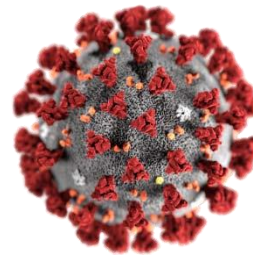




EACH | campus capital
USP
LESTE
Escola de Artes, Ciências e Humanidades
Universidade de São Paulo



Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Biologia Molecular

BBM5002 - Bioquímica e Biologia Molecular

Docente:

Prof. Dr. Felipe S. Chambergo – fscha@usp.br

<https://sites.usp.br/lbbp/>

Data: Segunda-feira 14 – 16 h / Sexta-feira 8 - 12 h.

USP – 2021-1S

Orientações para o Módulo II

Conteúdo

- 1- Aula: DNA o material genético primário
- 2- Aula: Elementos genéticos que controlam a expressão gênica
- 3- Aula: SARS-CoV-2 e COVID-19

Avaliação

As atividades do módulo II receberão nota do docente: presença na aula (A), participação na aula (P) e apresentação de seminário (S).

A Nota no módulo II (N) será dada pela equação: $N = 0,1A + 0,2P + 0,7S$

O conceito final da disciplina será baseado no seguinte critério:

Média < 6,0: Conceito R (reprovado)

6,0 <= Média < 7,5: Conceito C

7,5 <= Média < 9,0: Conceito B

Média => 9,0: Conceito A

Seminário

- Utilizando o documento do site VACCINE TRACKER (<https://covid19.trackvaccines.org/>), onde é mostrada a lista de vacinas em uso contra COVID-19, identificar e selecionar uma vacina para elaborar o seminário relacionado **a todos os aspectos do desenvolvimento dessa vacina**. O tema de seminário será:
“Desenvolvimento de uma vacina contra a COVID-19” – VACINA ESCOLHIDA
- O seminário será apresentado de forma oral (25 minutos + 5 de perguntas) e deve seguir a estrutura: título, introdução e justificativa, objetivos, material e métodos, resultados e discussão, perspectivas, relevância do tema na sua formação e no curso de pós-graduação e bibliografia segundo a norma ABNT. Apresentação em formato Power Point.
- Será avaliada a apresentação técnica do tema, desenvolvimento, conteúdo, respeito ao tempo e participação na fase de perguntas nos demais seminários. O arquivo com o seminário apresentado deve ser entregue no dia de sua apresentação (21/06/2021).

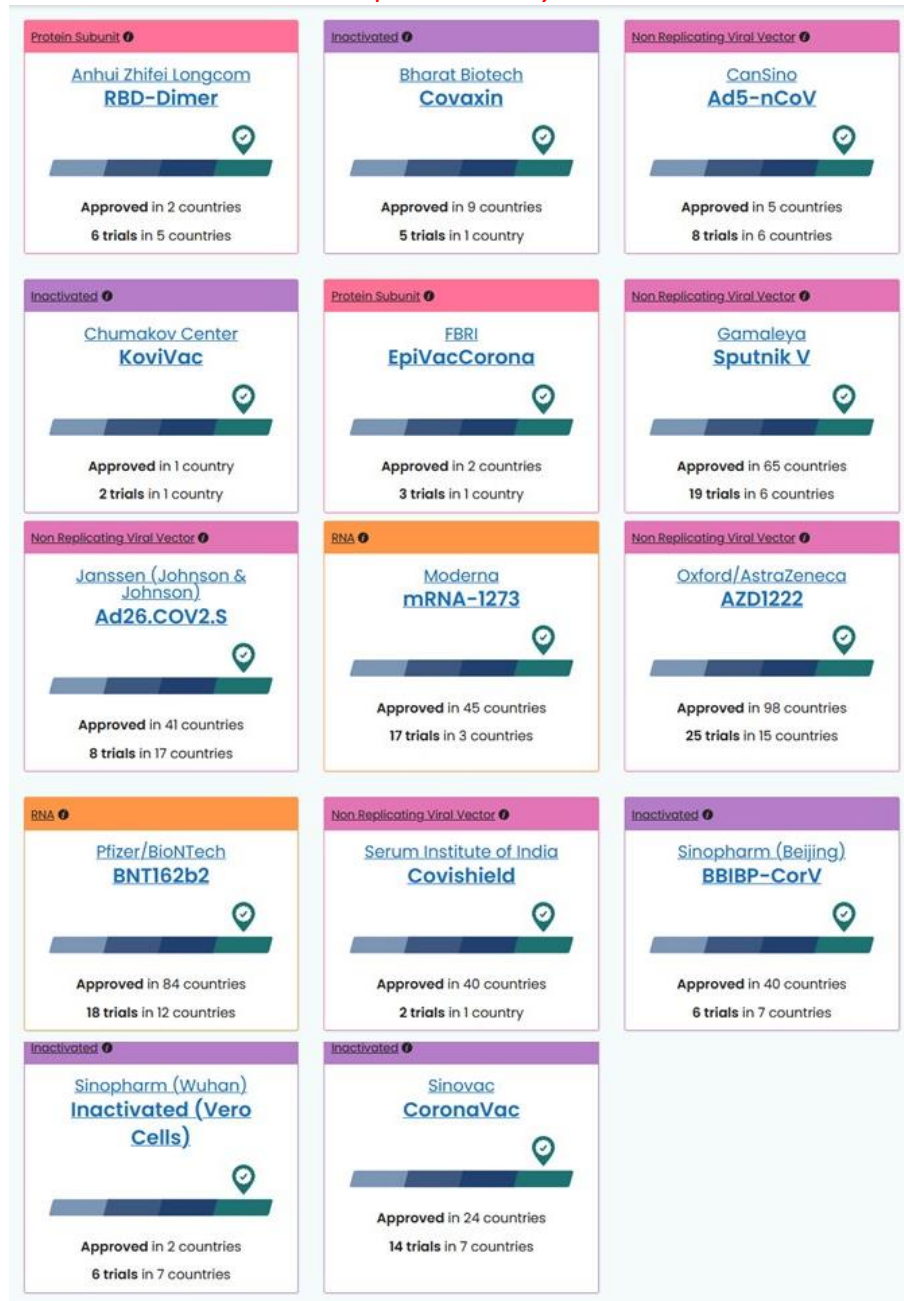
Platform		Candidate vaccines (no. and %)	
PS	Protein subunit	27	33%
VVnr	Viral Vector (non-replicating)	12	14%
DNA	DNA	10	12%
IV	Inactivated Virus	11	13%
RNA	RNA	11	13%
VVr	Viral Vector (replicating)	4	5%
VLP	Virus Like Particle	3	4%
VVr + APC	VVr + Antigen Presenting Cell	2	2%
LAV	Live Attenuated Virus	2	2%
VVnr + APC	VVnr + Antigen Presenting Cell	1	1%

Descrição da plataforma e desenho/estratégia de biologia molecular da Vacina contra COVID-19.

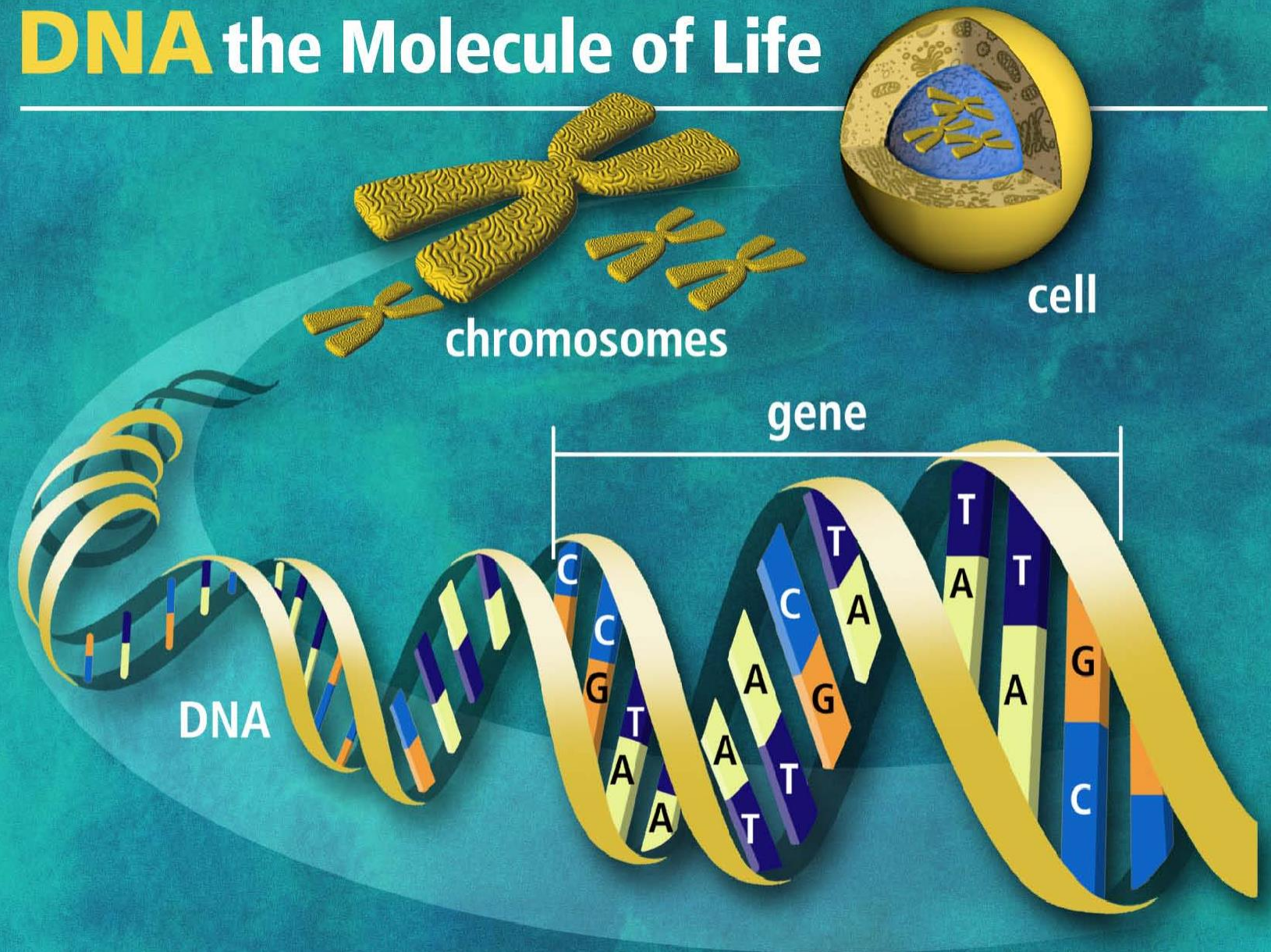
14 Vaccines Approved by at Least One Country

Last Updated 7 May 2021.

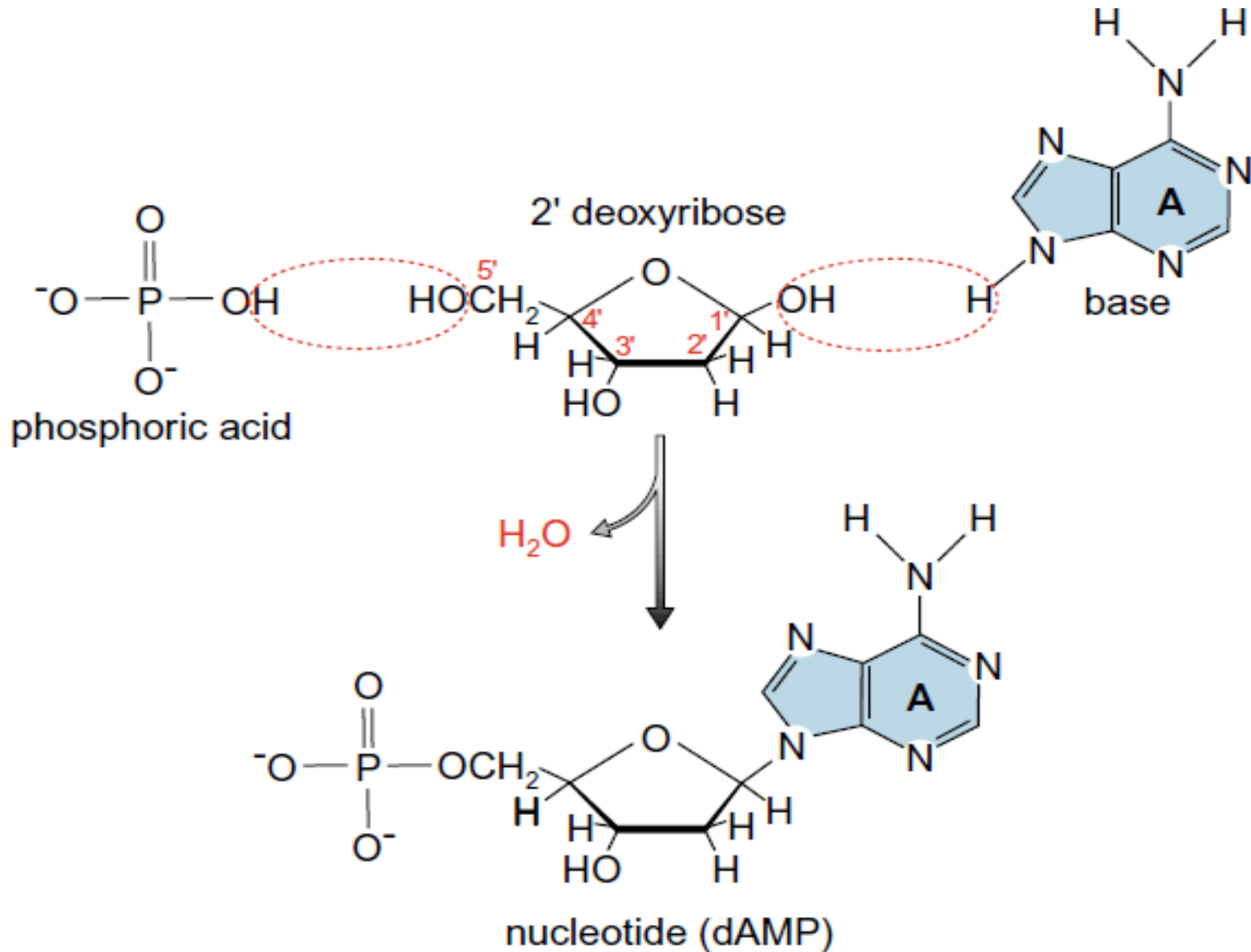
Apresentação
Seminário
21/06/2021



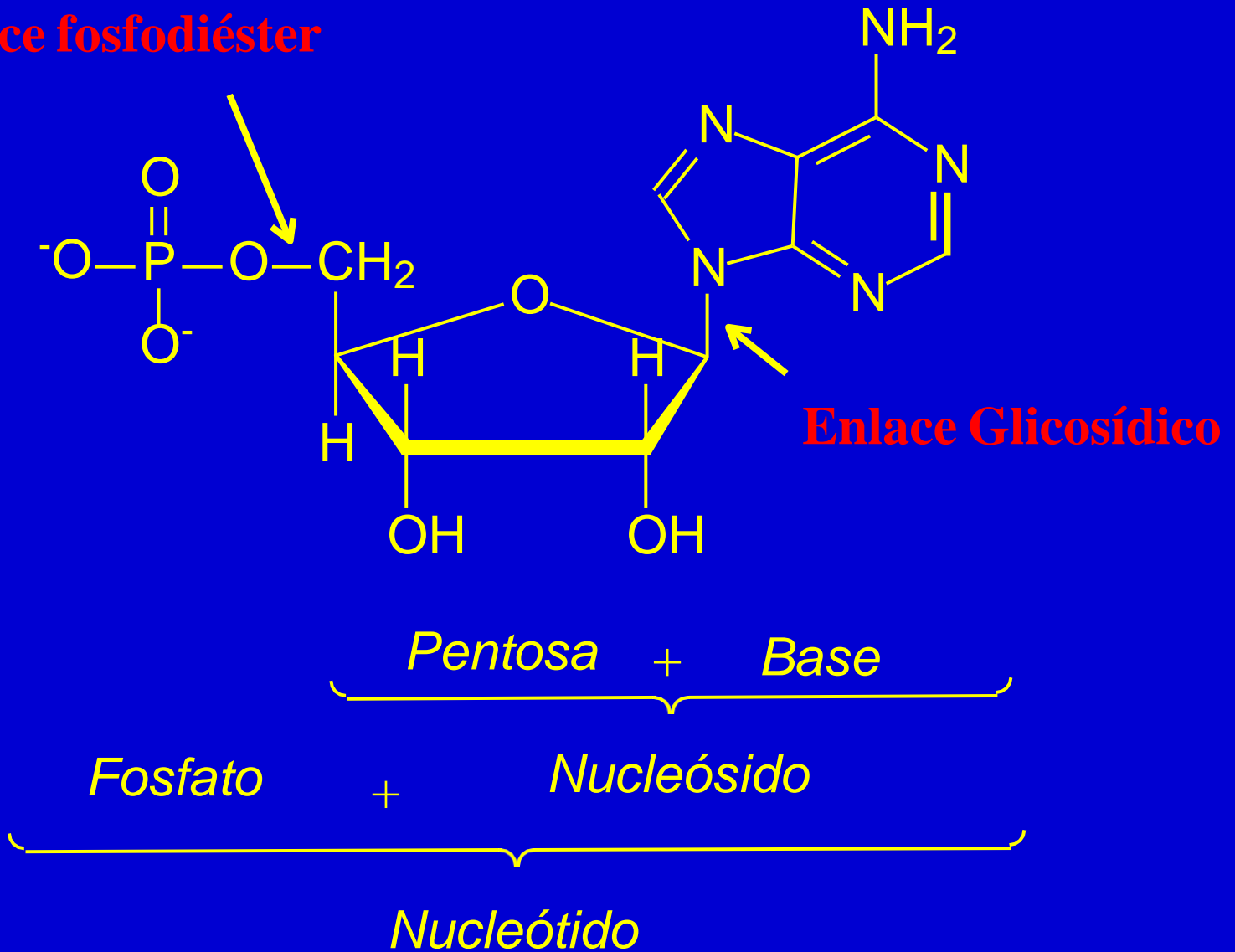
DNA the Molecule of Life



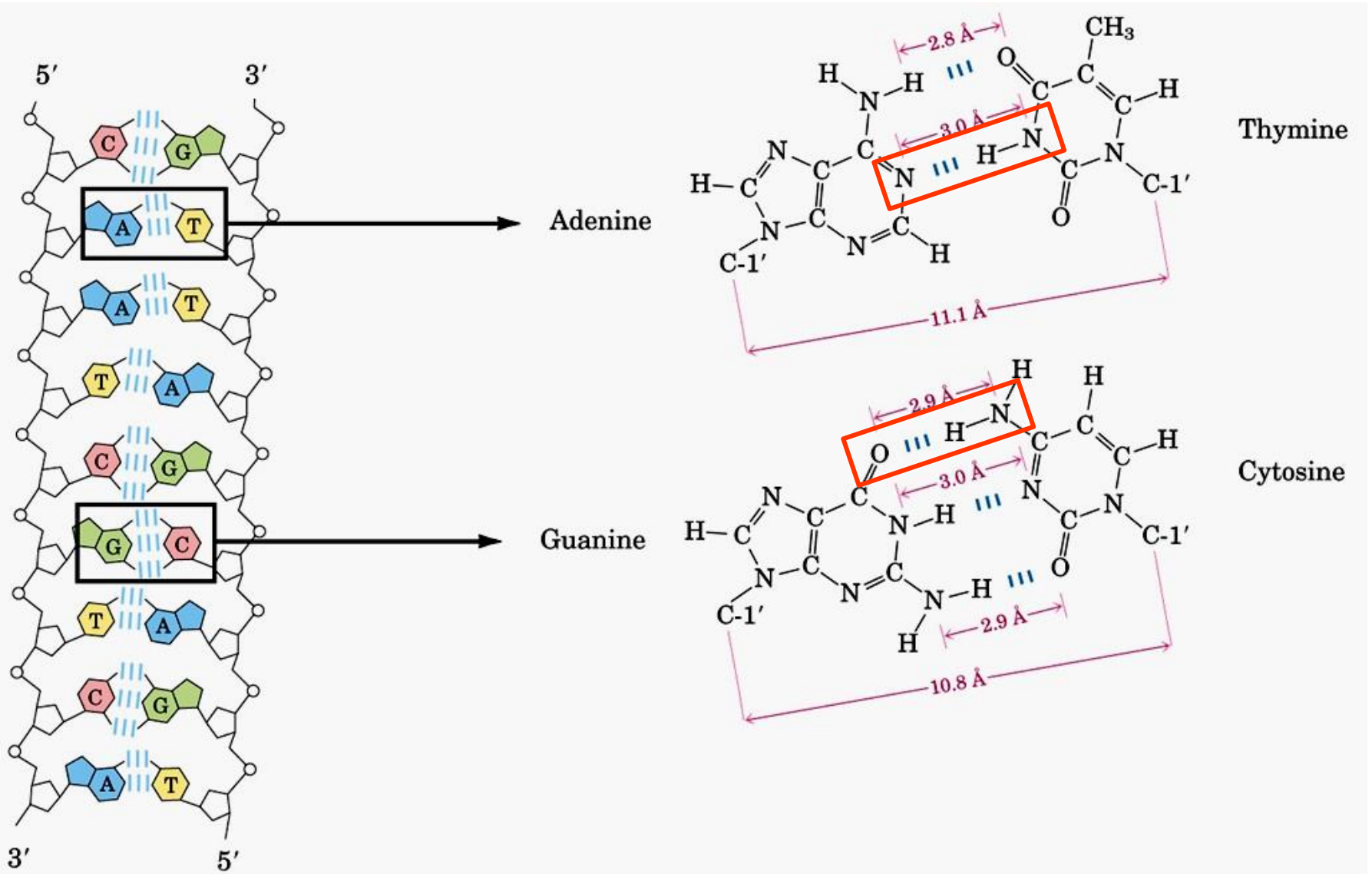
Formação de um Nucleótido



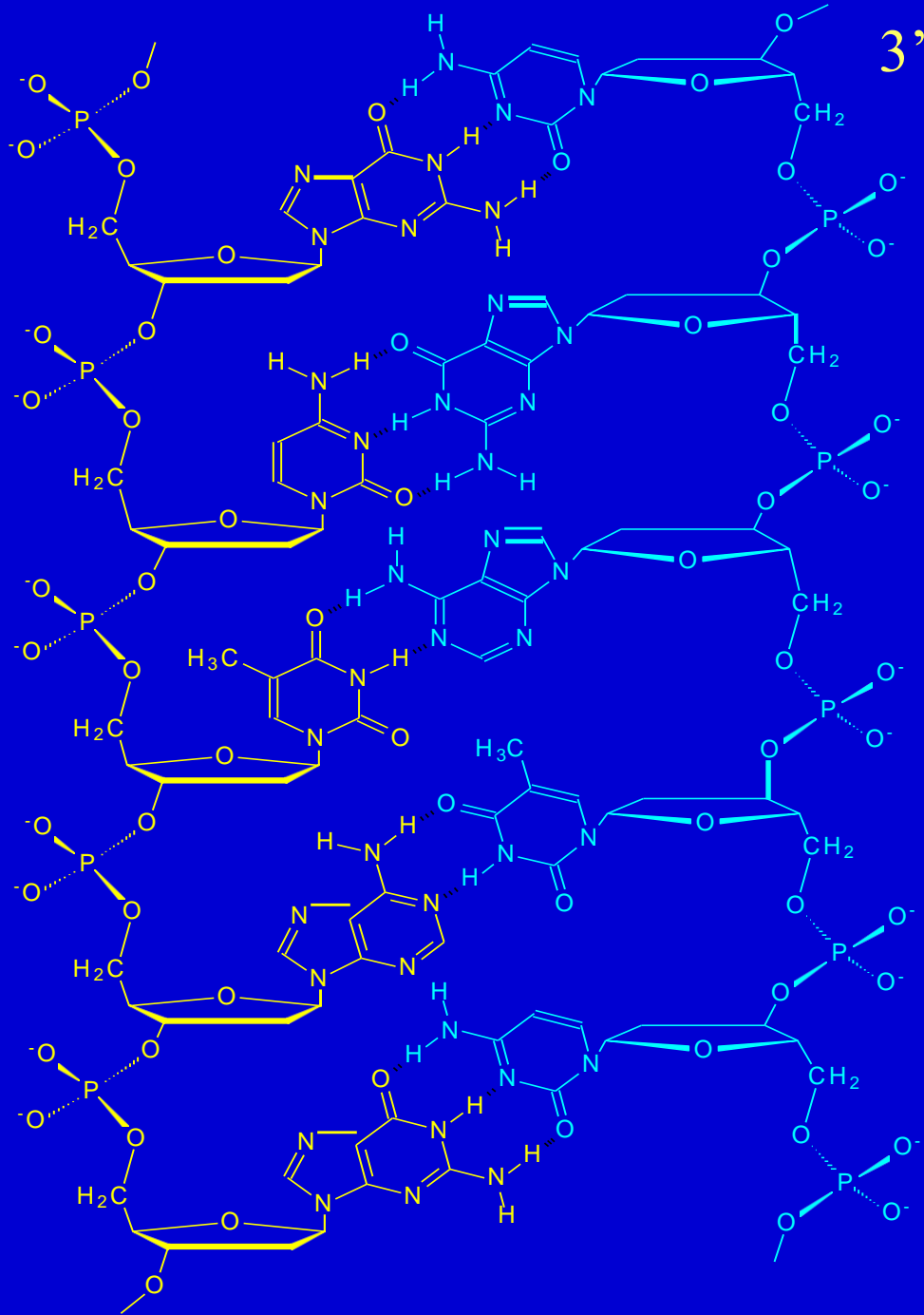
Enlace fosfodiéster



Associação complementar de bases (pontes de hidrogênio)



5'

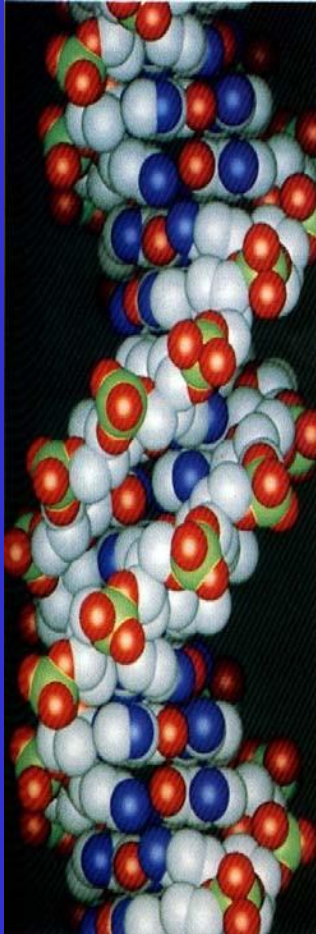


3'

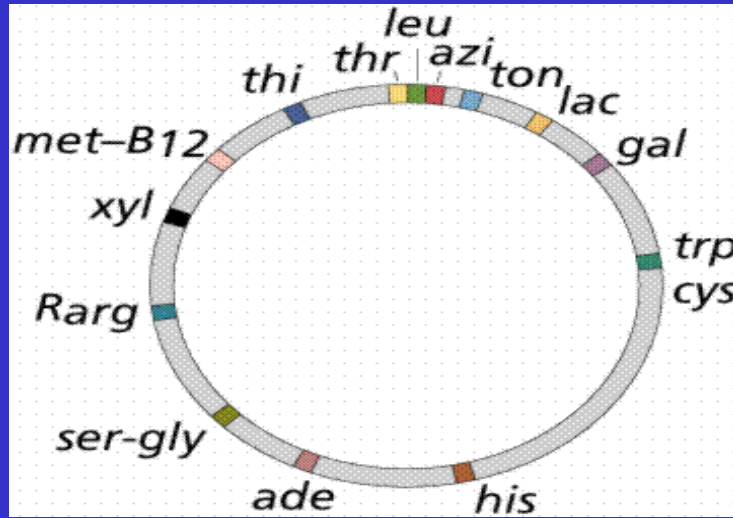
3'

5'

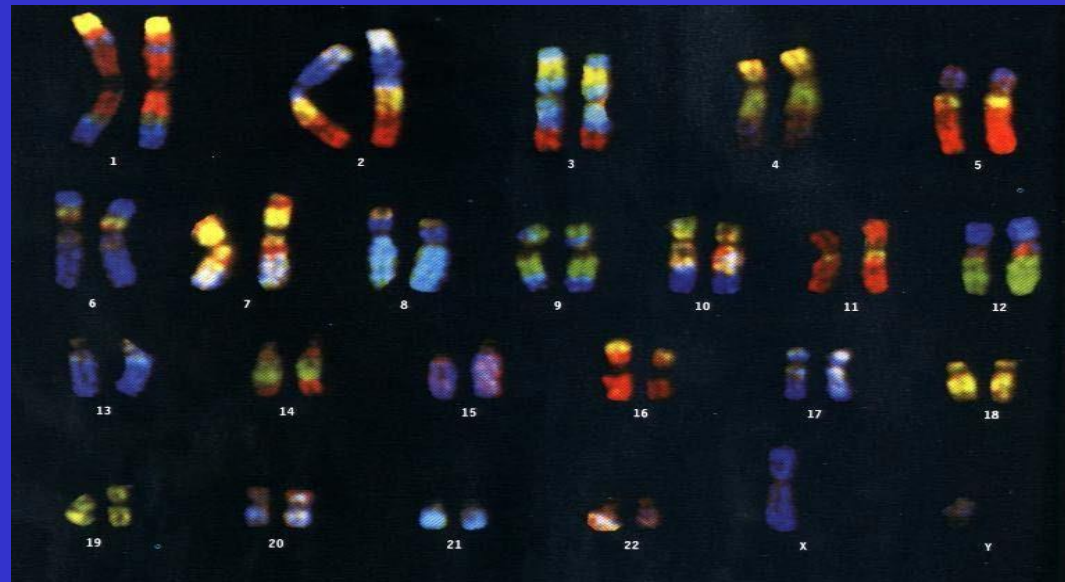
DNA



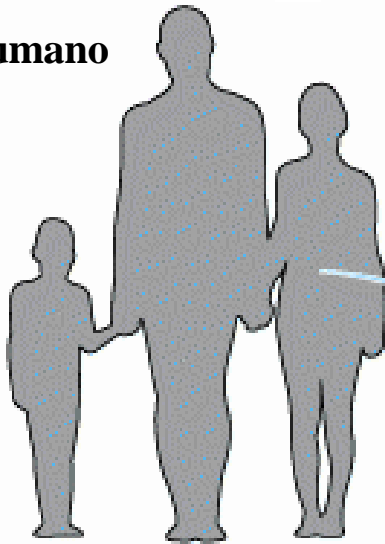
Cromossomo de *E. coli*



Cromossomos Humanos



Ser Humano



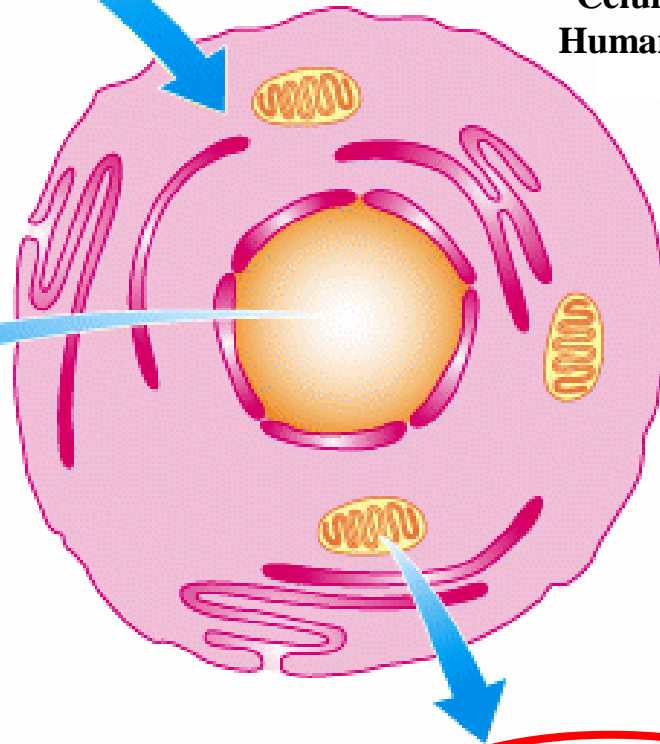
Por ser uma dupla fita a longitude da molécula de DNA é expressa em pares de bases (pb):

1 kb = 1000 pb

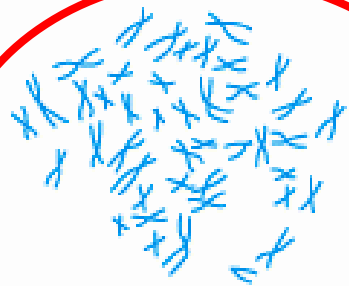
1 Mb = 1000 kb = 1 000 000 pb

1 Gb = 1000 Mb = 1 000 000 kb = 1 000 000 000 pb

Célula Humana



Genôma Nuclear

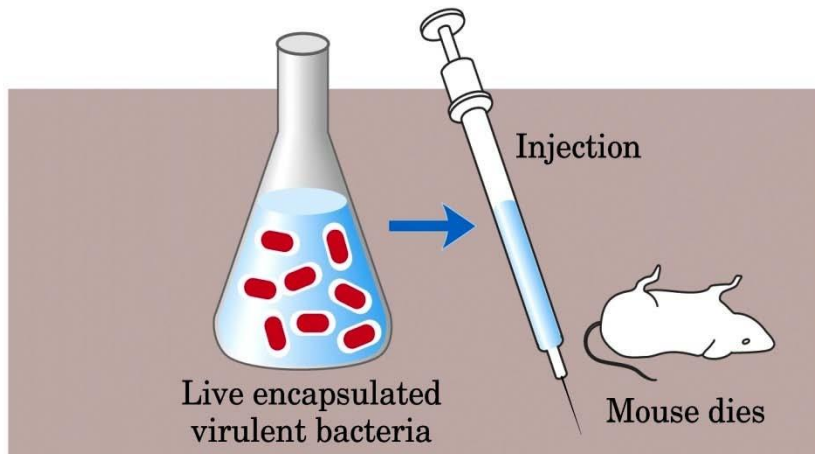


Genôma Mitocôndrial

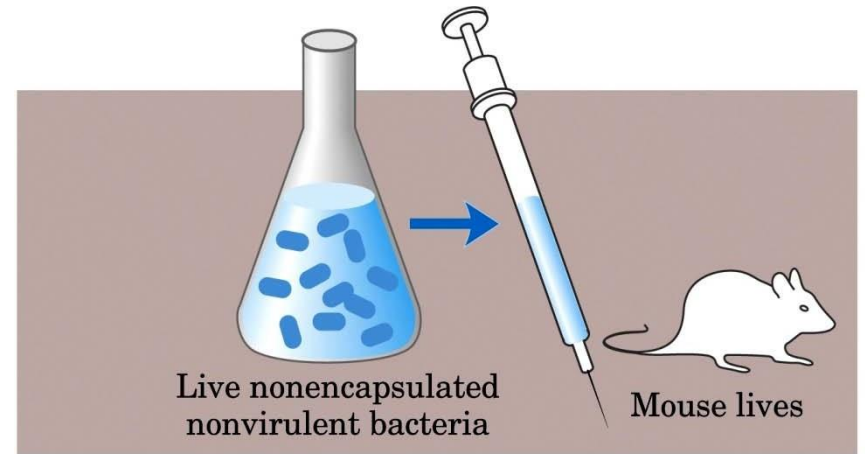


DNA e herança

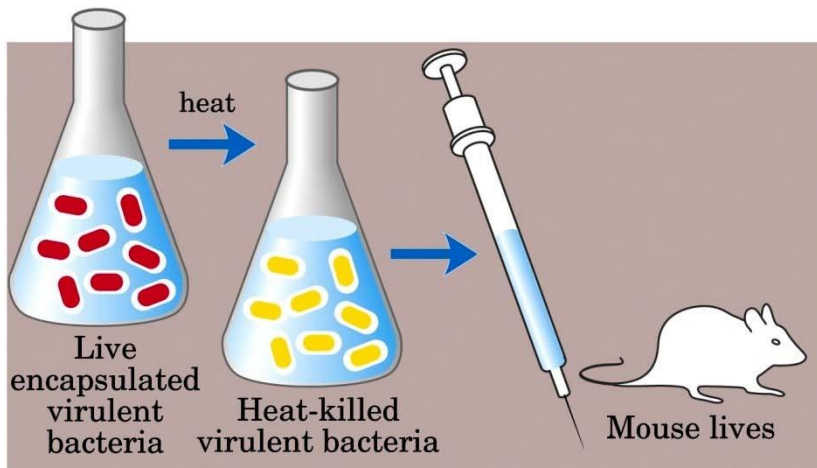
1944 - Avery, MacLeod e McCarty: Cepa de pneumococo



