



Universidade Federal do Rio Grande do Sul  
Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular

**O mutante *pso9-1* de *Saccharomyces cerevisiae*,  
sensível a psoralenos fotoativados, contém um alelo  
mutante do gene *MEC3* envolvido em *checkpoint***

**Jacqueline Moraes Cardone**

**Orientador: Prof. Dr. João A. P. Henriques**

Porto Alegre  
2002

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**

**O mutante *pso9-1* de *Saccharomyces cerevisiae*,  
sensível a psoralenos fotoativados, contém um alelo  
mutante do gene *MEC3* envolvido em *checkpoint***

**Jacqueline Moraes Cardone**

**Orientador: Prof. Dr. João A. P. Henriques**

Dissertação apresentada ao Programa de  
Pós-Graduação em Genética e Biologia  
Molecular como um dos pré-requisitos  
para a obtenção do Grau de Mestre em  
Genética e Biologia Molecular.

Porto Alegre  
2002

Aos meus pais, Gilberto e  
Jussara, que me deram alicerce para  
chegar a mais um momento especial,

Ao meu namorado, Luís  
Fernando, que me deu exemplo e  
inspiração.

Este trabalho foi realizado nas instalações do Laboratório de Radiobiologia Molecular do Centro de Biotecnologia nesta Universidade. O projeto foi subvencionado pela Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e pelo GENOTOX - Laboratório de Genotoxicidade.

## AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Henriques, pela grande oportunidade de aprendizado, pelo apoio e confiança no meu trabalho e, acima de tudo, pela amizade. Com tudo isso foi possível concluir mais esta etapa. Espero sempre corresponder às tuas expectativas.

Ao Prof. Martin Brendel, meu segundo orientador, sou muito grata pelas longas discussões científicas e por me contagiar com seu entusiasmo pela Ciência.

A todos os companheiros dos laboratórios 210, 219 e GENOTOX. De ontem e de hoje. Obrigada pela convivência amiga!

Aos colegas e amigos do Laboratório de Biologia Molecular Vegetal, sempre muito divertidos, que disponibilizavam desde um cafezinho até um *kit* básico de clonagem... Fica aqui um agradecimento especial ao Marcelo Kern, companheiro de longa data. Vou sentir saudades das nossas confidências de conquistas e lamentações...

Às amigas e colegas de bancada Alexandra, Cleidy e Heique. Não sei o que seria do Lab. (e do “núcleo *fashion*”...) sem vocês! Sempre terei vocês no coração. Por favor, não desapareçam se saírem antes de mim...

Ao Elmo, pela paciência e boa-vontade sem fim. Ah, se todos fossem como você...

À minha querida professora de inglês Daisy Graff, um grande exemplo de vida, responsável pela significativa melhora no meu inglês

À amiga, de hoje e de sempre, Adriana Giongo. Pela amizade que não se apagou com o tempo, pelo ombro amigo e pelos convites inesperados para “um café”, nas horas que eu mais precisava...

Aos meus pais, Gilberto e Jussara, por terem me oferecido livre arbítrio e pela confiança na minha opção. Agradeço por toda paciência e apoio que recebi ao longo desta fase, e que sem dúvida continuarei recebendo na continuação de minha formação profissional.

Ao meu namorado Luís Fernando, obrigada pelo amor, companheirismo e pelo incentivo incondicional. Descobri que mais difícil do que trabalharmos juntos é não tê-lo mais na bancada ao lado. Espero sempre ter o suporte da tua experiência...

“Aprender é a única coisa de que a mente nunca se cansa, nunca tem medo e nunca se arrepende.”

(Leonardo da Vinci)

# SUMÁRIO

<b>LISTA DE ABREVIATURAS.....</b>	<b>i</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>iii</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>iv</b>
<b>CAPÍTULO I</b>	
<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>2</b>
1.1 VIAS DE REPARAÇÃO DE DNA.....	5
1.1.1 Reparação por excisão de nucleotídeos (NER).....	7
1.1.2 Reparação pós-replicativa e/ou mutagênica.....	9
1.1.3 Reparação de DNA por recombinação homóloga.....	12
1.1.4 Reparação de DNA por recombinação não-homóloga ou ilegítima.....	13
1.2 AGENTES QUE LESIONAM A CÉLULA.....	16
1.2.1 Radiação UV.....	16
1.2.1.1 Dímeros de pirimidina .....	16
1.2.1.2 Fotoprodutos 6-4.....	17
1.2.2 Agentes alquilantes.....	18
1.2.3 Psoralenos/furocumarinas.....	20
1.3 MUTANTES <i>PSO</i> .....	23
1.4 OBJETIVOS.....	31
<b>CAPÍTULO II.....</b>	<b>32</b>
<p>“Psoralen-sensitive mutant <i>pso9-1</i> of <i>Saccharomyces cerevisiae</i> contains a mutant allele of the DNA damage checkpoint gene <i>MEC3</i>”.</p>	
<b>CAPÍTULO III</b>	
<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>57</b>
<i>A mutação <i>pso9-1</i> define um novo alelo do gene <i>MEC3</i>.....</i>	<b>58</b>
<i>PSO9/MEC3 participa da via de checkpoint que responde a danos no DNA.....</i>	<b>61</b>
<b>CAPÍTULO IV</b>	
<b>CONCLUSÕES e PERSPECTIVAS.....</b>	<b>69</b>



## **CAPÍTULO V**

<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>72</b>
--	-----------

## **APÊNDICE I**

<i>Estratégia de clonagem.....</i>	<i>89</i>
<i>Dados não mostrados.....</i>	<i>91</i>

## RESUMO

Análises de complementação do mutante *pso9-1*, sensível a psoralenos mono- e bifuncionais fotoativados, UV<sub>254nm</sub> e nitrosoguanidina, com os mutantes *pso1* a *pso8*, confirmou que este contém uma nova mutação *pso*. A clonagem molecular a partir de um banco genômico de levedura sugeriu *pso9-1* como alelo mutante do gene de *checkpoint* que responde a danos no DNA *MEC3*. A não-complementação de vários fenótipos de sensibilidade em diplóides *pso9-1/mec3Δ* confirmou o alelismo dos dois mutantes. A sensibilidade à *calcofluor white* e à cafeína não foi aumentada nas linhagens *pso9-1* e *mec3Δ*, em relação as suas respectivas selvagens, sugerindo que o mutante *pso9-1* não porta uma mutação na região promotora. O fenótipo mutante de *mec3Δ* foi levemente mais pronunciado para sensibilidade à 8-MOP + UVA e UVC, e para a supressão de mutação para frente induzida por UVC, sugerindo uma função residual para a proteína produzida por este alelo mutante.

## ABSTRACT

Complementation analysis of a *pso9-1* yeast mutant sensitive to photoactivated mono- and bifunctional psoralens, UV-light 254nm, and nitrosoguanidine, with *pso1* to *pso8* mutants, confirmed that it contains a novel *pso* mutation. Molecular cloning from a yeast genomic library suggested *pso9-1* to be a mutant allele of the DNA damage checkpoint control gene *MEC3*. Non-complementation of several sensitivity phenotypes in *pso9-1/mec3Δ* diploids verified allelism of both mutants. Sensitivity to calcofluor white and to caffeine was not increased in *mec3Δ* and *pso9-1* backgrounds, in relation to their respective WTs, suggesting that *pso9-1* does not carry a promoter mutation. The mutant phenotype of *mec3Δ* was slightly more pronounced for sensitivity to 8-MOP+UVA and UVC and for suppression of UVC-induced forward mutation than that exhibited by the *pso9-1* mutant, suggesting some residual function for the protein produced by this mutant allele.

**CAPÍTULO I**  
**INTRODUÇÃO**

## INTRODUÇÃO

Uma vez descoberto que o DNA é um componente químico, informacionalmente ativo de quase todos os materiais genéticos (à exceção do RNA de vírus e de viróides), assumiu-se que essa macromolécula deveria ser muito estável para manter o alto grau de fidelidade requerido para tal função. E, certamente, foi surpreendente descobrir-se que a estrutura primária do DNA é muito dinâmica e alvo de constantes mudanças, como transposições gênicas e alterações na química e seqüência dos nucleotídeos. Muitas destas alterações surgem em consequência de erros introduzidos durante eventos celulares como a replicação, recombinação e pela própria reparação, ou resultantes da instabilidade inerente às ligações químicas presentes na molécula. Acrescenta-se a isto a grande reatividade do DNA de células vivas a vários agentes químicos e físicos, muitos dos quais presentes no ambiente, seja como produtos do metabolismo, seja como decomposição de outros organismos ou, ainda, produzidos industrialmente.

Qualquer modificação na estrutura molecular do DNA pode interferir no seu metabolismo e função, incluindo replicação, transcrição e recombinação, tão bem quanto outras funções celulares importantes, tais como regulação do ciclo celular e/ou divisão celular (para revisão, ver Friedberg *et al.*, 1995)

A fim de garantir a integridade do genoma e a sobrevivência das células através de sucessivas divisões celulares, com o passar do tempo os seres vivos desenvolveram mecanismos de proteção e reparação aos possíveis danos causados a esta macromolécula.

Vários mecanismos de reparação celular, envolvendo etapas multienzimáticas, são capazes de remover rapidamente diferentes tipos de

lesões produzidas no DNA de acordo com a natureza química do agente genotóxico. Estas lesões, se não forem reparadas ou o forem de maneira incorreta, podem trazer sérias conseqüências, resultando em infidelidade na replicação, mutações, aumentando o risco de um indivíduo a sofrer várias doenças degenerativas. Gerada pela infidelidade na reparação de lesões no DNA, a instabilidade genômica pode permitir alterações genéticas relevantes para o desenvolvimento do câncer. Um grande progresso está sendo alcançado em todas as áreas de reparação, especialmente com células de mamíferos, e leveduras continuam sendo um excelente paradigma para o estudo da reparação em humanos. Quase todas as vias de reparação, e a maioria dos *loci* individuais são significativamente homólogos desde leveduras até mamíferos.

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* é o microrganismo eucariótico mais aplicável e melhor estudado para o entendimento de diversas funções biológicas. A seqüência completa de seu genoma (Goffeau *et al.*, 1996) mostrou-se extremamente importante como referência para o seqüenciamento de genes humanos e de outros eucariotos superiores. É um organismo unicelular, que apresenta um ciclo eucariótico típico, completo e bem definido. A capacidade desta levedura de replicar-se tanto em estado diplóide como em estado haplóide e a facilidade de obter-se mutantes faz deste organismo um dos modelos eucarióticos melhor caracterizados geneticamente quanto à resposta celular aos danos provocados no DNA. Métodos de alta eficiência de transformação em levedura estão disponíveis há mais de uma década, possibilitando a clonagem de genes por complementação genética. O eficiente sistema de recombinação homóloga presente nas leveduras permite que seqüências alteradas em genes clonados possam ser introduzidas novamente no cromossomo, na região homóloga correspondente. Isto permite a rápida identificação de conseqüências fenotípicas de mutações em qualquer gene clonado, técnica esta geralmente não disponível para eucariotos superiores (para revisão, ver Ausubel *et al.*, 1995).

O fato de muitos processos celulares serem fisiologicamente conservados entre diferentes espécies de eucariotos, combinado às potentes ferramentas genéticas e moleculares disponíveis para *S. cerevisiae*, têm feito desta levedura um valioso sistema modelo, permitindo sua utilização para convenientemente analisar e funcionalmente dissecar produtos de genes de outros eucariotos.

## 1.1 VIAS DE REPARAÇÃO DE DNA

O estudo dos mecanismos de reparação de lesões no DNA de leveduras iniciou com o isolamento de uma série de mutantes sensíveis aos efeitos das radiações UVC (radiação ultravioleta curta, 254nm) e ionizante, chamados mutantes *rad* (Game e Cox, 1971; Game e Mortimer, 1974), ao metilmetanosulfonato, mutantes *mms* (Prakash e Prakash, 1977), à fotoadição de psoralenos e ou furocomarinas, mutantes *ps* (Henriques e Moustacchi, 1980) e às mostardas nitrogenadas, mutantes *snm* (Ruhland *et al.*, 1981). Adicionalmente, foram caracterizados mutantes que apresentaram uma redução na taxa de mutações induzidas pela radiação UVC, os mutantes *rev* (Lemontt, 1971) que podem também ser defectivos na recombinação meiótica ou mitótica após tratamento com radiação UVC ou raios X (Rodarte-Ramon e Mortimer, 1972). O grande número de genes identificados e o isolamento de outros mutantes sugeriram a presença de múltiplas vias para a reparação de lesões induzidas por radiações. O estudo de alelismo entre simples mutantes sensíveis às radiações, bem como das interações de epistasia e sinergismo entre duplos e triplos mutantes estabeleceram três grupos genéticos de reparação de lesões (Game e Cox, 1971; 1972; Brendel e Haynes, 1973; Game e Mortimer, 1974), os quais correspondem às três principais respostas celulares referentes aos danos no DNA: reparação por excisão de nucleotídeos, via RAD3, também conhecida por NER (*nucleotide excision repair*), reparação por recombinação, via RAD52 e reparação pós-replicativa e/ou mutagênica, via RAD6 (para revisão, ver Friedberg *et al.*, 1995; Nickoloff e Hoekstra, 1998; Prakash e Prakash, 2000; Game, 2000; Kupiec, 2000).

As interações epistáticas são definidas de acordo com a resposta que as linhagens mutantes apresentam em relação a um determinado agente. Dois genes são ditos epistáticos quando um duplo mutante não apresentar sensibilidade maior do que o mais sensível dos simples mutantes. Isso indica



que estes dois genes estão envolvidos em etapas seqüenciais de uma rota bioquímica ou fazem parte de um complexo multimérico ou multiprotéico. Entretanto, se o duplo mutante apresenta uma sensibilidade aumentada, os dois genes pertencem a grupos epistáticos distintos e são ditos sinérgicos, indicando que pertencem a vias de reparação que competem para o mesmo tipo de lesão (Game e Cox, 1972; Brendel e Haynes, 1973; Friedberg *et al.*, 1995; Nicklokff e Hoekstra, 1998). Os grupos de epistasia dos genes envolvidos no processo de reparação são mostrados na Tabela 1.

A complexidade dos processos de reparação é evidente não somente pelo grande número de produtos gênicos requeridos, como também pela freqüente necessidade destes produtos associarem-se em complexos multienzimáticos e às muitas interações, agora conhecidas, que ocorrem entre estas vias de reparação (Game, 2000), demonstradas pela presença de alguns genes em mais de um desses grupos (Friedberg *et al.*, 1995; Henriques *et al.*, 1997).

**Tabela 1.** Grupos de epistasia dos genes de *S. cerevisiae* envolvidos em reparação de danos no DNA

Grupo RAD3	Grupo RAD6	Grupo RAD52
<i>RAD1</i>	<i>RAD5 (REV2) (SNM2)</i>	<i>RAD50</i>
<i>RAD2</i>	<i>RAD6 (UBC2)</i>	<i>RAD51</i>
<i>RAD3</i>	<i>RAD8</i>	<i>RAD52</i>
<i>RAD4</i>	<i>RAD9</i>	<i>RAD53</i>
<i>RAD7</i>	<i>RAD15</i>	<i>RAD54</i>
<i>RAD10</i>	<i>RAD18</i>	<i>RAD55</i>
<i>RAD14</i>	<i>RADH (SRS2)</i>	<i>RAD56</i>
<i>SSL1</i>	<i>REV1</i>	<i>RAD57</i>
<i>SSL2 (RAD25)</i>	<i>REV3 (PSO1)</i>	<i>RAD58</i>
<i>TFB1</i>	<i>CDC9</i>	<i>RAD59</i>
<i>RAD16 (PSO5)</i>	<i>REV5</i>	<i>PSO4 (PRP19)</i>
<i>RAD23</i>	<i>REV6</i>	<i>RAD24</i>
<i>CDC8</i>	<i>REV7</i>	<i>XRS2</i>
<i>CDC9</i>	<i>CDC7</i>	
<i>MMS19</i>	<i>CDC8</i>	
<i>PSO2 (SNM1)</i>	<i>MMS3</i>	
<i>PSO3</i>	<i>PSO4 (PRP19)</i>	
<i>UVS12</i>	<i>UMR-7</i>	
<i>RAD26</i>		
<i>CDC44</i>		
<i>RFA1</i>		
<i>POL30</i>		

Adaptado de Friedberg *et al.* (1995), Henriques *et al.* (1997) e Nickoloff e Hoekstra (1998). Os genes entre parênteses são alelos.

### 1.1.1 Reparação por excisão de nucleotídeos (NER)

A reparação por excisão de nucleotídeos (NER) representa a mais importante via de reparação unicamente adaptada para remover uma grande variedade de lesões no DNA, particularmente aquelas que causam distorções na dupla hélice do DNA (Guzder *et al.*, 1995), como danos induzidos pela luz UV, e pontes intra e intercadeias de DNA (Braithwaite *et al.*, 1999; Prakash e Prakash, 2000).

Em humanos, um defeito em NER resulta em doenças como xeroderma Pigmentosum (XP), síndrome de Cockayne (CS) e Tricodistrofia ou PIBIS. Indivíduos XP são extremamente sensíveis à luz UV e neles a incidência de câncer de pele induzido pela luz solar é aproximadamente 2000 vezes maior do que em indivíduos normais (Hoeijmakers, 1993; Wood, 1997; Prakash e Prakash, 2000).

O NER compreende uma série de reações enzimáticas necessárias para remover lesões no DNA, iniciando por uma etapa de reconhecimento da lesão onde diversas proteínas ligam-se ao DNA lesado, fazem duas incisões na fita simples (3' e 5' ao dano) e removem o fragmento de oligonucleotídeos contendo a lesão, cujo tamanho geralmente é fixo e independente da natureza do dano (Prakash e Prakash, 2000). Posteriormente, a DNA polimerase, DNA ligase e outras proteínas preenchem a lacuna deixada para regenerar uma fita de DNA intacta (Friedberg *et al.*, 1995; Nickoloff e Hoekstra, 1998; Braithwaite *et al.*, 1999). Este esquema básico, e bastante conservado evolutivamente, parece ser o mesmo para *E. coli*, mamíferos e leveduras (Friedberg *et al.*, 1995; Sweder, 1994; Wood, 1997; Braithwaite *et al.*, 1999; Benhamou e Sarasin, 2000; Prakash e Prakash, 2000).

Na levedura *S. cerevisiae*, fazem parte do NER vários genes que codificam proteínas essenciais para o reconhecimento da lesão e incisão do DNA, tais como os genes *RAD1*, *RAD2*, *RAD3*, *RAD4*, *RAD10*, *RAD14*, *SSL1*, *SSL2/RAD25*, *TFB1*, *TFB2* e *TFB3*. Alterações em quaisquer desses genes levam a um aumento na sensibilidade das células de levedura à ação de diversos agentes mutagênicos, principalmente à radiação UVC. Além dessa, há uma outra classe de genes não essenciais ao NER como *RAD7*, *RAD16*, *RAD23*, *RAD24* e *MMS19*. Mutações nestes genes apresentam sensibilidade moderada à UVC e a outros agentes causadores de lesões ao DNA; os efeitos adversos sobre a incisão de danos no DNA são menores do que em mutantes de genes essenciais (Bang *et al.*, 1992; Sweder e Hanawalt, 1992; Friedberg *et al.*, 1995; Prakash e Prakash, 2000).

O NER está subdividido em duas vias, parcialmente sobrepostas, em que uma seria especializada na reparação de fitas transcritas de genes ativos chamada de reparação acoplada à transcrição (TCR), e a outra estaria envolvida na reparação global do genoma, um processo que opera sobre o DNA de regiões silenciosas, incluindo fitas não transcritas de genes ativos (Hoeijmakers, 1993; Selby e Sancar, 1993; Verhage *et al.*, 1996; Laat *et al.*, 1999).

A velocidade de atuação de NER em fitas transcritas de genes ativos é maior do que em fitas não transcritas. Este efeito é devido à reparação preferencial de regiões transcricionalmente ativas de DNA (Friedberg *et al.*, 1995; Sancar *et al.*, 1996). O fenômeno de TCR tem sido documentado em *Escherichia coli*, leveduras e humanos (Sweder e Hanawalt, 1992; Mellon e Hanawalt, 1989). Células originadas de pacientes com CS apresentam defeitos na TCR (van Hoffen *et al.*, 1993). A CS é uma doença rara, autossômica, caracterizada primariamente por defeitos neurológicos e crescimento retardado. Os genes humanos CSA e CSB apresentam homologia com os genes de leveduras RAD26 e RAD28 (Prakash e Prakash, 2000).

### **1.1.2 Reparação pós-replicativa e/ou mutagênica**

A via RAD6 é responsável pela tolerância celular a uma variedade de lesões que bloqueiam a replicação de DNA (Xiao *et al.*, 2000), e também pela indução de mutagênese em células de levedura (Lawrence, 1994).

O DNA lesado normalmente bloqueia a maquinaria de replicação, entretanto a replicação da fita lesada pode ocorrer pela síntese translesão, na qual uma DNA polimerase especializada, presumidamente mais tolerante às alterações na estrutura molde que as replicases normais, insere um nucleotídeo correto ou incorreto no lado oposto à base lesada e então prolonga a cadeia (Johnson *et al.*, 1999b; Prakash *et al.*, 2000; Lawrence *et al.*, 2000). A

parada da maquinaria de replicação no sítio da lesão pode também resultar na formação de uma lacuna na nova fita sintetizada no lado oposto a lesão. Esta lacuna é sintetizada por meios recombinacionais ou não recombinacionais que utiliza o DNA duplex homólogo não lesado (Prakash *et al.*, 2000).

Mutantes deste grupo em geral são sensíveis à radiação UVC e ionizante (para revisão, ver Henriques e Moustacchi, 1980; 1981; Moustacchi *et al.*, 1983; Averbek *et al.*, 1992; Nickoloff e Hoekstra, 1998; Game, 2000), apresentando uma redução ou bloqueio na mutagênese induzida por diversos agentes (Prakash, 1976; Lawrence, 1994; Nickoloff e Hoekstra, 1998; Game, 2000). Alguns são defectivos em reparação pós-replicativa de DNA, presumidamente devido a um fracasso ou a uma falha para fechar as lacunas no DNA fita simples no lado oposto à lesão (Bailly *et al.*, 1997; Nickoloff e Hoekstra, 1998).

O grupo caracteriza-se pela sua complexidade, a qual resulta das diferenças fenotípicas apresentadas pelos seus mutantes. Mutantes *rad6* apresentam deficiência na reparação pós-replicativa e acentuada diminuição da mutagênese após tratamento com vários agentes que causam danos no DNA (Prakash, 1974; 1981; Lawrence, 1982; Prakash *et al.*, 1993), independente do tipo de dano ou de locus da mutação observada, com exceção da mutagênese do DNA mitocondrial (Friedberg *et al.*, 1995). São extremamente sensíveis à radiação UVC, raios  $\gamma$ , agentes alquilantes, psoralenos fotoativados e a vários agentes químicos (Prakash *et al.*, 1989; Koken *et al.*, 1991; Nickoloff e Hoekstra, 1998). Por outro lado, mutações *rev* e *umr* mostram sensibilidade igual a das linhagens selvagens correspondentes (Lawrence *et al.*, 1982). Além disso, mutantes *rev* possuem diferentes graus de bloqueio na mutagênese induzida, dependendo do alelo (para revisão, ver Prakash *et al.*, 1993).

