

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA SUPERIOR DE AGRICULTURA "LUIZ DE QUEIROZ"

LGN-809 GENÉTICA MOLECULAR

ANÁLISE DOS PROCESSOS DE QUEBRA, SÍNTESE E REPARO DO DNA DURANTE A
PRÓFASE MEIÓTICA EM *Lilium* spp.

RAFAEL MOYSES ALVES
FIRMINO J.N. FILHO
Professor Responsável: Flávio C.A. Tavares

EMBRAPA-CPAA
Biblioteca

PIRACICABA
Estado de São Paulo
Maio-1984

Análise dos processos de ...
1984 NC-FOL6075



CPAA-5999-1

FOL

Í N D I C E

1. INTRODUÇÃO.....	01
2. TAMANHO E FORMA DAS MOLÉCULAS DE DNA.....	02
3. SÍNTESE DE DNA.....	04
3.1. Análise da Síntese.....	04
3.2. Quebra e Reparo do DNA.....	06
a. Propriedades da atividade endonuclease em mi- crosporócito ao pH 5.2.....	07
b. Variação da atividade do microsporócito endonu- clease nos estágios da meiose.....	09
c. Quebra de fita simples por microsporócito.....	09
d. Análises de grupos terminais produzidos por microsporócitos endonuclease.....	11
e. Propriedades e variação no estágio meiótico da microsporócito polinucleotídeo ligase (MPL).....	12
f. Propriedades e variações no estágio meiótico da microsporócito polinucleotídeo kinase.....	13
g. Reparo de DNA por microsporócito endonuclease....	14
4. CARACTERÍSTICAS DO DNA REPETITIVO.....	20
5. DESCONTINUIDADES NA REPLICAÇÃO DO DNA.....	22
6. CONCLUSÕES.....	25
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	27



1. INTRODUÇÃO

Apesar da ampla revisão bibliográfica, não foi possível encontrar, dentro do acesso das bibliotecas da ESALQ, trabalhos que abordem os pontos solicitados pela disciplina . Em razão disso, e com aquiescência do professor responsável , procuramos desenvolver o tópico supra-citado direcionando o assunto para aspecto molecular.

Vários modelos moleculares tem sido proposto para explicar a recombinação gênica em organismos superiores . Porém, a maioria baseia-se em processos moleculares identificados em microorganismos, outros tem procurado racionalizar o fenômeno da conversão gênica.

Células meióticas de lírio, microsporócitos , tem sido amplamente usadas para estudos bioquímicos combinados. O sincronismo natural das células meióticas, a duração relativamente longa da prófase (2 a 5 dias) e a habilidade das células desenvolverem-se "in vitro", possibilitou analisar cada intervalo da síntese de DNA separadamente.

2. TAMANHO E FORMA DAS MOLÉCULAS DE DNA

A fim de verificar o tamanho e forma das moléculas de DNA de microsporócito de *Lilium longiflorum* em diferentes estágios da meiose, WOLSTENHOLME (1971) examinou ao microscópio eletrônico microsporócitos ligados de diferentes tamanhos. A relação entre comprimento de gema e microsporogênese foi semelhante ao encontrado por TAYLOR e MACMASTERS (1954). Longos complexos sinaptonêmicos ($> 1,5 \mu$) eram visíveis em seções finas de microsporócitos de gemas com 17 mm e 18 mm. Seções curtas de estruturas que lembravam complexos sinaptonêmicos foram também encontrados em gemas de 16 mm e de gemas com 19 e 20 mm.

Em todas as preparações, longos filamentos lineares tendo as conhecidas características de DNA supra-fita foram observados. Pelo menos 500 moléculas foram examinadas para cada preparação de DNA. Moléculas não circulares foram encontradas em todas as preparações. O comprimento médio das moléculas de DNA variou de 59μ a 75μ e eles tinham uma amplitude de comprimento que variava de 1 a 115μ e 1 a 210μ . Existe uma correlação não aparente entre as diferenças em comprimento, das moléculas de DNA e o estágio da microsporogênese. Também nenhum estágio era distinguível pela presença ou ausência de um

particular tamanho de classe de molécula. Um material tendo a parência felpuda foi encontrado na porção terminal de 2 a 5 % das moléculas de DNA de todas as preparações. Estas regiões tinham sido descritas previamente na porção terminal de moléculas de DNA de glândulas salivares e esperma de *Chironomus tentans* e *C. thummi*, e interpretada como DNA fita simples.

A massa por micron de DNA preparado por microscopia eletrônica, sob as condições utilizadas no experimento é estimada em $2,07 \times 10^6$ daltons. Se, todavia, 40.000 daltons é tomado como o peso médio molecular da cadeia polipeptídica codificada pelo DNA de lírio, então as moléculas de DNA observadas nas preparações de microsporócitos de lírio poderiam incluir entre 3 e 740 cópias de um gene (este argumento, assume um peso médio molecular de um aminoácido em 135 daltons).

3. SÍNTESE DE DNA

3.1. Análise da Síntese

Dois fatos estabelecidos sobre o metabolismo do DNA em células meióticas de *Lilium* são que a maioria, se não o total, da replicação do DNA nuclear ocorre durante a fase s premeiótica, e que uma pequena mas significativa quantidade de DNA sintetizado, ocorre durante dois intervalos da prófase mei^otica, zigóteno e paquíteno (HOTTA et al., 1966).

Não ocorre síntese de DNA durante o primeiro es^tágio da prófase, leptóteno, mas os estágios subsequentes zigóteno e paquíteno possuem cada um, distinto e diferente padrão de síntese de DNA.

Já foi mencionado que a quantidade de DNA sintetizado durante o zigóteno representa cerca de 0,3% do DNA nuclear. Esta síntese representa uma replicação atrasada. Além disso, a densidade de flutuação distinta do DNA zigotênico é característico de todas as espécies testadas. Parece que nas células meióticas, pelo menos em liliáceas, uma única porção do genôma é retardada em sua replicação até as células atingirem o estágio de zigóteno. Como este DNA relaciona-se com a estrutura cromossômica não é ainda conhecido. Embora tenha uma

alta densidade de flutuação não é rDNA.