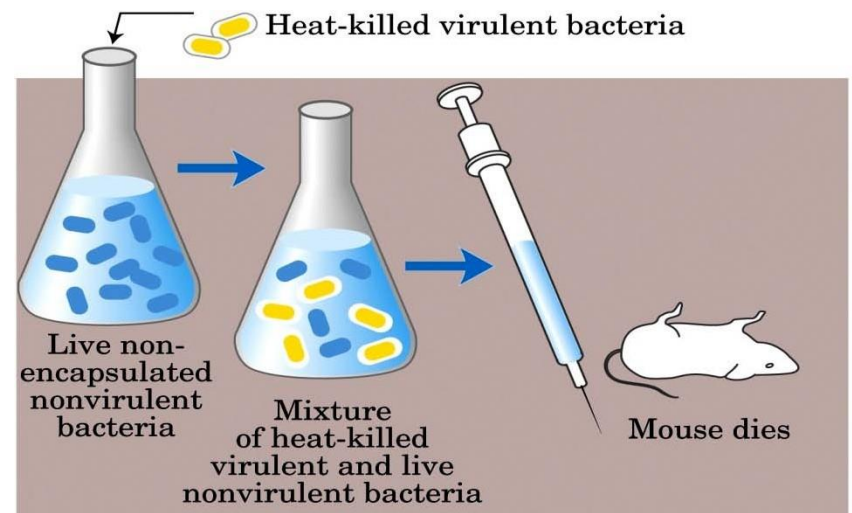
(a)



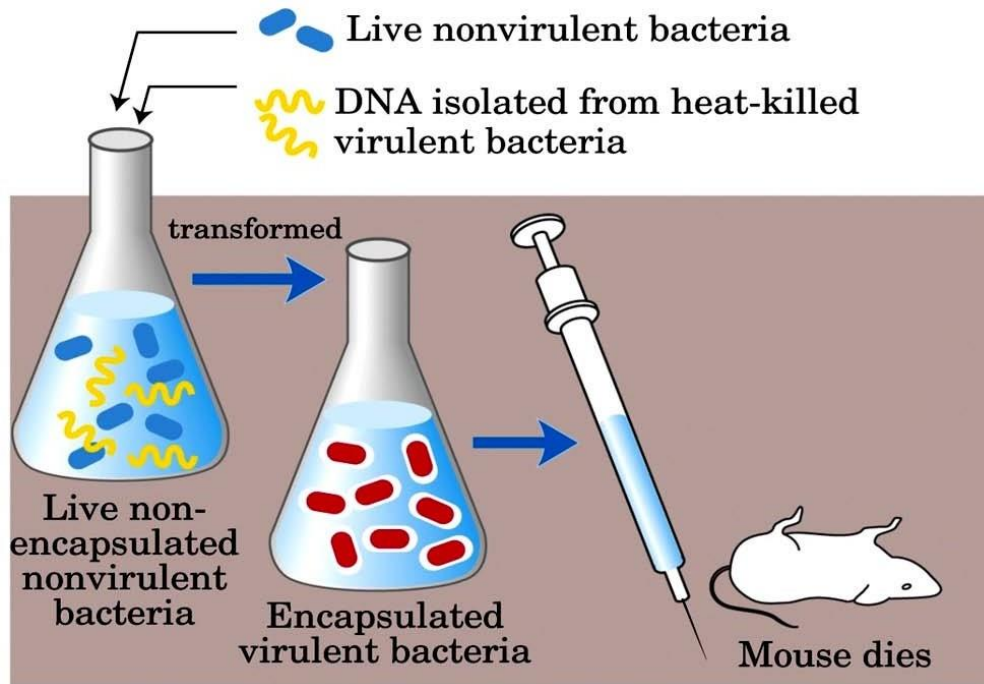
(b)



(c)



(d)



(e)

liso = virulento (pneumonia)

rugoso = não virulento

se injetar liso em camundongos = morre;

liso morto pelo calor = sobrevive;

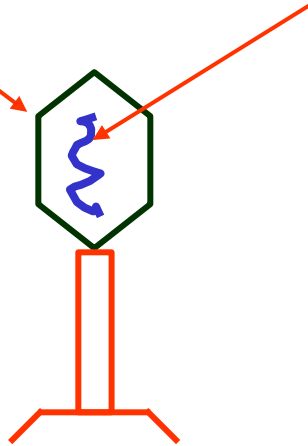
se injetar rugoso = sobrevive;

rugoso vivo + liso morto = morre.

rugoso vivo+ liso morto + DNase = sobrevive

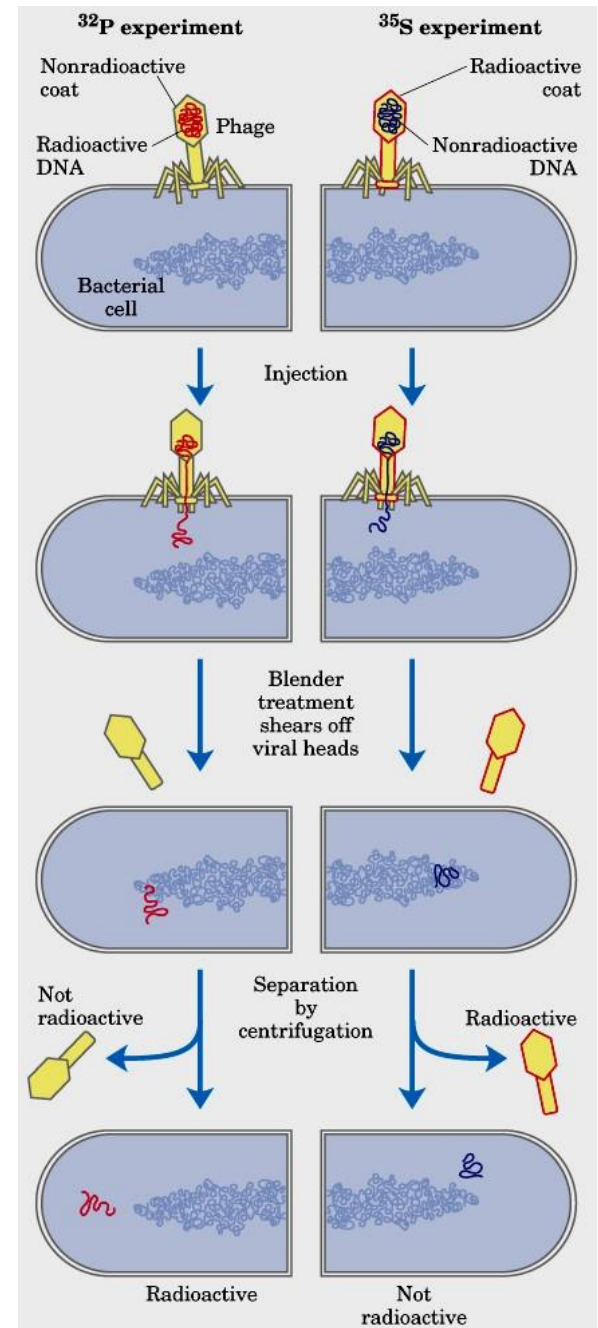
1952 - Hershey e Chase

E. coli /Bacteriófago T2
(Cápsula protéica/Ác. Nucléico=DNA)

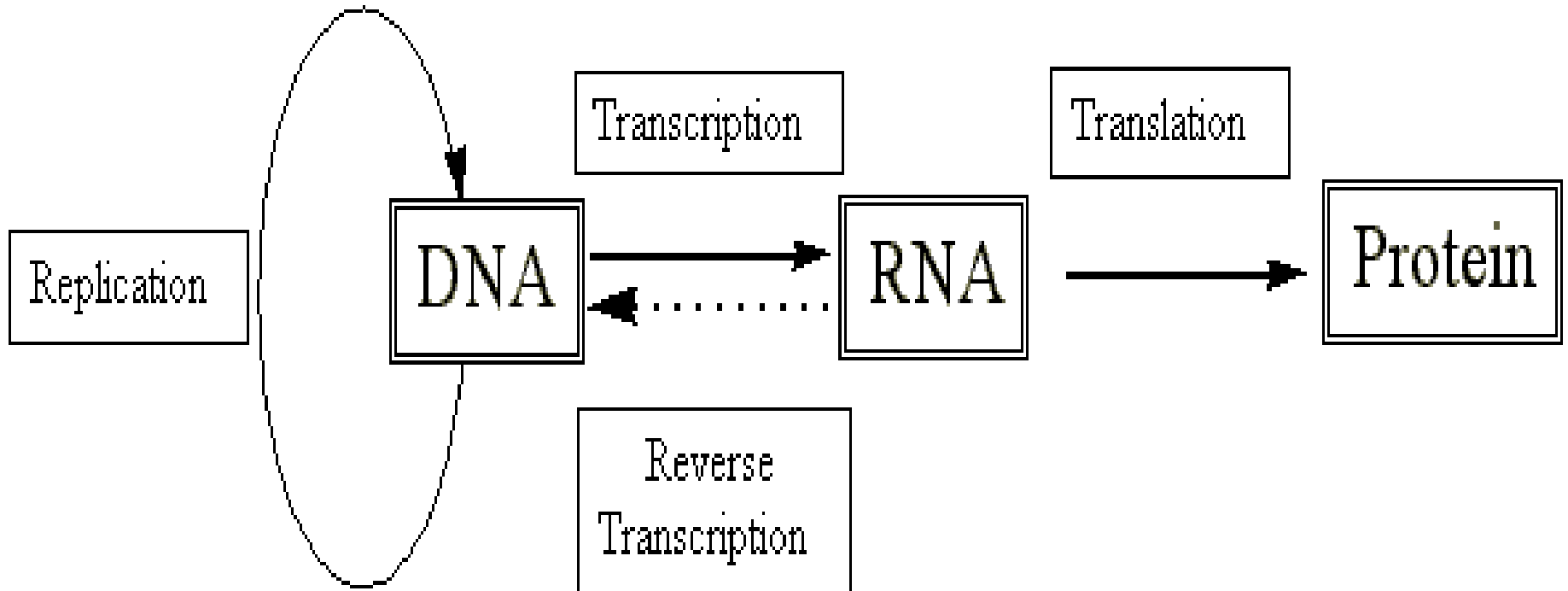


Proteína marcada com S^{35} ;
DNA marcado com P^{32} .

Marcando a proteína de T2, quando infecta a bactéria o radioativo fica fora da célula;
marcando o DNA, quando infecta a bactéria o radioativo fica dentro da célula;



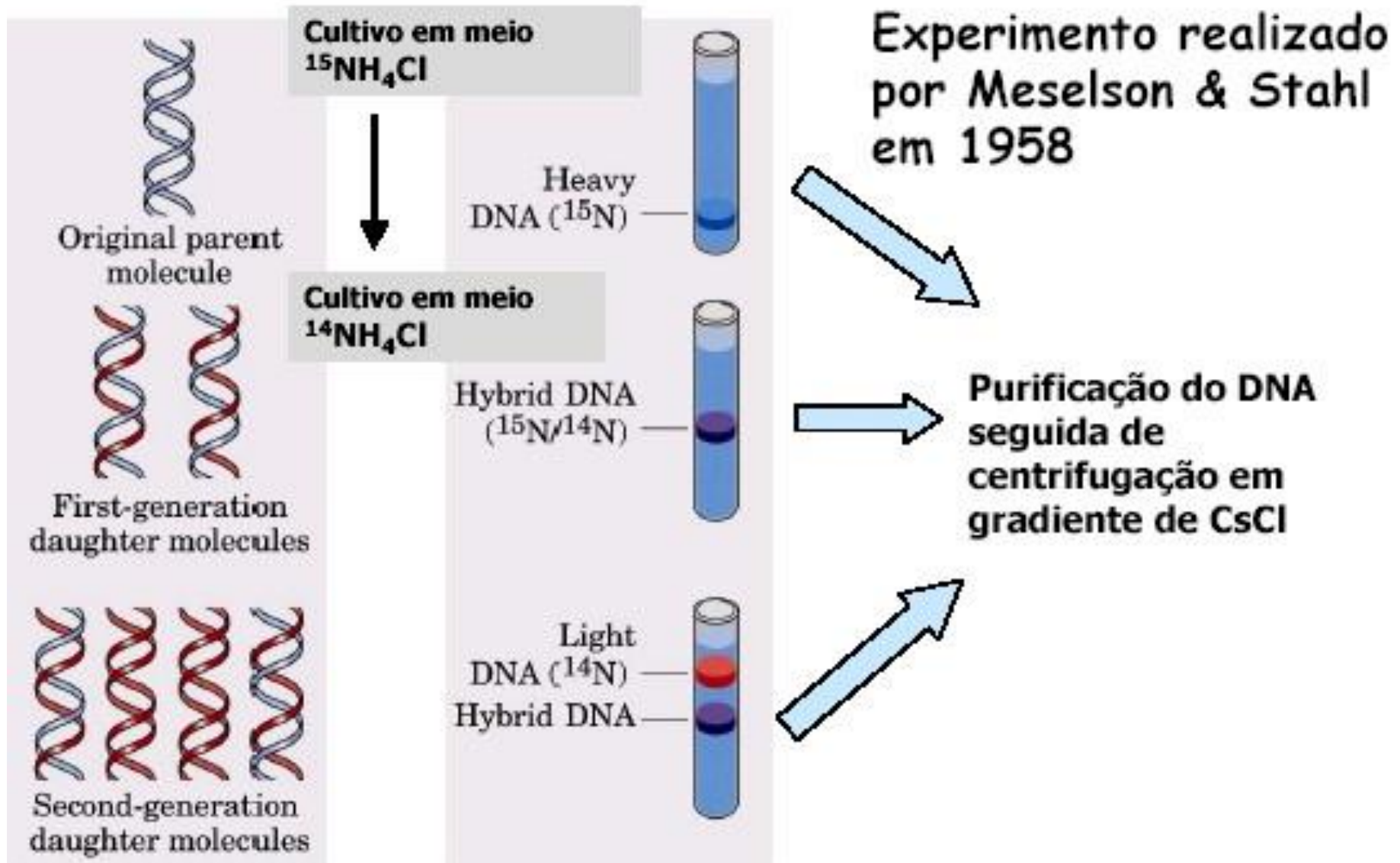
DOGMA CENTRAL



Replicação e reparo de DNA



A replicação do DNA é semi-conservativa



Regra de Chargaff (1940)

- 1. A composição de bases do DNA geralmente varia de uma espécie para outra.**
- 2. Amostras de DNA isoladas de diferentes tecidos da mesma espécie possuem a mesma composição de bases.**
- 3. A composição de bases do DNA em uma dada espécie não se altera com a idade do organismo, o estado nutricional ou a modificação ambiental.**
- 4. Em todas as espécies a relação purinas/pirimidinas é igual a 1, é dizer :**

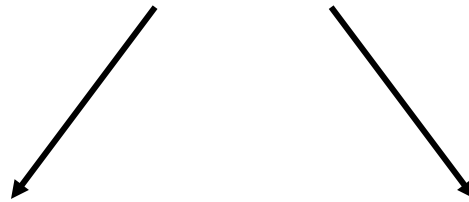
$$**A + G = C + T**$$

- 5. Em todos os DNA estudados, a proporção molar de A é igual à T, e G igual à C, é dizer:**

$$**A = T \text{ e } G = C**$$

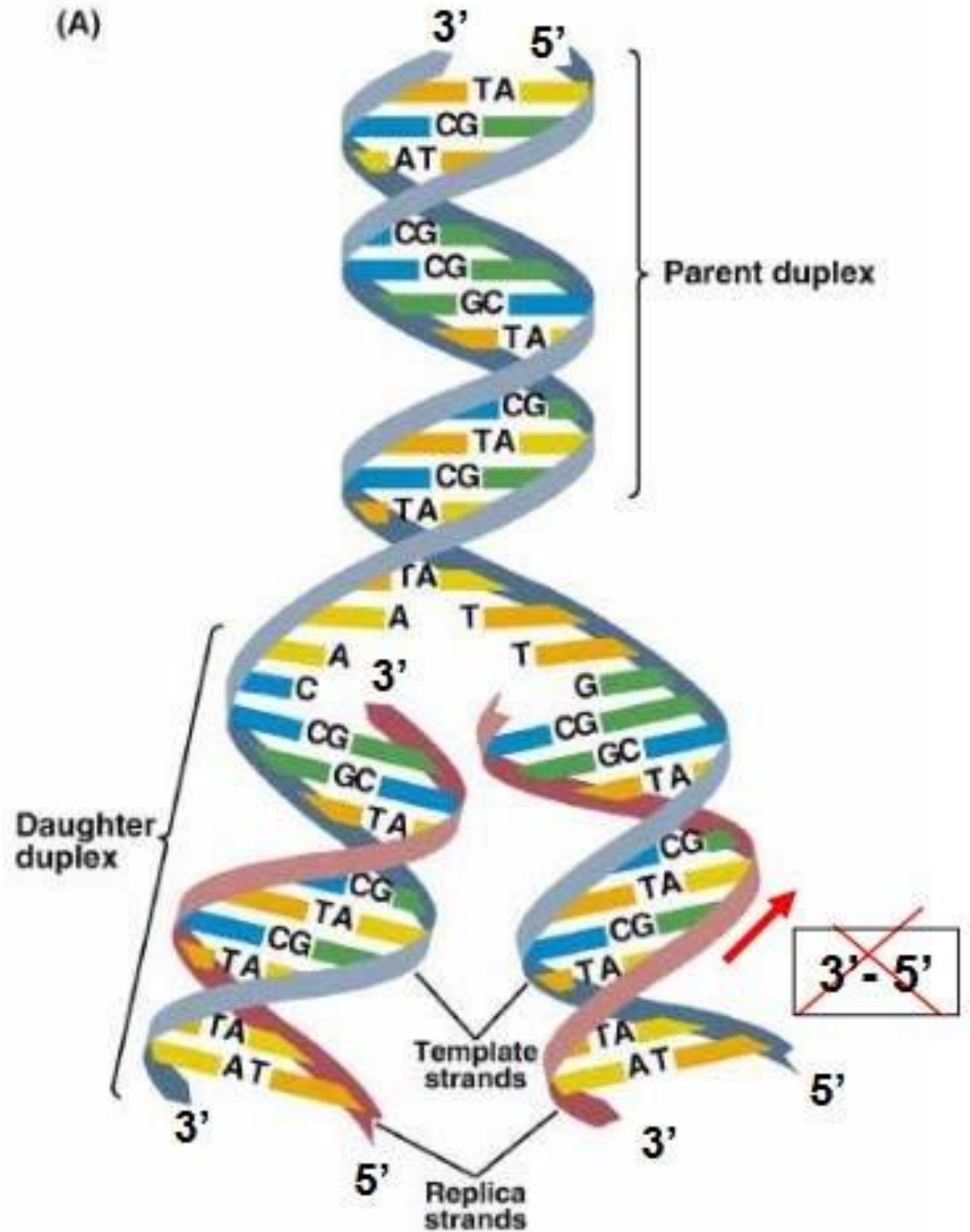
Implicações genéticas do modelo de DNA

A complementaridade de bases sugere um modelo para a replicação do mesmo, de forma que as duas moléculas filhas são idênticas ao pai:

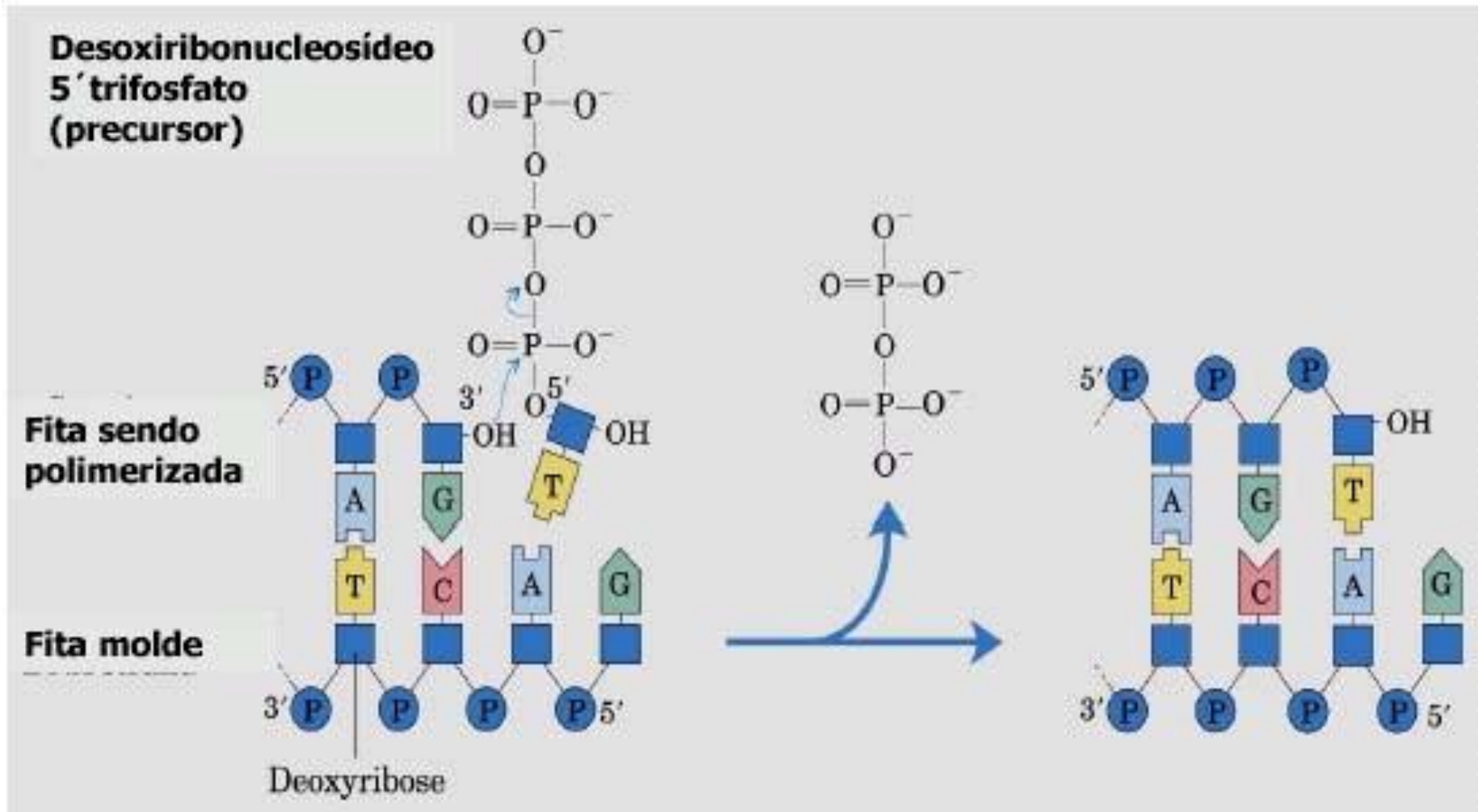


Replicação do DNA

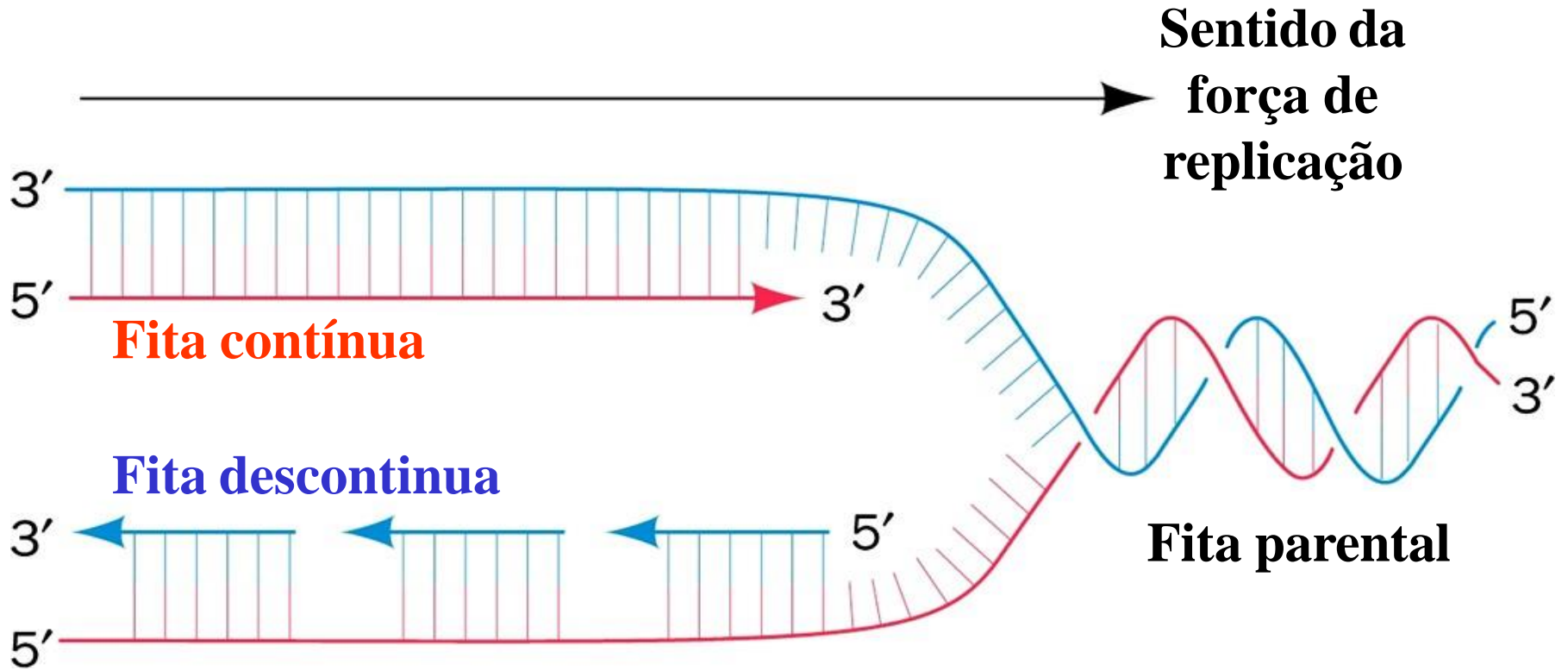
- Separação das duas fitas
- Síntese de uma fita complementar para cada uma



Ação da DNA polimerase (5' → 3')



Replicação da dupla fita de DNA em *E. coli*.

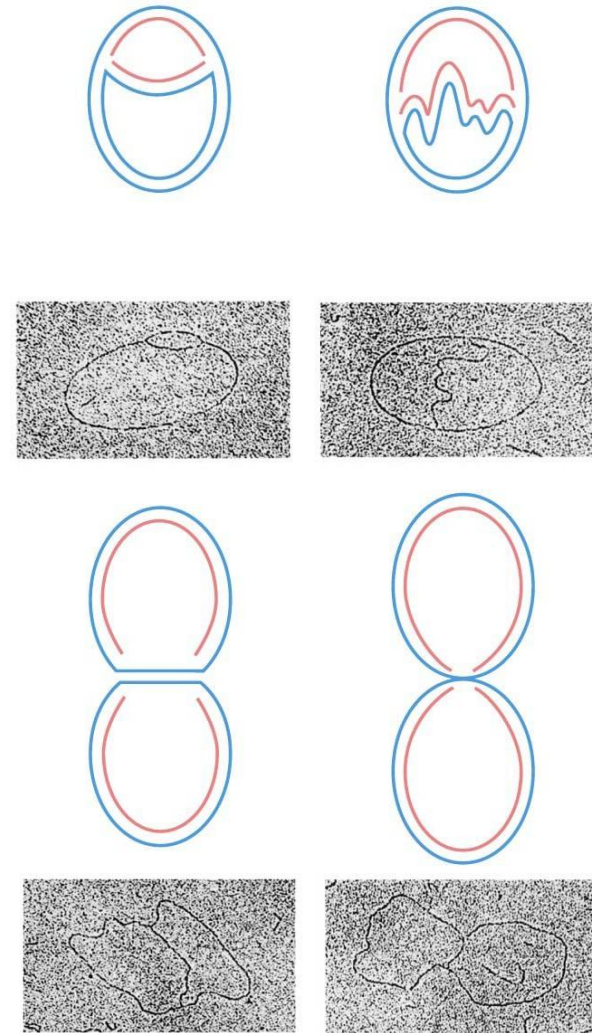
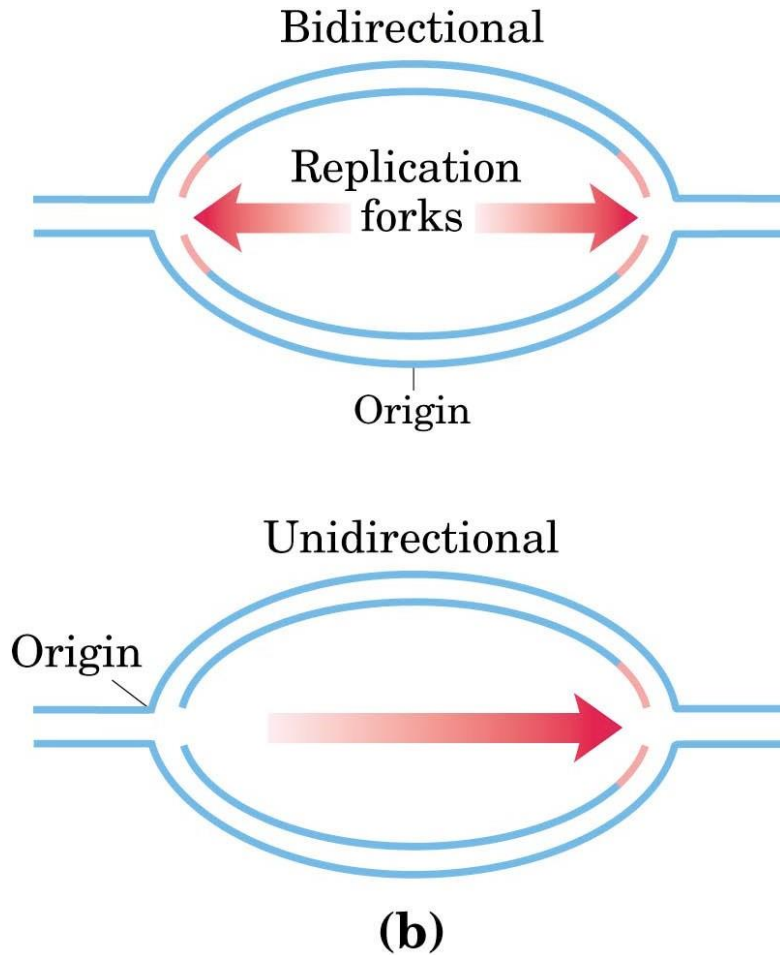


Replicon: Unidade do DNA onde está ocorrendo um evento de replicação

Replicon:

- 1. Origem + Término**
- 2. Ativados apenas uma única vez em cada ciclo celular**
- 3. O genoma de uma célula procariótica constitui um único replicon que é circular**
- 4. Cada cromossomo eucariótico possui vários replicons e todos são ativados uma única vez no ciclo celular ainda que não simultaneamente**

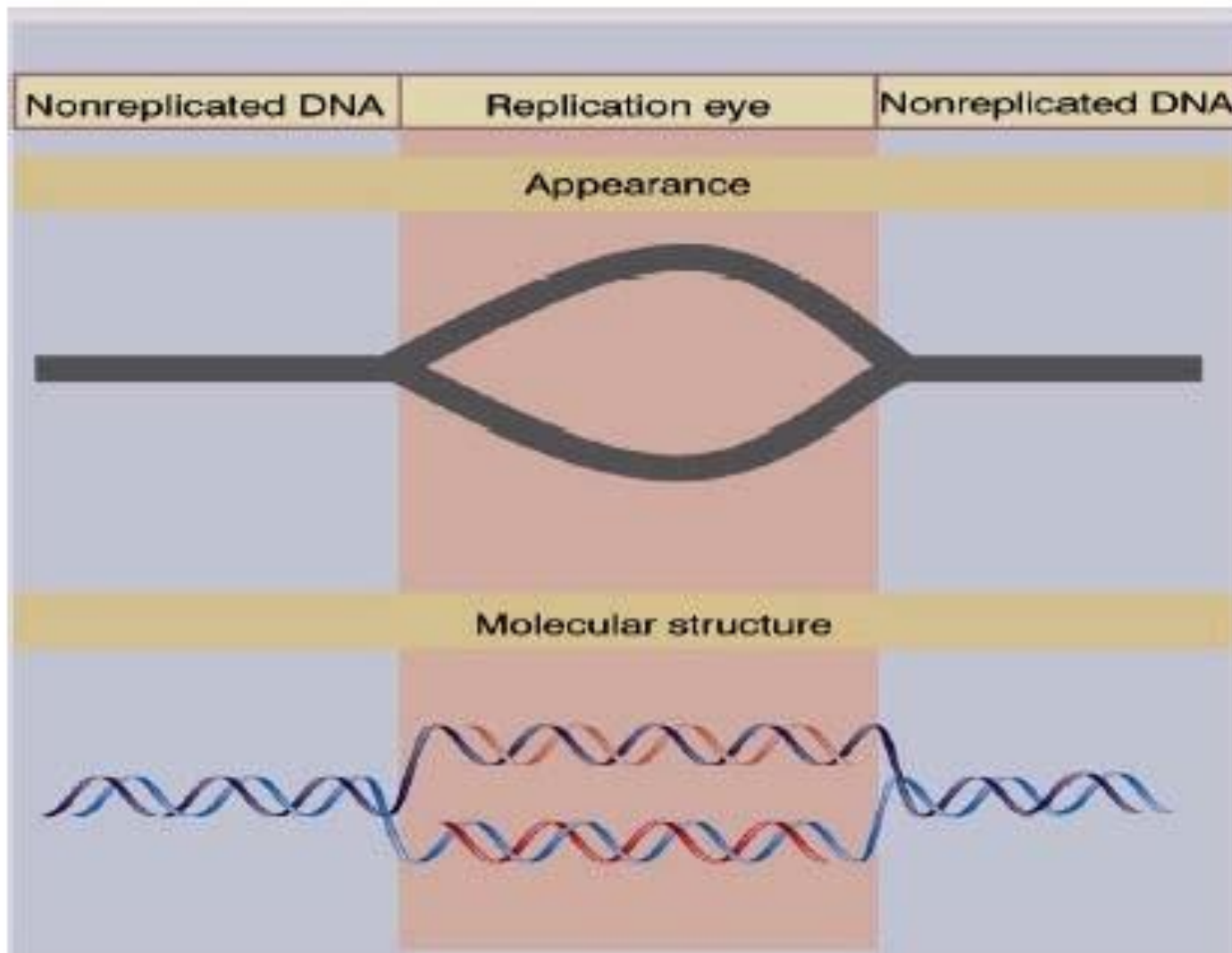
A replicação é bidirecional



(a)

