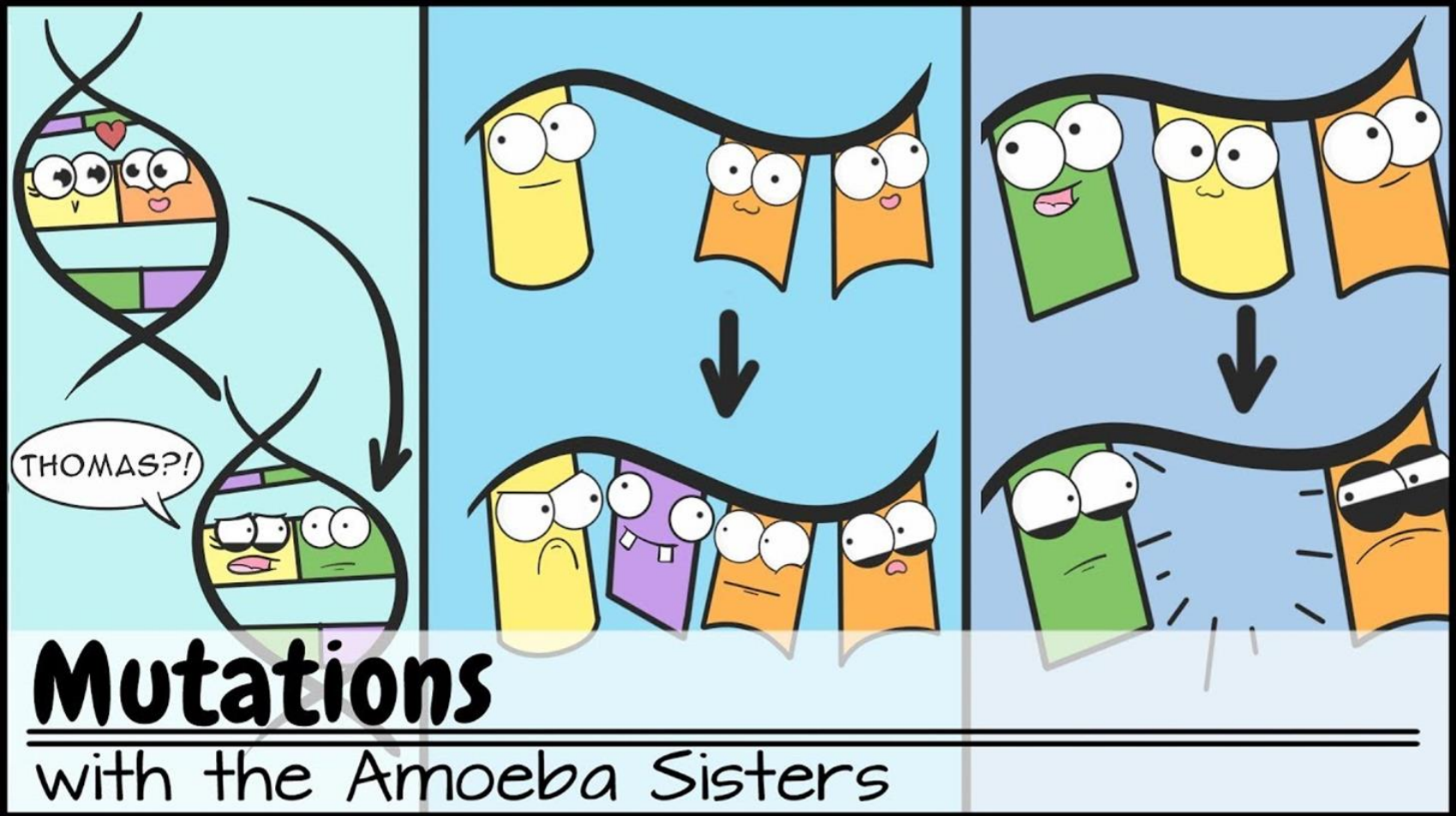


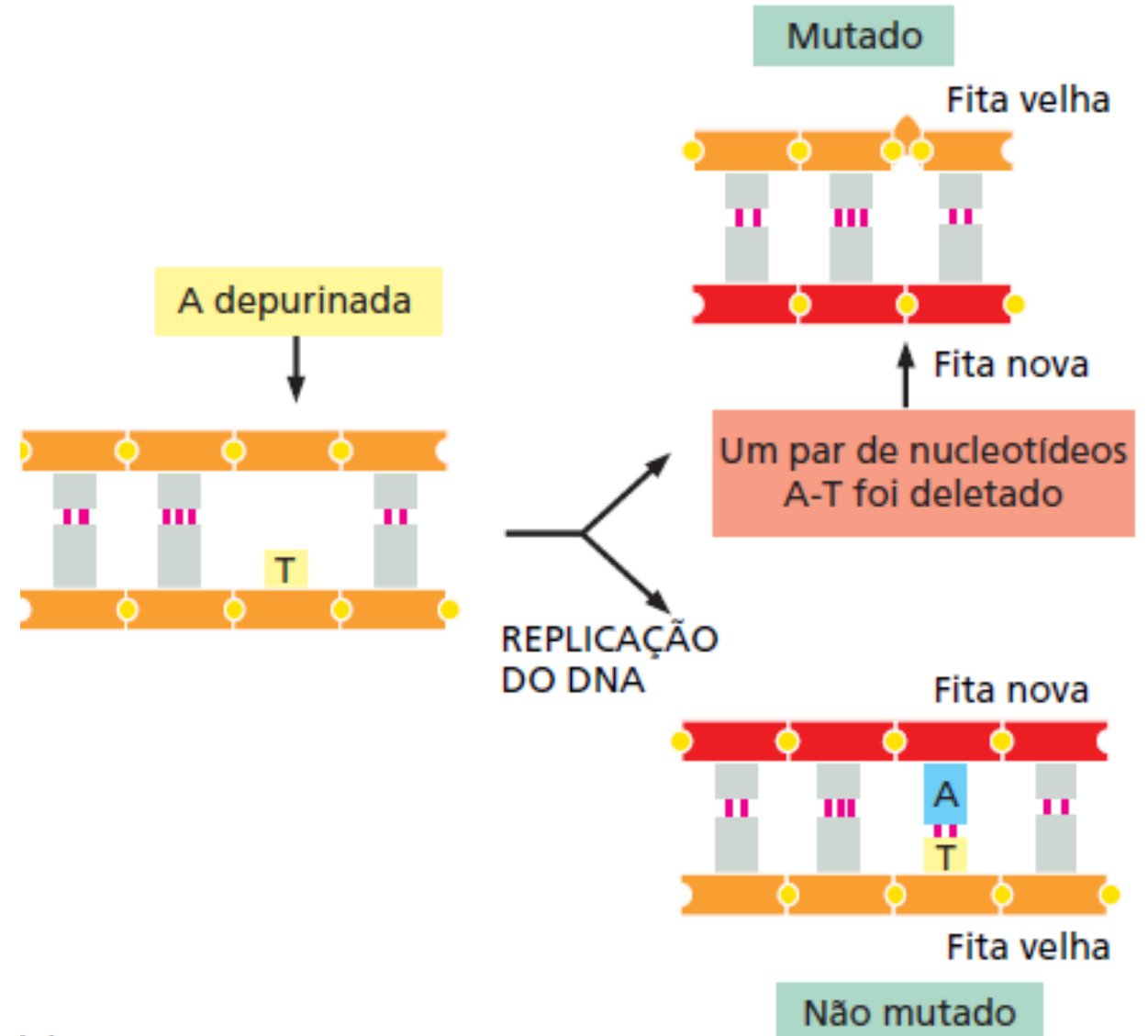
AULA_15 REPARO do DNA



MUTAÇÃO

MUTAÇÃO

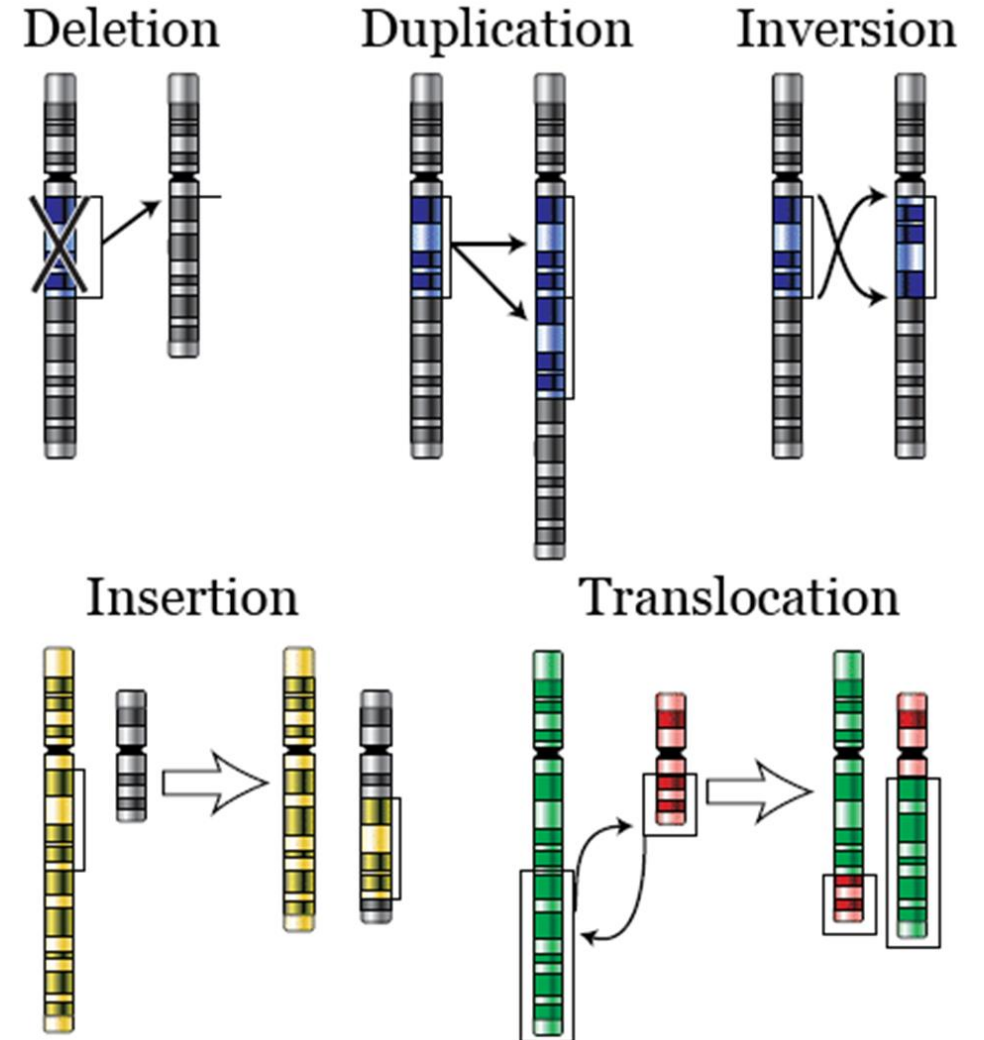
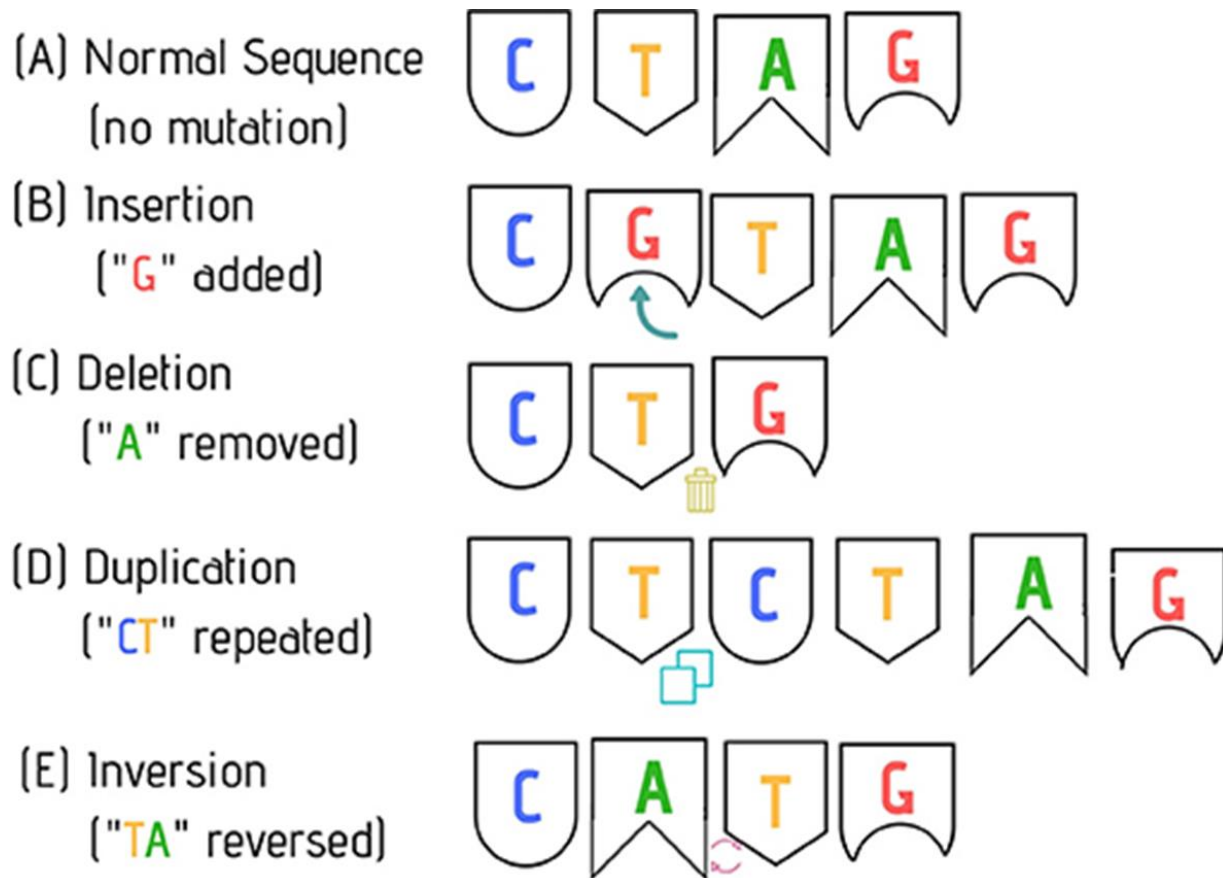
- Qualquer alteração permanente envolvendo seqüências de nucleotídeos de uma molécula de DNA;
- Que é fixada no genoma, ou seja, é transmitida para a geração seguinte de células após a divisão celular.