Xiao *et al.* (2000) sugerem que a via RAD6 é dividida em três e não em duas sub-vias independentes como se acreditava anteriormente, representadas pelos genes *RAD5*, *POL30* e *REV3*; as vias *RAD5* e *POL30* são supostamente livres de erros, enquanto a via *REV3* é largamente mutagênica.

O gene *RAD30* codifica uma nova DNA polimerase Pol  $\eta$ , homóloga ao gene *DinB*, *UmuC* de *E. coli*, e *REV1* de *S. cerevisiae* (Roush *et al.*, 1998; Johnson *et al.*, 1999b). A Pol  $\eta$ , distinta das Pols  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$  e  $\gamma$ , catalisa a síntese livre de erro sintetizando dímeros de timina com alta fidelidade (Johnson *et al.*, 1999b). *In vitro*, esta polimerase replica eficientemente após o *bypass* de TT CPD (anel ciclubutano entre timinas), inserindo uma adenina oposta a cada timina, uma lesão que normalmente bloqueia a DNA polimerase (Johnson *et al.*, 1999b; Kunz *et al.*, 2000; Prakash *et al.*, 2000). Mutações em seu homólogo em humanos hRAD30 foram encontradas em pacientes XP (Johnson *et al.*, 1999b; Masutani *et al.*, 1999), cujas células apresentam defeitos na atividade da Pol  $\eta$  (Masutani *et al.*, 1999; Hübscher *et al.*, 2000; Game, 2000; Prakash *et al.*, 2000).

Os genes *REV* constituem a bem definida via síntese translesão que replica o DNA, sintetizando lesões, com baixa fidelidade (Lawrence e Hinkle, 1996). Os mutantes *rev* da via mutagênica foram inicialmente isolados por apresentarem uma frequência extremamente reduzida em mutagênese induzida após tratamento com UVC (Lemontt, 1971; 1972). Os genes *REV1*, *REV3* e *REV7* são requeridos para a mutagênese induzida por radiação UVC, enquanto *RAD5*, *RAD30*, *POL30* e *MMS2* fazem parte de uma via alternativa livre de erro para a síntese de lesões no DNA induzidas por UV (Johnson *et al.*, 1999a; Kunz *et al.*, 2000).

Um grande número de evidências aponta para a existência de uma via livre de erro, pós-replicativa, distinta da mutagênica. A via mediada por *RAD5/REV2* é tida como livre de erro, pois uma deleção no gene *RAD5* não interfere significativamente na mutagênese induzida por UV. Os genes *RAD5* e *POL30* foram designados para duas vias de reparação pós-replicativa distintas baseados sobre a interação sinérgica entre os mutantes *rad5* e *pol30-46* (Xiao *et al.*, 2000).

### 1.1.3 Reparação de DNA por recombinação homóloga

Existem muitas evidências de que a tolerância aos danos no DNA, associada aos mecanismos recombinacionais, é iniciada por quebras de cadeias. Quebras de cadeias duplas ou *double strand breaks* (DSBs) são uma importante forma de danos no DNA que, se mal reparadas, podem resultar em deleções mutagênicas, rearranjos ou translocações, (Parshad e Sanford, 2001) e, se não reparadas, podem levar a perdas de cromossomos e morte celular (Friedberg *et al.*, 1995; Nickoloff e Hoekstra, 1998). A reparação de lesões na simples fita de DNA de leveduras é realizada utilizando imediatamente a fita complementar acessível como modelo, mas isso não é possível para DSBs (Friedberg *et al.*, 1995), que podem ser reparadas pela ligação direta para prevenir perda de cromossomos e aumentar a sobrevivência celular, mas com um custo mutagênico, se impreciso. Alternativamente, a reparação de DSBs pode ser realizada com alta fidelidade através de recombinação homóloga (Shinohara e Ogawa, 1998). Genes envolvidos em vias recombinacionais são conservados entre eucariotos superiores e inferiores. O mesmo é verdadeiro para o mecanismo recombinacional (Friedberg *et al.*, 1995). Células diplóides apresentam maior resistência aos efeitos das radiações ionizantes do que células haplóides, e células haplóides em fase G2 do ciclo celular, durante a replicação do DNA, são mais resistentes do que células em fase G1 (Nickoloff e Hoekstra, 1998). Os genes de *S. cerevisiae* que participam do processo de reparação recombinacional são colocados no grupo de epistasia liderado pelo gene *RAD52*. Os alelos defectivos dos genes deste grupo conferem especial sensibilidade à radiação ionizante e a produtos químicos que induzem quebras de cadeia do DNA, mas não são sensíveis nem mostram alteração de freqüências mutagênicas após irradiação com UVC (Nickoloff e Hoekstra, 1998).

DSBs são induzidas por uma variedade de agentes que danificam DNA, incluindo radiações ionizantes, químicos radiomiméticos, ou, indiretamente,

pela remoção de agentes intercalantes como furocumarinas, mostardas nitrogenadas e metilmetano sulfonato, ou ainda pela remoção de lesões muito próximas, mas em cadeias opostas (Magaña-Schwencke *et al.*, 1982; Game, 1993; Nickoloff e Hoekstra, 1998; Game, 2000).

Mutações nos genes desta via de reparação (RAD52), quando em homozigose, podem provocar deficiência em meiose, afetando a taxa de produção e viabilidade dos esporos, e as frequências de recombinação mitótica e meiótica, após tratamento mutagênico (Henriques e Brendel, 1990; Nickoloff e Hoekstra, 1998).

Na primeira etapa da meiose, as quebras de cadeias duplas são introduzidas em *loci* específicos no cromossomo e servem como sítios de iniciação da recombinação (Friedberg *et al.*, 1995; Nickoloff e Hoekstra, 1998). Mutações nos genes deste grupo também afetam a troca do sinal de acasalamento, que envolve o processamento de quebras duplas em alvos definidos e a transferência da seqüência de DNA do locus silencioso *HML* ou *HMR* para o locus ativo *MAT* (Haber, 1992). Há também outros genes cujos produtos não atuam diretamente na reparação de quebras duplas, mas têm uma função no processo recombinacional, como por exemplo, o *CDC1*, envolvido no ciclo de divisão celular (Ramotar e Masson, 1996; Kupiec, 2000).

#### **1.1.4 Reparação de DNA por recombinação não-homóloga ou ilegítima**

Em leveduras, DSBs são reparadas predominantemente por recombinação homóloga, dependente do gene *RAD52*, enquanto em vertebrados, a reparação de DSBs se dá principalmente por recombinação não-homóloga, dependente do gene *KU*. Estudos bioquímicos indicam que a proteína *KU* liga-se à extremidade do DNA e facilita a re-junção. O gene *RAD52* de humanos, semelhante ao gene *KU*, codifica uma proteína que se liga



diretamente às DSBs, protegendo-as da atividade de exonucleases e facilitando as interações entre as extremidades (Van Dick *et al.*, 1999).

A via de reparação de DBSs por recombinação não-homóloga em mamíferos inicia com a ligação das extremidades livres pela proteína quinase dependente de DNA (DNA-PK) (Price *et al.*, 1997). A DNA-PK é composta por três subunidades as proteínas Ku70 e Ku80 e uma subunidade catalítica de 465kDa (Braithwaite *et al.*, 1999; Game, 2000). As proteínas Ku70 (70kDa) e Ku80 (86kDa) formam um heterodímero que se liga fortemente às extremidades livres do DNA e, subseqüentemente, ativam a subunidade catalítica da DNA-PK. Esta reparação pode também requerer endonucleases específicas tal como o produto dos genes *FEN-1* e *XPF-ERCC1* (Braithwaite *et al.*, 1999).

O componente KU serve como uma subunidades regulatória da DNA-PK (Smider e Chu, 1997), aumentando a precisão da reparação, possivelmente protegendo as extremidades livres do ataque nucleolítico (Boulton e Jackson, 1996).

A levedura *Saccharomyces* utiliza a via de recombinação não-homóloga mais do que previamente suspeitava-se, mas somente para ligar extremidades curtas complementares; leveduras não são muito eficientes para juntar extremidades incompatíveis. Mamíferos usam outras micro-homologias mais distantes da extremidade para produzir junções, mas esta atividade é ineficiente em leveduras. Além disto, em leveduras não ocorre a associação entre KU e a subunidade catalítica da proteína quinase, DNA-PKcs, enquanto em mamíferos a recombinação não-homóloga é fortemente influenciada por esta proteína (Haber, 2000).

Em células de leveduras, a recombinação não-homóloga também é dependente dos genes *MRE11*, *RAD50* e *XRS2*. As proteínas codificadas por estes três genes formam um complexo com DNA desenrolado e apresentam atividade de nuclease (Haber, 2000).

Existe uma grande especulação a respeito do papel das proteínas *Sir* em recombinação ilegítima. Estas proteínas estão envolvidas na remodelação da

estrutura da cromatina; por isso a idéia de que as proteínas Sir recrutadas pela proteína Ku formariam ao redor das extremidades quebradas uma estrutura semelhante a de uma heterocromatina condensada, para retardar a degradação e facilitar a recombinação não-homóloga (Haber, 2000).

## 1.2 AGENTES QUE LESIONAM A CÉLULA

### 1.2.1 Radiação UV

A radiação UV é o primeiro e mais bem estudado agente capaz de provocar danos e por consequência induzir a reparação de DNA. O espectro da luz ultravioleta (UV) está dividido em três bandas: UVA (400-320nm), UVB (320-290nm) e UVC (290-100nm). Embora a maior parte dos estudos baseiem-se na radiação de comprimento de onda curto, que não atinge praticamente a face terrestre, outros alertam para o fato de que a radiação de maiores comprimentos de onda provocaria os mesmos danos, somente em menor intensidade (Friedberg *et al.*, 1995). Os danos gerados por radiação UV mais comumente estudados são os dímeros de pirimidina e os fotoprodutos 6-4.

#### 1.2.1.1 Dímeros de Pirimidina

A exposição do DNA à radiação de comprimento de onda curto (UV<sub>254nm</sub> ou UVC) promove a ligação covalente entre as bases pirimídicas adjacentes, formando uma estrutura anelar de ciclobutano chamada dímero de pirimidina, CPD, ou ainda, dipirimidina ciclobutano, resultante da saturação de suas duplas ligações C5=C6 (Figura 1).

Estes dímeros são extremamente estáveis mesmo em pHs e temperaturas extremas, inclusive após hidrólise ácida do DNA. Entretanto, a formação de dímeros durante irradiação de DNA é um processo reversível que se mantém em equilíbrio.

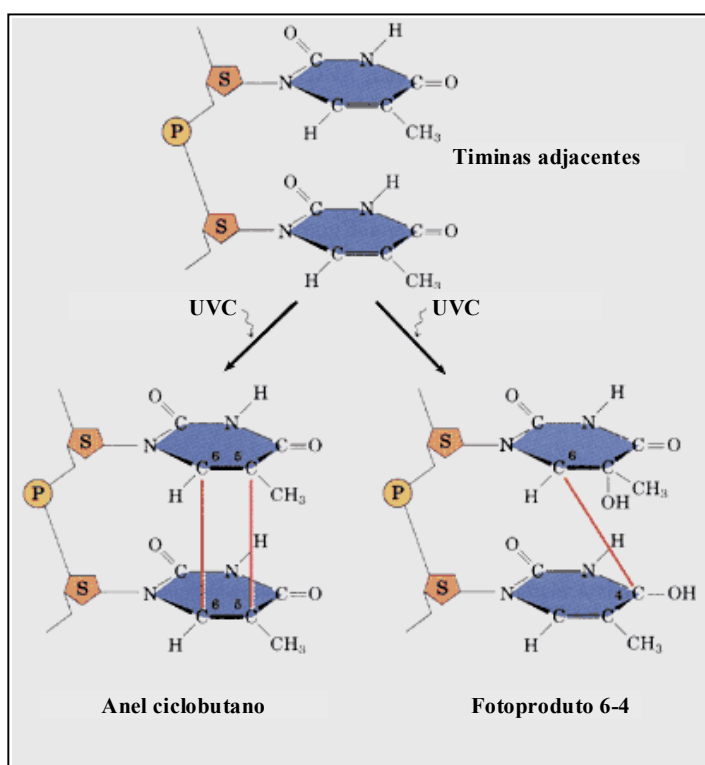
É mais freqüente a formação de dímeros de pirimidinas entre as timinas do que entre as citosinas, sendo quase 70% T-T, 15%T-C e 3% C-C

(Friedberg *et al.*, 1995). CPDs provocam grandes distorções na hélice de DNA, provocando uma parada obrigatória na replicação, devido à impossibilidade de inserir bases para formar pontes de hidrogênio estáveis (Chan *et al.*, 1985; Friedberg *et al.*, 1995).

#### **1.2.1.2 Fotoprodutos 6-4 (Pirimidina-pirimidina)**

Semelhante à formação de dímeros de pirimidina, após a exposição à UVC pode ocorrer uma ligação entre o C6 de uma timina e o C4 da timina adjacente. A dupla ligação da pirimidina 5' abre-se e reage com o grupo exocíclico da pirimidina 3' (Friedberg *et al.*, 1995), gerando maior distorção na estrutura do DNA (Taylor *et al.*, 1988) (Figura 1). São lesões álcali-lábeis (Lippke *et al.*, 1981). Essa ligação ocorre mais freqüentemente entre as citosinas (T-C, C-C) do que entre as timinas (T-T), porém não entre C-T. A metilação da citosina na posição C-5 aparentemente inibe a formação de fotoprodutos 6-4 (Friedberg *et al.*, 1995).

Lesões semelhantes a dímeros de pirimidina e fotoprodutos 6-4 podem ser geradas por agentes químicos como o UV mimético 4-NQO (óxido de 4-nitroquinolina). O 4-NQO é considerado um agente químico UV-mimético porque produz lesões de bases que, da mesma forma que os CPDs e 6-4 fotoprodutos, são reparados pelo sistemas NER. É capaz de formar lesões do tipo 8-hidroxi-2-deoxiguanosina (8-OH-dG), e de gerar uma quantidade significativa de quebras no DNA (Friedberg *et al.*, 1995).



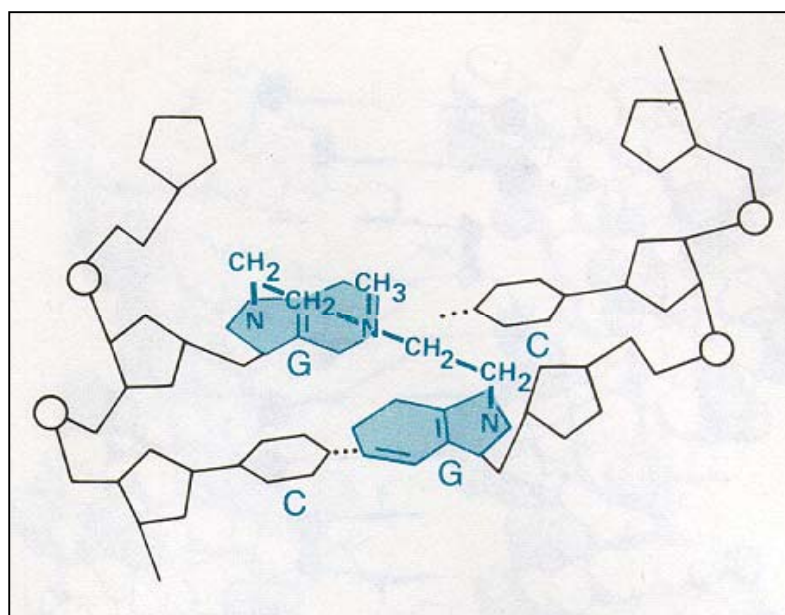
**Figura 1.** Representação esquemática de um anel ciclobutano entre duas timinas na mesma cadeia de DNA e um fotoproduto 6-4, produzido pela ligação entre o C6 de uma timina e o C4 da timina adjacente (Modificado de [www.cpmcnet.columbia.edu](http://www.cpmcnet.columbia.edu)).

### 1.2.2 Agentes alquilantes

Agentes alquilantes são compostos eletrofilicos capazes de interagir covalentemente com centros nucleofílicos de moléculas orgânicas, como o DNA. Podem ser mono ou bifuncionais. Os agentes monofuncionais possuem um único grupo reativo e, portanto, interagem covalentemente com um único centro nucleofílico no DNA. São exemplos destes compostos o metilmetanosulfonato (MMS), etilmetanosulfonato (EMS), dimetilnitrosoamina, N-

metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina (MNNG), e mostarda nitrogenada monofuncional (HN1).

Os agentes alquilantes bifuncionais apresentam dois grupos reativos, e cada molécula é potencialmente capaz de reagir com dois sítios no DNA. Por exemplo, mostarda nitrogenada bifuncional (HN2) e diepoxioctano (DEO). Quando os dois sítios da reação localizam-se na mesma cadeia de DNA, o produto da reação chama-se ponte intracadeias; em cadeias opostas do DNA, o produto da reação chama-se ponte intercadeia (Figura 2). Os efeitos gerados por agentes que provocam pontes intercadeias são significativos, já que impedem a separação da dupla fita de DNA, bloqueando a replicação e a transcrição.



**Figura 2.** Representação esquemática de uma ponte intercadeia formada por mostarda nitrogenada, através dos N7 entre guaninas de fitas opostas de DNA (Friedberg *et al.* 1991).

### 1.2.3 Psoralenos/Furocumarinas

As furocumarinas, ou psoralenos são compostos aromáticos tricíclicos de origem natural como o 8-metoxipsoraleno (8-MOP), ou sintética como o 3-carbetoipsoraleno (3-CPs), formados a partir da condensação do núcleo cumarínico (benzo- $\alpha$ -pirona ou 1,2-benzopirona) com o grupo furano (Averbeck *et al.*, 1992; Gasparro *et al.*, 1998).

Os psoralenos intercalam-se entre os pares de bases do DNA de maneira reversível através de ligações químicas de natureza fraca, como forças de Van der Waals e pontes de hidrogênio. Na presença de luz UV de 365nm (UVA), adicionam-se às bases pirimídicas, principalmente timinas, através de ligações covalentes, formando adutos. Estas fotoadições podem ocorrer na forma de mono ou biadições, dependendo da estrutura molecular da furocumarina.

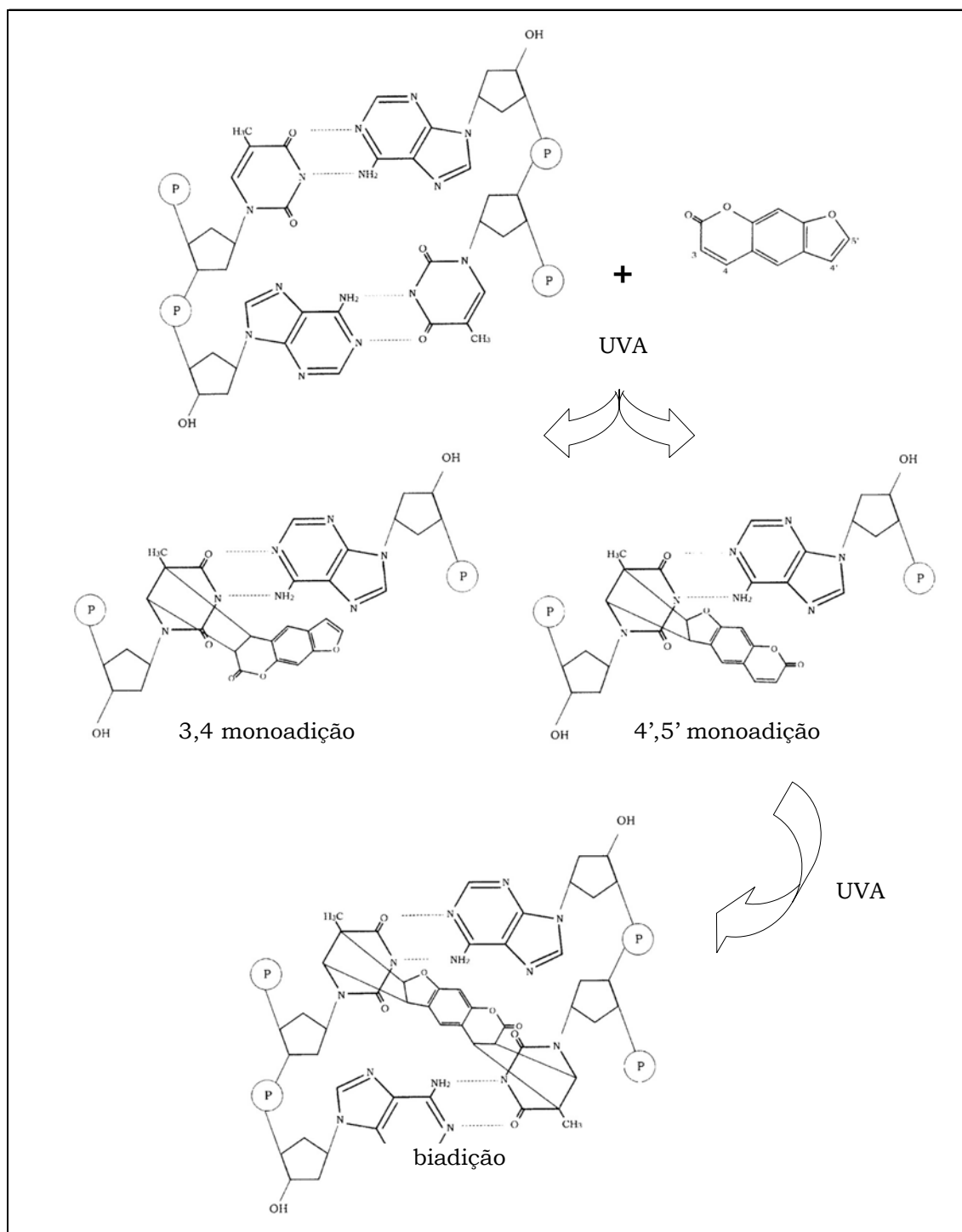
Nas monoadições, a dupla ligação C5-C6 da base pirimídica liga-se à dupla ligação C3-C4 do núcleo cumarínico (monoadições do tipo 3,4) ou à dupla ligação C4-C5 do grupo furano (monoadições do tipo 4',5') (Figura 3). As monoadições do tipo 3,4 são incapazes de absorver novos fótons de comprimento de onda superior a 320nm (Dall'Acqua *et al.*, 1979), entretanto as monoadições do tipo 4'-5' podem absorver um fóton adicional de 365nm e uma segunda fotoadição pode ocorrer entre a dupla ligação C3-C4 do anel cumarínico e outra pirimidina localizada na cadeia oposta do DNA, conduzindo à formação de uma ponte entre as cadeias do DNA (melhor conhecidas como *Interstrand Cross Links*, ICLs). Furocumarinas que possuem tanto o sítio C3-C4 do anel cumarínico como o C4-C5 do anel furano disponíveis e apresentam uma conformação planar podem formar tanto monoadições quanto biadições, sendo denominadas bi-funcionais, como os agentes 8-MOP e TMP (trimetoxipsoraleno). Por outro lado, moléculas angulares ou com algum impedimento estérico num dos sítios fotorreativos poderão formar somente monoadições. Exemplos desses agentes, denominados monofuncionais, são

o 3-CPs e a Angelicina (Averbeck, 1984; Averbeck *et al.*, 1992; Friedberg *et al.*, 1995; Henriques *et al.*, 1997).

