

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

**Caracterização molecular da mutação *pso8-1/rad6* de
Saccharomyces cerevisiae, sensível à fotoadição de
psoralenos, à radiação UVC e a mutágenos químicos.**

Helena Rolla Espindola

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

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica como um dos pré-requisitos para a obtenção do Grau de Doutor em Ciências.

Porto Alegre
2002

Aos meus pais, Ruy e Gelsa, que me deram um exemplo de vida, de luta e de força...

Aos meus filhos, Jonatas e Rui, que me deram inspiração e esperança.

Este trabalho foi realizado nas instalações do Laboratório de Radiobiologia e no GENOTOX - Laboratório de Genotoxicidade do Centro de Biotecnologia desta Universidade. O projeto foi subvencionado pela Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) e pelo GENOTOX - Laboratório de Genotoxicidade.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. João Antonio Pêgas Henriques, pela orientação, pela confiança, pela amizade, meu carinho, minha gratidão.

Ao Prof. Martin Brendel, pelas discussões científicas, pelas valiosas sugestões e pela imensa colaboração neste trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e ao Centro de Biotecnologia da UFRGS, pela acolhida e apoio acadêmico e científico.

À Dra. Clarice Lauer Schmidt, pela amizade, auxílio, incentivo e sugestões durante o desenvolvimento deste trabalho.

Aos colegas e amigos do laboratório de Genotoxicidade-GENOTOX Jaqueline, Miriam, Rosely, Gabriel e Marcia. Obrigado pela amizade e pelo carinho ao longo de todos estes anos, foi muito bom trabalhar com vocês, vou sentir saudades...

Aos colegas do laboratório 219, 210 e GENOTOX, pelo auxílio, discussões, críticas, pela convivência amigável e por todos os momentos compartilhados que nos fizeram amigos...

À Roseana Magni Machado, pela amizade, companheirismo, e pelas muitas conversas que tornaram este período mais divertido.

À bolsista de iniciação científica Adriana de Oliveira, pela inestimável colaboração durante a realização da parte experimental deste trabalho.

À Miriam, pela revisão do texto.

À Izabel e Ana Amélia, pela ajuda na elaboração da apresentação da tese.

À Dra. Cristina Pungartnik, pela amizade e pela leitura crítica desta tese.

Ao Elmo, do departamento de Genética e a Graziela, do CBIOT pela ajuda na digitação da bibliografia e formatação da tese.

Aos meus pais, que compartilharam os meus ideais e os alimentaram, apostando na minha conquista. Por seu amor, carinho e confiança.

Aos meus filhos Jonatas e Rui, grandes amigos e companheiros, fico devendo horas de dedicação, de carinho e de companhia. Mesmo assim, jamais deixaram de ser meu suporte e minha motivação.

“Descobri como é bom chegar quando se tem paciência, e para chegar onde quer que seja, aprendi que não é preciso dominar a força, mas a razão. É preciso antes de mais nada, querer.”

(Amyr Klink)

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	i
LISTA DE ILUSTRAÇÕES.....	iii
LISTA DE TABELAS.....	v
RESUMO.....	vi
ABSTRACT.....	vii
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 VIAS DE REPARAÇÃO.....	3
1.1.1 Reparação por excisão de nucleotídeos (NER).....	5
1.1.2 Reparação pós-replicativa e mutagênica.....	10
1.1.3 Reparação de DNA por recombinação homóloga.....	16
1.1.4 Reparação de DNA por recombinação não-homóloga ou ilegítima.....	20
1.2 AGENTES QUE LESIONAM A CÉLULA.....	22
1.2.1 Radiação UV.....	22
1.2.1.1 Dímeros de pirimidina	22
1.2.1.2 Fotoproduto 6-4 (pirimidina-pirimidona).....	23
1.2.1.3 Outros fotoprodutos.....	24
1.2.1.4 UV-mimético: óxido de 4-nitroquinolina (4-NQO).....	25
1.2.2 Agentes alquilantes.....	26
1.2.3 Poralenos/furocumarinas.....	27
1.3 MUTANTES <i>PSO</i>	30
1.4 OBJETIVOS.....	38
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	39
2.1 Linhagens e Plasmídeos.....	39
2.2 Meios de cultura.....	40
2.3 Agentes químicos.....	42
2.4 Estoque das culturas.....	43
2.5 Condições de crescimento.....	43
2.6 Construção das linhagens de levedura.....	44
2.7 Teste em gotas qualitativo.....	45
2.8 Determinação do sinal de acasalamento.....	46
2.9 Determinação microbiológica do conteúdo de glutatona.....	46
2.10 Curvas de sobrevivência.....	47
2.10.1 Preparação das suspensões celulares.....	47
2.10.2 Tratamento com 3-CPs e 8-MOP+UVA.....	48
2.10.3 Tratamento com radiação UVC.....	48
2.11 Tratamento com MNNG, 4-NQO, DEO, NDEA, 8-HQ, H ₂ O ₂ e Paraquat..	49
2.12 Determinação da frequência de revertentes <i>HIS</i> ⁺ e de mutação para frente (<i>forward mutation</i>).....	49
2.13 Métodos relacionados a ácidos nucleicos.....	50
2.13.1 Maxi-prep.....	51
2.13.2 Mini-prep.....	52
2.13.2.1 Extração de plasmídeos contidos em células de bactéria...	52
2.13.2.2 Extração de plasmídeos contidos em células de levedura..	53

2.13.3	Extração de DNA cromossômico das linhagens de levedura.	53
2.14	Transformação.....	54
2.14.1	Transformação de células de bactéria.....	54
2.14.1.1	Eletroporação.....	54
2.14.1.2	Cloreto de Cálcio.....	55
2.14.2	Transformação de células de levedura.....	56
2.14.2.1	Acetato de lítio.....	56
2.14.2.2	Eletroporação.....	56
2.15	Perda plasmideal.....	57
2.16	Análise e construção plasmideal.....	57
2.16.1	Restrição enzimática.....	57
2.16.2	Eletroforese.....	58
2.16.3	Isolamento de fragmentos a partir de gel de agarose.....	58
2.17	Seqüenciamento.....	59
2.18	Banco de dados Internacional.....	59
3.	RESULTADOS.....	60
3.1	ANÁLISE GENOTÍPICA DA MUTAÇÃO <i>PSO8-1</i>	61
3.1.1	Efeito da mutação <i>ps08-1</i> sobre a esporulação.....	63
3.1.2	Teste de complementação.....	63
3.2	ANÁLISE FENOTÍPICA DA MUTAÇÃO <i>PSO8-1</i>	64
3.2.3	Sensibilidade do mutante <i>ps08-1</i> ao efeito letal de diferentes agentes mutagênicos.....	64
3.2.1.1	Sobrevivência após a fotoadição de furocumarinas mono (3CPs) bi-funcionais (8MOP).....	65
3.2.1.2	Sobrevivência após a radiação UVC.....	67
3.2.1.3	Sobrevivência após tratamento com DEO, MNNG, NDEA, 4-NQO, 8-HQ, H ₂ O ₂ e Paraquat.....	68
3.2.2	Resposta mutagênica da mutação <i>ps08-1</i> para diferentes agentes genotóxicos.....	70
3.2.2.1	Indução de mutação reversa.....	70
3.2.2.2	Indução de mutação para frente (<i>forward mutation</i>).....	72
3.3	CLONAGEM DO GENE <i>PSO8</i>	74
3.3.1	Mapeamento do incerto.....	75
3.3.2	Seqüenciamento da mutação <i>ps08-1</i>	78
4.	DISCUSSÃO.....	79
5.	CONCLUSÕES.....	93
6.	PERSPECTIVAS.....	95
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	96
9.	ANEXO I.....	118

“Mutant *ps08-1* of *Saccharomyces cerevisiae*, sensitive to photoactivated psoralens, UV-radiation and chemical mutagens, contains a *rad6* missense mutant allele”

LISTA DE ABREVIATURAS

3-CPs	3-carbetoxipsoraleno
4-NQO	óxido de 4-nitroquinoleína
8-HQ	8-hidroxiquinolina
8-MOP	8-metoxipsoraleno
AP	sítios apurínicos/apirimidínicos
ATP	adenosina trifosfato
BER	reparação por excisão de bases
C-C	dímero de pirimidina citosina-citosina
CPD	dímero de pirimidinas ciclobutano
DEO	1,2,7,8-diepoxioctano
DNA	ácido desoxiribonucléico
DSB	quebras duplas do DNA
EMS	etil metanosulfonato
ERO	espécie reativa de oxigênio
H ₂ O	água
H ₂ O ₂	peróxido de hidrogênio
HN1	mustarda nitrogenada monofuncional
HN2	mustarda nitrogenada bifuncional
ICL	ponte intercadeia
MMS	metilmetano sulfonado
MNNG	N-metil-N ¹ -nitro-N-nitrosoguanidina
NDEA	dietilnitrosamina
NEF-	fator de excisão de nucleotídeos
NER	reparação por excisão de nucleotídeos
ORFs	quadro aberto de leitura
PIBIS	Tricotiodistrofia
RNA	ácido ribonucléico
SC	Síndrome de Cockaine

T-T	dímero de pirimidina timina-timina
UV	radiação ultravioleta
UVA	radiação ultravioleta longa (365nm)
UVC	radiação ultravioleta curta (254nm)
XP	Xeroderma pigmentosum

LISTA DE FIGURAS

Figura 1:	Representação esquemática de um anel ciclobutano entre duas timinas na mesma cadeia de DNA (Friedberg <i>et al.</i> 1991).....	23
Figura 2:	Representação esquemática de um fotoproduto 6-4, produzido pela ligação entre o C ⁶ de uma timina com o C ⁴ da timina adjacente (Friedberg <i>et al.</i> 1991).....	24
Figura 3:	Representação esquemática de uma ponte intercadeia formada por mustarda nitrogenada, através dos N ⁷ entre guaninas de fitas opostas de DNA (Friedberg <i>et al.</i> 1991).....	27
Figura 4:	Representação esquemática da fotoadição de furocumarinas ao DNA.....	29
Figura 5:	Sobrevivência das linhagens haplóides selvagem <i>PSO8</i> (□) e mutante <i>pso8-1</i> (♦) em comparação com as diplóides homozigotas <i>PSO8/PSO8</i> (*) e <i>pso8-1/pso8-1</i> (Δ), e da diplóide heterozigota <i>PSO8/pso8-1</i> (●) após tratamento com radiação UVC em fase estacionária de crescimento.....	62
Figura 6:	Interação entre as mutações <i>pso8-1</i> e <i>rad4-4</i>	64
Figura 7:	Sobrevivência da linhagem selvagem <i>PSO8</i> (●) e do mutante <i>pso8-1</i> (□) após tratamento com 3-CPs, 8-MOP fotoativados (UVA) e radiação UVC.....	66
Figura 8:	Teste em gotas. Sobrevivência da linhagem selvagem <i>PSO8</i> e do mutante <i>pso8-1</i> após tratamento com MNNG, 4-NQO, DEO, NDEA, Paraquat, H ₂ O ₂ , e 8-HQ.....	69
Figura 9:	Indução de revertentes <i>HIS</i> na linhagem selvagem <i>PSO8</i> (●) e no mutante <i>pso8-1</i> (□) após tratamento com 3-CPs (A), 8-MOP (B) fotoativados (UVA) e UVC (C) em função da dose e da sobrevivência.....	71

- Figura 10:** Indução de mutantes *can1^R* na linhagem selvagem *PSO8* (●) e no mutante *pso8-1* (□) após tratamento com 3-CPs (A), 8-MOP (B) fotoativados (UVA) e UVC (C) em função da dose e da sobrevivência..... 73
- Figura 11:** Sobrevivência após tratamento com UVC, 3-CPs+UVA e 8-MOP+UVA da linhagem haplóide *pso8-1* HR1259-1d contendo o plasmídeo pHR01 (□) e sem o plasmídeo pHR01 (*) em comparação à linhagem *PSO8* HR1259-1a com plasmídeo YCp50(●)..... 75
- Figura 12:** A - Subclonagem e mapa de restrição parcial do fragmento genômico selecionado por complementação da mutação *pso8-1*. B - não complementação da sensibilidade à radiação UVC conferida pelo alelo *pso8-1* em diplóides heteroalélicas 77
- Figura 13:** Teste em gotas. Sobrevivência de linhagens diplóides tratadas com radiação UVC nas doses 0, 15J, 50J, em fase estacionária de crescimento..... 77
- Figura 14:** Seqüência dos 172aa amplificada por PCR da ORF *RAD6* diretamente do DNA genômico total do mutante *pso8-1* e da linhagem selvagem..... 78

LISTA DE TABELAS

Tabela 1:	Grupos de epistasia dos genes de <i>S. cerevisiae</i> envolvidos em reparação de danos no DNA.....	4
Tabela 2:	Propriedades das proteínas codificadas pelos genes <i>PSO</i> e os fenótipos dos seus alelos mutantes.....	37
Tabela 3:	Vetores de uso bifuncional em <i>S. cerevisiae</i> e <i>E. coli</i>	39
Tabela 4:	Linhagens de <i>S. cerevisiae</i> utilizadas para a realização deste estudo.....	40
Tabela 5:	Conteúdo de glutatona das células haplóides <i>S. cerevisiae</i> ..	61
Tabela 6:	Segregação da mutação <i>pso8-1</i> para sensibilidade à radiação UVC.....	61
Tabela 7:	Efeito da mutação <i>pso8-1</i> sobre a esporulação de linhagens diplóides.....	63
Tabela 8:	Características da sobrevivência do mutante <i>pso8-1</i> em relação à linhagem selvagem <i>PSO8-1</i> após o tratamento com UVC, 8-MOP e 3-CPs+UVA.....	68
Tabela 9:	Representação da região altamente conservada de enzimas conjugada-ubiquitina de diferentes organismos, incluindo a proteína Pso8-1 alterada.....	88
Tabela 10:	Interação entre mutantes <i>rad</i> e <i>pso</i> para a sobrevivência a radiação UVC e a fotoadição de 8-MOP e 3-CPs.....	90

RESUMO

Um novo mutante isolado da levedura *Saccharomyces cerevisiae*, sensível à fotoativação de psoralenos mono- e bi-funcionais, à UVC e ao MNNG, complementou o fenótipo de sensibilidade à fotoadição de psoralenos conferido pelas mutações *pso1* a *pso7* e assim foi chamado *pso8-1*. O duplo mutante *pso8-1 rad4-4* foi altamente sensível à UVC, indicando assim uma interação sinérgica dos dois mutantes alelos. A clonagem molecular pela complementação do fenótipo de sensibilidade à radiação UVC do mutante *pso8-1* e estudos genéticos revelaram que *pso8-1* é alelo ao gene *RAD6*. O produto do gene *RAD6/UBC2* é uma enzima conjugada à ubiquitina envolvida em reparação de DNA, esporulação, recombinação, indução de mutagenese, degradação de proteínas, genes silenciosos, transposição Ty1. Enquanto o mutante *pso8-1* apresenta um fenótipo mutador espontâneo e possui baixa mutabilidade induzida a mutágenos, a esporulação de diplóides homoalélicas mostrou eficiência próxima à da linhagem selvagem. A análise da seqüência do mutante alelo mostrou que *pso8-1* contém uma nova, e até agora desconhecida, transição T→C no nucleotídeo 191, levando à substituição de uma prolina altamente conservada por uma leucina na posição 64 (Rad6-[P64L]) que pode ter severas conseqüências na estrutura terciária da proteína mutada, e conseqüente ligação a pRad18.

ABSTRACT

A novel mutant isolate of *Saccharomyces cerevisiae*, sensitive to photoactivated mono- and bi-functional psoralens, to UVC, and to nitrosoguanidine, was found to be complementing the photoactivated psoralen sensitivity-phenotype conferred by the *pso1* to *pso7* mutations and thus was called *pso8-1*. A constructed *pso8-1 rad4-4* double mutant was super-sensitive to UVC, thus indicating a synergistic interaction of the two mutant alleles. Molecular cloning via complementation of the *pso8* mutant's sensitivity phenotype and genetical studies revealed that *pso8* is allelic to *RAD6*. *RAD6/UBC2* gene encodes an ubiquitin-conjugating enzyme which is involved in DNA repair, sporulation, meiotic and mitotic recombination, spontaneous and induced mutagenesis, N-end-rule pathway degradation of proteins, gene silencing and Ty1 transposition. While a *pso8-1* mutant displayed a spontaneous mutator phenotype and had low mutagen-induced mutability, homoallelic diploids showed nearly WT-like sporulation. Sequence analysis of the mutant allele showed *pso8-1* to contain a novel, hitherto undescribed T → C transition in nucleotide position 191 leading to a substitution by leucine of a highly conserved proline at position 64 (Rad6-[P64L]) that may have severe consequences for the tertiary structure, and hence binding to Rad18p, of the mutant protein.

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 incrivelmente estável para manter o alto grau de fidelidade requerido para tal função. E, certamente, foi uma surpresa descobrir-se que a estrutura primária do DNA seria muito dinâmica e alvo de constantes mudanças tais como transposições gênicas ou 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, incluindo replicação, transcrição e recombinação, tão bem quanto outras funções celulares importantes tais como regulação do ciclo celular e/ou divisão celular.

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 molécula.

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 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 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 mais perfeito microorganismo eucariótico para estudos biológicos. A seqüência completa de seu genoma mostrou-se extremamente vantajosa como uma referência voltada para o seqüenciamento de genes humanos e de outros eucariotos superiores. É um organismo unicelular, que apresenta um ciclo eucariótico típico e completo 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. Além disso, a fácil manipulação genética de leveduras permite 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 e ionizante, chamados mutantes *rad* (Game e Cox 1971; Game e Mortimer 1974). 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 ressíntese, 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; Kupieck 2000).

As interações epistáticas são definidas de acordo com a resposta que 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.* 1995a), como danos induzidos pela luz UV, e pontes inter e intracadeias de DNA (Braithwaite *et al.* 1999; Prakash e Prakash 2000).

Em humanos um defeito em NER resulta em doenças, tais 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 um 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 mutagênicos, principalmente a 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 a 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 fator primário de reconhecimento da lesão no DNA seria feito pelo produto do gene *RAD14* (Guzder *et al.* 1993; Friedberg *et al.* 1999), uma proteína homóloga em humanos à proteína do grupo A xeroderma pigmentosum (XPA) e similar à proteína Uvra, que reconhece o mesmo tipo de dano em bactérias. A pRad14 possui regiões de ligação ao DNA de cadeia simples e dupla, apresenta um motivo de ligação ao DNA do tipo dedos de zinco e especificidade para lesões no DNA do tipo fotoproduto 6-4 causadas por radiação UVC (Guzder *et al.* 1993; Friedberg *et al.* 1999). Como não há evidências de que ela se ligue aos CPDs, outras proteínas devem estar envolvidas no reconhecimento dos vários tipos de lesões (Guzder *et al.* 1993; Wood 1996). A pRad14 forma um complexo com as proteínas pRad1 e pRad10, chamado fator de excisão de nucleotídeos-1 (NEF-1). As proteínas Rad1 e Rad10 são sub-unidades de uma endonuclease, requeridas tanto em NER quanto em recombinação mitótica (Bardwell *et al.* 1992; 1994). *RAD14* teria ainda a função de direcionar esta endonuclease (*RAD1/RAD10*) para o sítio da lesão (Guzder *et al.* 1996).

A seguir, a proteína RPA (Replication factor A) essencial para replicação do DNA, liga-se ao DNA (Wood 1997) e recruta as proteínas Rad4 e Rad23 (Prakash e Prakash 2000) que, posteriormente, irão atrair o fator de iniciação da transcrição RNA polimerase II (fator b ou TFIIH). A proteína RPA interage com as proteínas XPA e XPG em humanos, sugerindo seu envolvimento tanto na etapa de reconhecimento como na incisão da lesão no DNA (Benhamou e Sarasin 2000). A pRad4 interage

in vitro com TFIIH, e pRad23 interage com pRad14 e TFIIH (Guzder *et al.* 1995a). As pRad4 e pRad23 formam um complexo estequiométrico chamado NEF-2, que pode atuar como um marcador molecular que conecta NEF-1 ao fator de iniciação da transcrição (TFIIH) no sítio da lesão (Guzder *et al.* 1995b). Conhece-se relativamente pouco sobre o papel de pRad4. Estudos *in vitro* e *in vivo* revelaram que o NER não ocorre na ausência da proteína Rad4 (Svejstrup *et al.* 1995) e que esta proteína interage com as proteínas Rad7 e Rad23 no ensaio diíbrido (Wang *et al.* 1997).

O fator TFIIH percorre a fita de DNA na ausência de dano, sendo recrutado pela proteína Rad3 quando a lesão aparece. *RAD3* e *RAD25* e seus respectivos genes homólogos em humanos *XPD* e *XPB* são DNA helicases que translocam sobre a simples fita de DNA na direção 5'→3' e 3'→5' respectivamente (Schaeffer *et al.* 1994; Prakash e Prakash 2000), que, associadas com TFIIH, desenrolam a hélice de DNA no sítio da lesão. *RAD3* e *RAD25* constituem duas das seis sub-unidades do fator TFIIH que irão remover a lesão sob a forma de um fragmento contendo 27-30 nucleotídeos (Feaver *et al.* 1993; Nickoloff e Hoekstra 1998; Guzder *et al.* 1999; Prakash e Prakash 2000). Enquanto *RAD25* é indispensável para a transcrição e NER, *RAD3* é somente necessário em NER (Ramotar e Masson 1996; Prakash e Prakash 2000). TFIIH associado à pRad2 forma o complexo NEF-3.