(B)

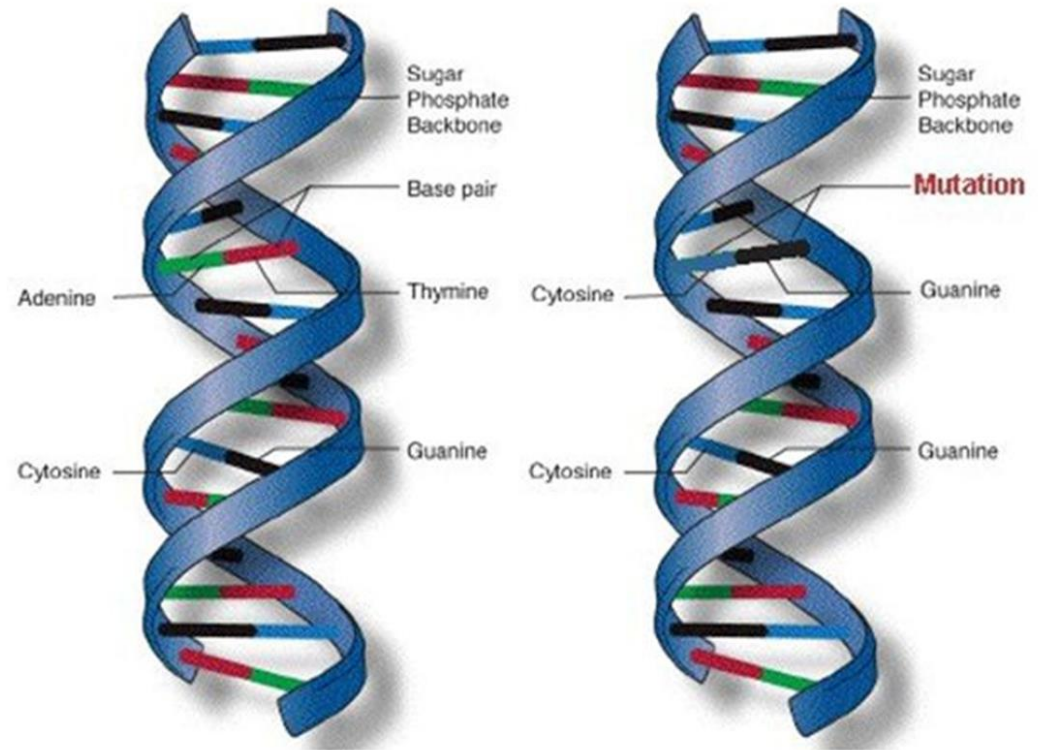
MUTAÇÃO

- O tipo e a extensão das mutações é muito variável:



MUTAÇÃO

- Pode acontecer em qualquer região do cromossomo;
- Que podem ter genes ou não;
- Nas duas situações as mutações podem;
- Desde não desencadear nenhum efeito, até gerar grandes problemas para a célula.



MUTAÇÃO

- Efeitos das mutações tb dependem:
 - Em que tipo celular elas acontecem;
 - Mutações somáticas: restritas ao indivíduo;
 - Mutações germinativas: transmitidas à prole;
-
- Em que momento acontecem em uma linhagem celular.

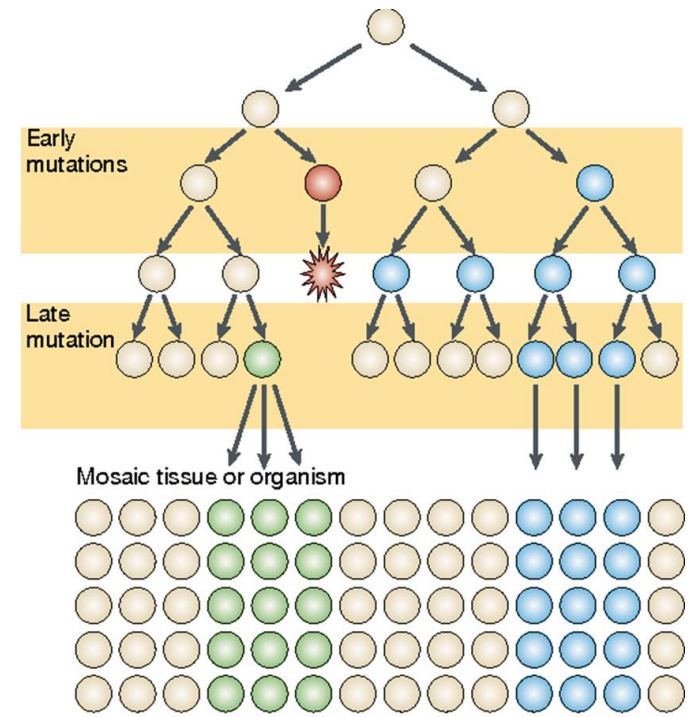
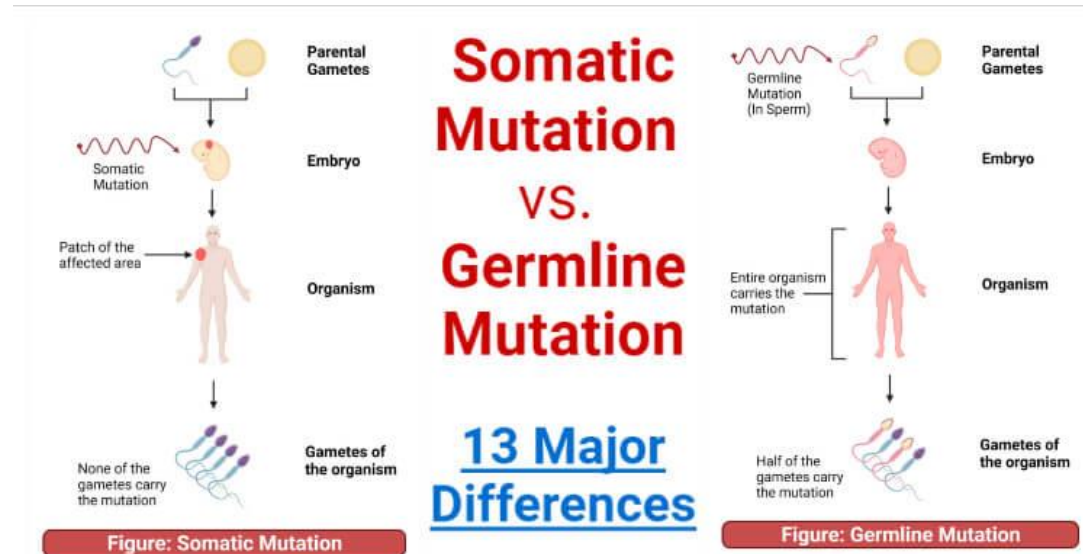
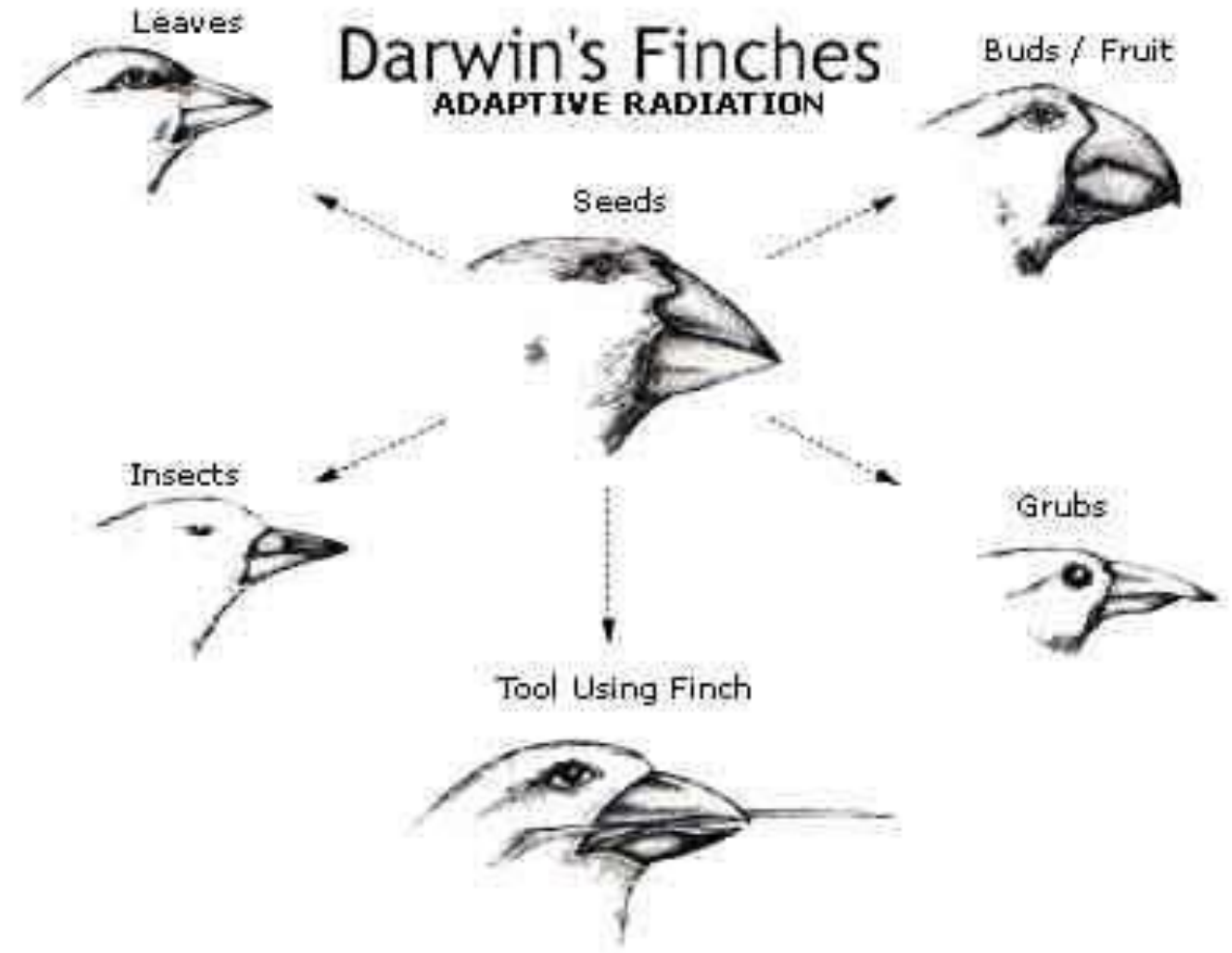
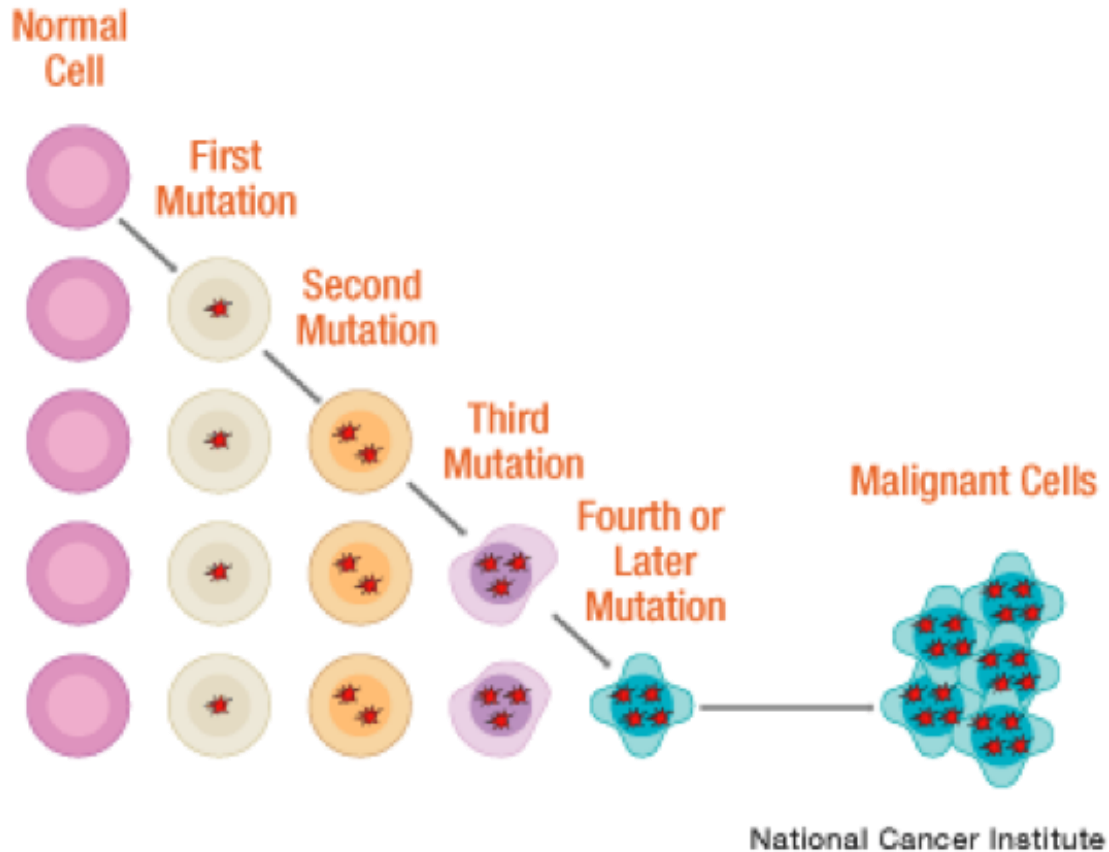


Figure 3 | Model for how new mutations are selected in



MUTAÇÃO

- Conseqüências das mutações:
- No curto e longo prazo.