Através dessas fotoadições, as furocumarinas podem causar diversos efeitos genotóxicos ao DNA, resultando em letalidade, mutagênese e recombino gênese, em procariotos e eucariotos (Parsons, 1980; Moustacchi, 1988; Averbeck *et al.*, 1992).

Foi demonstrado, entretanto, que as furocumarinas fotoativadas, especialmente o 3-CPs, podem também transferir energia para moléculas aceptoras, originando agentes fotodinamicamente ativos. Desta forma, a transferência de energia das moléculas de furocumarinas no estado excitado triplete para o oxigênio molecular origina uma espécie excitada mais reativa, o oxigênio *singlet*, que oxida os substratos com os quais entra em contato (Averbeck, 1989; Sage *et al.*, 1989; Averbeck *et al.*, 1992).





**Figura 3.** Representação esquemática da fotoadição de furocumarinas ao DNA. Após a intercalação da molécula de psoraleno entre os pares de bases do DNA, um fóton de 365 nm é absorvido gerando uma monoadição. Monoadições do tipo 4',5' permitem a absorção de um segundo fóton de 365 nm e formação de pontes ligando pirimidinas adjacentes.

### 1.3 OS MUTANTES *PSO*

Em 1980, Henriques e Moustacchi isolaram, a partir de uma população de células mutagenizada com EMS, uma nova classe de mutantes de *Saccharomyces cerevisiae* sensíveis à fotoadição de psoralenos mono-(3-CPs) e bi-funcionais (8-MOP): os mutantes *psa*.

A análise molecular desses genes e a caracterização fenotípica de seus alelos mutantes têm progredido consideravelmente. Atualmente, dez genes *PSO* estão caracterizados fenotipicamente; destes, seis genes codificam proteínas que estão envolvidas na reparação de lesões no DNA geradas pela fotoativação de psoralenos e por outros mutágenos. Dois genes não estão envolvidos diretamente na reparação de lesões de DNA: o gene *PSO6* é responsável por elementos estruturais da membrana e o gene *PSO7* envolvido com o metabolismo respiratório celular.

As características dos genes *PSO1* a *PSO10* estão apresentadas na tabela 4 (para revisão, ver Henriques e Brendel, 1990; Henriques *et al.*, 1997; Brendel e Henriques, 2001).

O gene *PSO1* é alelo ao gene *REV3* (Cassier e Moustacchi, 1988). O produto do gene *REV3* codifica uma proteína não essencial de 173kDa, uma DNA polimerase específica de reparação (Morrison *et al.*, 1989) que, junto com *REV7*, constitui a polimerase translesão zeta (pol  $\zeta$ ), uma proteína responsável pela síntese translesão (TLS) sujeita a erro, que faz o *bypass* de dímeros de pirimidina (Nelson *et al.*, 1996). A atividade da pol  $\zeta$  é controlada pela pRev1, então a perda da função de um ou outro destes três *loci REV* inibe a TLS sujeita a erro, portanto a mutagênese induzida por UVC (Lawrence e Hinkle, 1996; Brendel e Henriques, 2001). O alelo mutante *rev3* foi isolado por Lemontt (1971), entre outros mutantes de levedura bloqueados em mutação induzida por UVC (Lemontt, 1971; Brendel e Henriques, 2001). O mutante *psa1/rev3* é sensível a uma série de agentes genotóxicos como radiação UVC, raios X, agentes alquilantes mono e bi-funcionais e psoralenos

fotoativados (Moustacchi, 1988; Henriques e Brendel, 1990; Henriques *et al.*, 1997; Brendel e Henriques, 2001), sua freqüência de mutação reversa espontânea e induzida é extremamente reduzida, apresentando um fenótipo antimutador (Cassier *et al.*, 1980; Henriques *et al.*, 1997).

O gene *PSO2* é alelo do gene *SNM1* (Cassier e Moustacchi, 1988). Estudos moleculares demonstraram que o gene *PSO2/SNM1* codifica uma proteína nuclear não essencial de 76kDa, com um domínio do tipo dedos de zinco, característico de proteínas ligantes ao DNA, que pode, contudo, não ser importante para sua função em remover ICLs, desde que sua remoção mutacional manteve a resistência da célula semelhante à selvagem para sensibilidade a HN1 (Haase *et al.*, 1989). O gene *PSO2* é pobremente transcrito (aproximadamente 0,3 transcritos/célula) (Richter *et al.*, 1992), mas pode ser induzido cerca de quatro vezes mais por mutágenos que produzam ICL, incluindo UVC, mas não por agentes alquilantes monofuncionais como MNNG e por UV mimético 4-NQO (Wolter *et al.*, 1996). O mutante *pso2-1* incisa perto de sítios de DNA contendo ICL no locus transcricionalmente ativos *MAT $\alpha$* , mas não faz o mesmo no locus silencioso *HML $\alpha$* , sugerindo uma associação de *PSO2* com NER de genes transcricionalmente ativos (Meniel *et al.*, 1995). Mutantes *pso2/snm1* são capazes de incisar próximo às pontes intercadeias fotoinduzidas, mas são incapazes de reconstituir DNA de alto peso molecular, indicando então um bloqueio na etapa pós-excisão no mecanismo de reparação de ICL no DNA, independente de sua natureza química (Maganã-Schwencker *et al.*, 1982). São sensíveis aos agentes mutagênicos bi ou poli-funcionais, que induzem a formação de pontes intercadeias no DNA, como as mostardas nitrogenadas e sulfúricas e psoralenos fotoativados (Henriques *et al.*, 1997). A sensibilidade de mutantes *pso2/snm1* é independente do tipo de base envolvida na formação de ICLs. Dependendo do mutágeno usado, pode existir uma grande diferença na estabilidade de ICL, e a indução de mutagênese e recombinação mitótica podem ser total ou parcialmente bloqueadas (Brendel e Henriques, 2001).

O mutante *pso3-1* apresenta sensibilidade ao tratamento com psoralenos mono e bi-funcionais, é levemente sensível à radiação UVC, a mostardas nitrogenadas mono e bi-funcionais e, embora não afete a resistência a agentes alquilantes e à radiação gama, este mutante apresenta uma redução na mutagênese induzida por tais agentes (Moustacchi *et al.*, 1983; Henriques e Brendel, 1990; Meira *et al.*, 1994; Henriques *et al.*, 1997). Também é parcialmente defectivo na mutação reversa induzida e mutação para frente e é defectivo em recombinação mitótica espontânea e induzida, especialmente em conversão gênica (Andrade *et al.*, 1989). Estudos realizados através de interação gênica com os mutantes *rad* revelaram uma interação epistática do mutante *pso3-1* com *rad3* e *rad5* e *pso2-1*, pertencente ao grupo de epistasia RAD3.

A sensibilidade do mutante *pso3-1* ao ânion superóxido gerado pelo paraquat, à H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, à cloreto de cádmio e ao formaldeído sugere que este gene participe da reparação de lesões produzidas por estresse oxidativo (Henriques *et al.*, 1997; Brendel *et al.*, 1998). Entretanto, Brendel *et al.* (1998), mostraram que alguns fenótipos relacionados ao mutante *pso3-1* eram atribuídos aos baixos níveis de glutathione (GSH) na célula do mutante original e na linhagem selvagem N123, da qual todos os mutantes *pso*, com exceção do *pso4-1*, foram derivados. O gene *GSH1* codifica a enzima  $\gamma$ -glutamil-cisteína sintetase, a qual é requerida no primeiro passo da biossíntese de glutathione. Os fenótipos de resistência a MNNG, sensibilidade a cádmio e formaldeído, bem como a instabilidade das mitocôndrias foram complementados quando o mutante *pso3-1 gsh1-leaky* foi transformado com gene *GSH1*. Entretanto, a sensibilidade para UVC, a psoralenos fotoativados, a paraquat e a peróxido de hidrogênio, e a redução das taxas de mutagênese induzidas por UVC foram mantidas (Brendel *et al.*, 1998).

O mutante *pso4-1*, chamado originalmente de *xs9*, uma vez que foi isolado através de sua moderada sensibilidade a raios X (Benaten e Beam, 1977), foi posteriormente renomeado para *pso4-1* devido a sua alta

sensibilidade ao psoraleno 8-MOP+UVA (Henriques *et al.*, 1989). Esta mutação confere um fenótipo pleitrópico em defeitos na reparação (Henriques *et al.*, 1997) e é um mutante termocondicional, sem viabilidade a 36°C (Brusky *et al.*, 2000). A clonagem molecular mostrou que o gene *PSO4* é alelo ao gene *PRP19* (Grey *et al.*, 1996). Este gene essencial de levedura codifica uma proteína de 56,7 kDa associada ao spliceossoma (Cheng *et al.*, 1993). A disrupção deste gene é letal em células haplóides (Grey *et al.*, 1996) e diplóides heteroalélicas *pso4-1/pso4Δ*, embora viáveis, demonstram retardo no crescimento (Grey *et al.*, 1996). Mutantes diplóides homozigóticos são defectivos em esporulação e mostraram uma redução acentuada em recombinação meiótica e mitótica (Meira *et al.*, 1992; Silva *et al.*, 1995; Morais *et al.*, 1996). A análise de epistasia para sensibilidade a 8-MOP+UVA mostrou que o gene *PSO4* encontra-se também na via de reparação recombinacional RAD52 (Henriques *et al.*, 1997). As funções da proteína Prp19/Pso4 atuando no spliceossoma, o envolvimento na reparação de DNA sujeita a erros e suas atividades recombinacionais indicam que esta proteína pode estar associada com pelo menos dois complexos protéicos distintos na célula: um envolvendo o processamento de pré-mRNA e outro na reparação recombinacional (Revers *et al.*, 2002). Assim, a sensibilidade a mutágenos, as baixas taxas de mutabilidade, recombinação e esporulação encontradas para o mutante *pso4-1* e suas diplóides homozigóticas, podem ser resultado de uma ausência ou falha no processamento de determinados pré-mRNAs relacionados a tais funções (Revers *et al.*, 2002).

O gene *PSO5* mostrou-se alélico ao gene *RAD16* (Paesi-Toresan *et al.*, 1995) o qual tem função na reparação do genoma global de leveduras, reparando preferencialmente CPDs induzidas por UV em cadeias não transcritas de DNA (*loci HMLa* ou *HMLα*) em regiões silenciosas do DNA, e fitas não transcritas de DNA de genes ativos (Bang *et al.*, 1992; Schild *et al.*, 1992; Verhage *et al.*, 1994). O gene *PSO5/RAD16* codifica uma proteína de 91,3 kDa e contém dois possíveis domínios dedos-de-zinco e várias outras regiões típicas

de helicases que são também encontradas em outras proteínas de leveduras semelhantes a Snf2, Rad54 e Mot1 (Cassier e Moustacchi, 1981; Bang *et al.*, 1992; Schild *et al.*, 1992). A proteína codificada por este gene pertence à família *SNF2* de helicases. *RAD16* forma um complexo com *RAD7* chamado NEF-4 e liga-se ao DNA de maneira ATP dependente (Reed *et al.*, 1998; Guzder *et al.*, 1997; 1998; 1999; Prakash e Prakash, 2000). O mutante *pso5-1* caracteriza-se por apresentar sensibilidade moderada a UVC, UV-mimético 4-NQO, HN1 e HN2 (Querol *et al.*, 1994), apresenta sensibilidade cruzada ao psoraleno monofuncional 3-CPS+UVA e a outros agentes químicos que aumentam o estresse oxidativo da célula como H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e paraquat (Sage *et al.*, 1989; Averbeck *et al.*, 1992; Querol *et al.*, 1994). Estudos de interações protéicas utilizando o sistema diíbrido mostraram que a proteína Pso5/Rad16 interage com a proteína Sgs1 envolvida em envelhecimento (Saffi *et al.*, 2000; 2001). O produto do gene *SGS1* em humanos corresponde à síndrome de Werner, também conhecida como síndrome do envelhecimento precoce e síndrome de Bloom, com fenótipo de predisposição ao câncer (Watt *et al.*, 1995).

O gene *PSO6* é alelo ao gene *ERG3*, o qual codifica a enzima esteroil  $\Delta$ -5 desaturase, que introduz a dupla ligação C5=C6 durante a biossíntese do ergosterol (Schmidt *et al.*, 1999). O ergosterol é o esteroil mais abundante da membrana (90%) de leveduras (Thompson, 1974), em contraste a outras células eucarióticas que contêm colesterol como principal esteroil. A falta de ergosterol leva a alterações na rigidez e permeabilidade das membranas, assim como influencia a atividade de diversas proteínas ligadas à membrana, como quitina-sintetases (Schmidt *et al.*, 1999). Adicionalmente, há evidências de que o ergosterol sirva como um agente de extinção de oxigênio *singlet*, assim como absorva as reações de peroxidação de lipídios, gerada por radicais de oxigênio, atuando na proteção celular contra o estresse oxidativo (Schmidt *et al.*, 1999; Bocking *et al.*, 2000). Uma alteração no padrão normal de esteróis levaria a uma diminuição da proteção a agentes geradores de estresse oxidativo

presentes no metabolismo respiratório de fontes não fermentáveis de carbono (Schmidt *et al.*, 1999). O mutante *pso6-1* é deficiente na quantidade de esteróis na membrana celular, principalmente em ergosterol. Esta seria a explicação para a sensibilidade apresentada por este mutante frente a agentes geradores de estresse oxidativo como paraquat, peróxido de hidrogênio 3-CPs + UVA (Querol *et al.*, 1994; Schmidt *et al.*, 1999).

A clonagem e caracterização molecular do gene *PSO7* mostraram que este gene é alelo do *COX11*, o qual codifica uma proteína nuclear de 28kDa associada à membrana interna mitocondrial, responsável pela formação do complexo protéico da citocromo oxidase (CO), que catalisa o último passo de transferência de elétrons do citocromo c reduzido para oxigênio molecular, o acceptor da cadeia transportadora de elétrons (Pungartnik *et al.*, 1999). A ausência do grupo heme a/a<sub>3</sub>, característica dos mutantes *pso7/cox11*, diminui a eficiência de neutralização de EROs (espécies reativas de oxigênio) produzidas por 3CPs+UVA, assim como por outros tratamentos que geram estresse oxidativo (Pungartnik *et al.*, 1999). Devido à incapacidade da CO captar os elétrons presentes na cadeia transportadora de elétrons, aumenta o fluxo de elétrons disponível para o ciclo redox de 4-NQO e outros compostos químicos, produzindo maior quantidade de espécies ativas de oxigênio e conseqüentemente aumentando a sensibilidade da célula. Este mutante é também sensível ao agente químico UV mimético 4-NQO, mas mostrou resistência semelhante à selvagem ao agente 8-MOP+UVA, bem como ao tratamento com UV e HN2 (Pungartnik *et al.*, 1999).

**Tabela 2.** Propriedades das proteínas codificadas pelos genes *PSO* e os fenótipos dos seus alelos mutantes<sup>a</sup>

Gene/Alelo	Proteína (kDa)/Função	Fenótipo do mutante
<i>PSO1/REV3</i>	173; polimerase translesão (possível)	sensível à radiação e a agentes mutagênicos químicos baixa mutabilidade
<i>PSO2/SNM1</i>	72; desconhecida	sensível ao tratamento com todos os agentes indutores de pontes
<i>PSO3</i>	Desconhecida	redução na mutabilidade induzida e recombinação; células não atingem a fase estacionária de crescimento
<i>PSO4/PRP19</i>	56,7; proteína associada a spliceossoma	sensível a agentes mutagênicos, não recombina em mitose, baixa mutabilidade e defectivo em esporulação
<i>PSO5/RAD16</i>	91,3; DNA helicase	sensível à UVC e lesões oxidativas
<i>PSO6/ERG3</i>	43; ergosterol desaturase	sensível a danos oxidativos
<i>PSO7/COX11</i>	28; associa-se ao complexo citocromo-oxidase	células sensíveis à 4-NQO
<i>PSO8/RAD6</i>	19,5; enzima conjugada a ubiquitina	sensível à UVC e a vários agentes mutagênicos; mutagênese reduzida
<i>PSO9</i>	Desconhecida	sensível a vários agentes mutagênicos; mutagênese reduzida;
<i>PSO10</i>	Desconhecida	sensível a vários agentes mutagênicos; mutagênese reduzida bloqueado em esporulação

<sup>a</sup>Adaptado de Henriques *et al.* (1997); Brendel e Henriques (2001).

O mutante *pso8-1* foi fenotipicamente caracterizado pela sua sensibilidade a 3-CPs e 8-MOP fotoativados, bem como a UVC, MNNG, 4-NQO e a DEO. Também apresentou redução na mutagênese induzida e um fenótipo mutador espontâneo (Rolla *et al.*, 2001). Ensaio de interação gênica alocaram



o gene *PSO8* no grupo epistático *RAD6*, e sua recente clonagem revelou o alelismo entre *PSO8* e *RAD6* (Rolla *et al.*, 2002). O produto do gene *RAD6* é uma enzima ubiquitina-conjugante (Prakash 1974; Jentsch *et al.* 1987; Sung *et al.*, 1988; Hass *et al.*, 1990) envolvida em reparação de DNA, esporulação, recombinação mitótica e meiótica, indução de mutagênese espontânea e induzida e na via de degradação de proteínas (regra da extremidade N-terminal) (Morrison *et al.*, 1988; Dohmen *et al.*, 1991; Prakash *et al.*, 1993; Lawrence, 1994; Friedberg *et al.*, 1995), genes silenciosos (Bryk *et al.*, 1997; Huang *et al.*, 1997; Singh *et al.*, 1998) e transposição Ty1 (Picologlou *et al.*, 1990; Liebman e Newnam, 1993; Huang *et al.*, 1999).

O mutante *pso9-1* é o *pso* mais recentemente investigado. Caracterizado por sua sensibilidade a 3-CPs e 8-MOP fotoativados e por complementar a sensibilidade de todos os mutantes *pso*, descritos até então, esta mutação foi considerada um novo alelo envolvido na reparação do DNA. Este mutante é sensível a diversos agentes mutagênicos, incluindo UVC, 3-CPs e 8-MOP fotoativados, e MNNG. Apresenta redução na mutagênese induzida, quando tratado com psoralenos fotoativados e UVC (Machado, 2000). Esta mutação não afeta a esporulação, e, quando submetido a agentes oxidativos como H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e paraquat, o mutante *pso9-1* mostra resistência semelhante à linhagem selvagem (Machado, 2000). Estas características fenotípicas justificam sua associação ao grupo de reparação dos mutantes *pso*, sendo ainda necessária a clonagem do gene *PSO9* para fins de caracterização molecular e da localização funcional da proteína codificada por este gene.

## **OBJETIVOS**

A clonagem e a caracterização molecular dos genes *PSO* têm contribuído para o esclarecimento dos vários mecanismos que envolvem etapas multienzimáticas de reparação celular de lesões no DNA, assim como os mecanismos envolvidos na reparação de lesões induzidas por psoralenos fotoativados. Com a finalidade de buscar novas informações que possam auxiliar na melhor compreensão destes mecanismos, este trabalho teve por objetivo principal isolar e caracterizar molecularmente o gene *PSO9*, na levedura *Saccharomyces cerevisiae*.

## **CAPÍTULO II**

### **“Psoralen-Sensitive Mutant *pso9-1* of *Saccharomyces cerevisiae* Contains a Mutant Allele of the DNA Damage Checkpoint Gene *MEC3*”**

(Artigo em preparação para submissão à Revista Mutation Research-DNA Repair)

**Psoralen-Sensitive Mutant *pso9-1* of *Saccharomyces cerevisiae* Contains a Mutant  
Allele of the DNA Damage Checkpoint Gene *MEC3***

J. M. Cardone, R. M. Machado, L. F. Revers,  
M. Brendel, J. A. P. Henriques \*

Dept. de Biofísica / Centro de Biotecnologia, UFRGS, Av. Bento Gonçalves 9.500,  
Porto Alegre, RS, Brasil (pegas@dna.cbiot.ufrgs.br)

\*to whom correspondence should be addressed

**Abstract** – Complementation analysis of a *pso9-1* yeast mutant sensitive to photoactivated mono- and bifunctional psoralens, UV-light 254nm, and nitrosoguanidine, with *pso1* to *pso8* mutants, confirmed that it contains a novel *pso* mutation. Molecular cloning from a yeast genomic library suggested *pso9-1* to be a mutant allele of the DNA damage checkpoint control gene *MEC3*. Non-complementation of several sensitivity phenotypes in *pso9-1/mec3Δ* diploids verified allelism of both mutants. Sensitivity to calcofluor white and to caffeine was not increased in *mec3Δ* and *pso9-1* backgrounds, in relation to their respective WTs, suggesting that *pso9-1* does not carry a promoter mutation. The mutant phenotype of *mec3Δ* was slightly more pronounced for sensitivity to 8-MOP+UVA and UVC and for suppression of UVC-induced forward mutation than that exhibited by the *pso9-1* mutant, suggesting some residual function for the protein produced by this mutant allele.

**Key words** yeast - psoralen sensitivity – *MEC3* – DNA repair - checkpoint

## Introduction

The isolation of yeast mutants specifically sensitive to photoactivated mono- and bifunctional psoralens, so called *pso* mutants, was initiated by Henriques and Moustacchi (1980) in order to study possible genotoxic effects of these medically important furocoumarins applied in the phototherapy of dermatological disorders like psoriasis and vitiligo [1]. Depending on their molecular structure psoralens, when photoactivated by UVA (UV-light of 360 nm), may form mono- and diadducts with the thymines in DNA [2, 3, 4, 5, 6]. The diadduct results from two consecutive reactions of, e.g., 8-MOP and leads to DNA interstrand crosslinks (ICL). Psoralen sensitive mutants, therefore, are putatively DNA repair-deficient. These very stable ICL may be one of the most toxic types of DNA damage encountered by living cells, with one to two ICL per chromosome, i.e. 20 ICL contained in 16 chromosomes of a haploid *Saccharomyces cerevisiae*, being lethal [7]. Studies of *pso* mutants have contributed to our knowledge of the different interactions of photoactivated psoralen damage in DNA with repair functions that, when impaired or absent, may alter viability and mutagenic responses. These processes may have relevance to cancer induction in higher eukaryotes.

Phenotypic, genetical and molecular analysis of the hitherto known eight *pso* mutants have allowed their separation into 2 groups; those which seem directly involved in DNA repair and those that encode metabolic functions that protect from the genotoxic action of photoactivated psoralens. Whereas *PSO1* (allelic to *REV3*), *PSO2* (allelic to *SNMI*), *PSO3*, *PSO4* (allelic to *PRP19*), *PSO5* (allelic to *RAD16*) and *PSO8* (allelic to *RAD6*) encode proteins with apparent functions in error-free and error-prone repair [8] mutations in genes *PSO6* (allelic to *ERG3*) and *PSO7* (allelic to *COX11*) alter the respective mutants' sensitivities by interfering with protective mechanisms [9] or by modulating the metabolism of certain mutagens [10], respectively.