Dados indicam que este DNA não está localizado em pequenas regiões do cromossomo. A fragmentação geral do cromossomo sob inibição parcial do DNA no zigóteno leva a crer que as sequências de DNA zigóteno distribuem-se ao longo do comprimento de cada cromossomo (HOTTA & STERN, 1971).

A melhor referência para a função do DNA zigóteno é que sua síntese coincide com o período do pareamento cromossômico e que inibição desta síntese previne a iniciação, e/ou continuação do pareamento cromossômico (STERN & HOTTA, 1969). A síntese do DNA no zigóteno então parece ser uma condição necessária para pareamento cromossômico. Nenhum experimento foi realizado para elucidar o papel da síntese do DNA zigotênico no processo do pareamento. Uma atrativa especulação, é que regiões de DNA zigotênico, servem como sítios nos quais, os cromossomos homólogos são inicialmente alinhados. A cinética de hibridação do DNA zigotênico estão consistentes com esta possibilidade (HOTTA e STERN, 1971).

Eliminação de guiasmas pela exposição de células meióticas à elevadas temperaturas após a fase do zigóteno já foram claramente demonstradas. Então síntese do DNA durante o estágio do zigóteno não está envolvido na formação de guiasmas. Formação do guiasma parece ocorrer no paquíteno e a característica síntese de DNA neste estágio é, portanto, particularmente relevante para o processo de recombinação cromossômica. A síntese de DNA no paquíteno é um tipo de replicação de reparo. Análises de hibridação DNA-DNA indicam que replicação de DNA durante o estágio do paquíteno não resulta em um

acréscimo de DNA.

O DNA sintetizado, durante o paquíteno é variável na composição, não mostra nenhuma mudança na densidade após incorporação de bromodeoxyuridina e sua síntese é relativamente insensível à inibição por hidroxiuréia (HOTTA e STERN, 1971).

3.2. Quebra e Reparo do DNA

A fim de identificar a atividade enzimática, que ocorre em células meióticas e que poderiam levar à explicação do processo de recombinação genética, HOWELL e STERN (1971) realizaram uma análise de células meióticas de *Lilium* cujos resultados obtidos foram apresentados na seguinte ordem:

- a. demonstração da atividade de uma endonuclease em células meióticas
- b. o padrão temporal desta atividade em relação ao estágio meiótico
- c. a produção de um único fio ou "disponibilidade" reparo de quebra por atividade da endonuclease
- d. a produção do terminal 5-OH pela ação da atividade de endonuclease
- e. demonstração da atividade de uma polinucleotídeo ligase em células meióticas e seu padrão temporal durante o ciclo meiótico
- f. demonstração da atividade de uma polinucleotídeo kinase em células meióticas e seu padrão temporal durante o ciclo meiótico

g. o reparo de quebras produzidas por endonuclease pela atividade da polinucleotídeo ligase e kinase.

a. Propriedades da atividade endonuclease em microsporócito
pH 5.2



Extratos grosseiros ou parcialmente purificados de tecidos de lírio continham tanto um dos dois tipos de endonuclease dependendo do tecido de origem. Células meióticas (microsporócitos) produziram uma atividade que tinha um pH ótimo em 5.2.

Repetidos ensaios sob várias condições para encontrar outras atividades de endonucleases em tecidos meióticos sob um limite estendendo-se de pH 4.0 para 9.5 não foram bem sucedidos.

A microsporócito endonuclease preferencialmente hidrolisa DNA em dupla fita. A atividade do extrato com substrato de DNA desnaturado ($> 0,15$ unidades/mg de proteína) tinha aproximadamente 10% da atividade com DNA nativo (1,8 unidades/mg de proteínas). A atividade da enzima sob condições de análise padrão com DNA de fago T7 era 1,8 unidades/mg de proteínas, com DNA de *B. subtilis* 1,7 unidades/mg de proteínas e com DNA de *Lilium* 1,5 unidades/mg de proteínas). Análises de filtro de retenção usando DNA de *B. subtilis* e *Lilium* deram somente resultados semi-quantitativos, pois a população inicial de substratos de DNA não era tão homogênea em tamanho molecular como a população do DNA do T7 usado na análise padrão. A endonuclease do microsporócito foi julgada ser endo e não exonu

cleotídica, pois os produtos de digestão limitados, não mostravam mononucleotídeos ou pequenos oligonucleotídeos. Todos os produtos de digestão marcados radioativamente permaneciam na origem, quando analisados por papel cromatográfico.

Em pH 5.2 a microsporócito endonuclease demonstra propriedades compartilhadas por outras endonucleases ácidas. A atividade possui um requerimento amplo para adicionar cátions bivalentes. Atividade ótima (1,8 unidades/mg proteína) foi encontrada na concentração de 3mM-Mg²⁺, enquanto, quando Mg⁺⁺ não era adicionado a atividade era 85% do ótimo. Altas concentrações de Mg⁺⁺ eram inibidoras: em 75mM-Mg⁺⁺ de atividade caía para 30% daquela em 3mM. A atividade é inibida por RNA dupla fita. 50% da inibição na análise padrão foi encontrada em 20µg/ml de sRNA de *E. coli*, e a concentração mínima que dava inibição mínima detectável (> 10%) era 4µg/ml.

Tecidos somáticos da variedade Cinnabar foram testadas na presença da atividade da microsporócito endonuclease. Extrato de tais tecidos mostravam alto nível de atividade endonucleolítica, exemplo: tecido do perianto 7,6 unidades/mg tecidos da folha 6,2 unidades/mg, comparado ao tecido do microsporócito 1,8 unidades/mg. Entretanto, tais tecidos deram atividades ótimas em pH 5.6, ao invés de pH 5,2 que foi o ótimo, em tecidos meióticos.

Estas diferenças em pH ótimo refletem diferenças reais nas propriedades entre a atividade mitótica e meiótica em vez de alguma diferença comum na natureza dos extratos.

b. Variação da atividade da microsporócito endonuclease nos estágios da meiose.

Extratos de microsporócitos de lírio Cinnabar, tomados em diferentes estágios da prófase meiótica foram testados na concentração de pH 5.2 da atividade de microsporócito endonuclease. Foi encontrado que a atividade específica do microsporócito endonuclease variava nos diferentes estágios da prófase. Em um experimento representativo ilustrado na Figura 1, pode ser visto que a atividade endonucleolítica não era detectável no extrato de microsporócito na interfase premeiótica ou nos primeiros estágios da prófase.