As pRad1 e pRad10 formam um complexo estável através de seus domínios hidrofóbicos presentes na região C-terminal de ambas proteínas (Bardwell *et al.* 1992) que, juntas, atuam como uma endonuclease que corta junções de DNA simples fita para produzir um grupo 3'-hidroxila e um terminal 5'-fosfato em uma reação dependente de Mg^{2+} (Tomkinson *et al.* 1993; Ramotar e Masson 1996). A endonuclease *RAD1/RAD10* realiza a incisão na terminação 5' do DNA lesado (Sung *et al.* 1993; Davies *et al.* 1995; Friedberg *et al.* 1995), enquanto que *RAD2*, recrutado pelas interações de TFIIH, realiza a incisão na terminação 3' (Habraken *et al.* 1993). Esta reação é dependente da hidrólise de ATP. A pRad2 é requerida

para a incisão de danos produzidos por UV no DNA e demonstrou possuir uma atividade endonucleásica específica para DNA simples fita (Habracken *et al.* 1993). O complexo *RAD1/RAD10* e o gene *RAD2* de leveduras apresenta homologia com o complexo *XPF/ERCC1* e com o gene *XPG* de humanos (Bardwell *et al.* 1992; Prakash e Prakash 2000).

Após a remoção do fragmento contendo a lesão, ocorre a síntese do DNA pela DNA polimerase δ e ϵ em presença do antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA) recrutado pelo fator de replicação (RFC) (Wood 1996; Nickoloff e Hoekstra 1998; Braithwaite 1999). PCNA funciona como um ativador para a DNA polimerase δ e ϵ , durante a replicação de DNA. O trabalho final de religação da fita de DNA fica a cargo da proteína codificada pelo gene *CDC9*, que é uma DNA ligase (Verhage *et al.* 1996).

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 do produto 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 reparação acoplado ao de transcrição (TCR) tem sido documentado em *Escherichia coli*, leveduras e humanos (Sweder e Hanawalt 1992; Mellon e Hanawalt 1989). Células originadas de pacientes com Síndrome de Cockayne (SC) apresentam defeitos na TCR (van Hoffen *et al.* 1993). SC 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).

Em leveduras, a reparação de fitas não transcritas e de regiões transcricionalmente inativas têm uma dependência específica sobre os genes *RAD7* e *RAD16*. O reparo destas regiões genômicas é severamente prejudicado em mutantes *rad7* e *rad16* (Verhage *et al.* 1994; Prakash e Prakash 2000). As proteínas Rad7 e Rad16 formam um complexo estável chamado fator NEF-4, que funciona como um sensor de danos no DNA, que, por sua vez, direciona as proteínas do NER à reparação das fitas não transcritas de DNA (Guzder *et al.* 1997; Reed *et al.* 1998).

Foi inicialmente proposto que *RAD7* e *RAD16* estariam envolvidos no remodelamento da estrutura da cromatina, para permitir o acesso das proteínas de reparação (Bang *et al.* 1992; Schild *et al.* 1992; Verhage *et al.* 1994) em sítios que apresentam o dano em regiões do DNA reprimidas na transcrição. Sabe-se que muitas destas regiões silenciosas do genoma apresentam conformação similar à da heterocromatina em eucariotos superiores (Nasmyth 1982) e que, nestas regiões, a conformação impede ou dificulta o acesso da maquinaria de reparação. Atuariam como um *open up* de regiões silenciosas do genoma (Reed *et al.* 1998; Friedberg *et al.* 1999; Prakash e Prakash 2000).

O complexo formado pelas proteínas Rad7 e Rad16 liga-se a danos no DNA de uma maneira ATP-dependente, diferente do fator de ligação de pRad14, RPA e do complexo pRad4/pRad23 que não mostram dependência de ATP ao ligar-se ao dano (Prakash e Prakash 2000). Interessantemente, esta atividade é inibida pela presença de danos no DNA (Guzder *et al.* 1998). Esta observação sugere um modelo no qual o complexo pRad7/pRad16 utilizaria a energia livre da hidrólise de ATP para translocar sobre o DNA. Quando em presença de danos induzidos por UV no DNA esta atividade é inibida e a inibição da atividade ATPase no sítio da lesão resultaria em uma ligação estável deste complexo com o sítio do dano. De acordo com este cenário, o complexo pode ser o primeiro a chegar no sítio do dano, e a ligação Rad7/Rad16-dano pode servir como um sítio de nucleação para os fatores da maquinaria do NER, conhecidos como NEF-1, NEF-2, NEF-3 e a proteína de replicação A, nas fitas não

transcritas de genes transcritivamente ativos e regiões silenciosas de DNA (Guzder *et al.* 1997; 1998; 1999; Reed *et al.* 1998; Prakash e Prakash 2000).

A proteína Rad7 liga-se ao DNA, mas não especificamente a danos induzidos por UV. Além disso, a existência de uma interação física de Rad7 com NEF-2 sugere uma função específica para Rad7 como um fator de ligação ou como uma ponte entre NEF-2 e NEF-4 (Prakash e Prakash 2000).

1.1.2 Reparação pós-replicativa e 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 as alterações na estrutura molde que as replicases normais, insere um nucleotídeo correto ou incorreto no lado oposto a 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 de DNA pós-replicativa, presumidamente devido a um fracasso ou a uma falha para fechar as lacunas no DNA fita simples no lado oposto à lesão (Bailey *et al.* 1997; Nickoloff e Hoekstra, 1998).

O produto do gene *RAD6/UBC2* é uma enzima conjugada à ubiquitina (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, 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).

A proteína Rad6 participa do sistema ligase-ubiquitina (Jentsch *et al.* 1987), é uma das 12 enzimas do tipo E2 que catalisa a transferência de ubiquitinas ativadas às proteínas alvo (Jentsch 1992). A transferência da ubiquitina para suas proteínas-alvo pode ser catalisada diretamente pelas enzimas E2, como no caso das histonas H2A, H2B e H3 (Koken *et al.* 1991), ou pode requerer a participação de uma enzima do tipo E3, produto do gene *UBR1*, que interage fisicamente com *RAD6* (Dohmen *et al.* 1991; Sung *et al.* 1991; Lawrence 1994; Varshavsky 1997; Nickoloff e Hoekstra 1998). O complexo Rad6-Ubr1 é requerido na proteólise da via da regra N-terminal (Lawrence 1994).

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 γ , agentes alquilantes, psoralenos fotoativados e a vários agentes químicos (Prakash *et al.* 1990; Koken *et al.* 1991; Nickoloff e Hoekstra 1998). Apesar de experimentos realizados com o gene *RAD6* disrupto terem mostrado

que ele não é essencial à sobrevivência da célula, mutantes *rad6* apresentam uma fase S prolongada e baixa eficiência de plaqueamento (Prakash e Prakash 1977; Nickoloff e Hoekstra 1998).

Recentemente, *RAD6* mostrou ser requerido por todos tipos de silenciamento em leveduras (Sung *et al.* 1990; Huang *et al.* 1997; Singh *et al.* 1998; Bryk *et al.* 1997). Além disto, mutantes *rad6* causam ambos uma elevação na taxa de transposição Ty1 e uma alteração em sítios-alvo preferenciais de Ty1 em certos *loci* (Huang *et al.* 1999; Liebman e Newman 1993), sugerindo que a perda de *rad6* cause uma alteração na estrutura da cromatina, facilitando a integração de elementos Ty1.

A pRad18 apresenta três domínios de dedos de zinco, com capacidade de ligação a fitas simples de DNA e de hidrolisar ATP (Jones *et al.* 1988; Bailly *et al.* 1994; 1997), forma um complexo estável com a pRad6 e ambas são requeridas tanto para reparação pós-replicativa quanto em mutagênese (Sung *et al.* 1988; Bailly *et al.* 1997; Xiao *et al.* 2000; Prakash *et al.* 2000). O complexo forma um aduto tioéster com a ubiquitina e conjuga a ubiquitina à histona H2B. Assim, o complexo retém a atividade de conjugação de ubiquitina de pRad6 (Lawrence 1994; Bailly *et al.* 1997; Freiberg *et al.* 2000). O papel do complexo Rad6-Rad18 na síntese de danos não é bem conhecido, mas é provavelmente regulatório (Prakash *et al.* 2000). Este complexo é formado separadamente daquele entre pRad6 e pUbr1 (Bailly *et al.* 1994; Lawrence 1994; Worthylake *et al.* 1998).

Similar ao mutante *rad6*, o mutante *rad18* demonstra um alto grau de sensibilidade para radiação UVC, raios X e vários agentes químicos, bem como a defeitos em reparação pós-replicativa (Prakash 1981). Entretanto a mutação *rad18* não influencia a mutagênese induzida por UVC ou HN2 (mustarda nitrogenada bifuncional), a esporulação (Jones *et al.* 1988; Bailly *et al.* 1997) e nem a recombinação meiótica (Lawrence 1982; Fabre *et al.* 1989).

Inicialmente isolado como um supressor dos mutantes *rad6* e *rad18* para sensibilidade à radiação UVC (Lawrence e Christensen 1979;

Schiests *et al.* 1990) o gene *SRS2 (RADH)* codifica para uma helicase 3'→5' com função de ATPase (Aboussekhra *et al.* 1989; Xiao *et al.* 1999). Mutações neste gene conferem deficiência na mutagênese radioinduzida e uma leve sensibilidade à UVC, deficiência esta que parece estar limitada à fase G1 (Aboussekhra *et al.* 1989). O produto deste gene teria um envolvimento com a canalização da reparação das lacunas (*gaps*) de DNA fita simples produzidas durante a replicação, no lado oposto à lesão. Este direcionamento iniciaria o processo mutagênico, executado por *RAD6/RAD18* e competiria com a reparação recombinacional dependente da via *RAD52* (Friedberg *et al.* 1995; Nickoloff e Hoekstra 1998).

O gene *MMS2* de leveduras foi inicialmente isolado e identificado como membro de uma via de reparação pós-replicativa livre de erro (Xiao *et al.* 1999; Brusky *et al.* 2000). O gene *MMS2* codifica uma proteína evolutivamente semelhante a pUbc, entretanto, não contém um resíduo ativo de cisteína dentro do domínio altamente conservado (Broomfield *et al.* 1998). Foi recentemente relatado que pMms2 forma um complexo com um novo membro de Ubc de leveduras, pUbc13, que é requerido por sua atividade de ubiquitinação. Entretanto, pUbc13 é diferente de todas as outras proteínas Ubc encontradas em leveduras, pois em lugar de catalisar um resíduo convencional de Lys-48 de uma proteína-alvo na elongação da cadeia poli-ubiquitinada, *UBC13* catalisa a montagem da cadeia poli-ubiquitinada através de um resíduo de Lys-63 (Hofmann e Pickart 1999; Brusky *et al.* 2000). A mutação *ubc13* é epistática às mutações *mms2* e *rad6* e, é sinérgica à mutação *rev3*, indicando que o gene *UBC13* está em uma via alternativa da mutagênica *REV3* (Brusky *et al.* 2000).

O gene *RAD30* codifica uma nova DNA polimerase Pol η , homóloga ao gene DinB, UmuC de *E. coli*, e *REV1* de *S. cerevisiae* (Roush *et al.* 1998; Johnson *et al.* 1999b). Pol η distinta das Pols α , β , δ , ϵ e γ catalisa a síntese livre de erro sintetizando dímeros de timina com alta fidelidade (Johnson *et al.* 1999b). *In vitro*, esta polimerase replica eficientemente

após *bypass* TT CPD, 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 η (Masutani *et al.* 1999; Hübscher *et al.* 2000; Game 2000; Prakash *et al.* 2000).

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).

O gene *REV1* codifica uma deoxicitidil transferase envolvida na síntese translesão (Nelson *et al.* 1996) com um trecho da seqüência de aminoácidos homóloga ao gene UmuC de *Escherichia coli* (Larimer *et al.* 1989; Friedberg *et al.* 1995; Prakash *et al.* 2000; Lawrence *et al.* 2000).

A pRev3 e a pRev7 são sub-unidades da DNA polimerase ζ , aparentemente específica na síntese de DNA translesão (Morrison *et al.* 1989; Nelson *et al.* 1996; Johnson *et al.* 1999a; Van der Laan *et al.* 2000). A DNA polimerase ζ purificada é capaz de *bypass* dímeros de timina mais eficientemente que Pol α (Nelson *et al.* 1996; Prakash *et al.* 2000; Lawrence *et al.* 2000). Assim a via mutagênica de leveduras parece contar com uma DNA polimerase específica (pol ζ) para o *bypass* de lesões na replicação do DNA pelo custo no aumento de mutações (Xiao *et al.* 2000). O gene *REV3* é alelo ao gene *PSO1* (Cassier e Moustacchi 1988). O mutante *rev3* é bloqueado em mutagênese induzida e espontânea, é pouco sensível à UVC e não é deficiente na reparação pós-replicativa (Prakash 1981).

O gene *REV2* é alélico ao gene *RAD5* e codifica uma proteína que pertence à família das helicases *SNF2*, que inclui *ERCC6*, *RAD16*, *RAD54*, *SNF2*, *MOT1* e o gene de *Drosophila* *BRM* (Eisen *et al.* 1999), possui sítios de ligação que lhe conferem a capacidade de interagir com diferentes substratos de DNA (Prakash *et al.* 1993; Nickoloff e Hoekstra 1998) um domínio do tipo dedos-de zinco (Johnson *et al.* 1992) e atividade ATPase dependente de DNA (Johnson *et al.* 1994). *RAD5/REV2* é requerido em uma via de síntese translesão livre de erro (Prakash *et al.* 2000). Mutantes *rev2/rad5* não são requeridos na mutagênese induzida por UVC (Xiao *et al.* 2000), contudo a mutação *rad5* limita a instabilidade de seqüências simples repetitivas (Johnson *et al.* 1992) e aumenta a ligação das quebras duplas de DNA (DSB) (Ahne *et al.* 1997).

O produto do gene *RAD9* é requerido para a reparação de quebras duplas de DNA induzidas por agentes genotóxicos químicos e físicos (Lewis *et al.* 1998), atuando tanto em G1 como em G2 (Friedberg *et al.* 1995; Kaplun *et al.* 2000). Juntamente com *RAD17* e *RAD24*, o gene *RAD9* influi na regulação da fase S do ciclo celular em *S. cerevisiae*, em resposta à ação de lesões no DNA, atuando na indução de troca de cromátides irmãs, dependente da replicação (Paulovich *et al.* 1997; Paulovich *et al.* 1998; Kaplun *et al.* 2000).

O gene *CDC7* codifica uma proteína quinase que é requerida tardiamente durante a transição de G1/S por iniciação da replicação (Nickoloff e Hoekstra 1998). A proteína Cdc7 pode ser componente de um complexo de replicação para síntese translesão, o qual é necessário para permitir o *bypass* mutagênico de lesões não codificantes em *S. cerevisiae*, a fim de garantir a sobrevivência da célula (Friedberg *et al.* 1995).

O gene *POL30* é essencial e codifica o antígeno nuclear de proliferação-PCNA requerido na síntese de ambas Pol δ e Pol ϵ (Xiao *et al.* 2000).

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. Os genes *REV* constituem a bem definida via síntese translesão que replica o DNA, sintetizando lesões, com baixa fidelidade (Lawrence e Hinkle 1996). 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 fortemente 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).

A síntese translesão pela Pol η não pode constituir apenas um modo de tolerância ao dano no DNA de leveduras. Sendo assim, a observação que mutantes *rad5* e *rad30* são sinérgicos para a mutagênese e morte celular induzida por UV, sugere que *rad5* e *rad30* podem funcionar em dois mecanismos distintos de tolerância livre de erros largamente dependente de *RAD6*. Isto pode explicar porque a mutagênese não é aumentada em mutantes *rad5* (Kunz *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 (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 eucarióticos 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 frequências 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).

O gene *RAD50* codifica uma proteína capaz de ligar-se a cadeias duplas de DNA em reação dependente de ATP. Uma mutação dentro do domínio de ligação de ATP da pRad50 resulta em acentuada sensibilidade a MMS (metil metanosulfonato) e bloqueio da meiose em estágios iniciais, com falha no complexo sinaptonêmico (Alani *et al.* 1990; Raymond e Kleckner 1993). Os mutantes *rad50* são capazes de realizar a troca do sinal de acasalamento, embora lentamente (Alani *et al.* 1990; Ivanov *et al.* 1994). Ensaio bioquímicos e através do sistema diíbrido mostraram que as proteínas Rad50, Xsr2 e Mre11 interagem umas com as outras. Mutações nestes genes conferem sensibilidade a agentes que causam dano no DNA, incluindo radiação ionizante e MMS. Estes mutantes mostram elevados níveis de recombinação mitótica, são deficientes em recombinação meiótica e formação de esporos; DSBs específicas da meiose não são observadas. Isso sugere que as proteínas Rad50, Xsr2 e Mre11 são parte de um complexo que atua na etapa inicial da formação de DSB de DNA necessárias para que haja recombinação meiótica (Johzuka e Ogawa 1995; Kannar e Hoeijmakers 1998).

De fato, defeitos nestes três genes alteram o processamento 5'-3' de finais de quebras duplas de cadeia durante a mitose, indicando que *Mre11*, *Rad50* e *Xrs2* podem diretamente constituir uma atividade exonuclease 5' 3' (Johzuka e Ogawa 1995; Ramontar e Masson 1996).

As proteínas *Mre11* e *Rad50* podem atuar juntas numa etapa anterior à criação de quebras duplas de cadeia para recombinação meiótica, além disto, mutantes *mre11* e *rad50* apresentam um fenótipo hiperrecombinogênico, e ambas proteínas podem ligar-se ao DNA dupla fita (DNAds), sugerindo que o complexo *Mre11/Rad50* liga-se a sítios expostos da cromatina afim de reprimir a produção de lesões recombinogênicas espontâneas (Ramontar e Masson 1996).

A proteína Rad51 purificada possui atividades de ligação a DNAds e DNAss (DNA simples fita) dependente de ATP (Heyer 1994). Apresenta alta homologia com a proteína *RecA de E. coli* e, à semelhança desta proteína, polimeriza em torno de moléculas de DNA para formar um nucleofilamento helicoidal sobre a simples e dupla fita de DNA (Shinohara *et al.* 1992; Ogawa *et al.* 1993), a qual é capaz de promover o emparelhamento homólogo e a transferência entre cadeias, numa reação dependente de ATP (Ogawa *et al.* 1993; Sung *et al.* 1994), levando à formação do heterodúplex de DNA, em presença da proteína RPA ligante de DNA simples fita.

A Proteína Rad52 interage com a proteína Rad51 (Shinohara *et al.* 1992; Milne e Weaver 1993). Homólogos destas duas proteínas são conservados desde leveduras a humanos, sugerindo que o mecanismo usado para o pareamento homólogo de moléculas de DNA, durante a recombinação, pode ser universal em eucariotos (Shinohara e Ogawa 1998). *RAD52* é capaz de ligar-se à DNA de fita simples e dupla e promover o anelamento de fita simples de DNA complementar (Mortensen *et al.* 1996). New *et al.* (1998) mostraram que Rad52 estimula a troca de fitas de DNA direcionando a pRad51 ao complexo formado entre pRPA e o DNAss. Foi proposto que o estímulo da pRPA após a formação de nucleofilamentos é devido a sua habilidade em remover a estrutura secundária da molécula de DNA (Sung 1997; Shinohara e Ogawa 1998). A pRad52 afeta o primeiro estágio da reação, que é a formação do filamento pré-sináptico, por superar os efeitos inibitórios da pRPA (New *et al.* 1998) que compete com pRad51 por sítios de ligação sobre o DNAss (Shinohara e Ogawa 1998). Esse estímulo da pRad52 é dependente da ação conjunta da pRad51 com pRPA, sugerindo então o requerimento de interações protéicas específicas entre *Rad52, Rad51 e RPA* (New *et al.* 1998).

Análises feitas através do sistema diíbrido mostraram interações entre pRad51 e pRad55, sendo que pRad55 está associado a pRad57 (Hays *et al.* 1995), e interações entre pRad51 e pRad54 têm sido sugeridas (Clever *et al.* 1997). Estas proteínas (Rad51, Rad52, Rad54, Rad55 e

Rad57) formam um complexo multiprotéico denominado recombinossomo (Hays *et al.* 1995; Ramontar e Masson 1996).

