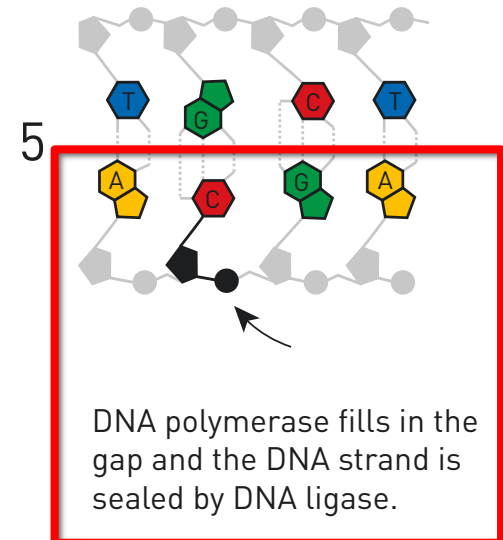
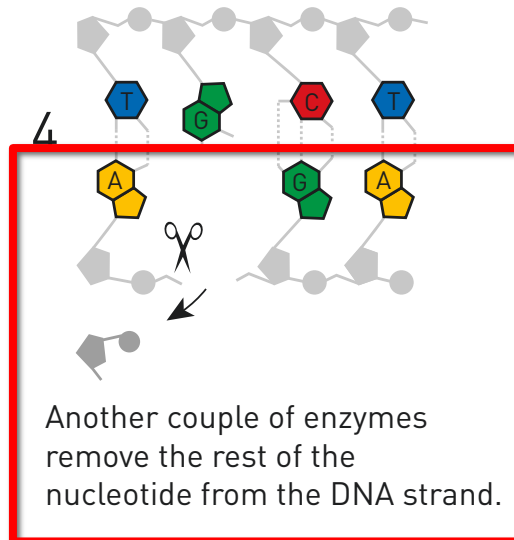
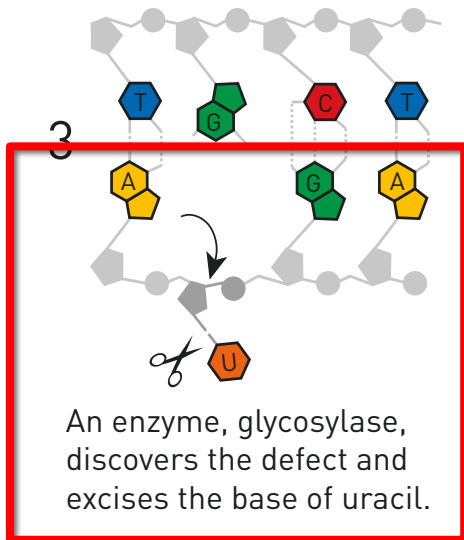
Base excision repairs DNA when a base of a nucleotide is damaged, for example cytosine.



Cytosine can easily lose an amino group, forming a base called uracil.



Uracil cannot form a base pair with guanine.



6. Reparos: BER e NER

Reparo por excisão de nucleotídeos (NER)

