



UNIVERSIDADE
DE SÃO PAULO

85 ANOS
1934 · 2019



GENES DE REPARO E ABORDAGENS TERAPÊUTICAS

Aparecida Maria Fontes

aparecidamfontes@usp.br

Ribeirão Preto – Março/ 2022



Departamento de Genética
USP Ribeirão Preto-FMRP

BIBLIOGRAFIA:

- ❑ 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.

Roteiro:

Revisão

1. Tipos de Lesão de DNA x de Sistema de Reparo
2. Revisando 3 sistemas de reparo de DNA

Exemplos em câncer

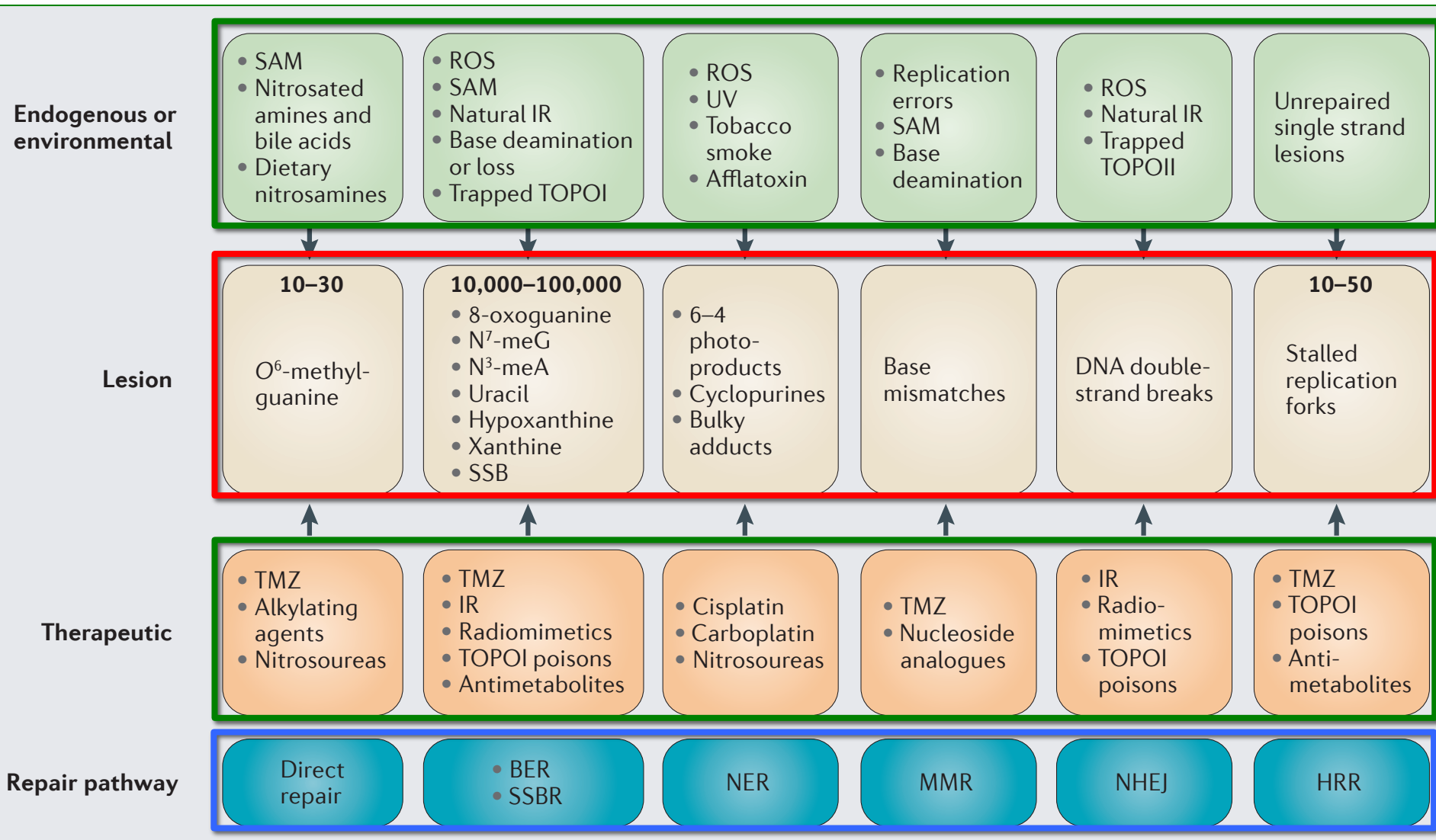
3. Potencializadores que inibem genes de sistemas de reparo e aumentam a eficácia de drogas anti-tumorais
4. Sistema de reparo direto MGMT e inibidor BG

Exemplos em Fungos

5. Mecanismos de resistência a drogas e desenvolvimento de novas drogas
6. *Trichophyton*: Nucleotide Excision Repair (NER)

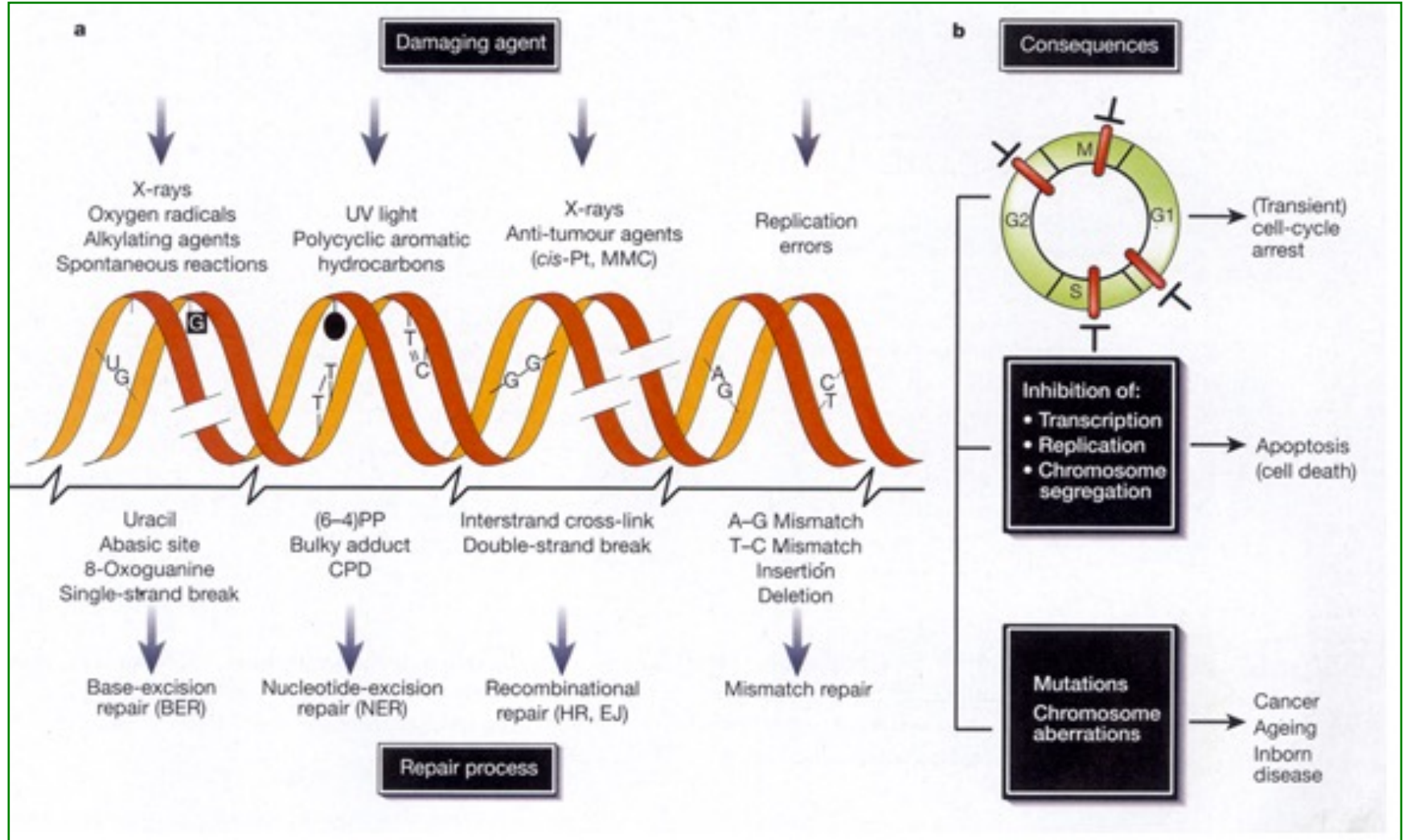
7. Projeto: analisar a modulação de genes que codificam fatores de transcrição e genes de reparo em *Trichophyton*

1. Tipos de lesão no DNA x Sistemas de Reparo



1. Sistemas de Reparo X Tipos de lesão no DNA

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



1. 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)