A replicação do cromossomo circular

A replicação é vista como um "olho" flanqueado por DNA não replicado

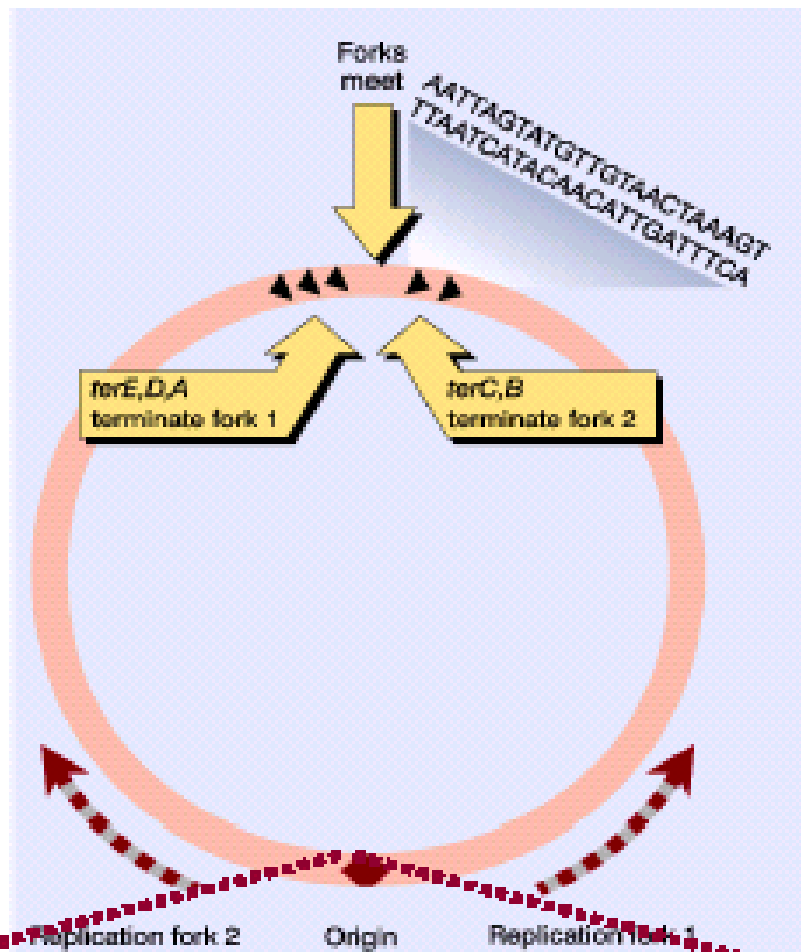


Replicação de DNA Procariótico

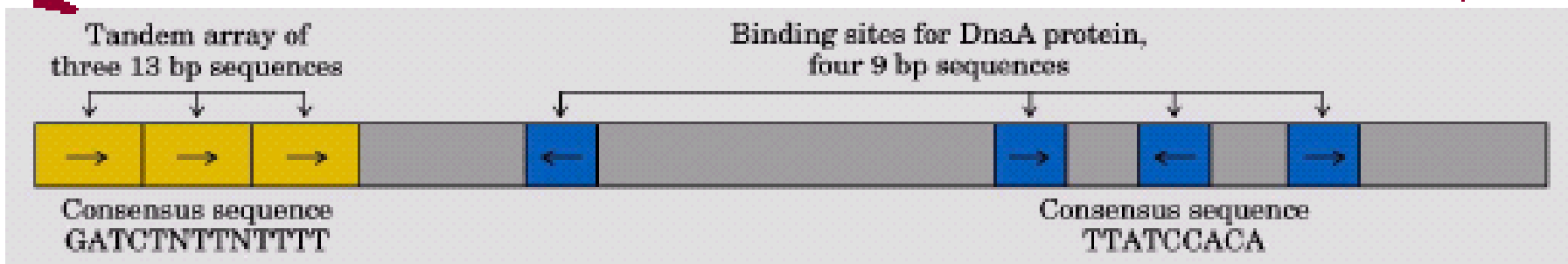
A replicação do DNA foi melhor estudada na bactéria *E. coli*



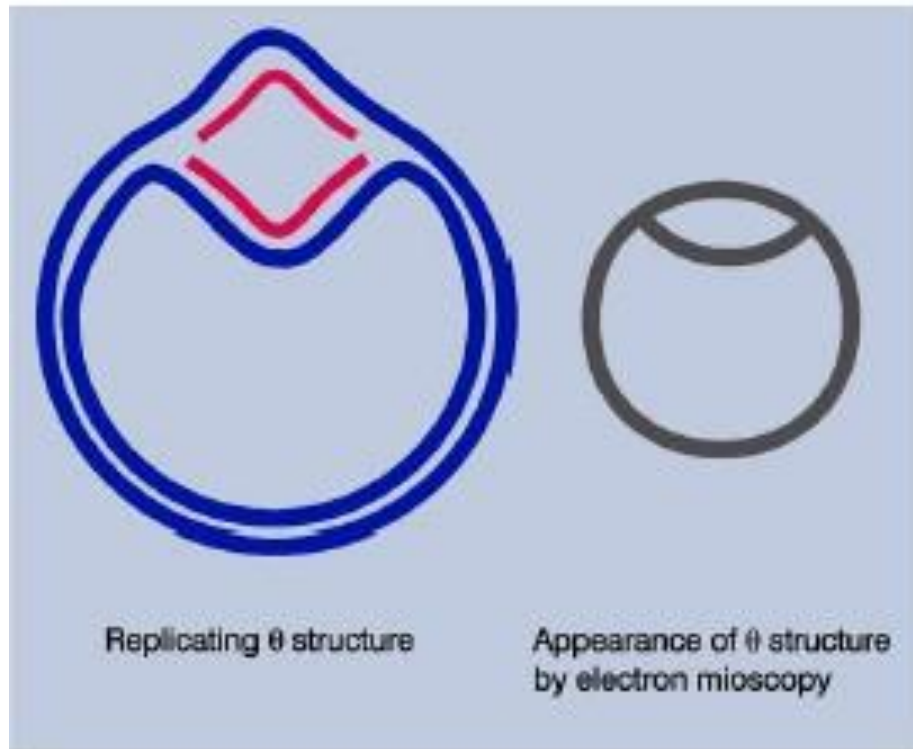
OriC do cromossomo de *E.coli*



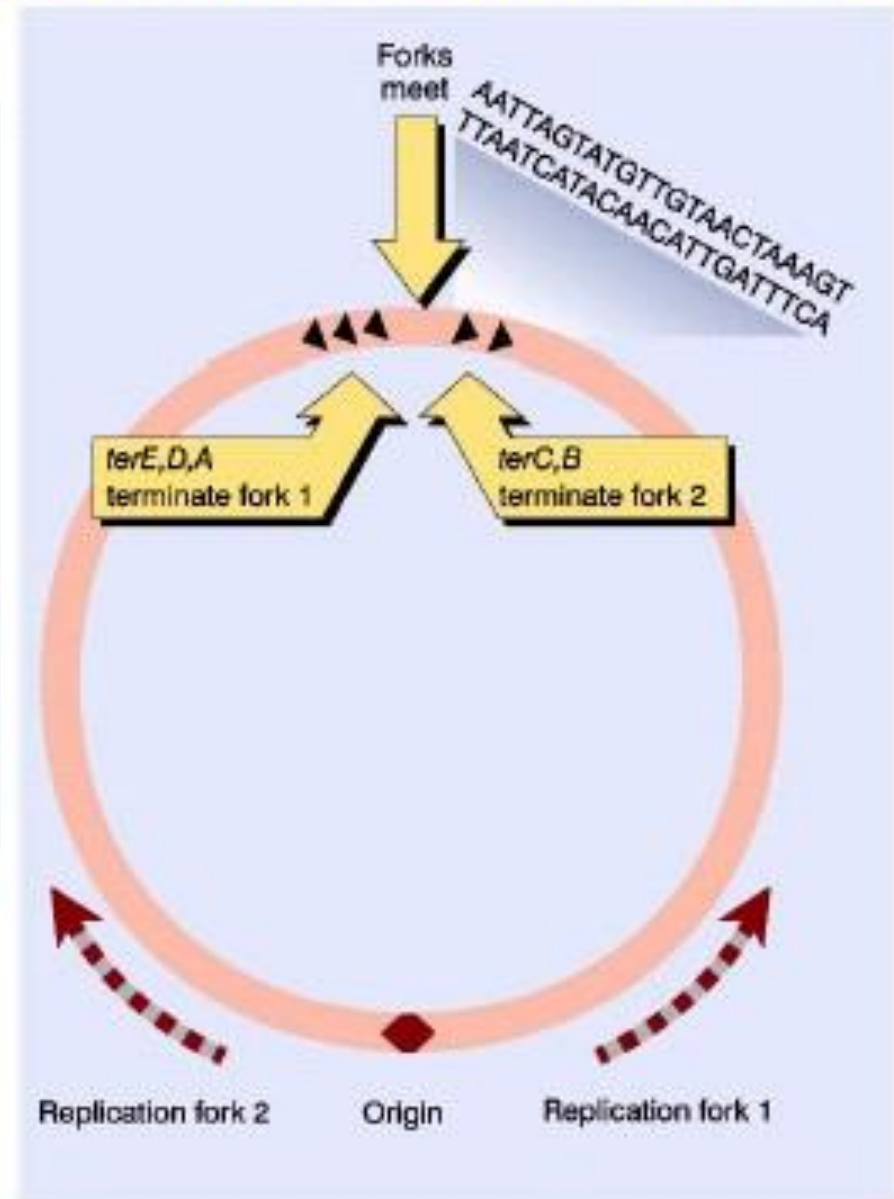
~245 pb



O genoma bacteriano circular constitui um único replicon



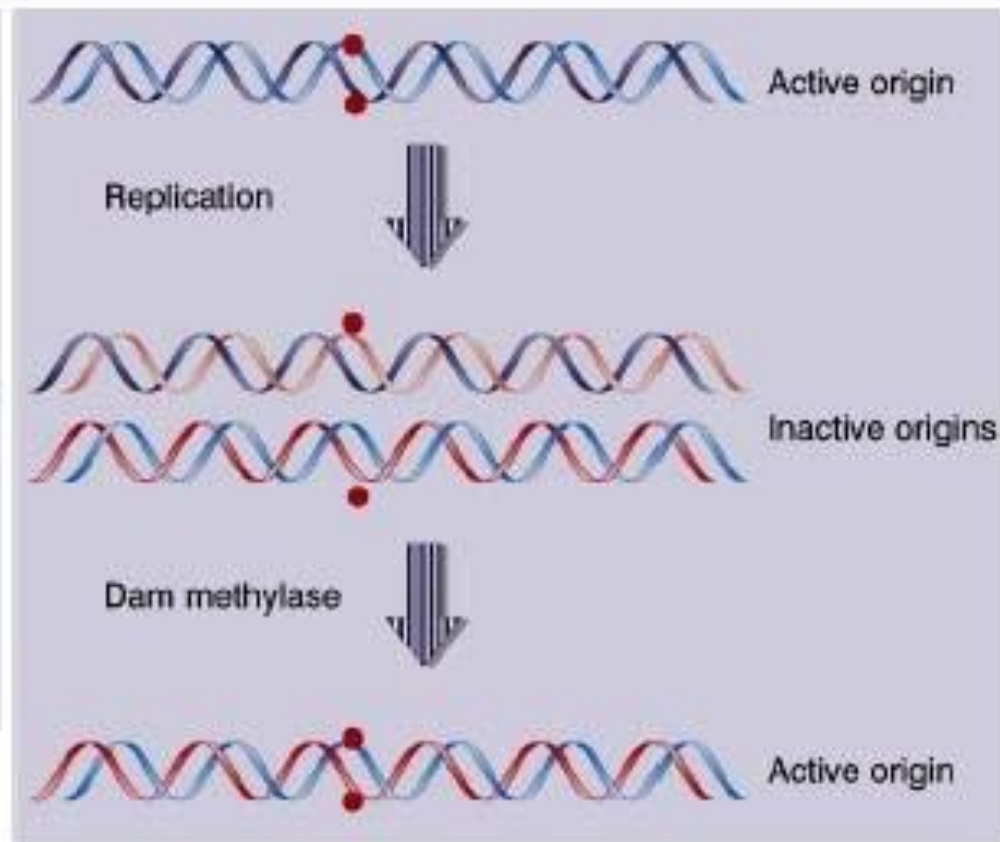
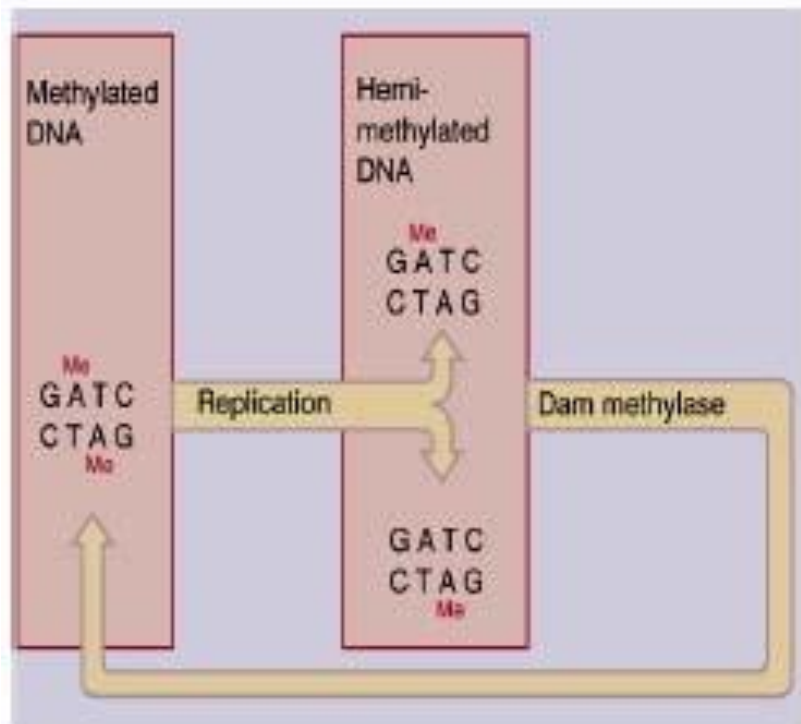
- A velocidade da forquilha de replicação bacteriana é 50000pb/min
- Um única origem de replicação em *E.coli* (*OriC*, 245 pb)



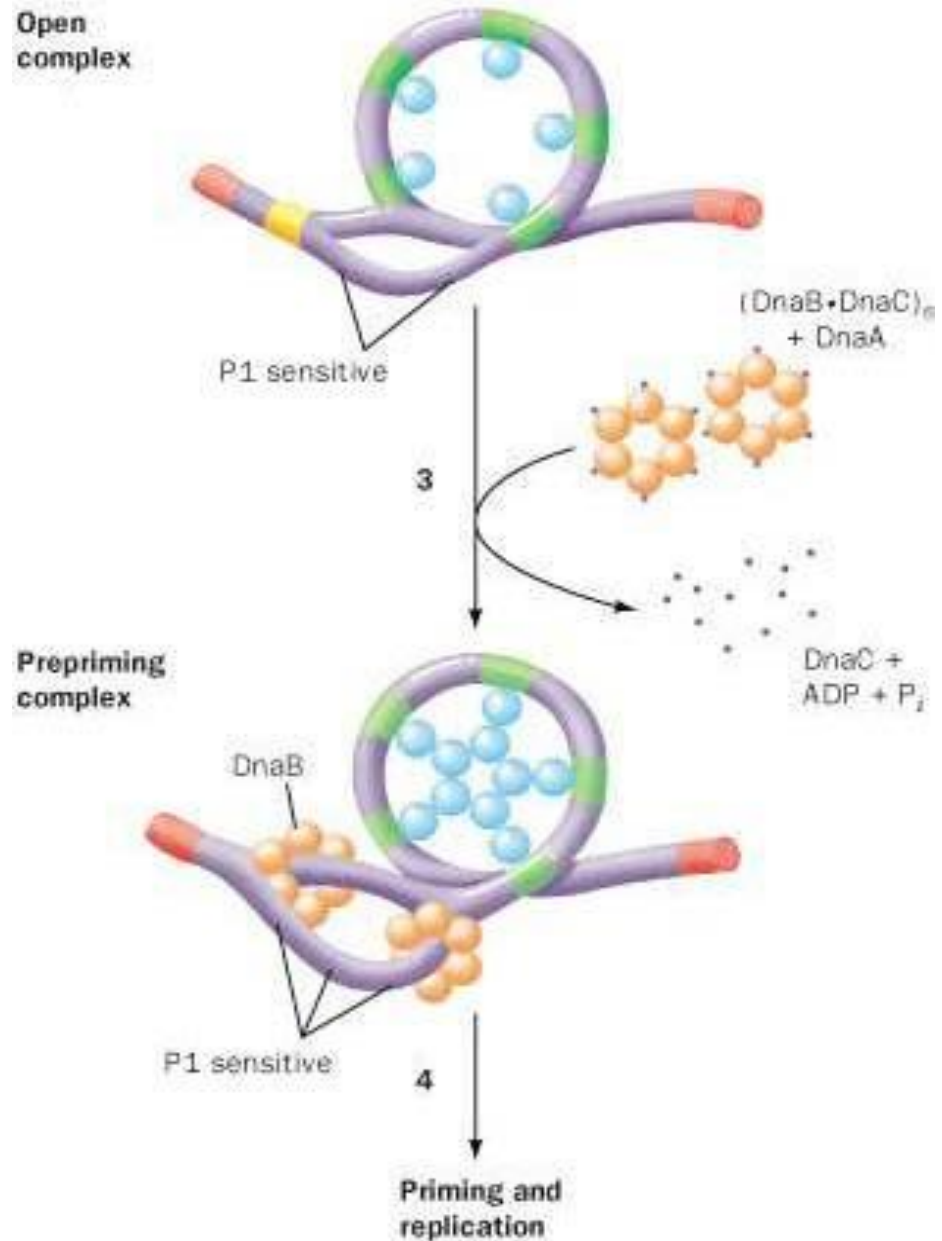
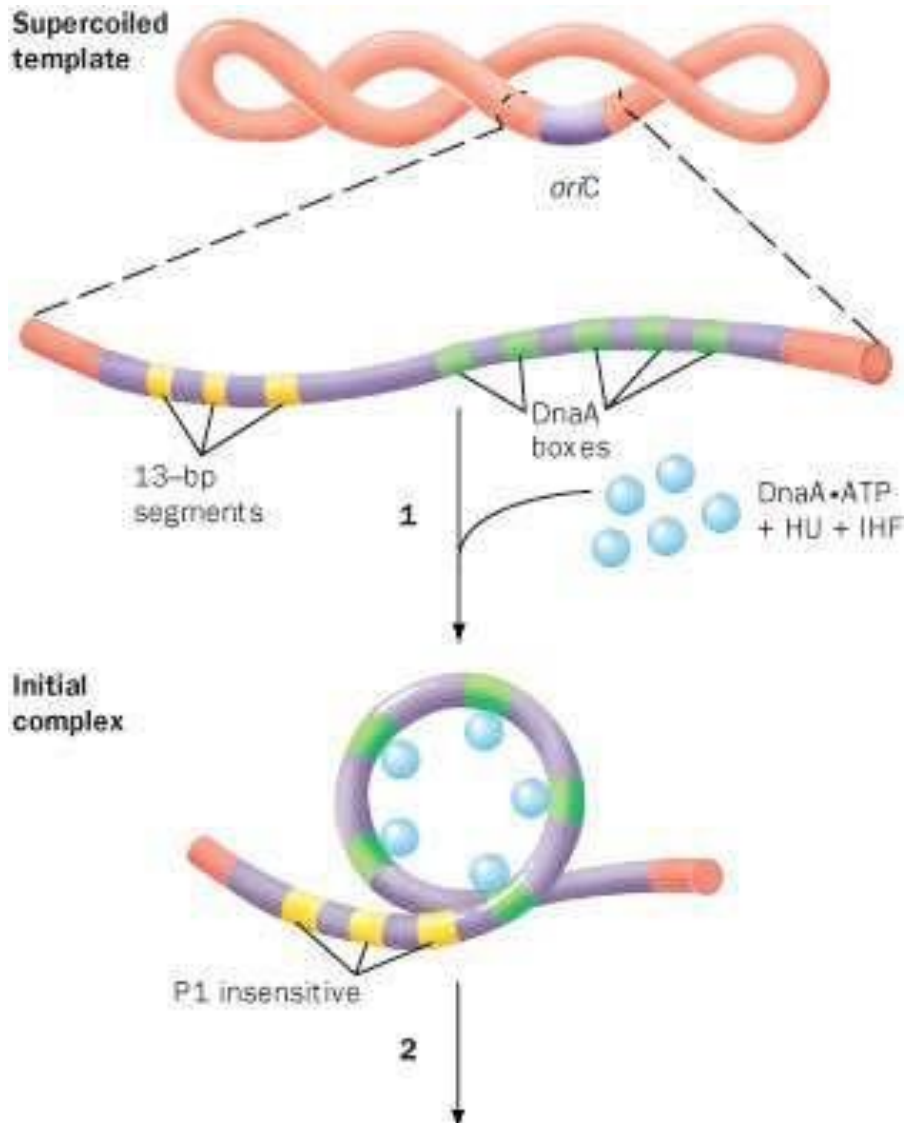
Proteínas presentes na origem de Replicação de *E.coli*

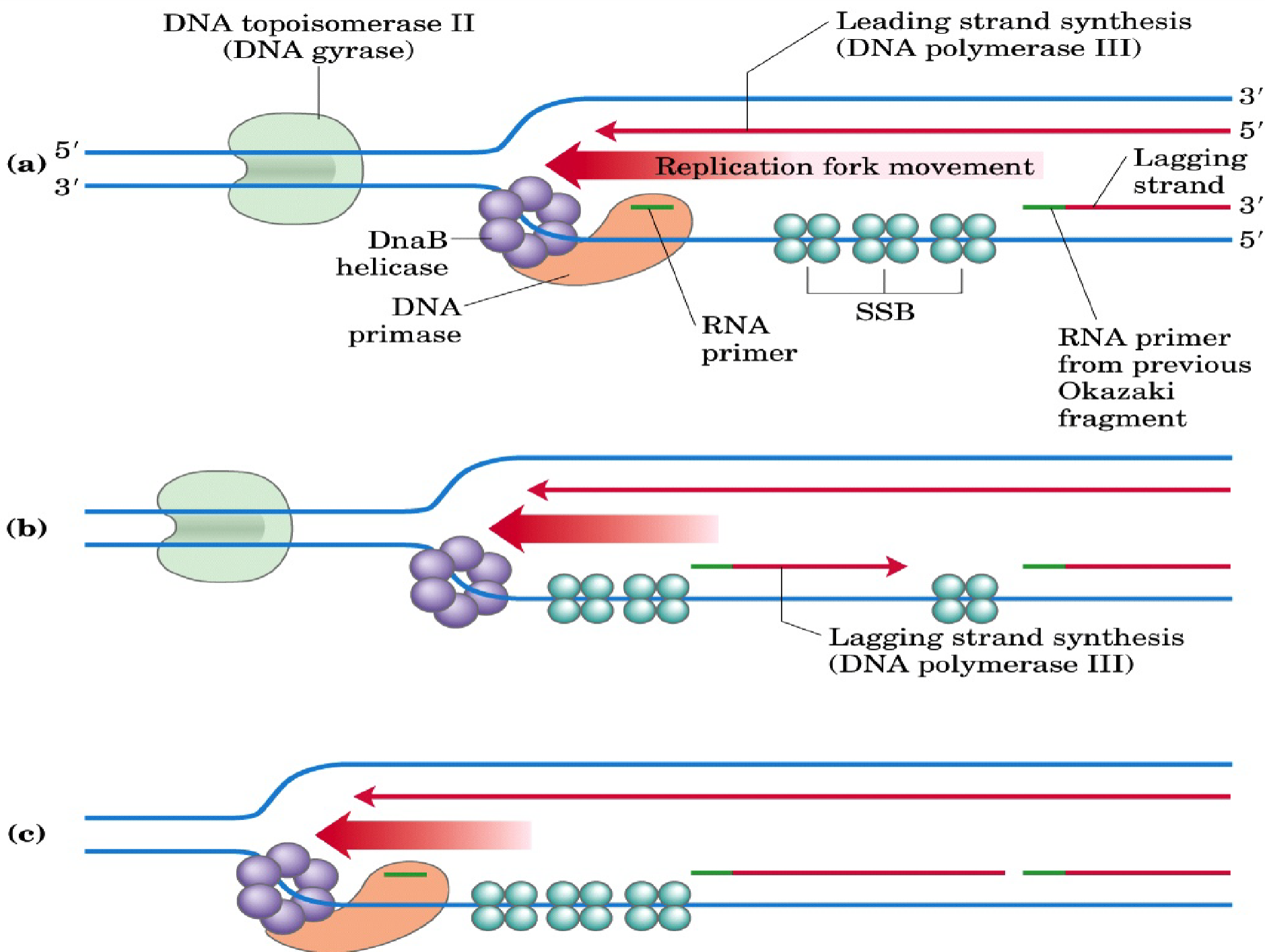
DnaA	Reconhece a origem e abre a dupla fita em sítios específicos
DnaB (helicase)	Desenrola o DNA
DnaC	Auxilia a ligação de DnaB na origem
HU	Proteína do tipo histona que estimula a iniciação
Primase (DnaG)	Sintetiza os primers de RNA
Single strand binding (SSB)	Liga a fita simples de DNA
RNA polimerase	Facilita a ação da DnaA
DNA girase	Alivia a tensão torsional gerada pela abertura da dupla-fita
Dam Metilase	Metila as sequências GATC na OriC

Origem de Replicação em bactérias: Somente origens completamente metiladas podem iniciar a replicação



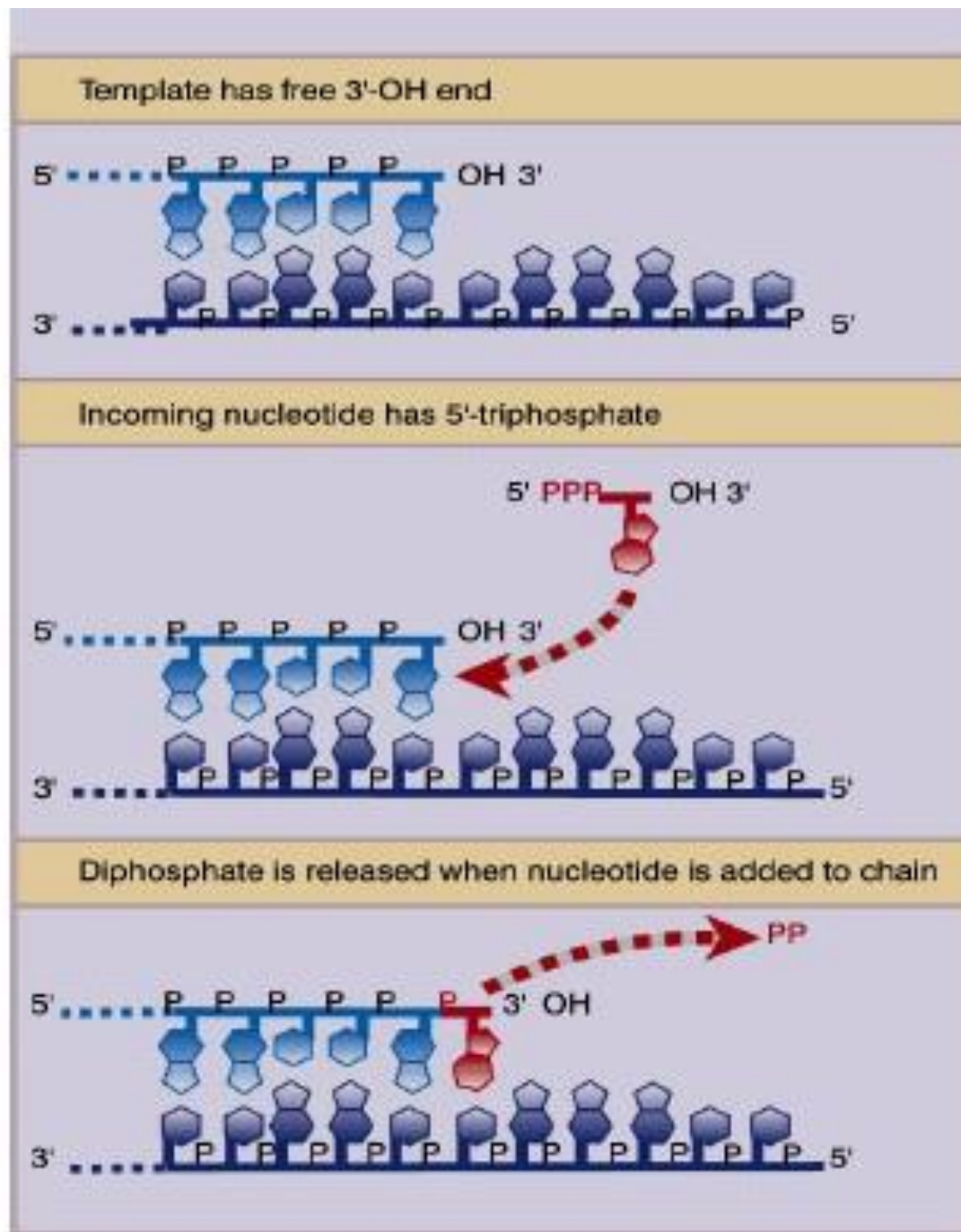
Início de Replicação do DNA no *oriC*



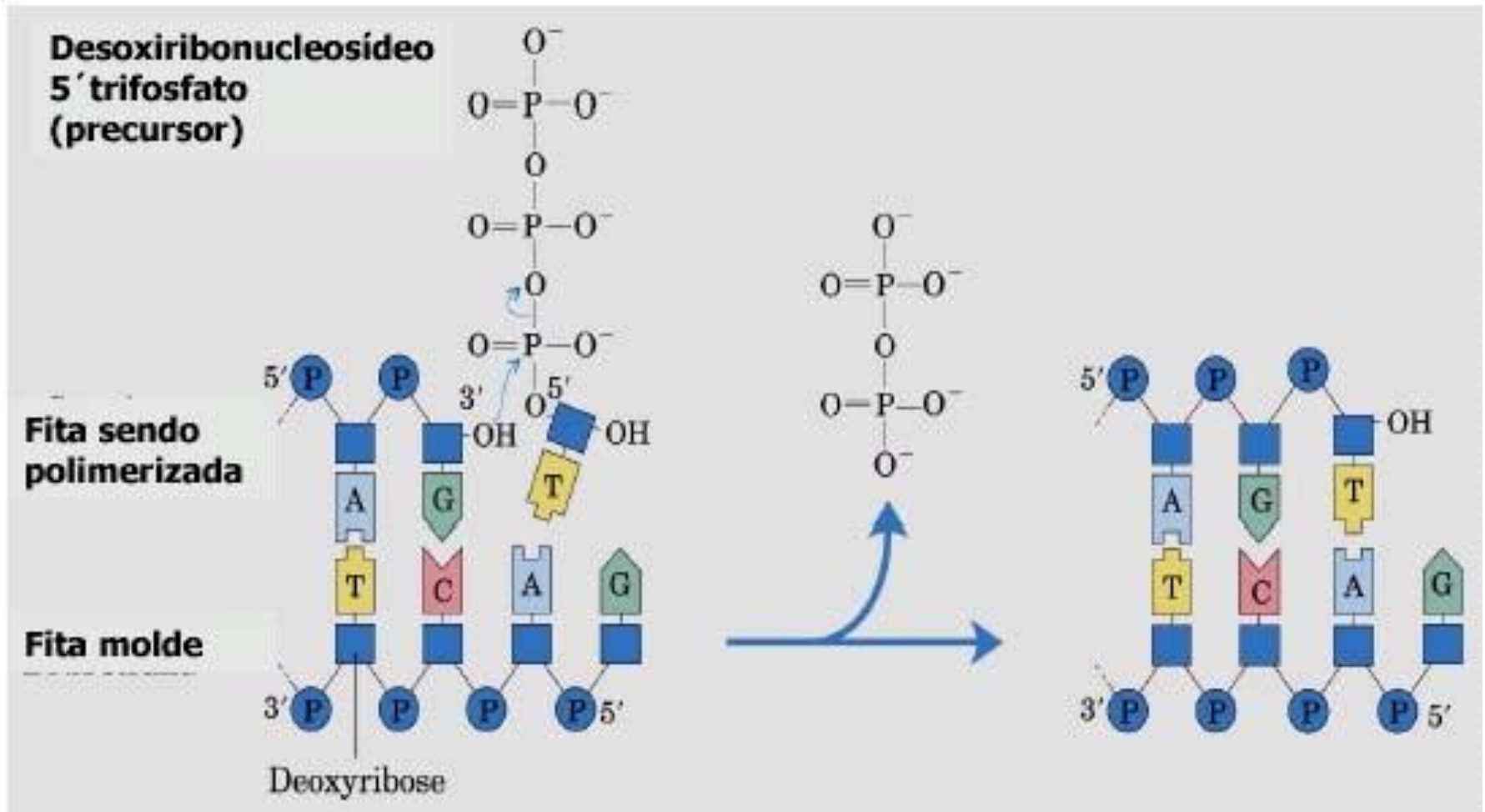


Polimerases de DNA: As enzimas que sintetizam DNA

- A síntese de DNA ocorre pela adição de nucleotídeos a extremidade 3' OH da cadeia em crescimento. O precursor da síntese é o desoxiribonucleosídeo 5' trifosfato
- Sentido da síntese sempre é 5' → 3'
- A replicação é um processo extremamente fiel. As DNA-polimerases tem atividade revisora



DNA polimerase

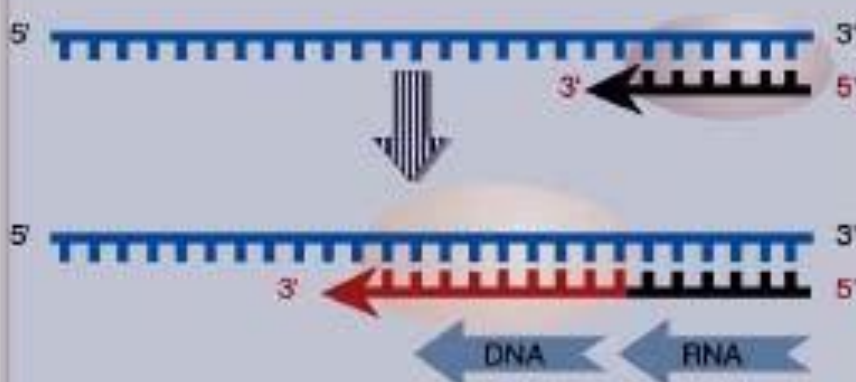


As DNA-polimerases sempre requerem um iniciador previamente pareado ao molde que será copiado

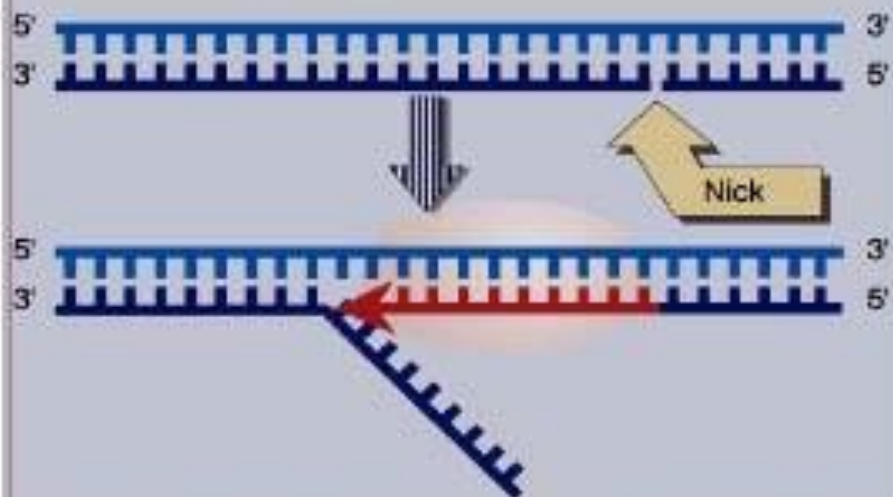
DNA polymerases cannot initiate DNA synthesis on duplex or single-stranded DNA without a primer