1. RECONHECIMENTO

XPC, XPE e XPA

2. EXCISÃO

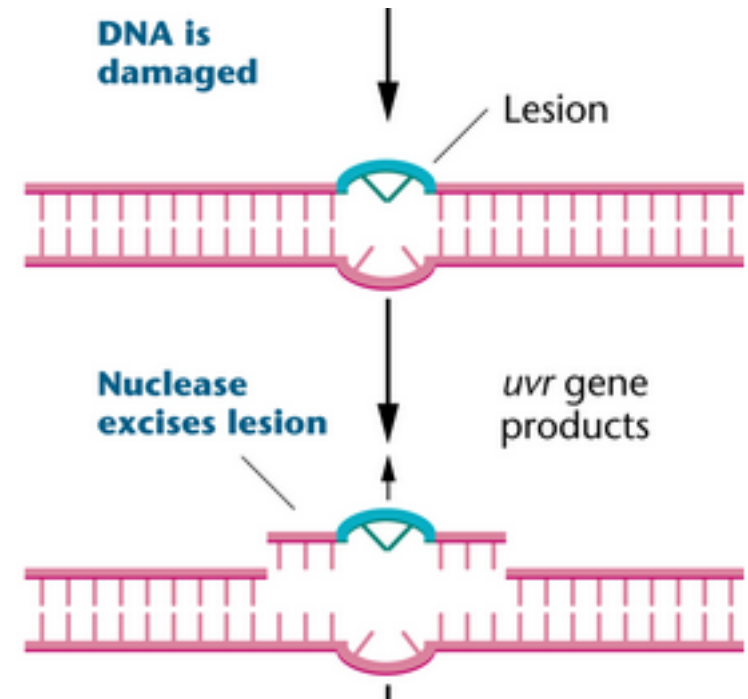
XPF e XPG

3. SÍNTESE DE DNA

DNA polimerase

4. LIGAÇÃO

DNA ligase

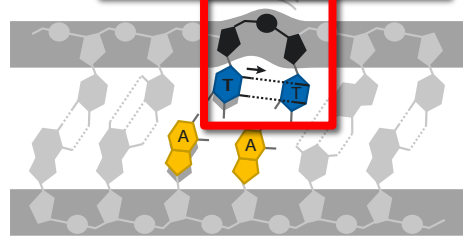
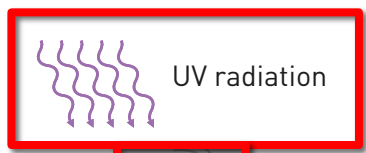


6. Reparos: BER e NER

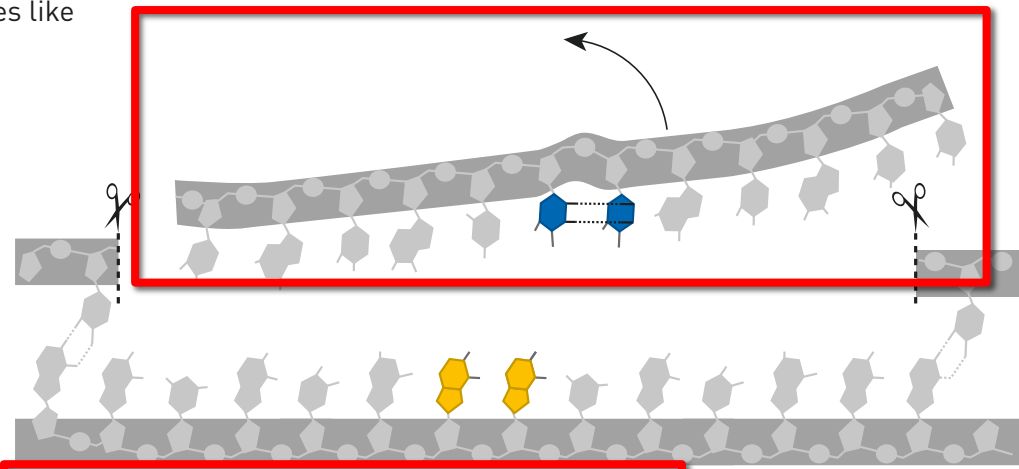
Reparo por excisão de nucleotídeos (NER)

Nucleotide excision repair

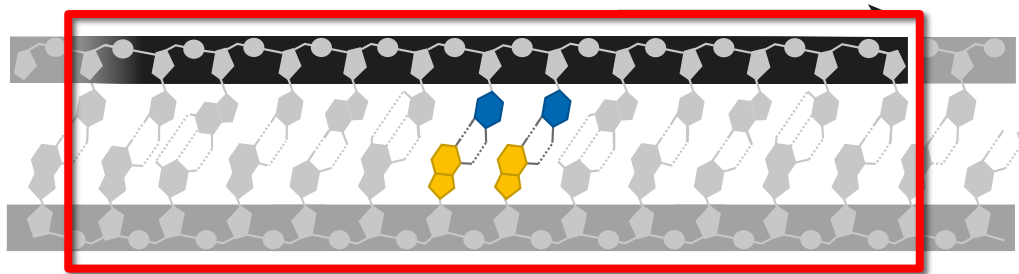
Nucleotide excision repairs DNA-injuries caused by UV radiation or carcinogenic substances like those found in cigarette smoke.