Maintaining genome integrity is the main challenge for living cells. Therefore, to achieve this ability cells have evolved surveillance mechanisms that monitor the structure of chromosomes and coordinate DNA repair and cell-cycle progression, termed checkpoints. Such a mechanism refers to the biochemical pathways which are activated in response to internal and external

agressions, that are responsible for the induction of transcriptional programs, for the inhibition of cell-cycle progression and for an increase in DNA repair [for reviews, see 11, 12, 13, 14].

To extend our understanding of the genetical and biochemical basis of DNA repair we have identified and cloned a further *pso* mutant from the original stock of mutagenized yeast cells [15]. In this report, we describe the phenotypical characteristics and the molecular cloning of a novel *pso* mutant which complemented all hitherto described *pso* mutant strains (*pso1* to *pso8*). We show that mutagen sensitivity of the mutant strain *pso9-1* is due to a deficiency in an important checkpoint protein, encoded by the yeast *MEC3* gene.

## Materials and methods

*Strains, plasmids and media.* The genetic constitution of the yeast strains used in this study is given in table 1. The *Escherichia coli* strain TOP10 (Invitrogen) was employed for plasmid manipulation and propagation. A yeast genomic library contained in the centromeric vector pRS200 was used for molecular cloning of *PSO9*. pRS200 is a modification of pRS314 by replacing *Sma*I by *Bgl*II linkers [18]. DNA fragments of interest were subcloned into the centromeric vector pRS314 [18]. Yeast media and bacterial genetic procedures were as described by Burke *et al.* (2000) [19] and Sambrook *et al.* (1989) [20], respectively. Yeast was routinely grown and stored on YPD. Auxotrophy markers were controlled on synthetic medium - SynCo (1.7 g yeast nitrogen base w/o amino acids and w/o ammonium sulfate/L, 5 g ammonium sulfate/L, 20 g glucose/L) supplemented with the appropriate amino acids and bases (40 µg/mL).

*Mutagen treatments.* Stationary phase cells were washed in 0.9% NaCl and resuspended in the same buffer to a titer of  $10^8$ /mL. Treatment with the furocoumarins 8-methoxypsoralen (8-MOP) and 3-carbethoxypsoralen (3-CPs) was as previously described [15]. Sensitivity to UV<sub>254nm</sub> (UVC) was assayed by irradiating (Stratalinker, Stratagene) cells plated on solid medium. Cells were treated with nitro *N*-methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine (MNNG [SIGMA]) in exposure doses from 0 to 200 µM, for 18 h in a shaker at 30°C. For drop tests,

stationary cultures were serially diluted in 1:10 steps and 5  $\mu$ L aliquots were then spotted onto SynCo medium and treated as above. When the mutants sensitivities needed to be compared the DRF (dose reduction factor) was applied. The DRF is calculated by dividing the exposure dose of the WT by the exposure dose of the mutant, at the same level of survival, in our case 37% which equals one lethal hit.

*Mutation induction.* Reversion was detected by measuring frequencies of Lys revertants (lys1  $\rightarrow$  LYS1) on SynCo -Arg-Lys media and forward mutation was measured with the canavanine resistance assay (CAN1  $\rightarrow$  can1<sup>r</sup>) after induction with UVC, 3-CPs+UVA and 8-MOP+UVA. Concentration of canavanine in SynCo -Arg-Lys medium was 40 mg/mL [21]. Mutant frequencies were scored per surviving cells.

*Molecular cloning.* Yeast *pso9-1* mutant strain JC003-8C was transformed with a yeast genomic library contained in the centromeric pRS200 vector [18]. Transformants were selected in synthetic medium lacking tryptophan (SynCo -Trp) and then screened for sensitivity to UVC (50 J/m<sup>2</sup> UVC dose) and afterwards to 8-MOP+UVA (0.5 kJ/m<sup>2</sup> UVA dose). In cases of wild-type-like growth, transformants were subjected to a plasmid loss experiment and assayed for concomitant loss of tryptophan prototrophy, UVC and 8-MOP+UVA resistance. The resistant isolate had its plasmid extracted and transformed into *E. coli* for propagation. Sequencing was performed using T3 and T7 primers (Amersham Biosciences) in an automated sequencer (MegaBACE<sup>TM</sup> 1000 – Amersham Biosciences), according to the manufacturer's instructions.

## Results

### *Phenotype of pso9-1 mutant*

Mutant *pso9-1* can be phenotypically characterized as sensitive to photoactivated 3-CPs and 8-MOP as well as to UVC and MMNG. It showed a sensitivity phenotype about three times greater than wild-type, in all mutagen exposures (Figure 1). Sporulation in mutant *pso9-1* is not



affected (Table 2) and it was not sensitive to oxidative damage-inducing H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and paraquat treatment (data not shown). Reverse mutation was significantly lower than in wild-type after photoactivated 3-CPs, 8-MOP and UVC treatments, but not as much restricted as forward mutation in *CAN* locus for the same mutagens (Figure 2).

#### *Molecular cloning of PSO9*

The original *pso9-1* mutant N123<sub>35(11)</sub> was crossed to MKPo in order to introduce appropriate markers for molecular cloning and also a functional *GSH1* gene to the new haploids, thereby replacing the *gsh1-L* mutant allele of N123 that leads to a strongly reduced glutathione pool in that strain and its derivatives [22] which in turn might alter mutagen sensitivity phenotypes, e.g., to MNNG [22, 23]. The new *pso9-1* haploid isolated, called RMH3001-1C, was used to verify the *pso9-1* phenotypic characterization but it unfortunately had a very poor transformability. This strain was therefore crossed to W303 and after two backcrosses one WT (JC003-8D) and a *pso9-1* mutant (JC003-8C) were selected.

Molecular cloning of *PSO9* gene was achieved by complementing UVC and photoactivated 8-MOP sensitivities of the *pso9-1* mutant strain JC003-8C, harboring a single copy vector pRS200-based yeast genomic DNA library. Analysis of 9,120 transformants yielded one isolate showing WT resistance to both mutagens. Complementation of UVC and photoactivated 8-MOP sensitivities were plasmid-linked, since the strains which had lost the plasmid were sensitive to the aforementioned agents and once more resistant when the plasmid was re-transformed into them. The complementing plasmid, pJC9, was isolated from yeast and sequence analysis revealed a 8,611 bp DNA fragment from the left arm of chromosome XII, containing two unknown ORFs (YLR287c and YLR290c), and the known genes *RPS30A*, *MEC3* and *GUF1*. Analysis of mutant phenotypes and physiological functions indicated *MEC3* as the most likely candidate for complementation of the putative yeast DNA repair mutant *pso9-1*. This assumption was confirmed by two types of experiments: (1) subcloning of the 8,611 bp complementing fragment followed by re-transformation into *pso9-1* and (2) crosses of *pso9-1* to already established *mec3* mutants. Therefore, a 2,461 bp *PstI-SnaBI* DNA fragment (Figure 3) containing the *MEC3* gene was subcloned into pRS314, originating pJC91. This plasmid was able to complement UVC and photoactivated 8-MOP sensitivities of *pso9-1* (Figure 4), revealing

that the *MEC3* gene alone is sufficient to restore the wild-type-like phenotype, indicating that *PSO9* might be allelic to *MEC3*. Final evidence for the allelism of the cloned ORF with *PSO9* was obtained by demonstrating that the *mec3* $\Delta$  allele was unable to complement any known phenotype of the *pso9-1* mutant in a heteroallelic diploid (Figure 5), which had been constructed by crossing *pso9-1* with a haploid *mec3* $\Delta$  of opposite mating type. Since the heterozygous diploid *PSO9/mec3* $\Delta$  displayed the wild-type phenotype of *PSO9/MEC3* and a *mec3* $\Delta$  allele was unable to complement the *pso9-1* mutant phenotype, we have good evidence that both genes are allelic.

## Discussion

Photochemotherapy employing 8-methoxypsoralen and long wave ultraviolet radiation (PUVA) is widely used in the treatment of skin disorders. Unfortunately, the efficacy of PUVA is linked to the formation of DNA photoadducts in the target cells. The screening of a mutagenized yeast culture for photoactivated psoralen sensitivity by Henriques and Moustacchi (1980) [15] yielded mutants with impaired functions related to this kind of damage, all of them lacking a protein with direct or indirect function in DNA repair or protection from DNA damage [8]. Of the nine *pso* mutants characterized so far, seven are thought to be directly involved in DNA repair or nucleic acid processing, while two, *PSO6* and *PSO7*, are responsible for structural elements of the membrane and for a functional respiratory chain, respectively [8].

Molecular cloning of a plasmid-contained yeast DNA fragment from chromosome XII and genetical complementation tests showed that mutant *pso9-1*, originally isolated for its sensitivity to photoactivated mono- and bi-functional psoralens 3-CPs and 8-MOP, is yet another mutant allele of the *MEC3* gene. In a single copy vector a ~8.6 kb passenger DNA complemented perfectly the UVC and the 8-MOP+UVA sensitivity of *pso9-1*. Subcloning of a 2,461 bp *Pst*I-*Sna*BI DNA fragment from that passenger, containing the *MEC3* gene, did not change the smaller plasmid's ability to fully complement the UVC and 8-MOP+UVA sensitivity phenotype of *pso9-1* mutant (Figure 4). Non-complementation of the heteroallelic diploid derived from

cross between *pso9-1* and *mec3Δ*, both recessive mutant alleles, unequivocally showed both mutants to contain alleles of the same locus (Figure 5).

In this work, we were able to show that the *PSO9/MEC3* allelism includes DNA damage checkpoint to the Pso9-1p functions. *MEC3* is required for the DNA damage checkpoint response in mitosis and is probably also required for the meiotic recombination checkpoint [24, 25, 26]. Mec3p exist in a complex with Rad17p and Ddc1p [27] and is required for both localization [28] and phosphorylation of Ddc1p [29]. The Ddc1/Mec3/Rad17 complex shares sequence similarity with PCNA, the DNA polymerase processive factor, suggesting that this factor acts by sensing DNA damage directly [30]. The *mec3* mutants have already been known to be sensitive to UVC, methyl methanesulfonate and hydroxyurea [31], and also seem to reduce induced mutability after UVC irradiation, in a *rad1Δ* background [32]. These phenotypes combine with the *pso9-1* phenotypic characterization shown in our work, and have been extended for sensitivities to photoactivated mono- and bifunctional psoralens (Figures 1 and 2).

Although *pso9-1* sequencing is in progress, we may already have some clues about the remainder of Pso9-1p. It had been reported that *mec3* with mutations in the promoter region are hypersensitive to calcofluor white and caffeine [33]. We have submitted *pso9-1* to these agents and its viability was not affected compared to the WT (data not shown), thus indicating that the *pso9-1* mutation is not localized in the promoter region but most likely in the codifying region. We could also observe that *pso9-1* mutant was less sensitive to UVC and 8-MOP+UVA than *mec3Δ* (Figures 4 and 6). Considering UVC treatment, the dose reduction factor (DRF) for *pso9-1* was 2.3 and for *mec3Δ* was 2.0 at 37% survival. After 8-MOP+UVA, DRF numbers were 1.7 and 1.6, respectively. These results suggest that *pso9-1* might be a leaky mutant allele and that Pso9-1p is not totally hindered to be part of a partially functional Ddc1p/Mec3p/Rad17p complex [27], since it presents some residual function which may be positively contributing to DNA damage repair. Comparison of forward induced mutagenesis of both mutants was not conclusive since *mec3Δ* and its isogenic EUROSCARF wild-type showed the same level of CAN1 → can1<sup>r</sup> reversion (Figure 7). The EUROSCARF wild-type background probably carries some deficiency in this process, since this fact has also been observed by other research groups (M. Strauss, personal communication). We can suggest that *mec3Δ* mutability phenotype might

be being disguised by its background, thus not revealing the actual consequence of a *mec3* deletion in mutagenic pathways. However, it should be noted that the mutant frequencies of *mec3* $\Delta$  were even lower than that of *pso9-1* in the canavanine resistance forward mutation assay (Figure 7). Further experiments employing *mec3* $\Delta$  in a different background as well analysis of reverse mutation will allow us to clarify this point.

In summary, *PSO9/MEC3* is crucial for sensing DNA lesions generated by photoinduced psoralens and by other mutagens, allowing an optimal repair by delaying the progression of cell cycle. Future investigation of the *pso9-1* mutation will contribute to elucidate the connections between checkpoint pathways and DNA repair and their physiological effects on eukaryotic cells.

**Acknowledgements** We thank L. Driller for kindly providing us the yeast genomic library used in this work, and D. P. Potrich for sequencing the complementing plasmid. We also acknowledge the helpful scientific discussions of M. Grey. This work was supported by CNPq and Genotox. J.M.C. held a CAPES fellowship in a master's degree program.

## References

- [1] T. Horio, Indications and action mechanisms of phototherapy, *J. Dermatol. Sci.* 23 (Suppl. 1) (2000) S17–S21.
- [2] F. Dall’Acqua, S. Marciani, D. Vevaldi, G. Rodighiero, Skin photosensitization and crosslinking formation in native DNA by furocoumarins, *Z. Naturforsch.* 290b (1974) 635–636.
- [3] G.D. Cimino, H.B. Gamper, S.T. Isaacs, J.E. Hearst, Psoralens as photoactive probes of nucleic acid structure and function: organic chemistry, photochemistry, and biochemistry, *Annu. Rev. Biochem.* 54 (1985) 1151-1193.
- [4] D. Averbek, M. Dardalhon, N. Magaña-Schwencke, L.B. Meira, V. Meniel, New aspects of the repair and genotoxicity of psoralen photoinduced lesions in DNA, *J. Photochem. Photobiol., B: Biol.* 14 (1992) 47-63.
- [5] M.L.G. Dronkert, R. Kanaan, Repair of DNA interstrand cross-links, *Mutat. Res.* 486 (2001) 217-247.
- [6] R.B. Greenberg, M. Alberti, J.E. Hearst, M.A. Chua, W.A. Safran, Recombinational and mutagenic repair of psoralen interstrand crosslinks in *Saccharomyces cerevisiae*, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 31551-31560.
- [7] M. Bankmann, M. Brendel, Molecular dosimetry of 8-MOP + UVA – induced DNA photoadducts in *Saccharomyces cerevisiae*: correlation of lesion number with genotoxic potential, *J. Photochem. Photobiol., B: Biol.* 4 (1989) 57-74.
- [8] M. Brendel, J.A.P. Henriques, The *pso* mutants of *Saccharomyces cerevisiae* comprise two groups: one deficient in DNA repair and another with altered mutagen metabolism, *Mutat. Res.* 489 (2001) 79-96.

- [9] C.L. Schmidt, M. Grey, M. Schmidt, M. Brendel, J.A.P. Henriques, Allelism of *Saccharomyces cerevisiae* genes *PSO6*, involved in survival after 3-CPs + UVA induced damage, and *ERG3*, encoding the enzyme sterol C-5 desaturase, *Yeast* 15 (1999) 1503–1510.
- [10] C. Pungartnik, M.C. Kern, M. Brendel, J.A.P. Henriques, Mutant allele *pso7-1*, that sensitizes *Saccharomyces cerevisiae* to photoactivated psoralen, is allelic with *COX11*, encoding a protein indispensable for a functional cytochrome c oxidase, *Curr. Genet.* 36 (1999) 124–129.
- [11] S.J. Elledge, Cell cycle checkpoints: preventing an identity crisis, *Science* 274 (1994) 1664–1672.
- [12] A.G. Paulovich, D.P. Toczyski, L.H. Hartwell, When checkpoints fail, *Cell* 82 (1997) 315–321.
- [13] T. Weinert, DNA damage checkpoints update: getting molecular, *Curr. Opin. Genet. Dev.* 8 (1998) 185–193.
- [14] J. Melo, D. Toczyski, A unified view of the DNA damage checkpoint, *Curr. Opin. Cell Biol.* 14 (2002) 237–245.
- [15] J.A.P. Henriques, E. Moustacchi, Isolation and characterization of *pso* mutants sensitive to photoaddition of psoralen derivatives in *Saccharomyces cerevisiae*, *Genetics* 95 (1980) 273–288.
- [16] M.K. Pierce, C.N. Giroux, B.A. Kunz, Development of a yeast system to assay mutational specificity, *Mutat. Res.* 182 (1987) 65–74.
- [17] S. Broomfield, B.L. Chow, W. Xiao, *MMS2*, encoding a ubiquitin-conjugating-enzyme-like protein, is a member of the yeast error-free postreplication repair pathway, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95 (1998) 5678–5683.

- [18] R.S Sikorski, P. Hieter, A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*, *Genetics* 122 (1989) 19-27.
- [19] D. Burke, D. Dawson, T. Stearns, *Methods in yeast genetics*, a CSH laboratory course manual, CSH Laboratory Press, Plainview, N.Y. (2000).
- [20] J. Sambrook, E.R Fritsch, T. Maniatis, *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2<sup>nd</sup> ed. Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, N.Y. (1989)
- [21] C. Cassier, R. Chanet, J.A.P. Henriques, E. Moustacchi, The effects of the three *PSO* genes on induced mutagenesis: a novel class of mutationally defective yeast, *Genetics* 96 (1980) 841–857.
- [22] M. Brendel, M. Grey, A.F. Maris, J. Hietkamp, F. Fesus, C.T. Pich, L. Dafre, M. Schmidt, F. Eckardt-Schupp, J.A.P. Henriques, Low glutathione pools in the original *pso3* mutant of *Saccharomyces cerevisiae* are responsible for its pleiotropic sensitivity phenotype, *Curr. Genet.* 33 (1998) 4–9.
- [23] R.Süssmuth, F. Lingens, Zum Wirkungsmechanismus von 1-Nitroso-3-nitro-1-methylguanidin (MNNG) bei der Mutationsauslösung; Beständigkeit des MNNG, Beziehungen zwischen Mutationsrate und Aufnahme des Mutagens durch die Zelle und Förderung der Methylierung durch Sulfhydrylgruppen in Abhängigkeit vom pH-Wert, *Z. Naturforsch.* 24b (1996) 903-910.
- [24] T.A. Weinert, G.L. Kiser, L.H. Hartwell, Mitotic checkpoint genes in budding yeast and the dependence of mitosis on DNA-replication and repair, *Genes Dev.* 8 (1994) 652-655.
- [25] D. Lydall, Y. Nikolsky, D.K. Bishop, T. Weinert, A meiotic recombination checkpoint controlled by mitotic checkpoint genes, *Nature* 383 (1996) 840-843.

- [26] D. Lydall, T. Weinert, G2/M checkpoint genes of *Saccharomyces cerevisiae*: further evidence for roles in DNA replication and/or repair, *Mol. Gen. Genet.* 256 (1997) 638-651.
- [27] V. Paciotti, G. Lucchini, P. Plevani, M.P. Longhese, Mec1p is essential for phosphorylation of the yeast DNA damage checkpoint protein Ddc1p, which physically interacts with Mec3p, *EMBO J.* 17 (1998) 4199-4209.
- [28] J.A. Melo, J. Cohen, D.P. Toczyski, Two checkpoint complexes are independently recruited to sites of DNA damage in vivo, *Genes Dev.* 15 (2001) 2809-2821.
- [29] M.P. Longhese, V. Paciotti, R. Fraschini, P. Plevani, G. Lucchini, The novel DNA damage checkpoint protein Ddc1p is phosphorylated periodically during the cell cycle and in response to DNA damage in budding yeast, *EMBO J.* 16 (1997) 5226-5226.
- [30] C. Venclovas, M.P. Thelen, Structure-based predictions of Rad1, Rad9, Hus1 and Rad17 participation in sliding clamp and clamp-loading complexes, *Nucleic Acids Res.* 28 (2000) 2481-2493.
- [31] M.P. Longhese, R. Fraschine, P. Plevani, G. Lucchini, Yeast pip3/mec3 mutants fail to delay entry into S phase and to slow DNA replication in response to DNA damage, and they define a functional link between Mec3 and DNA Primase, *Mol. Cell. Biol.* 16 (1996) 3235-3244.
- [32] A.G. Paulovich, C.D. Armour, L.H. Hartwell, The *Saccharomyces cerevisiae* RAD9, RAD17, RAD24 and MEC3 are required for tolerating irreparable, ultraviolet-induced DNA damage, *Genetics* 150 (1998) 75-93.



[33] M. Lussier, A-M. White, J. Sheraton, T. di Paolo, J. Treadwell, S.B Southard, C.I. Horenstein, J. Chen-Weiner, A.F.J. Ram, J.C. Kapeteyn *et al.*, Large scale identification of genes involved in cell surface biosynthesis and architecture in *Saccharomyces cerevisiae*, *Genetics* 147, (1997) 435-450.

## Figure legends

**Fig. 1** Sensitivity of *pso9-1* (open circles) and wild type (filled circles) to treatment by a) 3-CPS + UVA; b) 8-MOP + UVA; c) UVC; d) MMNG.

**Fig. 2** Mutability by 3-CPS + UVA (A,C), 8-MOP + UVA (B,D), and by UVC (C,E) of *pso9-1* (open circles) and wild type (filled circles). Induced reversion in the *lys1* locus (per  $10^8$  survivors) and induced forward mutation in the *CAN1* locus (per  $10^6$  survivors).

**Fig. 3** Location on yeast chromosome XII (710309 bp to 718919 bp) of *pso9-1* complementing gene *MEC3*; original complementing isolate pJC9 and shortened insert in JC91.

**Fig. 4** Complementation of *pso9-1* strain by the pJC91 plasmid harboring a WT *MEC3* gene. (A) UVC and (B) 8-MOP+UVA treatment. Open squares: *pso9-1* transformed with *MEC3*-containing pJC91, filled squares and circles: wild-type and *pso9-1* transformed with pRS314, respectively.

**Fig. 5** Non-complementation assay in the heteroallelic *pso9-1/mec3Δ* diploid for UVC ( $50 \text{ J/m}^2$ ) and 8-MOP+UVA ( $0.5 \text{ kJ/m}^2$ ) sensitivity. (+/+) *PSO9/MEC3*; (+/-) *PSO9/ mec3Δ*; (-/-) *pso9-1/ mec3Δ*.

**Fig. 6** Sensitivity of *mec3Δ* (open triangles) and wild type (filled triangles) to a) UVC and b) 8-MOP+UVA.

**Fig. 7** Comparison of forward induced mutability by UVC, of *pso9-1* (open circles) and *mec3Δ* (open triangles), and their isogenic WTs (filled circles and triangles, respectively).