MUTAÇÃO

- No curto prazo, as mutações podem comprometer o desenvolvimento e a fisiologia de um indivíduo;
- A célula pende para a estabilidade do DNA, ou seja;
- A célula evita a consumação da alteração genética (mutação)!
- Isso pode ser constatado em diversos aspectos celulares.

MUTAÇÃO

- O DNA como material genético é uma excelente opção!;
- A dupla hélice protege as regiões mais importantes (bases nitrogenadas);
- E a complementaridade dos nucleotídeos garante a oportunidade de manter a informação original em uma das cadeias e recuperar essa informação caso aconteça algo errado com a outra cadeia.

MUTAÇÃO

- A replicação do DNA é uma condição básica da vida;
- Mas também é uma situação que predispõe às mutações;
- No entanto, a marca da replicação é a fidelidade do processo;
- Até mesmo pela capacidade corretiva da DNA polimerase;
- A enzima que sintetiza DNA é capaz de corrigir pareamentos incorretos antes da incorporação na cadeia ou por meio da sua atividade exonucleolítica!

MUTAÇÃO

- O DNA celular está exposto à agentes mutagênicos o tempo todo;
- Devido a causas externas (por exemplo: luz ultra-violeta, radiação);
- E principalmente, de causas espontâneas, inerentes as próprias células:
- Além da replicação celular;
- Colisões químicas espontâneas;
- Modificações tautoméricas das bases nitrogenadas;
- DNA sujeito à subprodutos metabólicos.

MUTAÇÃO

TABLE 5-1 The Three Steps That Give Rise to High-Fidelity DNA Synthesis

Replication step	Errors per nucleotide added
5'→3' polymerization	1 in 10^5
3'→5' exonucleolytic proofreading	1 in 10^2
Strand-directed mismatch repair	1 in 10^3
Combined	1 in 10^{10}

- As taxas de mutação espontâneas são baixas;
- Podem variar conforme região do genoma, tipo celular e idade; mas mesmo entre espécies muito distantes;
- *E coli* de laboratório 3×10^{-9} e em humanos 1×10^{-9} .
- A DNA polimerase III gera uma taxa de erro na ordem de 10^{-5} (1 erro em cada 100.000 inserções);
- A atividade revisora da polimerase baixa essa taxa para 10^{-7} ;
- Mas a taxa observada de mutação é ainda menor, podendo chegar a 10^{-10} , de onde se conclui que existem sistemas de reparo operando.

MUTAÇÃO

- As taxas de lesões no DNA não se resumem ao malpareamento durante a replicação;
- Das milhares de alterações diárias em uma célula humana...;
- Apenas 0,02% são efetivadas.

TABLE 5-3 Endogenous DNA Lesions Arising and Repaired in a Diploid Mammalian Cell in 24 Hours

DNA lesion	Number repaired in 24 h
Hydrolysis	
Depurination	18,000
Depyrimidination	600
Cytosine deamination	100
5-Methylcytosine deamination	10
Oxidation	
8-oxo G	1500
Ring-saturated pyrimidines (thymine glycol, cytosine hydrates)	2000
Lipid peroxidation products (M1G, etheno-A, etheno-C)	1000
Nonenzymatic methylation by S-adenosylmethionine	
7-Methylguanine	6000
3-Methyladenine	1200
Nonenzymatic methylation by nitrosated polyamines and peptides	
O ⁶ -Methylguanine	20-100

REPARO

- Então, a taxa de mutação observada é muito menor do que a taxa esperada;
- Esse é uma característica comum entre as espécies;
- Portanto, as mutações podem ser “consertadas” por sistemas de reparo celular;
- De fato existem mecanismos específicos para sondagem de alterações e reparo;
- Que não se restringem a fase de replicação do DNA;
- E que existem de bactérias até mamíferos;

REPARO

- A importância dos mecanismos de reparo para as células pode ainda ser reconhecida;
- Pela quantidade de genes no genoma dedicados a esses mecanismos (ao menos 130 genes em humanos);
- Pelo envolvimento de genes do sistema de reparo em diferentes doenças;
- Pelo aumento da taxa de mutações quando há um comprometimento de um componente do sistema de reparo.

REPARO

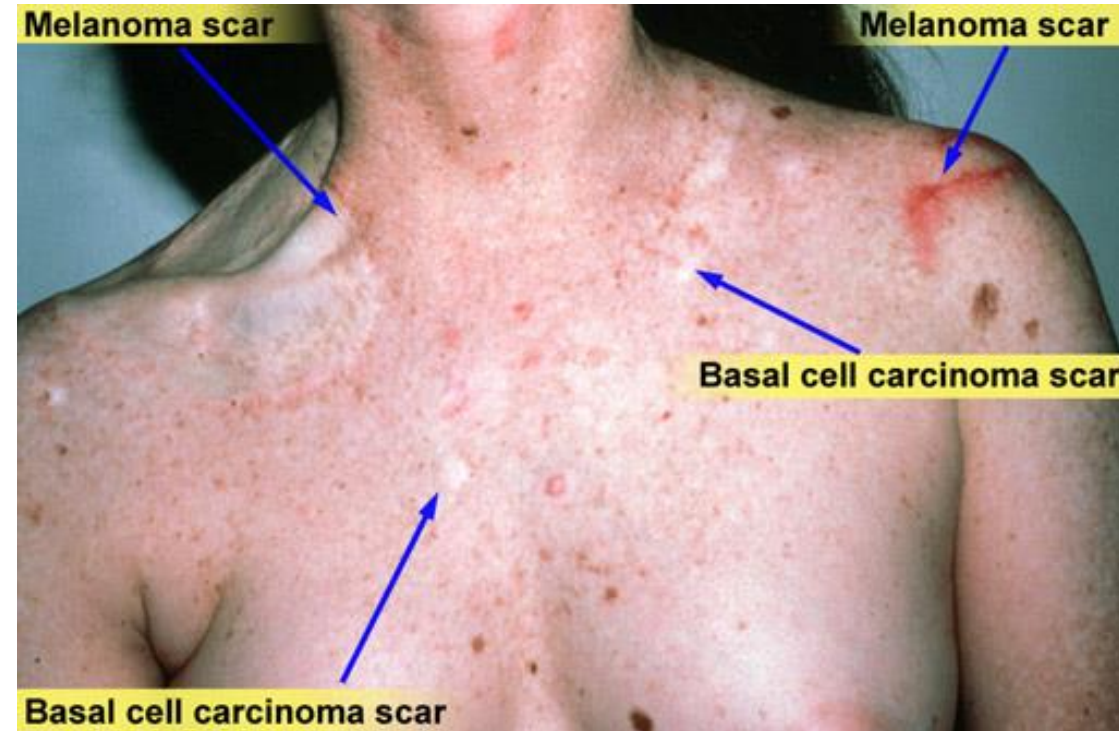
TABLE 5–2 Some Inherited Human Syndromes with Defects in DNA Repair

Name	Phenotype	Enzyme or process affected
MSH2, 3, 6, MLH1, PMS2	Colon cancer	Mismatch repair
Xeroderma pigmentosum (XP) groups A–G	Skin cancer, UV sensitivity, neurological abnormalities	Nucleotide excision repair
Cockayne syndrome	UV sensitivity; developmental abnormalities	Coupling of nucleotide excision repair to transcription
XP variant	UV sensitivity, skin cancer	Translesion synthesis by DNA polymerase ν
Ataxia telangiectasia (AT)	Leukemia, lymphoma, γ -ray sensitivity, genome instability	ATM protein, a protein kinase activated by double-strand breaks
BRCA1	Breast and ovarian cancer	Repair by homologous recombination
BRCA2	Breast, ovarian, and prostate cancer	Repair by homologous recombination
Werner syndrome	Premature aging, cancer at several sites, genome instability	Accessory 3'-exonuclease and DNA helicase used in repair
Bloom syndrome	Cancer at several sites, stunted growth, genome instability	DNA helicase needed for recombination
Fanconi anemia groups A–G	Congenital abnormalities, leukemia, genome instability	DNA interstrand cross-link repair
46 BR patient	Hypersensitivity to DNA-damaging agents, genome instability	DNA ligase I

REPARO

- Indivíduos afetados por essa doença apresentam extrema sensibilidade aos raios ultravioleta;
- Porque um sistema de reparo para solucionar os danos do UV no DNA não é operante;
- Essa condição aumenta a taxa de mutação dos tecidos mais expostos como a pele, e a suscetibilidade aos tumores em 1000x;
- Doença genética autossômica recessiva (1:200.000)
- A mutação pode afetar qualquer um dos 7 genes envolvidos com o sistema de reparo por excisão de nucleotídeo.

XERODERMA PIGMENTOSO



MECANISMOS DE REPARO

- Existem vários mecanismos de reparo celular;
- Que reconhecem distorções no DNA como indutores da sua atividade;
- As distorções podem ser reconhecidas por enzimas que detectam especificamente uma base alterada até uma alteração espacial mais genérica na estrutura do DNA.
- Os mecanismos de reparo podem ser classificados como:
 - Mal pareamento logo após a replicação;
 - De forma direta;
 - Reparo por excisão (em uma das cadeias de DNA);
 - Quebra das duas cadeia de DNA;
 - Translesão.

MECANISMOS DE REPARO

POR EXCISÃO MMR

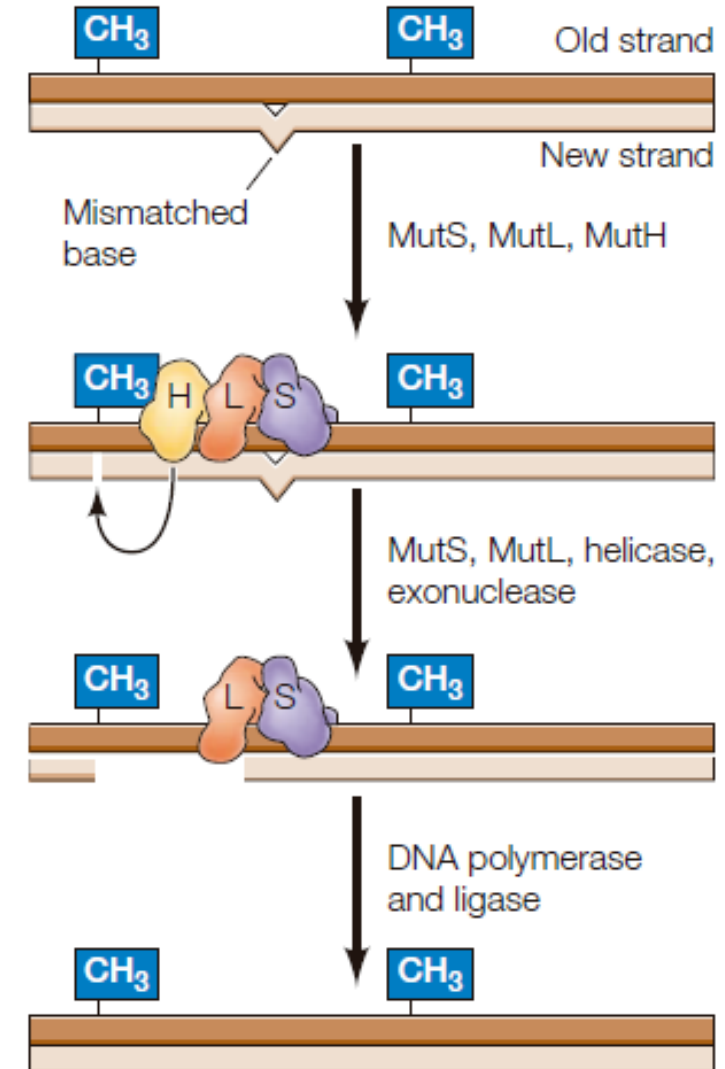
- O sistema de mal pareamento vasculha o DNA em busca de inserções, deleções ou de pareamentos incorretos;
- Esse sistema de reparo entra em ação logo após a replicação;
- Reconhece e corrige alterações de pareamentos incorretos que não foram corrigidas pela DNA polimerase;
- Ou detecta a formação de alças pela inserção ou deleção de bases em uma das fitas e corrige de acordo com a cadeia parental;

MECANISMOS DE REPARO

POR EXCISÃO

- Esse mecanismo de reparo depende do reconhecimento de qual cadeia é a antiga e qual é a cadeia recém-sintetizada, com mais chances de ser a cadeia portadora da alteração;
- Em *E coli*, a hemimetilação de cadeias permite essa identificação;
- Existe um intervalo de tempo para a metilação da nova cadeia em bases A de seqüências GATC;
- Que estão metiladas apenas na cadeia antiga.