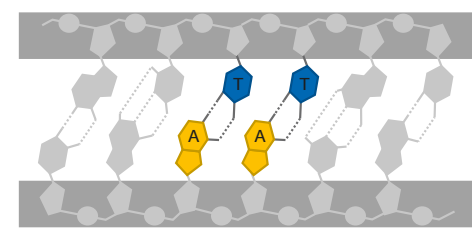
1 UV radiation can make two thymines bind to each other incorrectly.



2 The enzyme exinuclease finds the damage and cuts the DNA strand. Twelve nucleotides are removed.



3 DNA polymerase fills in the resulting gap.



4 DNA ligase seals the DNA strand. Now the injury has been dealt with.

REPARO POR EXCISÃO DE NUCLEOTÍDEOS

Xeroderma Pigmentoso e
Síndrome de Cockayne

Xeroderma pigmentoso



Proteção da luz solar previne o acúmulo de mutações causados pela UV e a evolução da doença.

Padrão de herança: autossômica recessiva.

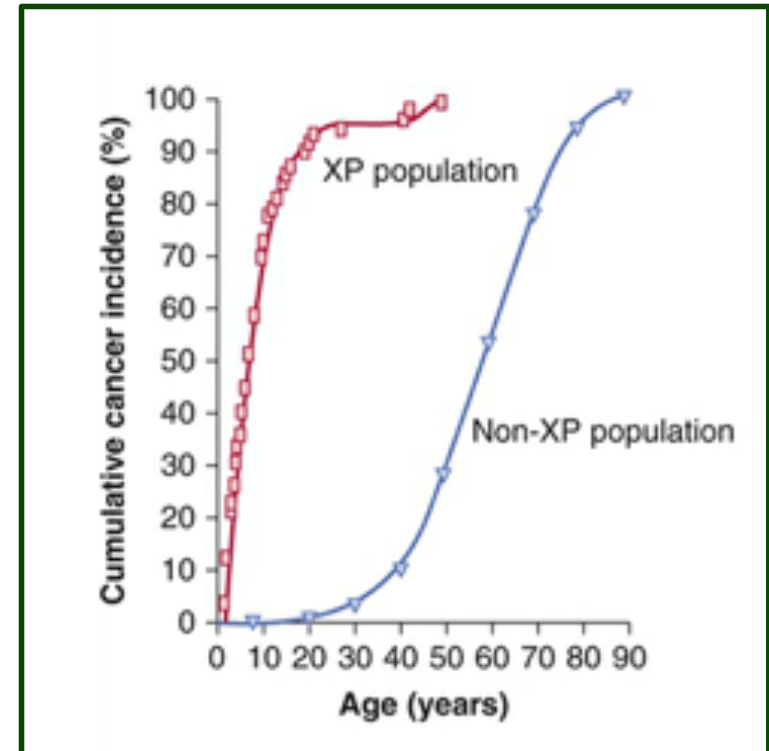
Fenótipo clínico: extrema sensibilidade aos raios UV da luz solar, risco aumentado de câncer de pele e problemas cognitivos.

Diagnóstico molecular: variantes patogênicas em diferentes genes do sistema de reparo NER [XPA, ERCC3 (XPB), XPC, ERCC2 (XPD), ERCC4 (XPF), DDB2, ERCC5 e POLH].

Xeroderma pigmentoso

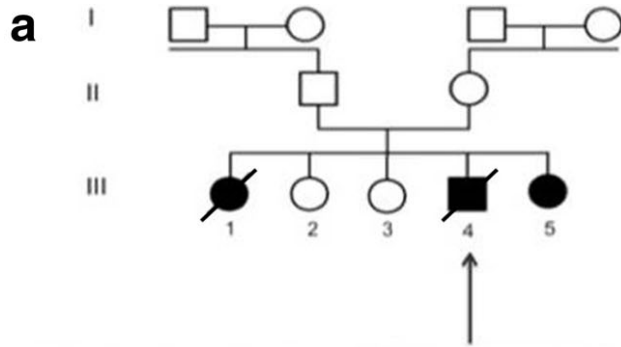
- ❖ **Aumento da incidência de câncer em pacientes com xeroderma pigmentoso (XP).**

Incidência de câncer de pele em pessoas com XP comparado com a população não afetada com XP.