Atividade endonucleolítica foi encontrada nos estágios iniciais do zigóteno e alcançava níveis máximos nos extratos dos microsporócitos nos estágios zigóteno-paquítenu. A atividade declinava através do paquíteno e alcançava níveis quase não detectáveis no diplóteno.

Nenhum fator inibidor ou estimulador para a atividade do microsporócito endonuclease foi encontrado pela mistura de extratos preparados em diferentes estágios da prófase meiótica.

c. Quebra de fita simples por microsporócito

A descoberta de que o microsporócito endonuclease estava correlacionado no tempo com os estágios zigóteno-paquítenu foi confirmada por exames posteriores das propriedades da atividade da endonuclease. Uma questão particularmente relevante para atividade de quebra e reunião do DNA é a nature

za da quebra produzida pela endonuclease.

Uma comparação da velocidade de sedimentação da endonuclease digerir DNA antes e após denaturação promove os meios para determinar se a microsporócito endonuclease produz, quebras em fio simples ou duplo na molécula bihelicoidal do DNA.

A forma denaturada do DNA de T7 previamente digerido com microsporócito endonuclease em pH 5.2 sedimenta em gradiente alcalino em taxas cada vez mais baixas com o tempo de digestão. Para estimação do coeficiente de sedimentação dos fragmentos de DNA de T7 resultantes, o número de quebras (r_0) por fio simples de DNA (T7) foi calculado ser 3,5 ($S_{20,w}^0 = 26s$) por três minutos de digestão e 8.0 ($S_{20,w}^0 = 20s$) por 10 minutos de digestão. DNA não denaturado da mesma digestão (3 e 10 minutos) sedimentam em gradiente neutro quase na mesma taxa do controle não digerido ($S_{20,w}^0 = 37s$) com a exceção de algum afastamento do pico principal. Os perfis em gradiente neutro do DNA digerido por microsporócito endonuclease exclue a possibilidade que a microsporócito atue principalmente para quebrar fios simples, pois quebras em fios duplos reduziram, as taxas de sedimentação em gradiente neutro do DNA digerido, em acordo com os valores de r_0 obtido dos perfis de gradiente alcalino.

Ao contrário da ação mostrada pelo microsporócito endonuclease tanto a forma nativa como denaturada de DNA de T7, previamente digerido com endonuclease em pH 5.6, mostram decréscimo, de sedimentação com aumento do tempo de digestão. O gradiente alcalino, os valores de r_0 para fita simples de

DNA de T7 por 3 minutos de digestão era 3.2 ($S_{20.w}^O = 27s$) e por 10 minutos de digestão era 12 ($S_{20.w}^O = 18s$). Em gradiente neutro por tres minutos de digestão, ro para DNA dupla fita= 3.0, ($S_{20.w}^O = 25s$) e por 10 minutos de digestão ro= 11 ($S_{20.w}^O = 18s$). Desde que um número equivalente de quebras por molécula de DNA é encontrado para uma única amostra em análise de gradiente tanto neutro como alcalino, então o pH 5.6 para endonuclease em tecidos somáticos pode produzir predominantemente quebras em DNA fita dupla.

A descoberta de que a microsporócito endonuclease produz inicialmente quebras em fita simples contrasta com a ação da endonuclease em pH 5.6 de tecidos somáticos de lírio e as outras endonucleases ácidas as quais tem sido mencionadas por hidrolisar DNA para quebras em fitas duplas. A ação de outras endonucleases ácidas é então produzir quebras não reparáveis no DNA enquanto que, as quebras produzidas pelo microsporócito endonuclease não exclue a possibilidade de reparo.

d. Análises de grupos terminais produzidos por microsporócitos endonuclease

Análises de grupos terminais de DNA (T7) parcialmente digeridos pode ser usado para determinar se o radical fosfodiester hidrolisado por microsporócito endonuclease é adjacente ao carbono 3' ou 5' da porção desoxiribose. Para tais análises, a polinucleotídeo kinase de *E. coli* infectada, por fago T4, é usada para catalisar a transferência quantitativa do orthofosfato do ATP para o terminal do DNA. Polinucleo-

tídeo kinase exibe uma seletividade para o terminal 5' mas não catalisa a transferência de um grupo fosfato para o terminal 5' que já é fosforilado. Polinucleotídeo kinase, portanto, marca quantitativamente o aparecimento do terminal -5'-OH ou em conjunção com fosfatase, o aparecimento de algum terminal 5' produzido pela hidrólise de DNA (T7) por microsporócito endonuclease.

e. Propriedades e variação no estágio meiótico da microsporócito polinucleotídeo ligase (MPL)

Extratos de microsporócitos em prófase meiótica possuem uma demonstrável atividade polinucleotídeo ligase. Atividade ligase foi analisada em fragmentos de DNA de T7 produzidos por DNase pancreática com a função de aumentar a taxa de sedimentação ou a resistência a fosfatase radioativa, dos fosfomonoesteres 5' internos.

Ambas análises mediram a capacidade do microsporócito extraído juntar justaposicionalmente grupos 3'-hidroxil e 5'-fosforil em quebras de fio único do DNA.

A atividade específica do polinucleotídeo ligase em extratos de microsporócitos (Tabela 1) é 500 vezes menos que aquele reportado para extratos de bactérias seguido de infecção do fago, porém duas vezes maior que aquele reportado para células mitóticas de mamíferos. A microsporócito ligase requer o ATP como um co-fator; é dependente de um reagente sulfidril e cátions bivalentes (Mg^{++}) na reação mista e mostra um pH ótimo em pH 7.4.

Extratos preparados de microsporócitos em vários estágios meióticos e analisados em concentração enzimática limitante, mostraram que a atividade específica da ligase varia com os estágios meióticos do microsporócito (Figura 2). Extratos de células em interfase pré-meiótica contêm atividade altamente específica da ligase, atividade da ligase decresce durante o leptóteno e retorna para níveis máximos no zigóteno-paquítenu e então declina uniformemente, através do paquíteno.