O gene *RAD53* codifica uma proteína quinase de serina/treonina, provavelmente envolvida na parada do ciclo celular, a fim de permitir a correta resposta aos danos no DNA antes da progressão do ciclo celular (Weinert *et al.* 1994; Kaplun *et al.* 2000). *RAD54* codifica uma putative ATPase/helicase da família de genes *SNF2/SWI2*, que inclui ativadores de transcrição e helicases que alteram a estrutura da cromatina (Troelstra e Jaspers 1994). O gene *RAD56* foi identificado como sendo *SGEI* e tem um papel prognóstico em resistência a multidrogas. *Rad59* atua na recombinação mitótica independente de *Rad51*. A superexpressão de *Rad52* suprime os defeitos de recombinação e reparação em mutantes *rad59*, sugerindo a possibilidade de funções comuns entre essas duas proteínas (Nickoloff e Hoeckstra 1998).

1.1.4 Reparação de DNA por recombinação não-homóloga ou ilegítima

Em leveduras, DSB de DNA são reparadas predominantemente por recombinação homóloga dependente do gene *RAD52*, enquanto em vertebrados a reparação DSB de DNA é principalmente por recombinação não-homóloga dependente do gene *KU*. Estudos bioquímicos indicam que o gene *KU* liga-se à extremidade do DNA e facilita a rejunção. O gene *RAD52* de humanos, semelhante ao gene *KU*, liga-se diretamente à DSB, protegendo as da atividade de exonucleases e facilitando as interações entre as extremidades (Van Dyck *et al.* 1999).

A via de reparação de DBS 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). 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 proteína Xrcc4 é um substrato eficiente para DNA-PK e o complexo Xrcc4-DNA/ligaseIV possivelmente pode ser uma ponte entre o reconhecimento de DBS pela DNA-PK e a junção pela DNA ligase IV (Yu *et al.* 1999).

Os genes *HDF1* (Feldmann e Winnacker 1993) e *YKU80* (Boulton e Jackson 1996) ou *KU80* apresentam homologia com os genes *KU70* e *KU86* de mamíferos, respectivamente (Game 2000).

Nenhum homólogo da subunidade catalítica (PKcs) do complexo DNA-PK de mamíferos foi encontrado em leveduras (Game 2000).

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 microhomologias mais distantes da extremidade para produzir junções, mas esta atividade é ineficiente em leveduras. Além disto, em leveduras não ocorre a associação entre o gene *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 depende fortemente dos genes *MRE11*, *RAD50* e *XRS2*. Estas três proteínas formam um complexo com DNA desenrolado e apresentam atividade de nuclease (Haber 2000).

Existe um grande interesse no 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 à 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 baseiam-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).

1.2.1.1 Dímeros de Pirimidina

A exposição do DNA à radiação de comprimento de onda curto (UV_{254nm} 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).

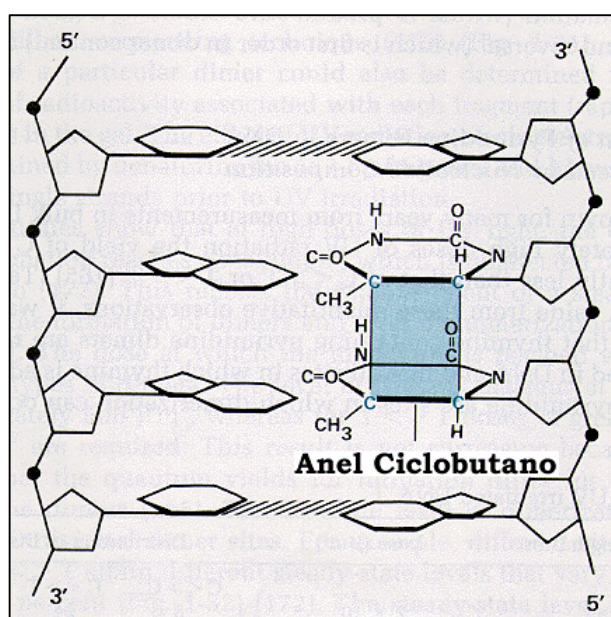


Figura 1: Representação esquemática de um anel ciclobutano entre duas timinas na mesma cadeia de DNA (Friedberg *et al.* 1991).

1.2.1.2 Fotoprodutos 6-4 (Pirimidina-pirimidona)

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 2). 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).

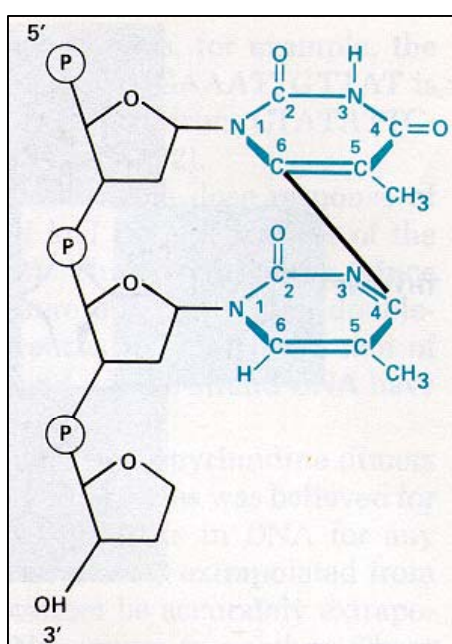


Figura 2: Representação esquemática de um fotoproduto 6-4, produzido pela ligação entre o C⁶ de uma timina com o C⁴ da timina adjacente (Friedberg *et al.* 1991).

1.2.1.3 Outros Fotoprodutos

A radiação UVC pode resultar em pontes DNA-proteínas ou DNA-DNA ou mesmo em quebras de cadeia, entretanto as doses necessárias para tal são altíssimas, correspondendo a quase 100% de inativação das populações de *Streptococcus* e de fago T7.

Agentes que provocam pontes intercadeias são extremamente importantes já que impedem a separação das cadeias, bloqueando a replicação e a transcrição.

As lesões do tipo timina glicóis são mais abundantes após a radiação ionizante, mas são também encontradas após UVC como resultado da saturação da dupla ligação 5,6 de algumas pirimidinas.

Além dessas, podem ser observadas dipirimidinas não ciclobutanos, lesões complexas envolvendo purinas e hidratos de pirimidinas (Friedberg *et al.* 1995).

1.2.1.4 UV-mimético: óxido de 4-nitroquinolina (4-NQO)

O 4-NQO é um potente agente carcinogênico, porém a espécie reativa responsável por essa ação é o produto de sua metabolização. O 4-NQO é convertido em óxido de 4-hidroxiaminoquinolina (4HAQO) e, finalmente, em óxido de 4-aminoquinolina (4AQO) que serve como acceptor final de hidrogênio (Endo *et al.* 1971).

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 reparadas pelo sistema NER. É capaz de formar lesões do tipo 8-hidroxi-2-deoxiguanosina (8-OH-dG), e de gerar uma quantidade significativa de quebras de fita de DNA, provavelmente pela formação de adutos instáveis (Friedberg *et al.* 1995).

1.2.2 Agentes alquilantes

Agentes alquilantes são compostos eletrofilicos capazes de interagir covalentemente com centros nucleofilicos de moléculas orgânicas, como DNA. Podem ser mono ou bifuncionais. Os agentes monofuncionais possuem um único grupo reativo e, portanto, interagem covalentemente com um único centro nucleofilico no DNA. São exemplos destes compostos o metil metano sulfonato (MMS), etil metano sulfonato (EMS), dimetilnitrosoamina, N-metil-N-nitrosouréia, N-etil-N-nitrosouréia e mostarda nitrogenada (HN1).

Numerosos sítios reativos para alquilação têm sido identificados em todas as quatro bases, entretanto nem todas têm igual reatividade. A reatividade destes centros é extremamente influenciada pela natureza das bases adjacentes na molécula do DNA. Os centros mais reativos na base adenina são os nitrogênios N-1, N-3, N-7. Nas guaninas, são os N-2, N-3 e N-7, assim como o oxigênio O-6. Em geral, o nitrogênio do anel das bases é mais reativo do que o oxigênio, sendo N-7 da base guanina e o N-3 da base adenina os mais reativos. Quanto às bases pirimídicas, os centros mais reativos das citosinas são N-3, N-4 e O-2, para as timinas são N-3, O-2 e O-4 (Friedberg *et al.* 1995).

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 (HN2) e diepoxioctano (DEO). Quando os dois sítios da reação localizam-se na mesma cadeia de DNA, o produto da reação chama-se pontes intracadeias; em cadeias opostas do DNA, o produto da reação chama-se ponte intercadeia (Figura 3). Agentes que provocam pontes intercadeias são extremamente importantes já que impedem a separação da dupla fita de DNA, bloqueando a replicação e a transcrição.

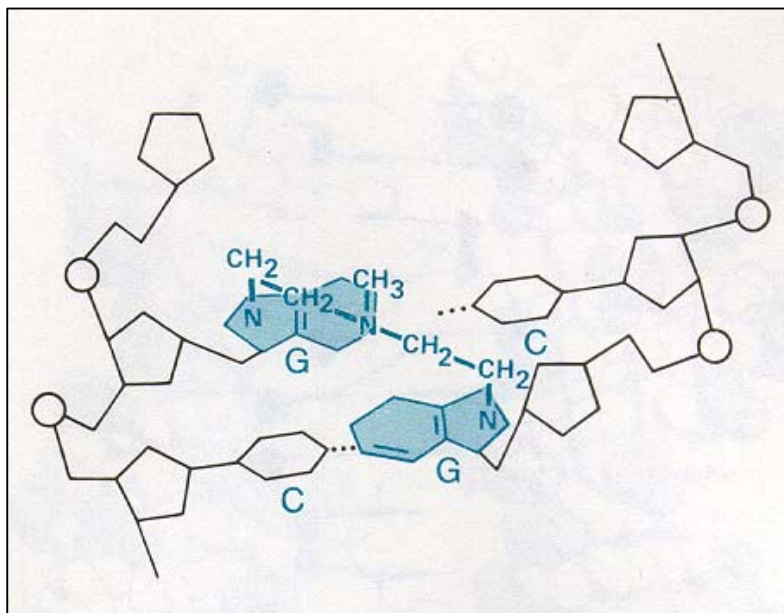


Figura 3: Representação esquemática de uma ponte intercadeia formada por mustarda nitrogenada, através dos N7 entre guaninas de fitas opostas de DNA (Friedberg *et al.* 1991).

1.2.3 Psoralenos/Furocumarinas

As furocumarinas ou psoralenos são compostos aromáticos tricíclicos de origem natural 8-metoxipsoraleno (8-MOP) ou sintética 3-carbetoxipsoraleno (3-CPs), formados a partir da condensação do grupo cumarínico (benzo- α -pirona ou 1,2-benzopirona) com o anel 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 as 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 grupo cumarínico (monoadições do tipo 3,4) ou à dupla ligação C⁴-C⁵ do anel furano (monoadições do tipo 4',5') (Figura 4). 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 grupo 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*, ICL). Furocumarinas que possuem tanto o sítio C³-C⁴ do grupo 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. 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 organismos procariotos e eucariotos (Parsons 1980; Moustacchi 1988; Averbeck *et al.* 1992).

Foi demonstrado, entretanto, que as furocumarinas fotoativadas podem também transferir energia para moléculasceptoras, 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).

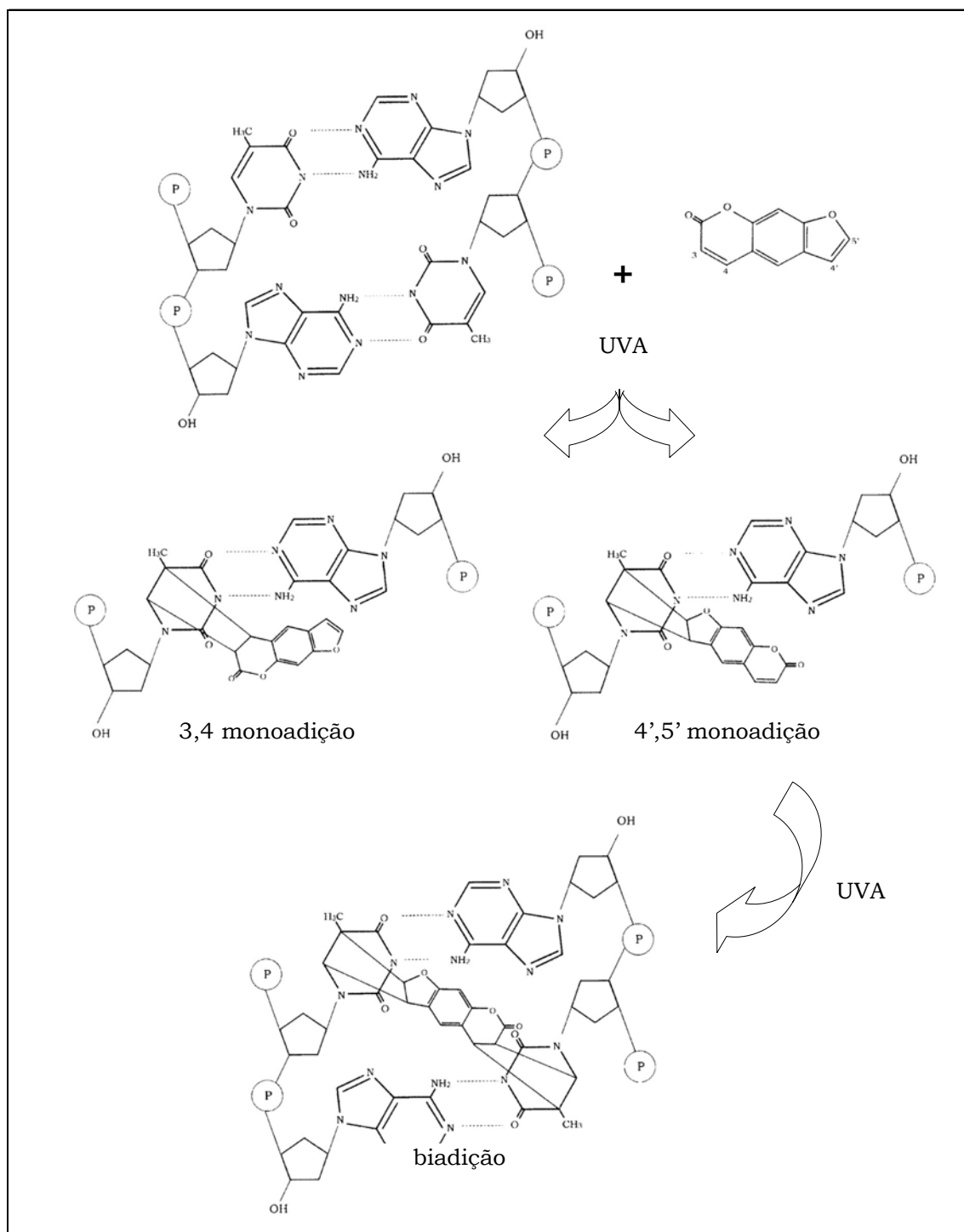


Figura 4: Representação esquemática da fotoadição de furocumarinas ao DNA. Após a intercalação da molécula de psoraleno entre os pares de bases do DNA, um fóton de 365 nm é absorvido gerando uma monoadição. Monoadições do tipo 4',5' permitem a absorção de um segundo fóton de 365 nm e formação de pontes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

Estudos fotoquímicos demonstraram que a maioria dos derivados de furocumarinas apresentam uma certa capacidade de gerar oxigênio *singlet*, embora nenhum com a mesma extensão que o derivado monofuncional 3-CPs (Averbeck *et al.* 1992; Joshi e Pathak 1995). Demonstrou-se também que 3-CPs induz a foto-oxidação dos resíduos de guaninas presentes no DNA via formação de oxigênio *singlet*, originando sítios álcali-lábeis, e que as monoadições 4'-5' surgem da ligação de moléculas do psoraleno intercaladas entre as cadeias do DNA, enquanto as moléculas livres de 3-CPs parecem ser as espécies mais acessíveis para a transferência de energia e conseqüente produção de oxigênio *singlet* (Sage *et al.* 1989; Averbeck *et al.* 1992).

1.3 OS MUTANTES *PSO*

Em 1980, Henriques e Moustacchi isolaram, a partir de uma cultura 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 *pso*.

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 2 (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 ζ), uma proteína responsável pela síntese translesão (TLS) sujeita a erro, que *bypass* dímeros de pirimidina (Nelson *et al.* 1996). A atividade da pol ζ 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 por UVC (Lawrence e Hinkle 1996; Brendel e Henriques 2001). O mutante alelo *rev3* foi isolado por Lemontt (1971) entre outros mutantes de leveduras bloqueados em mutação induzida por UVC (Lemontt 1971; Brendel e Henriques 2001). O mutante *psol/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 and Brendel 1990; Henriques *et al.* 1997; Brendel e Henriques 2001), sua frequência de mutação reversa espontânea e induzida é extremamente reduzida, apresentando um fenótipo antimutador (Cassier *et al.* 1980; Henriques *et al.* 1997). A deficiência de reparação do mutante *psol-1* afeta, principalmente, as células em fase G1 do ciclo celular.

O gene *PSO2* é alelo ao gene *SNM1* (Cassier e Moustacchi 1988). Estudos moleculares demonstraram que o gene *PSO2/SNM1* codifica uma proteína nuclear não essencial de 76kDa, localizada no cromossomo XIII com um domínio do tipo dedos de zinco, característico de proteínas ligantes ao DNA (Haase *et al.* 1989), que pode contudo não ser importante para sua função em remover ICL, desde que sua remoção mutacional manteve a resistência da célula semelhante à selvagem para sensibilidade a HN1. *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). A indução do gene parece depender da presença de seqüências DRE (damage response element), semelhante à encontrada no promotor do gene *PSO2* (Richter *et al.* 1992). O mutante *pso2-1* incisa perto de sítios de DNA contendo ICL no locus transcritivamente ativos *MAT α* , mas não faz o mesmo no locus silencioso *HML α* , sugerindo uma associação de *PSO2* com NER de genes transcritivamente ativos (Meniel *et al.* 1995). Mutantes *pso2/snm1* são capazes de incisar próximo às pontes intercadeias fotoinduzidas, mas são incapazes de restituir o 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 seus derivados e psoralenos fotoativados (Henriques *et al.* 1997). A sensibilidade de mutantes *pso2/snm1* é independente do tipo de base envolvida na formação de ICL. 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). Interessantemente mutantes *pso2/snm1* exibem uma leve sensibilidade para UVC, que pode ser explicado pelo fato de que UVC produz ICL, embora em pequena quantidade (Rahn e Patrick 1976). Ao mesmo tempo que timinas ICL induzidas por 8MOP+UVA são quimicamente estáveis, fato que facilita sua exata quantificação por métodos bioquímicos, ICL-N7-diguaninyl induzidos por mostardas nitrogenadas e sulfúricas não o são e têm uma meia vida de aproximadamente 2h a 36°. Assim, a estabilidade de um ICL pode influenciar grandemente sua remoção via enzimas de reparação de DNA e pode ser diretamente correlacionada com sua genotoxicidade. De todos os ICL aqueles induzidos por 8MOP+UVA são os

mais estáveis, os mais tóxicos (Bankmann e Brendel 1989; Andrade *et al.* 1989; Henriques *et al.* 1997).

O mutante *ps03-1* 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 a radiação gama, este mutante apresenta uma redução na mutagênese induzida por tais agentes (Moustacchi *et al.* 1983; Henriques e Brendel 1990; Henriques *et al.* 1997), é parcialmente defectivo na mutação reversa induzida e mutação para frente e é defectivo em recombinação mitótica espontânea e induzida, especialmente em conversão gênica (Meira *et al.* 1994). Estudos realizados através de interação gênica com os mutantes *rad* revelaram uma interação epistática do mutante *ps03-1* com *rad3 e5* e *ps02-1*, pertencente ao grupo de epistasia RAD3.

A sensibilidade do mutante *ps03-1* ao ânion superóxido gerado pelo paraquat, à H₂O₂, 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 *ps03-1* eram atribuídos aos baixos níveis de glutathiona (GSH) na célula do mutante original e na linhagem selvagem N123, da qual todos os mutantes *ps0*, com exceção do *ps04-1*, foram derivados. O gene *GSH1* codifica a enzima γ -glutamyl-cisteína sintetase, a qual é requerida no primeiro passo da biossíntese de glutathiona. Os fenótipos de resistência a MNNG, sensibilidade a cádmio e formaldeído, bem como a instabilidade das mitocôndrias foram complementados quando o mutante *ps03-1 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 *ps04-1* 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 *PSO4-1* é alelo ao gene *PRP19* (Brusky *et al.* 2000). Este gene essencial de levedura codifica uma proteína de 56,7 kDa associada ao complexo spliceossomo (Cheng *et al.* 1993). A disrupção do gene *pso4-1/prp19* é letal em células haplóides (Grey *et al.* 1996) e diplóides heteroalélicas para *pso4-1/pso4-1Δ*, 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 *PSO4-1* encontra-se na via de reparação recombinacional RAD52 (Henriques *et al.* 1997). As funções da proteína Prp19/Pso4 na atividade de spliceossoma em pré-mRNA, 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 (Henriques *et al.* 1997). Assim, a sensibilidade a mutágenos, baixa mutabilidade, recombinação e esporulação encontradas para mutante *pso4-1* e suas diplóides homozigóticas podem ser resultado do não splice (ou não splice parcial) do respectivo pré-mRNAs (Brendel e Henriques 2001). Recentemente, descobriu-se que a proteína Prp19 interage *in vitro* com Snt309, uma outra proteína associada ao mesmo complexo de Prp19p (Chen *et al.* 1998).