Reparo por excisão de nucleotídeos

Síndrome de Cockayne



Padrão de herança: autossômica recessiva.

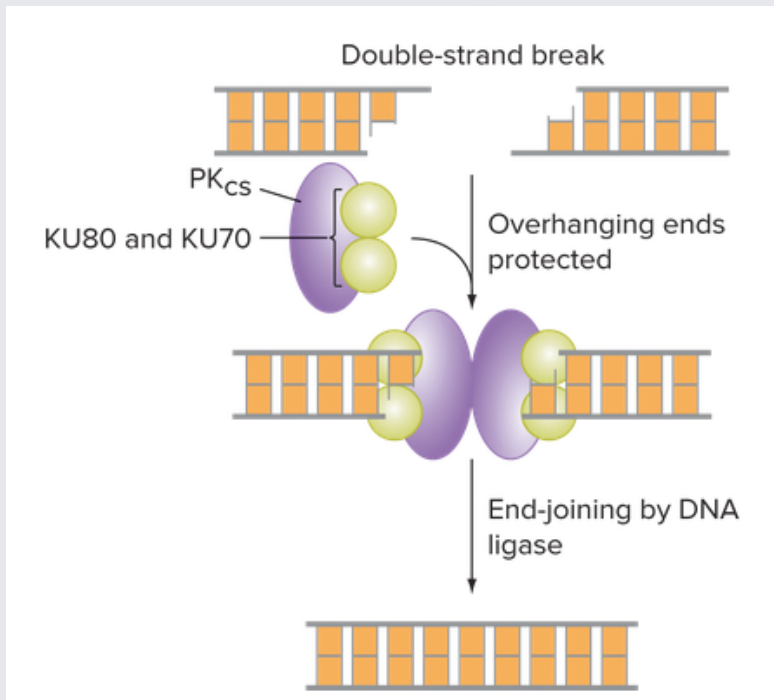
Fenótipo clínico: neuropatia periférica, atraso no desenvolvimento, degeneração neurológica progressiva, baixa estatura, sensibilidade a luz solar sem aumento em risco para câncer.

Diagnóstico molecular: variantes patogênicas em genes do sistema de reparo NER: ERCC-8 (OMIM: 216400) ou ERCC-6 (OMIM 133540).