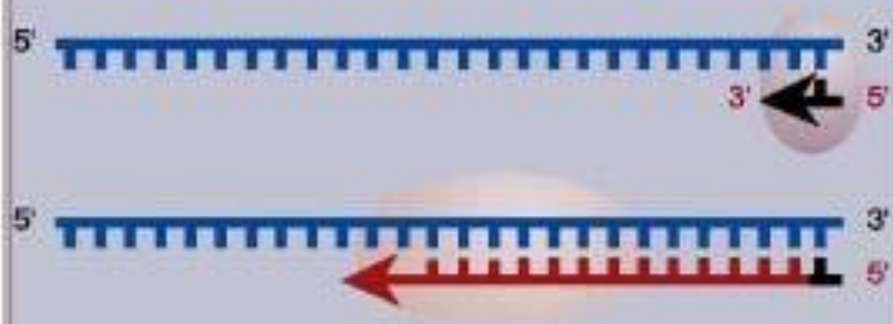
RNA primer is synthesized (or provided by base pairing)



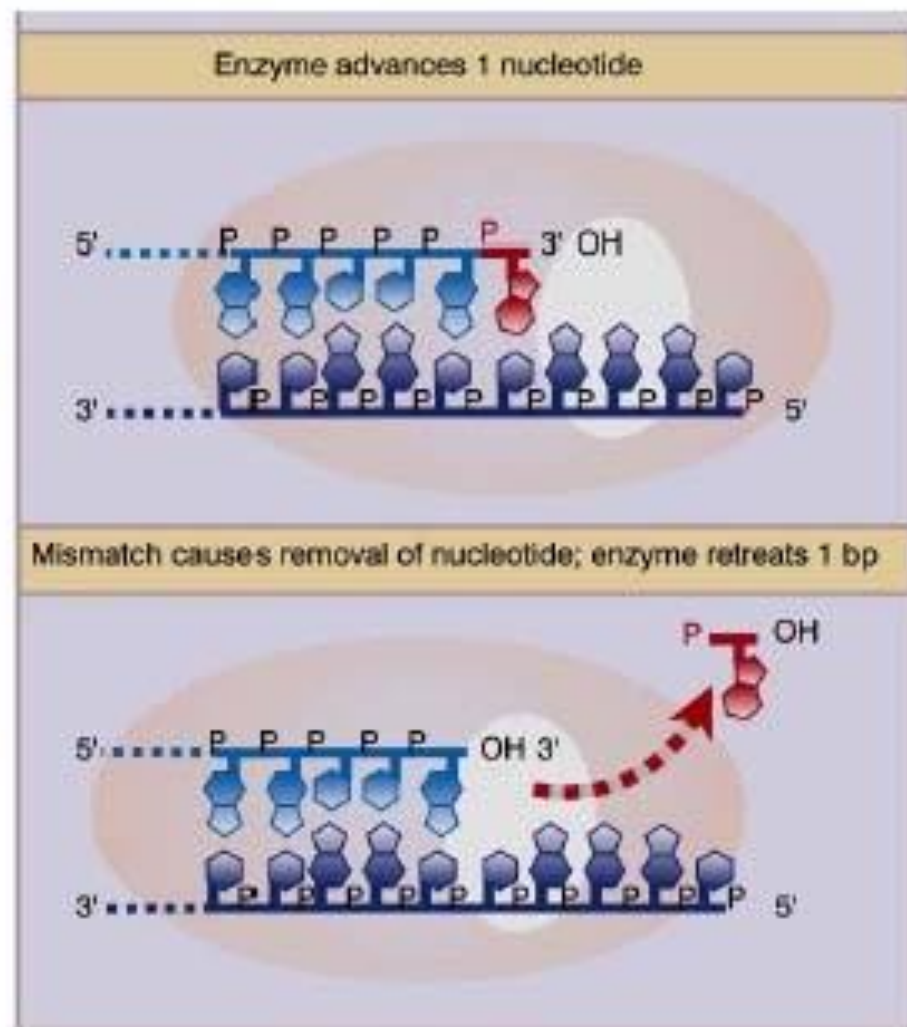
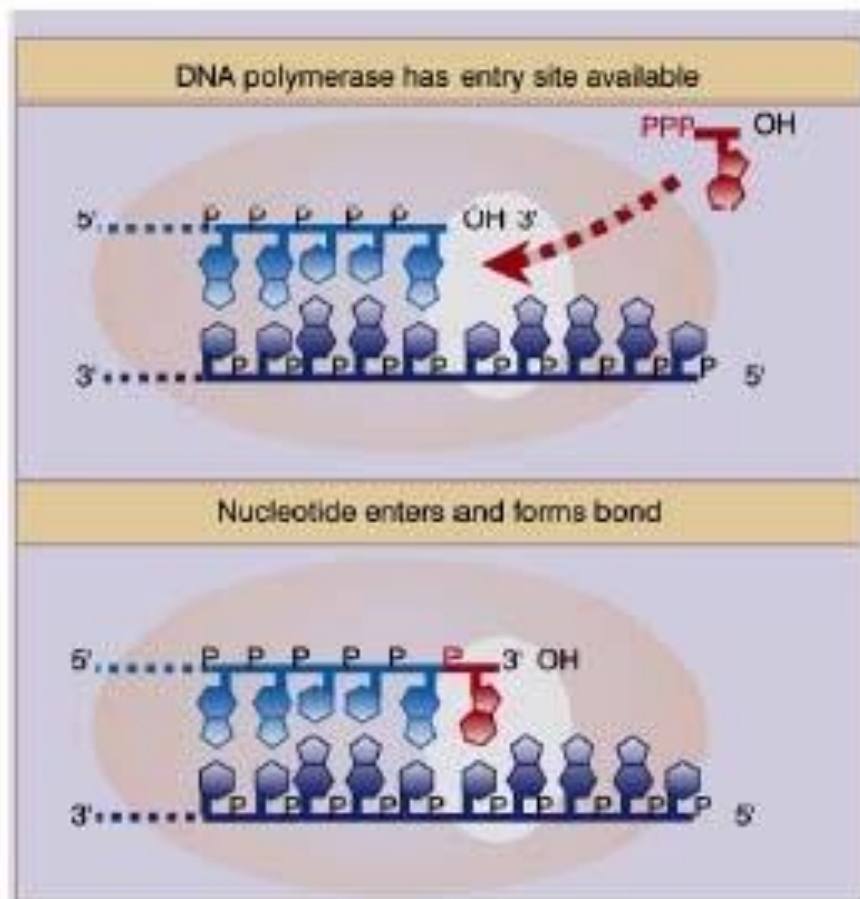
Duplex DNA is nicked to provide free end for DNA polymerase



A priming nucleotide is provided by a protein that binds to DNA



Atividade revisora 3' → 5' garante a fidelidade da replicação



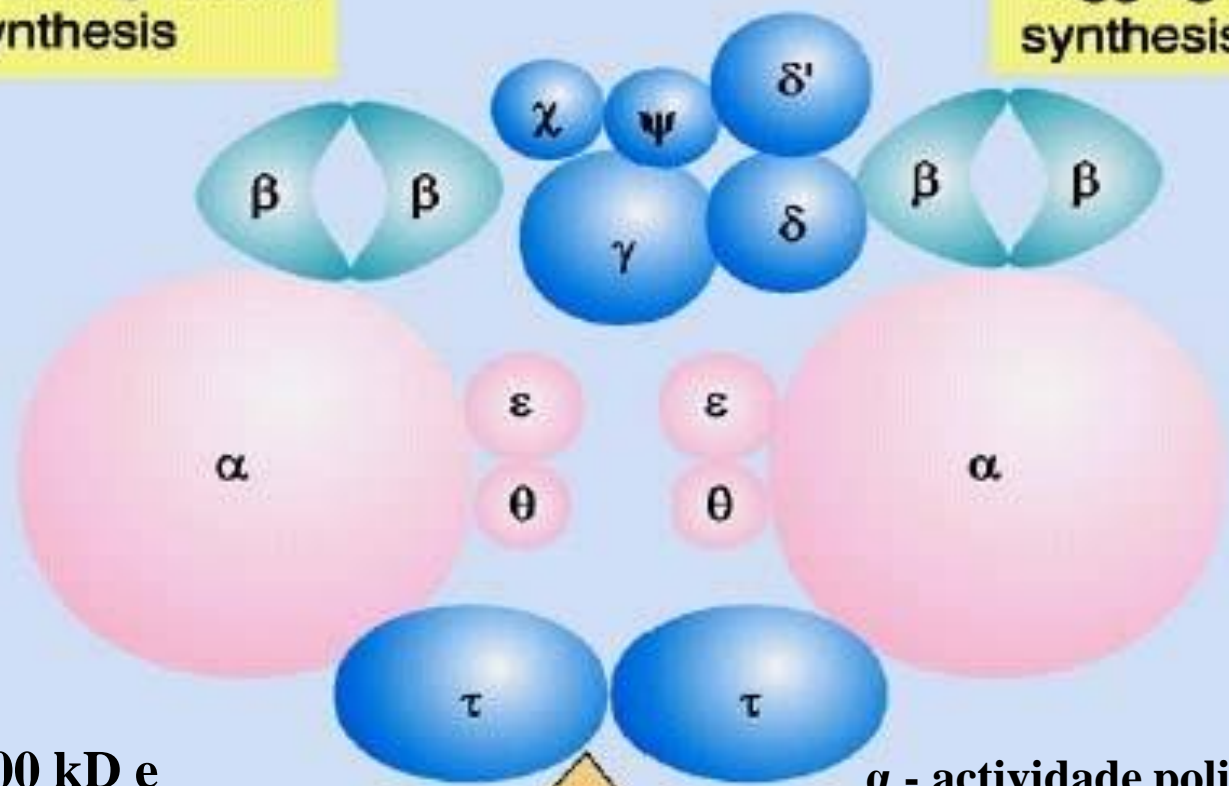
Propriedades das DNA-polimerases Bacterianas

	Pol I	PolII	PolIII
Polimerização 5' → 3'	+	+	+
Exonuclease 3' → 5'	+	+	+
Exonuclease 5' → 3'	+	-	-
Número de subunidades	1	≥4	≥10
Tamanho em kDa	103	90	~900
Velocidade de Polimerização(nt/seg)	16-20	40	250-1000
Processividade (nt adicionados antes da dissociação do molde)	3-200	1500	≥500000

DNA-polimerase III é uma holoenzima de mais de 10 cadeias de estrutura dimérica

Leading strand synthesis

Lagging strand synthesis

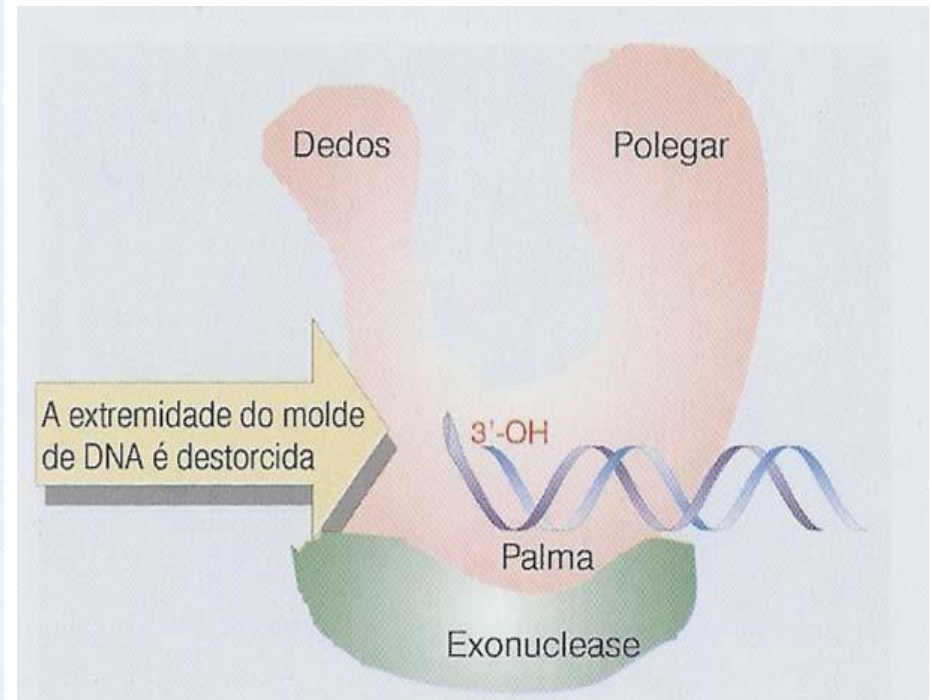
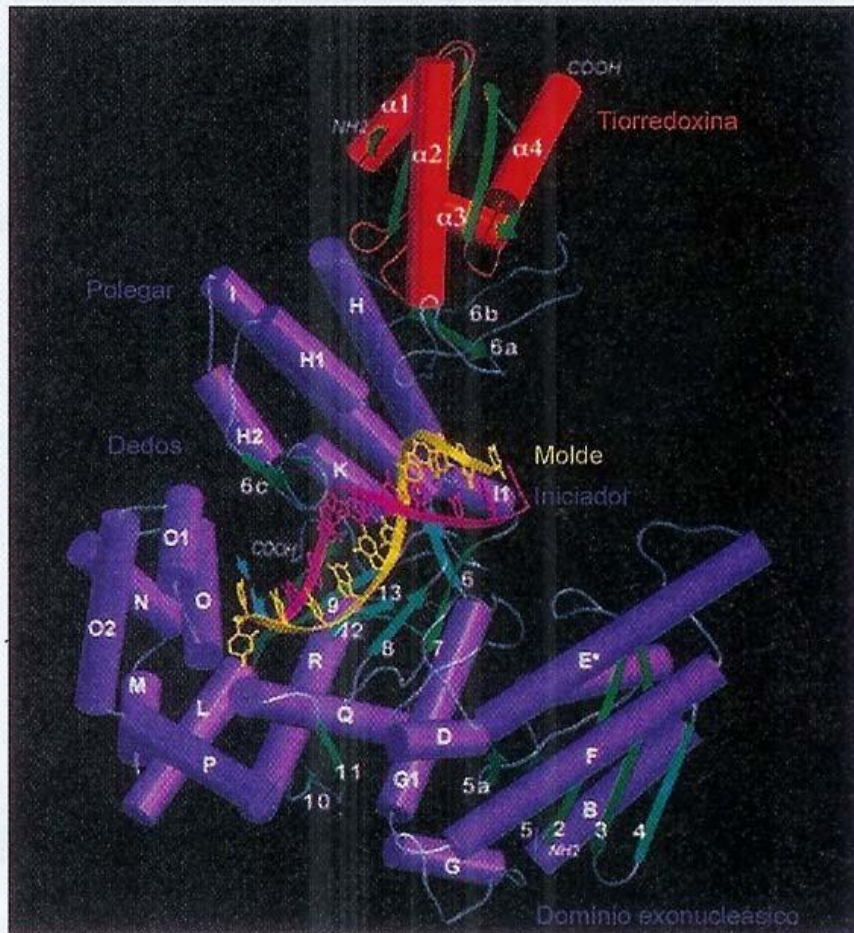


~900 kD e estrutura dimerica

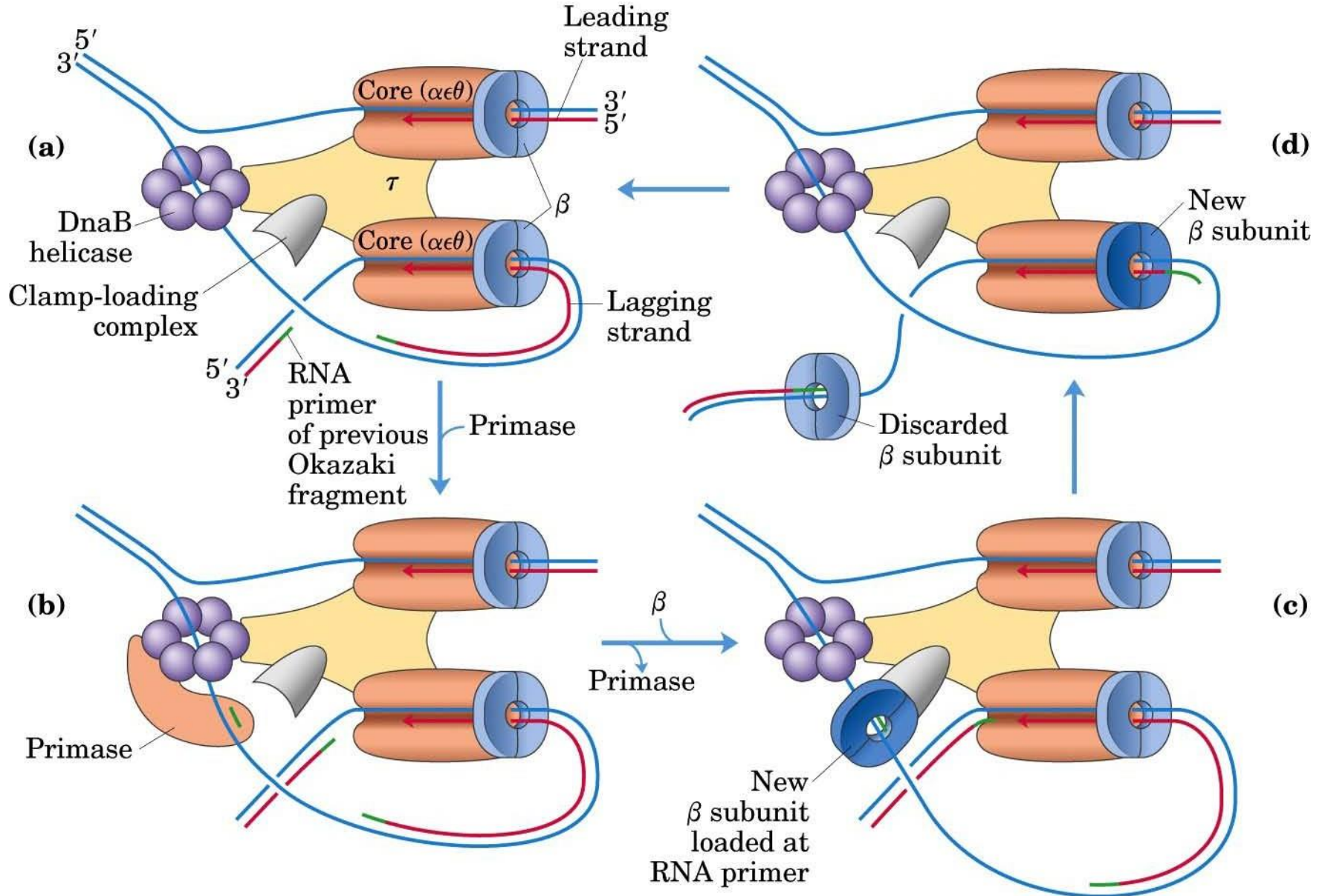
τ subunits maintain dimeric structure

- α - actividade polimerase 5'-3'
- ϵ - " exonuclease 3'-5'
- β - aumenta processividade da enzima
- θ - necessária à montagem de $\alpha \epsilon \tau$
- τ - mantém estrutura do dímero e contacta com DnaB (helicase)

Modelo da estrutura das DNA-polimerases



Síntese do DNA na fita contínua e descontínua



A síntese do DNA é semi-descontínua e requer um iniciador (primer) de RNA

Síntese da Fita descontínua

Previous fragment

Last fragment

Exposed single strand

Parental DNA

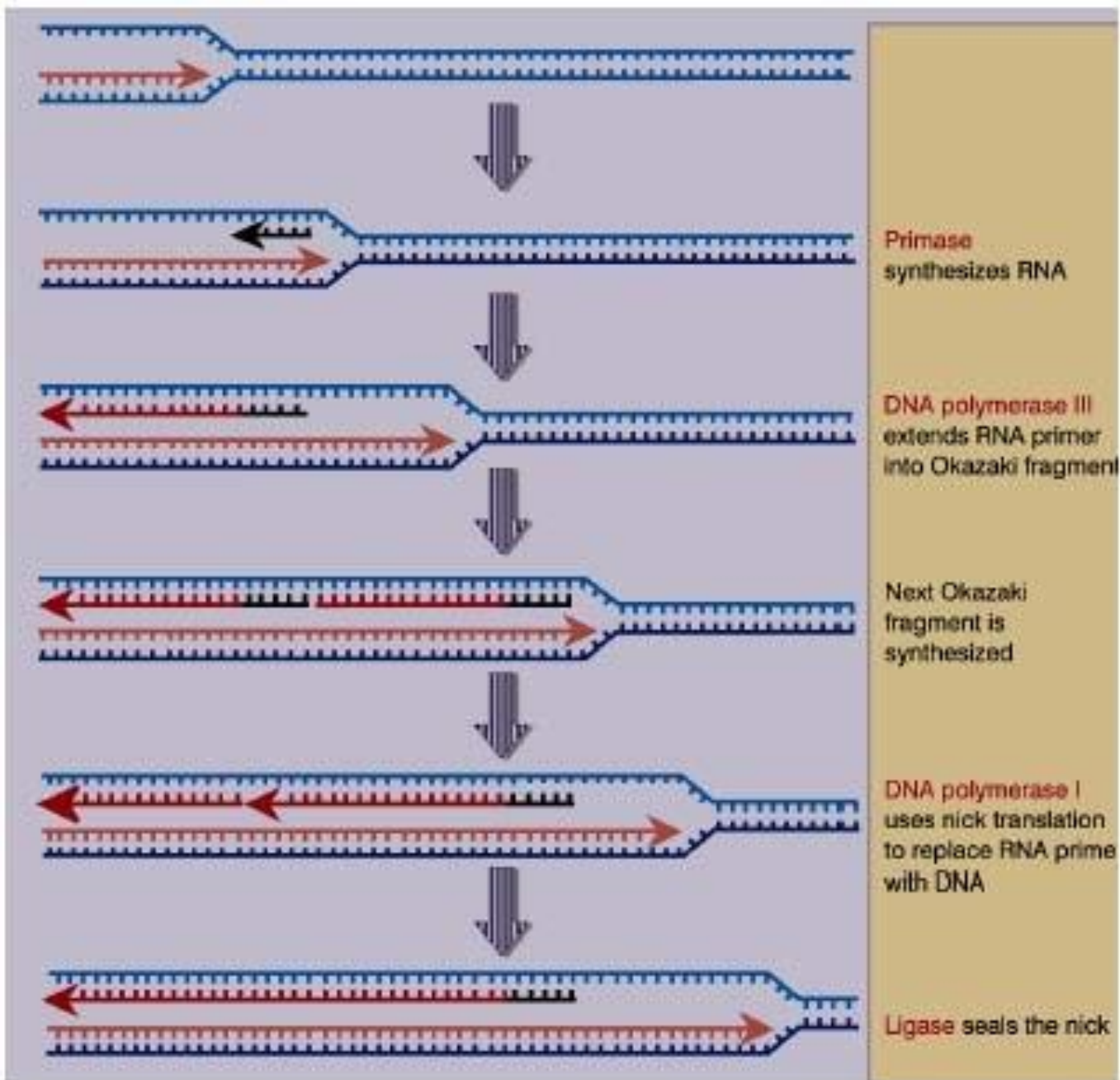


Síntese da Fita Contínua

Nucleotides added continuously to 3' end

Proteínas presentes na forquilha de Replicação de *E.coli*

SSB	Liga a fita simples de DNA
DnaB (helicase)	Desenrola o DNA
Primase (DnaG)	Sintetiza os primers de RNA
DNA Polimerase III	Síntese da fita nova
DNA Polimerase I	Preenche as lacunas e excisa os primers
DNA Ligase	Liga os fragmentos
DNA girase	Superenrolamento

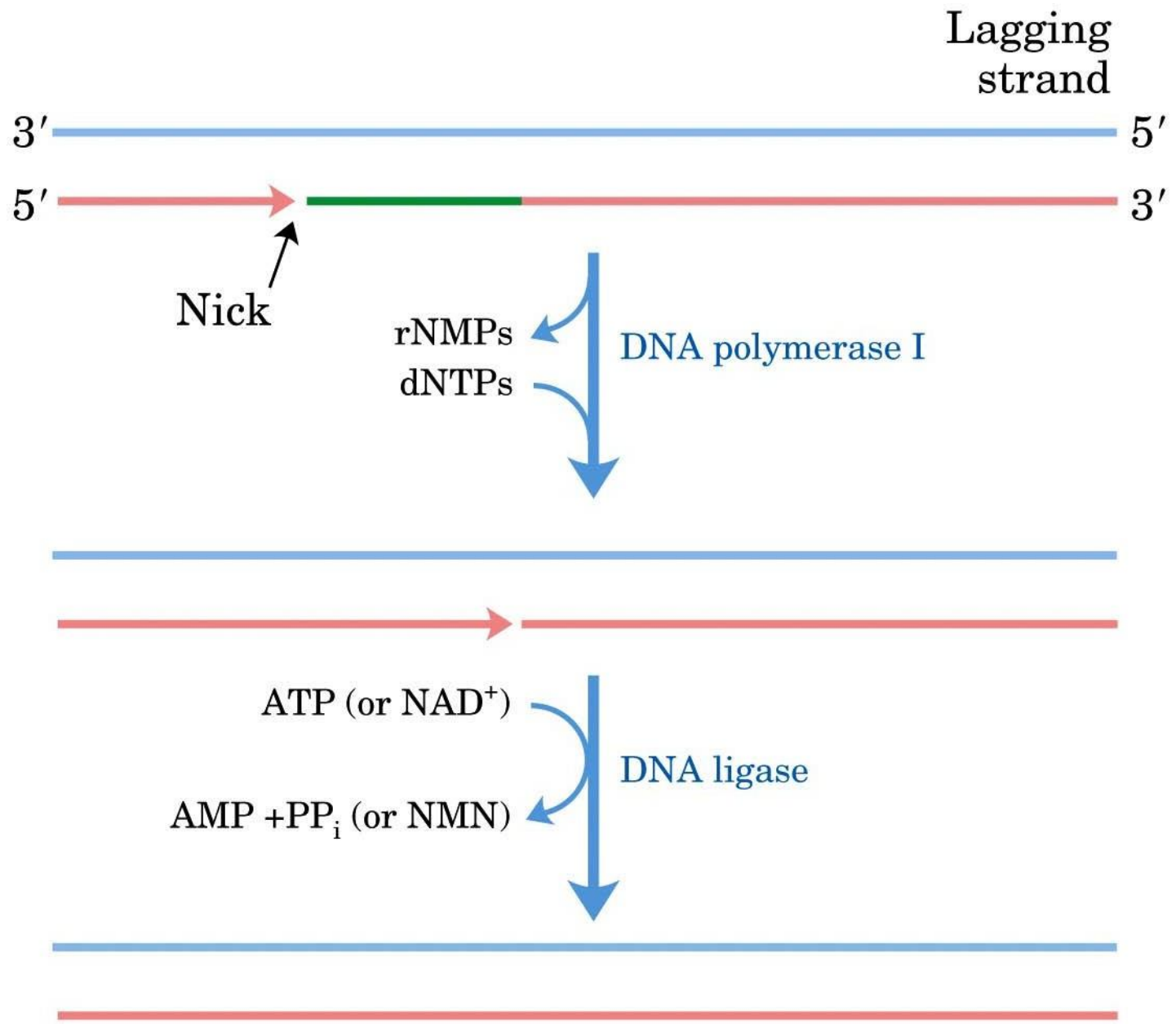


- Fragmentos de Okasaki ocorrem na fita descontínua

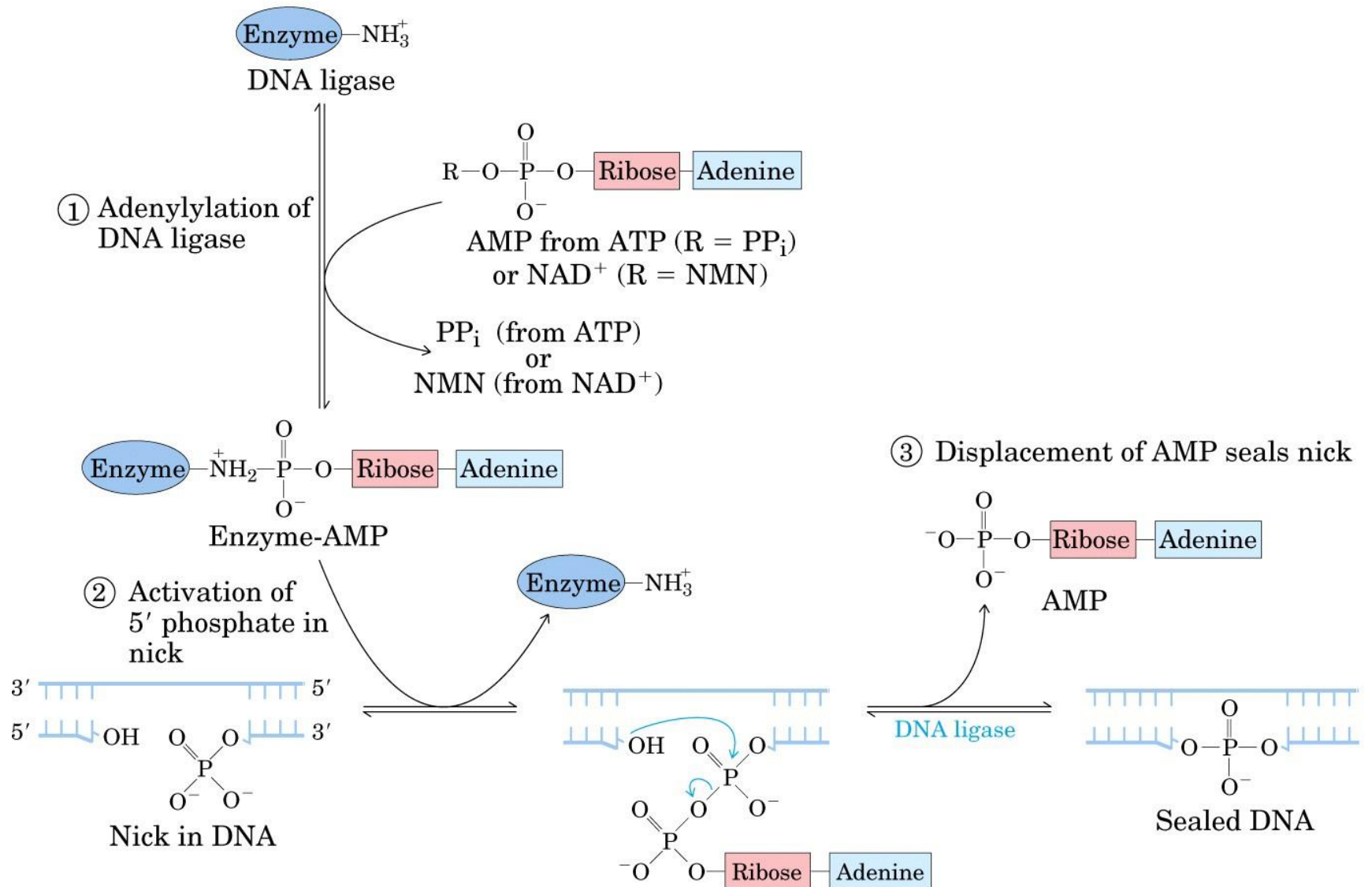
- A DNA polimerase III é responsável pela síntese da maior parte do DNA

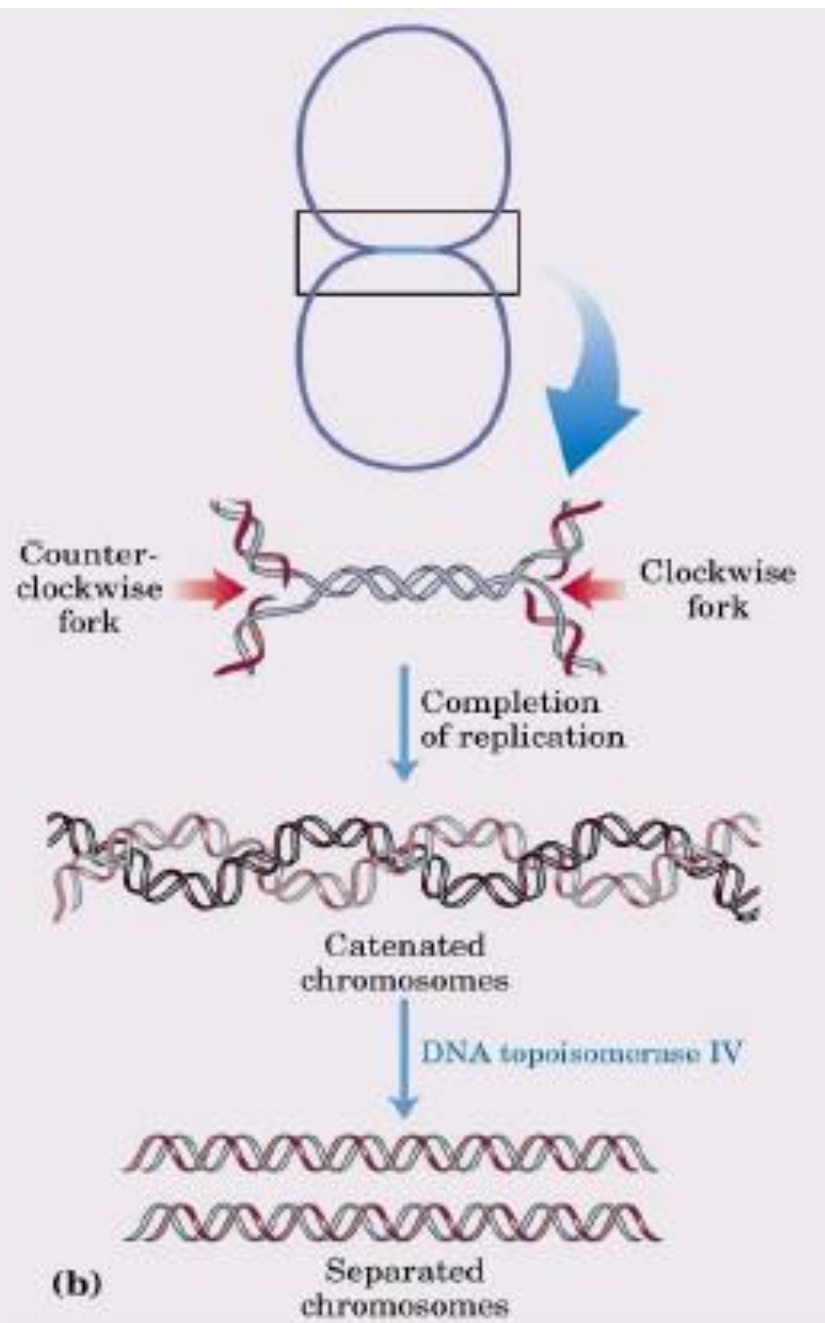
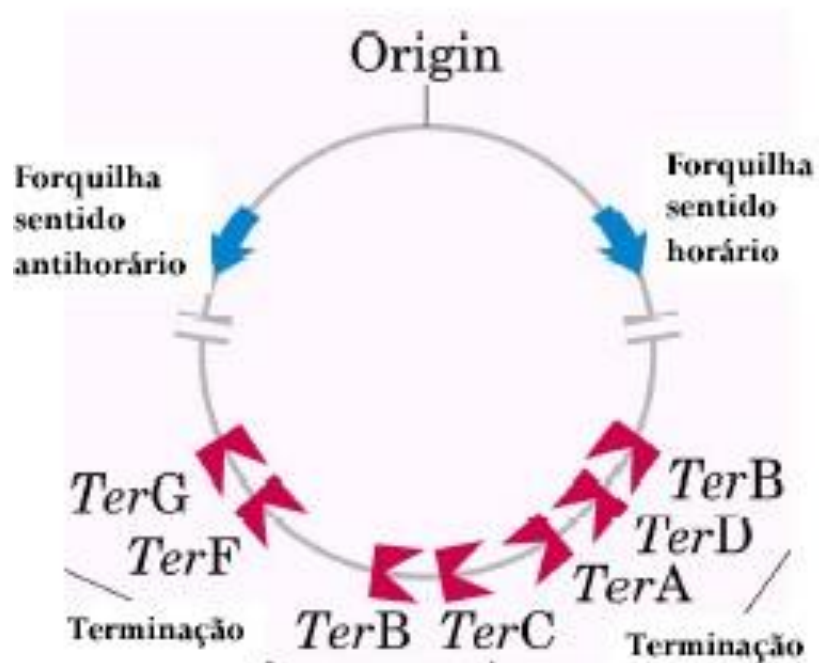
- A DNA polimerase I remove o primer de RNA e preenche as lacunas