O gene *PSO5-1* mostrou-se alélico ao gene *RAD16* (Paesi-Toresan *et al.* 1995) que tem a função na reparação do genoma global de leveduras, uma subvia de NER que repara preferencialmente CPDs induzidas por UV em cadeias não transcritas de DNA, que repara preferencialmente CPDs

nos 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). *PSO5/RAD16* codifica uma proteína de 91,3 kDa e contém dois putativos domínios dedos-de-zinco e várias outras regiões típicas de helicases que são também encontradas em várias 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 H₂O₂ 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 Wernwe, também conhecida como síndrome do envelhecimento precoce e síndrome de Bloom, com fenótipo de predisposição ao câncer (Watt *et al.* 1995; Saffi *et al.* 2001).

O gene *PSO6-1* é alelo ao gene *ERG3*, que codifica para a enzima esterol Δ-5 desaturase, que introduz a dupla ligação C5=C6 durante a biossíntese do ergosterol (Schmidt *et al.* 1999). Ergosterol é o esterol mais abundante da membrana (90%) de leveduras (Thompson 1974) em contraste a outras células eucarióticas que contêm colesterol como principal esterol. 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 serve como um agente de extinção de oxigênio singlete, assim como absorve 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 *psob-1* é deficiente na quantidade de esteróis na membrana celular, principalmente em ergosterol. Isto seria responsável pela sensibilidade apresentada por este frente a agentes geradores de estresse oxidativo (Schmidt *et al.* 1999). Além da sensibilidade aumentada ao oxigênio singlet fotoinduzido pelo 3CPs+UVA especificamente em fase estacionária de crescimento celular, o mutante *psob-1* mostra-se também sensível ao tratamento com outros agentes envolvidos na geração de radicais de oxigênio como paraquat e peróxido de hidrogênio (Querol *et al.* 1994).

A clonagem e caracterização molecular do gene *PSO7* mostrou que este gene é alelo ao *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 heme a/a₃, característica dos mutantes *psob/cox11*, diminui a eficiência de neutralização de EROS produzida 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. O mutante *psob-1* é particularmente sensível ao psoraleno monofuncional 3CPs+UVA em fase estacionária de crescimento, e este efeito também desaparece em presença de azida sódica, um quelante de oxigênio singlet (Querol *et al.* 1994) é também sensível ao agente

químico UV mimético 4-NQO em crescimento celular, mas mostrou resistência semelhante à selvagem ao agente 8MOP+UVA, bem como ao tratamento com UV, HN2.

Tabela 2: Propriedades das proteínas codificadas pelos genes *PSO* e os fenótipos dos seus alelos mutantes^a.

Gene/Alelo	Proteína (kDa)/Função	Fenótipo do mutante
<i>PSO1/REV3</i>	173; polimerase translesão (putativa)	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 a 4-NQO em fase de crescimento
<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

^aAdaptado de Henriques *et al.* 1997; Brendel e Henriques 2001.

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:

- caracterizar fenotípica e genotipicamente um novo mutante de *Saccharomyces cerevisiae* sensível à fotoadição de psoralenos, o mutante *pso8-1*;
- isolar, clonar e caracterizar molecularmente o gene *PSO8*.

MATERIAL E MÉTODOS

2.1 LINHAGENS E PLASMÍDEOS

Nas rotinas de laboratório para propagação e amplificação plasmideal foi utilizada a linhagem DH-5 α da bactéria *Escherichia coli* apresentando o genótipo:

F'/endA₁ hsdR17(rk-mk⁺) supE44 thi-1 recA1 gyrA (Nal^r) relA1 Δ (lacZYA-argF) U169 (ϕ 80 lacZ Δ M15).

Os vetores plasmideais de uso bifuncional em *Saccharomyces cerevisiae* e *E. coli* e as linhagens de *S. cerevisiae* utilizadas neste trabalho encontram-se descritas nas tabelas 3 e 4.

Tabela 3: Vetores de uso bifuncional em *S. cerevisiae* e *E. coli*

Plasmídeo	Características	Fonte
YcP50	Vetor centromérico bifuncional contendo URA3 como marcador genético	Rose <i>et al.</i> 1987
PHR01	Plasmídeo Ycp50 contendo fragmento do banco genômico de levedura	este estudo
PMG861	Plasmídeo pYCP50 contendo gene RAD6	este estudo

Tabela 4: Linhagens de *S cerevisiae* utilizadas para a realização deste estudo

Linhagens	Genótipo	Fonte
N123	<i>Mata his1 gsh1 PSO8</i>	Henriques e Moustacchi 1980
56(16)	<i>Mata his1 gsh1 pso8-1</i>	Henriques e Moustacchi 1980
MKPo	<i>Mata can1-100 ade2-1 lys2-1 ura3-52 leu2-3,112 his3-Δ200 trp1-Δ901 PSO8</i>	Pierce <i>et al.</i> 1987
FF1852	<i>Mata ade5 can1 leu2-3 trp1-289 ura3-52</i>	Dr. F. Fabre, Curie I., Paris, França
MG5312	<i>Mata/Mata ade2-101/ade2-101 LEU2/leu2-Δ1 LYS2/lys2-801 TRP1/trp1-Δ1 ura3-52/ura3-52 gsh1-Δ1::URA3/gsh1-Δ1::URA3</i>	Schmidt <i>et al.</i> 1996
HR0112-10C	<i>Mata his1 ade2-1 ura3-52 leu2-3,112 GSH1 PSO8</i>	este estudo
HR0112-11D	<i>Mata ade2-1 lys2-1 trp1-Δ901 ura3-52 leu2-3,112 GSH1 pso8-1</i>	este estudo
HR1259-1A	<i>Mata ura3-52 leu2-3,112 ade2-1 lys2-1 GSH1 PSO8</i>	este estudo
HR1259-1B	<i>Mata ura3-52 leu2-3,112 ade2-1 trp1-Δ901 GSH1 pso8-1</i>	este estudo
HR1259-1C	<i>Mata ura3-52 leu2-3,112 ade2-1 trp1-Δ901 his1 GSH1 pso8-1</i>	este estudo
HR1259-1D	<i>Mata ura3-52 leu2-3,112 ade2-1 lys2-1 his1 GSH1 PSO8</i>	este estudo
HT18-2C	<i>Mata his3 ade2-1 lys2-1 rad4::URA3</i>	Dr. M. Brendel, University Frankfurt, Alemanha
MB1625-1A	<i>Mata pso8-1 rad4-4</i>	este estudo
MB1625-1C	<i>Mata pso8-1 rad4-4 lys2-1 his3 ade2-1 rho-</i>	este estudo
Y202	<i>Mata ade2-1 can1-100 his3-11,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-Δ100 rad6::URA3</i>	Dr. M. Brendel, University Frankfurt, Alemanha

2.2 MEIOS DE CULTURA

Para o crescimento das células de levedura foi utilizado o meio líquido completo (YEPD), cuja constituição é 1% de extrato de levedura (Difco), 2% de bacto peptona (Difco) e 2% de glicose (Synth). Para a obtenção de colônias isoladas e culturas para estoque, usou-se o meio

YEPD solidificado pela adição de 2% de bacto ágar (Difco). Para prevenir a presença de mutantes "petite" (defectivos em DNA mitocondrial) nas culturas em fase estacionária de crescimento, foi utilizado o meio YEPG, com a mesma constituição do meio YEPD, exceto que a glicose foi substituída por 2% de glicerol, uma fonte não-fermentável de carbono.

Também foi usado o meio mínimo (MM) ou meio sintético mínimo (SC) composto de 0,34% de bases nitrogenadas de leveduras, sem aminoácidos e sulfato de amônio (Difco), 0,5% de sulfato de amônio (Synth), 2% de glicose (Synth) e 2% de bacto ágar (Difco).

Na determinação das marcas auxotróficas, as células de levedura foram semeadas em SC suplementado com os aminoácidos e bases nitrogenadas requeridas, exceto aquelas necessárias para determinar a marca auxotrófica, nas seguintes concentrações: 20 mg.l⁻¹ de hemissulfato de adenina (Sigma), 10 mg.l⁻¹ de L-histidina (Sigma), 30 mg.l⁻¹ de L-leucina (Sigma), 30 mg.l⁻¹ de L-lisina (Sigma), 20 mg.l⁻¹ de uracil (Sigma). Assim, para determinar se uma linhagem era auxotrófica para lisina, por exemplo, suas células eram semeadas em SC contendo todos os nutrientes citados, menos lisina. Esse meio passa então a ser denominado meio seletivo ou de omissão (SC-lis).

Na lavagem, suspensão e diluição das células foi empregada a solução tampão PBS que é composta de 0,01 M NaH₂PO₄ (Synth), 0,01 M Na₂HPO₄ (Synth) e 0,9% NaCl (Synth), pH7.

Para o crescimento das linhagens bacterianas, utilizou-se o meio LB, composto de 1% de extrato de levedura (Difco), 0,5% de cloreto de sódio e 2% de bacto triptona (Difco), com pH ajustado para 7,0 com NaOH 1M e, quando necessário, solidificado com 2% de bacto ágar (Difco). Para a seleção de colônias de bactérias transformantes e para a manutenção de plasmídeos foi acrescentado o antibiótico ampicilina (100µg.ml⁻¹ - Sigma) ao meio LB.

Os meios de cultura foram esterilizados em autoclave, sob 1 atm de pressão e temperatura de 121°C por 20 minutos (autoclave AV75, Phoenix).

2.3 AGENTES QUÍMICOS

A furocumarina monofuncional **3-carbetoxipsoraleno** (3-CPs, peso molecular 258) foi gentilmente fornecida pelo Dr. E. Bisagni (Institut Curie, Orsay, França), e a furocumarina bifuncional **8-metoxipsoraleno** (8-MOP, peso molecular 216) foi obtida da Sigma. As soluções estoque foram preparadas segundo Averbeck e Moustacchi (1975): após dissolução de 6,4 mg de 3-CPs ou 5,2 mg de 8-MOP em 4 ml de etanol absoluto (Synth) previamente destilado, completou-se o volume com água destilada até 10ml. As soluções foram armazenadas a 4°C ao abrigo luz. A concentração final das furocumarinas nas suspensões de células tratadas é $5 \times 10^{-5} \text{M}$.

N-metil-N'-nitrosoguanidina (MNNG)

A solução estoque de MNNG (Sigma) foi preparada em acetona na mínima quantidade suficiente para dissolver a droga. A concentração adequada para estoque (100 mM) foi obtida completando-se o volume com água destilada estéril. As diluições necessárias foram feitas em água destilada estéril.

1,1'-dimetil-4,4'-bipiridinium diclorido (Paraquat) e Peróxido de hidrogênio (H₂O₂)

As soluções estoque de Paraquat (Sigma) e H₂O₂ (Synth) foram preparadas em água destilada estéril em uma concentração de 100 mM.

óxido de 4-nitroquinolina (4-NQO)

A solução estoque de 4-NQO (Sigma) foi preparada em dimetilsulfóxido-DMSO (Merck), em uma concentração de 5.26 μM .

8-hydroxyquinolina (8-HQ)

A solução estoque de 8-HQ (Merck) foi preparada em DMSO a uma concentração 0,5M.

dietilnitrosamina (NDEA) e 1,2,7,8-diepoxi octano (DEO)

As soluções originais dos químicos NDEA (sigma) e de DEO (Aldrich) apresentam as concentrações 95mM e 970mM, respectivamente.

2.4 ESTOQUE DAS CULTURAS

Culturas de leveduras crescidas em meio rico ou seletivo durante 12-15 horas ou até a concentração celular alcançar 10^7 células.ml⁻¹, característica de uma fase exponencial de crescimento, foram diluídas 1:1 em tampão PBS contendo 50% de glicerol (Sigma) e armazenadas em freezer -20°C (F27, Prosdócimo) ou -85°C (Freezer Ultra-Low, Sanyo, EUA).

Culturas de bactéria cresceram por 15 horas em meio LB ou LB+Amp, diluídas 1:1 em solução de glicerol [65% glicerol (Sigma), 0,1 M MgSO₄ (Synth), 0,025M Tris-HCL (Sigma) pH 8,0] e armazenadas em freezer a -20°C.

Para rápido acesso durante o desenvolvimento dos experimentos, placas de meio YEPD, seletivo ou LB com culturas em fase estacionária de ambos organismos foram mantidas refrigeradas a 4°C (R27, Prosdócimo) por até 30 dias (Placa estoque).

2.5 CONDIÇÕES DE CRESCIMENTO

Para obtenção de culturas líquidas de células de levedura em fase estacionária de crescimento, alíquotas do estoque em glicerol ou da placa estoque foram inoculadas em meio rico ou seletivo e incubadas a 28°C com agitação orbital de 180 rpm (Incubator Shaker G25, New

Brunswick Scientific Co. Inc.) por 3 dias ou até atingirem a concentração de 2 a 4×10^8 cels.ml⁻¹, característica de uma fase estacionária. Células de levedura também foram semeadas em meio YEPD sólido para obtenção de culturas em fase estacionária, sendo incubadas a 28°C em estufa (TC-500, Instrulab), durante 5 a 7 dias.

As Células em fase exponencial de crescimento foram obtidas com 5 a 12 horas de incubação a 28 °C com agitação orbital de 180 rpm, atingindo 1 a 2×10^7 células.ml⁻¹ e cerca de 20 a 30% de células em brotos.

Células de bactéria cresceram a partir de colônias isoladas em meio LB ou LB+Amp a 37 °C com agitação orbital de 250 rpm (Incubator Shaker G25, New Brunswick Scientific Co. Inc.) por 2 horas (fase exponencial de crescimento) ou 15 horas (fase estacionária de crescimento).

2.6 CONSTRUÇÃO DAS LINHAGENS DE LEVEDURA

As linhagens diplóides foram obtidas pelo contato de duas linhagens haplóides com sinais de acasalamento opostos em fase exponencial de crescimento, por 6h em YEPD líquido, a 28°C. As culturas foram centrifugadas a 4000 rpm durante 5 minutos a 4°C (centrífuga RC5C, rotor SS34, Sorvall®Instruments, Du Pont Co.), lavadas e suspensas em tampão PBS. As células diplóides construídas foram selecionadas por prototrofia em meio seletivo ou através dos métodos clássicos de micromanipulação de zigoto (Mortimer e Hawtorne 1969; Sherman *et al.* 1986).

Linhagens diplóides foram induzidas à esporulação através da inoculação de culturas em fase exponencial de crescimento em meio KAC solidificado, a 28°C por 4 dias. As células foram coletadas, suspensas em

tampão PBS e tratadas com β -Glucoronidase (Sigma) por 15 min a 37°C para rompimento parcial do envoltório protetor dos ascósporos. Os esporos foram separados por micromanipulação e inoculados em YEPD por 3 dias. As tétrades obtidas foram analisadas quanto à segregação gênica para a sensibilidade à radiação UVC, para as marcas auxotróficas, sinal de acasalamento e nível de glutathiona.

2.7 TESTE EM GOTAS QUALITATIVO

Para caracterizar rapidamente um grande número de linhagens, esporos ou transformantes quanto as suas marcas de auxotrofia, bem como do caráter mutante ou selvagem para o gene *PSO8* dos esporos segregantes foi utilizado o teste em gotas. Na determinação de marcas de auxotrofia, gotas com 5-10 μ l de suspensões celulares em tampão PBS contendo 10^5 a 10^7 cels.ml⁻¹ foram depositadas em placas de Petry contendo meio MM ou meios de omissão. Após 3-4 dias de crescimento a 28°C (estufa TC-500, Instrulab), as células aptas a formar tapetes celulares nos meios de omissão eram consideradas prototróficas para os respectivos aminoácidos omitidos, e aquelas que não apresentavam crescimento celular eram consideradas auxotróficas.

O caráter mutante ou selvagem foi definido pela sensibilidade à UVC, quando 5 a 10 μ l de suspensões celulares contendo 10^5 a 10^7 cels.ml⁻¹ foram depositadas em meio YEPD sólido, submetidas a uma dose de radiação de 50J, e incubadas durante três dias a 28°C. Aquelas células capazes de formar tapetes celulares nos limites das gotas inoculadas, em comparação ao controle, eram consideradas *PSO8*⁺, enquanto aquelas que não apresentavam crescimento eram designadas *pso8-1*.

2.8 DETERMINAÇÃO DO SINAL DE ACASALAMENTO

Para a determinação do sinal de acasalamento, aproximadamente 10^6 céls.ml⁻¹ de cada linhagem ou esporo foram colocadas em contato com as linhagens testadoras *Mata* (FF1852 - Tabela 4) ou *Mata* (MKPo - Tabela 4) na mesma concentração celular, em meio YEPD líquido. Após 4 a 6 horas de incubação a 28°C, a presença ou não de zigotos era observada em microscópio universal (Zeiss Co., Alemanha), assumindo-se como *Mata* aquelas linhagens que apresentavam zigotos nos inóculos contendo a linhagem teste MKPo e *Mata* aquelas cruzadas com a linhagem teste FF1852.

2.9 DETERMINAÇÃO MICROBIOLÓGICA DO CONTEÚDO DE GLUTATIONA

A determinação do conteúdo endógeno de glutathione e conseqüente caracterização dos esporos provenientes de linhagens diplóides heterozigóticas para o gene *GSH1* foi realizada conforme descrito por Schmidt *et al.* (1996). A linhagem indicadora MG5312 (*gsh1-Δ1::URA3/ gsh1-Δ1::URA3* - ver tabela 4) foi crescida em YEPD a 28°C, sob agitação, até atingir a fase estacionária de crescimento. As células foram coletadas por centrifugação a 4000 rpm durante 5 minutos a 4°C (centrífuga RC5C, rotor SS34, Sorvall® Instruments, Du Pont Co.), lavadas 2 vezes e diluídas para 2×10^7 cels.ml⁻¹ em tampão PBS. Após, 100μl da suspensão celular foi diluídas em 3,5 ml de Ágar de superfície (4g de bacto ágar em tampão PBS) a 48°C, sendo semeadas em placas de meio sintético completo ou seja suplementado com todos os aminoácidos e bases nitrogenadas essenciais as leveduras, sem glutathione. Células em

fase estacionária das linhagens a serem testadas eram suspensas em tampão PBS numa proporção de 20% (peso/volume), sendo então submetidas a ruptura térmica em banho-maria a 85°C por 15 minutos, após, os restos celulares foram precipitados por centrifugação e 20µl do sobrenadante foi aplicado sobre filtros de papel de 10mm de diâmetro (Schleicher & Schüll, Alemanha) depositados sobre as placas indicadoras. Após 3-4 dias a 28°C, a glutathiona presente no extrato difunde-se pelo ágar, e um halo forma-se ao redor do filtro devido ao crescimento da linhagem indicadora. O diâmetro do halo de crescimento foi medido em mm e convertido para µg de glutathiona.ml⁻¹ com base na curva padrão feita com soluções de glutathiona sintética de concentrações conhecidas (Boeringer Mannheim GmbH, Alemanha).

2.10 CURVAS DE SOBREVIVÊNCIA

2.10.1 Preparação das suspensões celulares

Culturas de células em fase estacionária ou exponencial de crescimento foram centrifugadas a 5000 rpm (Centrífuga RC5C, rotor SS34, Sorvall® Instruments, Du Pont Co.) por 5 min a 4°C e lavadas com tampão PBS por 3 vezes para a completa remoção do meio de cultura. Para dissociar eventuais agrupamentos celulares, as suspensões celulares foram submetidas a tratamento com ultrassom (Ultrasonic Homogenizer 4710, Cole-Palmer Instrument) por 10 a 30s para dissociação dos grumos celulares. A concentração celular foi determinada por contagem em câmara Neubauer e ajustada para 2x10⁶ céls.ml⁻¹.

2.10.2 Tratamento com 3-CPs e 8-MOP+UVA

Para os tratamentos com 3-CPs e 8-MOP, as suspensões celulares em fase estacionária ou exponencial de crescimento foram incubadas a 4°C por 15 min ao abrigo da luz com concentrações equimoleculares de 5×10^{-5} M de 3-CPs ou 8-MOP (ver item 2.3). Após incubação, retirou-se uma alíquota para controle e diluições apropriadas foram feitas e semeadas em YEPD. Alíquotas de 10 ml foram expostas a doses crescentes de radiação UVA (lâmpada Phillips-HPW de alta pressão de mercúrio, 125W) em placas de Petry de vidro abertas. Entre a lâmpada de mercúrio e a suspensão de células a ser irradiada foi colocado um cristalizador Pirex contendo 150 ml de água destilada, tendo como objetivos evitar o aquecimento da preparação celular e filtrar radiações com comprimentos de onda inferiores a 320 nm. Alíquotas foram retiradas a cada dose, diluídas apropriadamente, semeadas em triplicata em placas de YEPD e incubadas a 28°C (geladeira Prosdócimo, com TC-500 adaptado, Instrulab) por 4 dias. Após este período, a contagem do número de colônias visíveis em cada placa foi realizada e, com base nas diluições efetuadas, calculou-se a fração de sobrevivência de cada linhagem em relação à dose zero. A dose de radiação ao nível da preparação celular foi de $1,1 \text{ KJ.m}^{-2} \text{ min}^{-1}$, conforme estabelecido por um dosímetro Black-Ray® J221 (Ultraviolet Products Inc., San Gabriel, EUA).