7. Reparo de quebra de fita-dupla

NHEJ

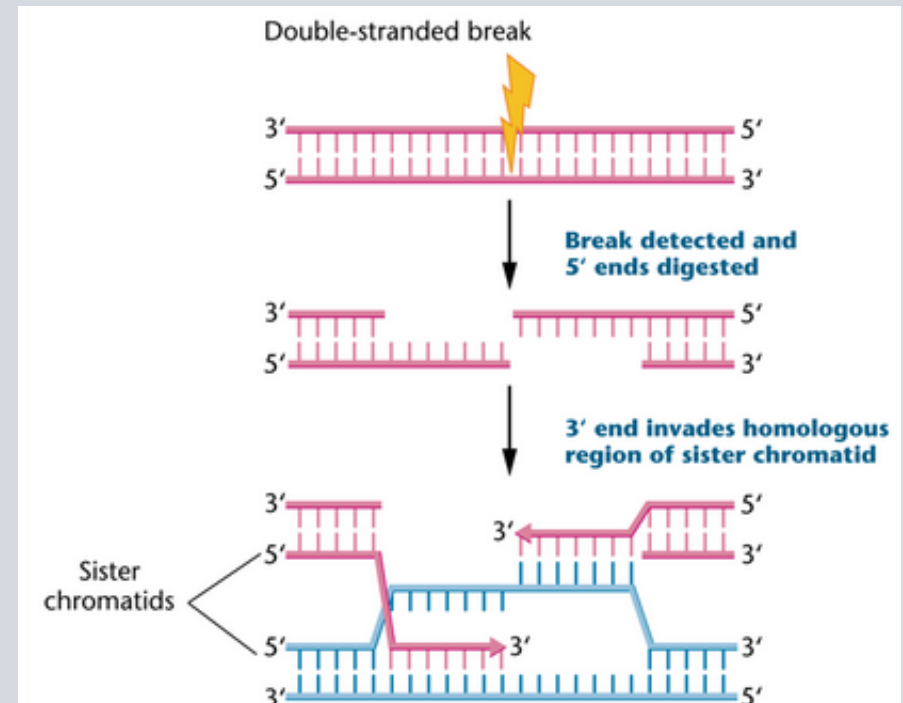
7.1. Junção dos Terminais Não Homólogos



In Hartwell et al, 2018 –
Genetics: from Genes to Genome – Chapter 7

HRR

7.2. Reparo por Recombinação Homóloga

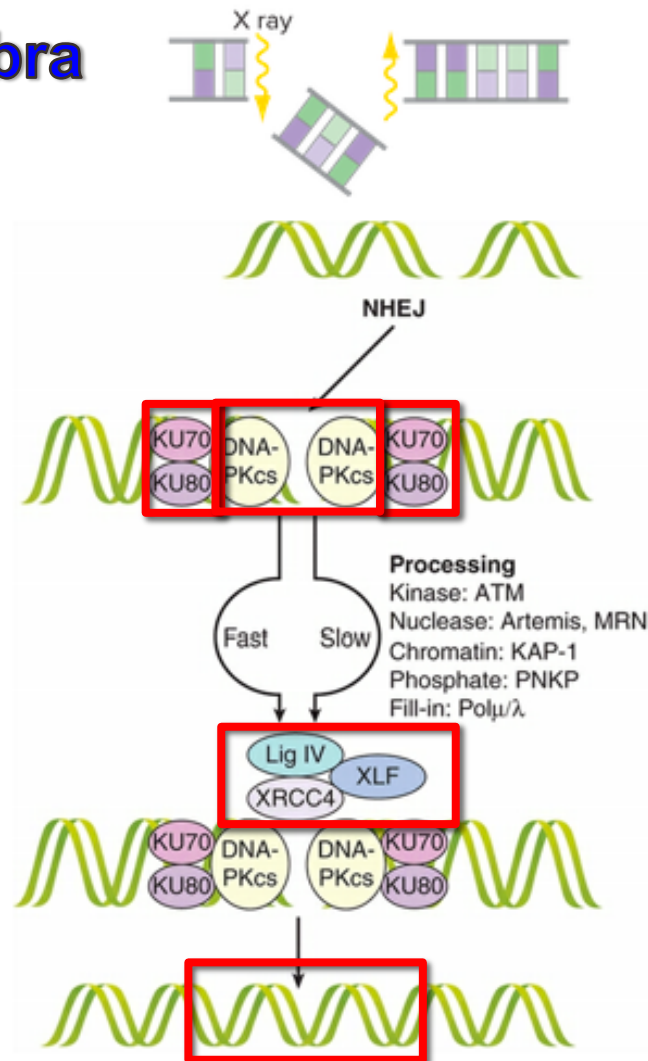


In Klug et al, 2019 –
Concepts of Genetics – Chapter 15

7. Reparo de quebra de fita-dupla