MMR

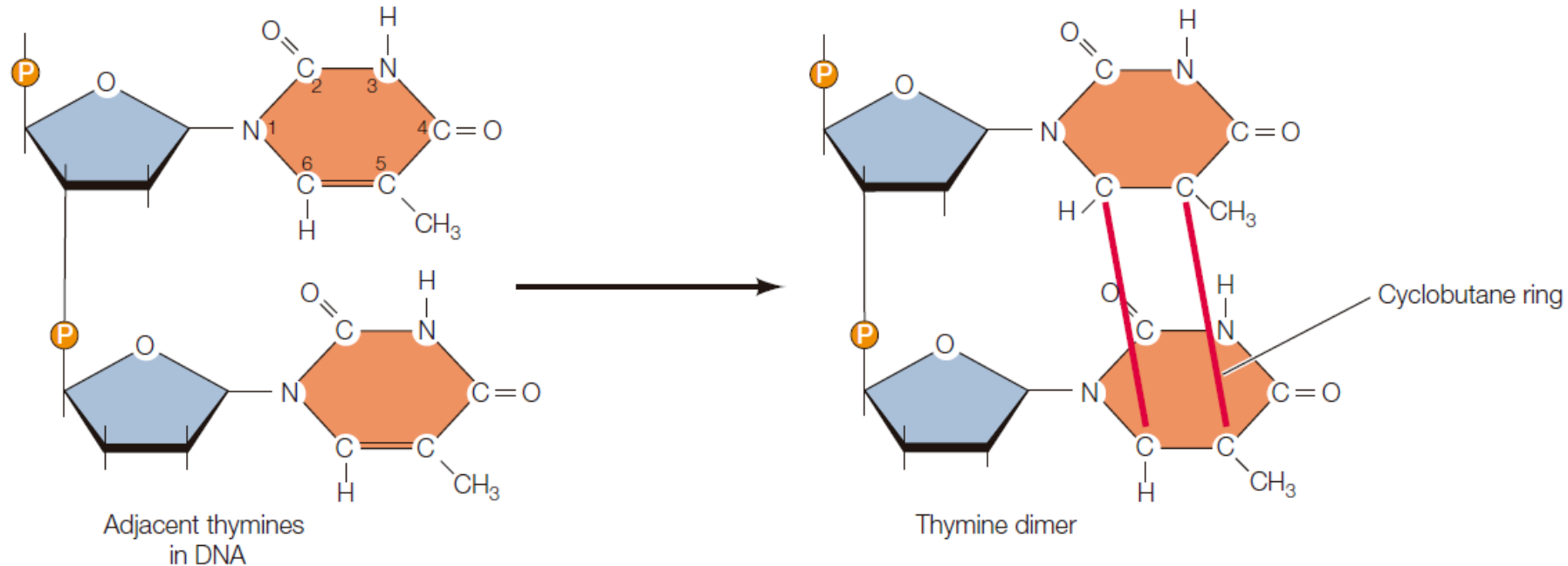


MECANISMOS DE REPARO

REPARO DIRETO

- A exposição aos raios ultravioletas;
- É uma das maiores geradoras de danos ao DNA;
- O mais recorrente é a formação de dímeros de pirimidina;
- Especialmente entre duas timinas adjacentes;

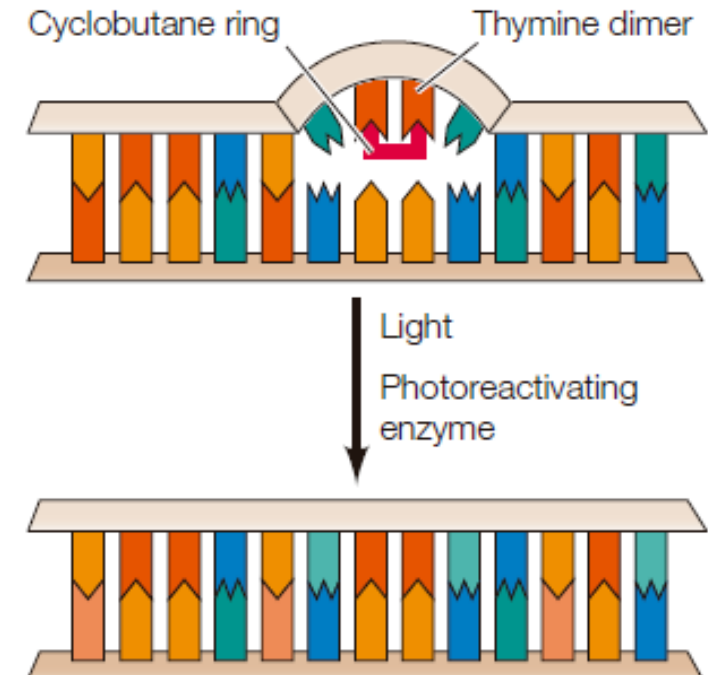
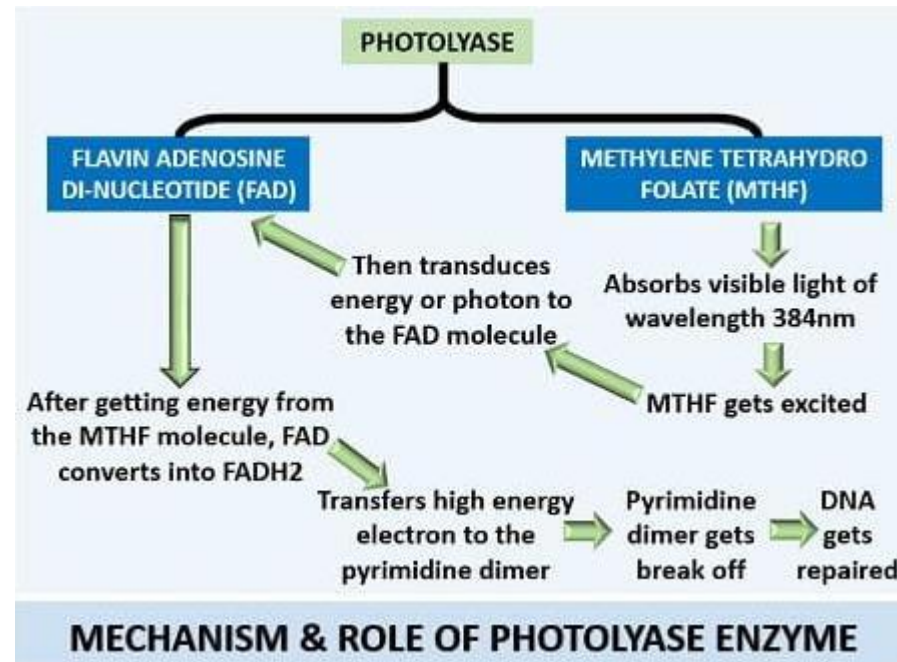
(B) Exposure to UV light



MECANISMOS DE REPARO

REPARO DIRETO

- A formação de dímeros é uma mutação importante;
- Que bloqueia transcrição e replicação;
- Algumas espécies, como bactérias, possuem uma enzima que reverte de forma direta as timinas originais por um sistema de reparo por fotorreativação;
- Mas o sistema de reparo direto;
- Que reverte ou desfaz alterações no DNA pela atuação direta de uma enzima;
- É um mecanismo de reparo pouco utilizado.



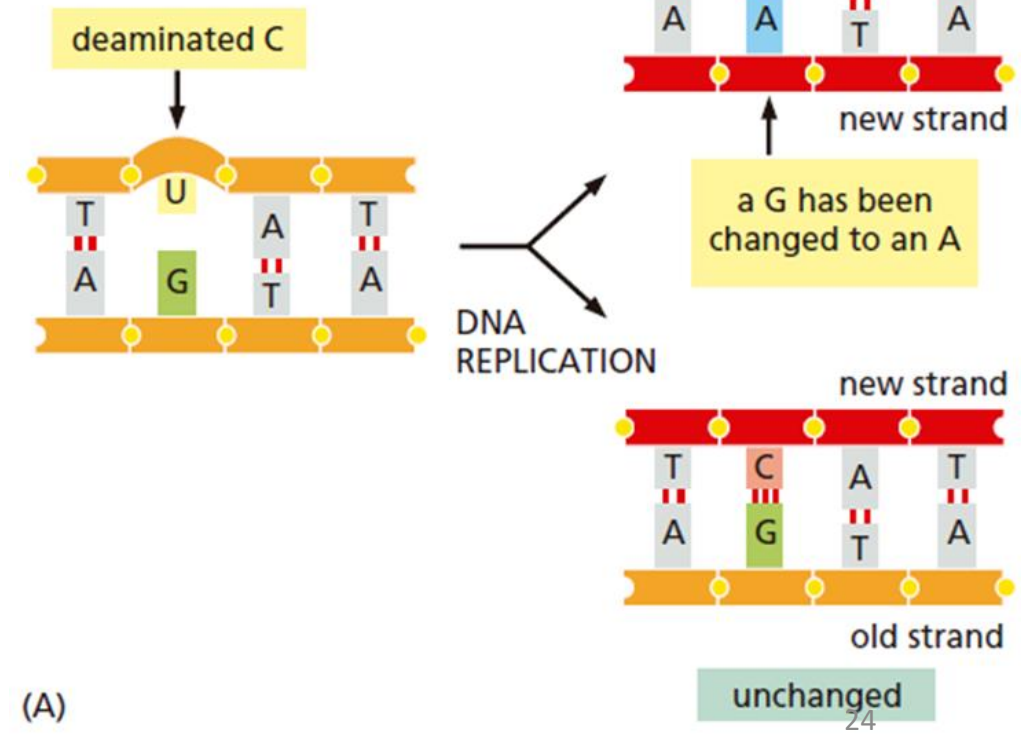
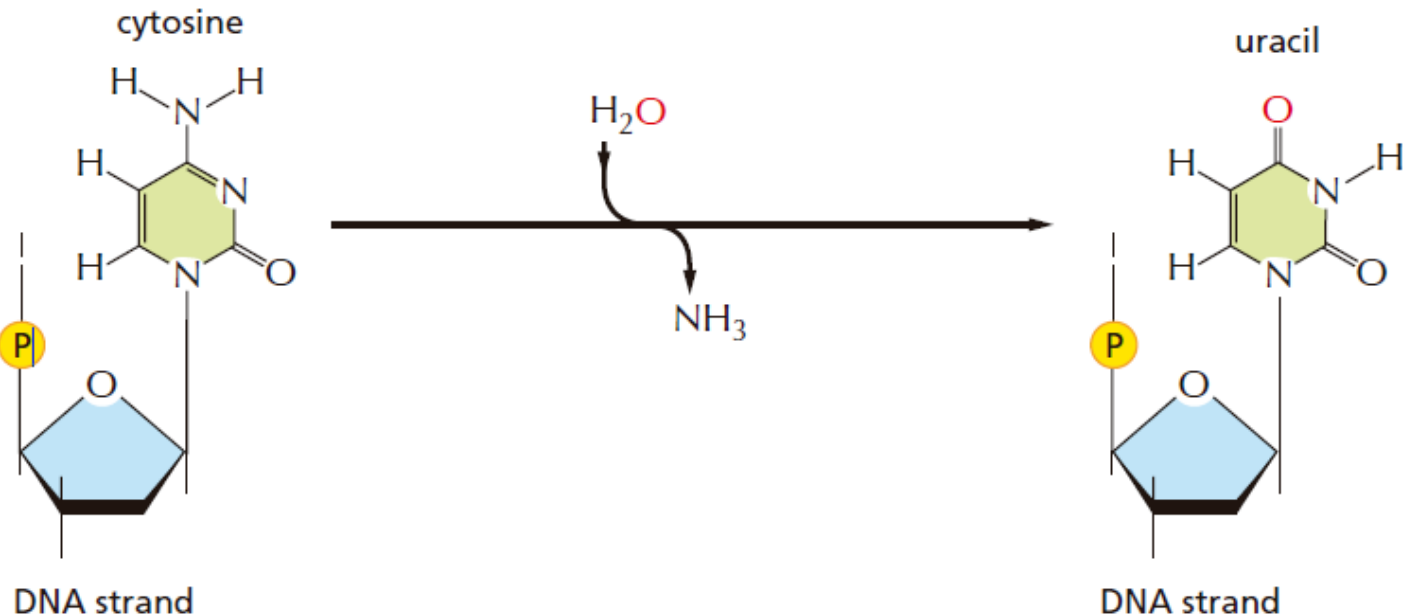
MECANISMOS DE REPARO POR EXCISÃO

- Os mecanismos de reparo por excisão apresentam características comuns;
- Sondagem do DNA por diferentes proteínas, cada uma capaz de reconhecer alterações na estrutura do DNA causadas por um dano específico;
- Reconhecimento possibilita a remoção de nucleotídeo ou de sequências de nucleotídeos seguida de síntese para o reparo;
- Podem ser agrupados em 3 tipos:
- Reparo de mal pareamento (MMR);
- Excisão de base (BER);
- Excisão de nucleotídeo (NER).