Este mesmo padrão foi reproduzido em vários experimentos. A atividade não era detectável por essa análise de comportamento nos microsporócitos após paquíteno ou em algum tempo nos tecidos somáticos de lírio.

Se a atividade específica da ligase em microsporócito é expressada por célula em vez de por mg de proteína, então a atividade específica de extratos de zigóteno-paquítenu é duas vezes maior que extratos interfásicos.

f. Propriedades e variações no estágio meiótico da microsporócito polinucleotídeo kinase

A análise mensurou a capacidade do extrato, para transferir ortofosfato do ATP para a terminação 5'-OH, do DNA. Para determinar a quantidade de atividade da polinucleotídeo kinase em vários estágios da prófase meiótica, extratos de microsporócito foram preparados da mesma forma que para ligase e testados em condições "limitantes" da enzima.

Atividade da polinucleotídeo kinase estava presente na interfase pré-meiótica e mostraram leve aumento da atividade específica até estágio de meio-paquítenu quando a atividade declinou rapidamente. Análise de fosfatase foi conduzida no mesmo extrato para determinar se a variação na atividade da kinase era atualmente um reflexo da variação na atividade da fosfatase no mesmo extrato. A Figura 3 indica que a atividade da fosfatase específica era alta, mas permanecia favoravelmente constante neste extrato e, portanto, não pode ter em conta as variações analisadas na atividade da kinase. A comparação um por célula em vez de um por mg da atividade específica indica, que a atividade da kinase no pico zigóteno-paquítenu é duas vezes maior que a atividade na interfase pré-meiótica. A atividade específica da kinase em tecidos somáticos de lírio (ex: tecido do perianto) é 20% da atividade máxima encontrada nos tecidos meióticos.

A atividade específica da microsporócito polinucleotídeo kinase em extrato bruto é comparável aquelas encontradas em extratos de fagos infectando *E. coli*, e quatro vezes maior que a reportada para extratos de núcleos de ratos.

g. Reparo de DNA por microsporócito endonuclease

A questão sobre a qual a atividade enzimática, presente no extrato bruto de células meióticas pode tanto cortar como reparar DNA é de particular interesse para o problema da recombinação meiótica.

Esta possibilidade foi testada primeiramente,

em DNA de T7 com H^3 (marcado), com microsporócito endonuclease e então incubando o produto da digestão com extrato de microsporócito sob condições favoráveis tanto para a polinucleotídeo kinase e atividade ligase. A Figura 4, dá um perfil da velocidade de sedimentação de DNA de T7 denaturado o qual foi digerido limitadamente antes da denaturação com a microsporócito endonuclease parcialmente purificada, em pH 5.2. O perfil não é nem inteiramente unimodal nem simétrico, mas, com uma aproximação, o número médio de quebras (ro) por fio simples da molécula de DNA (T7) é 10. A Figura 4(b) mostra a distribuição, da digestão pela endonuclease do DNA (T7) pós-tratado com extrato de microsporócito contendo entre outras atividades polinucleotídeo kinase e atividade ligase.

Um aumento na taxa de sedimentação para a população da fita simples do DNA fragmentado, foi observado. Os valores de ro para a população das moléculas de reparo foi estimado como 5. Então a diferença em ro para o DNA antes e após incubação com o extrato de microsporócito mostrou que pelo menos 50% das quebras produzidas pela microsporócito endonuclease eram reparadas pelo extrato de microsporócito. Nestes dados, o reparo do DNA (T7) cortado não é completo para a população de moléculas, com extrato bruto de microsporócito usando tanto endonuclease pancreática ou microsporócito endonuclease, em substrato de DNA de T7. Duas razões para dificultar o completo reparo parecem possíveis:

1. Sob condições favoráveis para atividade da polinucleotídeo kinase e ligase, extratos de microsporócitos exibem alguma atividade hidrolítica do DNA, incluindo endonuclease.

2. DNA digerido em reações extensas com microsporócito endonuclease parcialmente purificado, começa a mostrar algumas quebras não reparáveis.

Neste estudo, um conjunto de DNA complementar, quebrado e atividade de reparo foram encontrados em extratos de microsporócito desenvolvendo sincronicamente no estágio do zigóteno-paquítenu da meiose. O aparecimento coordenado de endonuclease, polinucleotídeo kinase e ligase, apontam a conclusão que estas enzimas agindo em conjunto, são responsáveis pelos eventos de quebra e reunião de DNA durante o estágio zigóteno-paquítenu.

Em trabalho paralelo HOTTA e STERN (1971) demonstraram que a síntese de uma pequena quantidade de DNA, denominada DNA paquitênico, ocorre durante o mesmo intervalo no qual as atividades de quebra e reparo são encontrados. Além disso o DNA sintetizado neste intervalo parece ser o produto dos eventos de quebra e reparo, no qual DNA paquitênico mostra propriedades de reparo e replicação de DNA.

As propriedades descritas por HOTTA e STERN (1971) as quais caracterizam o DNA paquitênico como o produto de replicação de reparo por síntese de DNA são as seguintes:

Primeiro: A quantidade de DNA paquitênico sintetizado é pequena e variável.

Segundo: DNA paquitênico não é DNA satélite, mas tem uma composição básica e densidade de flutuação que reflete, aquele do DNA grupal.

Terceiro: DNA paquitênico parece ter uma síntese modificada de DNA e não uma replicação tardia de alguma porção do

genôma.

Finalmente: DNA paquitênico parece ter replicação não conservativa.

Um esquema especulativo que decreve a quebra e reu -
nião do DNA cromossômico por recombinação genética foi construí-
do dentro do contexto dos eventos metabólicos do DNA observados
no paquíteno (Figura 5).