7.1. Junção dos terminais não homólogos

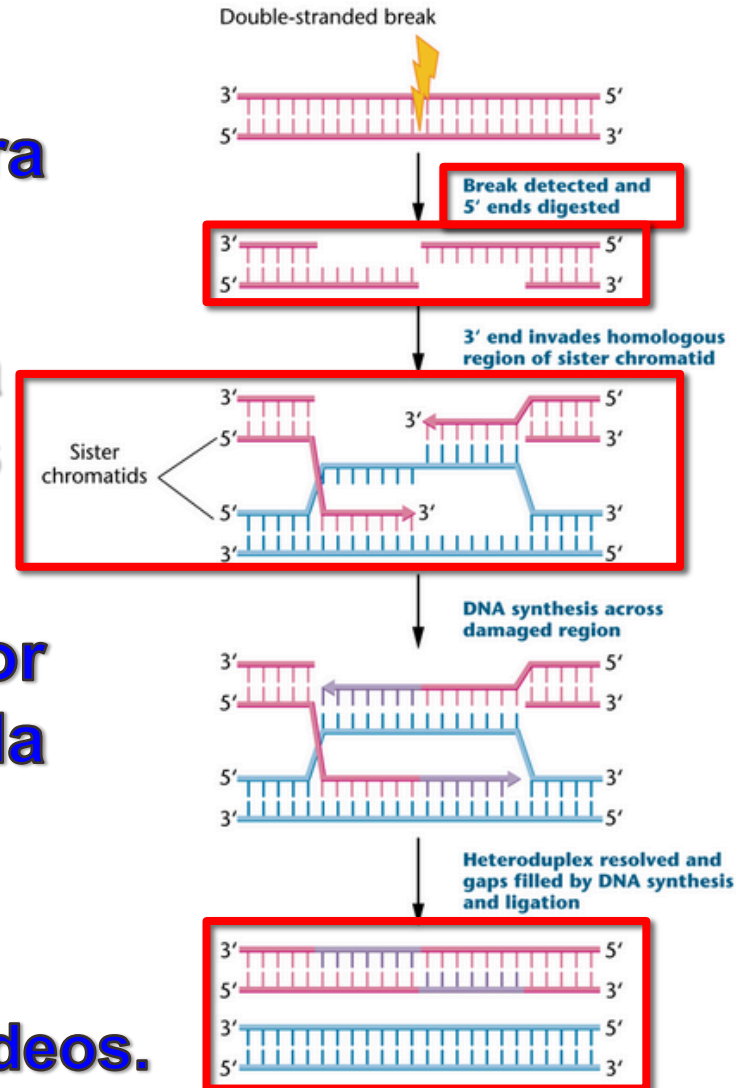
- ❖ Exposição do DNA a raio-X e quebra da fita-dupla;
- ❖ A enzima heterodimérica (KU70/80) reconhece a quebra da fita dupla;
- ❖ Recrutamento das enzimas DNA-PKcs;
- ❖ Com o auxílio de um complexo proteico a DNA ligase une os terminais do DNA onde ocorreu a quebra;
- ❖ Pode ocorrer a perda de alguns nucleotídeos.