MECANISMOS DE REPARO POR EXCISÃO BER

- Esse tipo de reparo é utilizado para algumas mutações espontâneas onde uma base é convertida em outra;
- Por exemplo, como na desaminação;
- Mais comum para a citosina gerando uma uracila.

(B) DEAMINATION



MECANISMOS DE REPARO

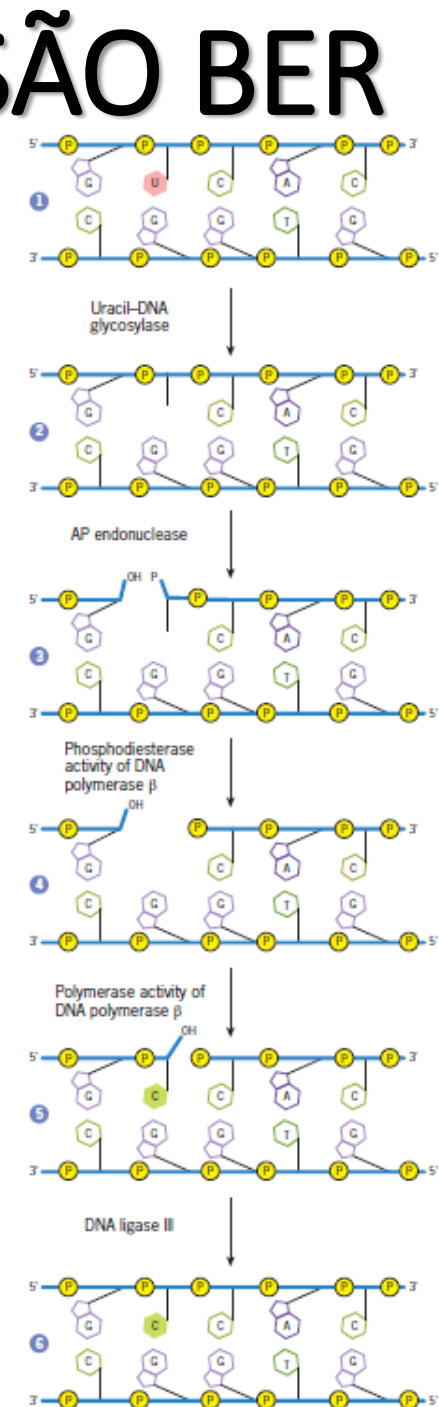
POR EXCISÃO BER

- O sistema de reparo por excisão de base remove o nucleotídeo com a base danificada e repõe o nucleotídeo correto;
- Esse mecanismo tb depende de um reconhecimento de alterações específicas no DNA;
- Diferentes enzimas vasculham diferentes tipos de alterações;
- Essas enzimas, as DNA glicolases, não só reconhecem;
- Como tb clivam a base do nucleotídeo e recrutam os demais componentes do sistema;



MECANISMOS DE REPARO POR EXCIÇÃO BER

- No caso da desaminação da citosina gerando uma uracila;
- Uma uracil DNA glicosilase reconhece a alteração na estrutura do DNA e remove a base nitrogenada;
- Gera um nucleotídeo apirímico (sem a sua pirimidina);
- Reconhecido por uma endonuclease apirímica;
- Que cliva a fita imediatamente ao lado do nucleotídeo;
- Atividade de fosfodiesterase remove fósforo 5' e possibilidade polimerase repor nucleotídeo correto e DNA ligase selar a cadeia.



MECANISMOS DE REPARO

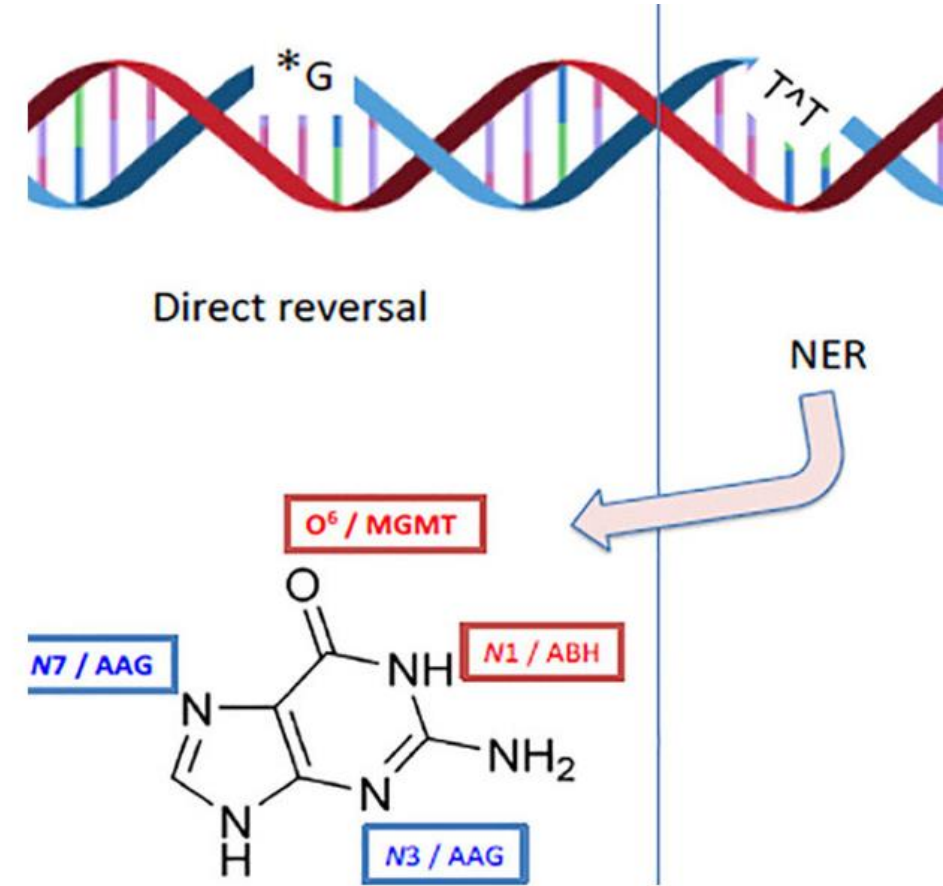
POR EXCISÃO MER

- O sistema de reparo por excisão de nucleotídeo remove uma sequência de nucleotídeos incluindo a região alterada e repõe a sequência correta;
- Sistema atrelado a danos mais significativos na estrutura do DNA;
- Não no que diz respeito aos efeitos implicados na função da mutação;
- Mas impeditivos da transcrição ou replicação.

MECANISMOS DE REPARO

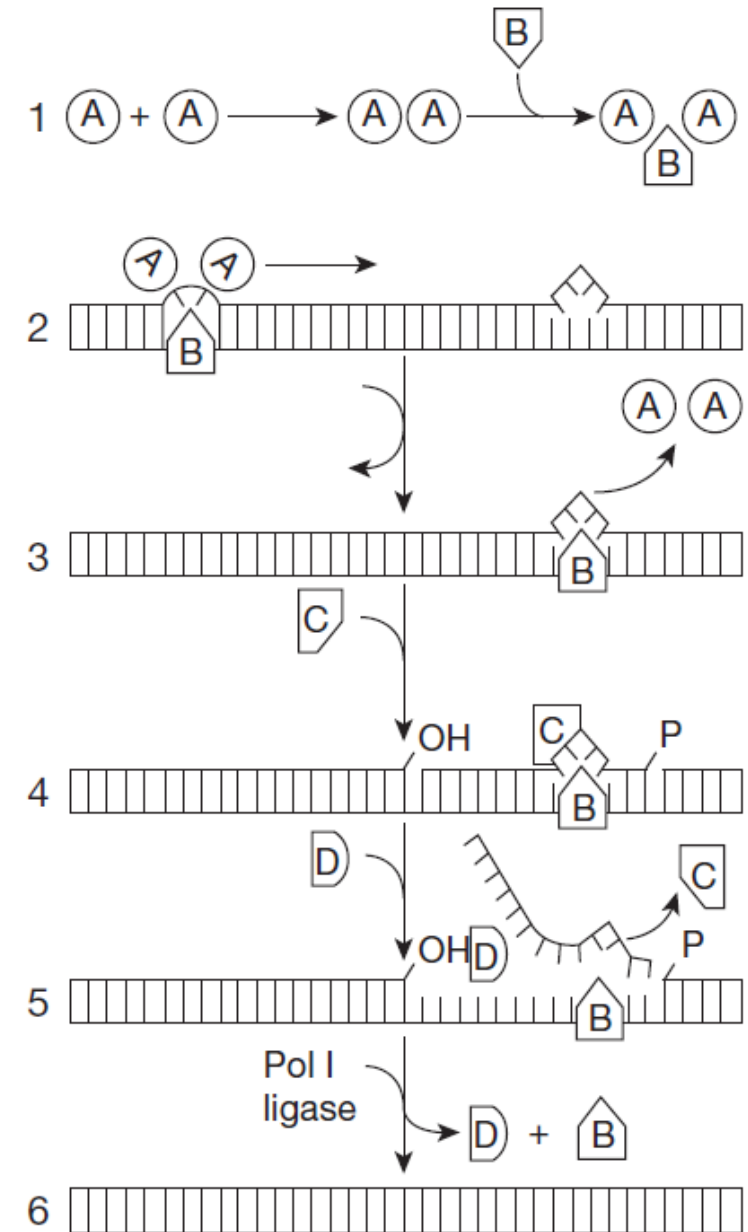
- Exemplos de danos dessa natureza são modificações de nucleotídeos como a O⁶ metilguanina e formação de dímeros (ligações covalentes entre bases) como dímero de timinas;
- Então, a formação de dímeros de timina pode ser reparada por diferentes mecanismos, mesmo em bactérias;
- Tb O⁶ metilguanina pode ser reparada de forma direta.

POR EXCISÃO MER



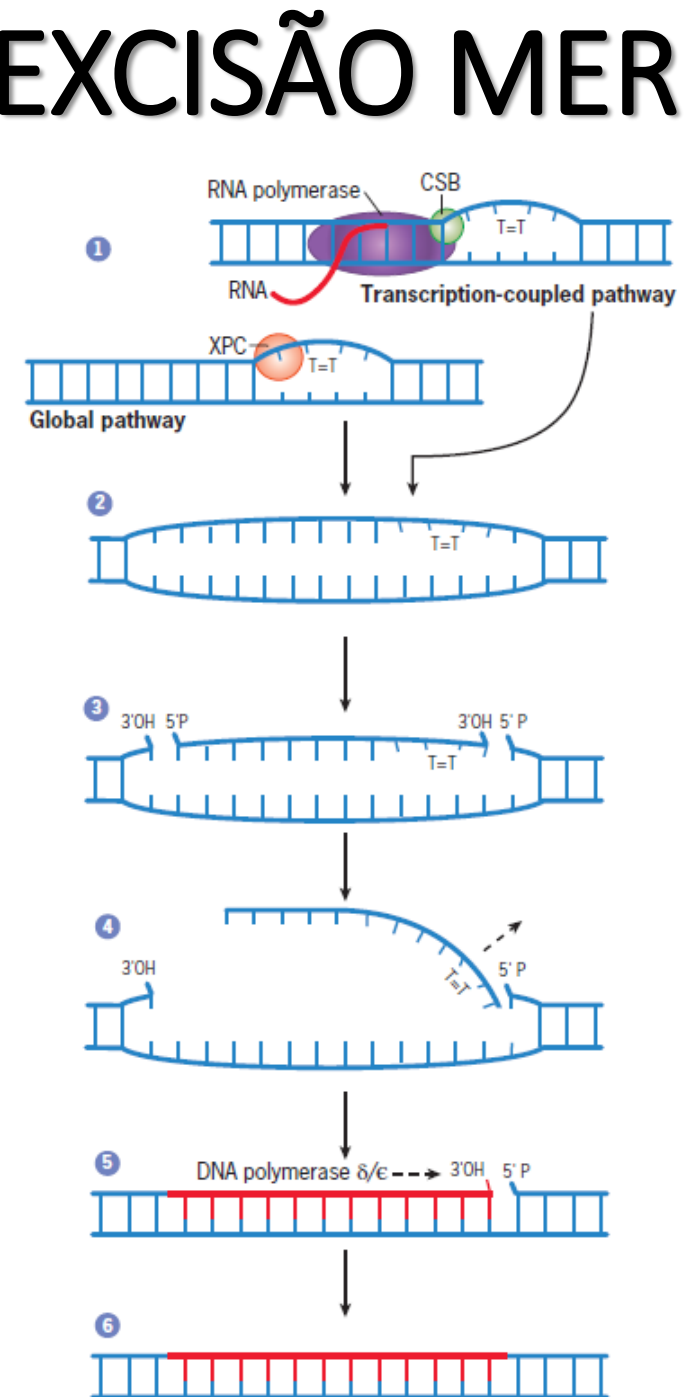
MECANISMOS DE REPARO POR EXCISÃO MER

- En *E coli* esse mecanismo depende de etapas sucessivas da atuação de um complexo enzimático;
- Inicialmente enzimas do complexo escaneiam o DNA;
- E são capazes de reconhecer uma grande variedade de estruturas danificadas de DNA;
- Recrutando enzimas que clivam a certa distância (antes e depois da lesão), em torno de 10 nucleotídeos;
- DNA polimerase I remove e repõe a sequência;
- DNA ligase religa a cadeia.