- A DNA ligase sela as quebras



Atividade da DNA ligase

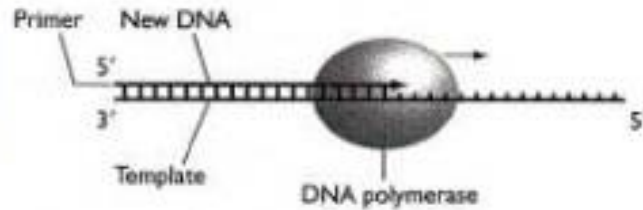




ACTIVITIES

(A) 5'→3' DNA synthesis

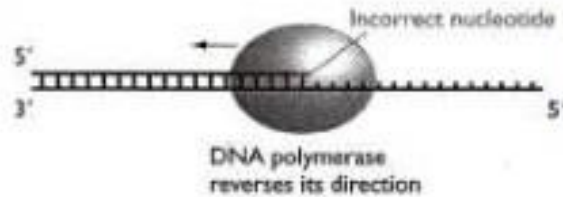
DNA polymerase I
DNA polymerase III



Synthesis

(B) 3'→5' exonuclease activity

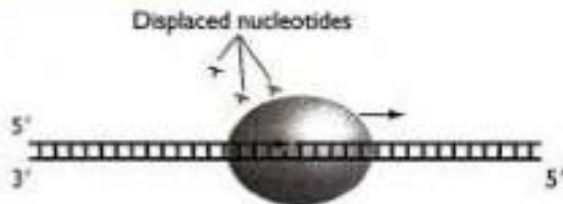
DNA polymerase I
DNA polymerase III



Removes incorrect nucleotide

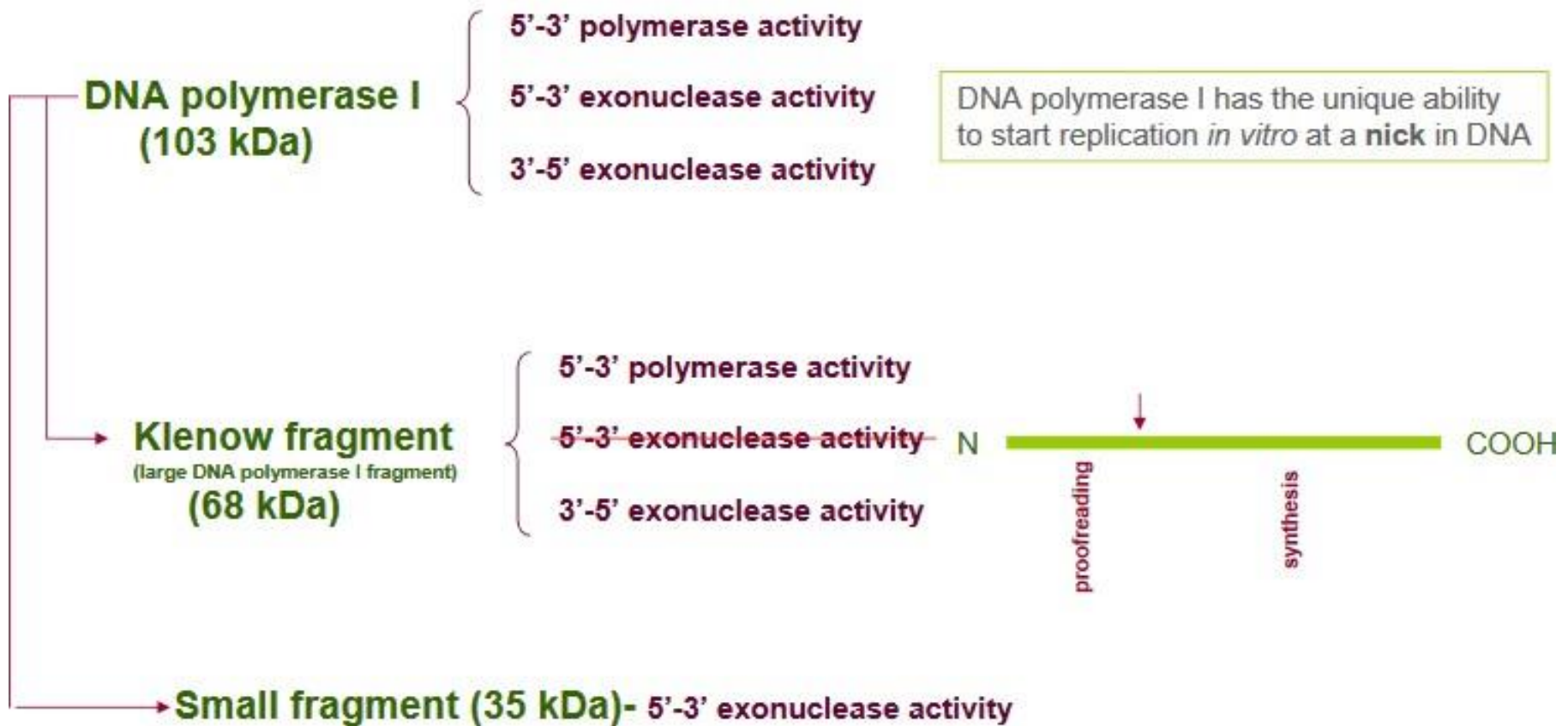
(C) 5'→3' exonuclease activity

DNA polymerase I



Displaces incorporated nucleotides

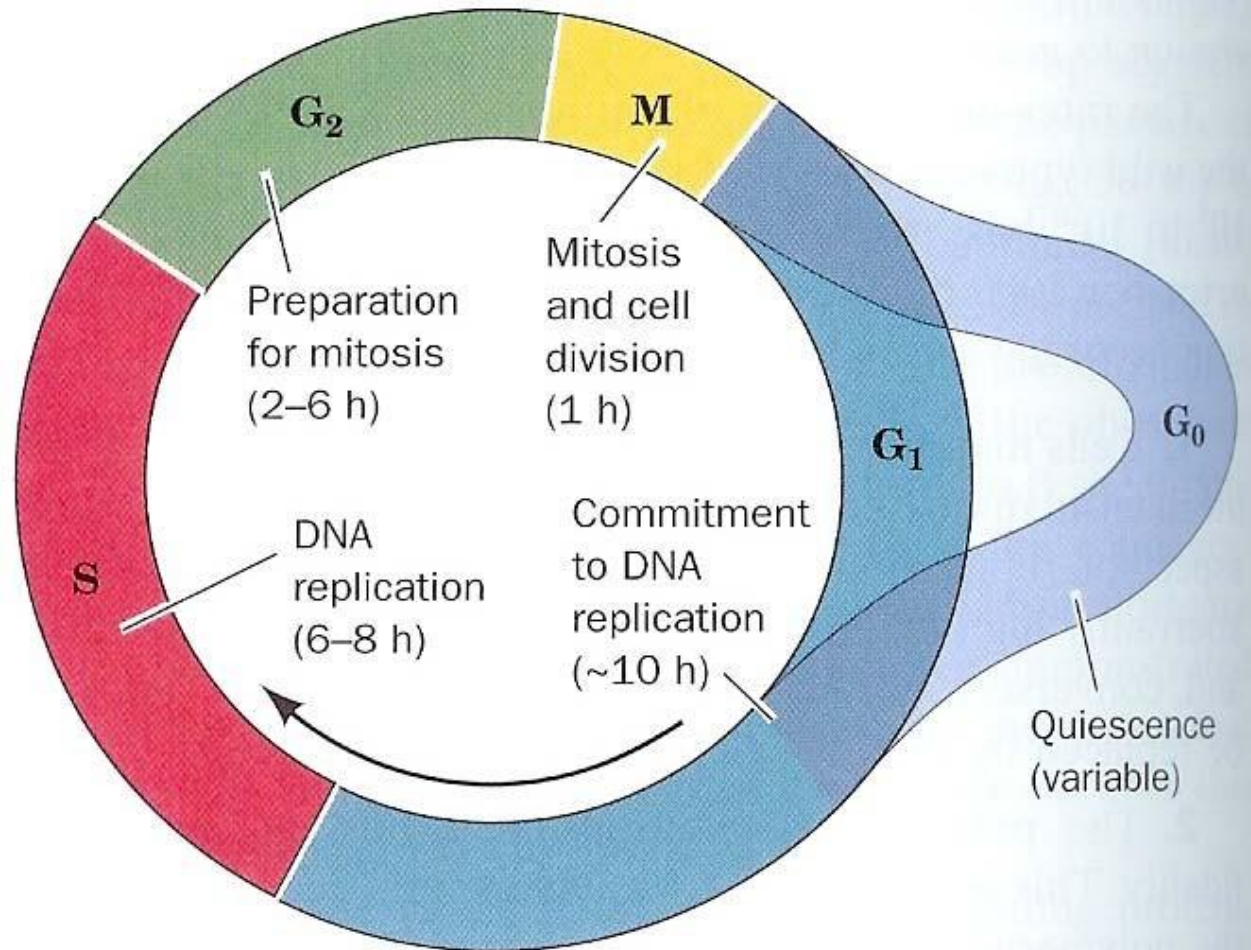
Klenow fragment (large DNA polymerase I fragment)

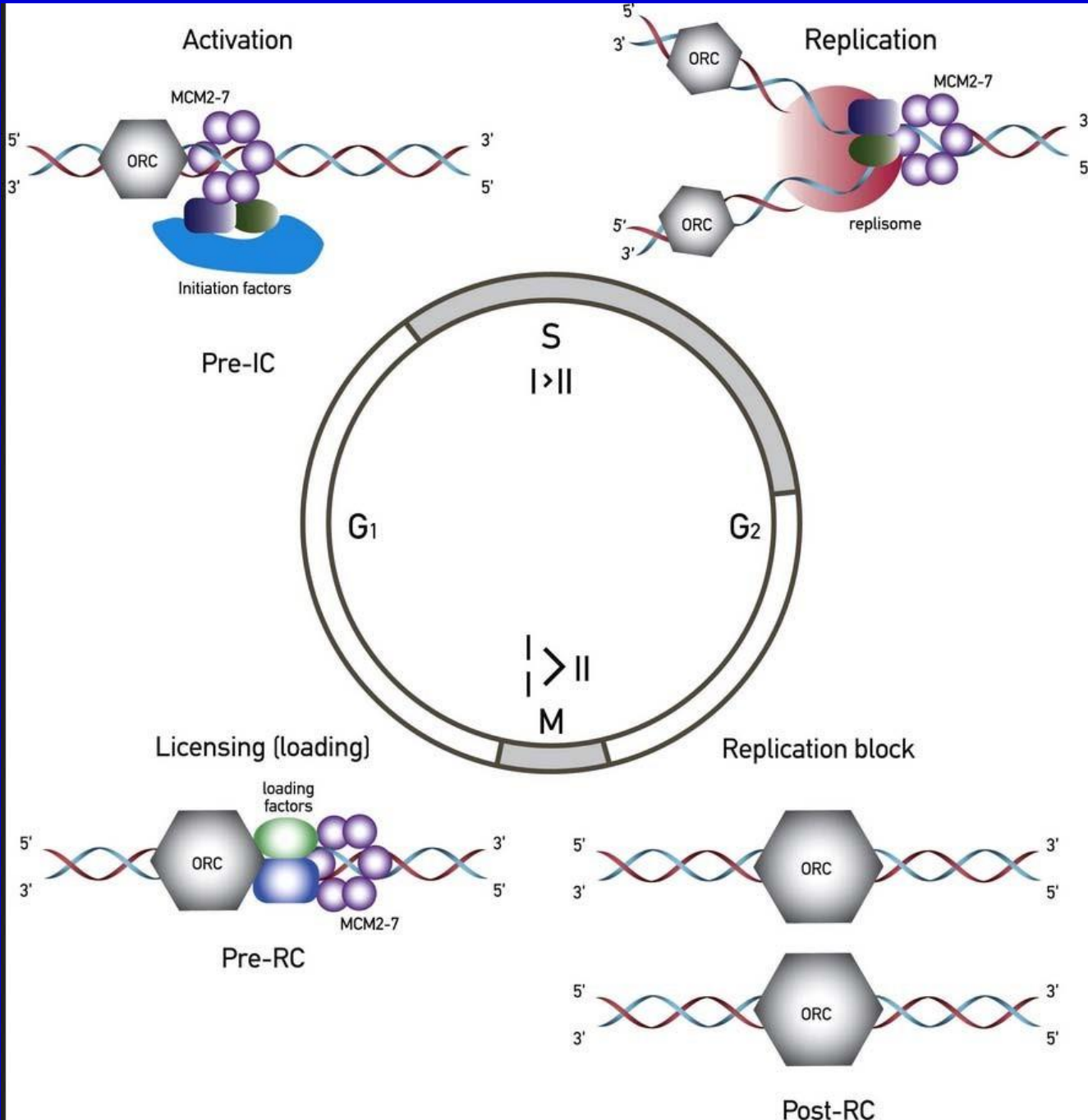


Replicação do DNA Eucariótico



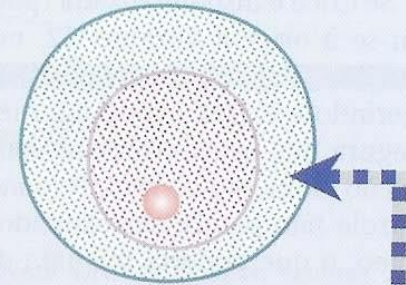
Ciclo Celular Eucariótico



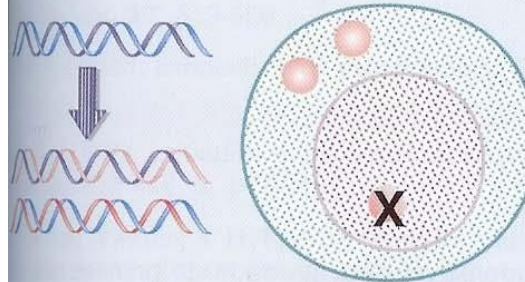


O fator licenciador controla a replicação do DNA eucariótico

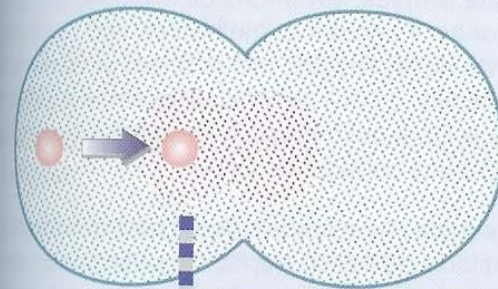
Antes da replicação, o núcleo contém o fator licenciador ativo



Após a replicação, o fator licenciador é inativado no núcleo; o fator licenciador que está no citoplasma não pode entrar no núcleo

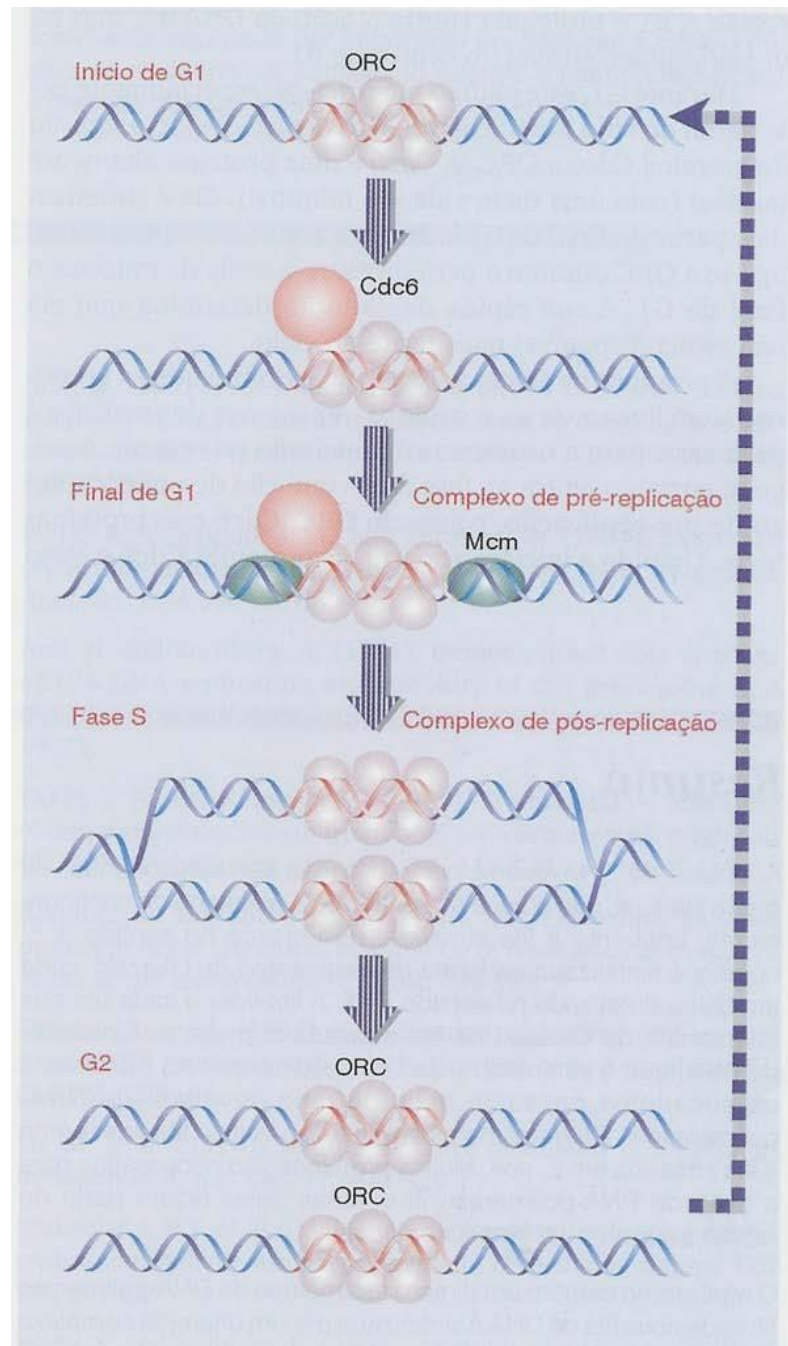


A dissolução da membrana nuclear durante a mitose permite que o fator licenciador associe-se ao material nuclear

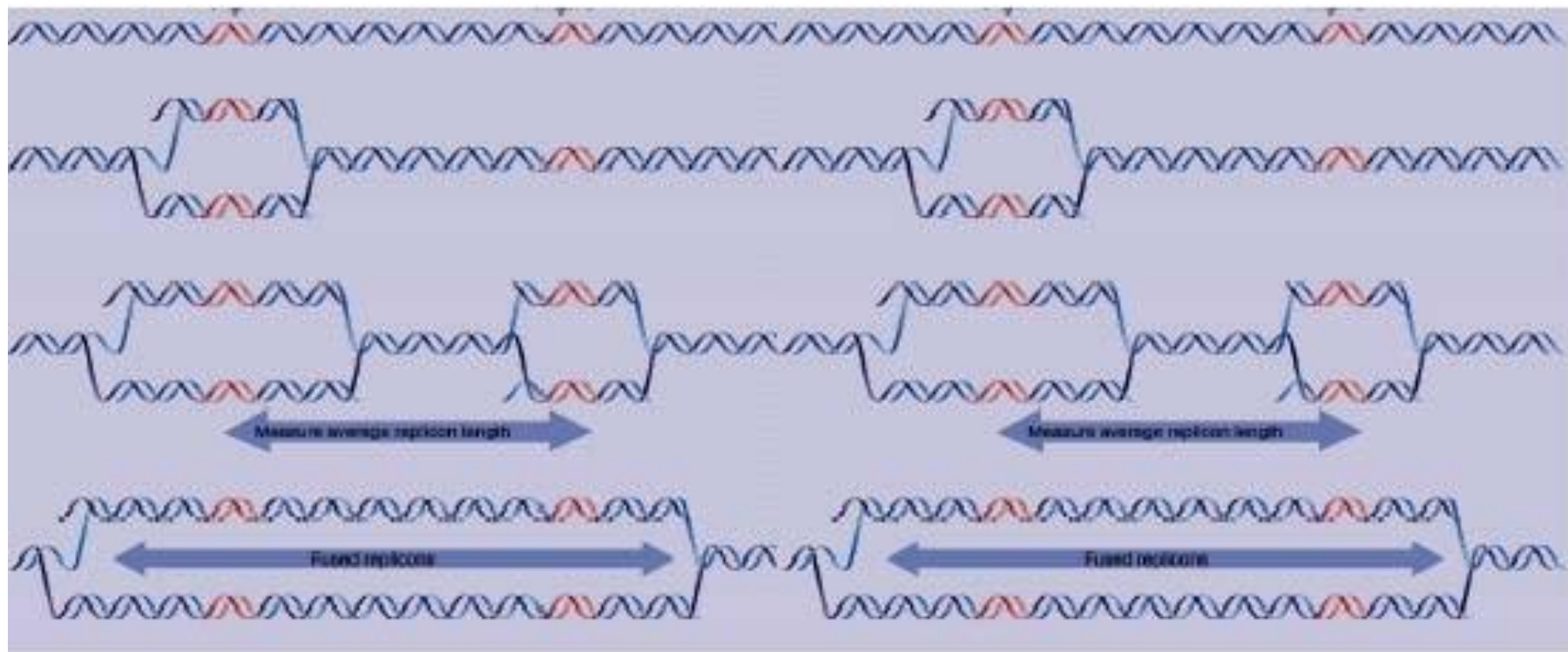


A divisão celular gera núcleos-filho competentes para promover a replicação

Complexo origem-ORC

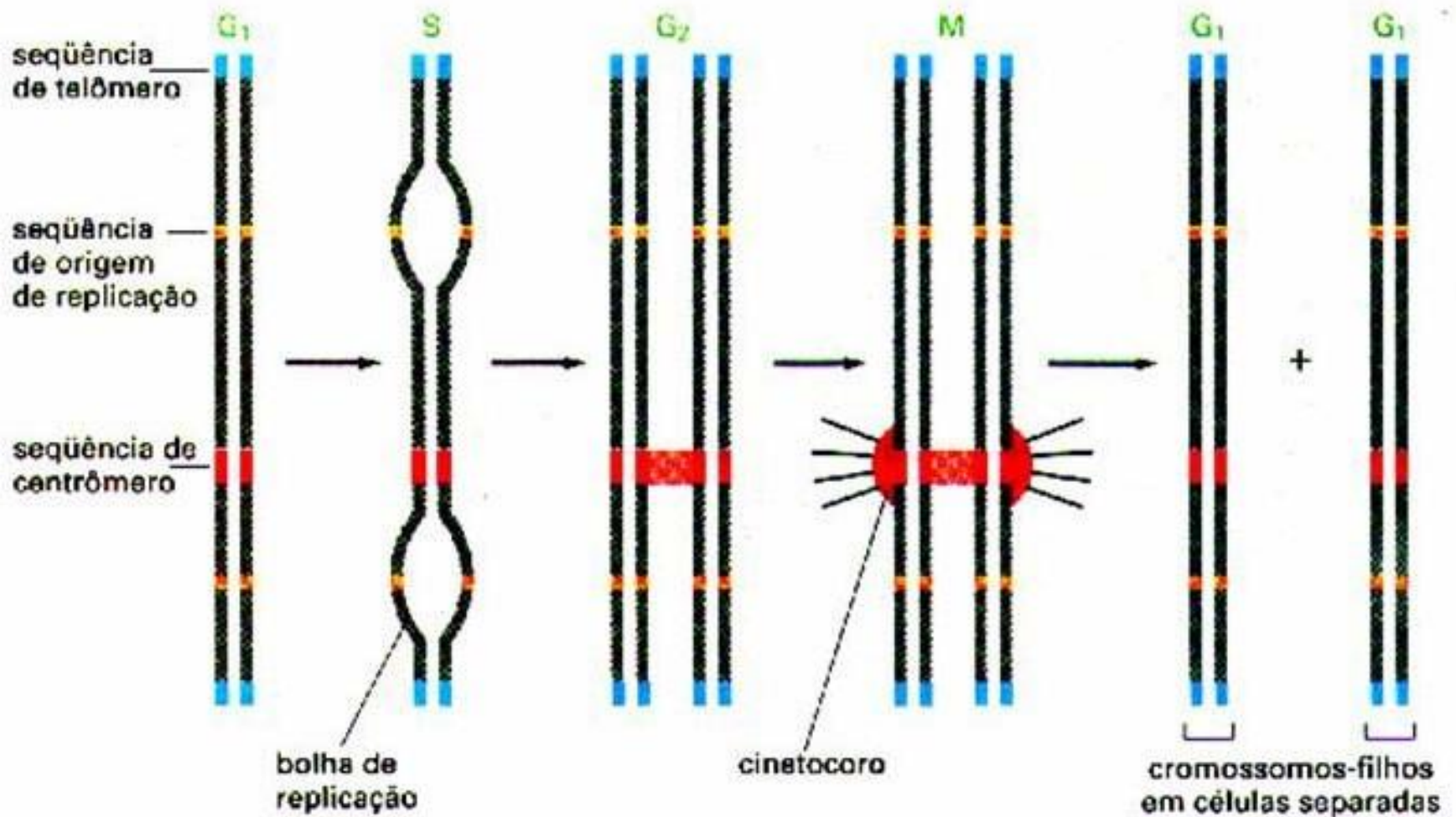


O genoma eucariótico constitui vários replicons

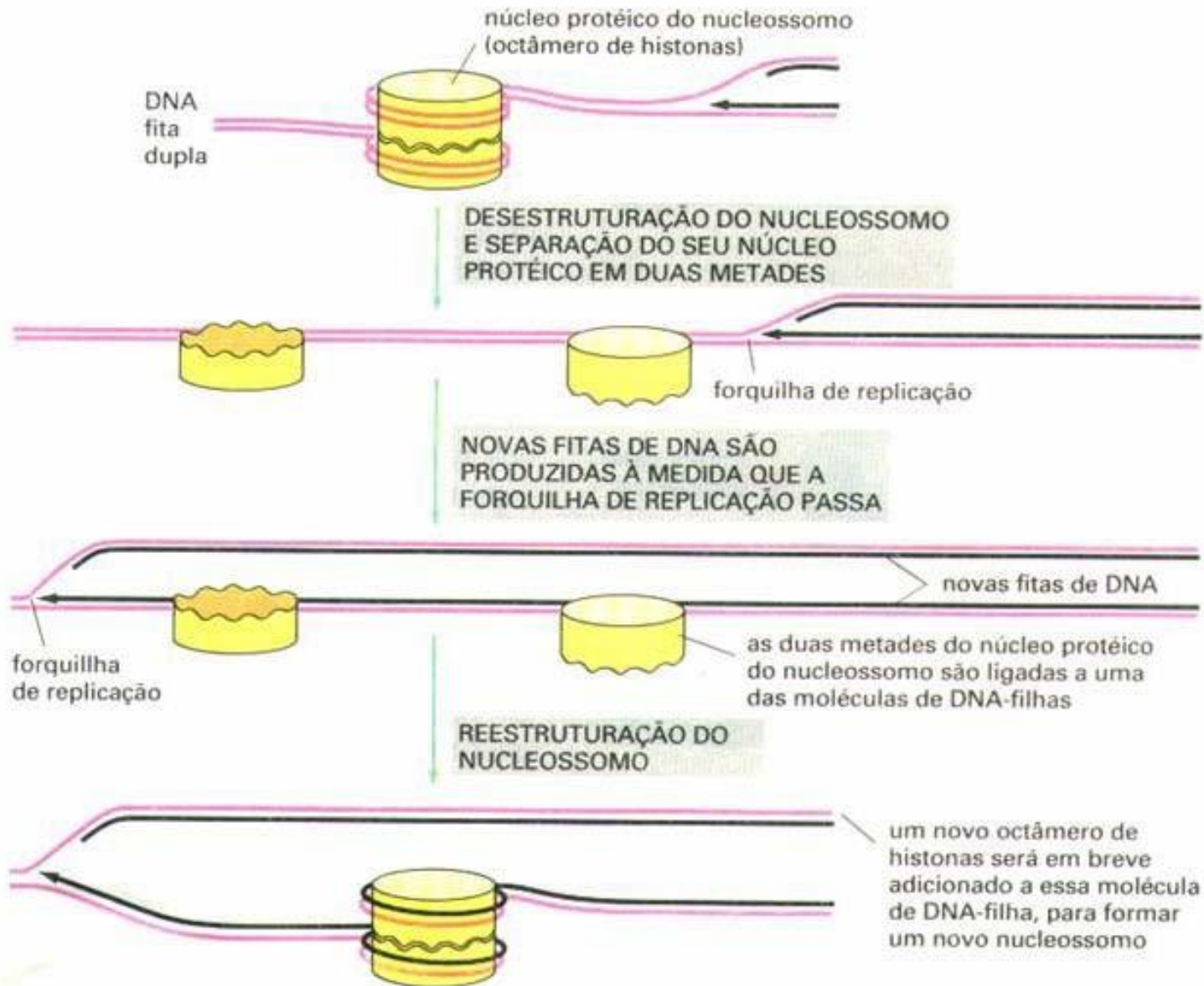


- A velocidade da forquilha de replicação eucariótica é 2000pb/min
- Os replicons eucarióticos tem 40-100 kb e são iniciados em tempos diferentes
- Fase S demora ~ 6hrs em uma célula somática

Cromossomo Eucariótico



Replicação e Nucleossomos



DNA polymerases of humans

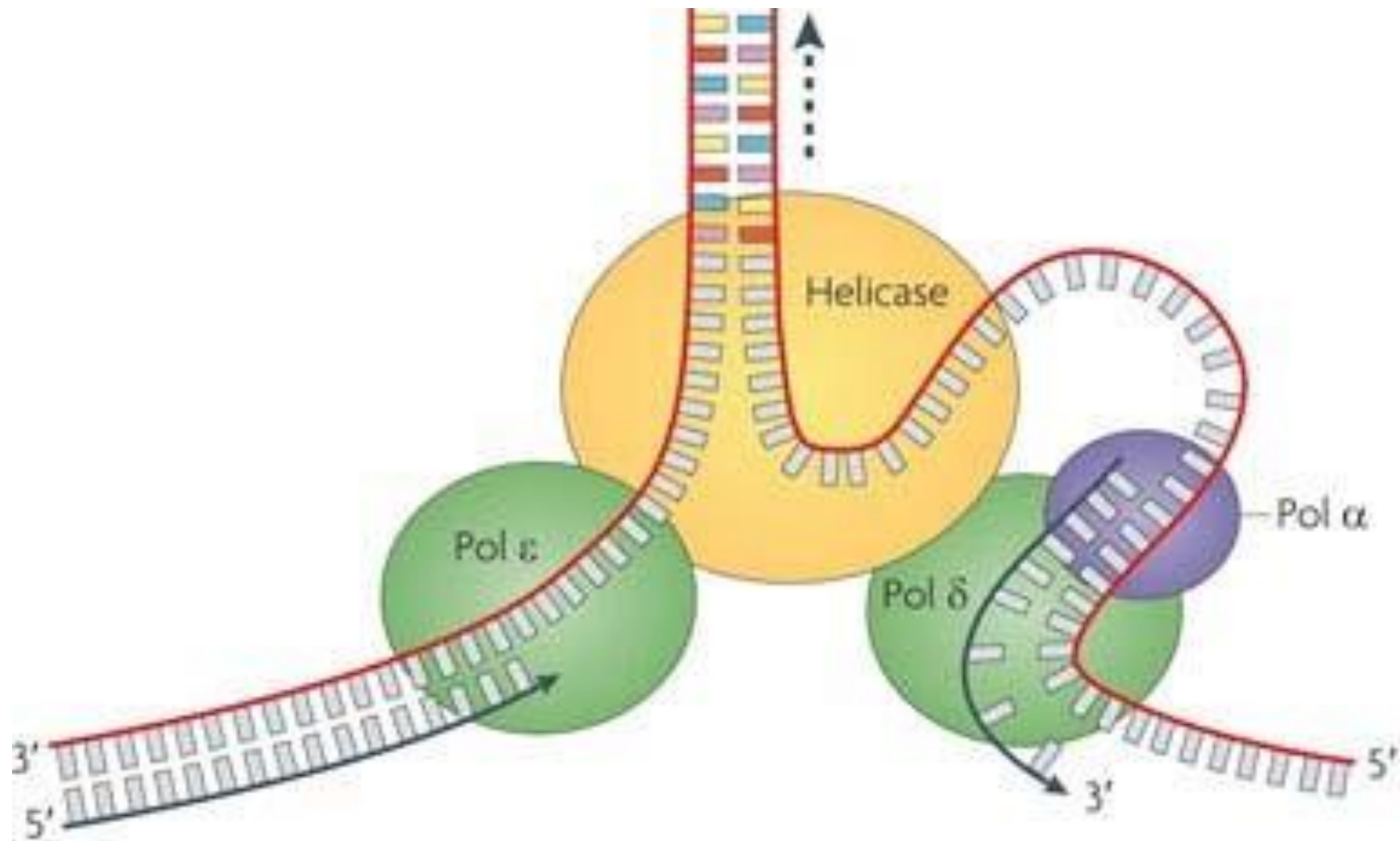
	α	β	γ	δ	ϵ
Location	nucl	nucl	mito	nucl	nucl
Replication	yes	no	yes	yes	(no)
Repair	no	yes	no	no	yes ³
Functions					
5' to 3' polymerase	yes	yes	yes	yes	yes
3' to 5' exonuclease	no	no	yes	yes	yes
5' to 3' exonuclease ¹	no	no	no	no	no
Primase	yes	no	no	no	no
Associates with PCNA²	no	no	no	yes	no
Processivity	low			high	
Strand synthesis	Descont	repair	both	Contin	repair

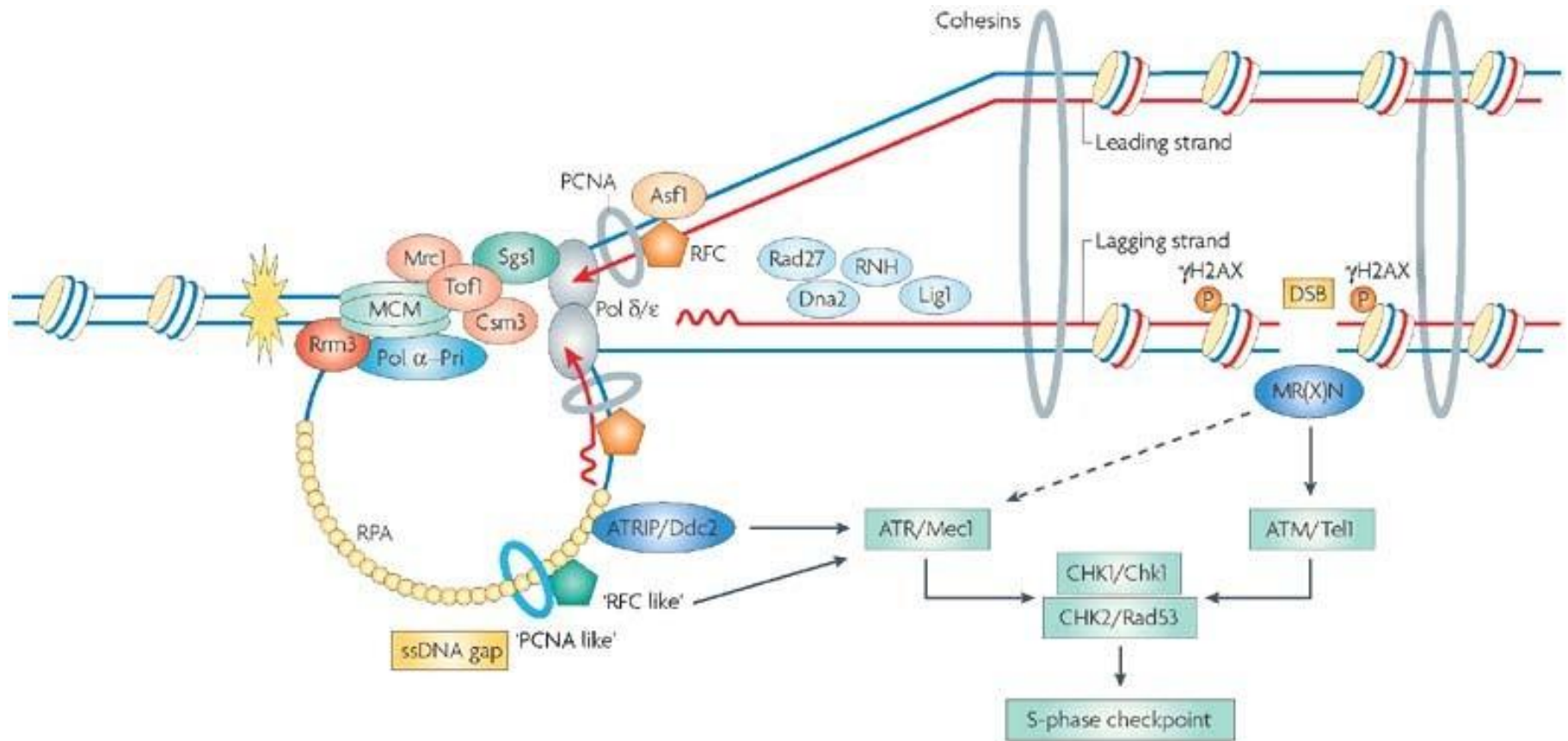
¹ activity present in associated proteins

² **P**roliferating **C**ell **N**uclear **A**ntigen

³involved in transcription-linked DNA repair

Polimerases de DNA Eucarióticas independentes realizam à iniciação e alongação





Replication is catalysed by the replisome multisubunit complex, which contains replication elongation factors. The eukaryotic MCM helicase unwinds the parental duplex to allow access to the DNA polymerase alpha primase (Pol alpha–Pri). Processive elongation is catalysed by the replicative polymerases delta and epsilon (Pol delta/epsilon). This polymerase switch is mediated by the replication processivity clamp (PCNA) that is loaded by the replication factor C complex (RFC) and stabilizes DNA polymerases. During DNA synthesis in the discontinuous lagging strand, primer RNA displacement results in a flap structure that is cleaved by the Rad27 nuclease (FEN1 in humans); the resulting intermediate is processed by the DNA2 helicase, RNase H (RNH), pol delta and DNA ligase I (Lig1). Cohesins hold the two sister chromatids together until anaphase. Encountering an obstacle can cause replication-fork (RF) stalling, leading to ssDNA gaps and double-stranded breaks (DSBs). Several factors associate with the RF to prevent its collapse, including the *Saccharomyces cerevisiae* Rrm3 helicase, the Mrc1 checkpoint mediator in association with Tof1 and Csm3, or the nucleosome assembly factor Asf1. ssDNA gaps and DSBs are sensed by the S-phase checkpoint which is activated through Tel1 (ATM in humans) and Mec1 (ATR in humans) (see Box 1). In the case of a DSB, the checkpoint signalling spreads around the DSB site by histone H2AX phosphorylation (gammaH2AX) in humans (H2A in yeast). ATRIP/Ddc2, ATR/Mec1 interacting protein; CHK1/Chk1 and CHK2/Rad53, serine/threonine-protein kinases; MCM, replicative helicase; MR(X)N, a nuclease complex; RPA, replication protein A; Sgs1, ATP-dependant helicase.