2.10.3 Tratamento com radiação UVC

Alíquotas de 10 ml das suspensões de 2×10^6 cels.ml⁻¹ em fase estacionária ou exponencial de crescimento foram submetidas à irradiação com doses crescentes de UVC (General Electric G 15T8). A cada dose, uma

alíquota foi retirada, diluída e semeada em YEPD, em triplicata. As placas foram incubadas a 28°C, durante 3 dias (geladeira Prosdócimo, com TC-500 adaptado, Instrulab) e as colônias visíveis foram contadas, as diluições foram corrigidas e convertidas em taxa de sobrevivência com relação ao controle. A taxa de dose de UVC, ao nível da preparação celular, foi de 10 erg.mm⁻².s⁻¹, conforme determinado por um dosímetro Black-Ray J225 (Ultraviolet Products Inc., San Gabriel, EUA).

2.11 TRATAMENTO COM MNNG, 4-NQO, DEO, NDEA, 8-HQ, H₂O₂ e PARAQUAT.

A sensibilidade aos agentes mutagênicos foi determinada pelo teste em gotas segundo Ruhland *et al.* (1981). Culturas de células em fase estacionária e exponencial de crescimento foram centrifugadas a 4000 rpm (Centrífuga RC5C, rotor SS34, Sorvall® Instruments, Du Pont Co.) por 5 minutos a 4°C, lavadas e diluídas para 2x10⁸ céls.ml⁻¹ em tampão PBS. Alíquotas de 1 ml de cada cultura foram incubadas por 2 horas a 28°C com agitação (Incubator Shaker G25 Co Inc) com: 0,1 e 1 mM de MNNG, 5 e 10 mM de Paraquat, 5 e 10 mM de H₂O₂, 20 e 40 mM de 8-HQ, 0.4 e 0.8 mM de NDEA, 15 e 45 mM de DEO, 5x10⁻⁴ e 1x10⁻³ de 4-NQO. De cada alíquota, foram feitas diluições seriadas (1:10), partindo de 1 a 2x10⁸ céls.ml⁻¹ e 6µl de cada diluição foram plaqueados sobre meio YEPD. As placas foram incubadas a 28°C por 4-5 dias.

2.12 DETERMINAÇÃO DA FREQUÊNCIA DE REVERTENTES HIS⁺ E DE MUTAÇÃO PARA FRENTE (FORWARD MUTATION)

Alíquotas de 20 ml de uma suspensão celular em fase estacionária de crescimento, contendo 2x10⁷ céls.ml⁻¹ foram tratadas com 3-CPs,

8-MOP+UVA ou UVC, como nas curvas de sobrevivência. Após o tratamento, as suspensões foram coletadas por centrifugação a 4000rpm (Centrífuga RC5C, rotor ss34, Sorvall® Instruments, Du Pont Co.), durante 5 minutos a 4°C e concentradas para uma densidade de 2×10^8 céls. ml⁻¹ em tampão PBS.

Para a determinação da indução de mutações reversas, alíquotas de 0,3 ml das suspensões (2×10^8 céls. ml⁻¹) tratadas foram semeadas em placas de Petry contendo meio de omissão SC-his e incubadas a 28°C (geladeira Prosdócimo, com TC-500 adaptado, Instrulab) durante 7 a 8 dias, em quatro réplicas. As colônias revertentes foram contadas, e transformadas em taxa de reversão. Para determinação de mutações para frente, as suspensões celulares tratadas foram diluídas para uma concentração final de 2×10^6 céls.ml⁻¹. Alíquotas de 0,3 ml foram semeadas, em triplicata, em placas de Petri contendo meio SC suplementado com os aminoácidos e/ou nucleotídeos necessários para o crescimento das células e 40 µg.ml⁻¹ de sulfato de canavanina. Após incubação a 28°C (geladeira Prosdócimo, com TC-500 adaptado, Instrulab) durante 4 a 5 dias, as colônias mutantes foram contadas. A sobrevivência foi monitorada paralelamente, em todos os experimentos com os diferentes agentes. Os experimentos foram repetidos duas vezes.

2.13 MÉTODOS RELACIONADOS A ÁCIDOS NUCLÉICOS

A preparação de soluções e tampões foi feita segundo a metodologia empregada em laboratórios de Biologia Molecular, descritas por Ausubel *et al.* (1989) e Sambrook *et al.* (1989). Todos os produtos químicos utilizados foram P.A. e obtidos da Sigma, Merck, Fluka-Biochemika, Difco e Gibco BRL.

As enzimas de restrição e os respectivos tampões usados nas técnicas de genética molecular foram obtidos da Pharmacia, MBI e Cenbiot Enzimas (Centro de Biotecnologia-UFRGS).

2.13.1 Maxi-prep (Adaptado de Ausubel *et al.* 1989)

O banco genômico de levedura em YCp50 foi amplificado a partir de um estoque em *E. coli* a -20°C. Uma alíquota de 200 µl foi diluída em 1 ml de LB e semeada em placas de LB+Amp incubadas a 37°C (Incubator Shaker G25, New Brunswick Scientific Co. Inc.) por 15 horas. Os tapetes celulares resultantes foram lavados com 5 ml de LB e finalmente inoculados em 500 ml de LB+Amp. Após crescimento inicial por 2 horas a 37°C sob agitação orbital de 250 rpm, foi adicionado 170 µg de cloranfenicol por ml de cultura e novamente incubada por 13 horas a 37°C com agitação a 300 rpm. As células foram então centrifugadas a 5000 rpm (Centrífuga RC5C, rotor SS34, Sorvall® Instruments, Du Pont Co.) por 15 minutos a 4°C, ressuspensas em 25 ml de STE (10 mM NaCl, 10 mM Tris-HCL pH 8,0, 1 mM EDTA pH 8,0) e centrifugadas novamente sob as mesmas condições, sendo finalmente ressuspensas em 13 ml de Solução I (50 mM sacarose, 25 mM Tris-HCL, 10 mM pH 8,0 EDTA pH 8,0) contendo 600 µg.ml⁻¹ de lisozima e incubadas a 25°C por 10 minutos. As células foram então lisadas pela adição de 25 ml de Solução II (0,2 N NaOH, 1% dodecil sulfato de sódio) e incubadas a 4°C por 15 minutos. A reação foi neutralizada com a adição de 19 ml de Solução III gelada e pH 4,8 (29,4% acetato de potássio, 11,5 % ácido acético glacial) e incubadas a 4°C por 1 hora. O lisado foi então centrifugado a 5000 g por 20 minutos a 4°C, o sobrenadante foi recuperado, diluindo-o 1:1 com isopropanol e incubado a 25°C por 15

min. Após centrifugação a 4°C com 10000 g (Centrífuga RC5C, Sorvall® Instruments, Du Pont Co.) por 10 min, o precipitado resultante foi seco, gentilmente lavado com etanol 70 % e novamente seco em dessecador a vácuo. O precipitado foi então solubilizado em 3 ml de TE (10 mM Tris-HCl pH 8,0 e 1 mM EDTA pH 8,0), tratado com 36 µl de acetato de amônio 10 M (Sigma) e 600 µl de SDS 10% e agitado vigorosamente por 5 segundos. Procedeu-se então 3 extrações consecutivas dos ácidos nucleicos com uma mistura de fenol/clorofórmio/álcool isoamílico numa proporção 25:24:1. A fase aquosa final tratada com 40 µl de acetato de amônio 10 M e 6 ml de etanol absoluto e os ácidos nucleicos precipitados a -20°C por 15 horas. O precipitado foi finalmente centrifugado a 13000 rpm (Centrífuga Spin I, Incibrás) a 4°C por 15 minutos e o precipitado de DNA lavado com etanol 70%, seco a vácuo e solubilizado em 500 µl de TE sendo mantido a -20°C.

2.13.2 Mini-prep (Adaptado de Ausubel *et al.* 1989)

2.13.2.1 Extração de plasmídeos contidos em células de bactéria

Células de uma colônia isolada de *E. coli* contendo o plasmídeo de interesse foram inoculadas em LB+Amp a 37°C por 15 horas (Incubator Shaker G25, Scientific Co. Inc.). Aliquotas de 1,5 ml da cultura foram centrifugadas a 13000 rpm por 20 segundos (Centrífuga Spin I, Incibrás) e os sedimentos ressuspensos em 100 µl de Solução I e incubados a 25°C por 5 minutos. Adicionou-se 200 µl de Solução II gelada e incubou-se a 4°C por 5 minutos. A reação foi neutralizada com 150 µl de Solução III e mantida a 4°C por mais 5 minutos. O precipitado foi centrifugado a 13000 rpm por 1 minutos, recuperado e precipitado com 0,9 ml de Etanol absoluto a -20°C por 15 a 30 minutos, novamente centrifugado a 13000 rpm

por 1 minutos e os precipitados foram lavados gentilmente com etanol 70%, secos a vácuo e ressuspensos em 40 μ l de TE sendo estocados a -20°C.

2.13.2.2 Extração de plasmídeos contidos em células de levedura

Para extração de DNA a partir de células de levedura, culturas a partir de uma colônia isolada foram crescidas a 28°C por 15 horas em meio seletivo (SC-Ura). Centrifugou-se 1,5 ml a 13000 rpm por 20 s e os sedimentos resultantes foram ressuspensos em 150 μ l de SE (1m Sorbitol e 0,1 M EDTA pH 7,5) contendo 5 U.ml⁻¹ de liticase e incubados a 37°C por 1 hora para romper a parede celular. Os protoplastos foram então centrifugados a 13000 rpm por 1 minuto e ressuspensos em 100 μ l de Solução I seguindo o protocolo a partir deste ponto como para células de bactéria.

2.13.3 Extração de DNA cromossômico das linhagens de levedura

Para extração de DNA cromossomal de células de leveduras, 10 ml de cultura foi centrifugada em tubos SS-34 a 5000rpm por 5 minutos à temperatura ambiente (Centrifuga Sigma 3K12). O sobrenadante foi aspirado e as células ressuspensas em 1 ml de água MilliQ estéril. A suspensão foi transferida para tubos Eppendorf e centrifugada por 5 segundos à temperatura ambiente. As células foram ressuspensas em 200 μ l de *Breaking Buffer* ou tapão de lise [2% (v/v) Triton x-100, 1% (p/V) SDS, 100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 8,0 e 1 mM EDTA], e foram adicionados 0.3g de *glass beads* (425-600 μ m) e 200 μ l de

fenol/cloroformio/álcool isoamilico (25:24:1). A mistura foi agitada por Vortex durante 3 minutos. Foi adicionado 200 µl de TE e agitado brevemente com Vortex. A suspensão foi centrifugada a 13000 rpm por 5 minutos à temperatura ambiente e, cuidadosamente, a fase aquosa foi transferida para um novo tubo Eppendorf, onde foi adicionado 1 ml de etanol. Após centrifugação de 3 minutos a 13000 rpm à temperatura ambiente o sedimento foi ressuspense em 400 µl de TE. Foram adicionados 30 µl de RNase A (1mg.ml⁻¹), misturados e incubados 5 minutos a 37°C. À mistura, foram adicionados 10 µl da solução 4 M de acetato de amônio e 1ml de etanol e, após misturados por inversão, foram centrifugados por 3 minutos a 13000rpm à temperatura ambiente. Após o sedimento seco o DNA foi ressuspense em 100µl de TE e estocado a -20°C.

2.14 TRANSFORMAÇÃO

2.14.1 Transformação de células de bactéria

2.14.1.1 Eletroporação

Foram inoculadas células de *E. coli* (previamente crescidas por 15 horas) em meio LB por 2 a 3 horas (Incubator Shaker G25, Scientific Co. Inc.) sob vigorosa agitação, até atingirem fase exponencial de crescimento. A cultura foi então resfriada e mantida a 4°C durante todo o tratamento. As células foram coletadas por centrifugação a 5000 rpm por 15 minutos a 4°C (Centrífuga RC5C, Sorvall® Instruments, Du Pont Co.) e ressuspensas em água Milli-Q estéril (MP10, Millipore S.A.) por 3 vezes para remoção do meio de cultura, sendo finalmente ressuspensas em glicerol 10% numa concentração celular de 10⁸ células.ml⁻¹, e estocadas a -20°C, estando desta forma aptas a serem transformadas (células eletro-

competentes) por até 3 meses. Estas alíquotas recebiam de 200 a 1000 ng de DNA plasmideal e eram submetidas a choque elétrico em cubetas de 0,4 cm com auxílio de um aparelho eletroporador (Gene Pulser™, Pulse Controller e Capacitance Extender Bio-Rad, BIO-RAD Inc., Hercules) ajustado para 2,5 kV, 200Ω, 25 μF. As células assim transformadas eram incubadas a 37°C por 1 hora em meio LB e então semeadas em placas de meio LB+Amp, sendo as colônias transformantes analisadas após 15 horas de crescimento a 37°C.

2.14.1.2 Cloreto de Cálcio

Uma cultura de *E. coli* em fase exponencial de crescimento, obtida de forma semelhante à do protocolo de eletroporação já descrito, após resfriada e mantida a 4°C, foi centrifugada a 3000 rpm por 10 min. O sedimento obtido foi lavado por 3 vezes com solução de CaCl₂ (60mM CaCl₂ e 15% de glicerol) para remoção de meio de cultura e incubado em solução de CaCl₂ por 30 minutos a 4°C, sendo novamente centrifugado a 3000 rpm por 5 minutos e concentrado para cerca de 10⁸ células.ml⁻¹ em solução de CaCl₂. Essa suspensão celular foi distribuída em alíquotas contendo 500μl que após estocadas a -20°C mantinham-se em condições de ser utilizadas por até 3 meses. As células assim consideradas aptas a serem transformadas (células cálcio-competentes) foram tratadas com 200 a 1000 ng de DNA plasmideal e submetidas a choque térmico de 42°C por 2 minutos, sendo então incubadas a 37°C em meio LB por 1 h e semeadas em placas de meio LB+Amp. As colônias transformantes eram analisadas após 18 horas de crescimento a 37°C.

2.14.2 Transformação de células de levedura

2.14.2.1 Acetato de Lítio (Gietz et al. 1992)

Células de levedura crescidas em meio rico a 28°C por 15 horas até fase exponencial tardia (contendo 2 a 6×10^7 cels.ml⁻¹) foram centrifugadas a 5000 rpm por 5 min a 4°C (Centrífuga RC5C, Sorvall® Instruments, Du Pont Co.) e as células ressuspensas em 1 ml de 0,1 M acetato de lítio. A suspensão foi transferida para tubos Eppendorf e centrifugada por 5 segundos a 12000 rpm (Centrífuga Spin I, Incibrás). O sobrenadante foi aspirado, e o sedimento ressuspenso em aproximadamente 1 ml de 0,1 M acetato de lítio. A massa celular foi dividida em tubos Eppendorf, cada um com 50 µl. Nestes 50 µl foram adicionados 240 µl de PEG 50% (p/v), 36 µl LiC₂H₃O₂ 1 M, 20 µl SS-DNA (2 mg.ml⁻¹), 3 µg de DNA plasmidial. A suspensão foi incubada a 28°C por 30 minutos, e logo após foi aplicado o choque térmico de 42°C por 20 a 25 minutos. A mistura foi centrifugada a 12000 rpm por 5 segundos, e o sedimento gentilmente ressuspenso em 200 µl de água MilliQ estéril. A suspensão celular foi plaqueada em meio seletivo, sendo as colônias transformantes analisadas após 4 dias de crescimento a 28°C.

2.14.2.2 Eletroporação

Para transformações de rotina, quando um pequeno número de transformantes era necessário, utilizou-se o protocolo de Grey e Brendel (1992a). Células de levedura crescidas em meio rico até fase estacionária (ressuspensas em sorbitol 1M com auxílio de alça de platina) receberam 200 a 1000 ng de DNA plasmidial e foram submetidas a choque elétrico

com auxílio de aparelho eletroporador (Gene Pulser™, Pulse Controller e Capacitance Extender Bio-Rad, BIO-RAD Inc., Hercules, CA, EUA) calibrado em 1,5 kV, 200Ω, 25 μF, sendo então semeadas em placas de meio seletivo e incubadas a 28°C por 4 dias.

2.15 PERDA PLASMIDEAL

Linhagens de levedura portadoras de plasmídeos foram inoculadas em meio YEPD e crescidas até a fase estacionária. A cultura final foi então diluída e semeada em meio YEPD de modo a obter colônias isoladas. Após 3 a 4 dias de crescimento estas colônias eram repicadas em meio seletivo (SC-Ura) para averiguação da percentagem de perda plasmideal e testadas para os fenótipos associados aos plasmídeos, tais como resistência a agentes químicos e físicos.

2.16 ANÁLISE E CONSTRUÇÃO PLASMIDEAL

2.16.1 Restrição enzimática

Nas reações de restrição, 0,5μg a 10μg de DNA plasmidial foram misturados a 10μg de RNase A, a 1/10 do volume total de 10x tampão de restrição e a uma unidade de enzima por μg de DNA a ser digerido em um volume final de 20μl. As amostras foram incubadas durante duas horas a 37°C e analisadas por eletroforese em gel de agarose.

2.16.2 Eletroforese

Os plasmídeos intactos ou fragmentados pelas digestões enzimáticas foram tratados com 1/6 de volume de tampão de corrida (0,25% azul de bromofenol, 0,25% cianol-xileno FF e 30% de glicerol). As eletroforeses de DNA foram feitas em tampão 0,5x TBE (44,5 mM Tris Base, 1,0 mM EDTA, 44,5 mM ácido bórico) em gel de agarose 0.7% contendo 0,5 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ de brometo de etídeo, nas seguintes condições: 60 a 80 V, 500 mA, 250 W por 30 a 60 minutos. As bandas formadas foram analisadas através de transluminador de UV 302 nm (EB-20E, Ultra Lum Inc.) em comparação com uma amostra de DNA marcador e eventualmente fotografadas em câmara Polaroid com filme MP4 (Polaroid).

2.16.3 Isolamento de fragmentos a partir de Gel de Agarose

Os fragmentos de interesse para construção de novos vetores foram recuperados a partir de géis de eletroforese, conforme descrito por Grey e Brendel (1992b). As bandas eram recortadas do gel com o uso de bisturi livre de DNase e congeladas a -20°C por 30 min. Após os fragmentos de gel retornarem à temperatura ambiente, eram pressionados com o uso de uma seringa descartável de 2ml entre dois filtros de papel de 10mm de diâmetro (Schleicher & Schüll, Frankfurt, Alemanha). A seguir, o fluido resultante era tratado com 0,2 volumes de NaCl 1,2 M e 1 volume de Isopropanol a fim de precipitar o DNA presente. Após centrifugação a 12000 rpm por 20 min (Centrifuga Spin I, Incibrás), o precipitado era lavado com etanol 70% e ressuspenso em TE.

2.17 SEQÜENCIAMENTO

O fragmento de DNA de interesse (o passageiro) foi seqüenciado a partir dos seguintes *primers*: CW (TAC GCG ATC ATG GCG ACC ACA) e CCW (TGC CGG CCA CGA TGC GTC CGG) pelo método de terminação de cadeia com dideoxynucleotídeos, desenvolvido por Sanger e colaboradores em 1977. Estes *primers* apresentavam a mesma seqüência encontrada nas bordas do sitio *Bam*HI (presente no gene da tetraciclina) do plasmídeo centromérico YCp50, onde foram introduzidos os fragmentos do genoma de *S. cerevisiae* na construção do banco genômico (Rose *et al.* 1987).

Na identificação da seqüência do mutante alelo *pso8-1* [linhagens mutantes HR1259-1c e 56(16)] foram utilizados os *primers* RAD6 CW (CAACGAAGATCGAATTCCAAAG) e CCW (ATCGAATTCATAATATCGGCTC). Os mesmos *primers* foram utilizados para a amplificação da ORF RAD6 diretamente do DNA genômico por PCR.

2.18 BANCO DE DADOS INTERNACIONAL

A seqüência de DNA obtida após a leitura do gel de seqüenciamento foi submetida aos arquivos do genoma de *Saccharomyces cerevisiae* pelo acesso público do NIH (National Institute of Health, Bethesda, EUA) na Rede Internacional de Computadores (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Este serviço tem ligação direta aos bancos de dados do EMBL (European Molecular Biology Laboratory data library), *Genebank* e NBRF (National Biomedical Research Foundation nucleic acid database), entre outros, e está configurado de forma a encontrar seqüências idênticas de DNA rapidamente (Altschul *et al.* 1990).

RESULTADOS

A linhagem mutante *ps08* original isolada para sensibilidade à fotoadição de psoralenos por Henriques e Moustacchi (1980), além de portadora de um defeito no gene *GSH1*, herdado de sua selvagem isogênica N123 (Brendel *et al.* 1998) não apresentava marcas auxotróficas compatíveis com os sistemas de seleção normalmente utilizados em biologia molecular, como genes *URA3* ou *LEU2* (Tabela 3).