O esquema é baseado na atividade enzimática identifi-
cada em células meióticas de lírio e baseado parcialmente em cer-
tas atividades caracterizadas no sistema microbiológico. O es-
quema começa com o corte do DNA duplex nas cromatides meióticas
(b). Este processo é considerado como um passo controlador, por-
que toda atividade metabólica subsequente do DNA no esquema de-
pende do passo inicial de corte. Um corte deliberado do DNA
cromossomal no zigóteno tardio para paquíteno precoce é hipoteti-
zado em lugar de cortes resultantes de reparos incompletos de
síntese de DNA descontínuo na fase S desde que altos níveis de
atividade ligase são encontrados naquele intervalo pré-meiótico.
O corte do DNA pode estar sujeito a 1 ou vários fatores metabóli-
cos. Um corte poderia ser reunido sem incorporação de nu-
cleotídeos (F). Um corte poderia ser reposicionado por um pro-
cesso de tradução de corte ("nick translation") descrito para
DNA polimerase em *E. coli*, e então agrupado (B-D-E) ou um cor-
te poderia ser alargado por uma falha pela digestão do fio (c) e
o vazio próximo por síntese (D) seguido de reunião. Qualquer um
dos últimos processos resultariam em síntese de reparo sem uma
síntese líquida de DNA.

O possível relacionamento desse DNA metabolizado pa

ra um esquema de recombinação é mostrado na Figura 6.

Dois DNA duplex (X) de cromatídeos homólogos não irmãs são cortadas em vários pontos durante os estágios zigóteno-paquítenu quando os cromossomos estão pareados. Mas frequentemente o duplex seria reparado e reunido sem um evento de recombinação recíproca (2). Todavia, pouco frequentemente a reunião de duplex não covalentemente recombinaria sucessivamente presumivelmente por interação de pareamento de base entre fios homólogos de DNA duplex. O produto de tais eventos resultaria DNAs duplex (Y) que são recombinados reciprocamente (moléculas biparental recombinantes). O sucesso de um evento de recombinação pode ser governado pelo corte do DNA e por fato metabólico de DNA seguido de corte. Digestão de fita para produzir DNA fita simples pode ser necessário para promover uma flexibilidade do DNA estrutural para a justaposição de fios homólogos de DNA. Igualmente, reposição de um corte pode ser requerida, para transportar cortes em proximidade com um único duplex ou para alterar a geometria entre cortes nos duplex homólogos.

O "fato" metabólico de DNAs duplex que já são reciprocamente recombinados pode ter significância para transferir informação genética. Se tais moléculas recombinantes biparental (Y) forem sujeitas a reparo de síntese de DNA, então este evento pode ser reconhecido na análise genética como uma conversão ou evento de recombinação não recíproca.

Um postulado deste esquema, que o sucesso da recombinação origina-se não frequentemente de muitas quebras e reunião na prófase meiótica, foi extraído da seguinte estimativa da frequência dos eventos de replicação de reparo: A quantidade

de de DNA sintetizado durante a replicação do DNA de reparo é cerca de 0,1% do genoma. A quantidade de DNA por genoma ou por núcleo em microsporócito de lírio bright star é $1,1 \times 10^{-10}$ g. Portanto, $1,1 \times 10^{-13}$ g de DNA ou $6,6 \times 10^{10}$ daltons de DNA por núcleo são sintetizados neste período. DNA de reparo sintetizado durante a replicação não dá modificações profundas em gradiente de densidade de cloreto de césio mesmo quando o conjunto de DNA é contado para 5×10^5 daltons (HOTTA e STERN, 1971). Desde que a acuraração na determinação da modificação em análises de gradientes de densidade é limitada para cerca de 20% da alteração de densidade do híbrido totalmente substituído, então o número mínimo de regiões de reparos pode ser estimada dentro deste erro de acordo com equações de BRONHOEFER e GIERER (1963). Para qualquer núcleo meiótico o número mínimo de regiões de replicação de reparo é $6,6 \times 10^5$. Se assumirmos que cada região de reparo do DNA é produto de uma quebra de fios simples, então deveremos ter no mínimo $6,6 \times 10^5$ quebras de fios simples por núcleo.

Esta é a estimativa do mínimo porque no esquema proposto (Figura 6) qualquer quebra e reunião pode ocorrer sem síntese de DNA. Uma estimativa do número de recombinantes por núcleo em lírio pode ser encontrada somente citologicamente observando a frequência de guiasmas. Em geral uma média de três guiasmas por par de cromossomo ou trinta e seis guiasmas por núcleo são encontradas em lírio (SEN, 1969). Cada permuta deve requerer não menos que quatro fios simples quebrados. Então o número estimado de quebras de fio simples envolvidos em recombinação sucessiva por núcleo é cerca de

$1,4 \times 10^2$. Portanto, o limite superior de probabilidade que uma única quebra e reparo que seria envolvido em uma recombinação sucessiva é $1,4 \times 10^2 / 6,6 \times 10^5 = 2 \times 10^{-4}$.

4. CARACTERÍSTICAS DO DNA REPETITIVO

Evidências a nível bioquímico, em estudos de certos eucariotos, sugerem que organização da sequência de DNA é um fator primário na determinação dos locais de corte e subsequente reparo do DNA característico do paquíteno. Em lírio STERN e HOTTA (1978) demonstraram que uma ordenação da maquinaria bioquímica para o corte, desenrolamento e reparo, é mobilizado sendo o pico da atividade no paquíteno.

Ao nível molecular existem várias indicações que cortes e reparos, no paquíteno não são distribuídos aleatoriamente, pelo genôma. O mais significativo disto tem sido que a síntese de reparo no paquíteno ocorre preferencialmente no DNA moderadamente repetitivo (SMYTH e STERN, 1973; HOTTA et al., 1977). Estas informações levantaram a atenção sobre o papel de sequências de DNA repetitivos, com um substrato para eventos de recombinação meiótica como a evidência genética para múltiplos sítios dispersos responsáveis pela coordenação de controle.

Análises de estabilidade térmica de reassociações de preparações de P-DNA em particular, proveram a mais inequívoca in

dicação já obtida de que as atividades de corte e reparo em paquíteno de lírio são especialmente direcionadas para uma subclasse, especial de famílias moderadamente repetitivas.