Arabidopsis thaliana

Human

Nucleus

Replication

α δ ϵ

Repair

ξ η θ

κ λ σ

Mitochondria

POP (At1g50840)

POP (At3g20540)

Chloroplasts

POP (At1g50840)

POP (At3g20540)

Nucleus

Replication

α δ ϵ

Repair

β ξ η θ ι

κ λ μ ν σ

Mitochondria

γ

- Family A (*E. coli* Pol I type)
- Family B (*E. coli* Pol II type)
- Family X
- Family Y (*E. coli* Pol IV, V type)

A reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Definição: PCR (Polimerase Chain Reaction)

- reação de polimerização em cadeia de DNA

Objetivo:

- amplificar exponencialmente seqüências específicas de DNA, de amostras de genôma, plasmídios, etc., a partir de picogramas (10^{-9} g) de material genético

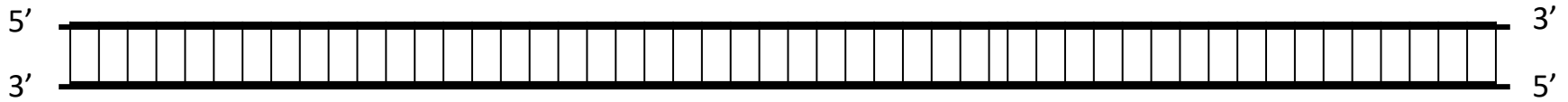
Requisitos:

- conhecimento da seqüência a ser amplificada
- “primers”, desoxinucleotídeos trifosfato (dNTP's), DNA polimerase termoestável, termociclador

Vantagens:

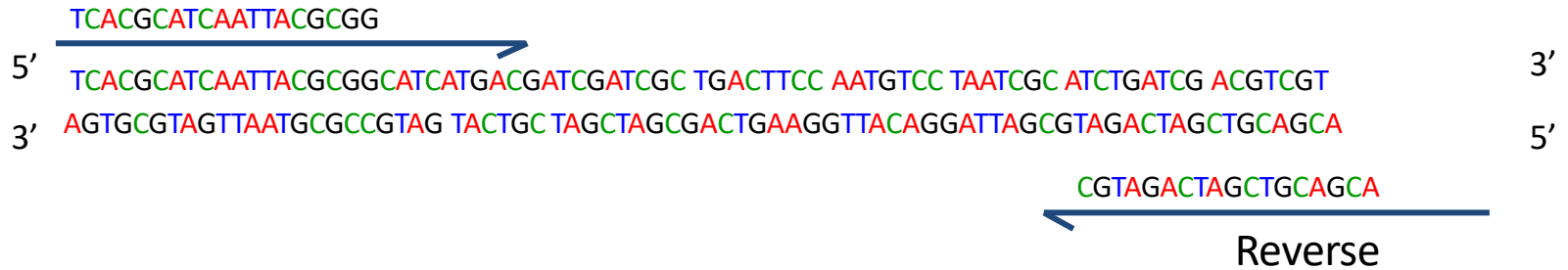
- funciona mesmo com amostras de DNA, mesmo que esteja parcialmente degradado
- amplifica a partir de quantidades muito pequenas, na ordem de picogramas
- etc.

DNA genômico

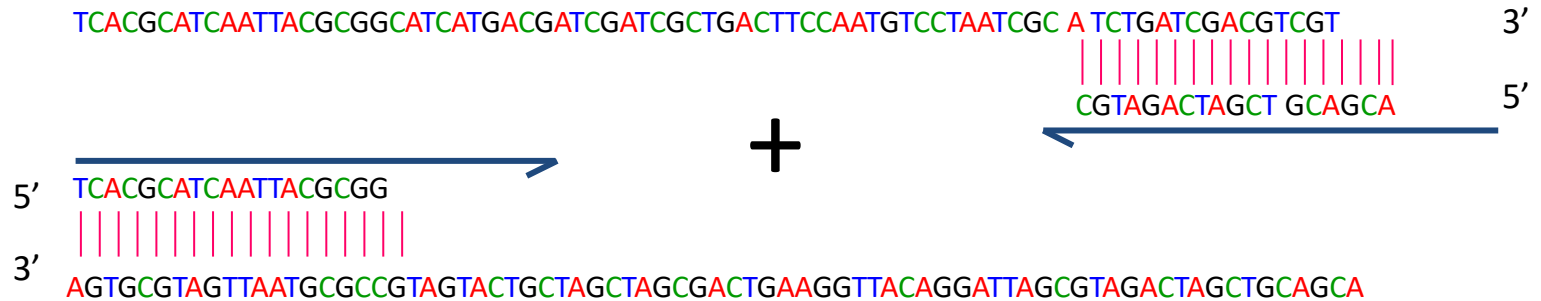


DNA e desenho de Oligonucleótidos

Forward

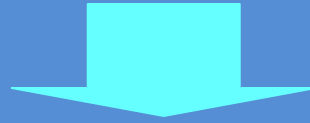


DNA e alinhamento de Oligonucleótidos



Reação de PCR

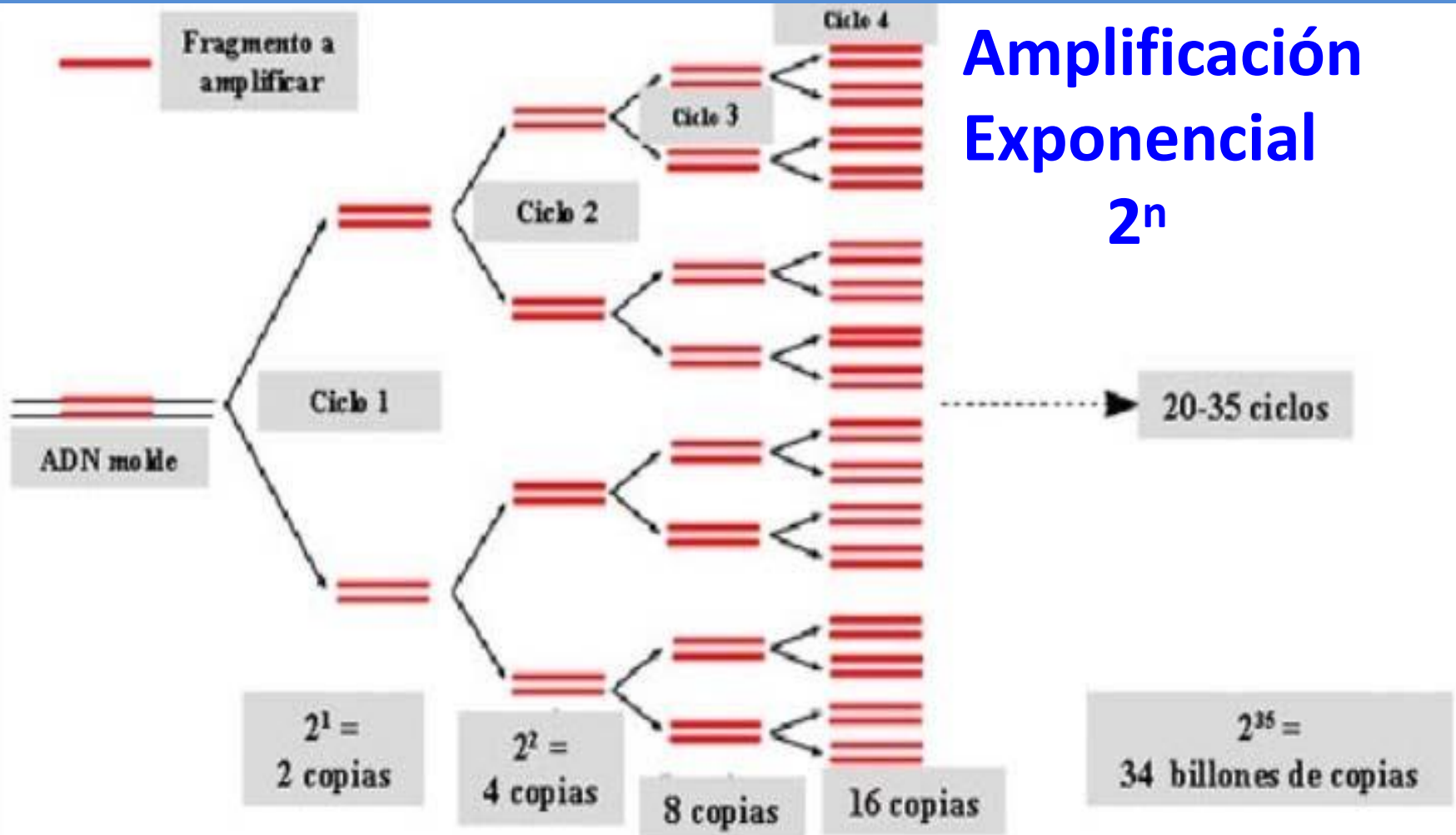
3' TTAACGGGGCCCTTTAAA.....TTTAAACCCGGGTTT 5'
5' AATTGCCCCGGGAAATTT.....AAATTTGGGCCCCAAA 3'



3' TTAACGGGGCCCTTTAAA.....TTTAAACCCGGGTTT 5'
5' AATTGCCCCGGGAAATTT 3'.....>

+

<..... 3' TTTAAACCCGGGTTT 5'
5' AATTGCCCCGGGAAATTT.....AAATTTGGGCCCCAAA 3'



Adaptado de Andy Vierstraete, 2001

Example of Protocol:

Mix and spin down the solutions prior to use

	Volume	Final Concentration 1X
<i>Taq</i> DNA Polymerase (5U/ μ l)	0.125 μ l	0.625 U
10X Reaction Buffer IV	2.5 μ l	1X
→ dNTP Mix (20mM)	1 μ l	0.2 mM of each nucleotide
→ MgCl ₂ (25mM)	1.5 μ l*	1.5 mM*
→ Primer forward (10 μ M each)	1.25 μ l*	0.5 μ M*
→ Primer reverse (10 μ M each)	1.25 μ l*	0.5 μ M*
→ Water (PCR Grade)	Variable	
→ DNA Template	0.5 – 10 μ l	0.5 – 125 ng
Total volume	25 μl	

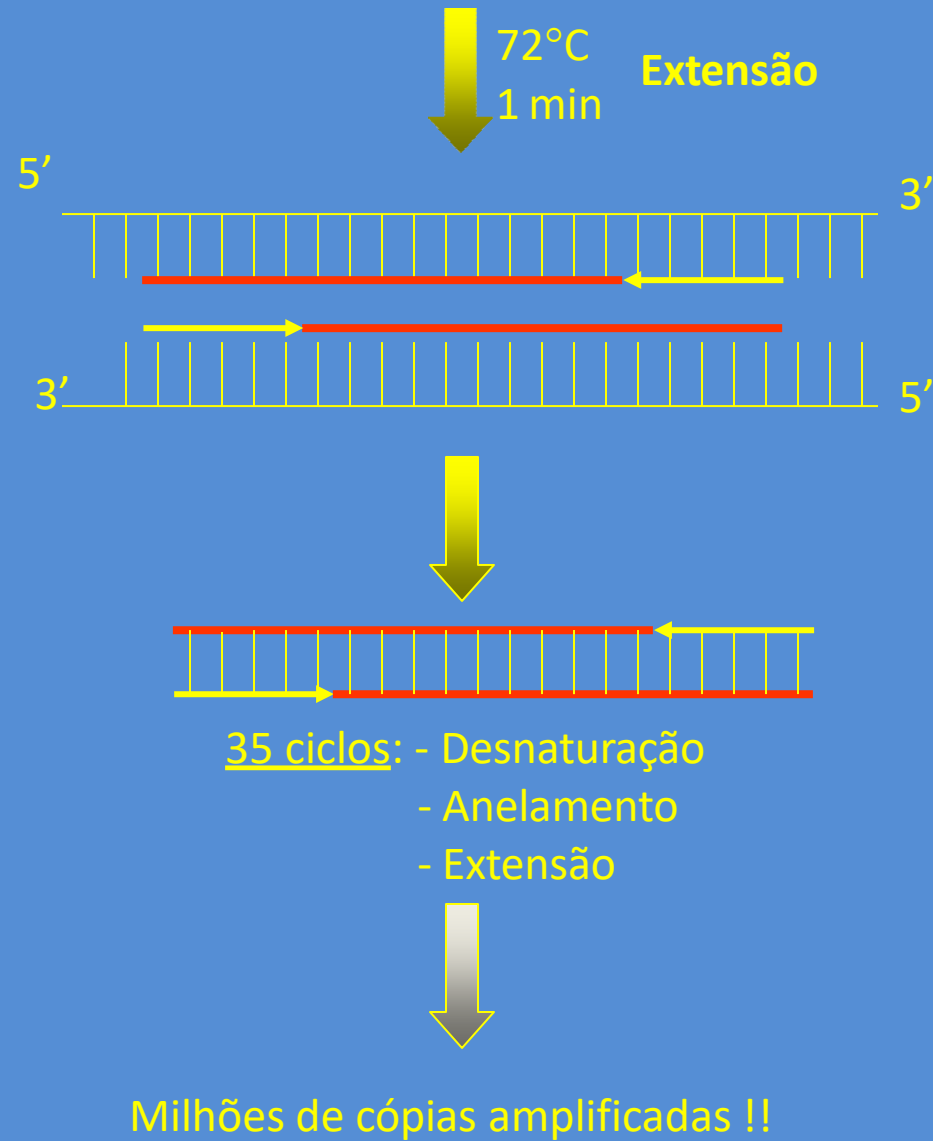
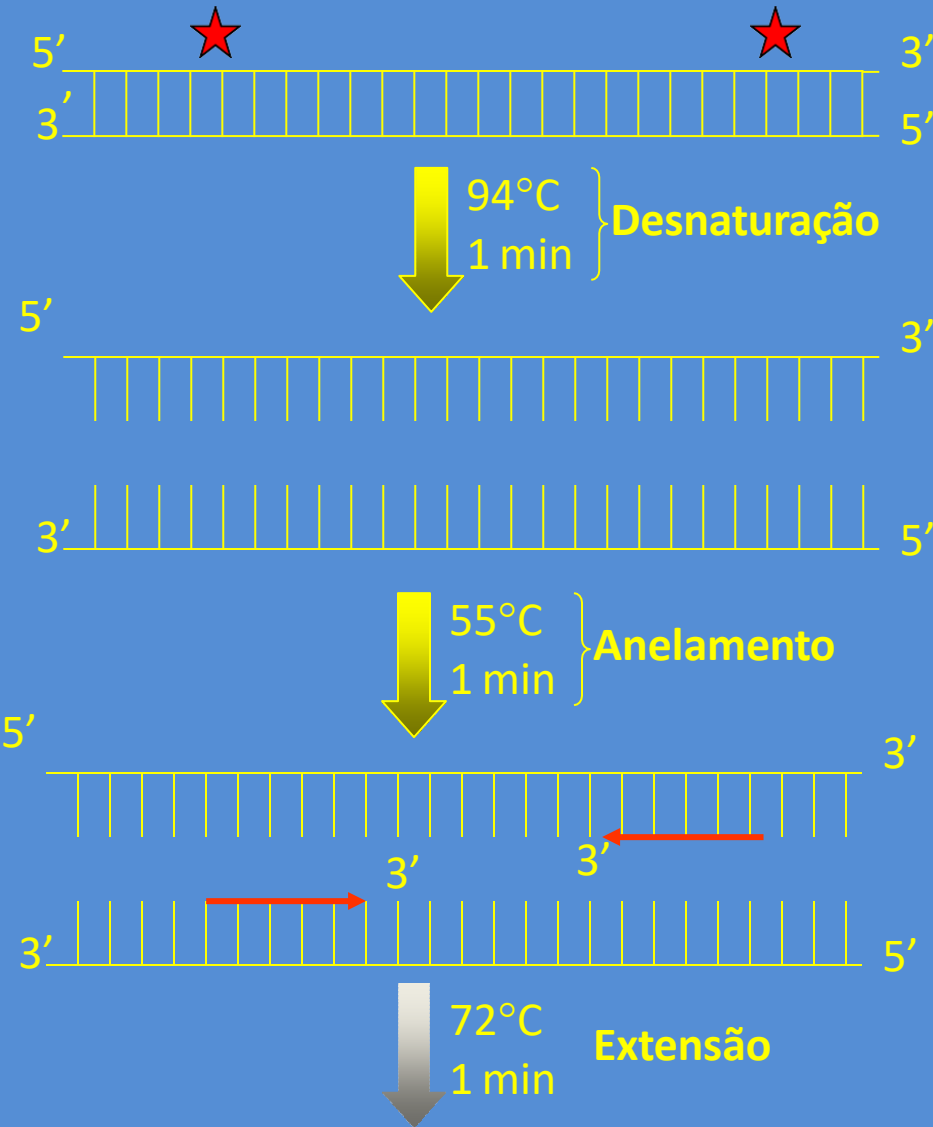
*Scale up or down the volume and concentration as appropriate
MgCl₂ concentration is usually between 1.5 and 4.0mM

Example of Program:

	Temp.	Time	Number of cycle
Initial Denaturation	94°C	2 min	1 cycle
Denaturation	94°C	20 sec	30 to 40 cycles
Annealing	50-65°C	30 sec	
Extension**	72°C	60 sec	
Final Extension	72°C	5 min	1 cycle

**Increase length of time in proportion to size of amplicon, *Taq* DNA Polymerase extends at approximately 1000 bp/min.

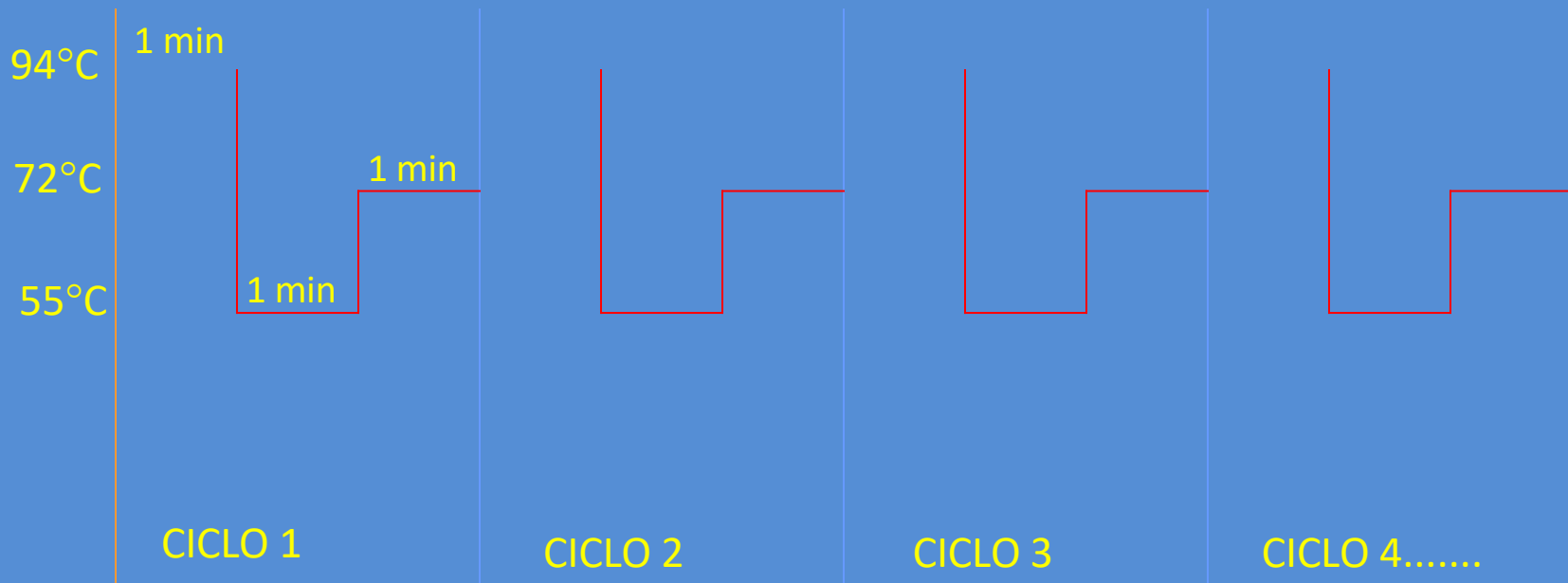
Tecnologia do PCR



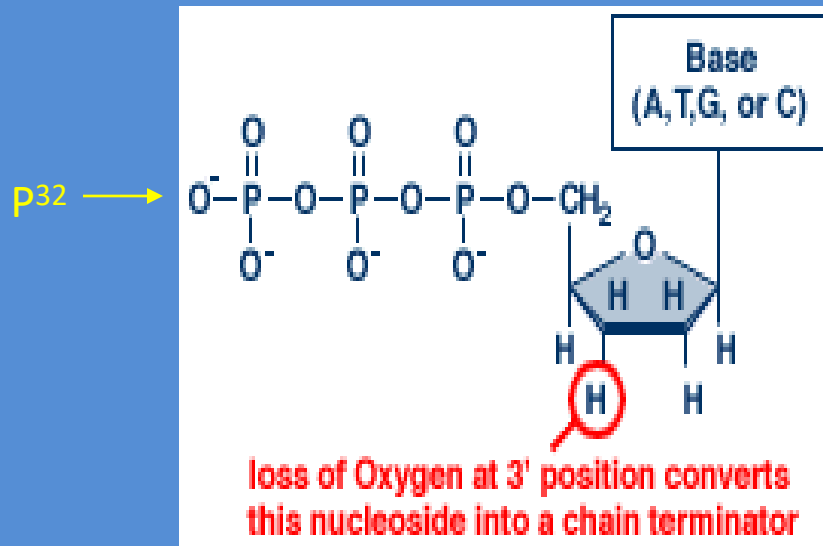
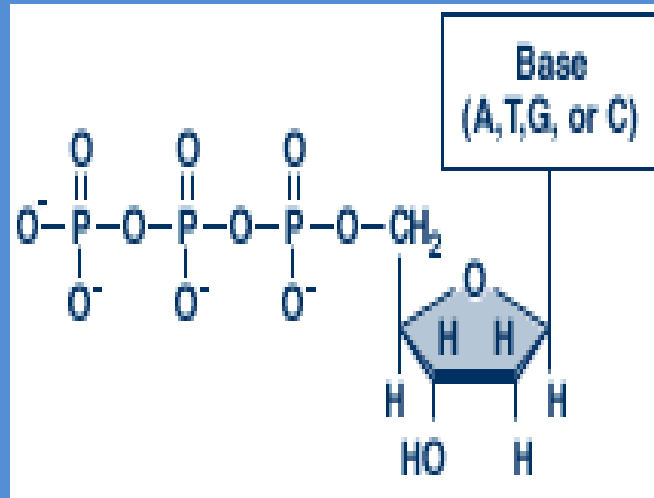
Tecnologia do PCR

- Passos:**
- 94°C, 1 min = desnaturação = rompimento das pontes de H entre as duas fitas de DNA
 - 55°C, 1 min = anelamento = os primers de hibridam em suas posições específicas
 - 72°C, 1 min = extensão = a DNA polimerase sintetiza novas fitas de DNA

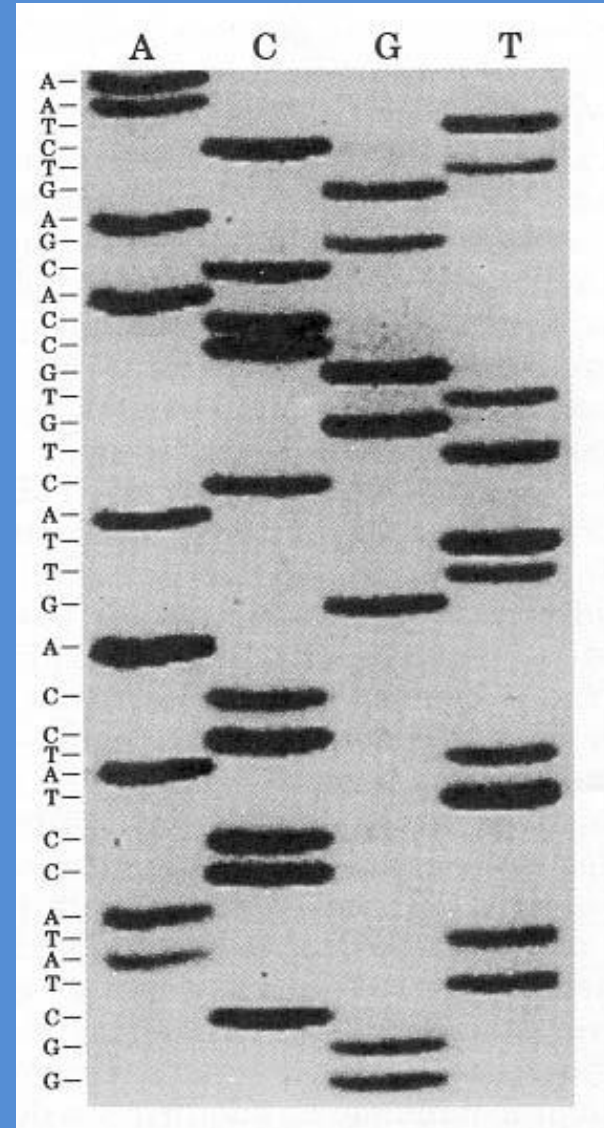
Ciclos:

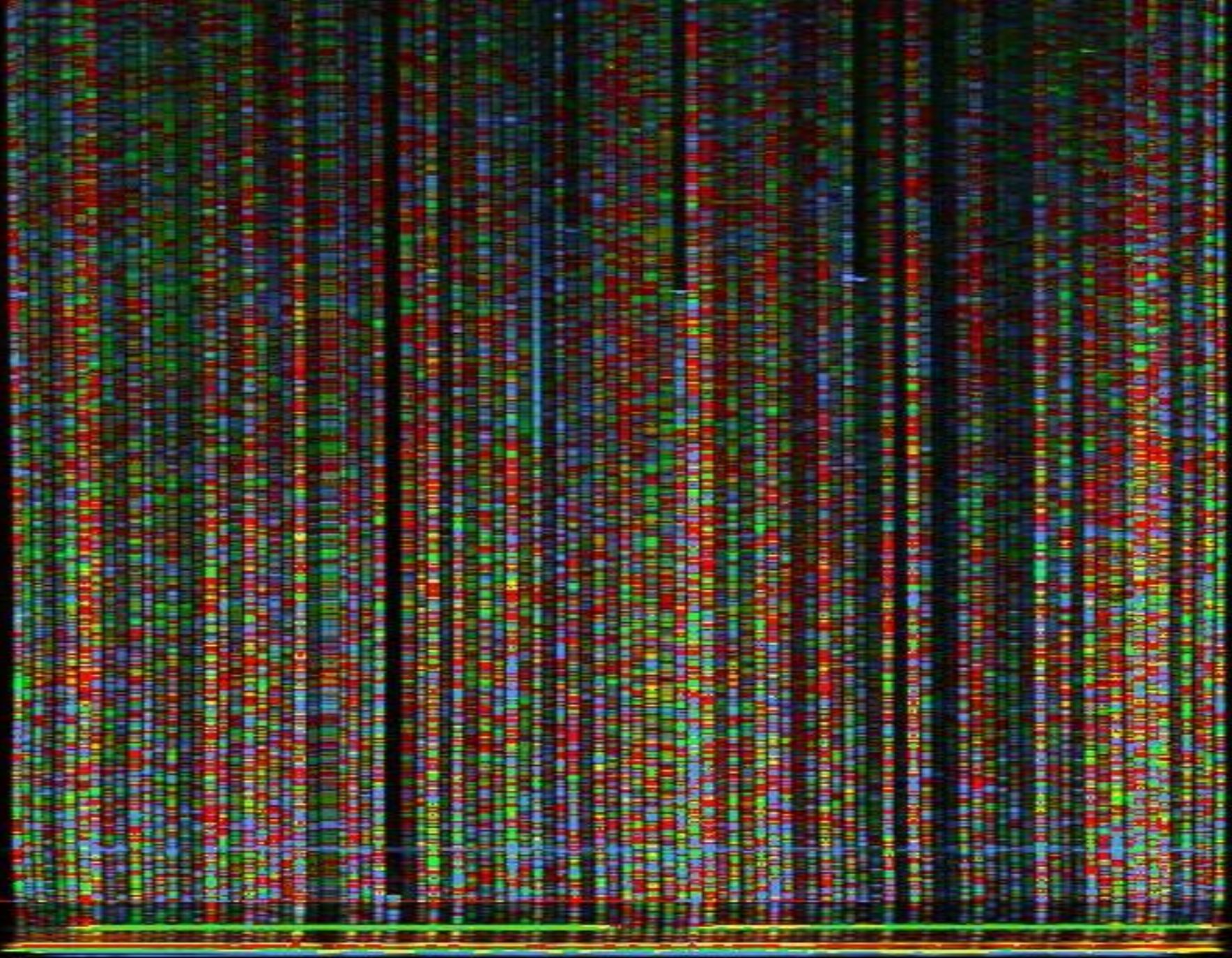


Seqüenciamento de DNA



Fluoroforo







National Center for Biotechnology Information

National Library of Medicine

National Institutes of Health

PubMed

All Databases

BLAST

OMIM

Books

TaxBrowser

Structure



results of BLAST

BLASTX 2.1.3 [Apr-11-2001]

Reference:

Altschul, Stephen F., Thomas L. Madden, Alejandro A. Schäffer, Jinghui Zhang, Zheng Zhang, Webb Miller, and David J. Lipman (1997), "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs", *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402.

RID: 989884248-13757-21712

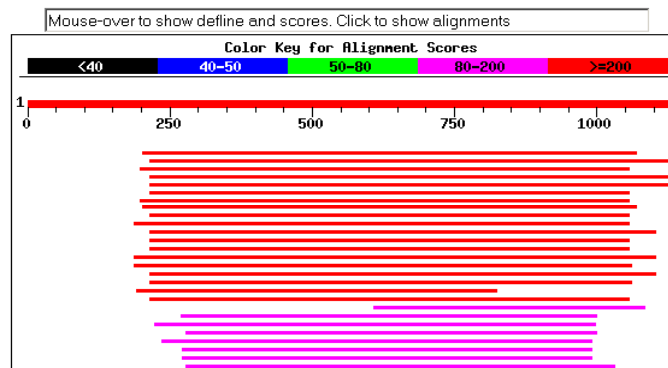
Query= TREST0857.fasta.screen.Contig1
(1142 letters)

Database: nr
687,743 sequences: 216,528,054 total letters

If you have any problems or questions with the results of this search please refer to the [BLAST FAQs](#)

[Taxonomy reports](#)

Distribution of 210 Blast Hits on the Query Sequence



Sequences producing significant alignments:	Score (bits)	E Value
gi 5763968 emb CAB53336.1 (AJ249117) methylcitrate synthas...	446	e-124
gi 10800928 emb CAC12961.1 (AJ296102) mitochondrial citrat...	352	4e-96
gi 7267133 emb CAB77625.1 (AJ243204) citrate synthase [Asp...	349	5e-95
gi 11268307 pir IT49379 citrate synthase, mitochondrial [im...	349	5e-95
gi 1705871 sp P51044 CISY_ASPNG CITRATE SYNTHASE, MITOCHOND...	346	3e-94
gi 461744 sp P34085 CISY_NEUCR CITRATE SYNTHASE, MITOCHONDR...	346	3e-94
gi 2493725 sp O00098 CISY_EMENI CITRATE SYNTHASE, MITOCHOND...	346	4e-94

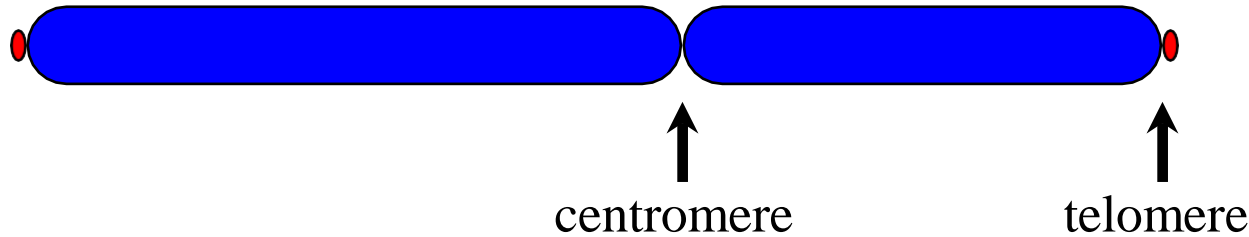
>TREST0554 (Contig)-Glycogen Synthase 5'3' Frame 1

gacgaggtcaaccagctgtgtcaattcatgttttgattactgtggcaagagccggcgtcaa
D E V N Q L C Q F M F D Y C G K S R R Q
cgtatcaaccagagaaaccgtactgagcgcactcagcgcacctgcttgactggaagcgcacg
R I N Q R N R T E R L S D L L D W K R M
ggatggagtatatcaaggcccgcagctcgccctccgacgagcataccccaactcgttc
G M E Y I K A R Q L A L R R A Y P N S F
cacggagacgaggaagaagaggagctggaggactttatccgtgggcccggagcagaagatc
H G D E E E E E L E D F I R G P E Q K I
tccaggccattctccgtccctggttcgcctcgcgatcggactggcatgatgacccttggga
S R P F S V P G S P R D R T G M M T P G
gactttgccagcttgcaggaagggcgagaaggcttgagcacggaggattacgttgcctgg
D F A S L Q E G R E G L S T E D Y V A W
aagctgcctgaggaggaggacccccgaggagtatcccttctcgttgacccttcggacaaag
K L P E E E D P E E Y P F S L T L R T K
cagccccggccctgtgagcccagagactcaggccactctcaacggtaactaaaagaactta
Q P G P V S P E T Q A T L N G N - K N L
gcaaataaggcggtttttttctcaaggtagcatccatttgcggtccacagccagcattgcg
A N Q G V F F S R - H P F A S T A S I A
tcggatcggggacgttgtacgtgtgatttctcgttcgtgtcgaatctatgatatatggtt
S D R G R C T C D F S F V S N L - Y M V
tttgtctcttccaggactgcgtccgaggtgccatgggagtagcaggttgggtaaagggtgg
F V S S R T A S E V P W E - Q V G - R W
gacaggagaaggaaaccaggcggaaaagaaaaggcgcgggttatt
D R R R K P G G K E K A R V I

Telomeres and aging

Telomeres are protective “caps” on chromosome ends consisting of short 5-8 bp tandemly repeated GC-rich DNA sequences, that prevent chromosomes from fusing and causing karyotypic rearrangements.