A fim de evitar interferências do fator glutatona na obtenção dos resultados, assim como de obter linhagens com marcas genéticas apropriadas, a linhagem *ps08* original 56(16) foi cruzada com a selvagem MKPo. A diplóide resultante do cruzamento foi induzida à esporulação. Os ascósporos resultantes da meiose foram dissecados por micromanipulação (ver item 2.6), e os esporos obtidos foram selecionados para as marcas desejadas através dos testes em gotas qualitativos e da determinação microbiológica de glutatona (ver itens 2.7 e 2.9). Os esporos selecionados apresentaram níveis de glutatona semelhantes ao da linhagem selvagem MKPo (Tabela 5). Assim, as características fenotípicas e genotípicas apresentadas pela linhagem 56(16) neste trabalho devem-se exclusivamente à mutação *ps08-1*. Um novo cruzamento foi realizado entre duas linhagens *GSH1* - HR0112-10c e HR0112-11d - resultantes do primeiro cruzamento, para obtenção de esporos *PSO*⁺ e *ps08-1* que portassem ao mesmo tempo o alelo selvagem *GSH1* e as marcas de seleção *ura3-52* e *leu2-3,112*. Construíram-se assim as linhagens HR1259-1a, -1b, -1c, -1d (Tabela 3).

Tabela 5: Conteúdo de glutatona das células haplóides *S. cerevisiae*.

Linhasgens	Glutaciona ($\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ células) ^a
N123	0,4 – 0,8
MKPo	2,4 – 2,8
N123 ₅₆₍₁₆₎ ^b	0,4 – 0,8
HR1259-1a ^c	2,4 – 2,8
HR1259-1b ^c	2,3 – 2,7
HR1259-1c ^c	2,4 – 2,8
HR1259-1d ^c	2,4 – 2,9

^a Peso úmido de células em fase estacionária de crescimento.

^b Mutante originalmente isolado.

^c Ascósporos utilizados para a caracterização do mutante *pso8-1*.

3.1 ANÁLISE GENOTÍPICA DA MUTAÇÃO *pso8-1*

A segregação do fenótipo de sensibilidade à radiação UVC foi analisada pelo cruzamento entre a linhagem *pso8-1* e a linhagem *PSO8* de sinais de acasalamento opostos. A tabela 6 mostra uma resposta mendeliana (2:2) dos fenótipos de resistência e sensibilidade à radiação UVC. A segregação das marcas auxotróficas para os loci *ade2-1*, *lys1-1*, *ura3-52* também foram normais entre os ascósporos (Tabela 6). Isto indica que, durante a meiose, o gene *PSO8*, assim como os dez mutantes *pso* já caracterizados, segrega como genes mendelianos (Henriques *et al.* 1997, Brendel e Henriques 2001).

Tabela 6: Segregação da mutação *pso8-1* para sensibilidade à radiação UVC.

Cruzamento	Nº de <i>asci</i> analisados	segregação de			segregação de
		<i>lys1-1</i>	<i>ade2-1</i>	<i>ura3-52</i>	<i>pso8-1</i>
<i>PSO8/pso8-1</i>	10	2+:2-	2+:2-	2+:2-	2Res.:2Sens.

A segregação das marcas de auxotrofia para os loci *lys1-1*, *ade2-1*, *ura3-52* é apresentada para ilustrar a segregação meiótica. A determinação qualitativa da sensibilidade dos ascósporos à UVC foi realizada pelo teste em gotas descritos no item 2.7.

A sobrevivência de linhagens diplóides homozigóticas e heterozigóticas para mutação *pso8-1*, após tratamento com radiação UVC foi analisada em células em fase estacionária de crescimento. Células diplóides heterozigotas (*PSO8/pso8-1*) demonstraram resistência semelhante à de linhagens diplóides homozigóticas *PSO8*, indicando que a mutação *pso8-1* é recessiva (Figura 5). Células diplóides homozigóticas *PSO8/PSO8* são levemente mais resistentes que células haplóides *PSO8*, enquanto células diplóides homozigóticas para a mutação *pso8-1* mostraram a mesma resposta após tratamento com radiação UVC que células haplóides *pso8-1*. Este resultado indica, como descrito previamente por Chanet *et al.* (1973), que a mutação *pso8-1* suprime o efeito de resistência diplóide após tratamento com radiação UVC.

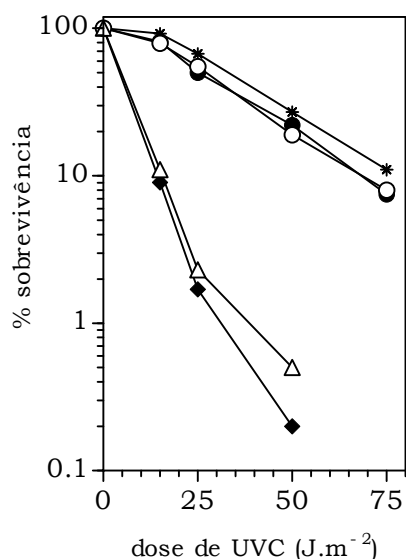


Figura 5: Sobrevivência das linhagens haplóides selvagem *PSO8* (○) e mutante *pso8-1* (◆) em comparação com as diplóides homozigotas *PSO8/PSO8* (*) e *pso8-1/pso8-1* (△), e da diplóide heterozigota *PSO8/pso8-1* (●) após tratamento com radiação UVC em fase estacionária de crescimento.

3.1.1 Efeito da mutação *ps08-1* sobre a esporulação

A mutação *ps08-1* não tem efeito significativo sobre a esporulação. Na condição homocigótica, em células diplóides, a esporulação ocorre com eficiência quase semelhante à linhagem selvagem (tabela 7).

Tabela 7: Efeito da mutação *ps08-1* sobre a esporulação de linhagens diplóides.

Linhagem	Esporulação(%)
<i>PSO8-1 x PSO8-1</i>	49,0%
<i>PSO8-1 x ps08-1</i>	47,7%
<i>ps08-1 x ps08-1</i>	37,7%

O número de células contadas em cada cultura esporulada foi em torno de 500.

3.1.2 Teste de complementação

A complementação pela resposta a inativação à radiação UVC foi sistematicamente utilizada. A mutação *ps08-1* foi complementada pelas mutações *pos1-1/rev3-1*, *ps02-1/snm1-1*, *ps03-1*, *ps04-4/prp19-1*, *ps05-1/rad16-1*, *ps06-1/erg3*, *ps07-1/cox11*, *ps09-1* e *ps010-1*. Além destas, *ps08-1* complementa a mutação *rad2-6* e *rad3-e5* representantes da via de reparação por excisão-ressíntese, *rad9-1* da via de reparação mutagênica e *rad50-1* da via de reparação recombinacional. Estes resultados sugerem que *ps08-1* representa *loci* distintos daqueles testados.

Pela comparação da sensibilidade de simples e duplos mutantes à radiação UVC foi analisado o modo de interação da mutação *ps08-1* com a mutação *rad4-4*, a qual pertence a via de reparação por excisão-ressíntese (Prakash e Prakash 2000). Na figura 6 observa-se que o duplo mutante *ps08-1rad4-4* mostrou, após o tratamento com radiação UVC,

sensibilidade maior do que a observada pelo mais sensível dos simples mutantes (*rad4-4*). Esta resposta caracteriza uma interação do tipo sinérgica entre estes dois *loci*. Isto significa que eles não são alelos e atuam em vias de reparação distintas.

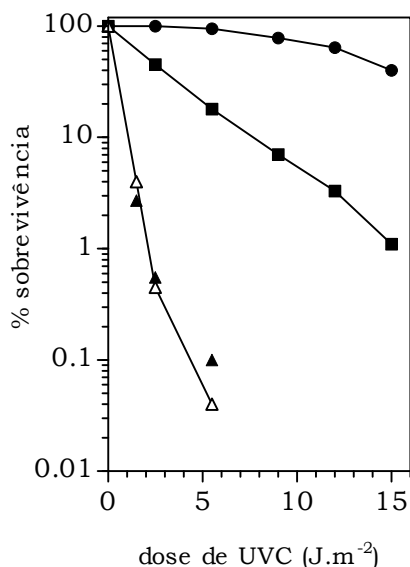


Figura 6: Interação entre as mutações *pso8-1* e *rad4-4*. Sobrevivência após radiação UVC em fase estacionária de crescimento dos segregantes haplóides derivados do cruzamento entre *pso8-1* x *rad4-4*, *pso8-1* (●), *rad4-4*(■) e *pso8-1rad4-4* (Δ, rho⁻; ▲, rho⁺).

3.2 ANÁLISE FENOTÍPICA DA MUTAÇÃO *pso8-1*

3.2.1 Sensibilidade do mutante *pso8-1* ao efeito letal de diferentes agentes mutagênicos

A sobrevivência do mutante *pso8-1* após tratamento com diferentes agentes químicos foi analisada em comparação à linhagem selvagem *PSO8*. Células em fase estacionária de crescimento foram comparadas com células em fase exponencial com o objetivo de verificar a influência da mutação *pso8-1* sobre a resistência característica das células em broto

(fase S-G2 do ciclo celular) ao efeito letal de agentes genotóxicos (para revisão ver Henriques e Brendel 1990; Henriques *et al.* 1997).

3.2.1.1 Sobrevivência após a fotoadição de furocumarinas mono (3CPs) bi-funcionais (8MOP).

As células selvagens *PSO8*, tratadas com 8-MOP+UVA em fase estacionária de crescimento são inativadas segundo uma curva sigmóide (figura 7C e F). Por outro lado, em fase exponencial de crescimento (S-G2 do ciclo celular), estas células exibem maior extensão no ombro da curva de sobrevivência, a qual está relacionada com a maior resistência das células em brotos (Henriques *et al.* 1977; Henriques e Moustacchi 1980) (figura 7C). Conseqüentemente, as células selvagens tratadas em fase exponencial são mais resistentes do que as em fase estacionária ($LD_{50}Exp/LD_{50}Est$, tabela 8).

Como previamente descrito por Averbeck *et al.* (1978) e Henriques e Moustacchi (1980) as células selvagens *PSO8* em fase estacionária após tratamento com 3-CPs+UVA apresentam uma curva de sobrevivência exponencial (figura 7E). Quando em fase exponencial de crescimento, observa-se que a primeira parte da curva de sobrevivência apresenta um declínio, seguido de um componente de resistência representado pela fração de células em broto presentes na população celular (figura 7B).

Os valores de LD_{50} apresentados na tabela 10 evidenciam a maior sensibilidade da linhagem selvagem ao agente bifuncional em relação ao agente monofuncional. Já é fato bem estabelecido que a furocumarina bifuncional é mais efetiva na indução de morte celular do que a monofuncional (Averbeck e Moustacchi 1975; Henriques *et al.* 1977; Henriques e Moustacchi 1980).

O mutante *pso8-1* é muito sensível à fotoadição de furocumarinas mono e bi-funcionais, em ambas as fases de crescimento (figura 7,

tabela 8, valores de RS). A maior sensibilidade das células mutantes após a foto-adição de 8-MOP não é só confirmada pelos valores de RS, como também pela ausência do ombro presente nas curvas de sobrevivência das células selvagens, em fase estacionária e exponencial de crescimento (figura 7C e F).

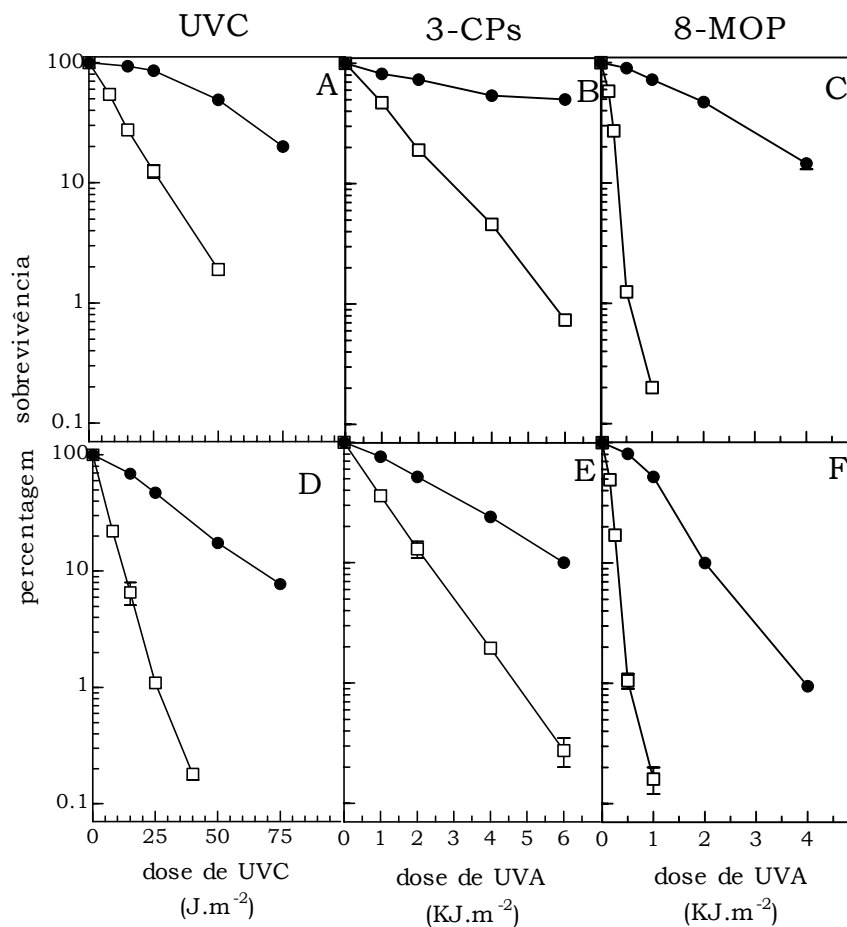


Figura 7: Sobrevivência da linhagem selvagem *PSO8* (●) e do mutante *pso8-1* (□) após tratamento com 3-CPs, 8-MOP fotoativados (UVA) e radiação UVC. Suspensões celulares (2×10^6 cels.ml⁻¹) foram tratadas em fase exponencial (A, B, C) e estacionária de crescimento (D, E, F).

Após a foto-adição de 3CPs, as curvas de sobrevivência são exponenciais em ambas as fases de crescimento, o declive da reta é mais pronunciado do que aquele apresentado pela linhagem selvagem e não existe o componente de resistência nas curvas de sobrevivência (figura 7B e E).

As células do mutante *ps08-1* em fase exponencial apresentam praticamente a mesma sensibilidade do que as células em fase estacionária. Isto indica que a mutação *ps08-1* aboliu a resistência característica das células em broto (S-G2 do ciclo celular) ao efeito letal fotoinduzido pelos psoralenos (valores de LD₅₀Exp/LD₅₀Est, tabela 8) (Henriques *et al.* 1977; Henriques e Moustacchi 1980). As células mutantes são 2 vezes mais sensíveis à fotoadição de 8-MOP do que ao 3-CPs (valores de LD₅₀, Tabela 8).

Convém ressaltar que o mutante *ps08-1* e a linhagem selvagem não foram sensíveis ao efeito letal isolado da radiação UVA.

3.2.1.2 Sobrevivência após a radiação UVC

Em culturas de células selvagens tratadas com radiação UVC, observa-se maior resistência das células em fase S-G2, quando comparadas com as em fase G1 do ciclo celular (Henriques e Moustacchi 1980). Estas observações são também verdadeiras para a linhagem selvagem *PSO8*, que é cerca de 2 vezes mais radiorresistente em fase exponencial do que em fase estacionária de crescimento ao tratamento com UVC (LD₅₀Exp/LD₅₀Est, Tabela 8).

O tratamento com radiação UVC leva as células *ps08-1* a uma inativação exponencial. O mutante *ps08-1* é sensível ao efeito letal da radiação UVC, em ambas as fases de crescimento em que se encontram as células durante o tratamento (figura 7A e D, valores de RS, Tabela 8). Entretanto, a magnitude deste efeito é muito mais acentuada para as células tratadas em fase estacionária. O mutante *ps08-1* mostrou-se 2

vezes mais resistente ao tratamento com UVC em fase logarítmica do que em fase estacionária de crescimento ($LD_{50}Exp/LD_{50}Est$, Tabela 8).

Tabela 8: Características da sobrevivência do mutante *pso8-1* em relação à linhagem selvagem *PSO8-1* após o tratamento com UVC, 8-MOP+UVA e 3-CPs+UVA.

Linhagens	3-CPs+UVA					8-MOP+UVA				
	Fase exponencial		Fase estacionaria		$\frac{LD_{50} \text{ exp.}}{LD_{50} \text{ est.}}$	Fase exponencial		Fase estacionaria		$\frac{LD_{50} \text{ exp.}}{LD_{50} \text{ est.}}$
	LD_{50}	RS	LD_{50}	RS		LD_{50}	RS	LD_{50}	RS	
<i>PSO8</i>	4.0	-	2.2	-	1.8	2.0	-	1.0	-	2.0
<i>Pso8-1</i>	1.0	4.0	0.9	2.4	1.1	0.25	8.0	0.25	4.0	1.0

Linhagens	Radiação UVC				
	Fase exponencial		Fase estacionaria		$\frac{LD_{50} \text{ exp.}}{LD_{50} \text{ est.}}$
	LD_{50}	RS	LD_{50}	RS	
<i>PSO8</i>	50	-	25	-	2.0
<i>Pso8-1</i>	10	5.0	5.0	5.0	2.0

LD_{50} corresponde às doses (em kJ.m^{-2} de UVA) que resultam em 50% de sobrevivência. RS é a sensibilidade relativa do mutante *pso8-1* em comparação à linhagem selvagem *PSO8*, calculada pela razão LD_{50} da linhagem selvagem pela LD_{50} do mutante.

3.2.1.3 Sobrevivência após tratamento com DEO, MNNG, NDEA, 4-NQO, 8-HQ, Paraquat e H_2O_2 .

Como se pode observar na Figura 8, o mutante *pso8-1* mostrou-se nitidamente sensível após o tratamento com os agentes alquilantes DEO e MNNG, assim como ao composto UV-mimético 4-NQO, independente da fase de crescimento em que se encontram as células durante o tratamento.

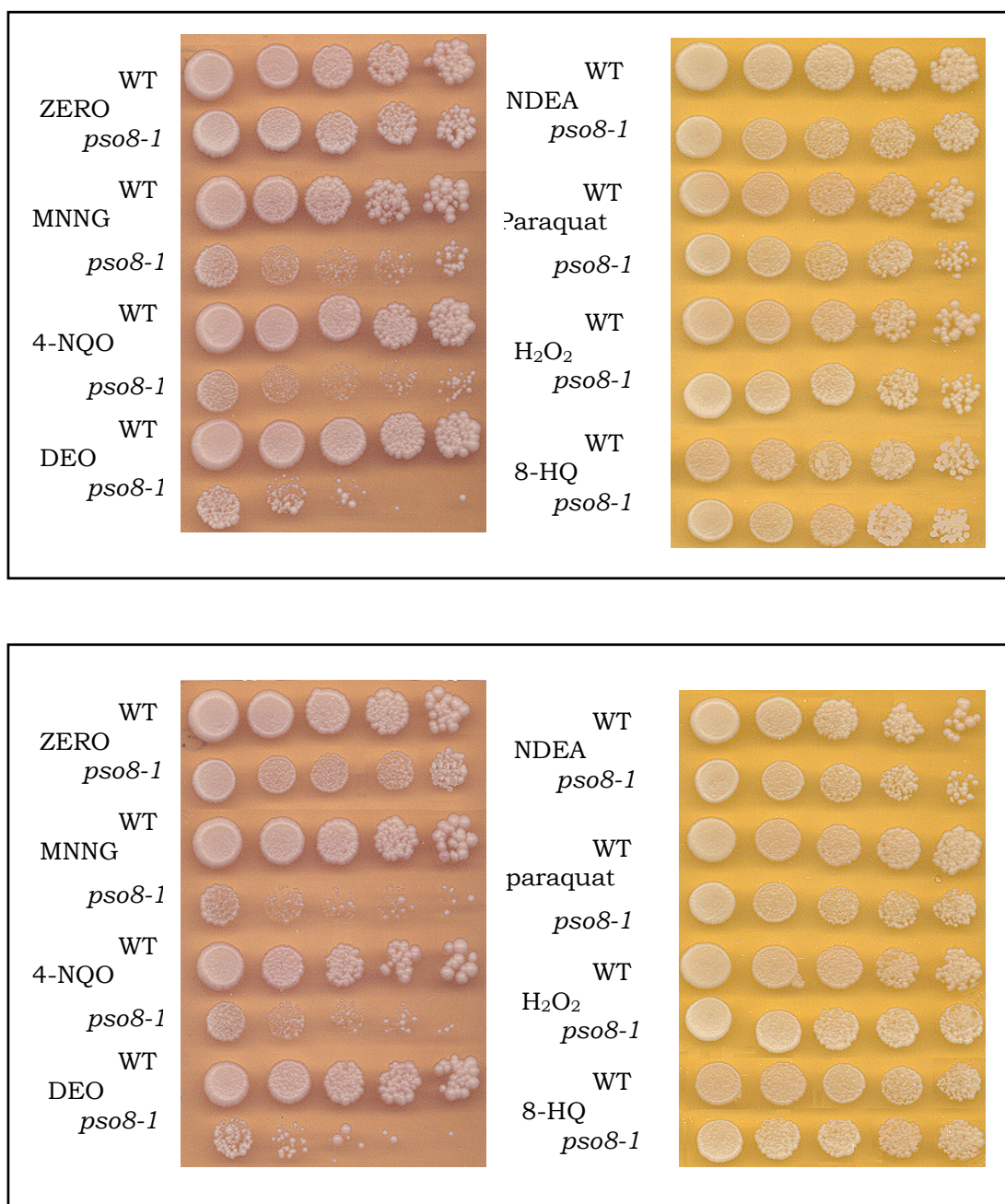


Figura 8: Teste em gotas. Diluições seriadas (1:10) partindo de uma suspensão celular de 1×10^7 céls.ml⁻¹ tratadas com MNNG (0,2mM), 4-NQO (0,5 μ M), DEO (15mM), NDEA (0,4mM), paraquat (10mM), H_2O_2 (5Mm) e 8-HQ (40mM) em fase exponencial (painel superior) e estacionária de crescimento (painel inferior).