**Table 1.** Yeast strains used in this study

Strain	Genotype	Source
N123	<i>MATa his1-1 gsh1-L PSO9</i>	[15]
N123 <sub>35(11)</sub>	<i>MATa his1-1 gsh1-L pso9-1</i>	[15]
MKPo	<i>MATα can1-100 ade2-1 lys2-1 ura3-52 leu2-3 his3Δ200 trp1Δ901</i>	[16]
RMH2001-1B	<i>MATa his3Δ200 ade2-1 lys1-1 ura3-52 GSH1 pso9-1</i>	This work
RMH2001-1C	<i>MATa his3Δ200 ade2-1 lys1-1 ura3-52 GSH1 PSO9</i>	This work
W303	<i>MATα his3-11 ade2-1 ura3-1 leu2-3 trp1Δ</i>	[17]
JC003-8C	<i>MATa his3Δ200 ade2-1 ura3-52 trp1Δ GSH1 pso9-1</i>	This work
JC003-8D	<i>MATα his3Δ200 ade2-1 ura3-52 trp1Δ GSH1 PSO9</i>	This work
Y10'000	<i>MATα his3Δ1leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0</i>	EUROSCARF
Y00'000	<i>MATa his3Δ1leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0</i>	EUROSCARF
Y15198	<i>MATα his3Δ1leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0 mec3::kanMX4</i>	EUROSCARF

**Table 2.** Sporulation of diploids heterozygous and homozygous for (a) *pso9-1* and (b) *mec3Δ*

Diploid	% asci
<b>(a)</b>	
<i>PSO9</i> x <i>PSO9</i>	39.0
<i>PSO9</i> x <i>pso9-1</i>	35.0
<i>pso9-1</i> x <i>pso9-1</i>	35.0
<b>(b)</b>	
<i>PSO9</i> x <i>MEC3</i>	28.8
<i>PSO9</i> x <i>mec3Δ</i>	29.3
<i>pso9-1</i> x <i>mec3Δ</i>	30.8

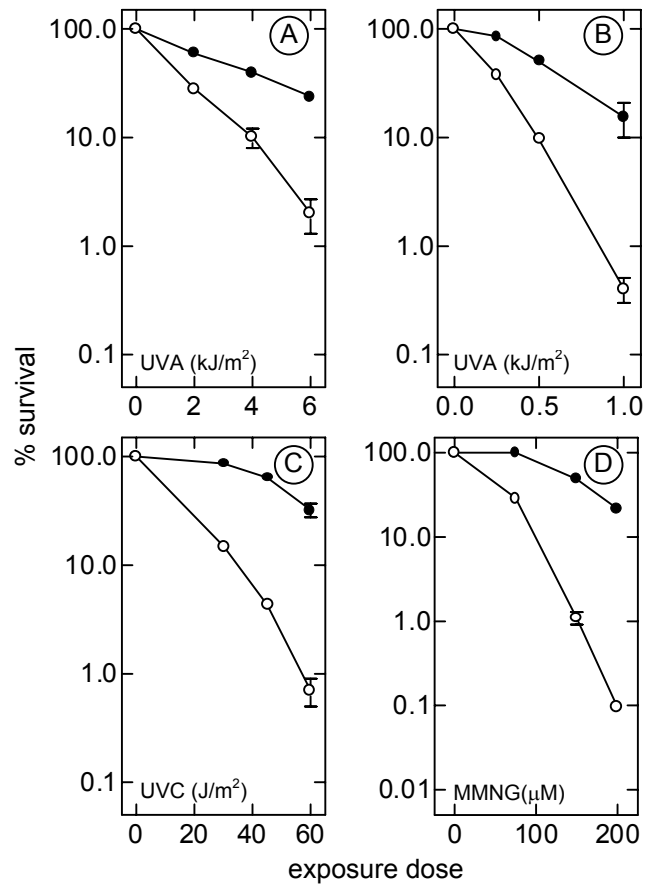


Fig. 1

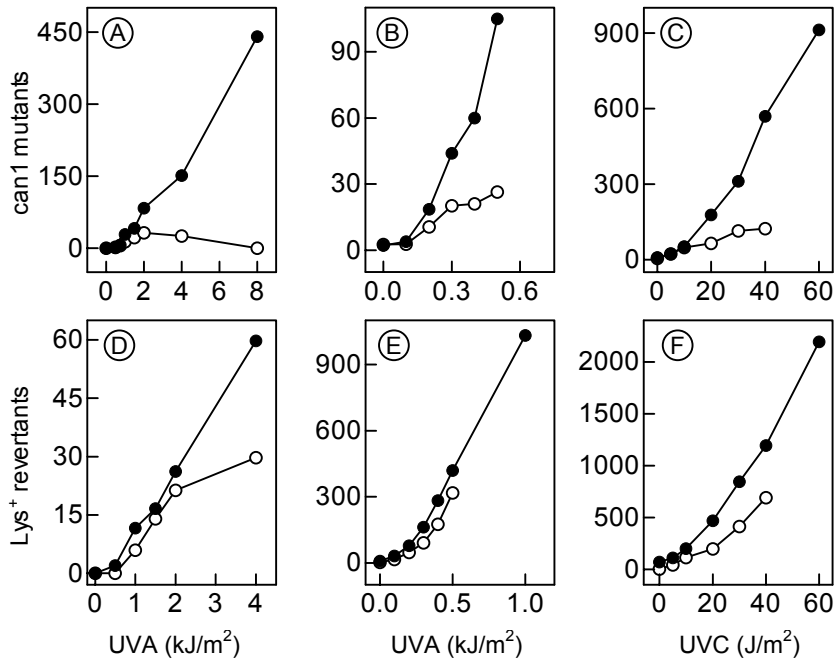


Fig. 2

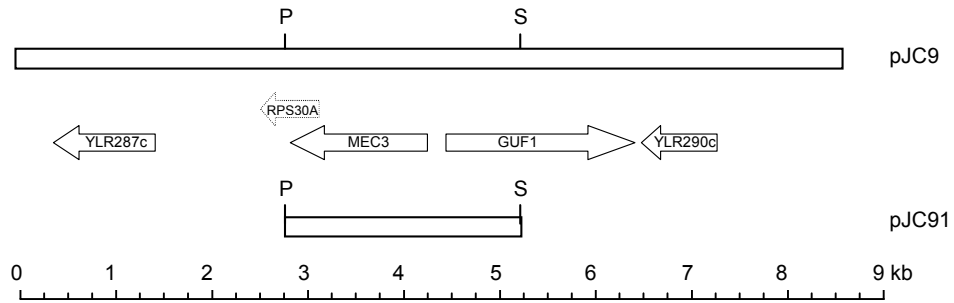


Fig. 3

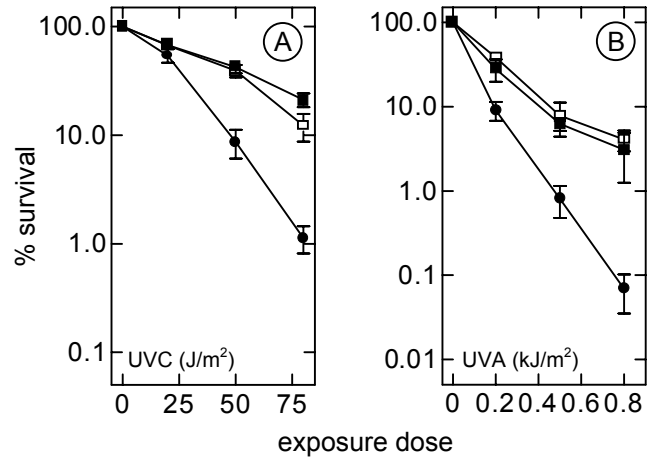


Fig. 4

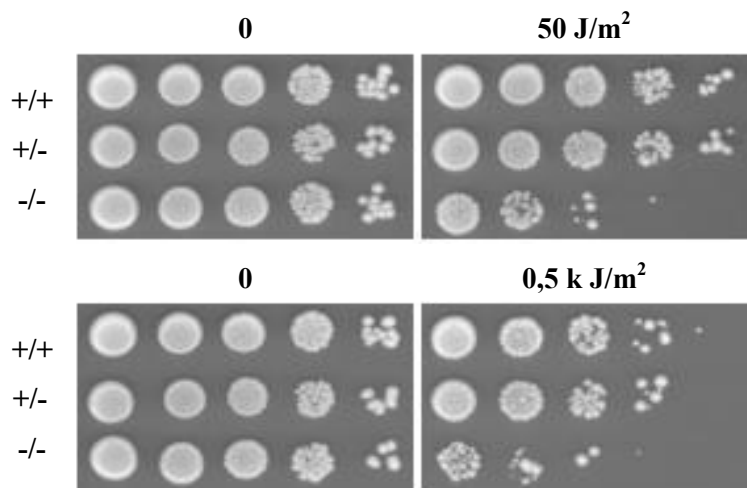


Fig. 5



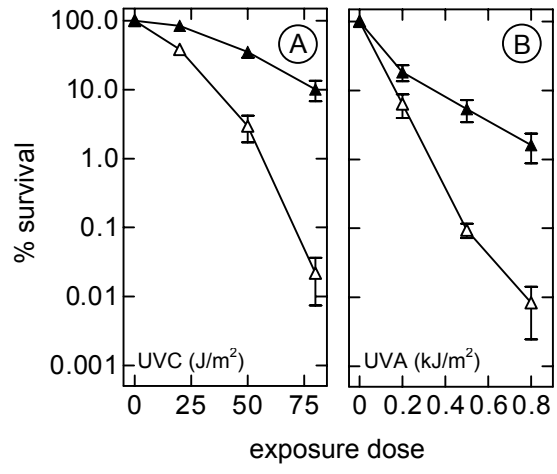


Fig. 6

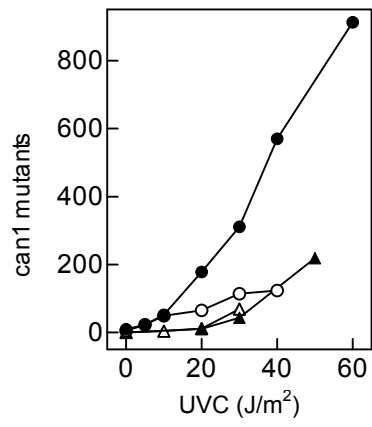


Fig. 7

**CAPÍTULO III**  
**DISCUSSÃO**

## DISCUSSÃO

A fotoquimioterapia empregando psoralenos+UVA (PUVA terapia) é largamente utilizada para tratar desordens dermatológicas desde dermatites atípicas à psoríase e vitiligo (Horio, 2000; Greenberg *et al.*, 2001). Os produtos formados pela fotoativação de psoralenos nos fibroblastos da pele são responsáveis pela eficácia deste tratamento (PUVA), devido a sua alta citotoxicidade na replicação celular (Greenberg *et al.*, 2001). Os psoralenos fotoreagem com as bases pirimídicas do DNA produzindo monoadutos de timinas e pontes intercadeias (ICLs) entre as timinas de fitas opostas (Dronkert e Kanaar, 2001; Greenberg *et al.*, 2001). Comparados a monoadutos, ICLs são mais tóxicos, mutagênicos e recombinogênicos (para revisão, ver Averbeck *et al.*, 1992; Henriques *et al.*, 1997). Um único ICL pode ser letal às células de leveduras e bactérias deficientes em reparação, assim como cerca de 40 ICLs podem ser letais às células de mamíferos também deficientes em reparação (Henriques *et al.*, 1997; Dronkert e Kanaar, 2001). O principal determinante da toxicidade de ICLs é devido a um impedimento na separação das fitas de DNA e, portanto, bloqueio na replicação e segregação do mesmo (Dronkert e Kanaar, 2001).

Entretanto, embora a PUVA terapia seja efetiva no tratamento da psoríase, os fotoprodutos resultantes desta associação (8-MOP+UVA) inibem o metabolismo do DNA, causam mutações e danos cromossomais, podem induzir apoptose e um elevado risco de câncer de pele, de um modo dose-dependente (Greenberg *et al.*, 2001; Dronkert e Kanaar, 2001).

O estudo de mutantes de levedura sensíveis a fotoadição de psoralenos (mutantes *ps0*) permitiu consideráveis progressos no entendimento dos processos celulares envolvidos na reparação do DNA lesado, assim como na

compreensão das conseqüências fotoquímicas, biológicas e genéticas do tratamento PUVA, em células vivas.

Inicialmente, três mutantes *psol*, *psol2* e *psol3*, cada um definindo um locus distinto, foram caracterizados detalhadamente. Desde então, mais alelos mutantes *psol* foram clonados e caracterizados fenotípica e genotipicamente. Atualmente, dez genes *psol* estão caracterizados (tabela 2, introdução). Estes genes não codificam proteínas com funções similares. Enquanto a maioria apresenta um papel na reparação de lesões induzidas por psoralenos fotoativados e outros mutágenos, pelo menos dois (*psol6-1* e *psol7-1*) dos dez mutantes *psol* não são deficientes em reparação de DNA. Todavia seus fenótipos de sensibilidade originam-se de deficiências fisiológicas (*psol6-1* e *psol7-1* são responsáveis por elementos estruturais da membrana e pela funcionalidade da cadeia respiratória, respectivamente), que influenciam a genotoxicidade a psoralenos, em vez de sua capacidade de reparação (para revisão, ver Henriques *et al.* 1997; Brendel e Henriques, 2001).

### ***A mutação psol9-1 define um novo alelo do gene MEC3***

Continuando a análise dos mutantes isolados por Henriques e Moustacchi (1980) um novo mutante *psol*, denominado *psol9-1*, foi caracterizado fenotipicamente. Por sua sensibilidade à 3-CPs e 8-MOP fotoativados e por complementar a sensibilidade de todos os mutantes *psol*, descritos até então, a mutação *psol9-1* foi considerada um novo alelo envolvido na reparação do DNA (Machado, 2000).

Este mutante mostra sensibilidade a diversos agentes mutagênicos, bem como redução na mutagênese induzida por psoralenos fotoativados e UVC, e não apresenta sensibilidade a agentes oxidativos como H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e paraquat (Machado, 2000). Estas características fenotípicas justificaram sua associação ao grupo de reparação dos mutantes *psol*, e, para caracterização molecular e

definição da localização funcional da proteína codificada por este gene, era ainda necessária a clonagem do gene *PSO9*.

O isolamento de um fragmento de aproximadamente 8,6 kb, a partir de um banco genômico de *S. cerevisiae*, contido no plasmídio simples cópia pRS200, complementou perfeitamente a sensibilidade do mutante *pso9-1* à radiação UVC e ao tratamento com 8-MOP+UVA (Figura 4, artigo). O seqüenciamento das extremidades deste fragmento de DNA permitiu localizar esta seqüência no braço esquerdo do cromossomo XII, abrangendo duas ORFs com funções desconhecidas (YLR287c e YLR290c), e três genes conhecidos: *RPS30A*, *MEC3* e *GUF1* (Figura 3, artigo). Investigação na literatura sobre os fenótipos e funções celulares associados às seqüências codificantes desta fração do cromossomo XII, indicou o gene *MEC3* como o mais provável candidato à alelo selvagem da mutação *pso9-1*. Enquanto o gene *RPS30A* codifica uma proteína que participa da subunidade ribossomal 40S (Baker *et al.*, 1997), e *GUF1*, uma GTPase de função desconhecida (Kiser e Weinert, 1995), a atuação da proteína Mec3 em *checkpoint* (Lydall e Weinert, 1997) levou à associação deste mecanismo de controle aos fenótipos de reparação do DNA apresentados pelo mutante *pso9-1*.

A subclonagem do fragmento de aproximadamente 2,5 kb *Pst*I-*Sna*BI, contendo o gene *MEC3*, no vetor simples cópia pRS314 (Figura 3, artigo), não alterou a habilidade do mesmo de complementar inteiramente o fenótipo de sensibilidade a UVC e 8-MOP+UVA do mutante *pso9-1* (Figura 4, artigo). A não complementação na linhagem diplóide heteroalélica derivada do cruzamento entre *pso9-1* e *mec3* $\Delta$  (Figura 5, artigo) mostrou inequivocadamente que ambos os mutantes contêm alelos não funcionais em um mesmo locus.

Mutantes *mec3* já foram descritos por sua sensibilidade à UVC, metilmetanosulfonato e hidroxipuréia (Longhese *et al.*, 1996) e também parecem reduzir a mutabilidade induzida após tratamento com UVC, em combinação com *rad1* $\Delta$  (Paulovich *et al.*, 1998). Estes fenótipos concordam com a

caracterização fenotípica prévia do mutante *pso9-1* e reforçam o alelismo entre *PSO9* e *MEC3*.

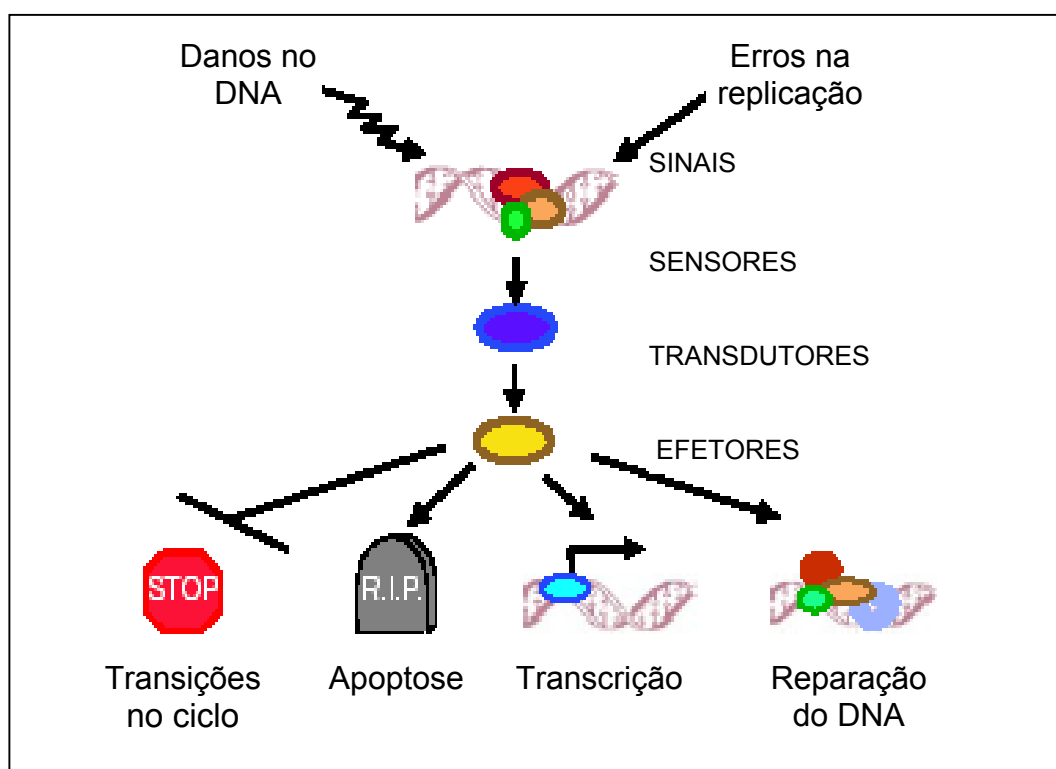
Embora a mutação *pso9-1* ainda não esteja determinada, os dados apontam algumas evidências sobre a proteína mutante Pso9-1. Mutações na região promotora de *MEC3* tornam as células de levedura sensíveis a cafeína e *calcofluor white* (Lussier *et al.*, 1997). Os mutantes *pso9-1* e *mec3Δ* foram testados para estes dois agentes e não apresentaram sensibilidade quando comparados às respectivas linhagens selvagens (Figura 2, apêndice 1), sugerindo que a mutação presente na linhagem *pso9-1* está localizada na região codificante. Além disso, a sensibilidade do mutante *pso9-1* à UVC e 8-MOP+UVA é levemente menos pronunciada que a demonstrada por mutantes *mec3Δ* (Figuras 4 e 6, artigo). Um método muito utilizado para fins de comparação de sensibilidade entre linhagens de diferente *background* é o chamado “fator de redução de dose” ou *dose reduction factor* (DRF). O DRF é calculado dividindo-se a dose de exposição da linhagem selvagem pela dose de exposição do mutante, em um mesmo nível de sobrevivência. Após tratamento com UVC, o DRF para a linhagem *pso9-1* foi 2,3 e para *mec3Δ*, 2,0. Para 8-MOP + UVA, os valores foram 1,7 e 1,6, respectivamente. O mutante *mec3Δ* também apresentou uma frequência de mutagênese mais baixa no locus *CAN1* que o mutante *pso9-1* (Figura 7, artigo), embora sua selvagem isogênica tenha se mostrado deficiente em mutabilidade. Estes resultados sugerem que *pso9-1* pode ser um alelo mutante *leaky* e que pPso9-1 ainda apresenta uma função residual.

***PSO9/MEC3 participa da via de checkpoint que responde a danos no DNA***

A sobrevivência dos organismos é dependente de uma acurada transmissão da informação genética de uma célula para suas filhas. Para alcançar esta fidelidade, as células têm evoluído mecanismos de sobrevivência que monitoram a estrutura dos cromossomos e coordenam reparação do DNA e progressão do ciclo celular, chamados *checkpoints* (para revisão ver, Elledge, 1996; Paulovich *et al.*, 1997; Weinert, 1998; Melo e Toczyski, 2002). Estes mecanismos foram inicialmente definidos como vias regulatórias não-essenciais que controlam a capacidade da célula de parar o ciclo-celular em resposta a danos no DNA, concedendo tempo para a reparação. No entanto, recentes evidências sugerem que a definição clássica de *checkpoint* é inadequada para explicar a função deste mecanismo por completo. Além de parar o ciclo-celular, têm sido mostrado que estas vias controlam a ativação das vias de reparação do DNA (Cortez *et al.*, 1999; Mercier *et al.*, 2001), a composição da cromatina telomérica e o direcionamento das proteínas de reparação do DNA aos sítios de dano (Martin *et al.*, 1999; Mills *et al.*, 1999), ativação de programas transcricionais (Elledge, 1996), extensão dos telômeros (Naito *et al.*, 1998; Ritchie *et al.*, 1999, Enomoto *et al.*, 2002) e, em alguns tipos de células, por razões ainda não completamente compreendidas, indução de morte celular por apoptose (Lowe *et al.*, 1993; Hirao *et al.*, 2000). Desta forma, fica claro que o *checkpoint* faz parte da complexa rede que responde a danos no DNA, a qual regula uma resposta multifacetada, como ilustra a Figura 4.

Como todas as vias de transdução de sinais, o mecanismo *checkpoint* envolve moléculas que atuam como sensores, transdutores e efetores. Os sensores monitoram o DNA para anormalidades estruturais e, então iniciam o sinal de *checkpoint*. Mais adiante, os transdutores transmitem e amplificam este sinal. Finalmente, as moléculas efetoras controlam as conseqüências biológicas desencadeadas pela via.