Metaphase chromosome



telomere structure

← <1 to >12 kb →

(TTAGGG)_{many}

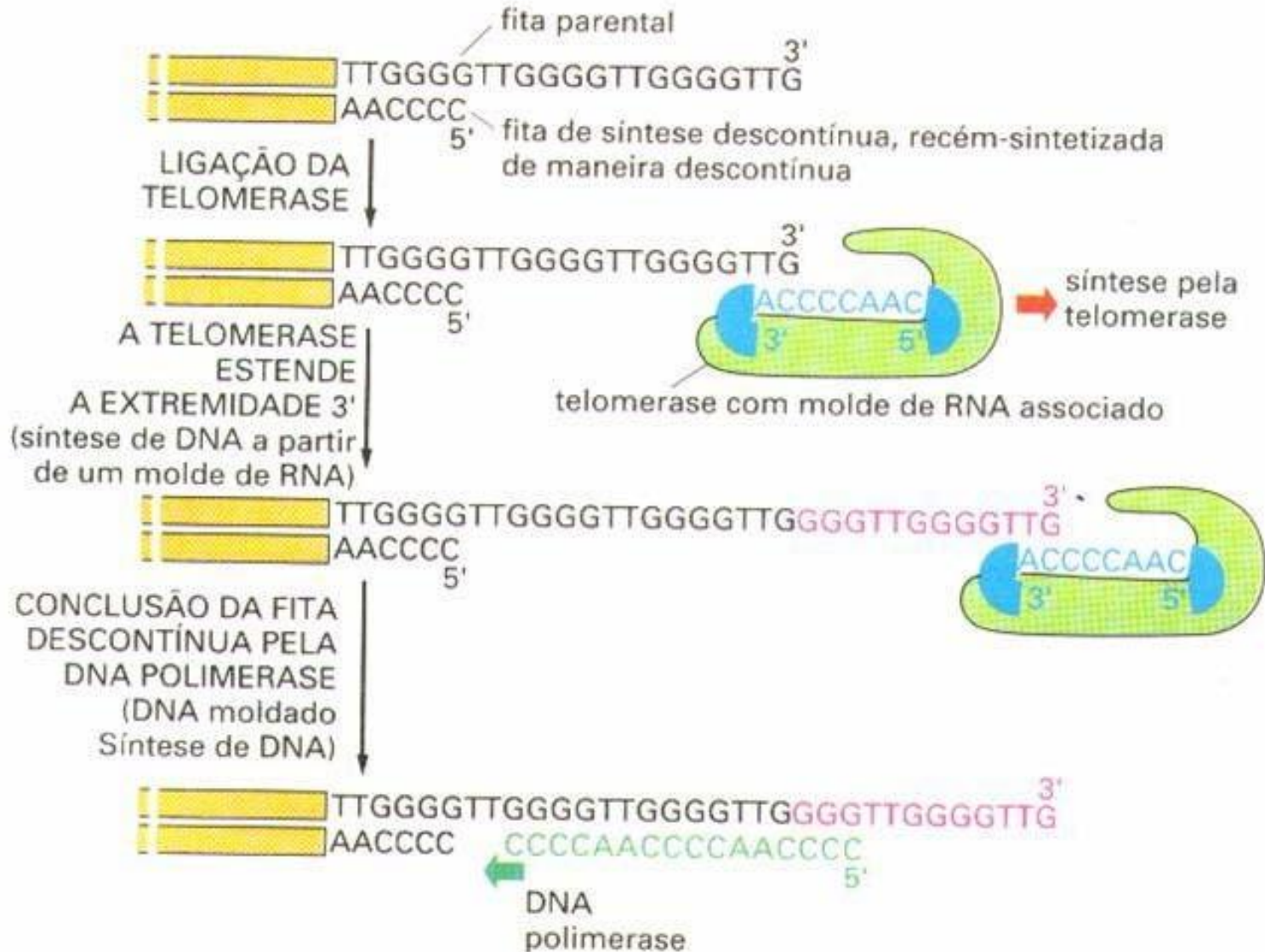
young

(TTAGGG)_{few}

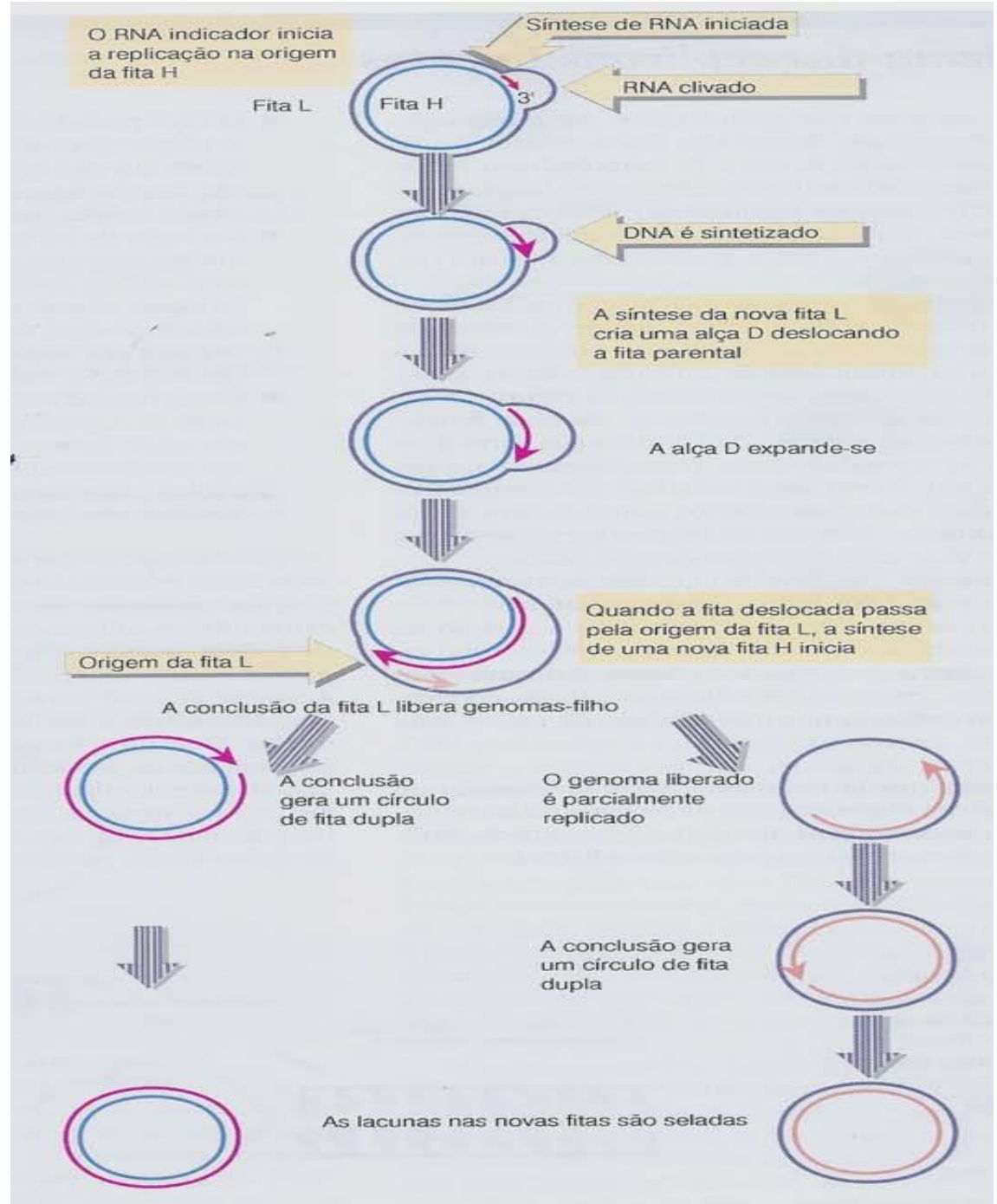
senescent

- telomerase (an enzyme) is required to maintain telomere length in germline cells
- most differentiated somatic cells have decreased levels of telomerase and therefore their chromosomes shorten with each cell division

Telômeros e Telomerase



Replicação do DNA mitocondrial



Mutação

Alteração do material genético do indivíduo

Gênicas

Afetam a sequência dos nucleotídeos de genes individuais

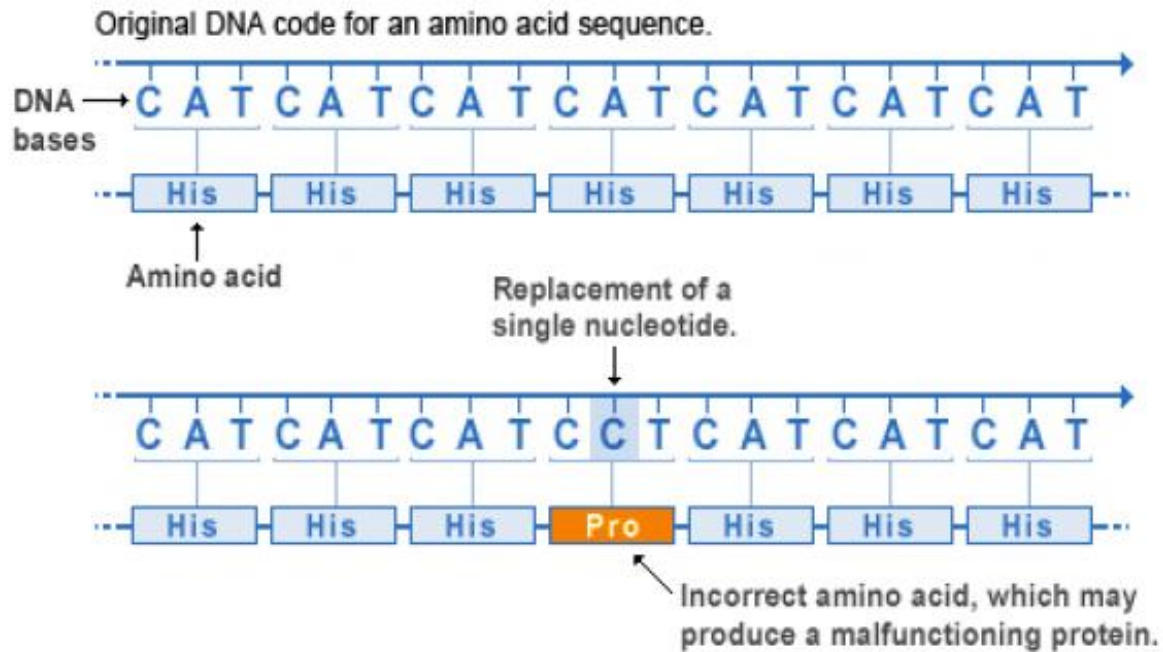
Origem:

- Erros na replicação
- Lesões no DNA
- Erros durante o reparo de lesões

Mutações pontuais

1. Mutação de sentido errado: Muda um único aminoácido no polipeptídeo codificado

Missense mutation

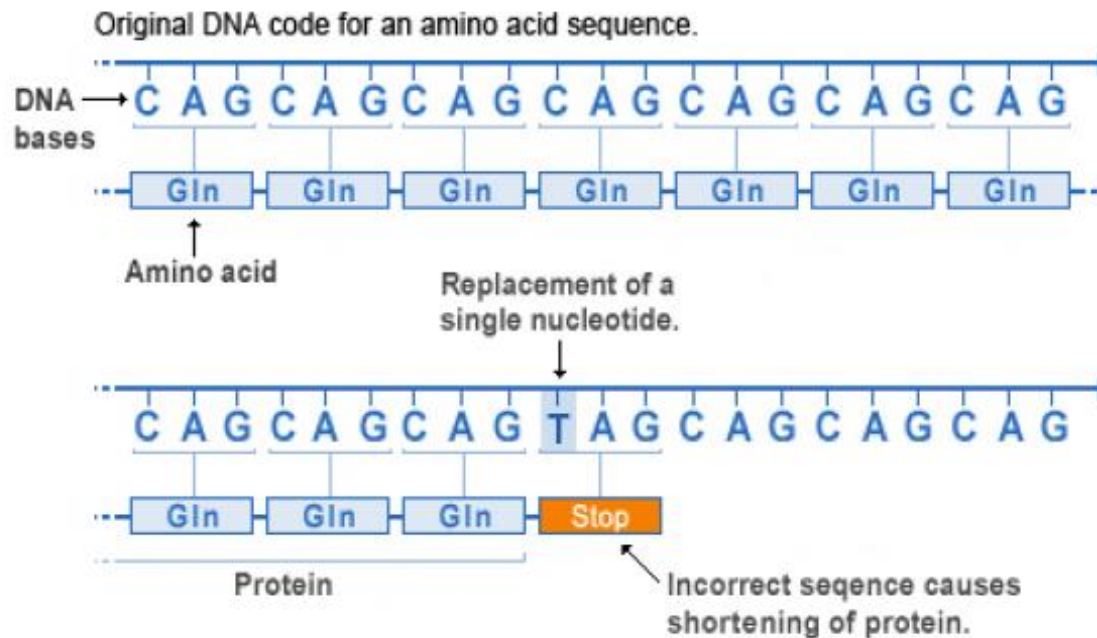


U.S. National Library of Medicine

In this example, the nucleotide adenine is replaced by cytosine in the genetic code, introducing an incorrect amino acid into the protein sequence.

2. Mutação sem sentido: Altera um códon de um aminoácido para um códon de terminação (stop) terminado a síntese do polipeptídeo codificado

Nonsense mutation

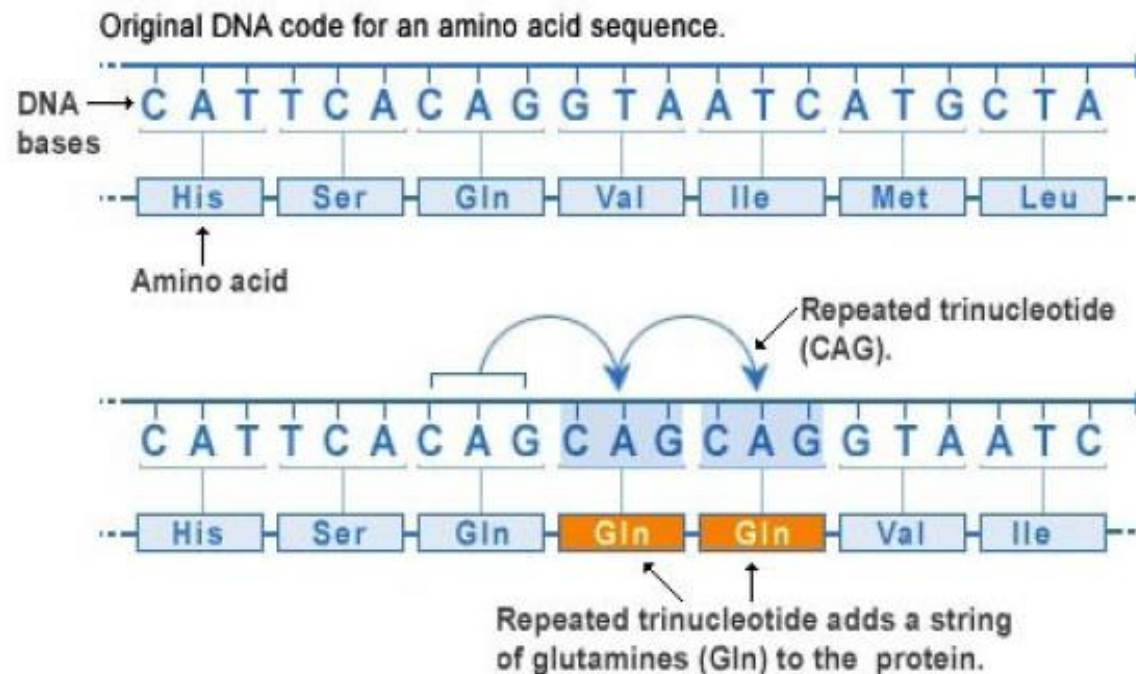


U.S. National Library of Medicine

In this example, the nucleotide cytosine is replaced by thymine in the DNA code, signaling the cell to shorten the protein.

3. Expansão de Tripletes: Adiciona longas extensões de um único aminoácido ao polipeptídeo codificado ou destruir a regulação do gene.

Repeat expansion mutation



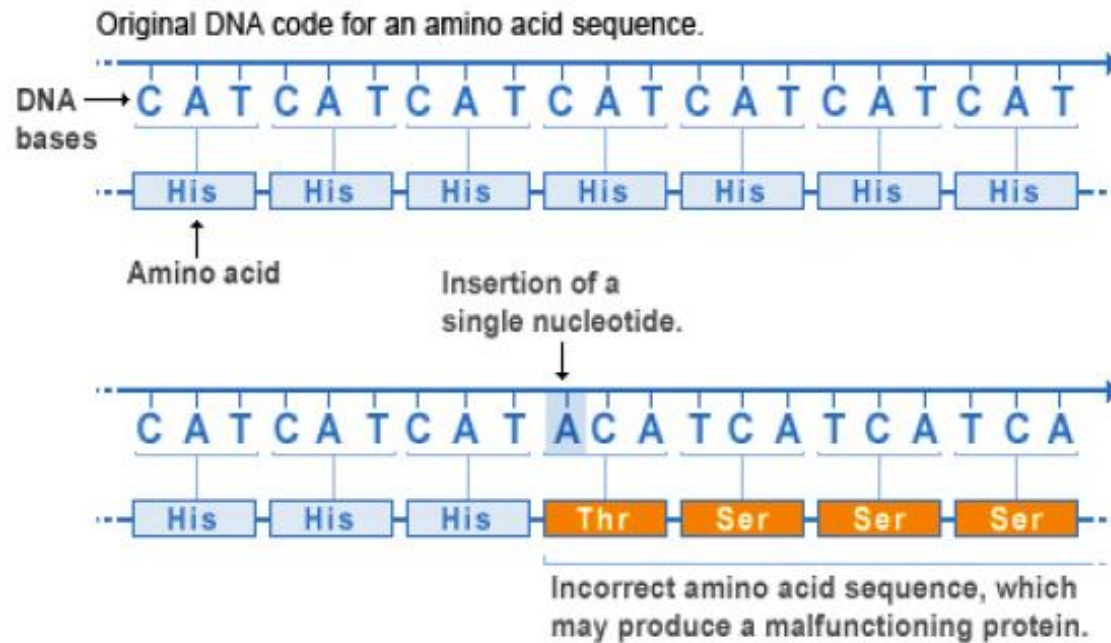
U.S. National Library of Medicine

In this example, a repeated trinucleotide sequence (CAG) adds a series of the amino acid glutamine to the resulting protein.

Inserções e remoções

4. **Inserção:** De um único nucleotídeo altera a estrutura de leitura de todos os códons depois do ponto de inserção que pode levar a formação de um códon de terminação

Insertion mutation

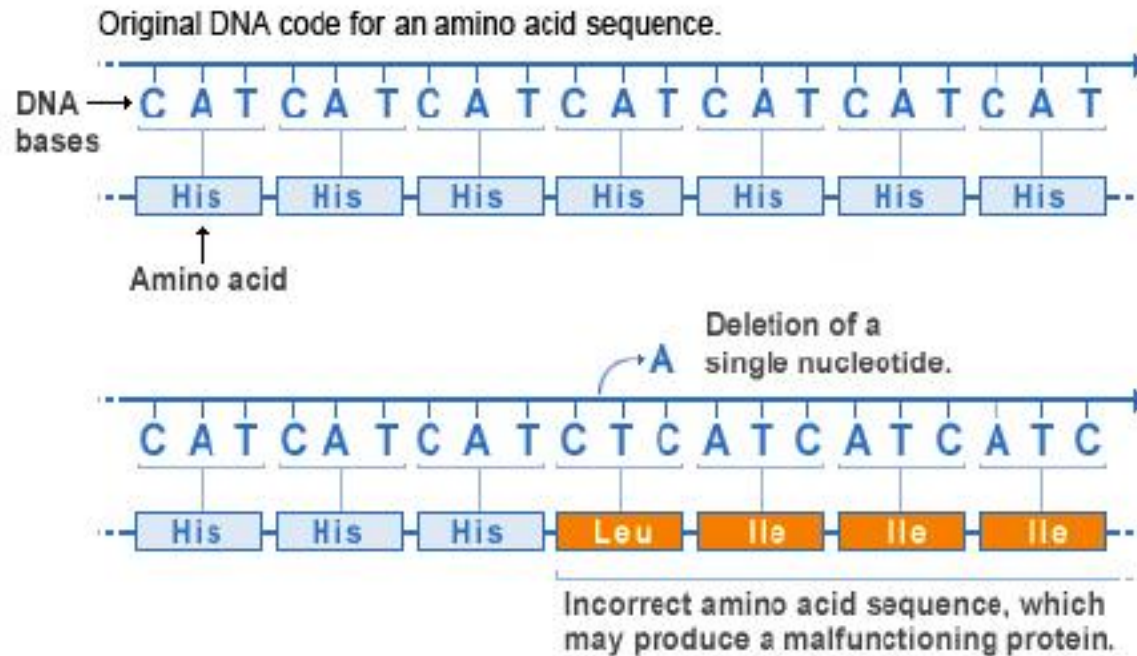


U.S. National Library of Medicine

In this example, one nucleotide (adenine) is added in the DNA code, changing the amino acid sequence that follows.

5. Deleção (remoção): De um único nucleotídeo muda a estrutura de leitura de todos os códons após o ponto de deleção o que pode levar a formação de um códon de terminação

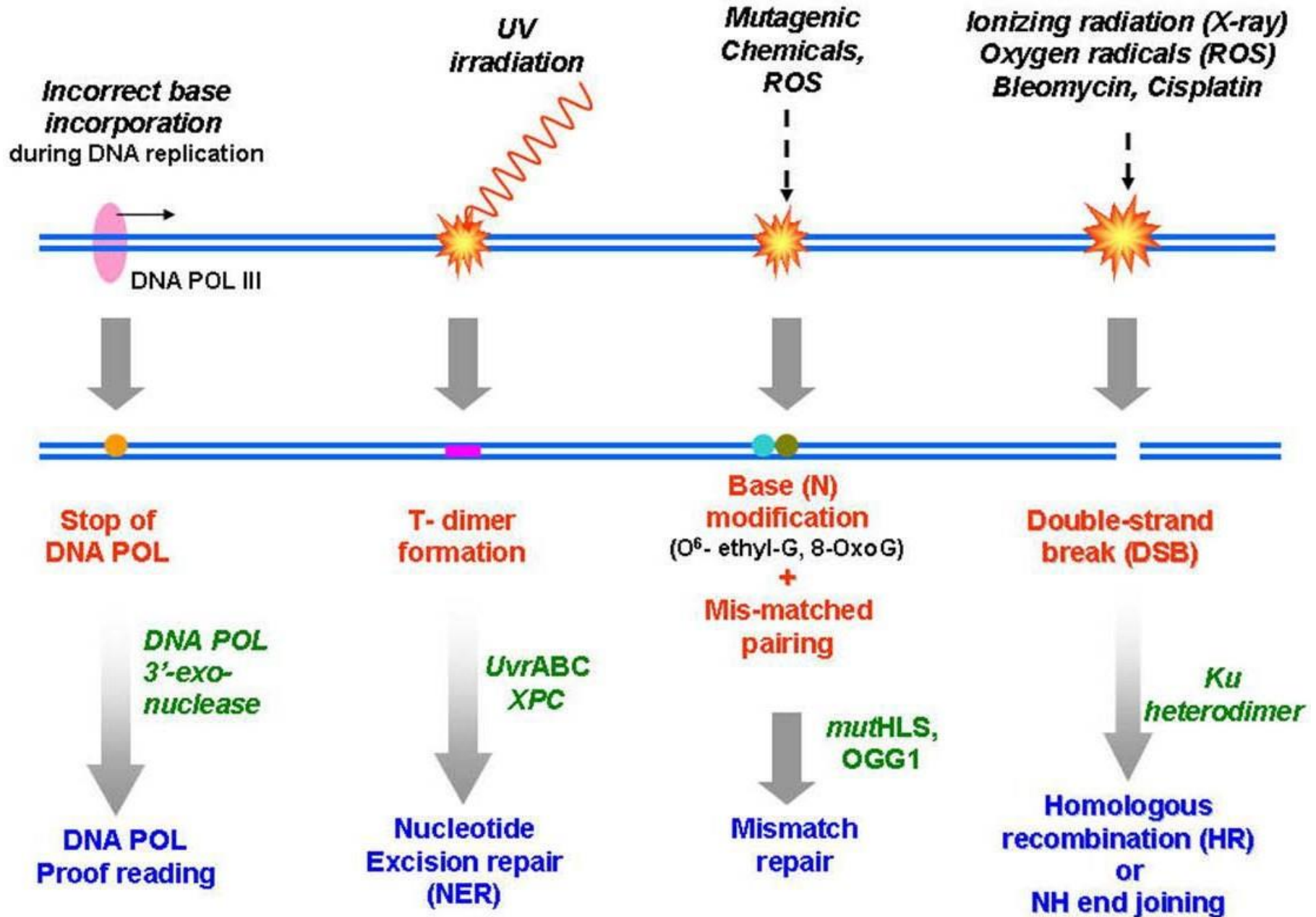
Deletion mutation



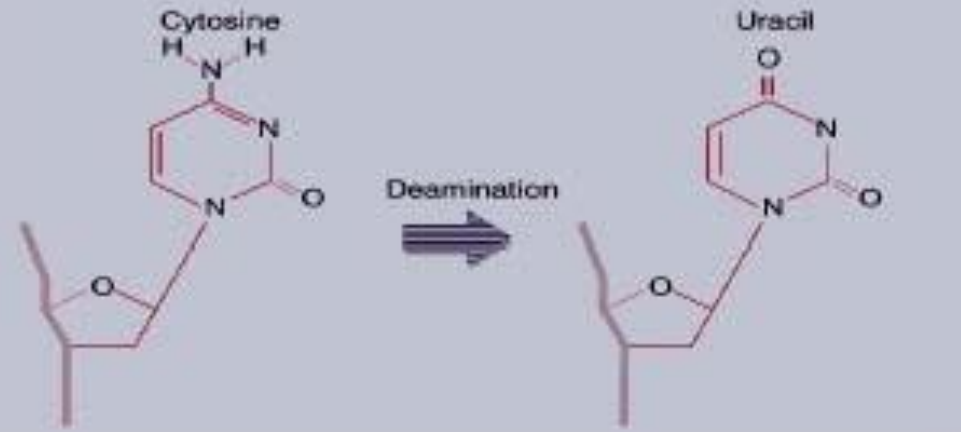
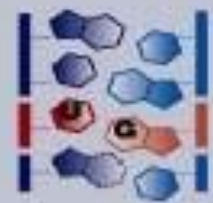
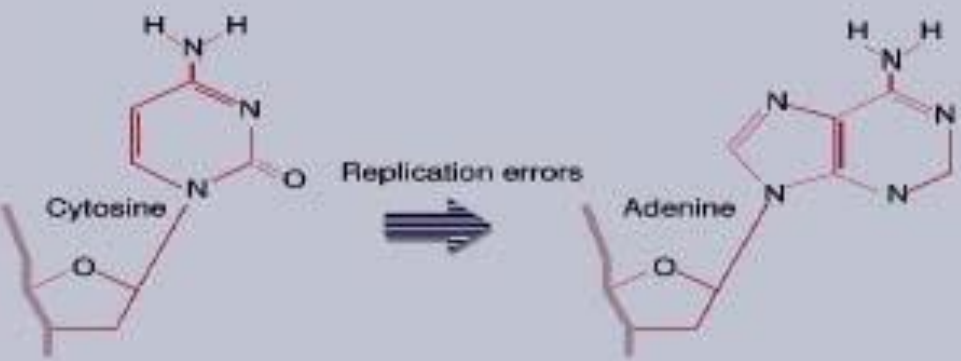
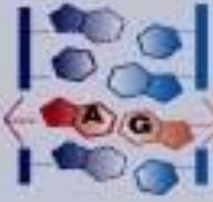
U.S. National Library of Medicine

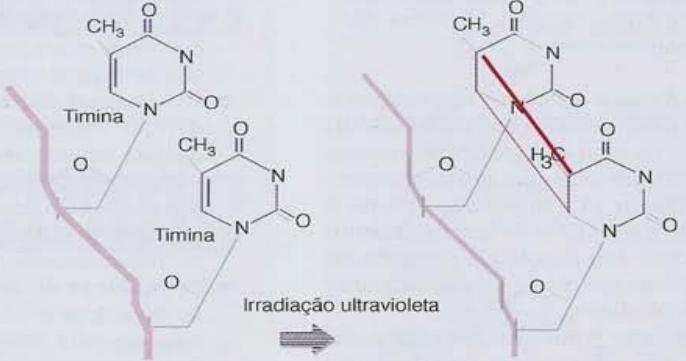
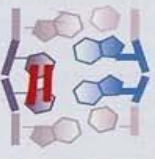
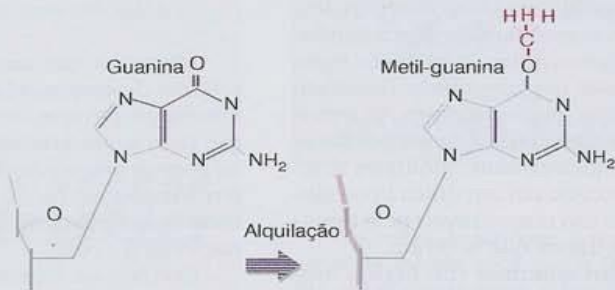
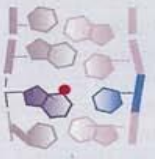

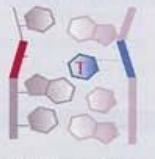
In this example, one nucleotide (adenine) is deleted from the DNA code, changing the amino acid sequence that follows.

Mecanismos de reparo corrigem danos no DNA



Mecanismos de reparo corrigem danos no DNA

Nature of mutation	Consequences
 <p>Cytosine</p> <p>Uracil</p> <p>Deamination</p>	<p>U-G replaces C-G</p>  <p>Corrected by removing U</p>
 <p>Cytosine</p> <p>Adenine</p> <p>Replication errors</p>	<p>Purine pair distorts duplex</p>  <p>Corrected by removing G</p>

Natureza da mutação	Conseqüências
 <p>Irradiação ultravioleta</p>	<p>O dímero de timinas distorce o dúplex</p>  <p>Corrigido por excisão</p>
 <p>Alquilação</p>	<p>O grupo metila distorce a hélice dupla</p>  <p>Corrigido pela desalquilação</p>
 <p>Depurinação</p>	<p>Ausência de uma purina</p>  <p>Corrigido por inserção</p>

Mecanismos de Reparo:

A) Reparo direto (ex: Fotoreativação de dímeros de pirimidinas pela fotoliase, enzima ativada por luz visível).

B) Reparo por excisão de bases

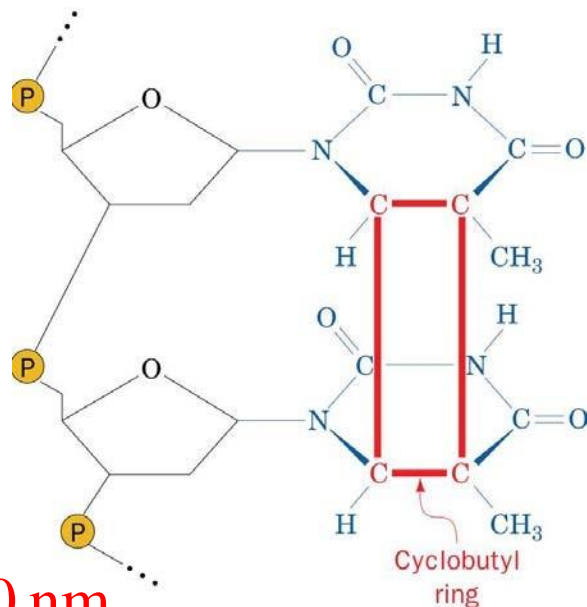
C) Reparo de bases pareadas incorretamente ou despareadas (mismatch repair/correção de erro)

D) Reparo por sistema de resgate.