Sequências moderadamente repetitivas de DNA em *Lilium* sintetizadas durante o paquíteno, consistem de famílias que tem uma divergência consideravelmente mais baixa do que do DNA total do genoma medianamente repetido, sendo que este último tem uma divergência média de 10%. Durante a fase inicial do paquíteno 80% da sequência sintetizada, e 100% daquele sintetizado durante a última fase do paquíteno, reassociam com perfeita ou quase perfeita fidelidade. Exceto para a pequena quantidade de DNA sintetizado durante o início do paquíteno sequências intermediárias, repetidas no paquíteno não são divergentes e assim constituem um subgrupo distinto do DNA total moderadamente repetitivo. O comprimento modal do paquíteno e o total de sequências medianamente repetidas são similares. Em contraste as primeiras medidas baseadas sobre a incorporação de isótopos, o comprimento modal é da ordem de 1.500 - 2.000 pares de base, 10 vezes o tamanho estimado. Cálculos baseados sobre o novo comprimento leva a conclusão que as sequências medianamente repetidas no paquíteno respondem por 1% do genoma total (BOUCHARD e STERN, 1980).

5. DESCONTINUIDADES NA REPLICAÇÃO DO DNA

Regiões do DNA cromossômico que são replicadas durante o zigóteno não são ligadas ao corpo do DNA nuclear no término da replicação. As descontinuidades estão presentes somente nas fitas que são sintetizadas durante a fase 5 pré-meiótica e elas persistem através da prófase até o período de disjunção cromossômica. As descontinuidades são vazios maiores que cortes e devem ser protegidas, in vivo, das atividades de reparo durante o paquíteno, quando todas as falhas no DNA estão sendo reparadas.

As falhas podem ser corrigidas em núcleos profásicos, isolados caso seja acondicionada polimerase e ligase.

Embora falte informações para generalizar acerca de um papel universal que o z-DNA possa ter na meiose, suas propriedades coletivas - sincronismo de pareamento e replicação, dependência de pareamento na replicação, sequências únicas e a prolongada presença de descontinuidades durante pareamento e crossing-over - torna difícil evitar a conclusão que em *Lilium* pelo menos, as regiões de z-DNA representam segmentos dos cromossomos que tem uma função especial na meiose.

Presumivelmente as principais descontinuidades são for

madadas quando regiões de z-DNA iniciam sua replicação atrasada. Entre o término da fase-S e aquela iniciação, as regiões de z-DNA estão provavelmente na forma duplex, uma fita de cada cromatíde irmã contribuindo para o duplex. Apesar de muitas tentativas, não foi possível obter evidência para a presença de uma proporção significativa de fita simples de DNA, durante o período entre a fase S e zigóteno. A persistência de z-DNA descontínuos através e além do estágio de paquíteno é de particular interesse para fisiologia meiótica. Meiócitos são capazes de reparar replicação em quase todos os estágios meióticos, e eles são especialmente ativos em reparar replicação, durante o paquíteno (HOTTA e STERN, 1974). As descontinuidades do z-DNA são acessíveis à reparos em núcleos isolados, e as enzimas que efetuam o reparo in vitro tem sido encontradas presentes nas células durante o período em questão. Portanto, como já foi mencionado, as descontinuidades devem ser protegidas "in vivo" da ação do sistema de reparo. Realmente, desde que inibição parcial da síntese de DNA durante o zigóteno, ou paquíteno precede a quebra cromossômica, presumivelmente, uma consequência da descontinuidade induzida (ITTO et al., 1967) a interrupção de z-DNA endógeno pode ser protegida da degradação.

A idéia que descontinuidades devem existir em DNA meiótico devido a replicação incompleta não é nova. Foi proposta por CHIU e HASTINGS (1973) para computar os efeitos de inibidores de DNA em recombinação em clamidomonas e como bases para um modelo nos quais descontinuidades são sítios potenciais para crossing over. Em *Lilium*, e aparentemente também em leveduras os sítios potenciais para crossing over são

providos para uma programada formação de cortes em fitas simples. Em *Lilium* estes são introduzidos deliberadamente no paquíteno pela ativação de uma endonuclease (HONELL e STERN, 1971). Além disso, os sítios de cortes são nas sequências moderadamente repetidas. Estas observações excluem z-DNA e seus vazios associados, de um papel direto no crossing over. Permanece difícil, no entanto, assegurar z-DNA como papel meiótico específico através dos dados disponíveis.

As persistentes descontinuidades devem servir para facilitar o desenrolamento do DNA duplex, particularmente em regiões que sofreram crossing-over, e onde existe especial necessidade para arrumar os fios para uma disjunção efetiva. Em um nível mais elementar de organização as descontinuidades persistentes podem funcionar facilitando a transferência de fios. Uma importante questão que não tem sido inteiramente respondida é a fração de sequência única ou poucas cópias que esta contém no z-DNA. Em *Lilium* sequências únicas representam uma pequena fração do genoma. Provavelmente a proporção de sequências únicas, representadas pelo z-DNA é uma chave métrica comparando a meiose de *Lilium* com outros organismos (HOTTA e STERN, 1976).

6. CONCLUSÕES

1. Além da síntese normal de DNA que ocorre durante a fase S na intérfase, ocorre também uma pequena mas significativa quantidade de DNA que é sintetizado na prófase meiótica.
2. Essa síntese se dá em duas etapas distintas, e o conteúdo e função do DNA produzido é distinto de uma fase para outra . A síntese do DNA no zigóteno está relacionada com o pareamento dos homólogos, enquanto que a síntese que ocorre no paquíteno é relevante para o processo de recombinação cromossômica.
3. Em microsporócito de lírio a atividade máxima da endonuclease se dá em pH 5,2.
4. A microsporócito endonuclease preferencialmente hidrolisa , DNA dupla fita, porém sua atividade é inibida por RNA dupla fita.
5. A atividade da microsporócito endonuclease não é detectável no extrato de microsporócito na interfase pre-meiótica como também nos primeiros estágios da prófase. Porém, é notada

no início do zigóteno e alcança níveis máximos nos extratos de microsporócito no zigóteno-paquíteo. Sendo que posteriormente, a atividade declina e no diplóteno alcança níveis semelhantes ao início da prófase.

6. O aparecimento coordenado de endonuclease, polinucleotídeo kinase e ligase apontam a conclusão que estas enzimas agindo em conjunto, são responsáveis pelos eventos de quebra e reunião de DNA durante o estágio zigóteno-paquíteo.
7. A síntese de DNA paquíteno ocorre durante o mesmo intervalo no qual as atividades de quebra e reparo são encontradas.
8. Os cortes e reparos do DNA no paquíteno ocorrem em pontos fixos no genôma, em pontos de DNA moderadamente repetitivos.
9. Quando a forma das moléculas, estudos tem demonstrado que elas são lineares com comprimento médio de 59μ a 75μ .