MECANISMOS DE REPARO POR EXCISÃO MER

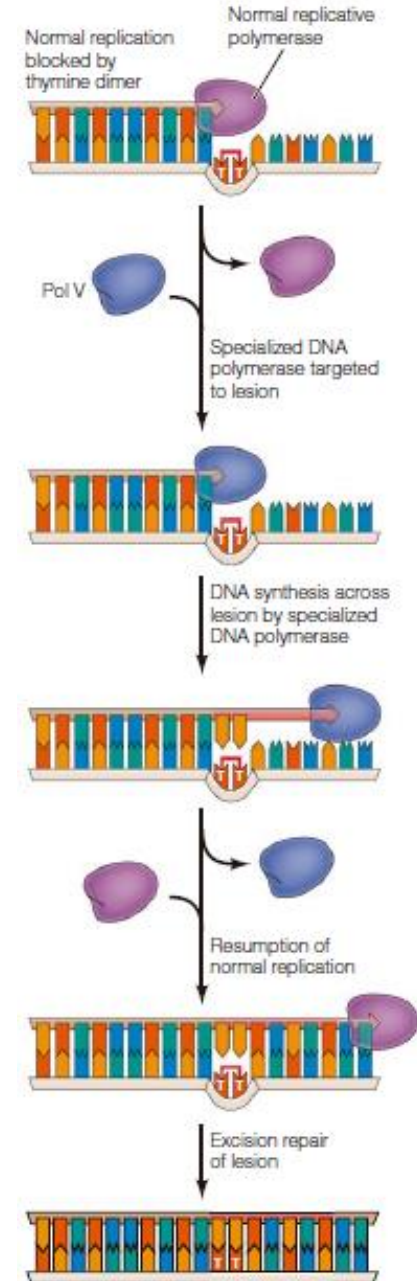
- Em eucariotos, o mecanismo geral é muito semelhante;
- Assim como em bactérias, existem dois mecanismos desse tipo de reparo, um de vasculhamento global no genoma, menos eficiente;
- E outro, acoplado a transcrição;
- Nesse caso a própria RNA polimerase reconhece o dano e interrompe sua atividade;
- O fator TFII-D recruta enzimas do complexo de excisão de nucleotídeo para corrigir o dano.



MECANISMOS DE REPARO

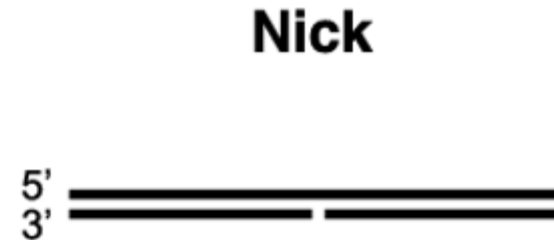
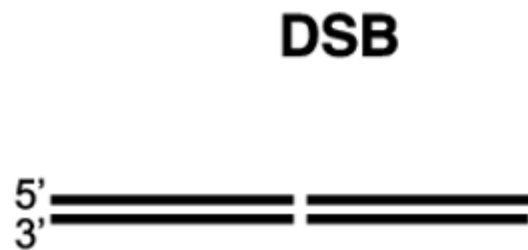
TRANSLESÃO

- Em algumas situações, danos no DNA não foram corrigidos até o momento da replicação;
- Alguns danos, como o dímero de timina na mesma fita, induz a parada de síntese pela DNA polimerase;
- Um sinal é enviado para recrutamento de uma DNA polimerase especializada nesse tipo de reparo;
- Essa polimerase substitui a polimerase replicativa e logo após a polimerização do trecho alterado a enzima replicativa reassume;
- Tanto em bactérias como em eucariotos foram descobertas várias dessas polimerases;
- Elas são muito mais suscetíveis a erros (são menos rigorosas na escolha dos nucleotídeos e não tem atividade revisora) mas aparentemente lidam melhor com situações de reparo (no caso, capazes de parear adeninas com a dupla de timinas).



REPARO DUPLA-FITA DSB

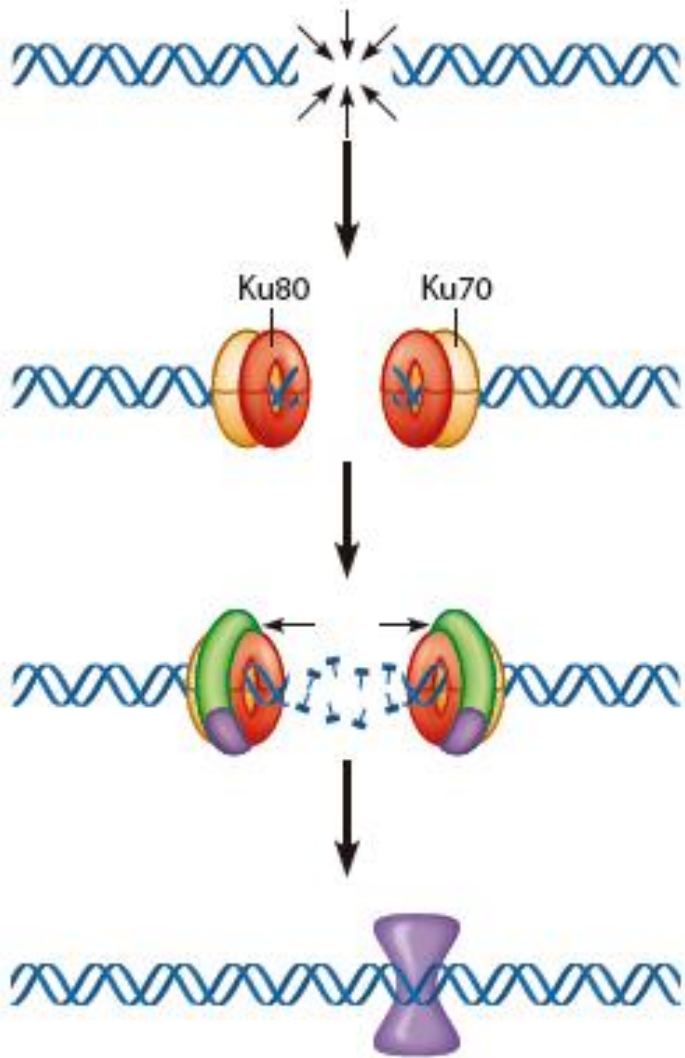
- Radiações ionizantes, erros da replicação e agentes oxidativos podem gerar quebra na molécula de DNA;
- A quebra de uma cadeia (de uma ligação fosfodiéster) gera um picote (*nick*) que é facilmente reparado;
- Esses agentes tb podem gerar quebra da dupla fita;
- Que é um problema mais sério para a célula;
- Pode ter várias consequências comprometendo a integridade do genoma como a perda de genes;



REPARO DUPLA-FITA DSB

- O reparo da dupla-fita é mais complexo;
- E pode não ser um reparo integral que pode desencadear problemas para a célula.
- As células apresentam duas formas de reparo da dupla fita, utilizando uma molécula molde (como para a maioria dos mecanismos de reparo), ou não.
- Junção de extremidades não homólogas (*nonhomologous end joining*);
- E junção por recombinação homóloga.

REPARO JUNÇÃO DE EXTREMIDADES NÃO-HOMÓLOGAS NHEJ

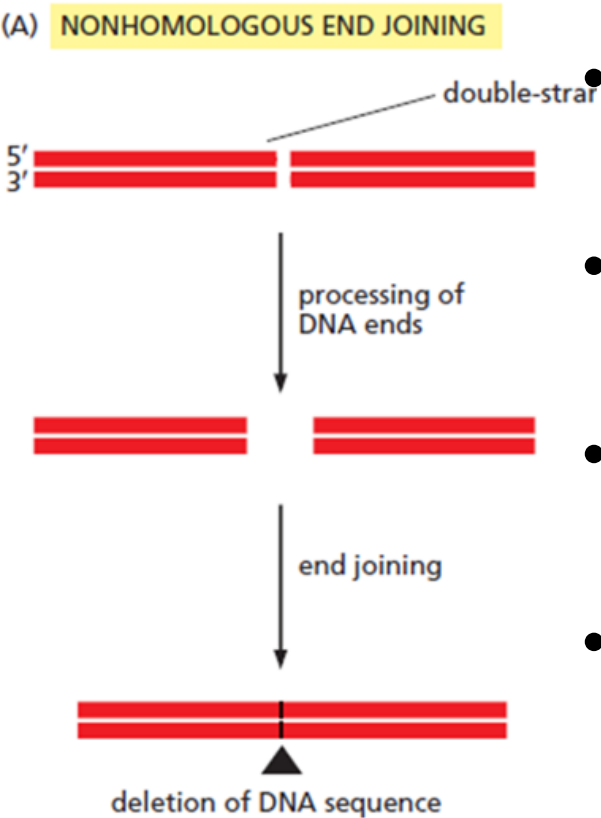


- Esse reparo não envolve a utilização de uma cadeia molde;
- Existem algumas versões desse mecanismo, mas a principal/ ou melhor conhecida envolve simplesmente a aproximação e ligação das extremidades soltas;
- O reconhecimento de extremidades soltas é feito por proteínas nucleares KU;
- As proteínas KU aproximam as extremidades e recrutam outras enzimas que aparam diferenças nas extremidades ou as tornam do mesmo tamanho completando a extremidade menor;

REPARO JUNÇÃO DE EXTREMIDADES NÃO-HOMÓLOGAS

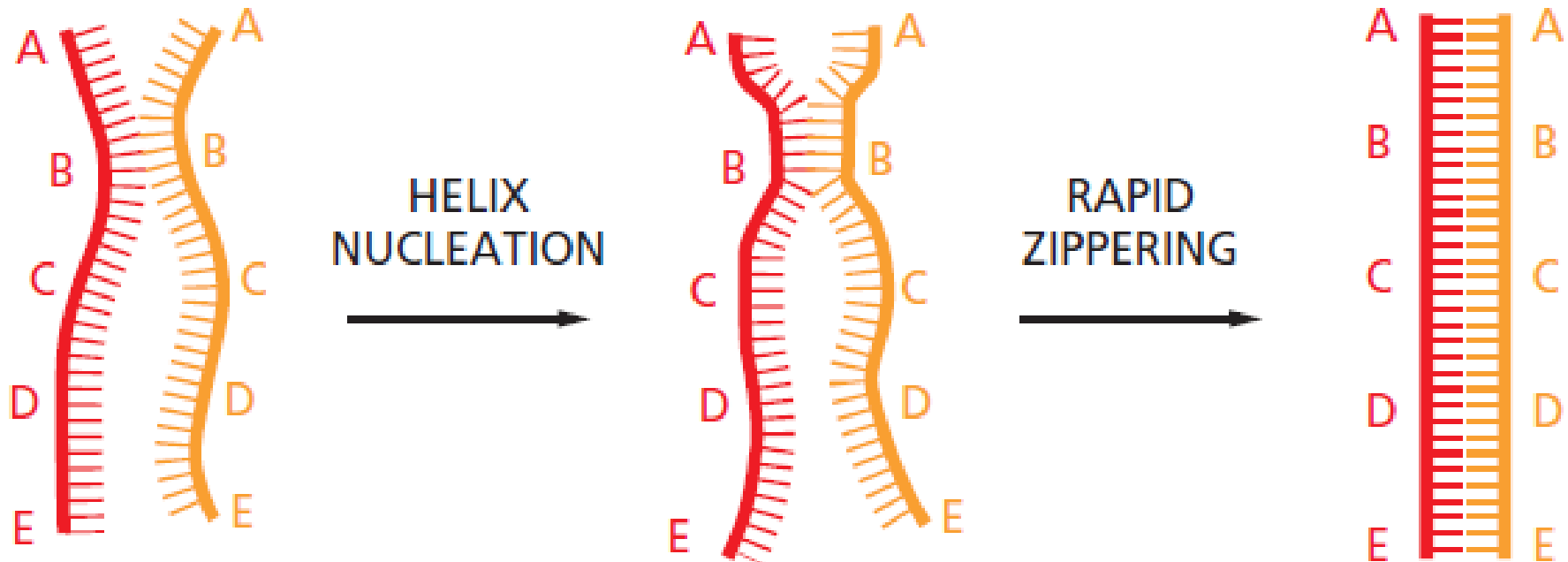
NHEJ

- Esse mecanismo não utiliza fita molde para reparo;
- O que muitas vezes leva a ligação de cadeias onde sequências foram perdidas;
- Apesar desse sistema ser muito utilizado em células de mamíferos;
- Isso não gera um problema para a maior parte do genoma desses animais;
- Mas eventualmente, extremidades de cadeias diferentes podem ser ligadas, condição inviável para a célula;
- Porém, é um mecanismo relativamente simples e rápido, que utilizado evita problemas maiores;
- E nem sempre existem moldes a disposição para recuperar a informação original.