Reparo Direto

● **Reparo por fotoreativação enzimática.**

Dímero de timina é desfeito pela fotoliase, enzima ativada por luz visível

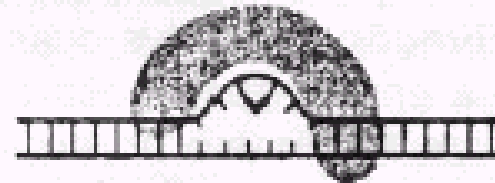


UV 200 – 300 nm

Distorção estrutural
(dímero de timina)



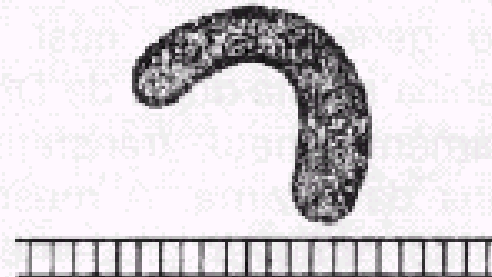
1. Complexo enzima-DNA



2. Fotorreativação



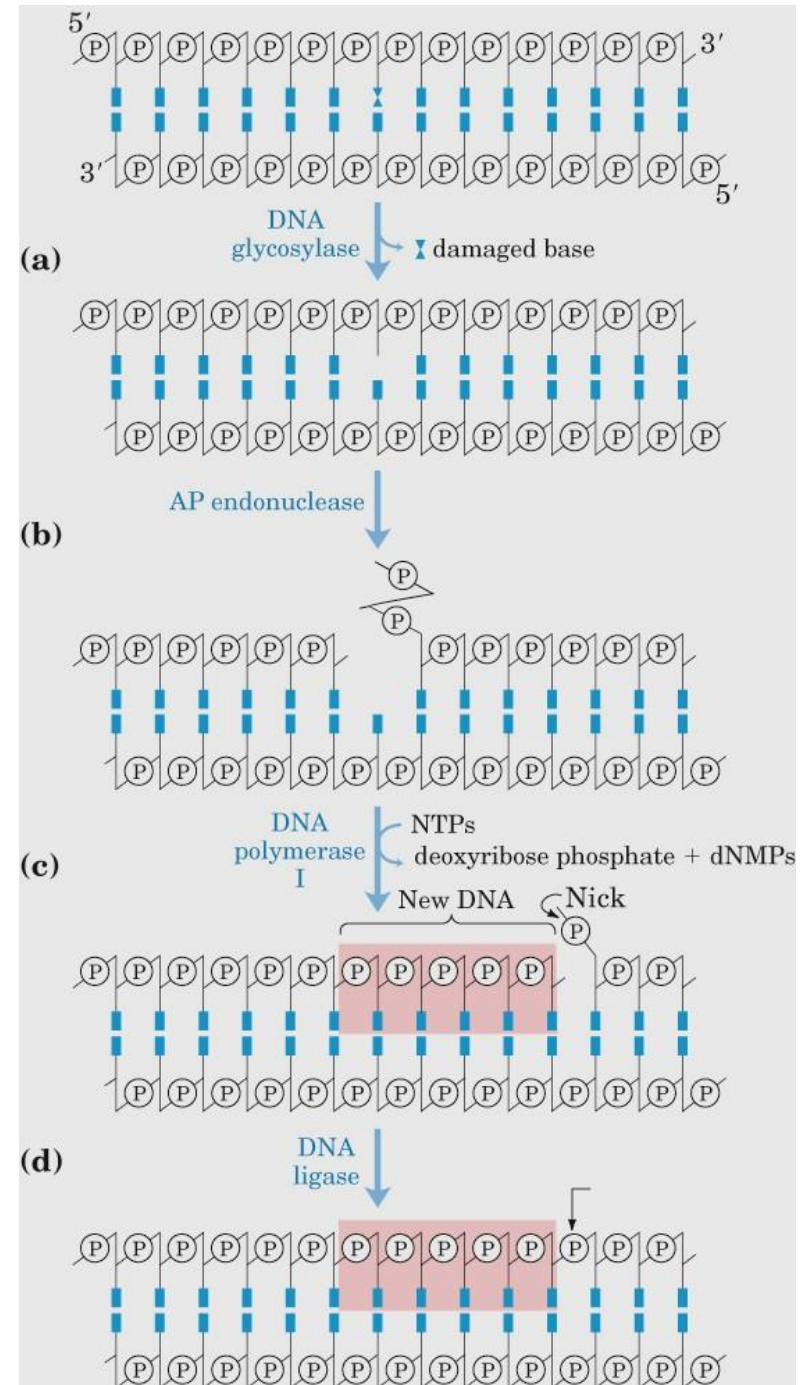
3. Liberação da enzima



Reparo por Excisão de Bases

Bases de DNA modificadas por reações fisiológicas normais ou agentes ambientais

- Desaminação espontânea
- Metilação não enzimática

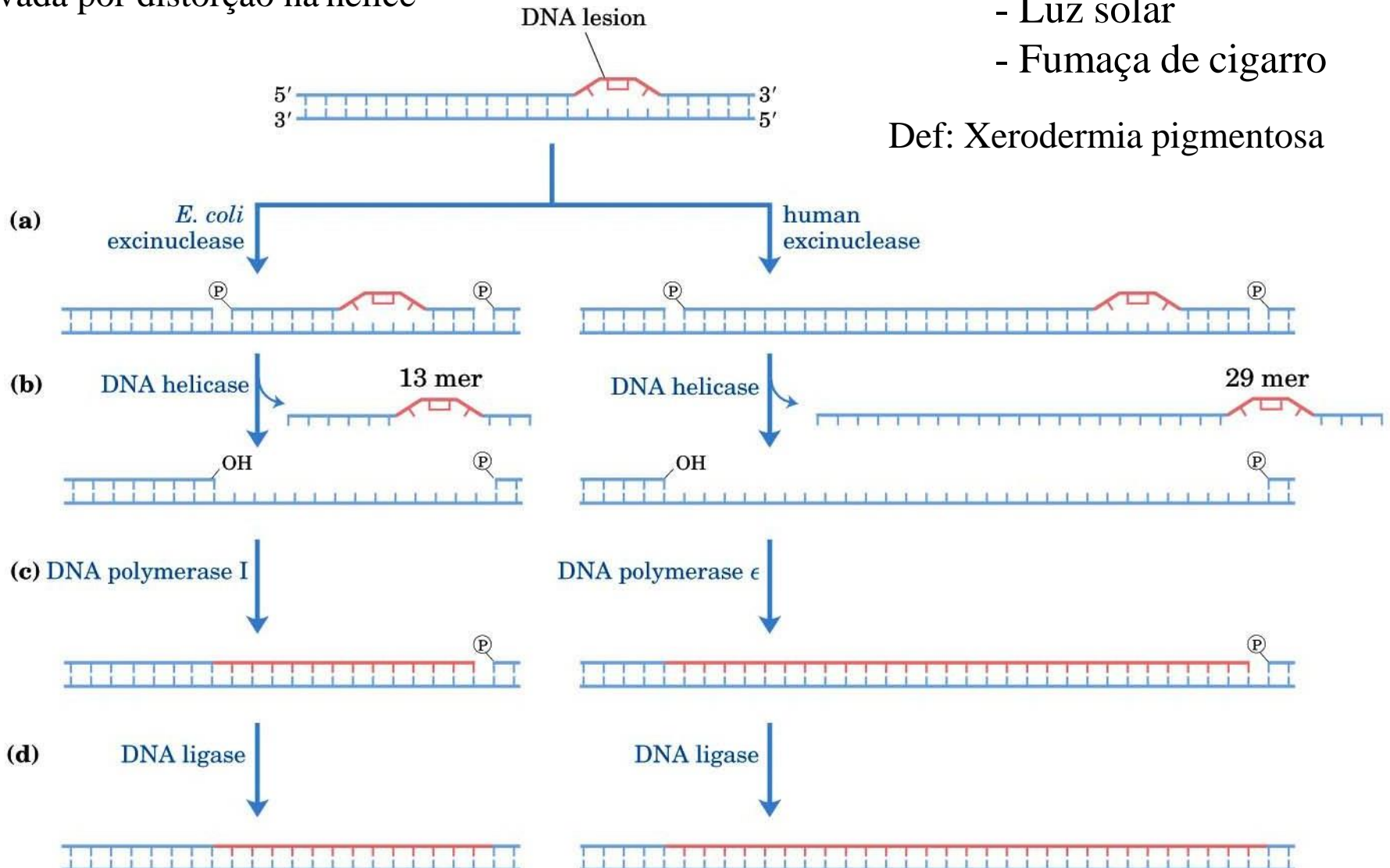


Reparo por excisão de nucleotídeos

Ativada por distorção na hélice

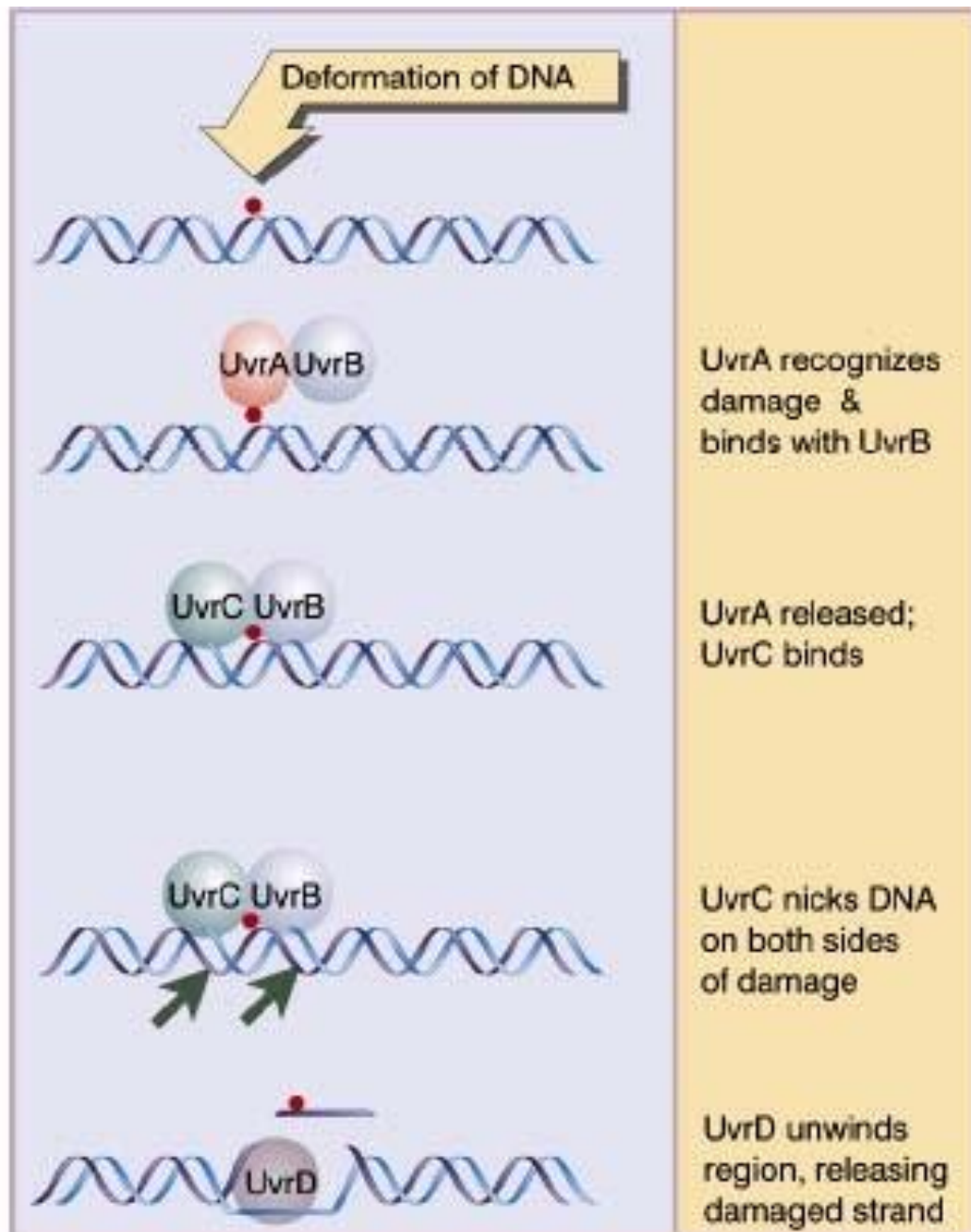
- Luz solar
- Fumaça de cigarro

Def: Xerodermia pigmentosa

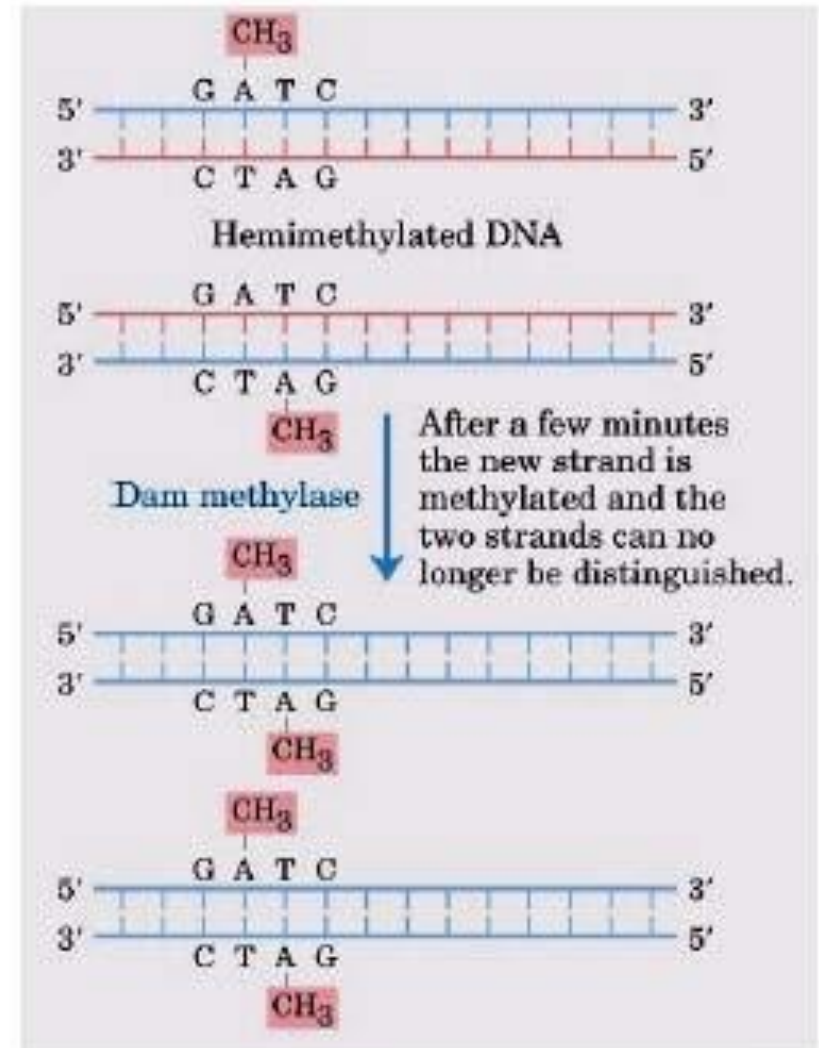
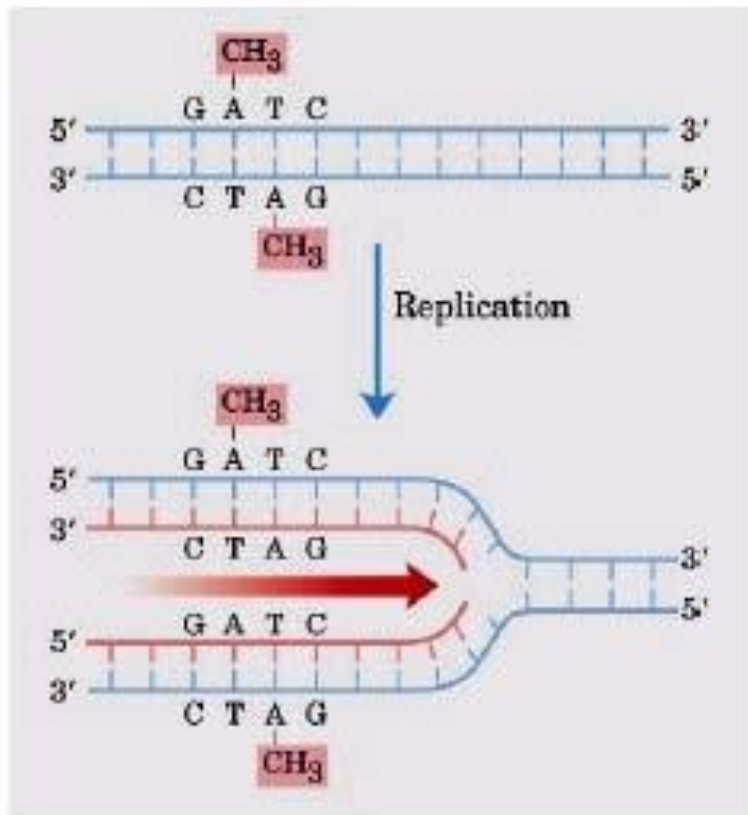


Sistema Uvr de *E. coli*

O complexo UvrA/UvrB é capaz de reconhecer distorções na estrutura do DNA provocadas por dímeros de pirimidinas, adutos químicos, etc.



Reparo de despareamento e Metilação

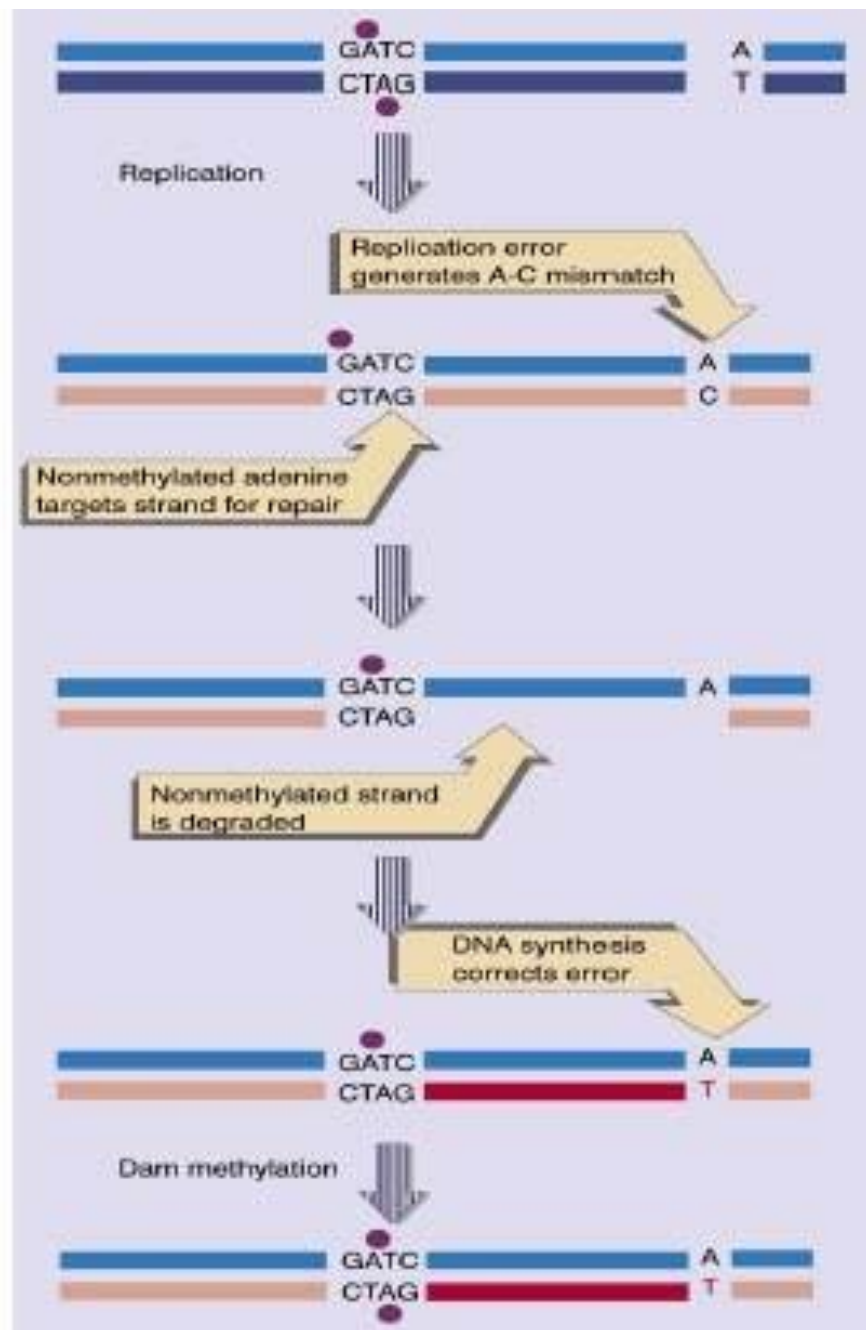


Metilação da adenina no sítio GATC identifica qual a fita é a parental

Reparo para correção de erro

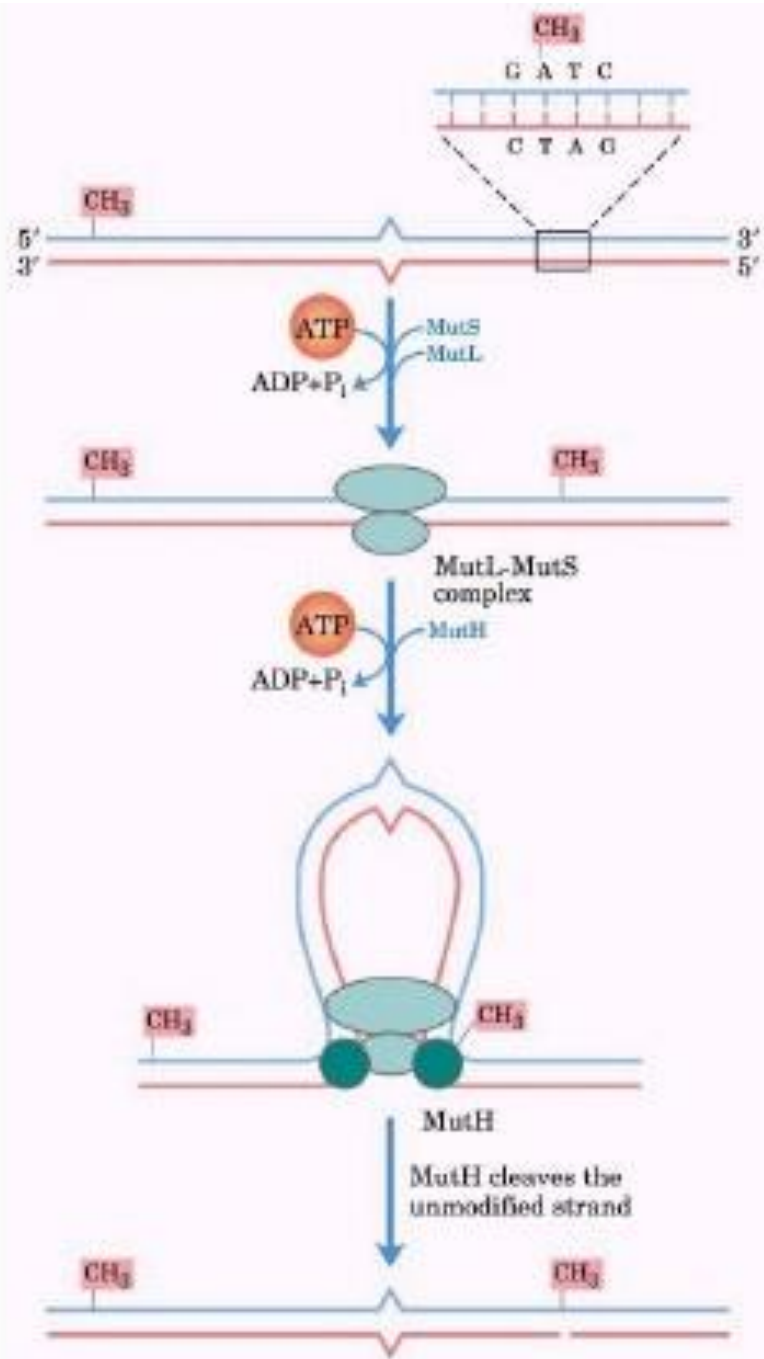
• Correção de erros que escapam da atividade revisora da DNA polimerase durante a replicação

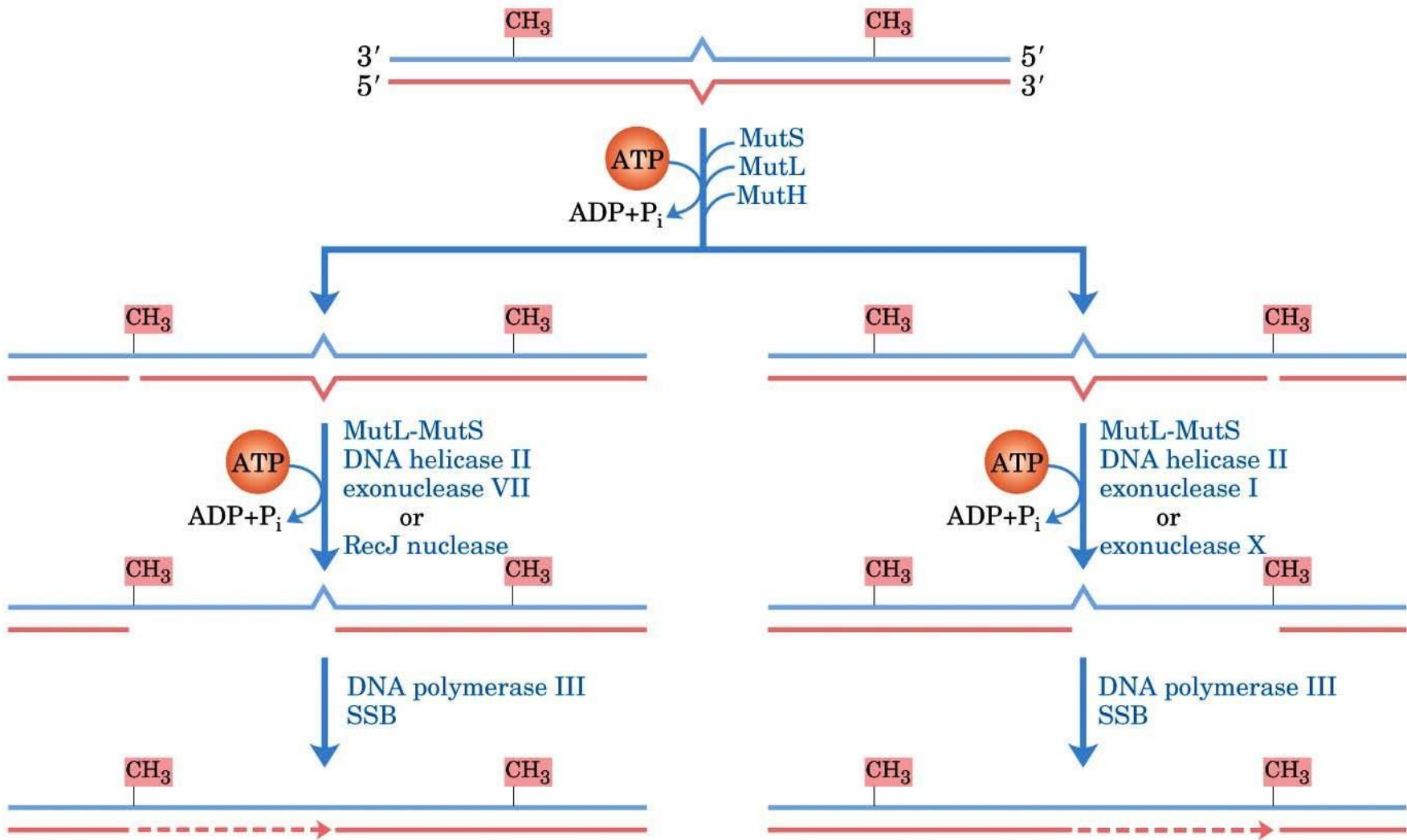
• Metilação garante que a fita a ser reparada seja a fita filha



Reparo para correção de erro

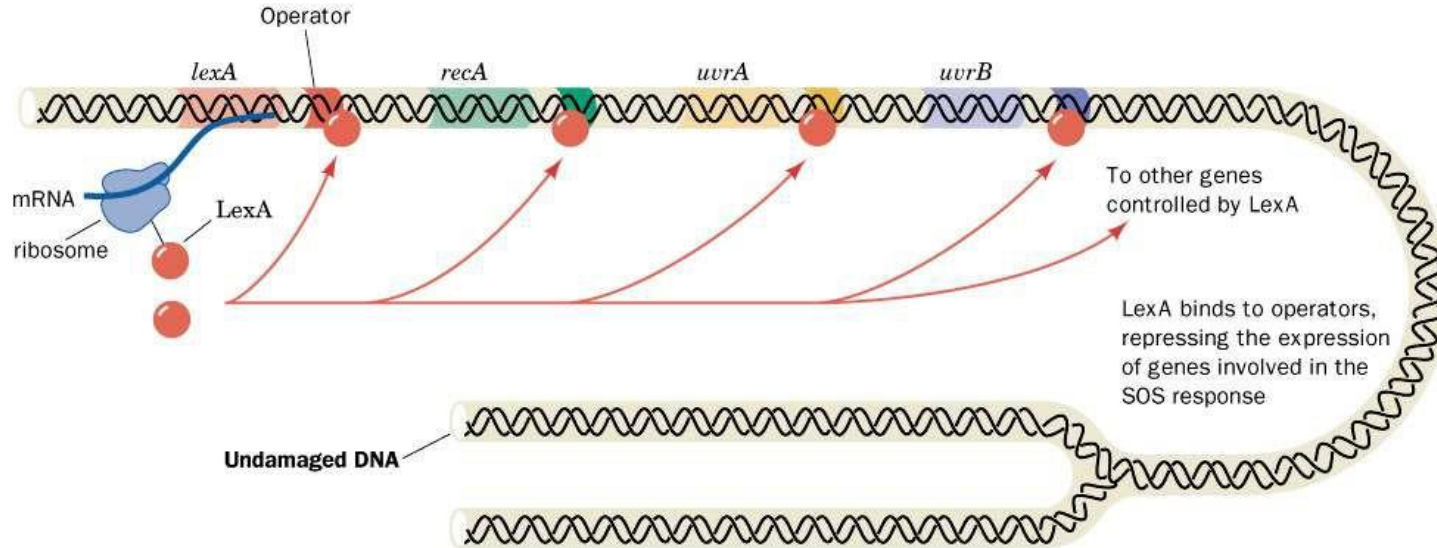
● Complexo de enzimas para correção de erros (mutS reconhece o pareamento incorreto, e transloca até o sítio GATC metilado. MutH cliva a fita não metilada e endonucleases degradam um trecho desta fita)



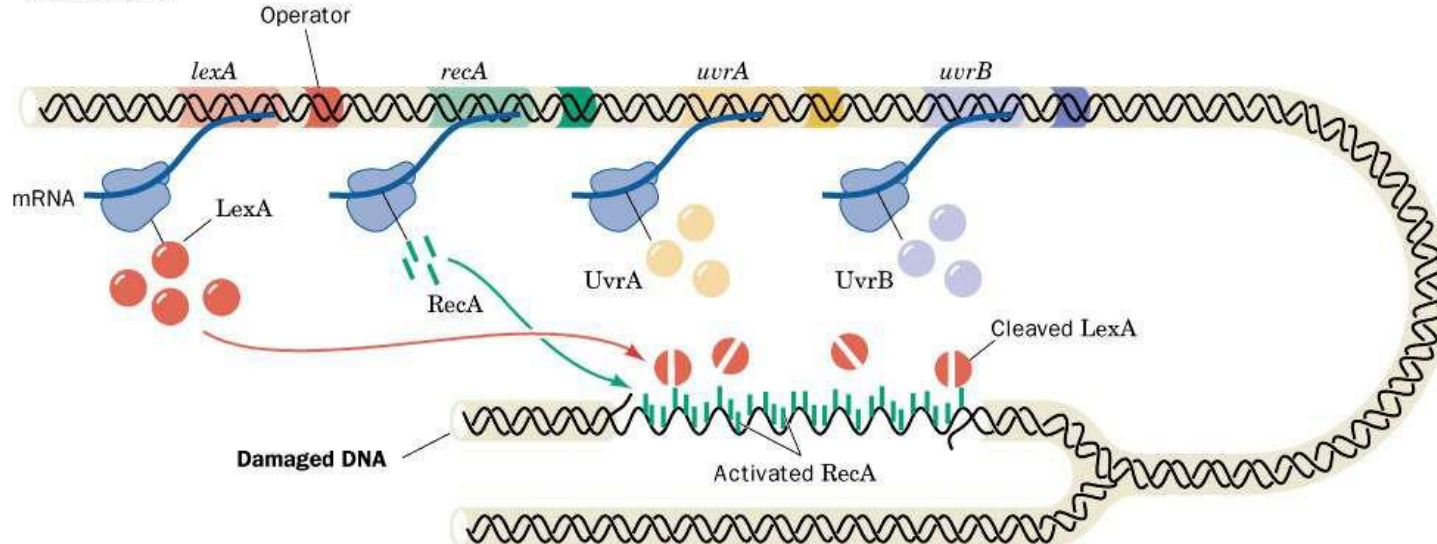


Sistema de resgate (SOS) em *E. coli*

Uninduced state

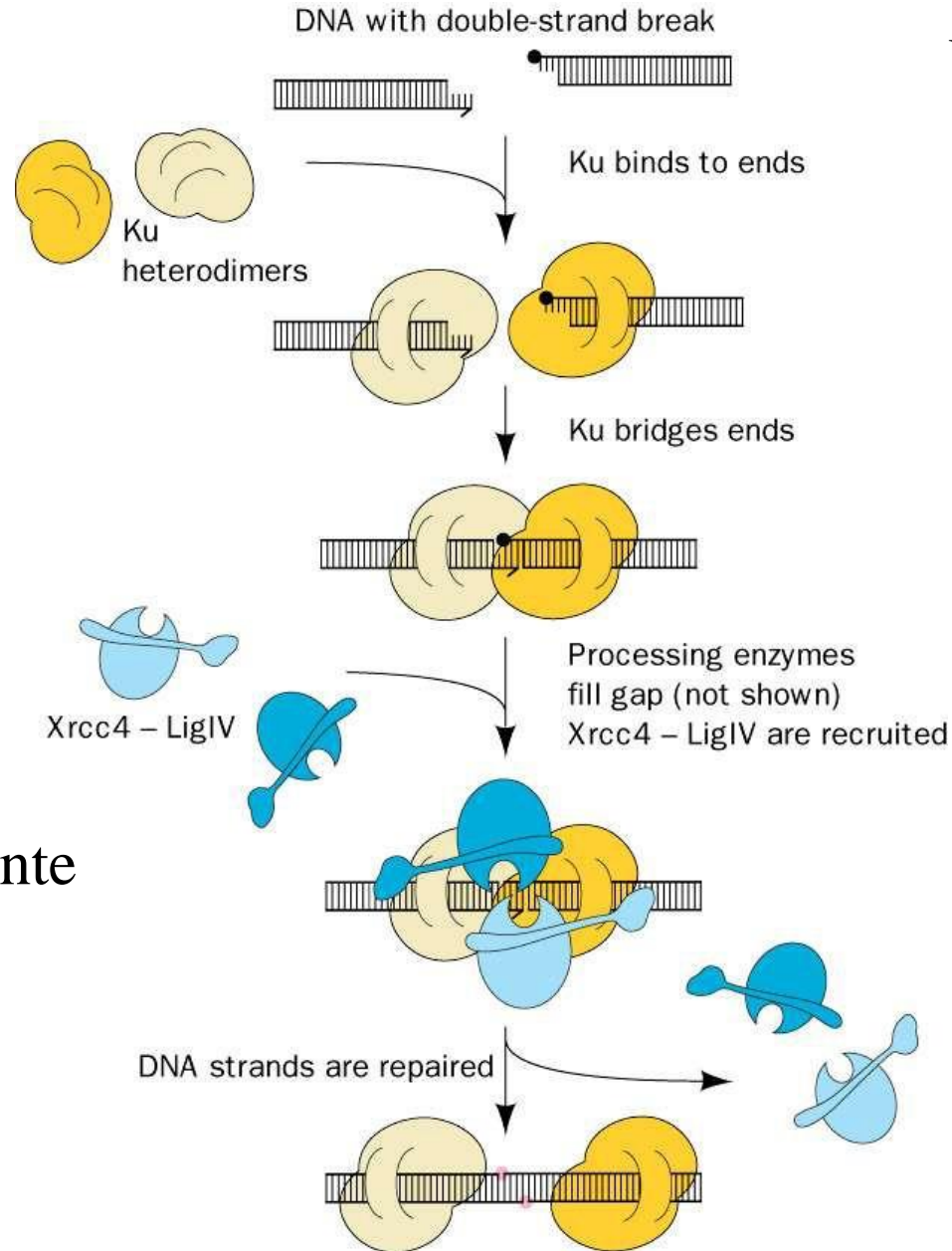


Induced state



Pol IV
Pol V

Reparo de quebras de Fita dupla



União de extremos
não-homólogos

- Radiação Ionizante
- Radicais livres