1. Tipos de Sistemas de Reparación

reactome

DNA DAMAGE BYPASS

REPLICATION-BLOCKING
TEMPLATE BASE DAMAGE

FANCONI ANEMIA PATHWAY

NUCLEOTIDE EXCISION REPAIR

HELIX-DISTORTING
BASE DAMAGE

BASE EXCISION REPAIR

DAMAGED BASE

ALKYLATED BASE

DNA DAMAGE REVERSAL

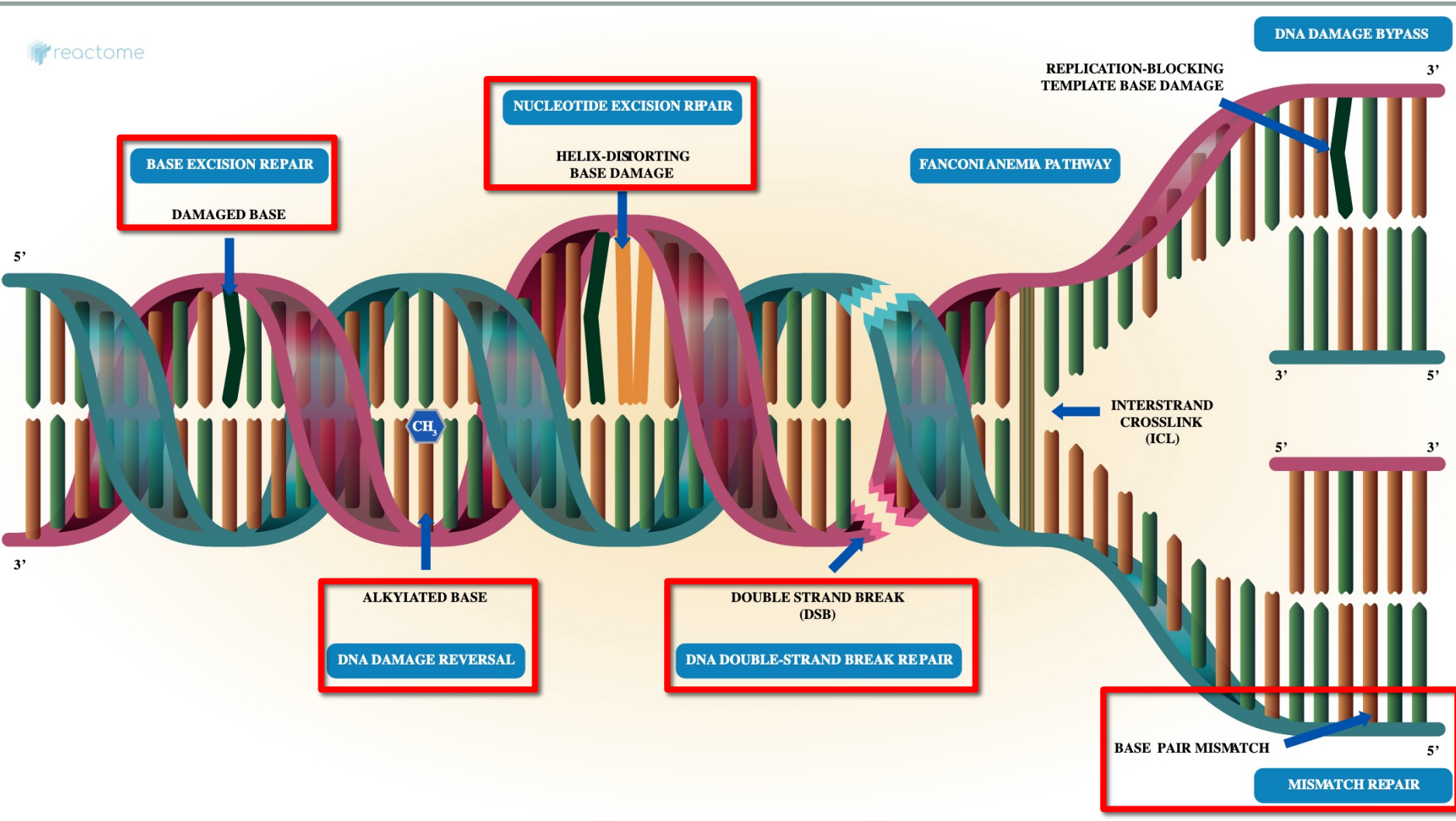
DOUBLE STRAND BREAK
(DSB)

DNA DOUBLE-STRAND BREAK REPAIR

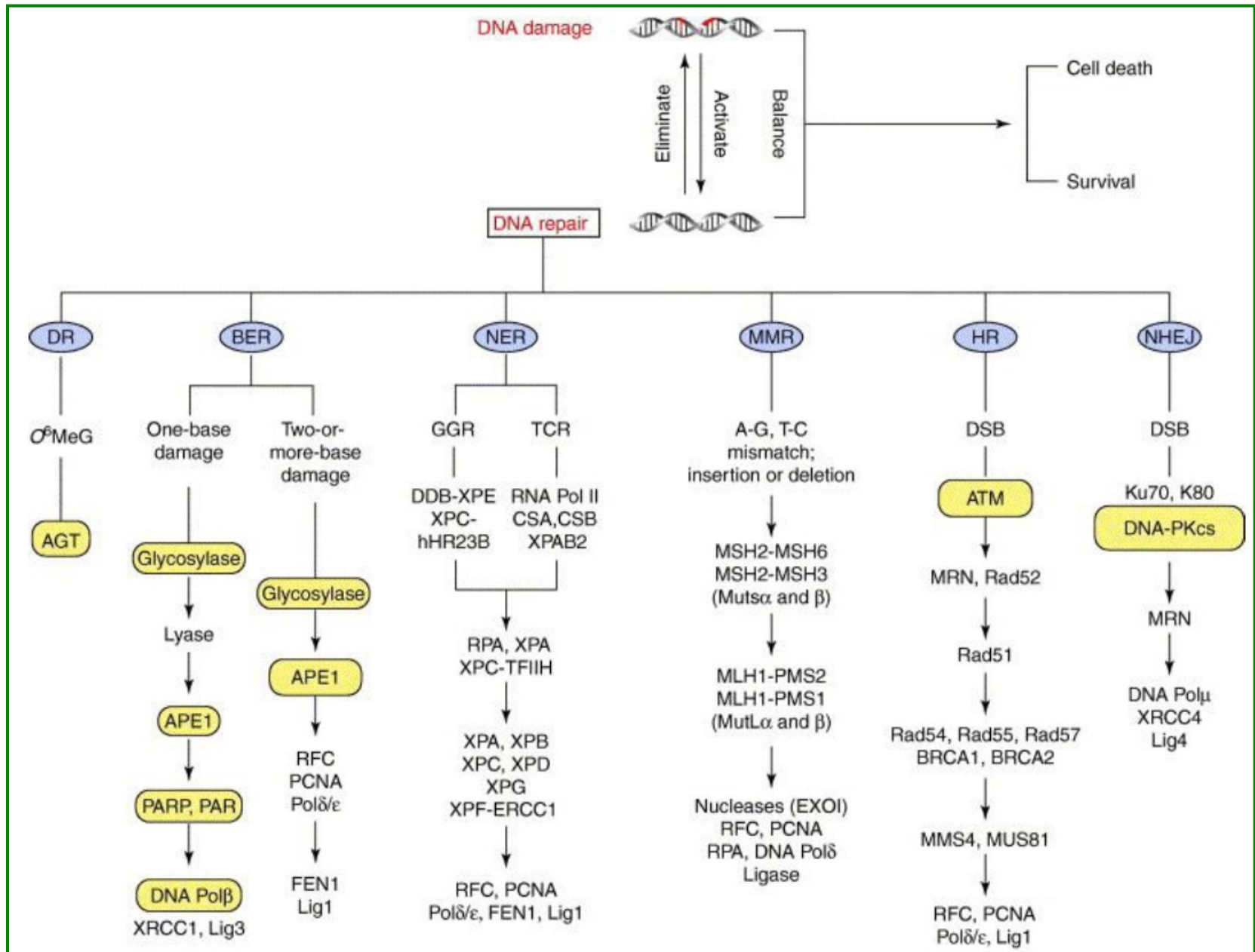
INTERSTRAND
CROSSLINK
(ICL)

BASE PAIR MISMATCH

MISMATCH REPAIR



1. Sistemas de Reparo X Tipos de lesão no DNA

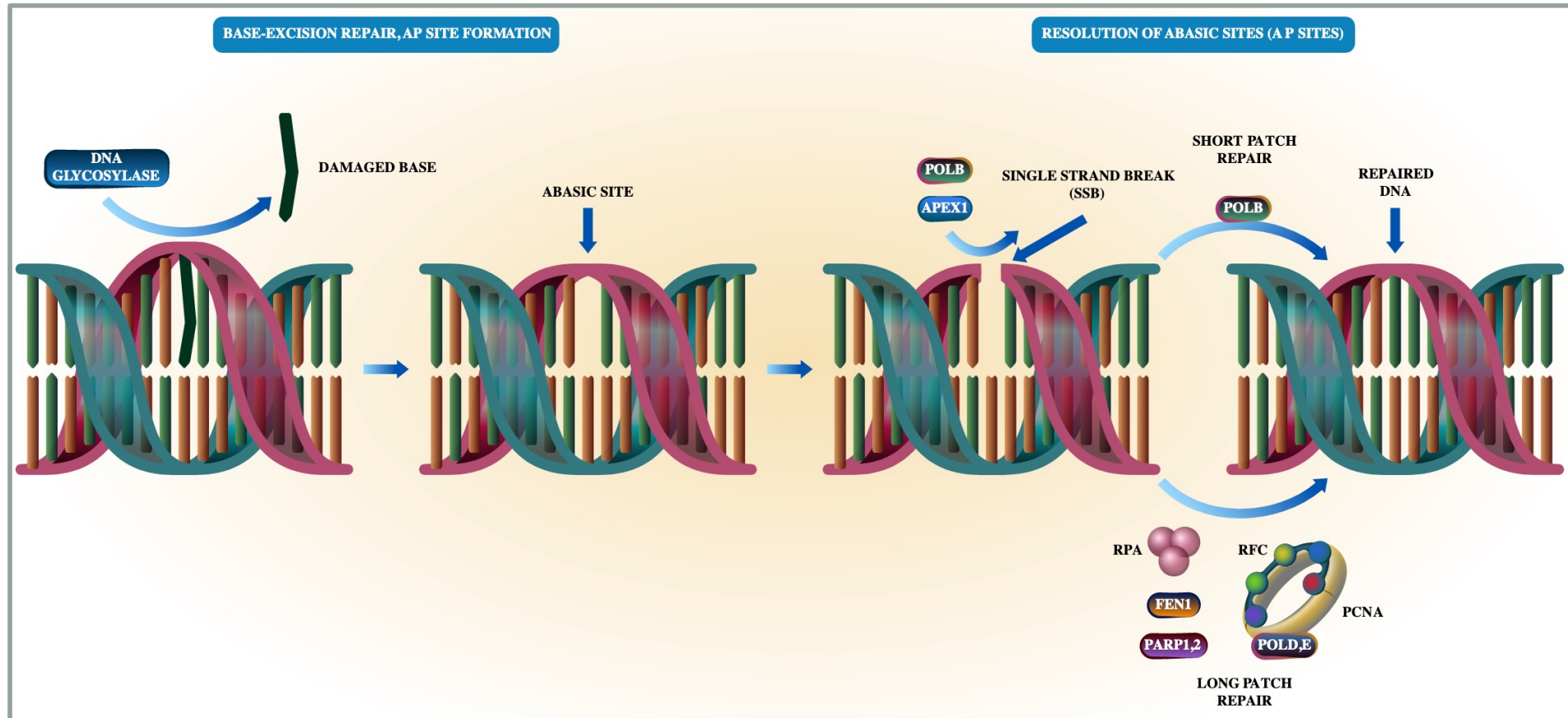


1. Sistemas de Reparo X Tipos de lesão no DNA

BER:

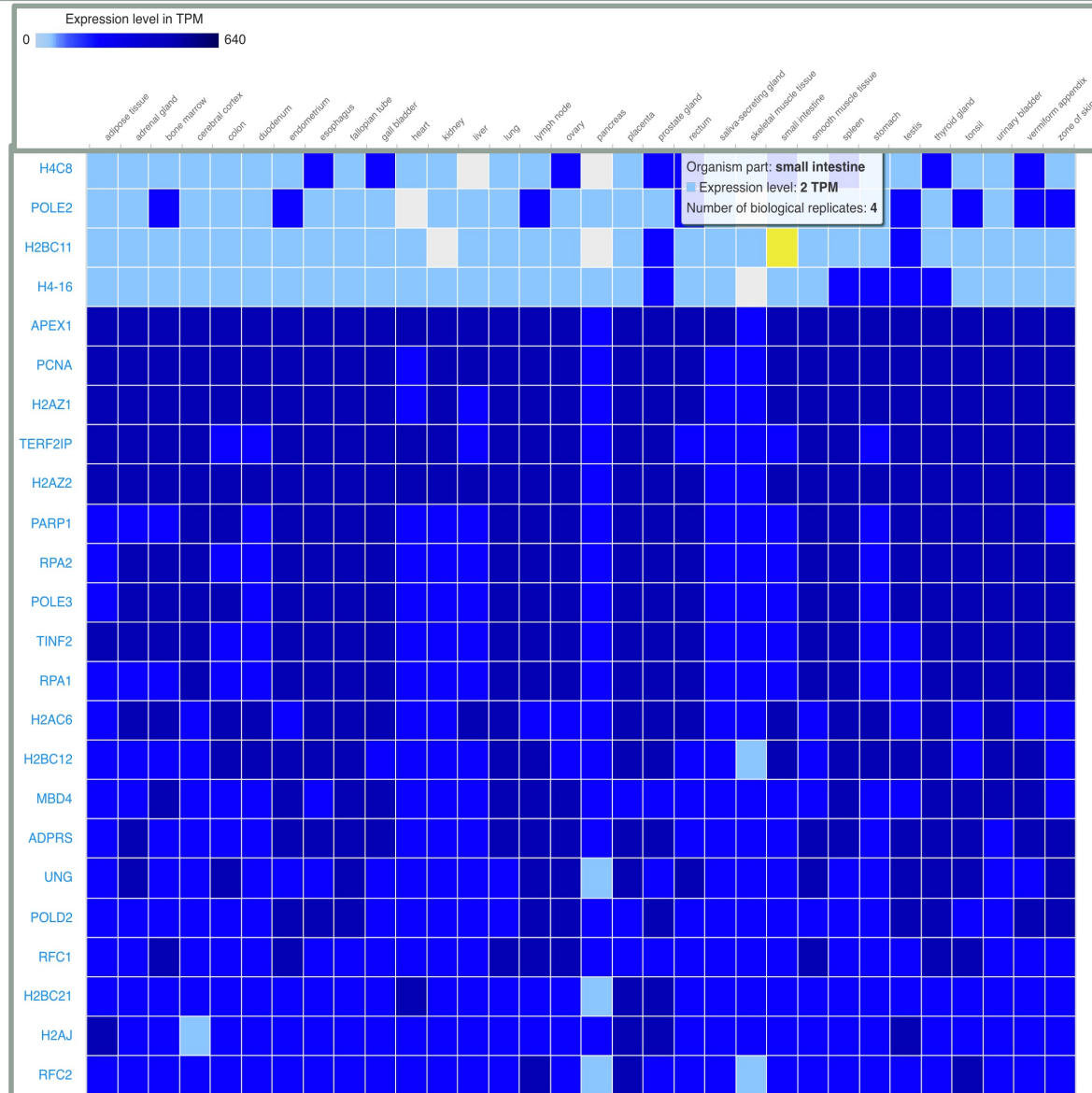
BASE-EXCISION REPAIR, AP SITE FORMATION

RESOLUTION OF ABASIC SITES (A P SITES)



1. Sistemas de Reparo X Tipos de lesão no DNA

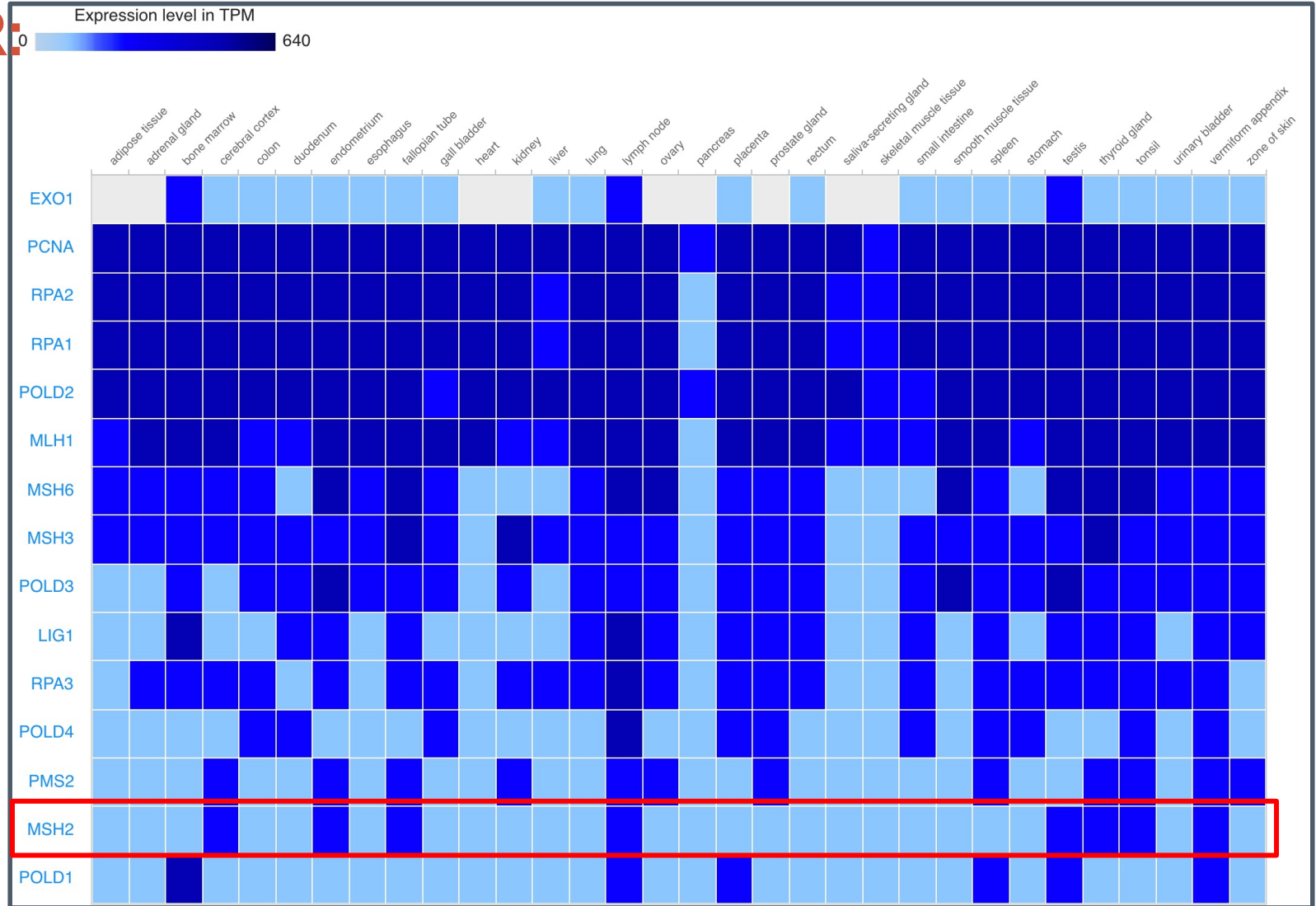
BER:



Dados de RNAseq de 122 indivíduos em 32 tecidos para os genes do sistema BER.