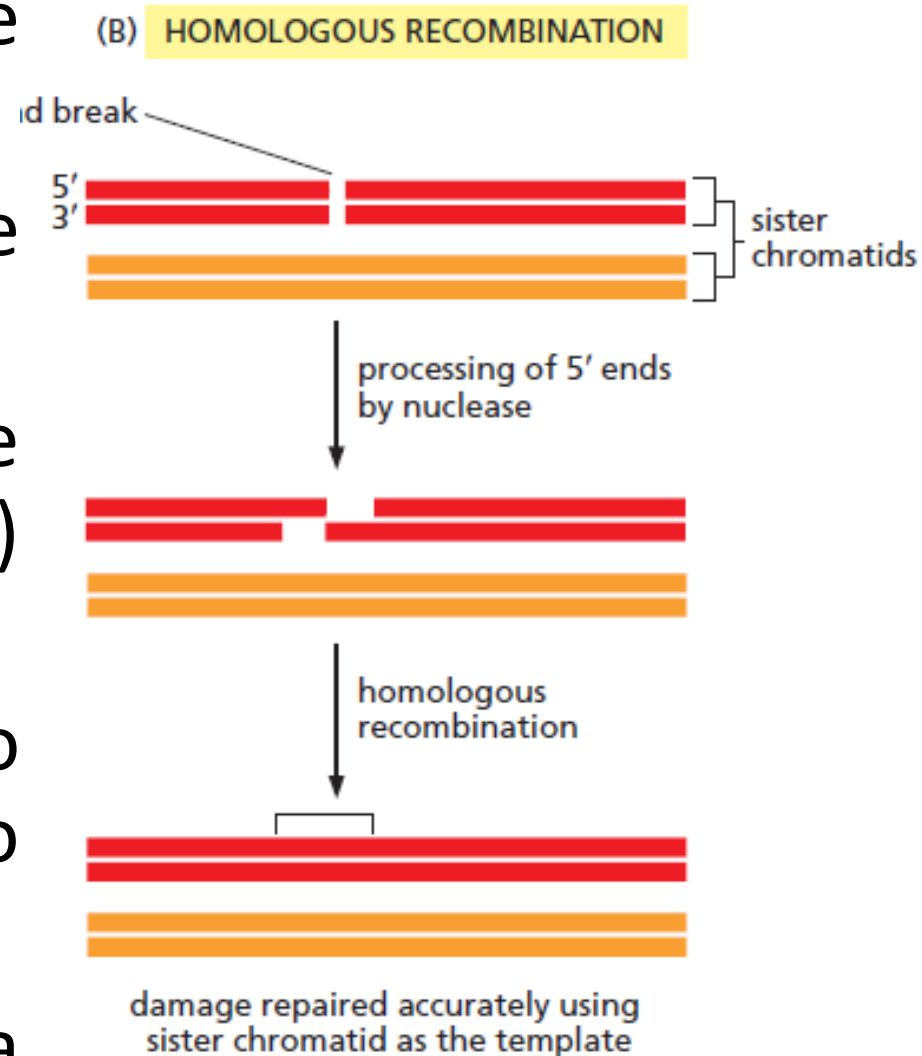
REPARO POR RECOMBINAÇÃO HOMÓLOGA

- A complementaridade entre nucleotídeos não só possibilita a dupla hélice da molécula de DNA;
- Mas possibilita a formação de novas moléculas de DNA com cadeias híbridas originadas de moléculas diferentes;
- Desde que elas tenham as mesmas sequências ou sejam muito similares;



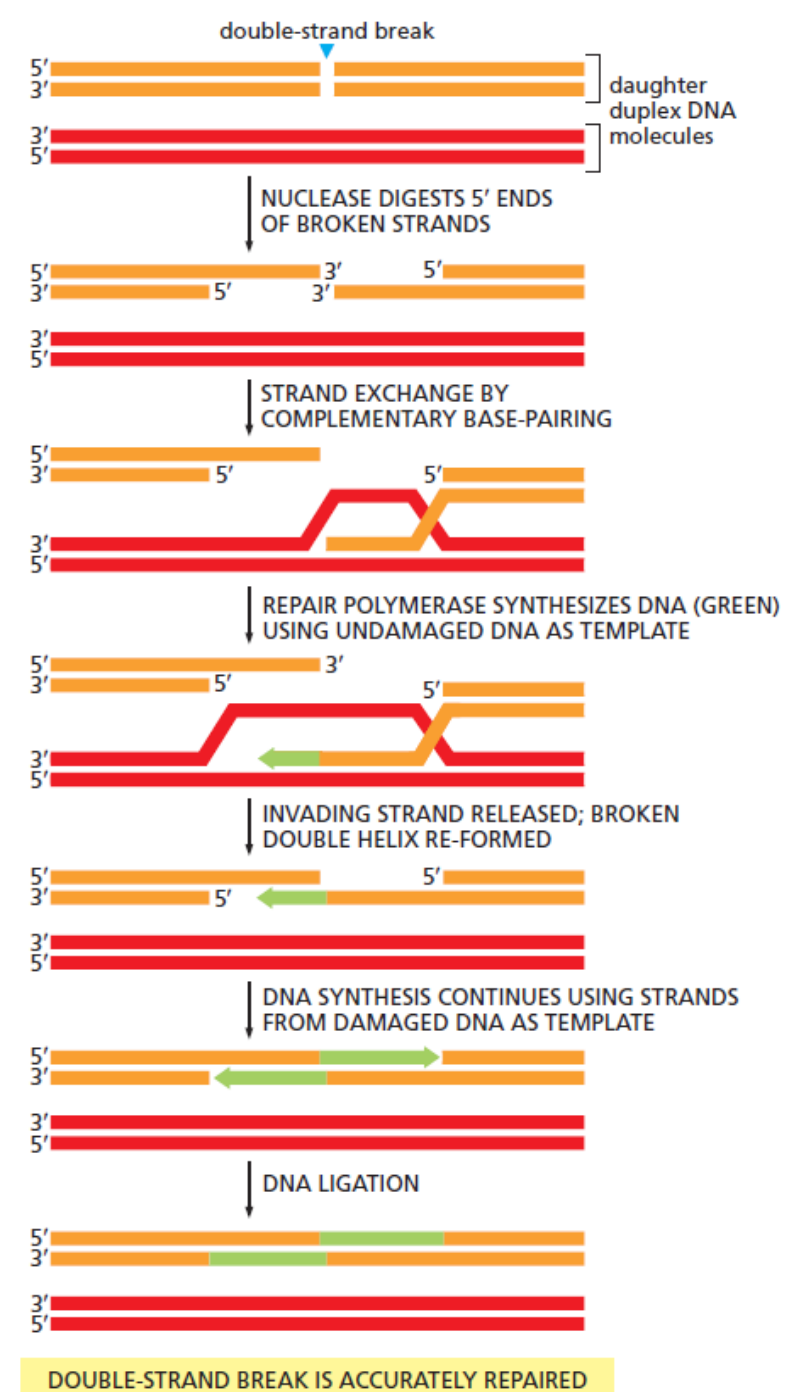
REPARO POR RECOMBINAÇÃO HOMÓLOGA

- A homologia de sequências entre moléculas diferentes proporciona um mecanismo de reparo;
- Muito mais acurado do que a junção de extremidades;
- Envolve a utilização de trechos de DNA de uma molécula distinta (cromátide irmã) como molde para reparo;
- Por isso, só pode ocorrer após a duplicação enquanto as cromátides irmãs estão disponíveis;
- Processo conservado, de bactérias e levedura até organismos mais complexos.



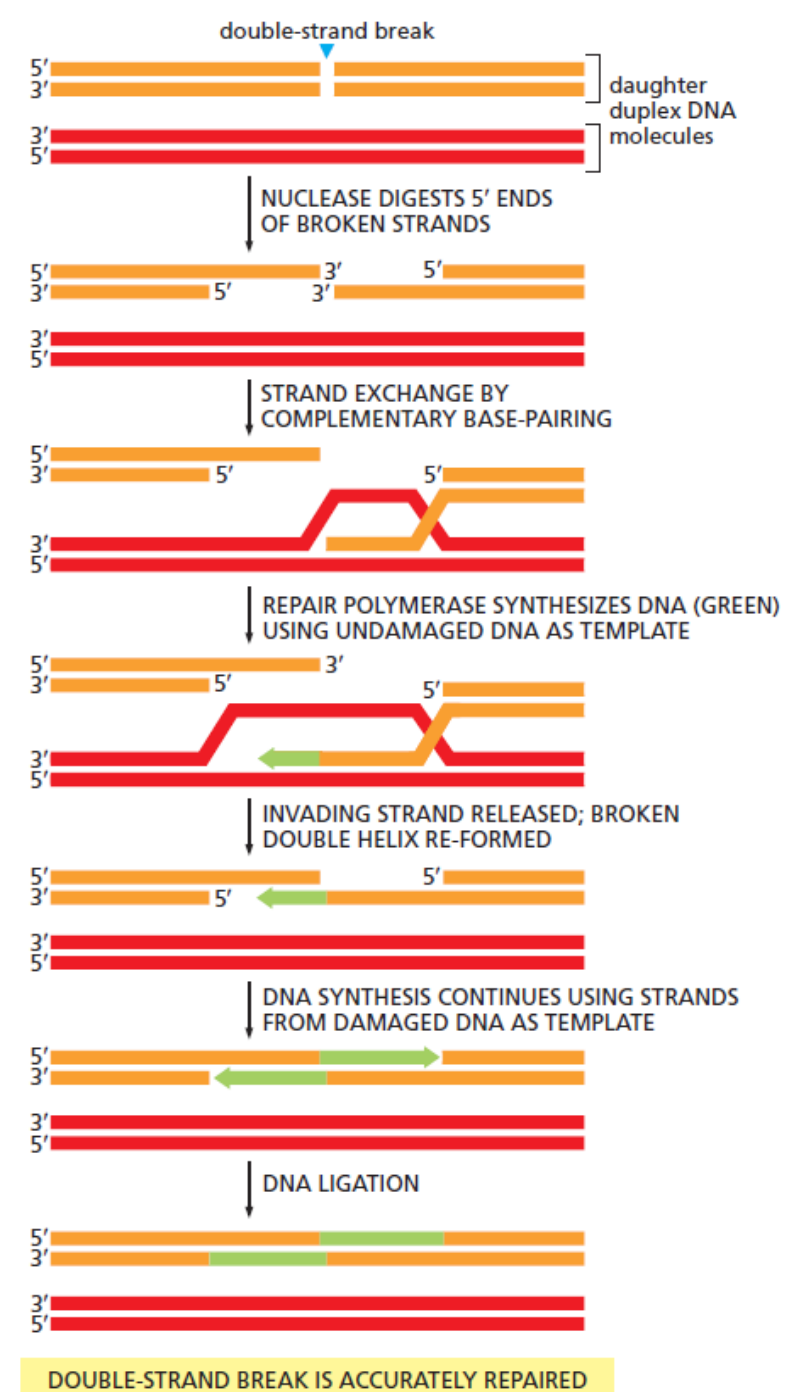
REPARO POR RECOMBINAÇÃO HOMÓLOGA

- Em primeiro lugar uma nuclease atua nas extremidades 5' quebradas deixando as extremidades 3' salientes;
- Uma das fitas 3' rompidas invade a dupla fita irmã, desfazendo as pontes de hidrogênio originais e pareia com regiões homólogas;
- Uma polimerase agora estende a fita 3' a partir da fita homóloga complementar;



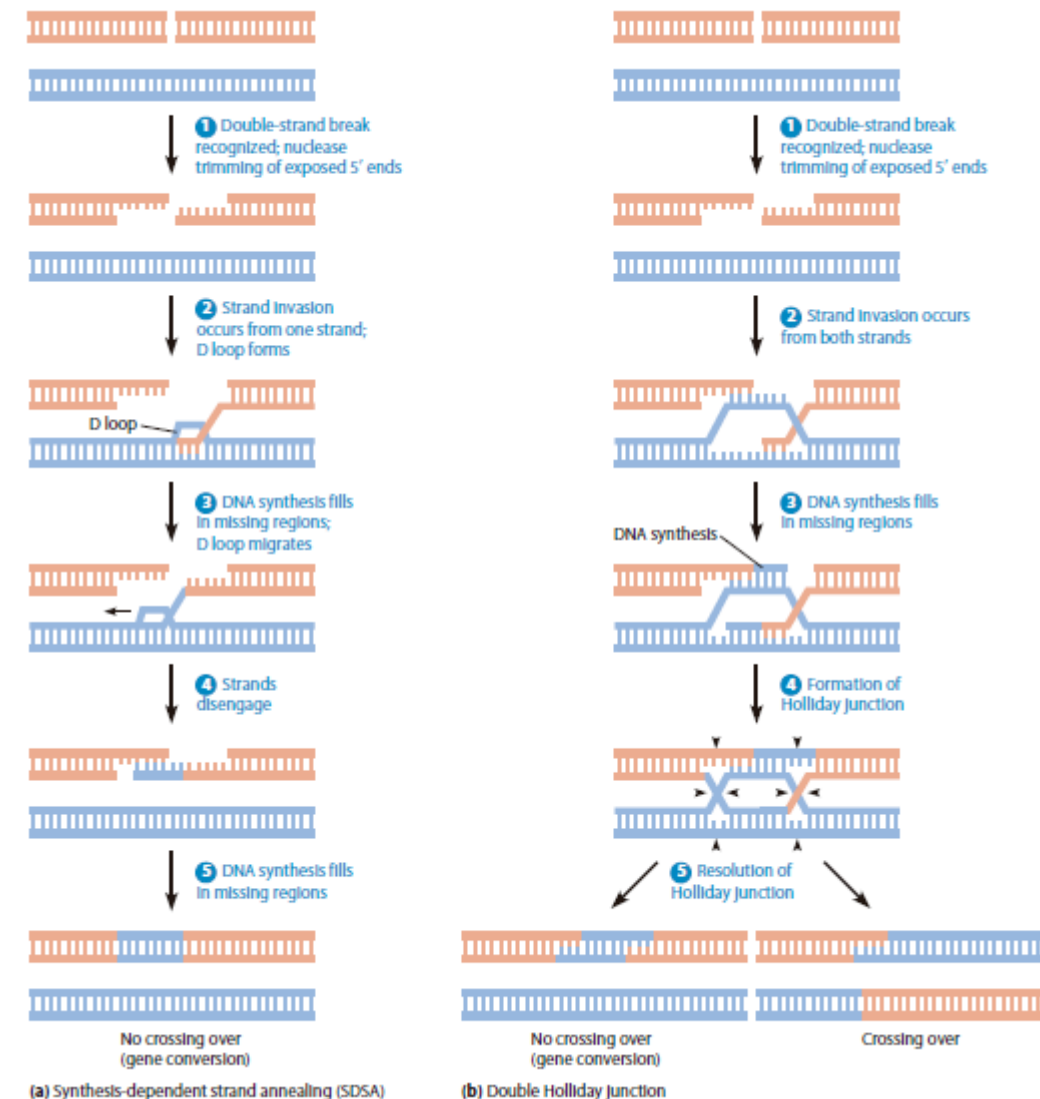
REPARO POR RECOMBINAÇÃO HOMÓLOGA

- A fita 3' estendida é deslocada para o cromossomo original;
- Possibilitando o reparo da outra fita irmã;
- Atuação de DNA polimerase e DNA ligase finaliza o reparo nas duas fitas;
- Portanto, diferente de outros mecanismos de reparo, a recombinação homóloga utiliza como molde uma cadeia complementar de uma molécula distinta daquela que sofreu alterações.