Quanto à sensibilidade para os agentes indutores de estresse oxidativo H_2O_2 e Paraquat (Maris *et al.* 2000; 2001), as células do mutante *pso8-1* demonstraram resistência à ação desses agentes semelhante à linhagem selvagem. O mesmo resultado foi observado após tratamento com o agente 8-HQ, o qual é um derivado quinolínico como o 4-NQO e o agente alquilante monofuncional NDEA, o qual é também gerador de estresse oxidativo (Goto *et al.* 1999).

3.2.2 Resposta mutagênica da mutação *pso8-1* para diferentes agentes genotóxicos

A resposta mutagênica das células do mutante *pso8-1* foi verificada pela análise da indução de mutação reversa para o locus *his1* e para frente (*forward*) para o locus *can1* em comparação à resposta da linhagem selvagem. Os agentes mutagênicos utilizados foram os mesmos que para as curvas de sobrevivência. Todos os tratamentos foram realizados quando as células encontravam-se em fase estacionária de crescimento.

3.2.2.1 Indução de mutação reversa

O alelo *his1* analisado neste estudo, embora não caracterizado, parece ser do tipo "sem sentido" (Snow 1978).

A comparação entre as figuras 9A e 9B demonstra que, em doses equivalentes de UVA o número de revertentes *HIS* da linhagem selvagem é muito maior após a fotoadição de 8-MOP do que a de 3-CPs. Estes resultados confirmam que a furocumarina bifuncional 8-MOP é mais efetiva do que a monofuncional 3-CPs na indução de mutações reversas,

como já descrito por Cassier *et al.* (1980), Moustacchi *et al.* (1983) e por Henriques e Brendel (1990).

O mutante *ps08-1* apresenta uma frequência reduzida de revertentes *HIS* quando comparada à da linhagem selvagem, após tratamento com UVC (Figura 9C), 3-CPs+UVA (Figura 9A) e 8-MOP+UVA (Figura 9B), tanto em função da dose como da sobrevivência.

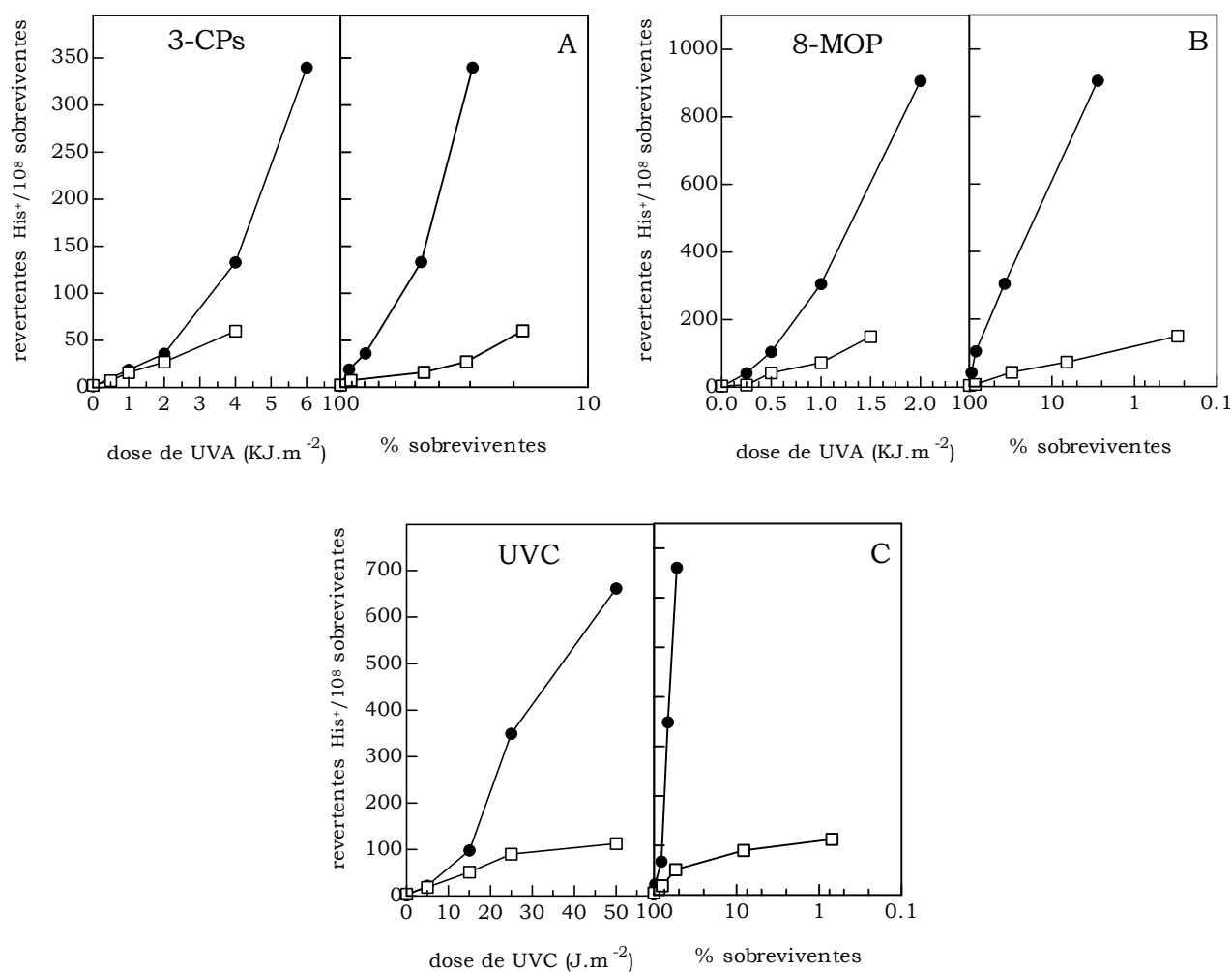


Figura 9: Indução de revertentes *HIS* na linhagem selvagem *PSO8* (●) e no mutante *ps08-1* (□) após tratamento com 3-CPs (A), 8-MOP (B) fotoativados (UVA) e UVC (C) em função da dose e da sobrevivência.

3.2.2.2 Indução de mutação para frente (*forward mutation*)

A análise da indução de mutações para frente foi realizada pela obtenção de um fenótipo de resistência à canavanina.

A canavanina é um análogo à arginina. Seu transporte para dentro das células de leveduras é realizado pela permease da arginina, a qual é codificada pelo gene *CAN1*. Uma vez dentro das células, a canavanina irá incorporar-se as proteínas, resultando em defeitos estruturais. Assim, quando este gene é mutado, codifica uma enzima inativa, e este alelo defectivo irá conferir resistência à canavanina, já que esta não será captada pelas células (Hampsey 1997).

A furocumarina 8-MOP para dose de 1,0 KJ·m⁻² de UVA, foi capaz de, na linhagem selvagem, induzir um número de mutantes *can1* 15 vezes maior do que aquele obtido pela furocumarina monofuncional 3-CPs, confirmando mais uma vez que a furocumarina bifuncional 8-MOP é mais efetiva do que a monofuncional 3-CPs também na indução de mutações para frente (Cassier *et al.* 1980; Moustacchi *et al.* 1983; Henriques e Brendel 1990) (figuras 10A e B).

A figura 10A mostra que, para o tratamento com 3-CPs+UVA, o mutante *pso8-1* apresenta uma indução de mutação para frente similar àquela apresentada pela linhagem selvagem. Entretanto, em função da sobrevivência, a indução de mutações para frente apresenta-se reduzida (Figura 10A).

O tratamento das células do mutante *pso8-1* com 8-MOP para doses muito pequenas leva a um aumento no número de mutações reversas *can1* semelhante à selvagem. Esta indução, quando expressa em função da sobrevivência, apresenta uma nítida redução na indução de mutantes *can1* (Figura 10B).

Após tratamento com UVC a resposta da linhagem *pso8-1* à indução de mutações para frente parece ser dose-dependente. Na figura 10C pode-se perceber que, até a dose de UVC correspondente a 15 J·m⁻², o mutante

psø8-1 possui uma cinética de indução de mutantes *can1* semelhante à da linhagem selvagem. No entanto, em doses mais elevadas, este efeito é abolido, e a indução apresenta-se reduzida. Porém, em função da sobrevivência, o mutante apresenta-se claramente reduzido na indução de mutações para frente.

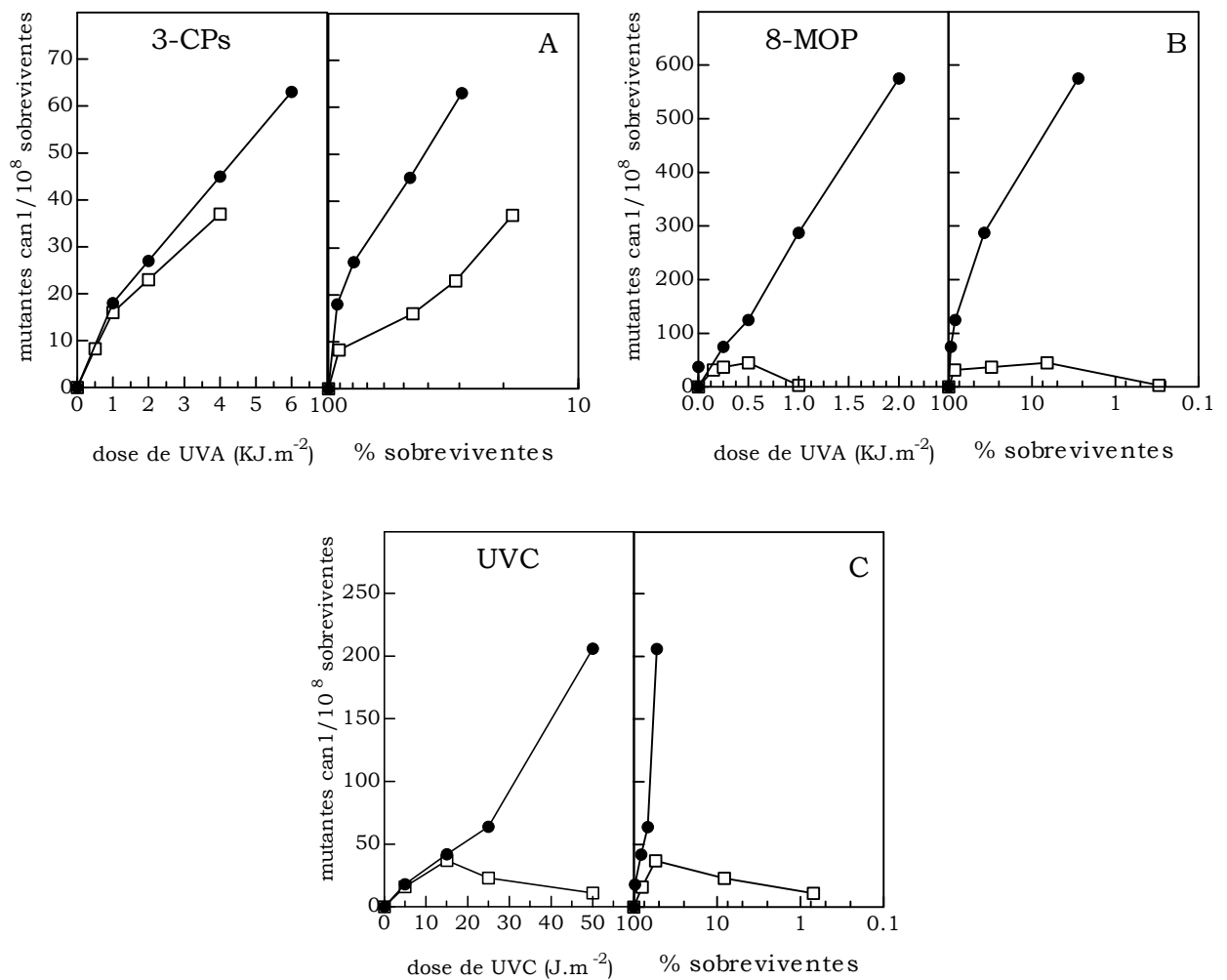


Figura 10: Indução de mutantes *can1*^R na linhagem selvagem *PSO8* (●) e no mutante *psø8-1* (□) após tratamento com 3-CPs (A), 8-MOP (B) fotoativados (UVA) e UVC (C) em função da dose e da sobrevivência.

3.3 CLONAGEM DO GENE *PSO8*

A estratégia de clonagem do gene *PSO8* foi realizada pela complementação fenotípica do mutante *pso8-1* à sensibilidade ao agente UVC. A linhagem mutante haplóide HR1259-1c foi transformada com o plasmídeo centromérico YCp50, contendo o banco genômico de *Saccharomyces cerevisiae* (Rose *et al.* 1987), utilizando o protocolo de acetato de lítio estabelecido por Gietz *et al.* (1992). Este método baseia-se na alteração da permeabilidade da membrana pelos cátions Li^{+2} e requer incubação celular com acetato de lítio por cerca de 2 horas. Empregando este protocolo, foi possível obter mais de 15.000 transformantes em uma única transformação com o banco genômico de levedura, na linhagem mutante.

Após a análise de aproximadamente 6.700 transformantes para crescimento após exposição à radiação UVC, obteve-se 1 transformante resistente, o 41(24). Submetido à perda plasmidial, este transformante demonstrou subsequente perda do fenótipo de resistência, mostrando-se clone positivo, indicando que o plasmídeo continha um fragmento de banco genômico que conferia resistência a radiação UVC. O plasmídeo contendo o inserto de banco genômico foi extraído do transformante 41(24) e amplificado em bactéria, sendo denominado pHR01. A seguir foi retransformado em uma outra linhagem *pso8-1* (HR1259-1d), bem como em sua selvagem isogênica (HR1259-1a). O pHR01 foi capaz de restaurar a sobrevivência da linhagem mutante semelhante à da linhagem selvagem após os tratamentos com radiação UVC, 3-CPs+UVA e 8-MOP+UVA (figura 11).

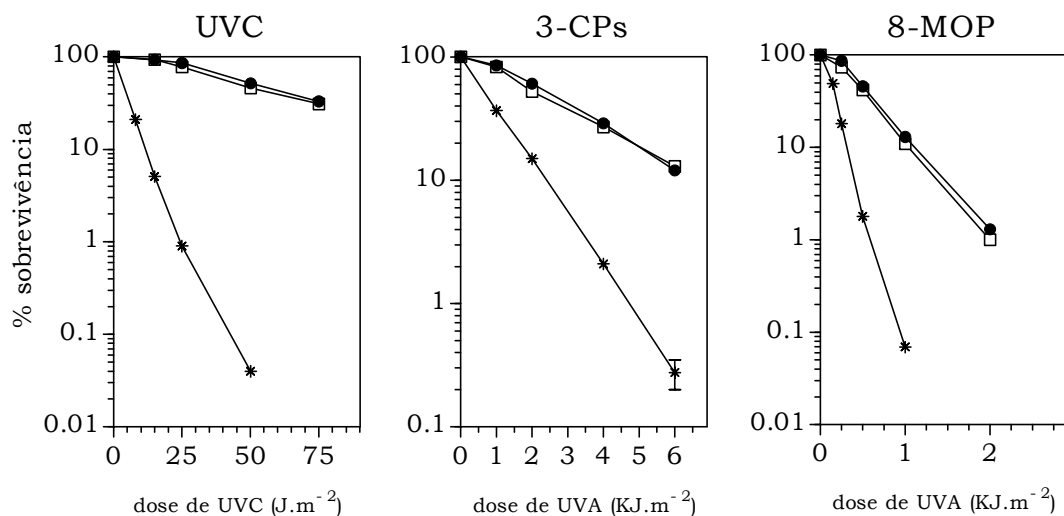


Figura 11: Sobrevivência após tratamento com UVC, 3-CPs+UVA e 8-MOP+UVA da linhagem haplóide *pso8-1* HR1259-1d contendo o plasmídeo pHR01 (□) e sem o plasmídeo pHR01 (*) em comparação à linhagem *PSO8* HR1259-1a com plasmídeo YCp50(●).

3.3.1 Mapeamento do inserto

Com o uso de enzimas de restrição, a análise molecular demonstrou que o plasmídeo pHR01 isolado do transformante 41(24) continha um passageiro de aproximadamente 15 kb no sítio *Bam*HI/*Sau*3A do plasmídeo original YCp50. Após o seqüenciamento de 700 pares de bases desta região e a partir de sua leitura, procedeu-se à busca de identidade da seqüência no banco de dados internacional do genoma de *Saccharomyces cerevisiae*.

O fragmento de DNA seqüenciado e contido no plasmídeo pHR01 apresentou uma identidade 687/705 (97%) com uma seqüência de bases contida no braço esquerdo do cromossomo VII de levedura. A fim de

determinar o exato segmento de DNA do passageiro que continha o gene *PSO8*, o pHR01 foi subclonado. O tamanho do passageiro foi reduzido pela deleção de um fragmento interno de 7 kb localizado entre os sítios *SaII* presentes no interior do fragmento e na região do plasmídeo hospedeiro, com posterior religação do vetor, resultando o pMG861. Este plasmídeo foi capaz de restaurar a sobrevivência do mutante semelhante a da linhagem selvagem após tratamento com radiação UVC. O pMG861 continha um sub-fragmento com 4 ORFs com funções ainda desconhecidas e o gene *RAD6* (figura 12A), considerado o mais provável candidato a complementação do fenótipo de sensibilidade do mutante *pso8-1*.

Paralelamente à subclonagem, foi realizado um teste de complementação entre as linhagens y202 *rad6Δ* e HR1259-1c *pso8-1*.

O cruzamento entre *rad6Δ* com o mutante *pso8-1* produziu uma diplóide altamente sensível a UVC, um fenótipo típico para um mutante *rad6* homozigótico (figura 13). O fenótipo de sensibilidade das células diplóides foi completamente restaurado, semelhante ao da linhagem selvagem, pela transformação com o pMG861 (figura 12B), assim como o da linhagem haplóide mutante HR1259-1c, após o tratamento UVC. Conseqüentemente *PSO8-1* é alelo a *RAD6*.

A seqüência nucleotídica do gene *RAD6* contém uma ORF de 516 pares de bases que codificam 172 aminoácidos. Os primeiros 149 resíduos de aminoácidos compreendem uma proteína tipicamente globular, enquanto que os 23 resíduos C-terminal formam uma cauda ácida livremente estendida (Jentsch *et al.* 1987).

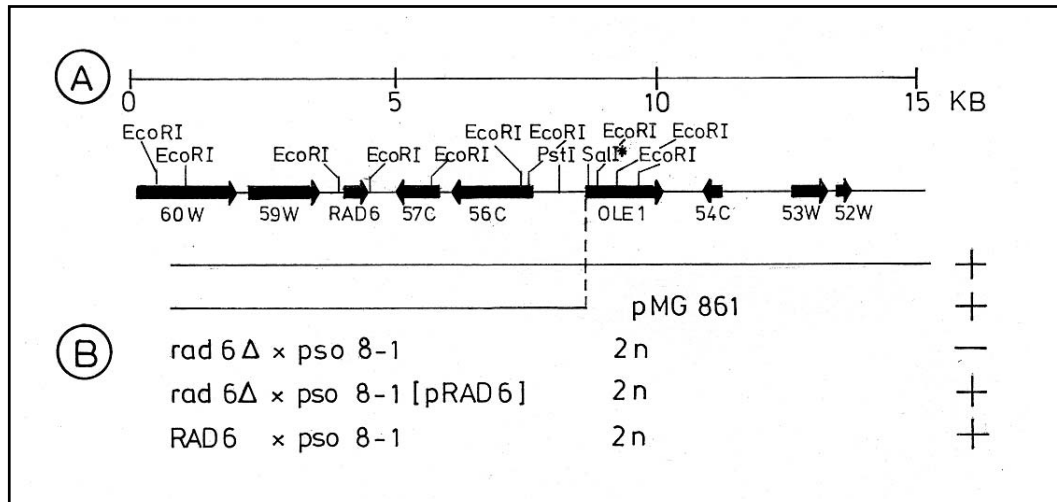


Figura 12: A - Subclonagem e mapa de restrição parcial do fragmento genômico selecionado por complementação da mutação *ps08-1*. B - não complementação da sensibilidade à radiação UVC conferida pelo alelo *ps08-1* em diplóides heteroalélicas *RAD6 ps08-1*, *rad6Δ ps08-1*; +, resistência à UVC semelhante a WT; -, Sensibilidade à UVC semelhante *rad6*.