1. Sistemas de Reparo:

MMR:

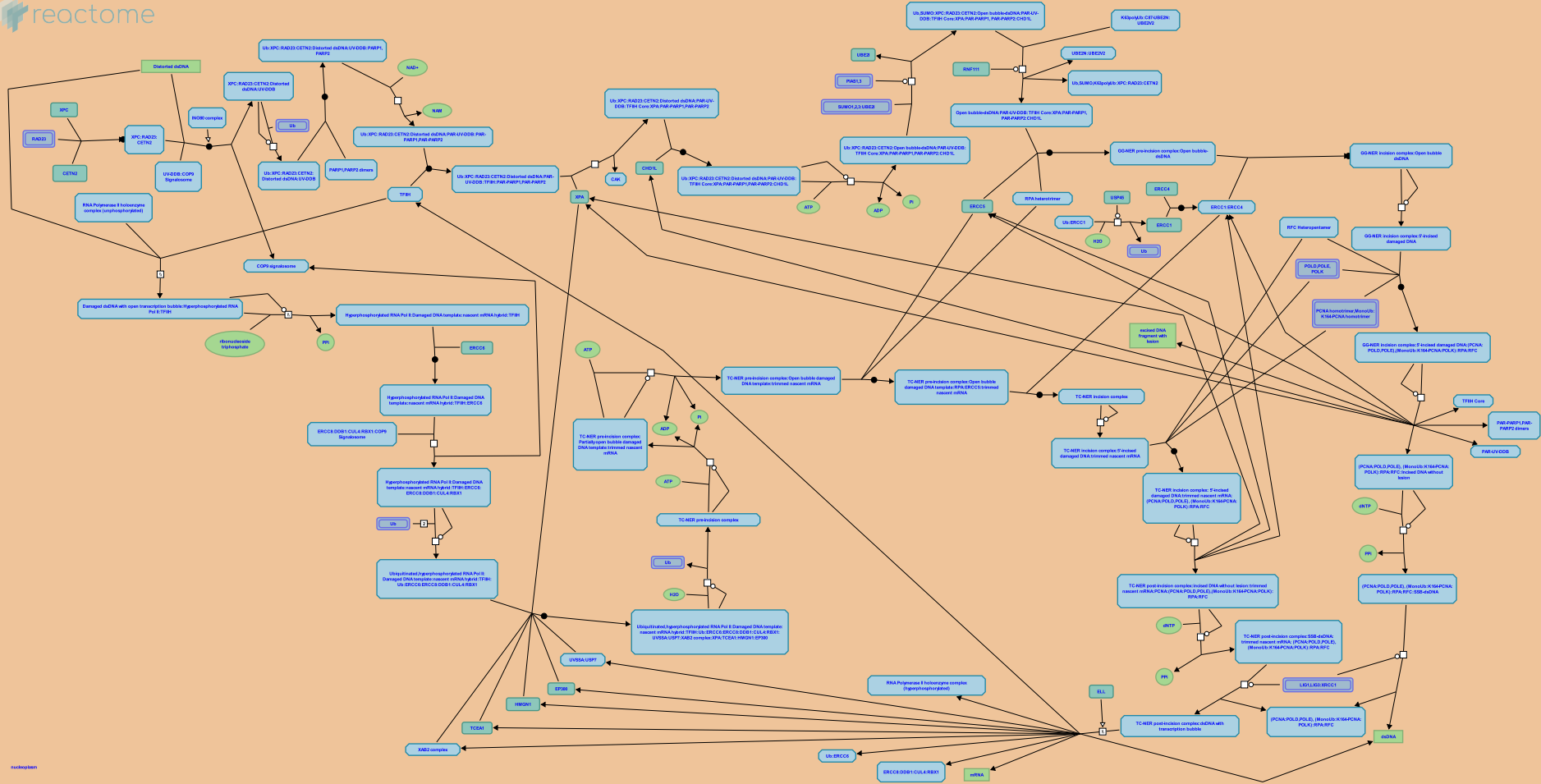


Dados de RNAseq de 122 indivíduos em 32 tecidos para os genes do sistema MMR.

1. Sistemas de Reparación

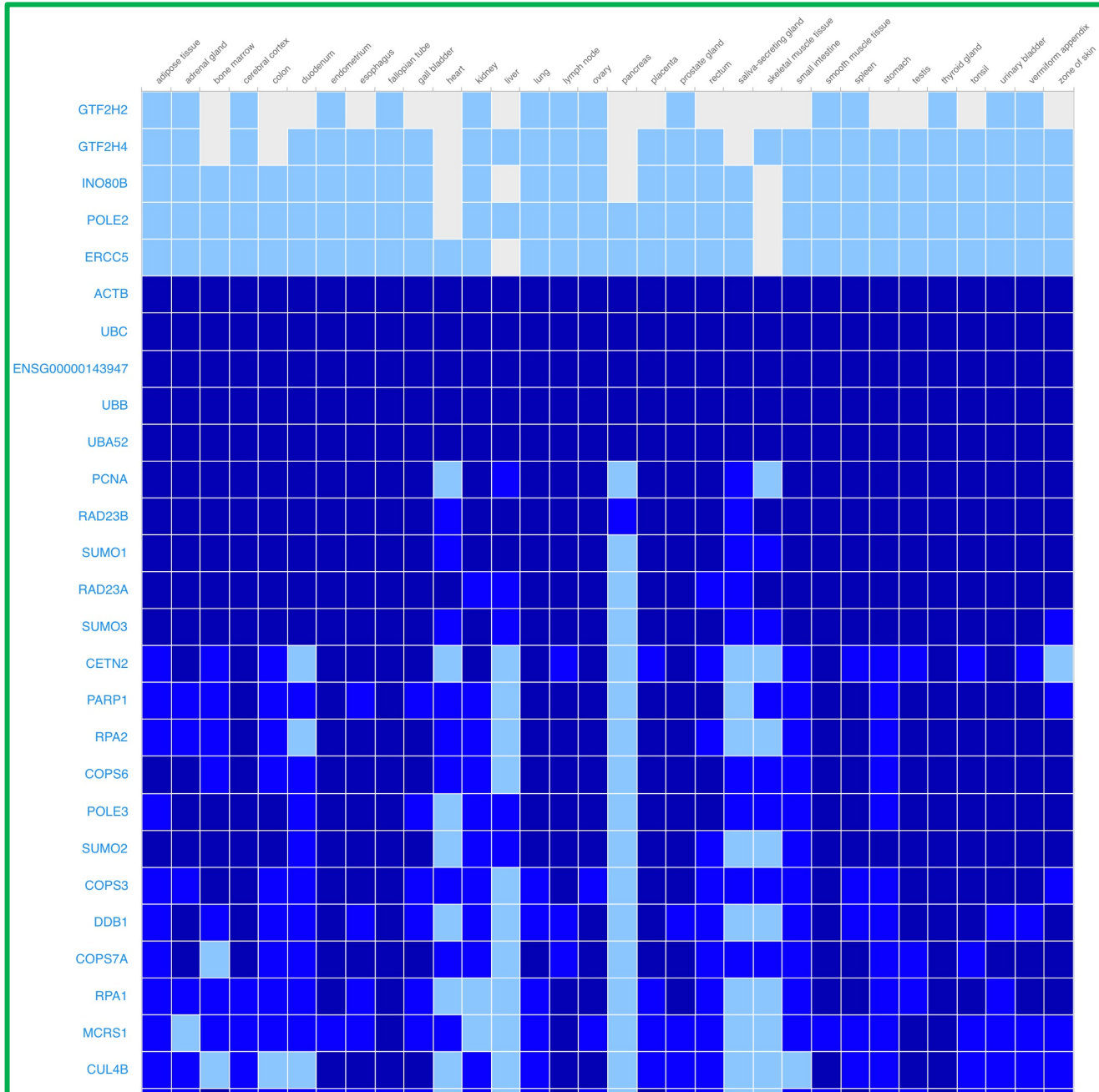
NER:

reactome



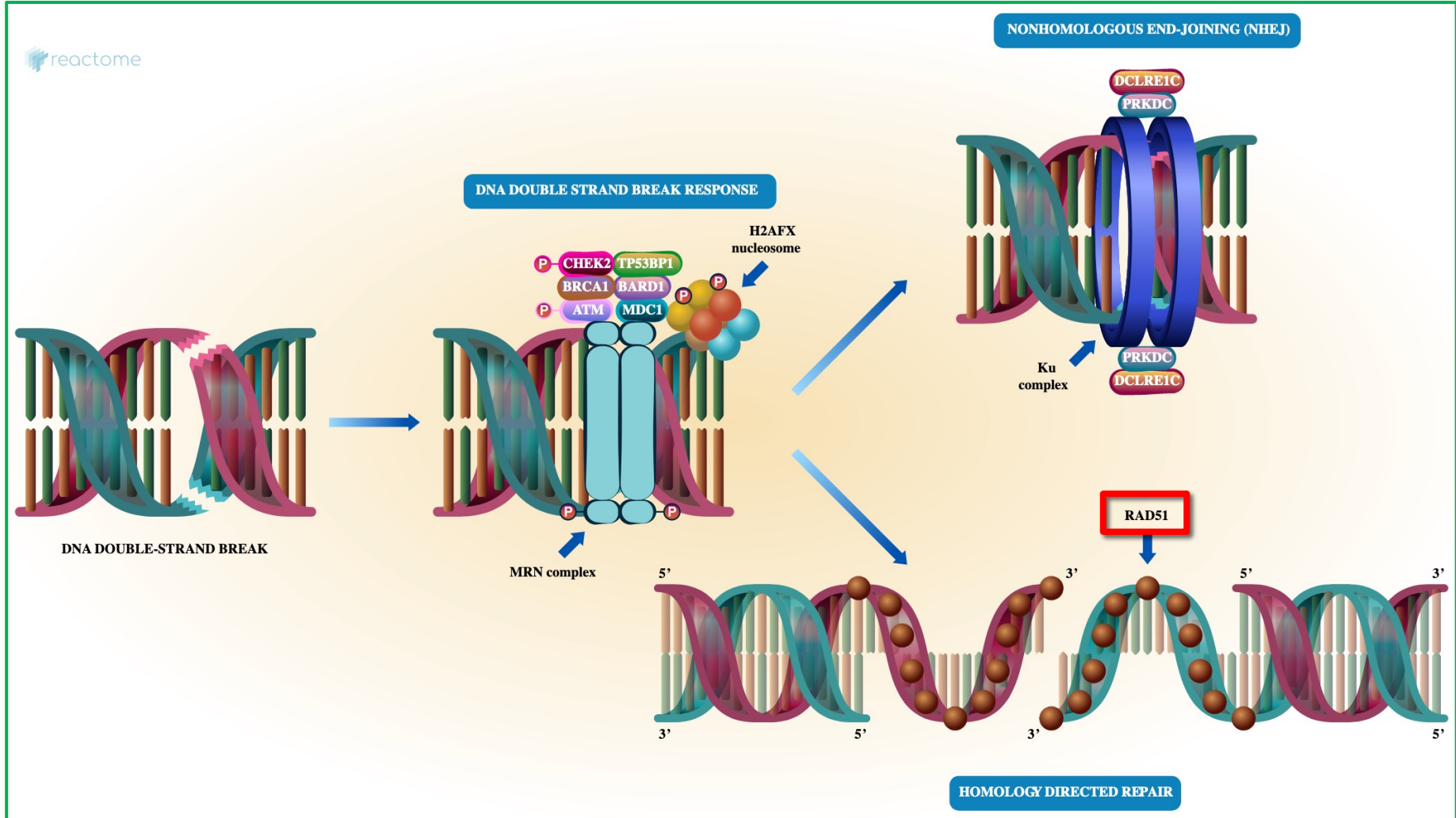
1. Sistemas de Reparación

NER:



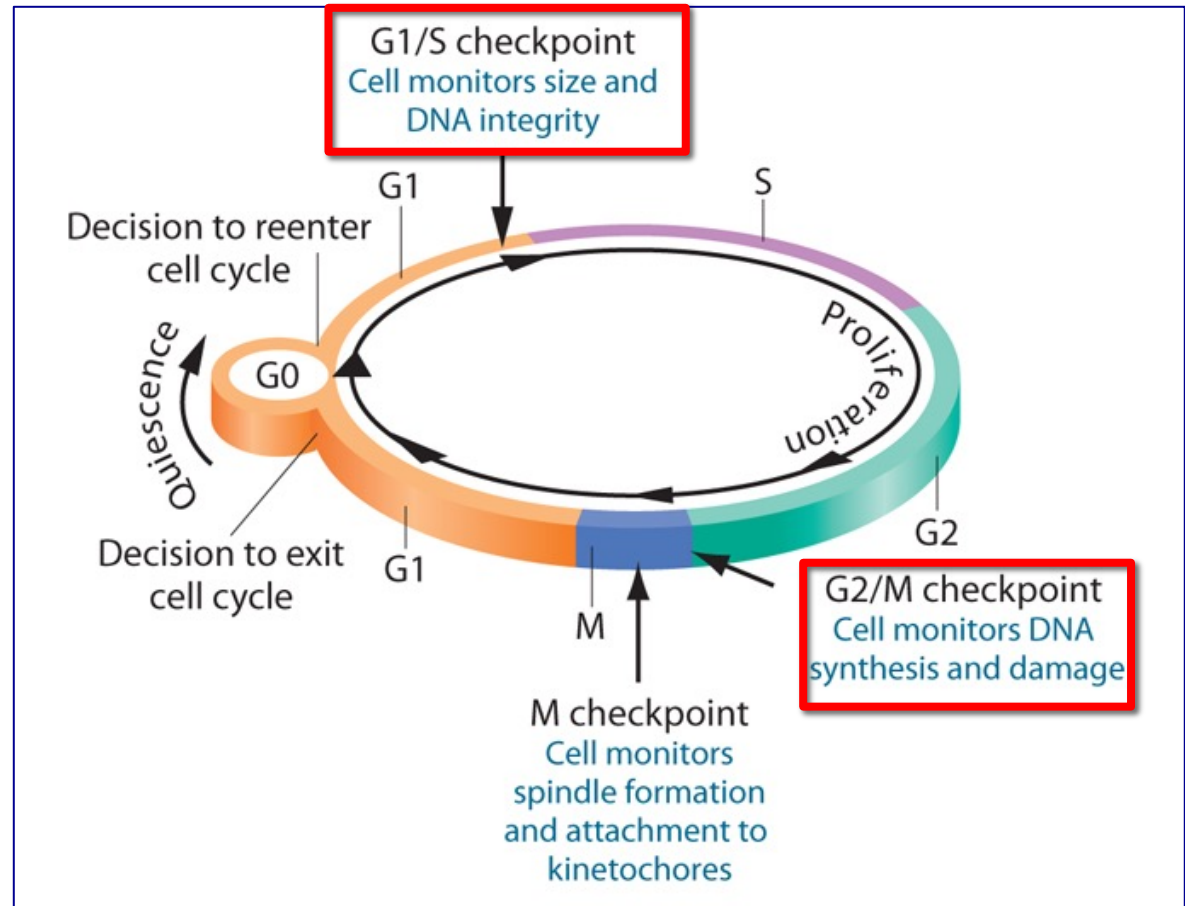
1. Sistemas de Reparación

Reparación de rotura de doble-hilo:



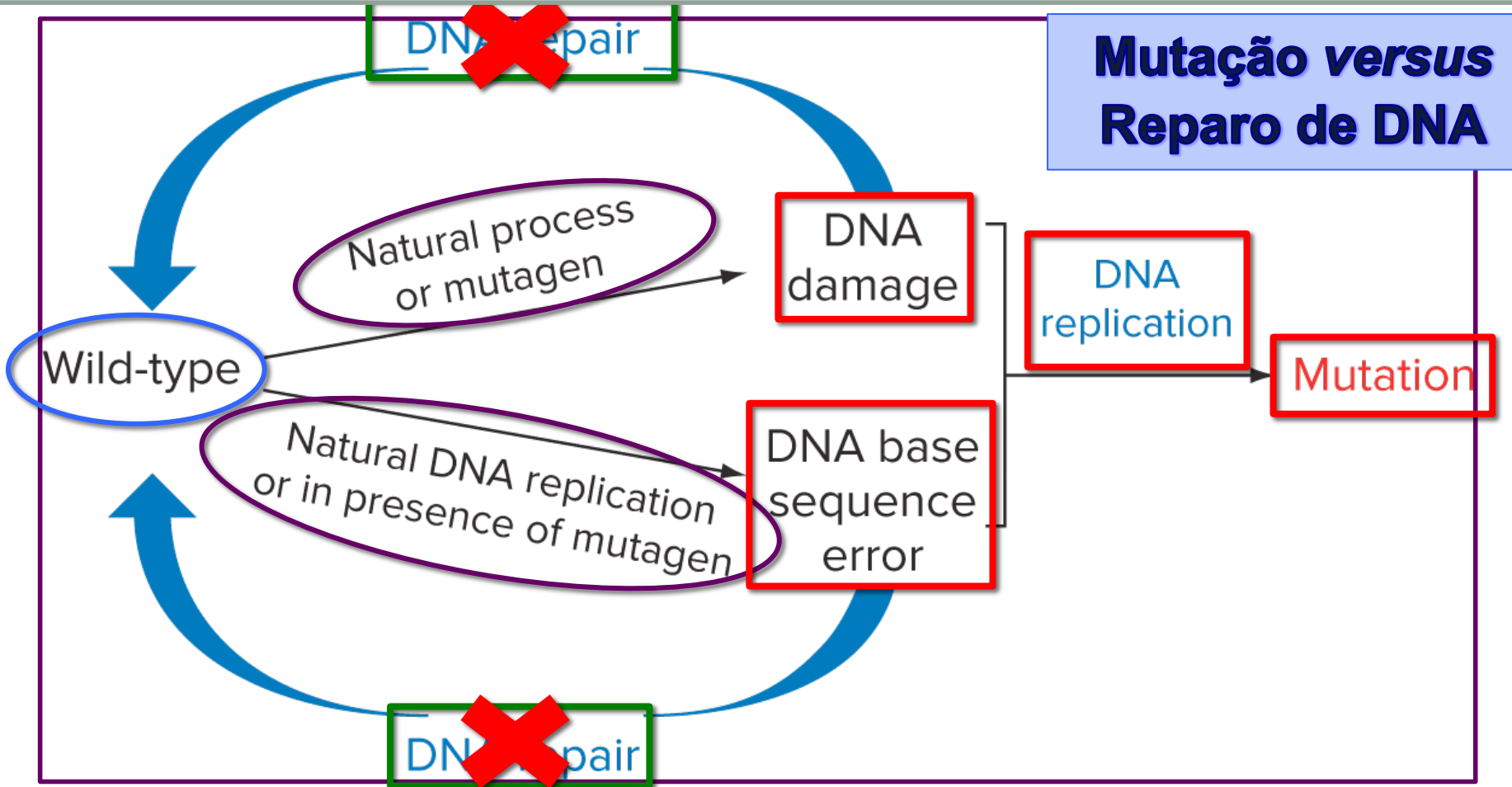
2. Reparo de DNA x Ciclo Celular

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.