7. Reparo de quebra de fita-dupla

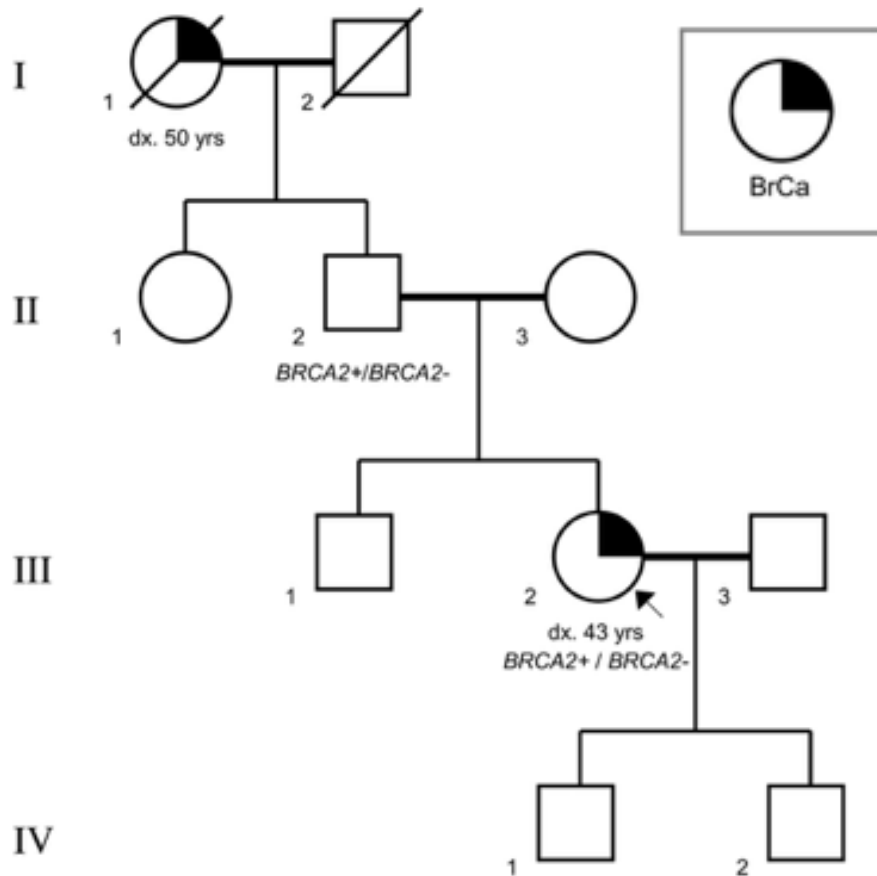
7.2. Reparo por Recombinação Homóloga

- ❖ A enzima reconhece a quebra da fita dupla;
- ❖ Os terminais 5' da fita quebrada são digeridos deixando terminais coesivos;
- ❖ Ocorre a síntese do DNA por complementariedade da cromátide irmã;
- ❖ DNA ligase;
- ❖ Não ocorre a perda de nucleotídeos.



7. Reparo de quebra de fita-dupla

7.2. Reparo por Recombinação Homóloga



Homologous Recombination Repair

Sensors:

MRE11/RAD50/NBS
ATM-CHK2
RPA
ATR-CHK1
and others

Mediators:

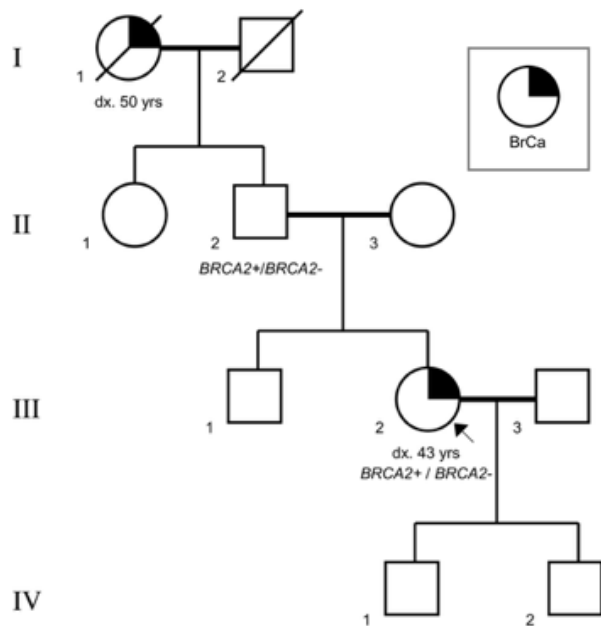
BRCA1/BARD1
CtIP
PALB2(FANCN)
Fanconi core complex
FANCD2/FANCI
and others [51]

Repair:

RAD51
RAD51B, RAD51C,
RAD51D, XRCC2, XRCC3
RAD52
RAD54
BRCA2(FANCD1)
BACH1(FANCI), FANCM,
RECQ1, RECQ5,
BLM/TOPOIII α
and others

7. Reparo de quebra de fita-dupla

7.2. Reparo por Recombinação Homóloga



Paciente de 43 anos surpresa de desenvolver câncer de mama agressivo, sendo que seus pais não desenvolveram esse tipo de câncer.

Médico geneticista encoragou-a a buscar informações de outros parentes.

A avó paterna tinha tido câncer de mama e faleceu aos 50 anos.

A variante patogênica *BRCA2* foi encontrada em seu pai.