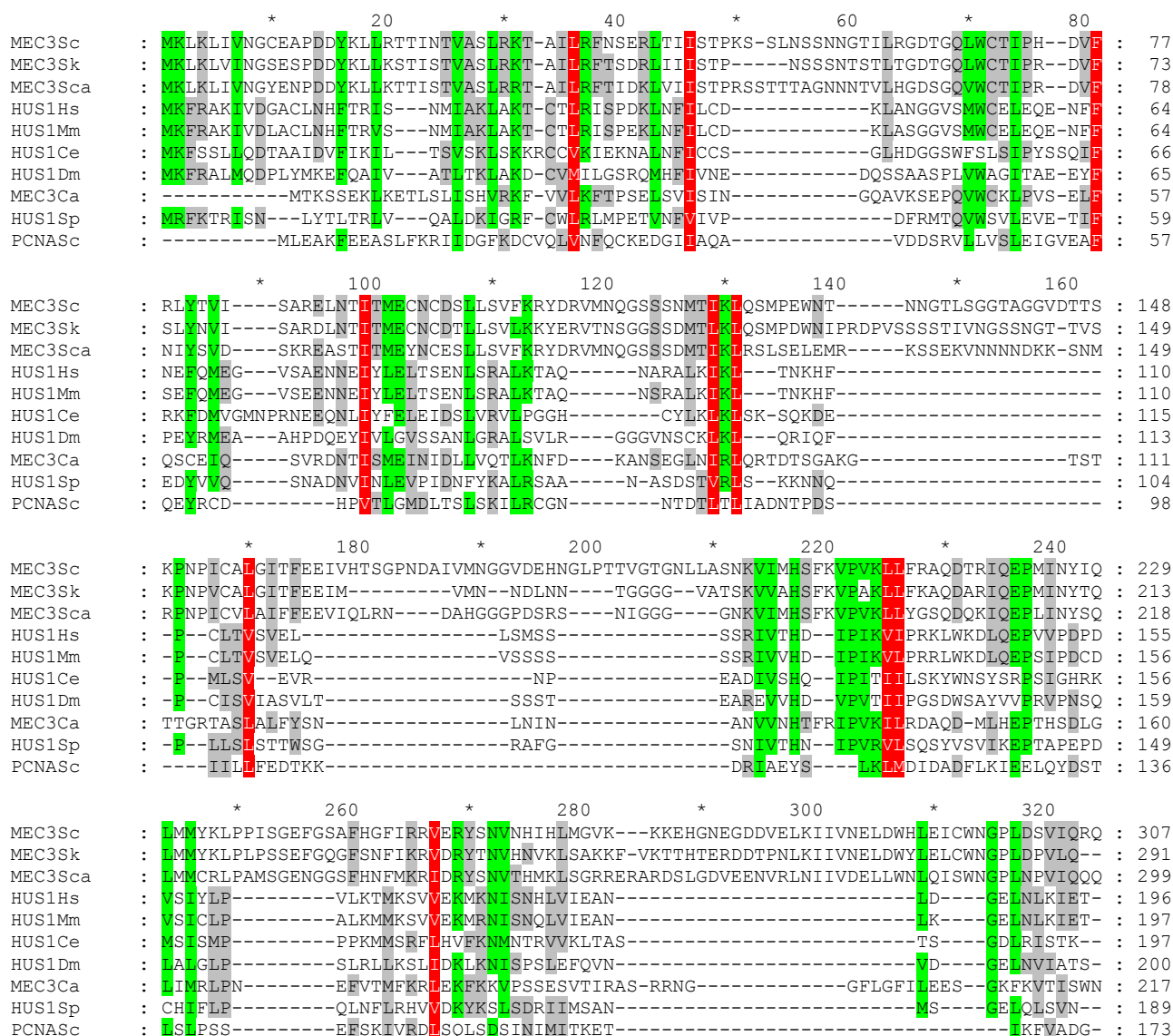
**Figura 4.** Esquema geral da via de transdução de sinais em *checkpoint*. Flechas representam eventos de ativação e finais perpendiculares representam eventos inibitórios. Paradas no ciclo celular estão marcadas com sinal de pare e apoptose com lápide. A hélice de DNA com uma flecha representa transcrição induzida por dano, enquanto a hélice de DNA com várias subunidades circulares representa reparação induzida por dano (Modificado de Zhou e Elledge, 2000).

Uma das questões mais cruciais neste campo é definir os sinais que ativam o *checkpoint*. Agentes genotóxicos causam muitos tipos de lesões primárias que podem ser convertidas em lesões secundárias durante a

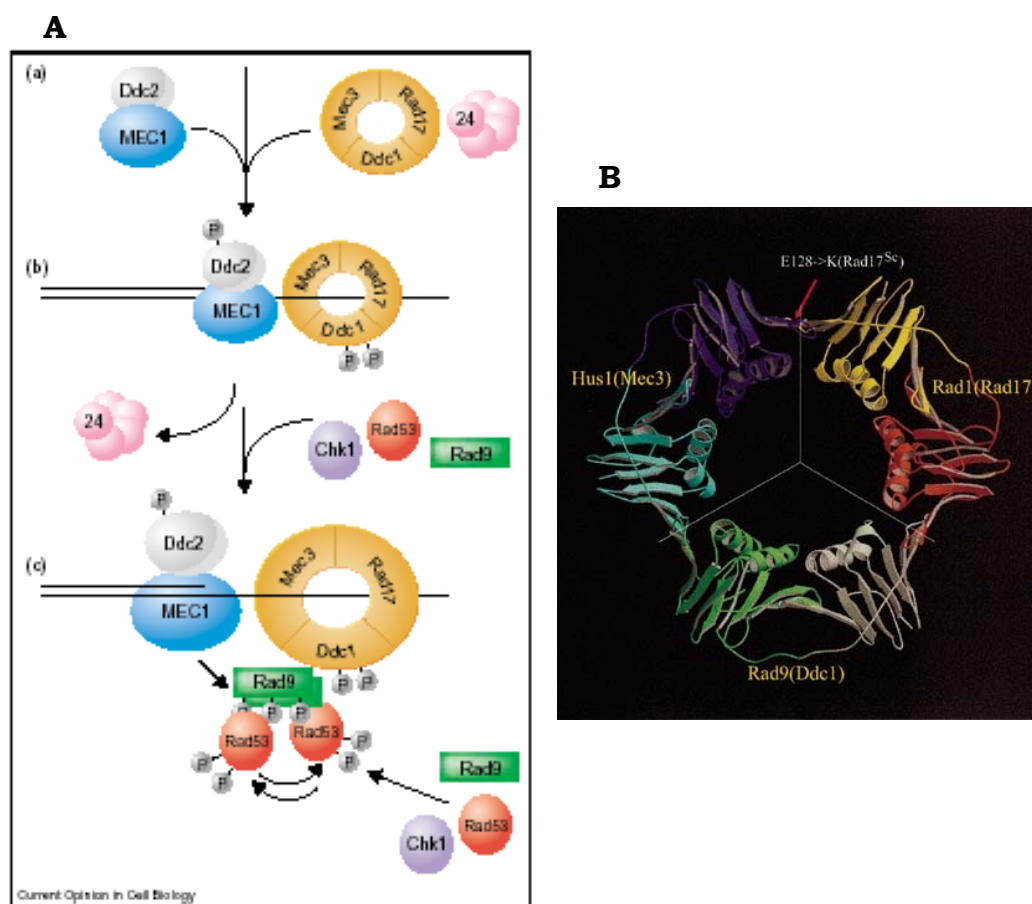
replicação de um molde danificado. Todas estas lesões podem ser diretamente reconhecidas por determinadas proteínas de *checkpoint*, sozinhas ou em complexos especializados, ou ainda podem ser processadas a intermediários comuns que por sua vez irão desencadear a ativação do *checkpoint*. Como esta resposta pode também ser influenciada pelo estágio do ciclo-celular no qual o dano ocorre, múltiplos sensores podem reconhecer os sinais, em fases específicas do ciclo-celular (para revisão ver Melo e Toczyski, 2002).

Na levedura *S. cerevisiae*, tem sido proposto que os genes envolvidos na detecção de danos no DNA funcionam em dois grupos distintos que atuam fundamentalmente nas fases G1 e G2 do ciclo celular. Estes grupos são definidos pelo gene *RAD9* e pela subclasse *RAD24* (Lydall and Weinert, 1995). Incluídos na subclasse *RAD24* estão os genes *RAD17*, *DDC1* e *MEC3*. *RAD24* e seus ortólogos em outras espécies apresentam homologia com as cinco subunidades do fator de replicação C (RF-C) (Griffiths *et al.*, 1995). A proteína codificada pelo gene *MEC3* existe em um complexo com pRad17 e pDdc1 (Paciotti *et al.*, 1998) e é requerida tanto para a localização (Melo *et al.*, 2001), quanto para fosforilação de pDdc1 (Longhese *et al.*, 1997). O complexo formado por pDdc1/pRad17/pMec3 (Paciotti *et al.*, 1998) compartilha similaridades de seqüência com PCNA (Antígeno Nuclear de Proliferação Celular) (Caspari *et al.*, 2000; Venclovas e Thelen, 2000), o fator de processividade da DNA polimerase. A própria pMec3 compartilha várias regiões de similaridade com possíveis genes ortólogos, não só de outros eucariotos inferiores, como também superiores (Figura 5), evidenciando a importância desta conservação para a posterior formação da estrutura quaternária PCNA-like. PCNA forma um anel homotrimérico ao redor do DNA dupla-fita e é adicionado ao DNA por uma reação catalisada pelo complexo RF-C (para revisão, ver Mossi e Hubscher, 1998). Tem sido sugerido que o complexo pDdc1/pMec3/pRad17 atua com um grampo específico de detecção de danos no DNA e que o recrutamento destas proteínas é catalisado por uma versão modificada de RF-C, mediada por pRad24. Uma vez ligado ao DNA, este

grampo se tornaria competente a recrutar fatores adicionais de *checkpoint*, responsáveis pela transdução de sinais (Figura 6) (Longhese *et al.*, 1998; Lowndes e Murguia, 2000; Melo *et al.*, 2001; Melo e Toczyski, 2002).



**Figura 5.** Alinhamento de aminoácidos da porção N-terminal da proteína Mec3 e potenciais ortólogos de vários organismos. Resíduos conservados em 100% das seqüências estão mostrados em vermelho; verde e cinza correspondem a 80% e 50%, respectivamente. Os números de acesso são: MEC3Sc (*S. cerevisiae* AAB67334), MEC3Sk (*S. kluyveri* Contig2217.5a), MEC3Sca (*S. castelli*, Contig470.6a), HUS1Hs (*Homo sapiens* XP\_165873), HUS1Mm (*Mus musculus*, XP\_122185), HUS1Ce (*Caenorhabditis elegans*, AAC78225), HUS1Dm (*Drosophila melanogaster*, AAF52090), MEC3Ca (*Candida albicans*, CA2321), HUS1Sp (*Schizosaccharomyces pombe*, P78955), PCNASc (*S. cerevisiae* CAA85038). <sup>a</sup> dados não depositados (Paul Cliften e M. Johnston, comunicação pessoal).



**Figura 6. A)** “Modelo de recrutamento ao substrato” para ativação de *checkpoint* que responde a danos no DNA. **(a)** Os complexos pMec1/pDdc2 (azul) e pDdc1/pMec3/pRad17 (laranja) são independentemente recrutados aos sítios de dano no DNA, **(b)** promovendo sua interação por um efeito dependente da concentração de dano. **(c)** múltiplos complexos pMec1/pDdc2 e pDdc1/pMec3/pRad17 são recrutados ao sítio de dano, facilitando uma rápida ativação da via de *checkpoint* e o recrutamento de pDdc1/pMec3/pRad17 é catalisado por pRad24 (rosa). É proposto que a função de pDdc1/pMec3/pRad17 seja auxiliar no recrutamento de pRad9 para fosforilação por Mec1p. (Extraído de Melo e Toczyski, 2002) **B)** Modelo do complexo pDdc1/pMec3/pRad17, baseado na estrutura de PCNA. (Extraído de Venclovas e Thelen, 2000).

As proteínas de *checkpoint* são bem conservadas de leveduras a células humanas (para revisão, ver Venclovas e Thelen, 2000), indicando que a organização básica destas vias tem sido preservada ao longo da evolução. Alguns dos componentes destas vias encontram-se mutados em síndromes humanas raras, estando associados à predisposição ao câncer (para revisão ver Hartwell e Kastan, 1994; McDonald e El-Deiry, 2001). Portanto, torna-se relevante investigar os papéis destes componentes em organismos modelos, podendo assim utilizar estes dados para o esclarecimento dos mecanismos de controle da divisão celular em eucariotos superiores. Neste sentido, o estudo da mutação *pso9-1* revelará como a estrutura terciária da proteína Pso9-1 arranja-se para interagir com seus parceiros moleculares, contribuindo para o esclarecimento das conexões entre as vias de reparação do DNA e *checkpoint*, e seus efeitos fisiológicos em células eucarióticas.

## **CAPÍTULO IV**

### **CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS**

## CONCLUSÕES e PERSPECTIVAS

Além de confirmar a ligação entre processos de reparação do DNA e controle de *checkpoint* em levedura, a comprovação do alelismo entre *PSO9* e *MEC3* inclui o mecanismo de *checkpoint* ao grupo de funções das proteínas Pso.

O seqüenciamento do alelo mutante *pso9-1* permitirá identificar o local e tipo de mutação, possibilitando estudar os seus efeitos na função da proteína e definir domínios importantes para o desempenho de seu papel no controle da divisão celular e reparação do DNA. A determinação dos domínios requeridos para a funcionalidade de pPso9 poderá ser alcançada através da expressão de construções truncadas do mesmo.

A proteína Mec3 forma um complexo com pDdc1 e pRad17 (Paciotti *et al.*, 1998), muito semelhante ao complexo PCNA em humanos (Venclovas e Thelen, 2000) e é essencial para a localização e fosforilação de pDdc1 no local do dano (Melo *et al.*, 2001; Paciotti *et al.*, 1998). Nesse sentido, torna-se relevante analisar se pPso9-1 mantém a interação física com pDdc1 e com pRad17. Além destas proteínas, que interagem com pPso9 na formação de complexos, outras interações físicas já foram identificadas, como com pSap18 (Uetz *et al.*, 2000), pSet1 (Corda *et al.*, 1999), pSpo12 (Grether e Herskowitz, 1999), além de uma interação genética com pPri1 que resulta em letalidade sintética (Longhese *et al.*, 1996). O emprego de técnicas como o sistema duplo-híbrido e coimunoprecipitação permitirá avaliar como a mutação *pso9-1* afeta a interação física entre os membros do complexo pDdc1/pMec3/pRad17, e



sua estabilidade funcional, bem como com as demais interações com proteínas não envolvidas em *checkpoint*.

Alguns genes *PSO* já identificados, como *PSO2* e *PSO3*, permanecem com função não esclarecida na reparação do DNA. O mutante *pso2-1* é extremamente sensível a agentes formadores de pontes intercadeia no DNA, porém, o exato mecanismo utilizado por pPso2 para reparar estas pontes ainda é desconhecido. A mutação *pso3-1* é a que resulta na menor sensibilidade a psoralenos fotoativados entre os *pso*, sendo caracterizada pela deficiência na reparação de danos oxidativos. Além disso, especula-se a respeito da participação de pPso3 na síntese translesão livre de erro, podendo exercer influência em fenômenos como mutações induzidas e conversão gênica (para revisão, ver Brendel e Henriques, 2001). O estudo de combinações da mutação *pso9-1* com *pso3-1* e com *pso2-1* contribuirá para a melhor compreensão dos mecanismos pelos quais pPso3 e pPso2 atuam nesses processos de reparação.

## **CAPÍTULO V**

### **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDRADE, H.H.R.; MOUSTACCHI, E.E.; HENRIQUES, J.A.P. The *PSO3* gene is involved in error-prone intragenic recombinational DNA repair in *Saccharomyces cerevisiae*. **Mol. Gen. Genet.**, v. 219, p. 75-80, 1989.
- AUSUBEL, F.M.; BRENT, R.; KINGSTON, R.E.; MOORE, D.D.; SEIDMAN, J.G.; SMITH, J.A.; STRUHL, K. (eds.) **Curr. Protocols in Mol. Biol.**, New York: Wiley, 1989.
- AVERBECK, D. Photochemistry and photobiology of psoralens. **Proc. Jpn. Invest. Dermatol.**, v. 8, p. 52-73, 1984.
- AVERBECK, D. Recent advances in psoralen phototoxicity mechanism. **J. Photochem. Photobiol.**, v. 50, p. 859-882, 1989.
- AVERBECK, D.; DARDALHON, M.; MAGAÑA-SCHWENCKE, N.; MEIRA, L.B.; MENIEL, V. New aspects of the repair and genotoxicity of psoralen photoinduced lesions in DNA. **J. Photochem. Photobiol. B: Biology**, v. 14, p. 47-63, 1992.
- BAILLY, V.; PRAKASH, S.; PRAKASH, L. Domains required for dimerization of yeast Rad6 ubiquitin-conjugating enzyme and Rad18 DNA binding protein. **Mol. Cell Biol.**, v. 17, p. 4536-4543, 1997.
- BAKER, R.T.; WILLIAMSON, N.A.; WETTENHALL, R.E. The yeast homolog of mammalian ribosomal protein S30 is expressed from a duplicated gene without a ubiquitin-like protein fusion sequence: evolutionary implications. **J. Biol. Chem.**, v. 271, p. 13549-13555, 1996.
- BANG, D.D.; VERHAGE, R.; GOOSEN, N.; BROUWER, J.; VAN DE PUTTE, P. Molecular cloning of *RAD16*, a gene involved in differential repair in *Saccharomyces cerevisiae*. **Nucleic Acids Res.**, v. 20, p. 3925-3931, 1992.
- BENATEN, A.; BEAM, C.A. The genetic control of X-ray resistance in budding yeast cells. **Radiat. Res.** v. 69, p. 99-116, 1977.
- BENHAMOU, S.; SARASIN, A. Variability in nucleotide excision repair and cancer risk: a review. **Mutat. Res.**, v. 462, p. 149-158, 2000.
- BOCKING, T.; BARROW, K.D.; NETTING, A.G.; CHILCOTT, T.C.; COSTER, H.G.; HOFER, M. Effects of singlet oxygen on membrane sterols in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Eur. J. Biochem.**, v. 267, p. 1607-1618, 2000.

- BOULTON, S.J.; JACKSON, S.P. Identification of a *Saccharomyces cerevisiae* Ku80 homologue: roles in DNA double strand break rejoining and in telomeric maintenance. **Nucleic Acids Res.**, v. 24, p. 4639-4648, 1996.
- BRAITHWAITE, E.; WU, X.; WANG, Z. Repair of DNA lesions: mechanisms and relative repair efficiencies. **Mutat. Res.**, v. 424, p. 207-219, 1999.
- BRENDEL, M.; HAYNES, R.H. Interactions among genes controlling sensitivity to radiation and alkylation in yeast. **Mol. Gen. Genet.**, v. 125, p. 197-216, 1973.
- BRENDEL, M.; GREY, M.; MARIS, A.F.; HIETKAMP, J.; FESÜS, Z.; PICH, C.T.; DAFRÉ, A.; SCHMIDT, M.; ECKARDT-SCHUPP, F.; HENRIQUES, J.A.P. Low glutathione pools in the original *pso3* mutant of *Saccharomyces cerevisiae* are responsible for its pleiotropic sensitivity phenotype. **Curr. Genet.**, v. 33, p. 4-9, 1998.
- BRENDEL, M.; HENRIQUES, J.A.P. The *pso* mutants of *Saccharomyces cerevisiae* comprise two groups: one deficient in DNA repair and another with altered mutagen metabolism. **Mutat. Res.**, v. 489, p. 79-96, 2001.
- BRUSKY, J.; ZHU, Y.; XIAO, W. *UBC13*, a DNA-damage-inducible gene, is a member of the error-free postreplication repair pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. **Curr. Genet.**, v. 37, p. 168-174, 2000.
- BRYK, M.; BANERJEE, M.; MURPHY, M.; KNUDSEN, K.E.; GARFINKEL, D.J.; CURCIO, M.J. Transcriptional silencing of Tyl elements in the *RDN1* locus of yeast. **Genes. Dev.**, v. 11, p. 255-269, 1997.
- CASPARI, T.; DAHLEN, M.; KANTER-SMOLER, G.; LINDSAY, H.D.; HOFMANN, K.; PAPADIMITRIOU, K.; SUNNERHAGEN, P.; CARR, A.M. A Characterization of *Schizosaccharomyces pombe* Hus1: A PCNA-related protein that associates with Rad1 and Rad9. **Mol. Cell. Biol.**, v. 20, p. 1254-1262, 2000.
- CASSIER, C.; CHANET, R.; HENRIQUES, J.A.P.; MOUSTACCHI, E. The effects of the three *PSO* genes on induced mutagenesis: a novel class of mutationally defective yeast. **Genetics**, v. 100, p. 841-857, 1980.
- CASSIER, C.; MOUSTACCHI, E. Mutagenesis induced by mono- and bi-functional alkylating agents in yeast mutants sensitive to photoaddition of furocumarins (*pso*). **Mutat. Res.**, v. 84, p. 37-47, 1981.
- CASSIER, C.; MOUSTACCHI, E. Allelism between *pso1-1* and *rev3-1* mutants and between *pso2-1* and *snm1* mutants in *Saccharomyces cerevisiae*. **Curr. Genet.**, v.13, p. 37-40, 1988.

- CHAN, G.L.; DOETSCH, P.W.; HASELTINE, W.A. Cyclobutane pyrimidine dimers and (6-4) photoproducts block polymerization by DNA polymerase I. **Biochemistry**, v. 24, p. 5723-5728, 1985.
- CHENG, S.C.; TARN, W.Y.; TSAO T.Y.; ABELSON J. Prp19: a novel spliceosomal component. **Mol. Cell Biol.**, v. 13, p.1876-1882, 1993.
- CORDA, Y.; SCHAMKE, V.; LONGHESE, M.P.; SMOKVINA, T.; PACIOTTI, V.; BREVET, V.; GILSON, E.; GELI, V. Interaction between Set1p and checkpoint protein Mec3p in DNA repair and telomere functions. **Nat. Genet.**, v. 21, p. 204-208, 1999.
- CORTEZ, D.; WANG, Y.; QIN, J.; ELLEDGE, S. Requirement of ATM-dependent phosphorylation of brca1 in the DNA damage response to double-strand breaks. **Science**, v. 286, p. 1162-1166, 1999.
- DALL'ACQUA, F.; MARCIANI MAGNO, S.; ZAMBON, F.; RODICHIERO, G.. Kinetic analysis of the photoreaction (365 nm) between psoralen and DNA. **Photochem. Photobiol.**, v. 29, p. 489-495, 1979.
- DOHMEN, R.J.; MADURA, K.; BARTEL, B.; VARSHAVSKY, A. The N-end-rule is mediated by the UBC2 (RAD6) ubiquitin-conjugating enzyme. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 88, p. 7351-7355, 1991.
- DRONKERT, M.L.G.; KANAAN, R. Repair of DNA interstrand cross-links. **Mutat. Res.**, v. 486, p. 217-247, 2001.
- ELLEDGE, S.J.; Cell cycle checkpoints: preventing an identity crisis. **Science**, v. 274, p. 1664-1672, 1996.
- ENOMOTO, S.; GLOWCZEWSKI, L.; BERMAN, J. *MEC3*, *MEC1*, and *DDC2* are essential components of a telomere checkpoint pathway required for cell cycle arrest during senescence in *Saccharomyces cerevisiae*. **Mol. Biol. Cell**, v. 13, p. 2626-2638, 2002.
- FRIEDBERG, E.C. **DNA repair**. Ron Newcomer & Associates, San Francisco, USA. 1991.
- FRIEDBERG, E.C.; WALKER, G.C.; SIEDE, W. **DNA repair and mutagenesis**. Washington: ASM Press, USA, 1995.
- GAME, J.C.; COX, B.S. Allelism tests of mutants affecting sensitivity to radiation in yeast and a proposed nomenclature. **Mutat. Res.**, v. 12, p. 328-331, 1971.
- GAME, J.C.; COX, B.S. Epistatic interactions between four *Rad* loci in yeast. **Mutat. Res.**, v. 16, p. 353-362, 1972.