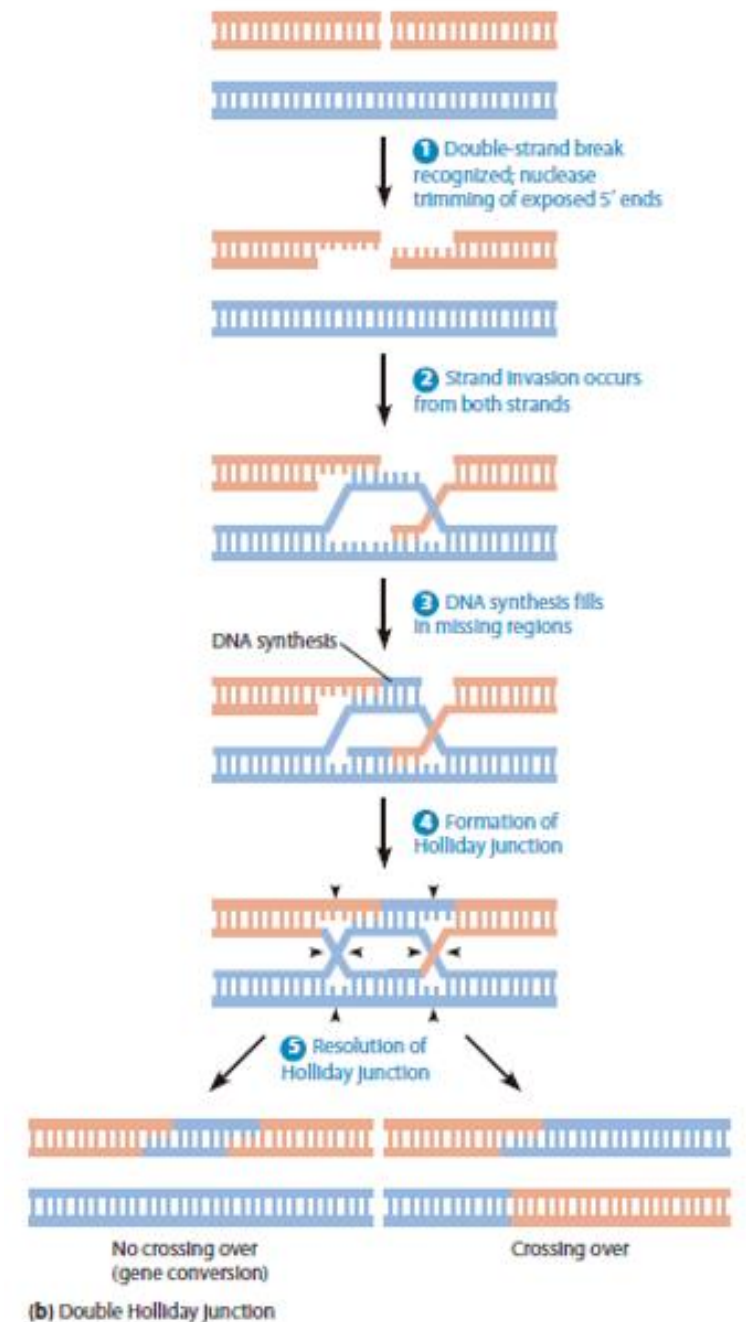
REPARO POR RECOMBINAÇÃO HOMÓLOGA

- A fita 3' invasora ao deslocar uma das cadeias originais forma a alça D;
- Eventualmente a alça D (cadeia deslocada) pode servir de molde para a outra cadeia 3';
- Então, as duas cadeias quebradas 3' agora são estendidas a partir das cadeias irmãs;
- Essa estrutura cruzada é chamada de junção de Holliday e duas formas são possíveis para resolver essa estrutura:



REPARO POR RECOMBINAÇÃO HOMÓLOGA

- Na maior parte das vezes, após o reparo as cadeias retomam sua posição original;
- A outra possibilidade envolve quebras e trocas de regiões intactas de cromátides homólogos, *crossing over*;
- No primeiro caso, pode haver o fenômeno de conversão gênica;
- As cromátides reparadas adquirem as sequências das cadeias homólogas e passam a ter a sequência delas, mesmo que sejam diferentes.



REPARO POR RECOMBINAÇÃO HOMÓLOGA

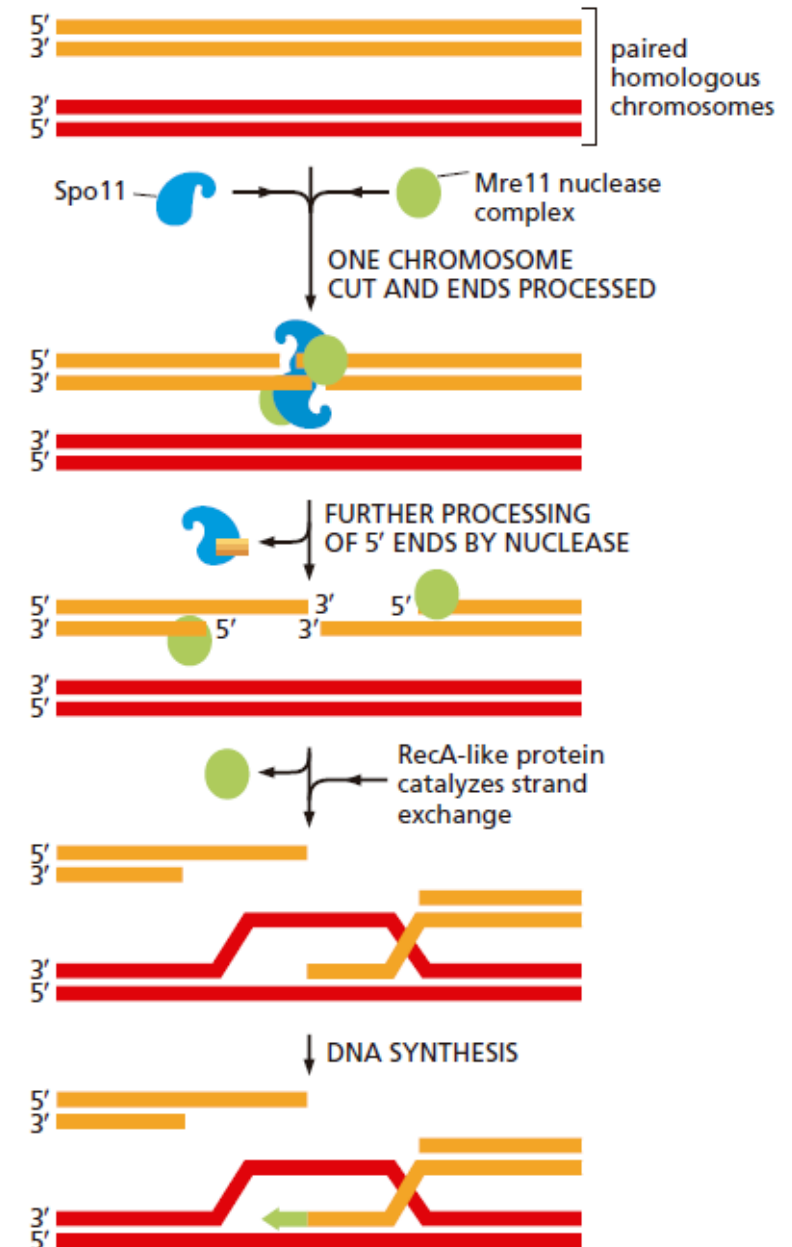
- O reparo por recombinação homóloga é muito mais acurado do que juntar fitas quebradas;
- Mas só pode ser utilizado a partir da replicação do DNA e as cromátides homólogas precisam estar próximas;
- Não é um mecanismo preferencial de reparo em mamíferos;
- O reparo das duas cadeia pode levar a conversão gênica;
- Há perda de heterozigose e eventualmente pode ser copiados alelo deletério (haverá perda da cópia “boa”);

REPARO POR RECOMBINAÇÃO HOMÓLOGA

- A recombinação homóloga é um processo versátil;
- Pode ser utilizada para reparo de única da cadeia (*nick*) durante na forquilha de replicação;
- Tb é a base *crossing-over* durante a meiose nas células germinativas;
- A recombinação homóloga para reparo e a recombinação homóloga para o crossing over
- Apresentam semelhanças e diferenças;

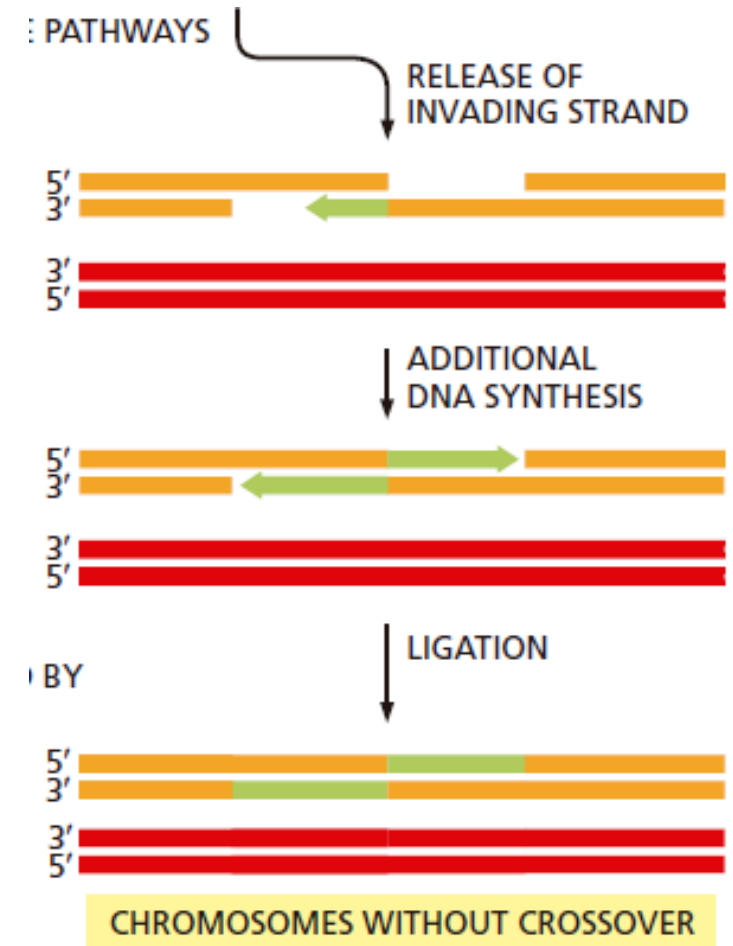
REPARO POR RECOMBINAÇÃO HOMÓLOGA

- Na recombinação genética, participam enzimas inicialmente que promovem quebra deliberada da dupla fita de DNA;
- Recrutando enzimas que diminuem a extremidade 5' e promovem a invasão de uma das fitas 3' na dupla fita intacta;
- As cadeias da dupla fita intacta são desfeitas e uma das cadeias é molde para extensão da cadeia invasora a partir do seu 3';



REPARO POR RECOMBINAÇÃO HOMÓLOGA

- O processo favorece a recombinação entre cadeias homólogas;
- Mas na maior parte das vezes, o processo é finalizado;
- Com a cadeia invasora voltando para sua origem e as duas cadeias rompidas;
- São polimerizadas e ligadas;
- Como no reparo de DNA;



REPARO POR RECOMBINAÇÃO HOMÓLOGA

- A junção de Holliday;
- Geram diversas conformações possíveis entre o heteroduplex;
- E a atuação de nucleases que clivam em pontos específicos;
- Promovem a troca de regiões entre as duas cadeias e a geração de novas combinações genéticas.