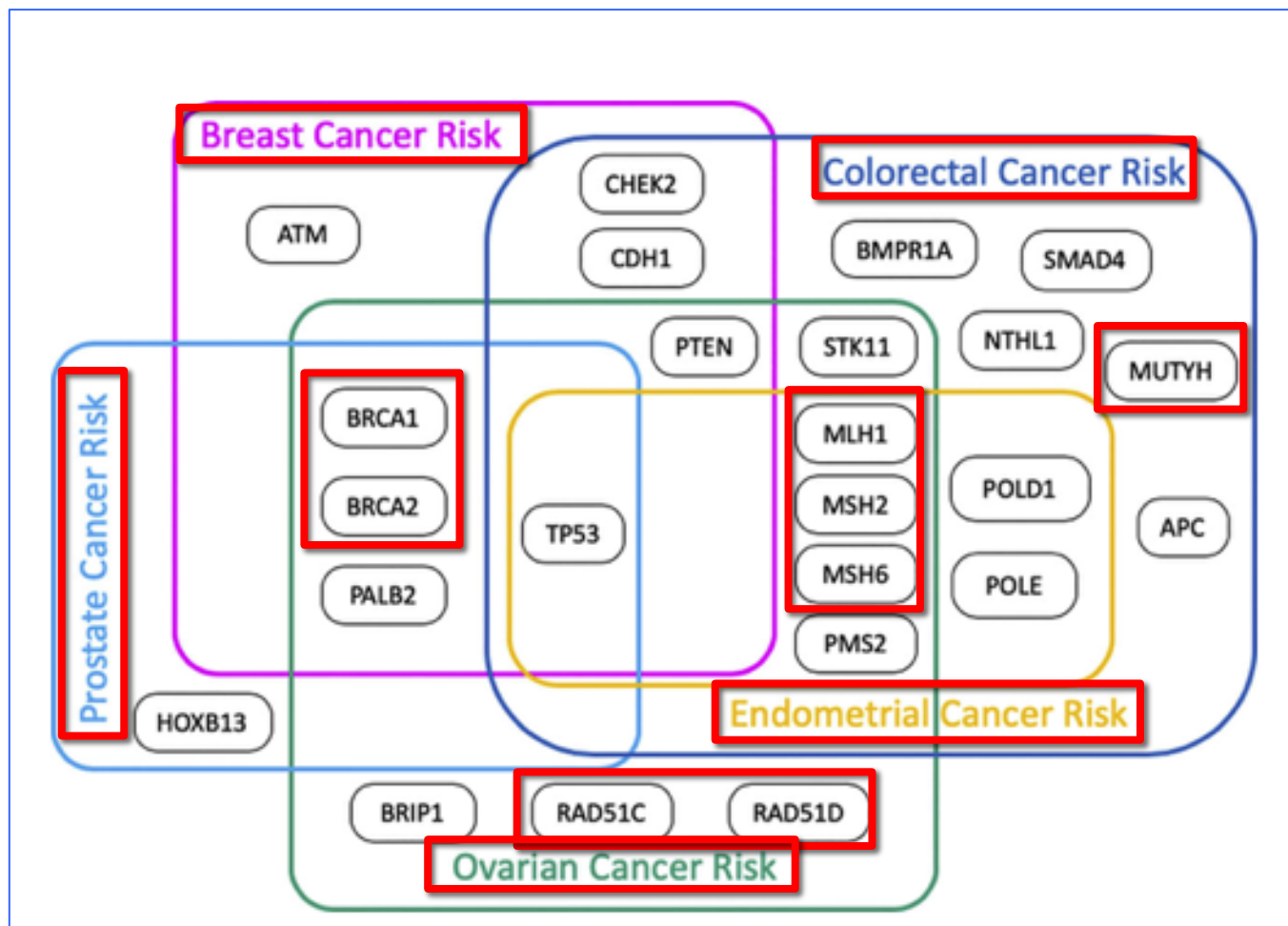
A investigação sobre a presença ou não da variante patogênica em seus filhos deve ser realizada.

Exemplo típico de que considerando o tamanho das famílias e a penetrância incompleta das síndromes hereditárias é aconselhável buscar informações por 3 gerações.

REPARO DE QUEBRA DE DUPLA-FITA DE DNA

**Predisposição para câncer de
mama e outros tipos câncer**

Variantes patogênicas dos sistemas de reparo



A relação entre variantes patogênicas: variantes de genes de reparo, associadas com o risco de desenvolvimento de câncer de mama e outros tipos de cânceres

REVISANDO CONCEITOS

1. Como classificar os mecanismos de reparo pelos quais as células podem reparar o DNA com nucleotídeos alterados ou lesionados?

2. Quais as principais diferenças entre o reparo por recombinação homóloga e o reparo dos terminais não homólogos no reparo de quebra da dupla-fita?

3. Como o reparo de mal-pareamento distingue a fita que deve ser reparada quando o erro ocorre ao longo da duplicação do DNA?

4. Quais as potenciais consequências para a saúde de mutações em genes responsáveis pelos sistemas de reparo?