- GAME, J.C.; MORTIMER, R.K. A genetic study of X-ray sensitive mutants in yeast. **Mutat. Res.**, v. 24, p. 281-292, 1974.
- GAME, J.C. DNA double-strand breaks and the *RAD50-RAD57* genes in *Saccharomyces cerevisiae*. **Semin. Cancer Biol.**, v. 4, p. 73-83, 1993.
- GAME J.C. The *Saccharomyces* repair genes at the end of the century. **Mutat. Res.**, v. 451, p. 277-293, 2000.
- GASPARRO, F.P.; LIAO, B.; FOLEY, P.J.; WANG, X.M.; McNIFF, J. M. Psoralen photochemotherapy, clinical efficacy, and photomutagenicity: the role of molecular epidemiology in minimizing risks. **Envir. Mol. Mutag.**, v. 31, p. 105-112, 1998.
- GOFFEAU, A.; BARRELL, B.G.; BUSSEY, H.; DAVIS, R.W.; DUJON, B.; FELDMANN, H.; GALIBERT, F.; HOHEISEL, J.D.; JACQ, C.; JOHNSTON, M.; LOUIS, E.J.; MEWES, H.W.; MURAKAMI, Y.; PHILIPPSEN, P.; TETTELIN, H.; OLIVER, S.G.. Life with 6000 genes. **Science**, v. 274, p. 546-547, 1996.
- GREENBERG, R.B.; ALBERTI, M.; HEARST, J.E.; CHUA, M.A.; SAFFRAN, W.A. Recombinational and mutagenic repair of psoralen interstrand cross-links in *Saccharomyces cerevisiae*. **J. Biol. Chem.**, v. 276, p. 31551-31560, 2001.
- GRETHER, M.E.; HERSKOWITZ, I. Genetic and biochemical characterization of the yeast *spo12* protein. **Mol. Biol. Cell**, v. 10, p. 3689-3703, 1999.
- GREY, M.; DÜSTERHÖFT, A.; HENRIQUES, J.A.P.; BRENDDEL, M. Allelism of *PSO4* and *PRP19* links pre-mRNA processing with recombination and error-prone rDNA repair in *Saccharomyces cerevisiae*. **Nucleic Acids Res.**, v. 24, p. 4009-4014, 1996.
- GRIFFITHS, D.; BARBET, N.; McCREADY, S.; LEHMANN, A.; CARR, A. Fission yeast *rad17*: A homologue of budding yeast *RAD24* that shares regions of sequence similarity with DNA polymerase accessory proteins. **EMBO J.**, v. 14, p. 5812-5823, 1995.
- GUZDER, S.N.; BAILLY, V.; SUNG, P.; PRAKASH, L.; PRAKASH, S. Yeast DNA repair protein *RAD23* promotes complex formation between transcription factor TFIIH and DNA damage recognition factor *RAD14*. **J. Biol. Chem.**, v. 270, p. 8385-8388, 1995.

- GUZDER, S.N.; SUNG, P.; PRAKASH, L.; PRAKASH, S. Yeast Rad7-Rad16 complex, specific for the nucleotide excision repair of nontranscribed DNA strand, is a ATP-dependent DNA damage sensor. **J. Biol. Chem.**, v. 272, p. 21665-21668, 1997.
- GUZDER, S.N.; SUNG, P.; PRAKASH, L.; PRAKASH, S. The DNA-dependent ATPase activity of yeast nucleotide excision repair factor 4 and its role in DNA damage recognition. **J. Biol. Chem.**, v. 273, p. 6292-6296, 1998.
- GUZDER, S.N.; SUNG, P.; PRAKASH, L.; PRAKASH, S. Synergistic interaction between yeast nucleotide excision repair factors NEF2 and NEF4 in the binding of ultraviolet-damaged DNA. **J. Biol. Chem.**, v. 274, p. 24257-24262, 1999.
- HAAS, A.; REBACK, P.M.; PRATT, G.; RECHSTEINER, M. Ubiquitin-mediated degradation of histone H3 does not require the substrate-binding ubiquitin protein ligase, E3, or attachment of polyubiquitin chains. **J. Biol. Chem.**, v. 265, p. 21664-21669, 1990.
- HAASE, E.; RIEHL, D.; MACK, M.; BRENDDEL, M. 1989. Molecular cloning of *SNM1*, a yeast gene responsible for a specific step in the repair of cross-linked DNA. **Mol. Gen. Genet.**, v. 218, p. 64-71, 1989.
- HABER, J.E. Mating-type gene switching in *Saccharomyces cerevisiae*. **Trends Genet.**, v. 8, p. 446-452, 1992.
- HABER, J. Recombination: a frank view of exchanges and vice versa. **Curr. Cell. Biol.**, v. 12, p. 286-292, 2000.
- HARTWELL, L.H.; KASTAN, M.B. Cell cycle control and cancer. **Science**, v. 266, p. 1821-1828, 1994.
- HENRIQUES, J.A.P.; MOUSTACCHI, E. Isolation and characterisation of *pso* mutants sensitive to photoaddition of psoralen derivatives in *Saccharomyces cerevisiae*. **Genetics**, v. 95, p. 273-288, 1980.
- HENRIQUES, J.A.P.; MOUSTACCHI, E. Interaction between mutations for sensitivity to psoralen photoaddition (*pso*) and to radiations (*rad*) in yeast. **J. Bacteriol.**, v. 148 p. 248-256, 1981.
- HENRIQUES, J.A.P.; VICENTE, E.J.; da SILVA, K.V.C.L.; SCHENBERG, A.C.G.; HENRIQUES, J.A.P. *PSO4*: a novel gene involved in error-prone repair in *Saccharomyces cerevisiae*. **Mutat. Res.**, v. 218, p. 111-124, 1989.
- HENRIQUES, J.A.P.; BRENDDEL, M. The role of *PSO* and *SNM* genes in dark repair of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Curr. Genet.**, v. 18, p. 387-393, 1990.

- HENRIQUES, J.A.P.; BROZMANOVA, J.; BRENDDEL, M. Role of *PSO* genes in the repair of photoinduced interstrand cross-links and photooxidative damage in the DNA of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **J. Photochem. Photobiol. B: Biology**, v. 39, p. 185-196, 1997.
- HIRAO, A.; KONG, Y.Y.; MATSUOKA, S.; WAKEHAM, A.; RULAND, J.; YOSHIDA, H.; LIU, D., ELLEDGE, S.J.; MAK, T.W. DNA damage-induced activation of p53 by the checkpoint kinase Chk2. **Science**, v. 287, p. 1824-1827, 2000.
- HOEIJMAKERS, J.H.J. Nucleotide excision repair II: from yeast to mammals. **Trends Genet.**, v. 9, p. 211-217, 1993.
- HORIO, T. Indications and action mechanisms of photo-therapy. **J. Dermatol. Sci.**, v. 23 (Suppl. 1), p. S17-S21, 2000.
- HUANG, H.; KAHANA, A.; GOTTSCHLING, D.E.; PRAKASH, L.; LIEBMAN, S.W. The ubiquitin-conjugating enzyme Rad65 (Ubc2) is required for silencing in *Saccharomyces cerevisiae*. **Mol. Cell. Biol.**, v. 17, p. 6693-6699, 1997.
- HUANG, H.; JOO, Y.H.; BUECK, C.; LIEBMAN, S.W. Host genes that affect the target-site distribution of the yeast retrotransposon, Tyt. **Genetics**, v. 151, p. 1393-1417, 1999.
- HÜBSCHER, U.; NASHEUER, H.-P.; SYVÄOJA, J.E. Eukaryotic DNA polymerases, a growing family. **TIBS**, v. 25, p. 143-147, 2000.
- JENTSCH, S.; McGRATH, J.P.; VARSHAVSKY. The yeast DNA repair gene *RAD6* encodes a ubiquitin-conjugating enzyme. **Nature**, v. 329, p. 131-134, 1987.
- JOHNSON, R.E.; KONDRATICK, C.M.; PRAKASH, S.; PRAKASH, L. *hRAD30* mutations in the variant form of *Xeroderma pigmentosum*. **Science**, v. 285, p. 263-265, 1999a.
- JOHNSON, R.E.; PRAKASH, S.; PRAKASH, L. Efficient bypass of a thymine-thymine dimer by yeast DNA polymerase Poleta. **Science**, v. 283, p. 1001-1004, 1999b.
- KISER, G.L.; WEINERT, T.A. GUF1, a gene encoding a novel evolutionarily conserved GTPase in budding yeast. **Yeast**, v. 11, p. 1311-1316, 1995.
- KOKEN, M.H.; REYNOLDS, P.; JASPERS-DEKKER, I.; PRAKASH, L.; PRAKASH, S.; BOOTSEMA, D.; HOEIJMAKERS, J.H. Structural and functional conservation of two human homologs of the yeast DNA repair gene *RAD6*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 88, p. 8865-8869, 1991.



- KUNZ, B.A.; STRAFFON A.F.L.; VONARX E.J. DNA damage-induced mutation: tolerance via translesion synthesis. **Mutat. Res.**, v. 451, p. 169-185, 2000.
- KUPIEC, M. Damage-induced recombination in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Mutat. Res.**, v. 4, p. 91-105, 2000.
- LAAT, W.L. de; JASPERS, N.G.J.; HOEIJMAKERS, J.H.J. Molecular mechanism of nucleotide excision repair. **Genes & Development**, v. 13, p. 768-785, 1999.
- LAWRENCE, C.W. Mutagenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. **Adv. Genet.**, v. 21, p. 173-254, 1982.
- LAWRENCE, C.W. The RAD6 DNA repair pathway in *Saccharomyces cerevisiae*: what does it do, and how does it do it? **Bioessays**, v. 16, p. 253-258, 1994.
- LAWRENCE, C.W.; HINKLE, D.C. DNA polymerase zeta and the control of DNA damage induced mutagenesis in eukaryotes. **Cancer Surveys**, v. 28, p. 21-31, 1996.
- LAWRENCE, C.W.; GIBBS, P.E.M.; MURANTE, R.S.; WANG, X.-D.; LI, Z.; McMANUS, T.P.; MCGREGOR, W.G.; NELSON, J.R.; HINKLE, D.C.; MAHER, V.M. Roles of DNA polymerase  $\zeta$  and Rev1 protein in Eukaryotic Mutagenesis and Translesion Replication. Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology. **Biological responses to DNA Damage**. v. LXV, p. 61-69, 2000.
- LEMONTT, J.F. Mutants of yeast defective in mutation induced by ultraviolet light. **Genetics**, v. 68, p. 21-33, 1971.
- LEMONTT, J.F. Induction of forward mutations in mutationally defective yeast. **Mol. Gen. Genet.**, v. 119, p.27-42, 1972.
- LIEBMAN, S.W.; NEWNAM, G. A ubiquitin-conjugating enzyme, RAD6, affects the distribution of Tyl retrotransposon integration positions. **Genetics**, v. 133, p. 499-508, 1993.
- LIPPKE, J.A.; GORDON, L.K.; BRASH, D.E.; HASELTINE, W.A. Distribution of UV light-induced damage in a defined sequence of human DNA: detection of alkaline-sensitive lesions at pyrimidine nucleoside-cytidine sequences. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 78, p. 3388-3392, 1981.

- LONGHESE, M.P.; FRASCHINI, R.; PLEVANI, P.; LUCCHINI, G. Yeast pip3/mec3 mutants fail to delay entry into S phase and to slow DNA replication in response to DNA damage, and they define a functional link between Mec3 and DNA primase. **Mol. Cell. Biol.**, v. 16, p. 3235-3244, 1996.
- LONGHESE, M.P.; PACIOTTI, V.; FRASCHINI, R.; ZACCARINI, R.; PLEVANI, P.; LUCCHINI, G. The novel DNA damage checkpoint protein ddc1p is phosphorylated periodically during the cell cycle and in response to DNA damage in budding yeast. **EMBO J.**, v 16, p 5216-5226, 1997.
- LONGHESE, M.P.; FOIANI, M.; MUZI-FALCONI, M.; LUCCHINI, G; PLEVANI, P. DNA damage checkpoint in budding yeast. **EMBO J.**, v. 17, p. 5525-5528, 1998.
- LOWE, S.W.; SCHMITT, E.M.; SMITH, S.W.; OSBORNE, B.A.; JACKS, T. p53 is required for radiation-induced apoptosis in mouse thymocytes. **Nature**, v. 362, p. 847-849, 1993.
- LOWNDES, N.; MURGUIA, J. Sensing and responding to DNA damage. **Curr. Opin. Genet. Dev.**, v 10, p 17-25, 2000.
- LUSSIER, M.; WHITE, A. M.; SHERATON, J.; diPAOLO, T.; TREADWELL, J.; SOUTHARD, S.B.; HORENSTAIN, C.I.; CHENWEINER, J.; RAM, A.F.J.; KAPTEYN, J.C. *et al.* Large scale identification of genes involved in cell surface biosynthesis and architecture in *Saccharomyces cerevisiae*. **Genetics**, v. 147, p. 435-450, 1997.
- LYDALL, D.; WEINERT, T. Yeast checkpoint genes in DNA damage processing: implications for repair and arrest. **Science**, v. 270, p. 1488-1491, 1995.
- LYDALL, D.; WEINERT, T. G2/M checkpoint genes of *Saccharomyces cerevisiae*: further evidence for roles in DNA replication and/or repair. **Mol. Gen. Genet.**, v. 256, p. 638-651, 1997.
- MACHADO, R.M. Caracterização fenotípica e genotípica de novos mutantes *pso* (*pso8-1* e *pso9-1*) de *Saccharomyces cerevisiae*, sensíveis à fotoadição de psoralenos. Porto Alegre, UFRGS. 100p, 2000 Dissertação de Mestrado – Curso de Pós-Graduação em Bioquímica.
- MAGAÑA-SCHWENCKE, N.; HENRIQUES, J.A.P.; CHANET, R.; MOUSTACCHI, E. The fate of 8-methoxypsoralen photoinduced cross-links in nuclear and mitochondrial yeast DNA: comparison of wild-type and repair deficient strains. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v. 79, p. 1722-1726, 1982.

- MARTIN, S.G.; LAROCHE, T.; SUKA, N.; GRUNSTEIN, M.; GASSER, S.M. Relocalization of telomeric Ku and SIR proteins in response to DNA strand breaks in yeast. **Cell**, v. 97, p. 621-633, 1999.
- MASUTANI, C.; KUSUMOTO, R.; YAMADA, A.; DOHMAE, N.; YOKOI, M.; YUASA, M.; ARAKI, M.; IWAI, S.; TAKIO, K.; HANAOKA, F. The XPV (xeroderma pigmentosum variant) gene encodes human DNA polymerase eta. **Nature**, v. 399, p. 700-704, 1999.
- McDONALD, E. R. III; EL-DERY, W. S. Checkpoint genes in Cancer. **Ann. Med.**, v. 33, p. 113-122, 2001.
- MEIRA, L.B.; FONSECA, M.B.; AVERBECK, D.; SCHENBERG, A.C.G.; HENRIQUES, J.A.P. The *pso4-1* mutation reduces spontaneous mitotic gene conversion and reciprocal recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. **Mol. Gen. Genet.**, v. 235, p. 311-316, 1992.
- MEIRA, L.B.; MAGAÑA-SCHWENCKE, N.; AVERBECK, D.; HENRIQUES, J.A.P. Involvement of the *PSO3* gene of *Saccharomyces cerevisiae* in intrachromosomal mitotic recombination and gene amplification. **Mol. Gen. Genet.**, v. 245, p. 750-759, 1994.
- MELLON, I.; HANAWALT, P.C. Induction of the *Escherichia coli* lactose operon selectively increases repair of its transcribed DNA strand. **Nature**, v. 342, p. 95-98, 1989.
- MELO, J.A.; COHEN, J.; TOCZYSKI, D.P. Two checkpoint complexes are independently recruited to sites of DNA damage in vivo. **Genes Dev.**, v. 15, p. 2809-2821, 2001.
- MELO, J.; TOCZYSKI, D. A unified view of the DNA damage checkpoint, **Curr. Opin. Cell Biol.**, v 14, p 237-245, 2002.
- MENIEL, V.; MAGAÑA-SCHWENCKE, N.; AVERBECK, D. Preferential repair in *Saccharomyces cerevisiae rad* mutants after induction of interstrand cross-links by 8-methoxypsoralen plus UVA. **Mutagenesis**, v. 10, p. 543-548, 1995.
- MERCIER, G.; DENIS, Y.; MARC, P.; PICARD, L.; DUTREIX, M. Transcriptional induction of repair genes during slowing of replication in irradiated *Saccharomyces cerevisiae*. **Mutat. Res.**, v. 487, p. 157-172, 2001.
- MILLS, K.D.; SINCLAIR, D.A.; GUARENTE, L. MEC1-dependent redistribution of the Sir3 silencing protein from telomeres to DNA double-strand breaks. **Cell**, v. 97, p. 609-620, 1999.

- MORAIS, M.A. Jr.; VICENTE, E.J.; BROZMANOVA, J.; SCHENBERG, A.C.G.; HENRIQUES, J.A.P. Further characterisation of the yeast *pso4-1* mutant: interactions with *rad51* and *rad52* mutant after photoinduced psoralen lesions. **Curr. Genet.**, v. 29, p. 211-218, 1996.
- MORRISON, A.; MILLER, E.J.; PRAKASH, L. Domain structure and functional analysis of the carboxyl-terminal polyacidic sequence of the RAD6 protein of *Saccharomyces cerevisiae*. **Mol. Cell Biol.**, v. 8, p. 1179-1185, 1988.
- MORRISON, A.; CHRISTENSEN, R.B.; ALLEY, J.; BECK, A.K.; BERNSTINE, E.G.; LEMONTT, J.F.; LAWRENCE, C.W. *REV3*, a yeast gene whose function is required for induced mutagenesis, is predicted to encode a nonessential DNA polymerase. **J. Bacteriol.**, v. 171, p. 5659-5667, 1989.
- MOSSI, R.; HUBSCHER, U. Clamping down on clamps and clamp loaders. **Curr. Opin. Genet. Dev.**, v. 254, p. 209-216, 1998.
- MOUSTACCHI, E.; CASSIER, C.; CHANET, R.; MAGAÑA-SCHWENCKE, N.; SAEKI, N.; HENRIQUES, J.A.P. Biological role of photoinduced crosslinks and monoadducts in yeast DNA: genetic control and steps involved in their repair. In: FRIEDBERG, E.C.; BRIDGES, A.B. (eds). **Cellular Responses to DNA damage**. New York: Alan Liss Inc., p. 87-106, 1983.
- MOUSTACCHI, E. Photomutagenicity induced by psoralens: mechanism of repair and photomutagenicity. **Arch. Toxicol.**, v. 12, p. 26-34, 1988.
- NAITO, T.; MATSUURA, A.; ISHIKAWA, F. Circular chromosome formation in a fission yeast mutant defective in two ATM homologues. **Nature Genet.**, v. 20, p. 203-206, 1998.
- NELSON, J.R.; LAWRENCE, C.W.; HINKLE, D.C. Thymine-thymine dimer bypass by yeast DNA polymerase  $\zeta$ . **Science**, v. 272, p. 1646-1649, 1996.
- NICKOLOFF, J.A.; HOEKSTRA, M.F. **DNA damage and repair**. Totowa, New Jersey: Humana Press, 1998.
- PACIOTTI, V.; LUCCHINI, G.; PLEVANI, P.; LONGHESE, M.P.; Mec1p is essential for phosphorylation of the yeast DNA damage checkpoint protein Ddc1p, which physically interacts with Mec3p. **EMBO J.**, v. 17, p. 4199-4209, 1998.
- PAESI-TORESAN, S.O.; PICH, C.T.; GREY, M.; KESZENMAN, D.; BRENDDEL, M.; HENRIQUES, J.A.P. Gene *PSO5* of *Saccharomyces cerevisiae*, involved in repair of oxidative damage, is allelic to *RAD16*. **Curr. Genet.**, v. 27, p. 493-495, 1995.

- PARSHAD, R.; SANFORD, K.K. Radiation-induced chromatid breaks and deficient DNA repair in cancer predisposition. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 37, p. 87-96, 2001.
- PARSONS, B. J. Psoralen photochemistry. **Photochem. Photobiol.**, v. 32, p. 813-821, 1980.
- PAULOVICH, A.G.; MARGULIES, R.U.; GARVIK, B.M.; HARTWELL, L.H. *RAD19*, *RAD17* and *RAD24* are required for S phase regulation in *Saccharomyces cerevisiae* in response to DNA damage. **Genetics**, v. 145, p. 45-62, 1997.
- PAULOVICH, A.G.; ARMOUR, C.D.; HARTWELL, L.H. The *Saccharomyces cerevisiae* *RAD9*, *RAD17*, *RAD24* and *MEC3* genes are required for tolerating irreparable, ultraviolet-induced DNA damage. **Genetics**, v. 150, p. 75-93, 1998.
- PICOLOGLOU, S.; BROWN, N.; LIEBMAN, S.W. Mutations in *RAD6*, a yeast gene encoding a ubiquitin-conjugating enzyme, stimulate retrotransposition. **Mol. Cell. Biol.**, v. 10, p. 1017-1022, 1990.
- PRAKASH, L. Lack of chemically induced mutation in repair-deficient mutants of yeast. **Genetics**, v. 78, p. 1101-1118, 1974.
- PRAKASH, L. The relation between repair of DNA and radiation and chemical mutagenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. **Mutat. Res.**, v. 41, p. 241-248, 1976.
- PRAKASH, L.; PRAKASH, S. Isolation and characterization of MMS-sensitive mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. **Genetics**, v. 86, p. 33-55, 1977.
- PRAKASH, L. Characterisation of postreplication repair in *Saccharomyces cerevisiae* and effects of *rad6*, *rad18*, *rev3* and *rad52* mutations. **Mol. Gen. Gent.**, v.184, p. 471-478, 1981.
- PRAKASH, L. The structure and function of *RAD6* and *RAD18* repair genes of *Saccharomyces cerevisiae*. **Genome**, v. 31, p. 597-600, 1989.
- PRAKASH, S.; SUNG, P.; PRAKASH, L. DNA repair genes and proteins of *Saccharomyces cerevisiae*. **Annu. Rev. Genet.**, v. 27, p. 33-70, 1993.
- PRAKASH, S.; JOHNSON, R.E.; WASHINGTON, M.T.; HARACSKA, L.; KONDRATICK, C.M. ; PRAKASH L. Role of Yeast and human DNA polymerase  $\eta$  in error-free replication of damaged DNA. Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology. **Biological responses to DNA Damage**. v. LXV p. 51-59, 2000.