7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BOUCHARD, R.A. e H. STERN., 1980. DNA synthesized at pachytene in *Lilium*: A non divergent subclass of moderately repetitive sequences. Chromosoma (Berl.) 81:349-363.
- CHIU, S.M., P.J. HASTINGS, 1973. Premeiotic DNA synthesis and recombination in Chlamydomonas reinhardii. Genetics, 73:29-43.
- HOTTA, Y.; M. ITTO e H. STERN, 1966. Synthesis of DNA during meiosis. Proc. Nat. Acad. Sci. Wash., 56, 1184.
- HOTTA, Y. e H. STERN, 1971. Analysis of DNA synthesis during meiotic prophase in *Lilium*. J. Molec. biol., 55:337-355.
- HOTTA, Y. e H. STERN, 1974. DNA scission and repair during pachytene in *Lilium*. Chromosoma (Berl.) 46:279-296.
- HOTTA, Y. e H. STERN, 1976. Persistent discontinuities in late replicating DNA during meiosis in *Lilium*. Chromosoma (Berl.) 55:171-182.

- HOTTA, Y.; A.C. CHANDLEY; H. STERN, 1972. Meiotic crossing-over in lily and mouse. Nature (Lond.), 209:240-242.
- HOWELL, S.H. e H. STERN, 1971. The appearance of DNA breakage and repair activities in the synchronous meiotic cycle of *Lilium*. J. Molec. Biol. 55:357-378.
- ITTO, M.; Y. HOTTA e H. STERN, 1967. Studies of meiosis in vitro. II. Effect of inhibiting DNA synthesis during meiotic prophase on chromosome structure and behaviour. Develop. Biol., 16:54-77.
- SMYTH, D.R.; H. STERN, 1973. Repeated DNA synthesized during pachytene in *Lilium henryi*. Nature (Lond.) New Biol. 245:94-96.
- STERN, H.; and Y. HOTTA, 1978. Regulatory mechanisms in meiotic crossing-over. Ann. Rev. Plant. Physiol. 29:415-436.
- TAYLOR, J.H. and R. McMASTER, 1954. Autoradiographic and microphotometric studies of deoxyribose nucleic acid during microgametogenesis in *Lilium longiflorum*. Chromosoma (Berl.) 6:489-521.
- WOLSTENHOLME, D.R. 1971. The size and form of DNA molecules from microsporocytes of *Lilium longiflorum* at different stages of meiosis. Chromosoma (Berl.) 33:396-402.

TABELA 1. Requerimentos de análise de reação da polinucleotídeo ligase.

Comprimento	p-moles/hr/mg proteína
Completo	7,04
menos ATP	0,32
menos ATP + 25 moles NAD	0,91
menos ditiotreitól	1,23
menos Mg ²⁺	0,24
menos extrato de microsporo	0,10
menos extrato de microsporo + 29mg de proteína no extrato do tecido da gema	<0,10

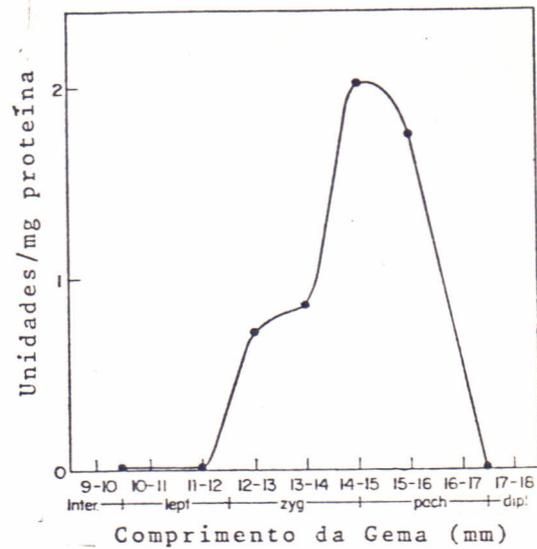


FIGURA 1. Atividade da endonuclease em extrato de microsporócito em interfase premeiônica (inter.) e vários estágios da prófase meiótica (Lept. leptoteno; zyg.; zigóteno; pach.; paquíteno; dipl.; diplóteno). Comprimento da gema está correlacionado com o estágio meiótico dos microsporócitos.

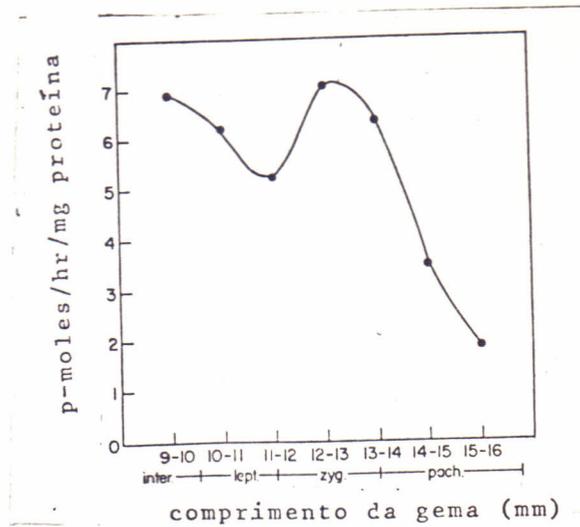


FIGURA 2. Atividade da polinucleotídeo ligase em extrato de microsporócito em interfase prêmeiótica (inter.) e vários estágios de prófase meiótica (Lept. leptóteno; zyg.; zigóteno; pach.; paquíteno). A análise padrão da medida da quantidade em p-moles de fósforo-monoestere interno separado fosfatase resistente.