2. Reparo de DNA x Ciclo Celular



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

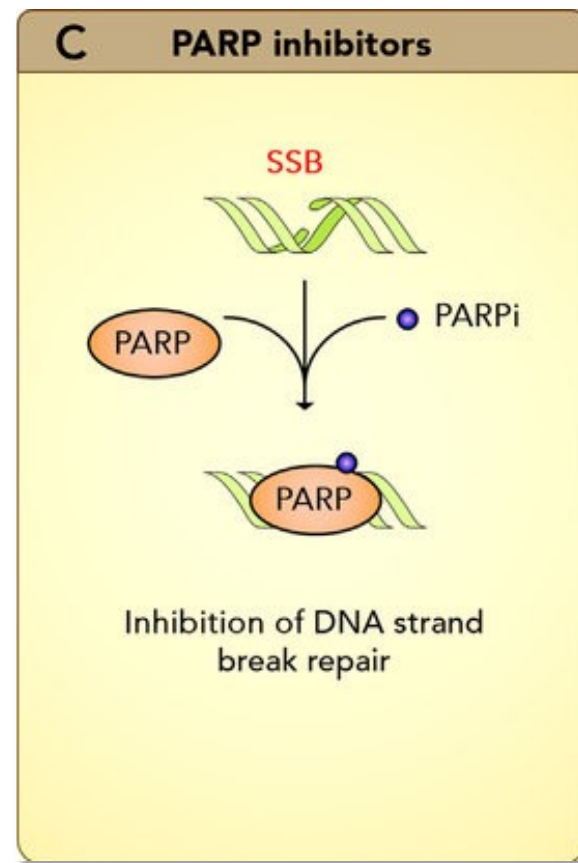
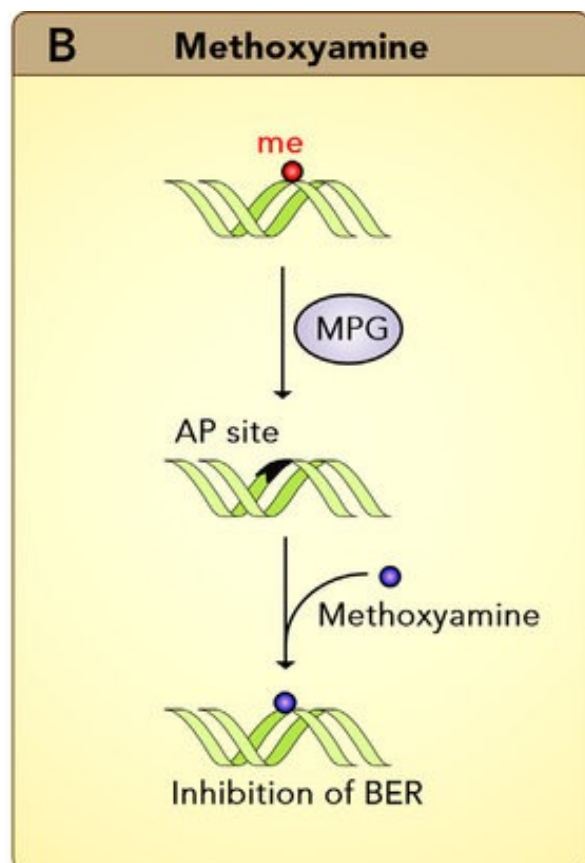
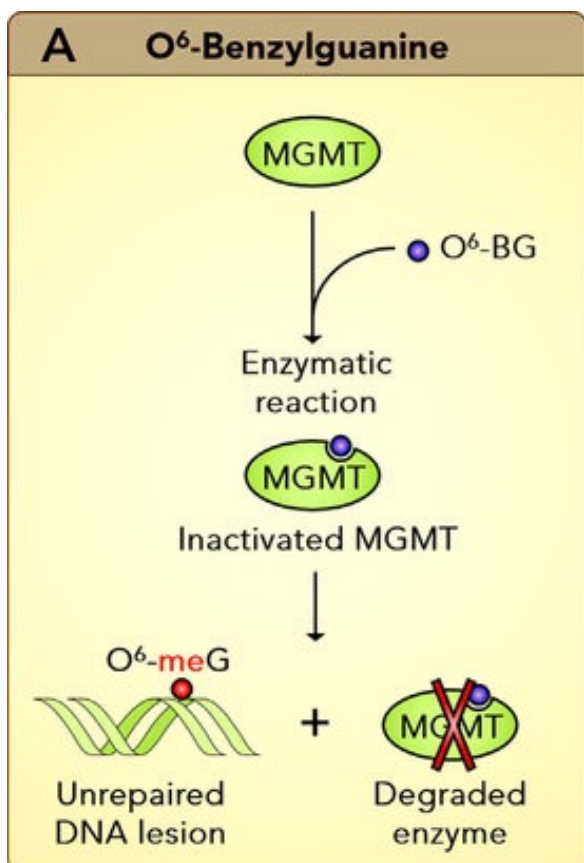
3. Potencializadores da resposta às drogas anti-tumorais



Antony E. Pegg



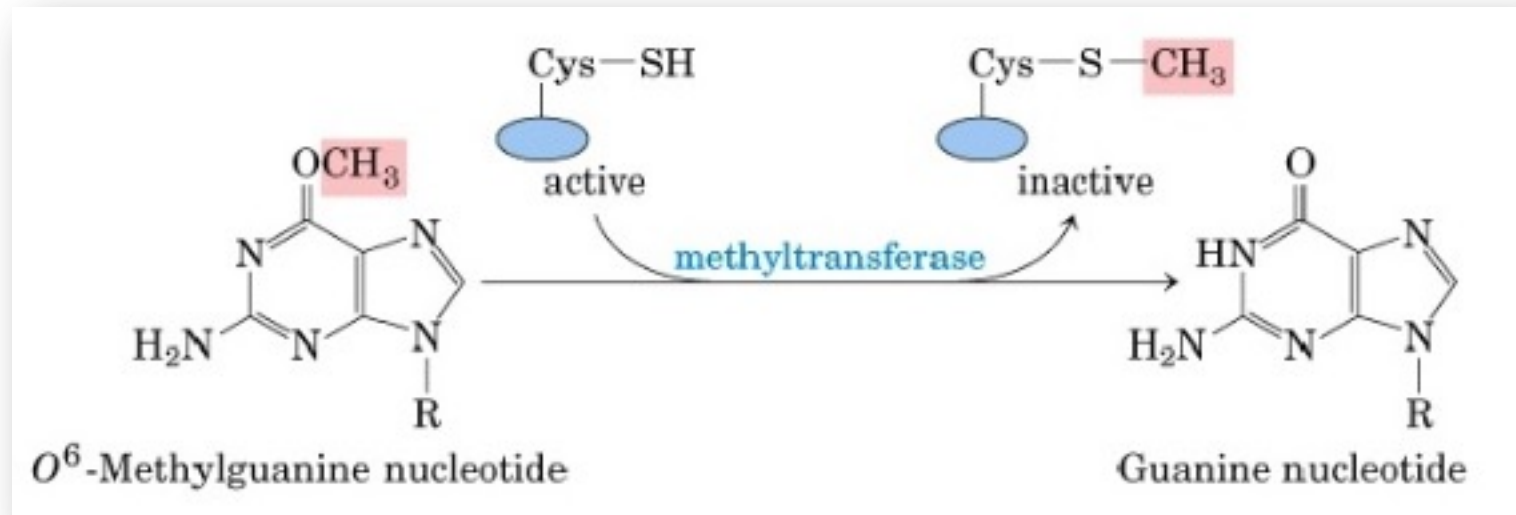
Stanton L. Gerson



Poli ADP Ribose Polymerase

3. Reparo Direto: MGMT

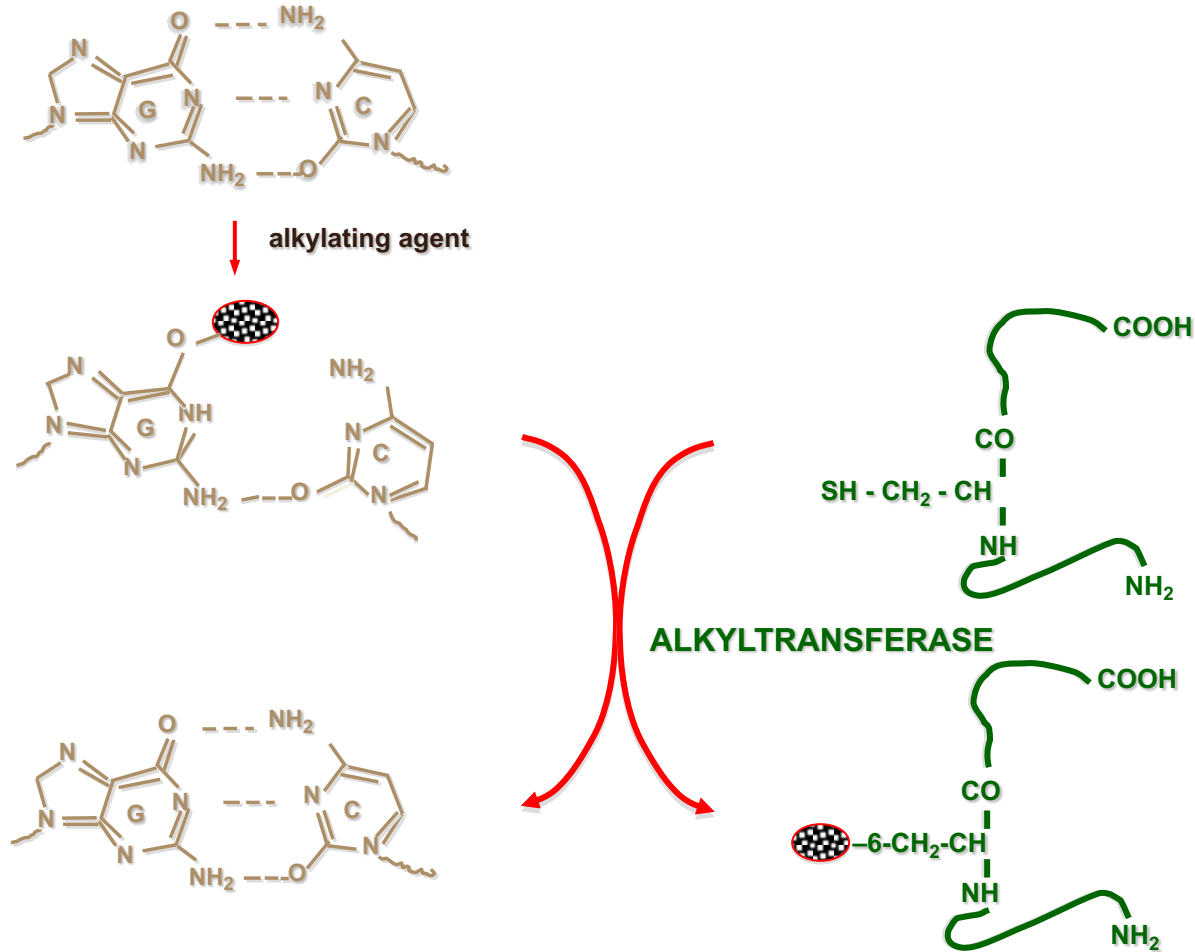
Reação realizada por uma única enzima que reconhece a base modificada e transfere a lesão para o seu sítio ativo.



☐ Responde à lesões frente a agentes alquilantes.