- PRAKASH, S.; PRAKASH, L. Nucleotide excision repair in yeast. **Mutat. Res.**, v. 451, p. 13-24, 2000.
- PRICE, E.A.; BOURNE, S.L.; RADBOURNE, R.; LAWON, P.A.; LAMERDIN, J.; THOMPSON, L.H.; ARRAND, J.E. Rare microsatellite polymorphisms in the DNA repair genes *XRCC1*, *XRCC3* and *XRCC5* associated with cancer in patients of varying radiosensitivity. **Somat. Cell. Mol. Genet.**, v. 23, p. 237-247, 1997.
- PUNGARTNIK, C.; KERN, M.F.; BRENDEL, M.; HENRIQUES, J.A.P. Mutant allele *ps07-1*, that sensitizes *Saccharomyces cerevisiae* to photoactivated psoralen, is allelic with *COX11*, encoding a protein indispensable for a functional cytochrome c oxidase. **Curr. Genet.**, v. 36, p. 124-129, 1999.
- QUEROL, C.B.; PAESI-TORESAN, S.O.; MEIRA, L.B.; BRENDEL, M.; HENRIQUES, J.A.P. Isolation and characterisation of three mutants with increased sensitivity to photoactivated 3-carbethoxypsoralen in *Saccharomyces cerevisiae*. **Curr. Genet.**, v. 25, p. 407-411, 1994.
- RAMOTAR, D.; MASSON, J.-Y. *Saccharomyces cerevisiae* DNA repair processes: an update. **Mol. Cell Biochem.**, v. 158, p. 65-75, 1996.
- REED, S.H.; YOU, Z.; FRIEDBERG, E.C. The yeast *RAD7* and *RAD16* genes are required for postincision events during nucleotide excision repair. **J. Biol. Chem.**, v. 273, p. 29481-29488, 1998.
- REVERS, L.F.; CARDONE, J.M.; FELDMANN, H.; SAFFI, J.; GREY, M.; BRENDEL, M.; HENRIQUES, J.A.P. Thermoconditional modulation of the pleiotropic sensitivity phenotype by the *Saccharomyces cerevisiae* *PRP19* mutant allele *ps04-1*. **Nucleic Acids Res.** Aceito para publ., 09/2002.
- RICHTER, D.; NIEGEMANN, E.; BRENDEL, M. Molecular structure of the DNA cross-link repair gene *SNM1* (*PSO2*) of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Mol. Gen. Genet.**, v. 231, p. 194-200, 1992.
- RITCHIE, K.B.; MALLORY, J.C.; PETES, T.D. Interactions of *TCL1* (which encodes the RNA subunit of telomerase), *TEL1* and *MEC1* in regulating telomere length in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Mol. Cell Biol.**, v. 19, p. 6065-6075, 1999.
- RODARTE-RAMON, U.S.; MORTIMER, R.K.. Radiation-induced recombination in *Saccharomyces cerevisiae*: isolation and genetic study of recombination-deficient mutants. **Radiat. Res.**, v. 49, p. 133-147, 1972.

- ROLLA, H.; GREY, M.; SCHIMIDT, C.; NIEGEMANN, E.; BRENDDEL, M.; HENRIQUES, J.A.P. Mutant *pso9-1* of *Saccharomyces cerevisiae*, sensitive to photoactivated psoralens, UV radiation, and chemical mutagens, contains a *rad6* missense mutant allele. **Curr. Genet.**, v. 41, p. 217-223, 2002.
- ROUSH, A.A.; SUAREZ, M.; FRIEDBERG, E.C.; RADMAN, M.; SIEDE, W. Deletion of the *Saccharomyces cerevisiae* gene *RAD30* encoding an *Escherichia coli* *DinB* homolog confers UV radiation sensitivity and altered mutability. **Mol. Gen. Genet.**, v. 257, p. 686-692, 1998.
- RUHLAND, A.; HAASE, E.; SIEDE, W.; BRENDDEL, M. Isolation of yeast mutants sensitive to the bifunctional alkylating agent nitrogen mustard. **Mol. Gen. Genet.**, v. 181, p. 346-351, 1981.
- SAFFI, J.; PEREIRA, V.R.; HENRIQUES, J.A.P. Importance of the Sgs1 helicase activity in DNA repair of *Saccharomyces cerevisiae*. **Curr. Genet.**, v. 37, p. 75-78, 2000.
- SAFFI, J.; FELDMANN, H.; WINNACKER, E.L.; HENRIQUES, J.A.P. Interaction of the yeast Pso5/Rad16 and Sgs1 proteins: influences on DNA repair and aging. **Mutat. Res.**, v. 486, p. 195-206, 2001.
- SAGE, E.; DOAN, T.L.; BOYER, V.; HELLAND, D.E.; KITTLER, L.; HELENE, C.; MOUSTACCHI, E. Oxidative DNA damage photoinduced by 3-carbethoxypsoralen and other furocoumarins: mechanisms of photooxidation and recognition by repair enzymes. **J. Mol. Biol.**, v. 209, p. 297-314, 1989.
- SANCAR, G.B.; SIEDE, W.; ZEELAND, A.A. Repair and processing of DNA damage: a summary of recent progress. **Mutat. Res.**, v. 362, p. 127-146, 1996.
- SCHILD, D.; GLASNER, B.J.; MORTIMER, R.K.; CARLSON, M.; LAURENT, B.C. Identification of *RAD16*, a yeast excision repair gene homologous to the recombinational repair gene *RAD54* and to the *SNF2* gene involved in transcriptional activation. **Yeast**, v. 8, p. 385-395, 1992.
- SCHMIDT, C.L.; GREY, M.; SCHMIDT, M.; BRENDDEL, M.; HENRIQUES, J.A.P. Allelism of *Saccharomyces cerevisiae* genes *PSO6*, involved in survival after 3-CPs+UVA induced damage, and *ERG3*, encoding the enzyme sterol C-5 desaturase. **Yeast**, v. 15, p. 1503-1510, 1999.
- SELBY, C.P.; SANCAR, A. Molecular mechanism of transcription repair coupling. **Science**, v. 260, p. 53-58, 1993.
- SHINOHARA, A.; OGAWA, T. Stimulation by Rad52 of yeast Rad51-mediated recombination. **Nature**, v. 391, p. 404-407, 1998.

- SILVA, K.V.C.L.; MORAIS Jr., M.A.; HENRIQUES, J.A.P. The *PSO4* gene of *S. cerevisiae* is important for sporulation and the meiotic DNA repair of photoactivated psoralen lesions. **Curr. Genet.**, v. 27, p. 207-212, 1995.
- SINGH, J.; GOEL, V.; KLAR, A.J. A novel function of the DNA repair gene *rhp6* in mating-type silencing by chromatin remodeling in fission yeast. **Mol. Cell. Biol.**, v. 18, p. 5511-5522, 1998.
- SMIDER, V.; CHU, G. The end joining reaction in V(D)J recombination. **Semin. Immunol.**, v. 9, p. 713-732, 1997.
- SUNG, S.; PRAKASH, S.; PRAKASH, L. The RAD6 protein of *Saccharomyces cerevisiae* polyubiquitinates histones, and its acidic domain mediates this activity. **Genes Dev.**, v. 2, p. 1476-1485, 1988.
- SWEDER, K.S.; HANAWALT, P.C. Preferential repair of cyclobutane pyrimidine dimers in the transcribed strand of a gene in yeast chromosomes and plasmids is dependent on transcription. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 89, p. 10696-10700, 1992.
- SWEDER, K.S. Nucleotide excision repair in yeast. **Curr. Genet.**, v. 27, p. 1-16, 1994.
- TAYLOR, J.S.; GARRET, D.S.; COHRS, M.O. Solution-state structure of the Dewar pyriminone photoproduct of thymidylyl-(3'-5')-thymidine. **Biochemistry**, v.27, p. 7206-7215, 1988.
- THOMPSON, E.D. Effect of latered sterol composition on growth characteristics of *Saccharomyces cerevisiae*. **J. Bacteriol.**, v.120, p. 779-784, 1974.
- UETZ, P.; GIOT, L.; CAGNEY, G.; MANSFIELD, T.A.; JUDSON, R.S.; KNIGHT, J.R.; LOCKSHON, D.; NARAYAN, V.; SRINIVASAN, M.; POCHART, P.; QURESHI-EMILI, A.; LI, Y.; GODWIN, B.; CONOVER, D.; KALBFLEISCH, T.; VIJAYADAMODAR, G.; YANG, M.; JOHNSTON, M.; FIELDS, S.; ROTHBERG, J.M. A comprehensive analysis of protein-protein interactions in *Saccharomyces cerevisiae*. **Nature**, v. 403, p. 623-627, 2000.
- Van DICK, E.; STASIAK, A.; STASIAK, A.; WEST, S.C. Binding of double-strand breaks in DNA by human Rad52 protein. **Nature**, v. 398, p. 728-731, 1999.
- Van HOFFEN; A.; NATARAJAN, A.T.; MAYNE, L.V.; Van ZEELAND, A.A.; MULLENDERS, L.H.F.; VENEMA, J. Deficient repair of the transcribed strand of active genes in Cockayne's syndrome cells. **Nucleic Acids Res.**, v. 21, p. 5890-5895, 1993.

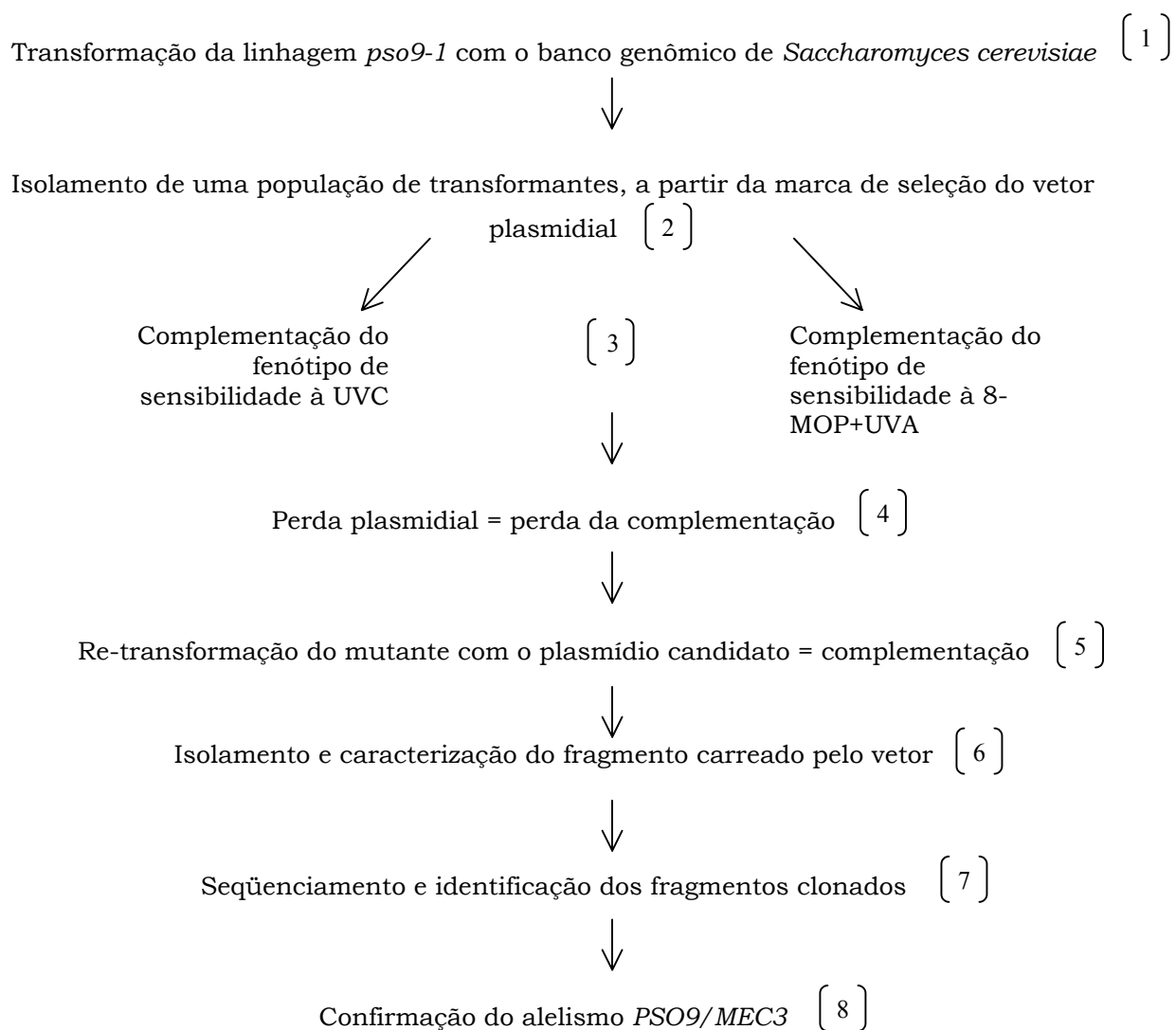


- VENCLOVAS, V.; THELEN, M.P. Structure-based predictions of Rad1, Rad9, Hus1 and Rad17 participation in sliding clamp and clamp-loading complexes. **Nucleic Acids Res.**, v. 28, p. 2481-2493, 2000.
- VERHAGE, R.; ZEEMAN, A.M.; de GROOT, N.; GLEIG, F.; BANG, D.D.; VAN DE PUTTE, P.; BROUWER, J. The *RAD7* and *RAD16* genes, which are essential for pyrimidine dimer removal from silent mating type loci, are also required for repair of nontranscribed strand of an active gene in *Saccharomyces cerevisiae*. **Mol. Cell Biol.**, v. 14, p. 6135-6142, 1994.
- VERHAGE, R.A.; VAN DE PUTE, P.; BROUWER, J. Repair of rDNA in *Saccharomyces cerevisiae*: RAD4-independent strand-specific nucleotide excision repair of RNA polymerase I transcribed genes. **Nucleic Acids Res.**, v. 24, p. 1020-1025, 1996.
- WATT, P.; LOUIS, E.; BORTS, R.; HICKSON, I. SGS1: a eukaryotic homolog of *E. coli* RecQ that interacts with topoisomerase II in vivo and is required for faithful chromosome segregation. **Cell**, v. 81, p. 253-260, 1995.
- WEINERT, T. DNA damage checkpoints update: getting molecular. **Curr. Opin. Genet. Dev.**, v. 8, p. 185-193, 1998.
- WOLTER, R.; SIEDE, W.; BRENDDEL, M. Regulation of *SNM1*, an inducible *Saccharomyces cerevisiae* gene required for repair of DNA cross-links. **Mol. Gen. Genet.**, v. 250, p. 162-168, 1996.
- WOOD, R.D. Nucleotide excision repair in mammalian cells. **J. Biol. Chem.**, v. 272, p. 23465-23468, 1997.
- XIAO, W.; CHOW, B.L.; BROOMFIELD, S.; HANNA, M. The *Saccharomyces cerevisiae* RAD6 group is composed of an error-prone and two error-free postreplication repair pathways. **Genetics**, v. 155, p. 1633-1641, 2000.
- ZHOU, B.S.; ELLEDGE, S.J. The DNA damage response: putting checkpoints in perspective. **Nature**, v. 408, p. 433-437, 2000.

## **APÊNDICE I**

## Estratégia de Clonagem

A estratégia de clonagem utilizada neste projeto baseou-se na complementação aos fenótipos mais evidentes do alelo mutante *pso9-1*. A linhagem mutante foi transformada com dois bancos genômicos de *S. cerevisiae* distintos, os quais foram previamente construídos nos plasmídios centroméricos YCp50 e pRS200. O esquema abaixo sintetiza as etapas da estratégia utilizada para clonagem do gene *PSO9*.



### ***Itens 1 e 2***

A estratégia de clonagem do gene *PSO9* foi iniciada com a transformação da linhagem *ps09-1* com um banco genômico de *S. cerevisiae* baseado no vetor YCp50, o qual possui o gene URA3 como marcador genético. Da população de transformantes isolada foram testados 9504 transformantes para complementação ao fenótipo de sensibilidade à UVC. Apenas um candidato foi obtido, tendo sido considerado um supressor pela fraca capacidade de complementação (restauração de apenas 30% da sensibilidade a UVC). Diante destes resultados, um banco genômico diferente foi empregado, sendo este baseado no vetor pRS200, contendo o gene TRP1 como marcador genético. Desta população, foram testados 9120 transformantes, também para complementação da sensibilidade à UVC, como os anteriores.

### ***Item 3***

A partir desta tiragem inicial foram isolados cinco transformantes candidatos que restauraram consideravelmente a sensibilidade à UVC, com comportamento semelhante à linhagem selvagem. Posteriormente, estes transformantes foram tratados com 8-MOP+UVA, condição em que igualmente houve complementação.

### ***Itens 4 e 5***

Os transformantes contendo clones da biblioteca genômica capazes de restaurar os fenótipos testados foram então submetidos à perda plasmidial, e novamente expostos aos mesmos testes de sensibilidade, a fim de garantir que a complementação era conferida pelo fragmento carregado pelo vetor pRS200, e não por mutações supressoras. Após a re-

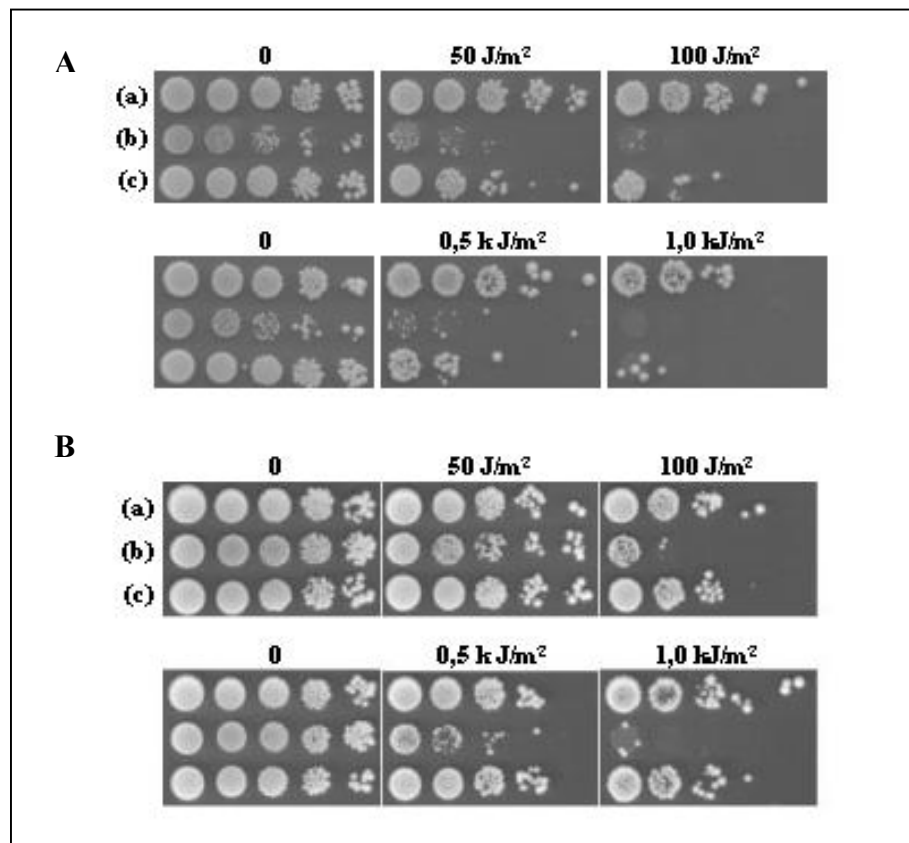
transformação da linhagem *ps09-1* com os plasmídios capazes de restaurar os fenótipos testados, apenas um destes continuou a complementar o fenótipo de sensibilidade à UVC e 8-MOP+UVA.

### **Itens 6 e 7**

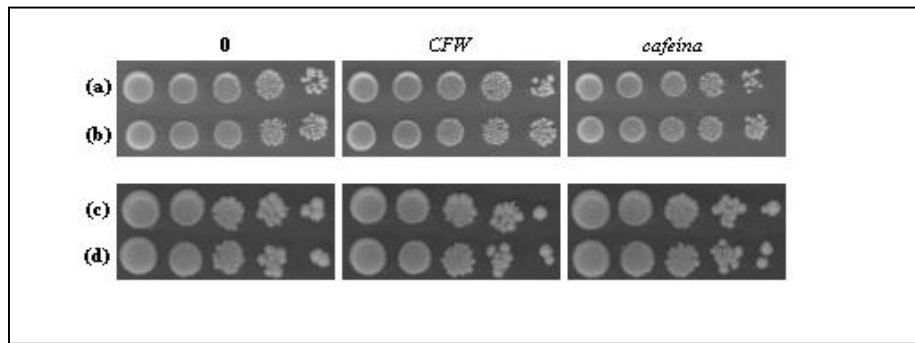
As extremidades do fragmento carregado pelo vetor pRS200 foram seqüenciadas e comparadas com os bancos de dados de *S. cerevisiae*, revelando uma seqüência de 8611 pb, ancorada no braço esquerdo do cromossomo XII. Esta seqüência contém duas ORFs desconhecidas (YLR287c e YLR290c), e os genes já descritos *RPS30A*, *MEC3* e *GUF1*. Após investigação da literatura e dos fenótipos e funções celulares associados às seqüências codificantes desta fração do cromossomo XII, o gene *MEC3* mostrou-se como o mais provável candidato à alelo selvagem da mutação *ps09-1*, indicando alelismo entre *MEC3* e *PSO9*.

### **Item 8**

Esta suposição foi confirmada por dois tipos de experimentos: (a) análise de complementação genética através da obtenção de uma linhagem diplóide homozigota mutante para o locus *MEC3/PSO9* resultante do cruzamento da linhagem *ps09-1* com outro mutante *mec3* obtido junto ao repositório de linhagens de *S. cerevisiae* do projeto EUROSCARF; (b) subclonagem do fragmento de *Pst*I-*Sna*BI de 2721pb da seqüência de 8611 pb, contendo a região codificante completa de *MEC3*, seguido de re-transformação na linhagem mutante *ps09-1* e posterior verificação da restauração ou não dos mesmos fenótipos testados nas etapas anteriores. Esta seqüência de experimentos resultou, respectivamente, em não-complementação e complementação dos fenótipos de *ps09-1*, confirmando o alelismo entre *PSO9* e *MEC3*.



**Figura 1.** Ensaio de perda plasmidial seguido de re-transformação do plasmídeo candidato pJC9, na linhagem *pso9-1*. **A)** Perda plasmidial e conseqüente perda da complementação da sensibilidade à UVC (50 e 100 J/m<sup>2</sup>) e 8-MOP + UVA (0,5 e 1,0 kJ/m<sup>2</sup>). **B)** Re-transformação do plasmídeo candidato e recuperação da complementação. **(a)** WT + pRS314; **(b)** *pso9-1* + pRS314; **(c)** *pso9-1* + pJC9.



**Figura 2.** Ensaio de sensibilidade das linhagens *pso9-1* e *mec3Δ* à *calcofluor white* (CFW) 30  $\mu\text{g}/\text{mL}$  e cafeína 0,5  $\text{mg}/\text{mL}$ . **(a)** *PSO9*; **(b)** *pso9-1*; **(c)** *MEC3*; **(d)** *mec3Δ*.