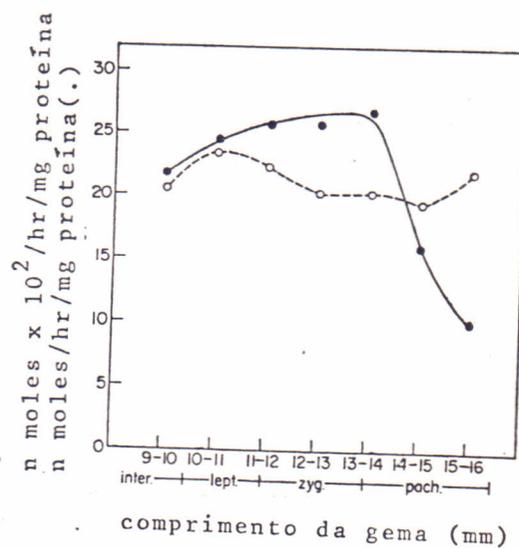


FIGURA 3. Atividades polinucleotídeo kinase (-.-.-) e fosfatase ácida pH (5,6) (- - 0 - - 0 - -) em extratos de microsporócito na interfase premeiótica (inter.) e vários estágios da prófase meiótica (Lept.; leptôteno; zyg.; zigôteno; pach.; paquíteno). A análise padrão da kinase, as quantidades medidas em moles de ^{32}P ortofosfato de ^{32}P ATP separou ácido-insolúvel pela transferência para os fragmentos de DNA terminados em 5'-hidroxila. A análise padrão da fosfatase, as quantidades medidas em moles de p-nitrofenol liberado do p-nitrofenil fosfatase.

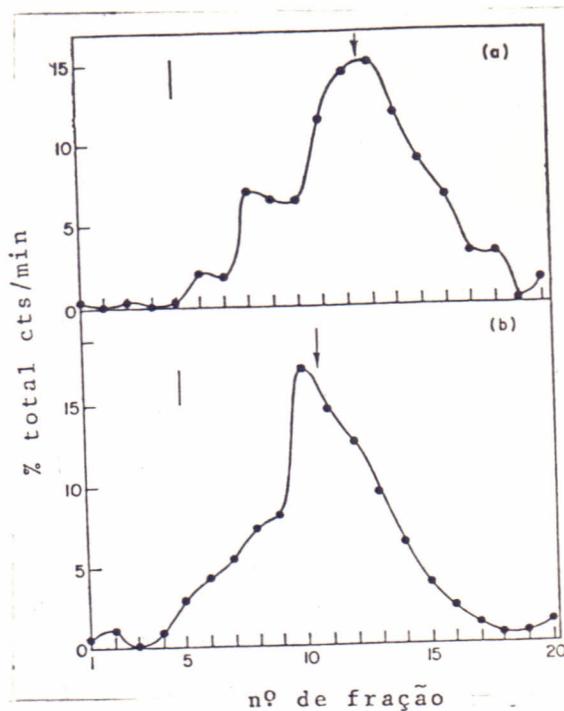


FIGURA 4.(a) Perfil de sedimentação em gradiente de sucrose alcalina de DNA de T7 tratada com microsporócito endonuclease.

(b) Perfil de sedimentação de DNA tratado com endonuclease após tratada com extrato de microsporócito contendo atividades da polinucleotídeo kinase e polinucleotídeo ligase. Na linha está a posição de sedimentação de DNA intacto em destaque. Seta é determinado os quadrados médio da distribuição do fragmento do T7 DNA. Coeficiente de sedimentação é calculado da posição da seta.

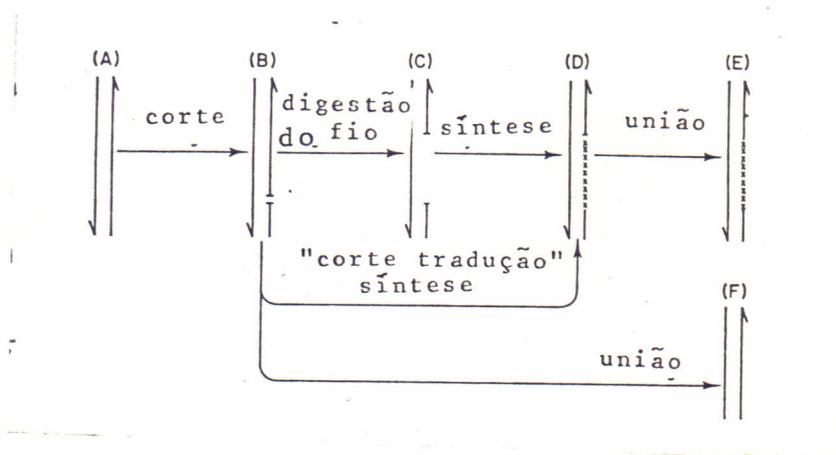


FIGURA 5. Esquema proposto dos eventos metabólicos de DNA durante a fase de zigóteno e paquíteno em microsporócito de lírio. Diagramas individuais representam uma curta região do DNA do plex de uma simples cromatíde.

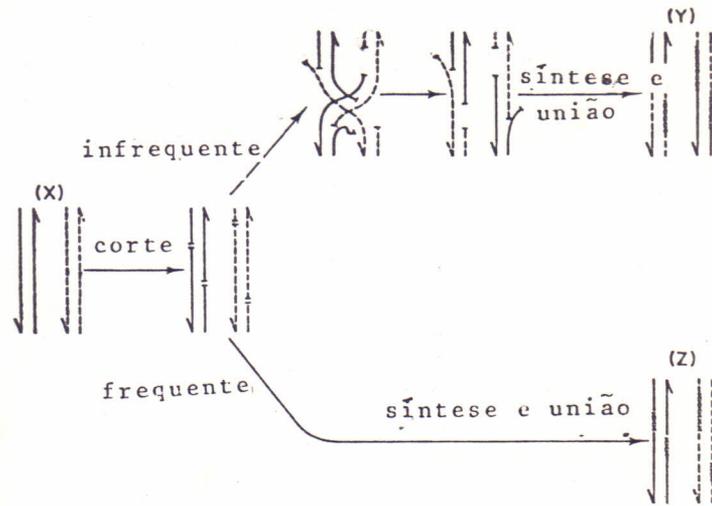


FIGURA 6. Esquema proposto de recombinação resultando dos eventos metabólicos do DNA durante o zigóteno e paquíteno. Diagrama individual representa outras regiões do duplex de DNA das cromátides homólogas não irmãs. O evento do crossing-over no primeiro diagrama da linha superior é transposto no seguinte para esclarecer. (Veja explanação no texto).