3. Reparo Direto: MGMT

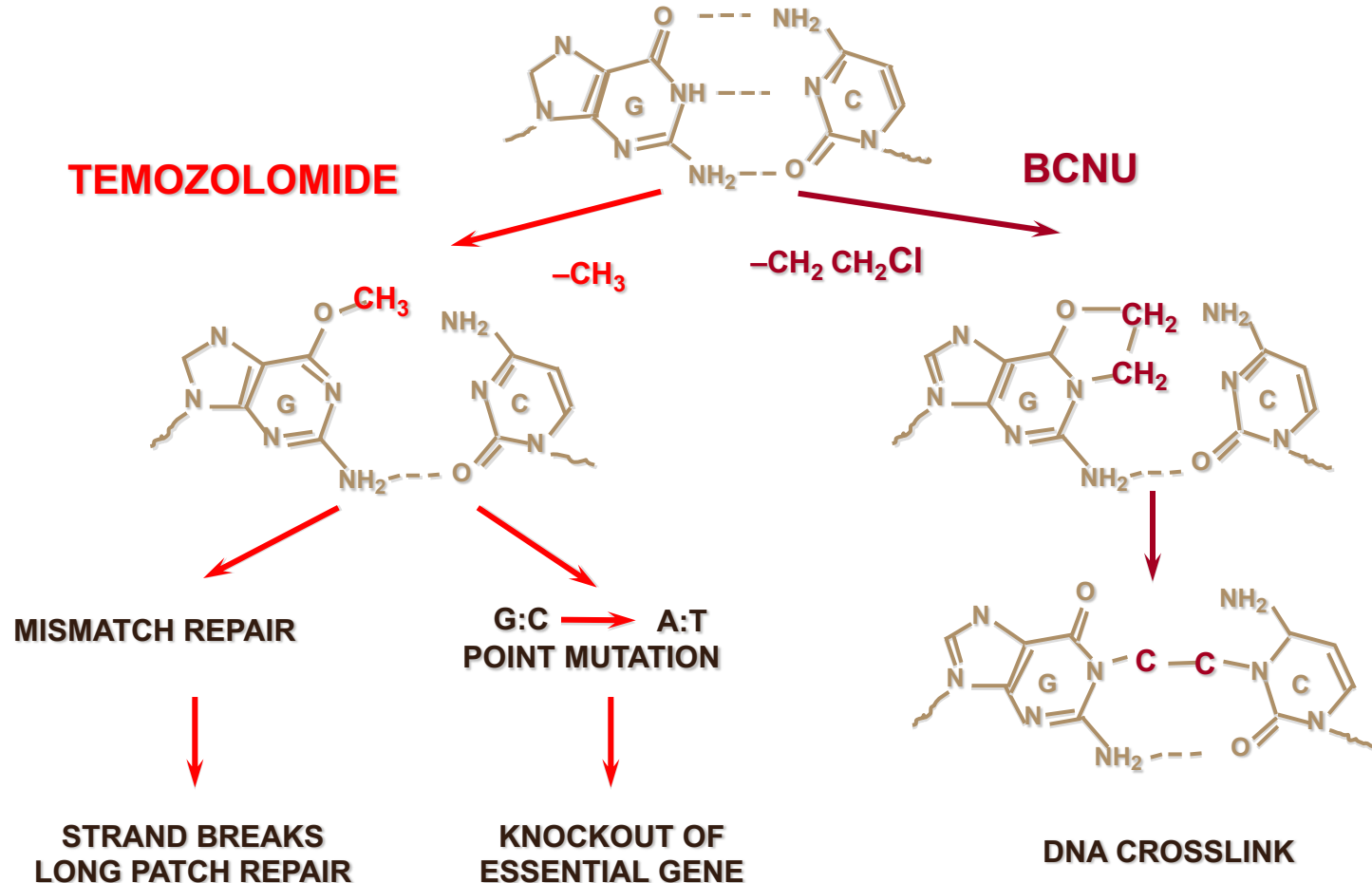
O⁶ ALKYLGUANINE - DNA ALKYLTRANSFERASE



◆ Pegg et al. *Prog. Nucleic. Acid. Res. Mol. Biol.* 51:167-223 (1995)

3. Reparo Direto: MGMT

Papel de agentes alquilantes na lesão do DNA



- ◆ Newlands et al. *Cancer Treat. Rev.* 23:35-61 (1997).

- ◆ Tong et al. *Cancer Res.* 42:3102-3105 (1982)

4. Reparo Direto: MGMT

Em algumas células tumorais o mecanismo de resistência aos agentes alquilantes é a super-expressão de MGMT.

Silenciamento de MGMT em tumores cerebrais

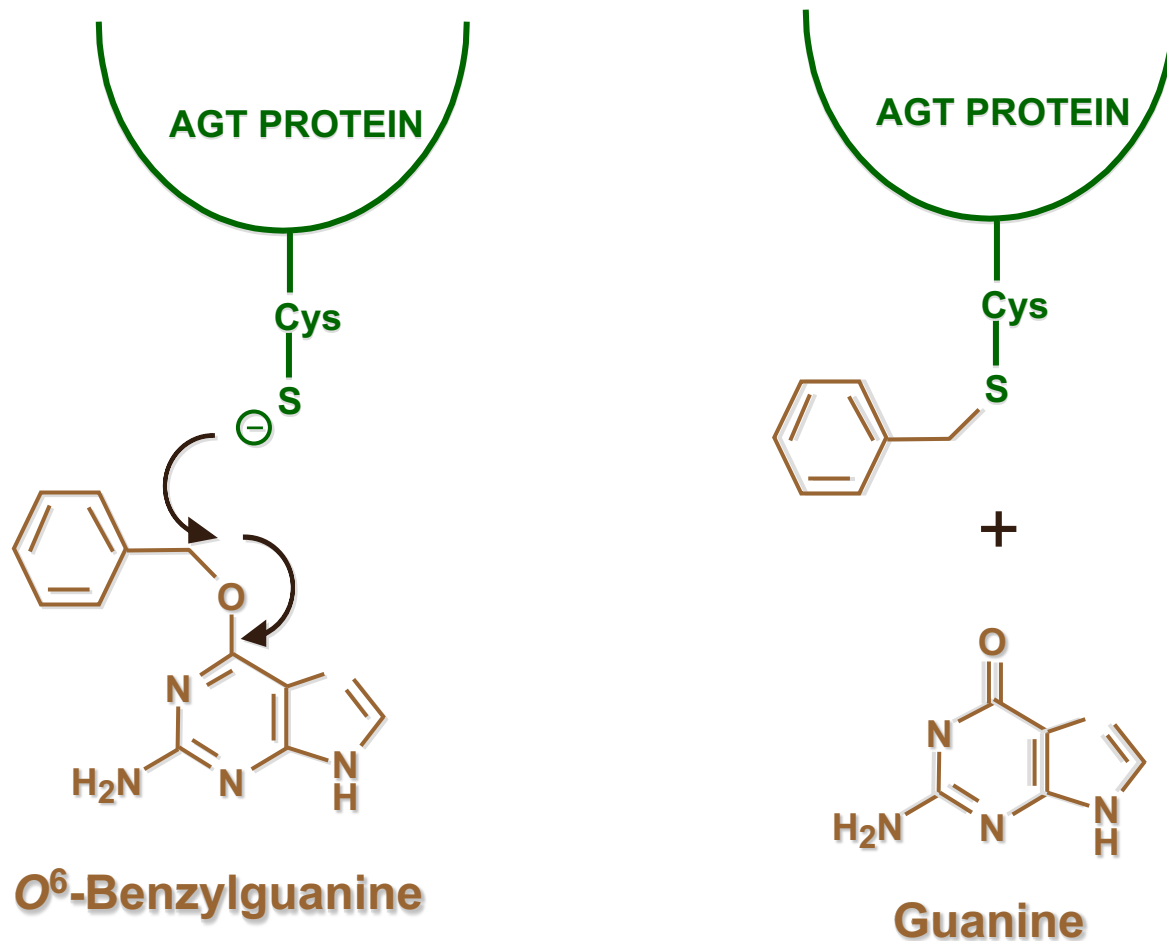
The diagram is divided into three panels illustrating the mechanism of MGMT silencing and the effect of Carmustine:

- Glioma with methylated MGMT:** Shows a cluster of tumor cells. Below, a DNA double helix is shown with several black circles representing methyl groups attached to the promoter region. A dashed box highlights the methylated promoter, labeled "MGMT promoter" and "Gene inactivation".
- Carmustine:** Shows the chemical structure of Carmustine, consisting of two benzene rings connected by a central nitrogen atom. A blue oval labeled "Carmustine" is positioned next to the structure.
- Chemosensitive tumor:** Shows a single tumor cell. Below, a DNA double helix is shown with a red vertical line representing a cross-link between the two strands. Text below reads: "DNA remains cross-linked, and tumor cells die".

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

3. Potencializadores da resposta às drogas anti-tumorais

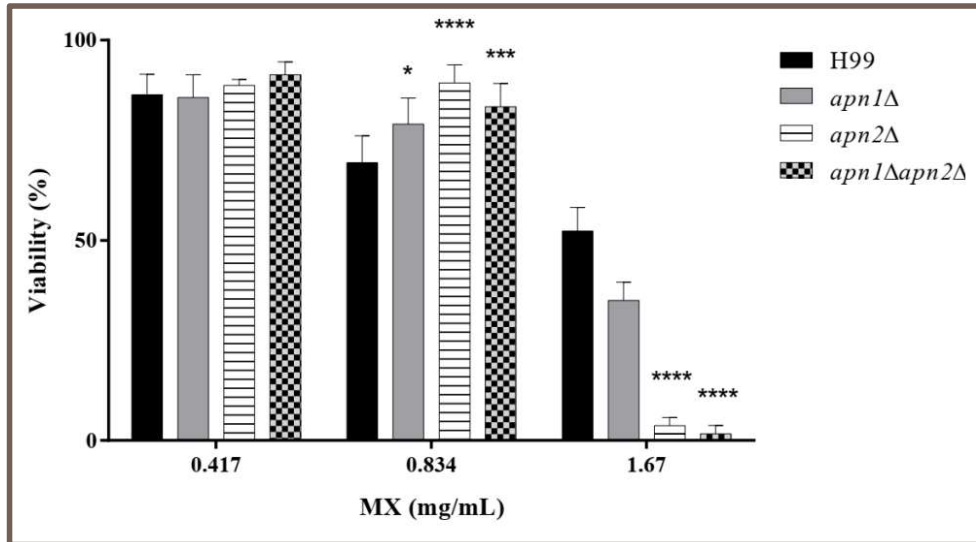
O6-Benzilguanina liga-se no sítio ativo da AGT humana



◆ Dolan and Pegg. *Clin. Cancer Res.* 3:837-847 (1995)

3. Potencializadores da resposta às drogas anti-tumorais

Metoxiamina:



Após a exposição por 1 hora com 1.67 mg/ml de metoxiamina a viabilidade celular foi afetada em linhagens mutantes para o *locus apn2*.

Em *Cryptococcus neoformans*, os loci *apn1* e *apn2* do sistema de reparo **BER** podem estar envolvidos na resposta ao dano por agentes alquilantes ou a radiação UV e a combinação de metoxiamina com um agente anti-fúngico convencional pode consistir uma nova abordagem terapêutica no combate a esse tipo de infecção.

3. Potencializadores da resposta às drogas anti-tumorais

Questões:

Pacientes em terapia anti-tumoral ou submetidos a diferentes condições cirúrgicas, ou ainda transplante de órgãos são mais susceptíveis a infecções fúngicas. A compreensão da modulação de genes de reparo após a exposição à drogas anti-fúngicas pode auxiliar no tratamento desse tipo de infecção?

Combinações sinérgicas de agentes anti-fúngicos e inibidores de genes de reparo podem ser utilizados no tratamento para combate a esse tipo de infecção?

Qual o ciclo de vida de *Tricophyton*? Produtos do metabolismo do fungo podem modular genes de reparo?

4. Infecções fúngicas x Genes de Reparo

Questões:

Inibição da expressão dos genes de reparo: pode ser um mecanismo para conferir resistência a compostos anti-fúngicos?

Qual a frequência de mutações espontâneas x mutações induzidas após a exposição à drogas anti-fúngicas?

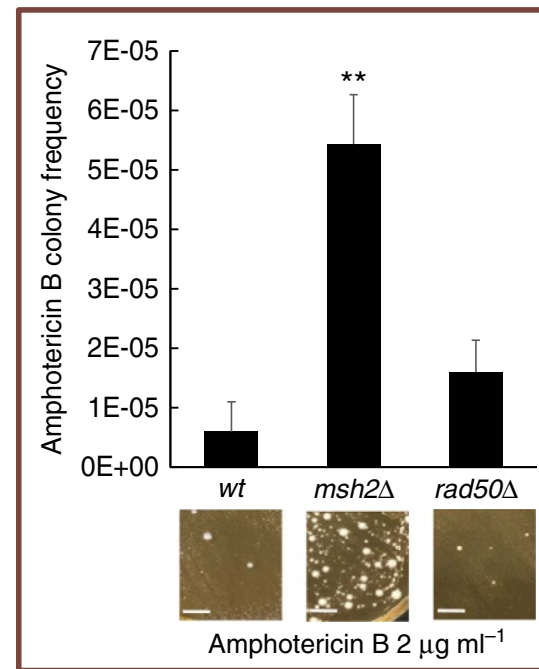
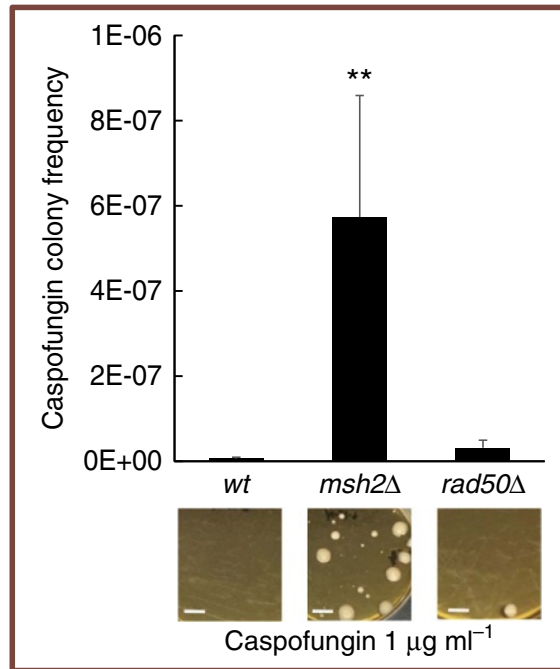


A identificação da modulação de genes de reparo após o tratamento com drogas anti-fúngicas pode auxiliar no tratamento do hospedeiro?

A identificação alelos mutantes dos genes de reparo em fungos deve ser um biomarcador em protocolos clínicos da terapia anti-fúngica?

5. Infecções fúngicas x Genes de Reparo

Exemplo: *C. glabrata*^{msh2Δ} e *C. glabrata*^{rad50Δ}



Linhagens *C. glabrata* mutantes para os loci *msh* e *rad50* são 82 x e 9 x mais resistentes a caspofungina e anfotericina B respectivamente, quando comparada à linhagens selvagens.

6. Nucleotide excision repair: *Trichophyton*

Journal of Medical Microbiology (2014), 63, 642–648

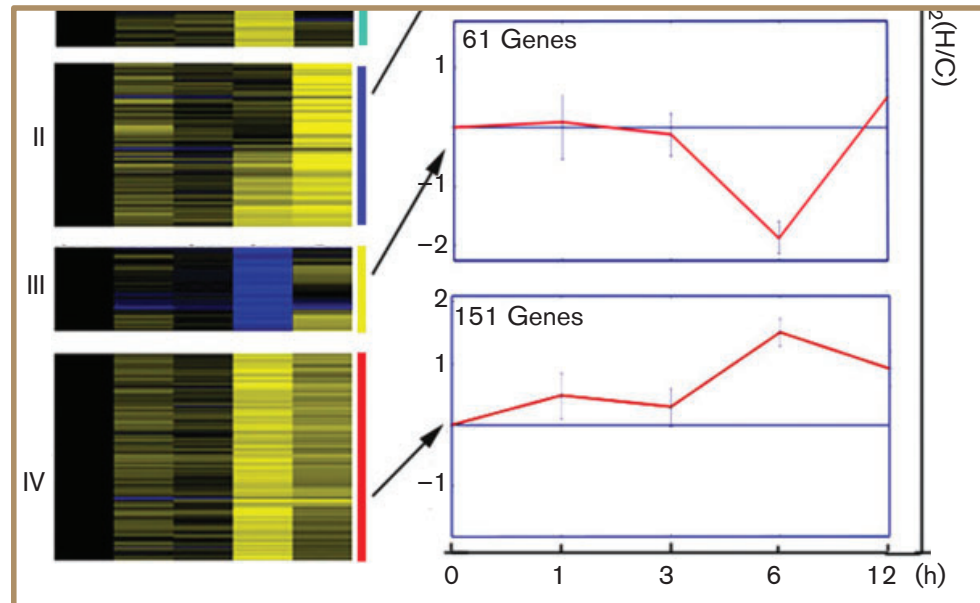
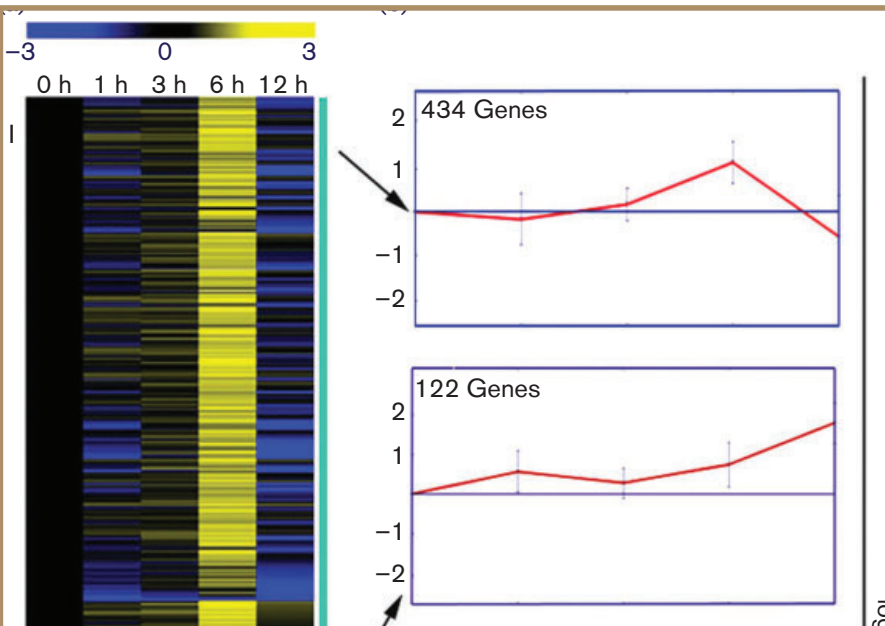
DOI 10.1099/jmm.0.059386-0

Analysis of gene expression changes in *Trichophyton rubrum* after skin interaction

Tao Liu, Xingye Xu, Wenchuan Leng, Ying Xue, Jie Dong and Qi Jin

Correspondence
Qi Jin
zdsys@vip.sina.com

MOH Key Laboratory of Systems Biology of Pathogens, Institute of Pathogen Biology, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Beijing 100730, PR China



Análise do perfil de expressão de 768 genes em *T. rubrum* em diferentes tempos após o cultivo com fragmentos de pele humana.

6. Nucleotide excision repair: *Trichophyton*

Table S6. Function annotation and cluster distribution of genes induced by human skin sections that are involved in cell cycle.

Accession	Cluster	Tentative annotation	GO biological process
DW705025	I	translationally controlled tumor protein-like variant I	nucleotide-excision repair;
DW691497	IV	U1 snRNP component	regulation of transcription
DW686862	II	UV-endonuclease UVE-1	nucleotide-excision repair;
DW702899	I	zinc ion binding; protein binding,regulation of transcription,	transcription;
EL789985	II	DNA binding protein	transcription;
DW707253	I	GDP-mannose pyrophosphorylase A	cell cycle; biosynthetic process;

Exemplos de genes do sistema em reparo NER que foram modulados em *T. rubrum* em diferentes tempos após o cultivo com fragmentos de pele humana.

PROJETO

1. Determinar a homologia (% identidade) de genes de reparo de *Trichophyton* e *Homo sapiens* a nível de DNA e de proteína;
2. Determinar a estrutura primária de determinado gene de reparo em *Trichophyton* e comparar com humano.