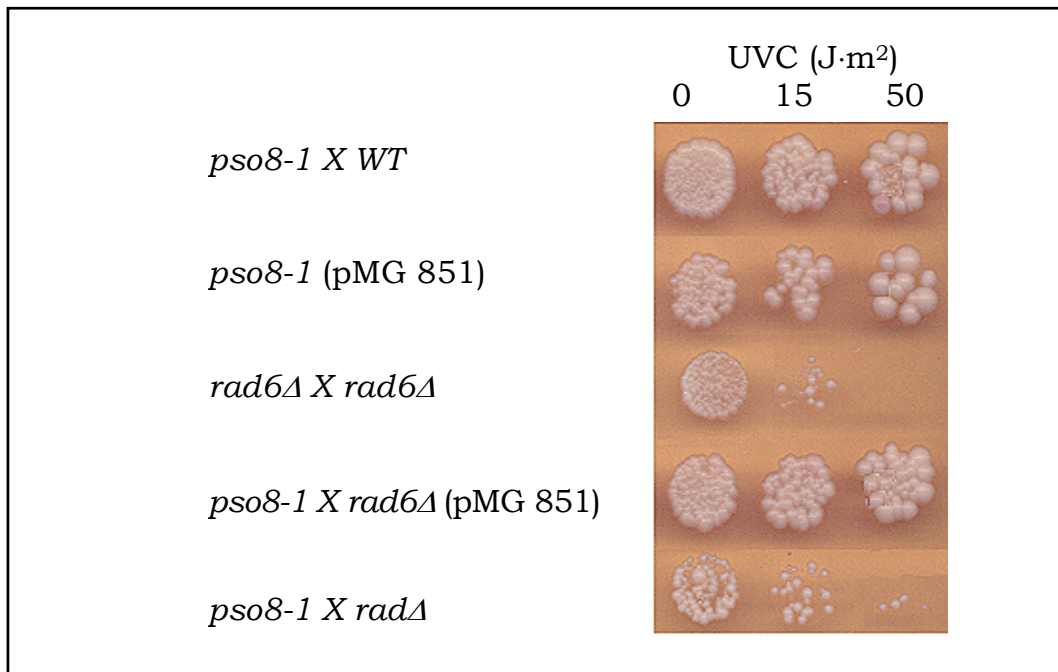


Figura 13: Teste em gotas. Suspensões celulares (1×10^7 céls. ml^{-1}) foram tratadas com radiação UVC nas doses 0, 15J, 50J, em fase estacionária de crescimento.

3.3.2 Seqüenciamento da mutação *pso8-1*

Com o objetivo de aprofundar o estudo genético e molecular da mutação *pso8-1*, pareceu interessante identificar o tipo de mutação e sua localização na seqüência de bases que codifica o gene *PSO8/RAD6*.

A seqüência de DNA de ambas as fitas foi determinada pelo seqüenciamento da ORF completa do alelo mutante do gene *RAD6*. A região seqüenciada foi amplificada por PCR diretamente do DNA genômico total, extraído das células da linhagem mutante original 56(16) e da linhagem HR1259-1c. Análises das três seqüências produzidas independentemente no PCR revelaram que o alelo mutante *pso8-1* contém uma transição do nucleotídeo C→T na posição 191, que resulta na troca de uma prolina por uma leucina, produzindo uma proteína Rad6 alterada na posição 64aa, uma mutação *missense* Rad6-P64L (figura 14).

<i>RAD6</i>	1	MSTPARRRLM	RDFKRMKEDA	PPGVSASPLP	DNVMVWNAMI	IGPADTPYED	GTFRLLLEFD
<i>Pso8-1</i>	1	MSTPARRRLM	RDFKRMKEDA	PPGVSASPLP	DNVMVWNAMI	IGPADTPYED	GTFRLLLEFD
<i>RAD6</i>	61	EEY	P	NKPPHV	KFLSEMFHPN	VYANGEICLD	ILQNRWTPTY DVASILTSIQ SLFNDPNPAS
<i>Pso8-1</i>	61	EEY	L	NKPPHV	KFLSEMFHPN	VYANGEICLD	ILQNRWTPTY DVASILTSIQ SLFNDPNPAS
<i>RAD6</i>	121	PANVEAATLF	KDHKSQYVKR	VKETVEKSWE	DDMDDMDDDD	DDDDDDDDDE	AD
<i>Pso8-1</i>	121	PANVEAATLF	KDHKSQYVKR	VKETVEKSWE	DDMDDMDDDD	DDDDDDDDDE	AD

Figura 14: Seqüência dos 172aa amplificada por PCR da ORF *RAD6* diretamente do DNA genômico total do mutante *pso8-1* e da linhagem selvagem.

DISCUSSÃO

A fotoquimioterapia empregando psoralenos+UVA (PUVA terapia) é largamente utilizada para tratar desordens dermatológicas desde dermatites atípicas a 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 pirimidínicas do DNA produzindo monoadutos-timinas e *interstrand crosslinks* (ICLs) entre as timinas de fitas opostas, da cadeia de DNA (Dronkert e Kanaar 2001; Greenberg *et al.* 2001). Comparados a monoadutos, ICLs são mais tóxicos, mutagênicos e recombinogênicos (para revisão 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 sua inibição na separação das fitas de DNA e, portanto, na replicação e segregação do DNA (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 uma maneira dose-dependente (Greenberg *et al.* 2001; Dronkert e Kanaar 2001).

Um dos principais avanços na tentativa de esclarecer os mecanismos de reparação do DNA originou-se do isolamento e

caracterização de linhagens sensíveis a agentes mutagênicos (mutantes). Em muitos casos, estas linhagens são defectivas em etapas específicas dos mecanismos que controlam a manutenção e integridade do DNA (material genético). Baseados neste procedimento, Henriques e Moustacchi (1980) trataram uma população selvagem da levedura *Saccharomyces cerevisiae* com etilmetanosulfonato, e o critério de seleção das colônias sobreviventes foi a maior sensibilidade a fotoadição de psoralenos.

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 compreender as conseqüências fotoquímicas, biológicas e genéticas do tratamento PUVA em células vivas.

Inicialmente, três mutantes *ps01*, *ps02* e *ps03*, cada um definindo um *locus* distinto, foram caracterizados detalhadamente. Desde então, mais alelos mutantes *ps0* foram clonados e caracterizados fenotípica e genotipicamente. Atualmente dez genes *ps0* estão caracterizados (tabela 2, introdução). Estes genes não codificam um grupo de proteínas com funções similares. Enquanto a maioria apresenta um papel na reparação de lesões induzidas por psoralenos fotoativados e outros mutágenos (Henriques *et al.* 1997; Brendel e Henriques 2001), pelo menos dois (*ps06-1* e *ps07-1*) dos dez mutantes *ps0* não são deficientes em reparação de DNA. Todavia seus fenótipos de sensibilidade originam-se de deficiências fisiológicas, que influenciam a genotoxicidade à psoralenos, em vez de sua capacidade de reparação. Os genes *ps06-1* e *ps07-1* são responsáveis por elementos estruturais da membrana e pela funcionalidade da cadeia respiratória, respectivamente.

Dando continuidade à análise dos mutantes isolados por Henriques e Moustacchi (1980) um novo mutante *ps0* denominado *ps08-1* foi caracterizado fenotípica e genotipicamente.

A análise meiótica do cruzamento entre o mutante *ps08-1* e a linhagem selvagem, deixou claro que a sensibilidade do mutante *ps08-1*

segrega como um fator mendeliano. A mutação *pso8-1* é recessiva e complementa todos os gene *pso* até então descritos.

O mutante *pso8-1* foi fenotipicamente caracterizado como sensível à fotoadição das furocumarinas mono (3-CPs) e bi (8-MOP) funcionais, bem como à radiação UVC, aos tratamentos com os agentes alquilantes MNNG e DEO e ao agente UV-mimético 4-NQO (figuras 7 e 8).

Quando foi examinada a resposta de sobrevivência das células haplóides *pso8-1*, tratadas com furocumarinas mono e bifuncionais mais UVA, MNNG, 4-NQO e DEO, observou-se a perda do componente de resistência característico para as células em fase logarítmica de crescimento (Henriques *et al.* 1977; Henriques e Moustacchi 1980; Henriques e Brendel 1990). Deve-se, no entanto, destacar a manutenção parcial deste componente logarítmico de resistência nas células *pso8-1* haplóides tratadas com UVC. A maior resistência das células diplóides em relação às haplóides, bem como das células no fim da fase S e G2 em relação às células G1 estão correlacionadas à presença do genoma duplicado que favorece a ação de processos recombinacionais, responsáveis pela reparação de uma fração adicional dos danos induzidos no DNA destas células (Henriques *et al.* 1977; Moustacchi *et al.* 1987; Henriques e Brendel 1990). Entretanto o mutante *pso8-1* não foi sensível aos agentes indutores de estresse oxidativo H₂O₂ e Paraquat, demonstrando uma resistência à ação desses agentes semelhante à linhagem selvagem (figura 8).

Sabe-se que a fotoadição da furocumarina monofuncional 3-CPs pode causar lesões através da formação de monoadições na cadeia de DNA ou pela fotooxidação de resíduos de guaninas devido à geração de oxigênio singlete (Sage *et al.* 1989; Averbeck *et al.* 1992). Conforme citado anteriormente, a caracterização fenotípica dos mutantes *pso5-1*, *pso6-1* e *pso7-1* demonstrou que estes mutantes são sensíveis principalmente à fotoadição de 3-CPs, e que esses três genes estão comprovadamente envolvidos em eventos de estresse oxidativo (Henriques *et al.* 1997; Pungartnik *et al.* 1999; Schmidt *et al.* 1999). Portanto, diferentemente do observado para os genes *PSO5-PSO7*, o gene *PSO8* não deve estar

envolvido na reparação de danos causados por agentes indutores de estresse oxidativo. A sensibilidade do mutante *ps08-1* à furocumarina monofuncional 3-CPs+UVA deve ser consequência da formação de monoadições nas cadeias de DNA, e não devido à geração de oxigênio singlete.

Em duplos mutantes *ps08-1 rad4-4*, os alelos interagem sinergisticamente para a sensibilidade a radiação UVC, assim a interação não-epistática com um alelo do NER (*rad4*) permitiu a alocação do mutante *ps08-1* no grupo de epistasia RAD6 de genes de reparação. Mutantes de reparação pós-replicativa/translesão geralmente são sinérgicos com ambas as vias de reparação, NER (grupo RAD3) e por recombinação (grupo RAD52) (Dronkert e Kanaar 2001). Os resultados dos estudos de mutagênese, após tratamento com radiação UVC, e a fotoadição de 3-CPs e 8-MOP reforçam a participação deste mutante nesta via de reparação. O mutante *ps08-1* quando tratado com estes agentes apresenta reduzida indução de mutações tanto reversa para o *locus his1*→HIS quanto para frente CAN1→can1^r em relação à linhagem selvagem (figuras 9 e 10). Além disto *ps08-1* mostrou um fenótipo mutador espontâneo, típico de mutantes *rad6* (Hastings *et al.* 1976) e de alguns membros da via RAD6 (para revisão ver Prakash 1974; Prakash e Prakash 1980; Nickoloff e Hoekstra 1998).

Confirmando estes resultados, a clonagem molecular do plasmídio contendo um fragmento de DNA de levedura, subsequente seqüenciamento do mutante alelo, e complementação genética, mostraram que o mutante *ps08-1* é alelo do gene *RAD6*.

O passageiro de 15 kB de banco genômico contido em um plasmídio simples cópia (YCp50) complementou perfeitamente a sensibilidade do mutante *ps08-1* à radiação UVC e ao tratamento com 3-CPs+UVA e 8-MOP+UVA (figura 11). O seqüenciamento de 700bp deste passageiro de DNA revelou que este fragmento originado do braço direito do cromossomo VII continha, entre muitas ORFs com funções desconhecidas, o conhecido gene de reparação de DNA *RAD6* (figura 12). A deleção de cerca de 7 kB

deste fragmento de banco genômico, restando a presença do gene *RAD6* no vetor simples cópia (figura 12), não alterou a habilidade do pequeno plasmídeo de complementar inteiramente o fenótipo de sensibilidade a UVC de mutantes *ps08-1*, bem como complementar a sensibilidade à radiação UVC de uma diplóide resultante do cruzamento genético entre *ps08-1* e *rad6Δ* (figura 13). A não complementação de diplóides heteroalélicas derivadas do cruzamento entre *ps08-1* e *rad6Δ* mostraram inequivocamente que ambos os mutantes contêm alelos em um mesmo *locus*.

O gene *RAD6* codifica uma proteína pequena (19,7kDa) que contém um domínio globular altamente conservado de 149 aminoácidos e uma cauda poliácídica na extremidade carboxiterminal composta por 13 resíduos de ácido aspártico (Reynolds *et al.* 1985; Morrison *et al.* 1988). A porção média contém um único resíduo de Cisteína (Cys-88) responsável pela anexação da ubiquitina à pRad6 por uma ligação tio-éster (Sung *et al.* 1994; Bailly *et al.* 1994; Brusky *et al.* 2000). A proteína Rad6 participa do sistema ligase-ubiquitina (Jentsch *et al.* 1987), e é uma das 12 enzimas do tipo E2 que catalisam a transferência de ubiquitinas de uma enzima do tipo E1 para moléculas-alvo, geralmente na forma de cadeia multiubiquitinada de ligações isopeptídicas (Jentsch 1992). Estas modificações direcionam proteínas para degradação pelo proteossomo 26s (Kaplun *et al.* 2000).

O isolamento de um novo mutante pela seleção para a sensibilidade à fotoadição de psoralenos não é surpreendente, uma vez que mutantes *rad6* sensíveis a radiação UVC apresentam sensibilidade cruzada a praticamente todas radiações e tratamentos químicos que danificam o DNA (Swietlinska *et al.* 1976; Cassier *et al.* 1980; Prakash *et al.* 1993) e, paralelamente, também exibem baixa mutabilidade induzida por mutágenos (Siede 1988; Lawrence 1994). Somente com 6N-hydroxiaminopurina, um análogo de bases que atua como um mutágeno direto, os mutantes *rad6* apresentam a mutabilidade semelhante a linhagem selvagem (Cassier *et al.* 1980; Shcherbakova *et al.*

1996). Por outro lado, a mutação espontânea é aumentada em mutantes *rad6*, como é a recombinação espontânea e recombinação dano-induzida (Nickoloff e Hoekstra 1998). Em particular, a taxa de mutação espontânea devido a retrotransposição de elementos transponíveis *Ty* é significativamente alta no patrimônio genético de mutantes *rad6* (Picologlous *et al.* 1990; Sung *et al.* 1993).

O seqüenciamento do mutante alelo *pso8-1* revelou que este contém uma mutação *missense* C→T ainda não descrita, que resulta em uma proteína Rad6 alterada na posição 64aa (*rad6*-[P64L]), deixando o resto da proteína inalterada. Entre os mutantes de reparação de DNA, *rad6* apresenta um fenótipo altamente pleitrópico (Siede 1988) e a proteína pRad6 tem várias funções biológicas que abrangem desde a conjugação de ubiquitina, reparação de DNA, mutagênese, silenciamento de telomero e esporulação.

Entretanto, as funções da proteína Rad6 em reparação e mutagênese induzida podem ser dissociadas: supressores de certas mutações de ponto de *RAD6* foram caracterizados por eliminarem a sensibilidade à radiação UVC, mas não apresentavam nenhum efeito sobre mutagênese (Nickoloff e Hoekstra 1998).

A simples troca de aminoácidos em *pso8-1* resultou no fenótipo de sensibilidade a mutágenos, baixa indução de mutabilidade e de crescimento lento das células em ambos estágios haplóide e diplóide, seu tempo de geração é duas vezes maior que o das células selvagens. O pequeno tamanho das colônias sobre as placas e um aumento em 30% no tempo de crescimento em meio líquido observado em mutantes *pso8-1* caracteriza defeitos em mitose. Da mesma forma um leve aumento no tamanho dos brotos sugere um atraso na fase S ou G2/M do ciclo celular (Robzyk *et al.* 2000). Entretanto a esporulação de diplóides heteroalélicas *pso8-1* ocorreu com eficiência quase semelhante à linhagem selvagem (tabela 7). Isto mostra que a proteína mutada Rad6-[P64L] codificada por *pso8-1* ainda tem alguma atividade biológica. A esporulação requer a funcionalidade de dois domínios de pRad6: primeiramente, um

carboxiterminal intacto, isto é, uma cauda constituída de 23 resíduos de aminoácidos ácidos (Morrison *et al.* 1988) e secundariamente, a atividade de conjugação de ubiquitina, que de fato é um pré-requisito para todas as funções biológicas de pRad6. Este último depende da presença de um único resíduo de cisteína na posição 88 (Sung *et al.* 1990; Bailly *et al.* 1997; Robzyk *et al.* 2000; Freiberg *et al.* 2000; Brusky *et al.* 2000).

Todas as funções de pRad6 são suprimidas em mutantes *rad6Δ* e *rad6*-[C88A], -[C88V] (Sung *et al.* 1990), e -[C88S] (Huang *et al.* 1997) enquanto outras pRad6, contendo mutações simples e duplas envolvendo troca de aminoácidos não intimamente ligados ao resíduo de cisteína 88, podem, entretanto, ter algumas das atividades biológicas inerentes na linhagem pRad6 selvagem.

Robzyk *et al.* (2000) demonstraram que a anexação da ubiquitina às histonas H2B depende primariamente da atividade de pRad6/pUbc2 e que a ubiquitinação de H2B é requerida para um crescimento celular mitótico ótimo e para meiose. As linhagens que continham formas de histonas H2A e H2B mutadas no sítio acceptor à conjugação de ubiquitina foram viáveis, mas apresentaram um pronunciado defeito mitótico e meiótico. O defeito em meiose resultou em uma falha de mutantes diplóides homozigóticas para formar esporos. Foi observado que estes mutantes diplóides apresentavam uma única massa de DNA, indicando que nenhuma divisão meiótica ocorreu e que o programa meiótico foi bloqueado em um estágio anterior. As células param de esporular em um passo subsequente à síntese de DNA pré-meiótica mas anterior a recombinação meiótica (Prakash *et al.* 1993).

Entretanto a ubiquitinação de histonas por pRad6 não pode ser a base para o fenótipo de reparação de DNA de mutantes *rad6*. A deleção da cauda ácida suprimiu a ubiquitinização de histonas *in vitro*, mas esta alteração somente resulta em defeitos de esporulação (Sung *et al.* 1988). De fato, genes HHR6A e HHR6B homólogos a pRad6 altamente conservados em humanos e *Drosophila*, que perdem o terminal ácido, complementam o defeito da deleção do mutante *rad6* em reparação e

mutagênese, mas somente complementam fracamente o defeito da esporulação (Nickoloff e Hoekstra 1998).

Dois interatores de pRad6, pUbr1 e pRad18 são conhecidos por ligar pRad6 a proteínas alvo distintas. Ubr1, uma proteína ubiquitina ligase E3, liga pRad6 a proteínas alvos que possuem seqüências amino-terminais desestabilizados, tornando-as extraordinariamente vulneráveis para degradação (Dohmen *et al.* 1991; Sung *et al.* 1991; Varshavsky 1997). Rad18, uma proteína de ligação de DNA fita simples (DNAss), forma um heterodímero com pRad6, presumidamente facilitando a participação de pRad6 na reparação de DNA (Bailly *et al.* 1994; 1997). pRad6 é incapaz de ligar-se ao DNA na ausência de pRad18 (Bailly *et al.* 1994), não contém um motivo de ligação ao DNA. O complexo Rad6-Rad18 tem atividade de conjugação de ubiquitina assim como de ligação a DNAss e atividade ATPase dependente de DNAss. O complexo Rad6-Rad18 representa o primeiro exemplo onde uma enzima conjugada a ubiquitina é fisicamente associada a uma proteína de ligação-DNA (Bailly *et al.* 1997).

A pRad6 não se liga a pRad18 e pUbr1 em um mesmo complexo e a porção da molécula de pRad6 que interage com pRad18 e pUbr1 não se sobrepõe (Bailly *et al.* 1994). As regiões de ligação-pRad18 e pUbr1 estão localizadas sobre o mesmo lado da estrutura de pRad6, que é o lado oposto do sítio ativo E2 (cisteína-88) (Worthylake *et al.* 1998).

Estas observações suportam a idéia de que proteínas companheiras contribuem para separar substratos específicos de pRad6 e sugerem a possibilidade de que pRad6 pode interagir com outras proteínas companheiras (Freiberg *et al.* 2000).

A ubiquitinação de proteínas alvos não-histonadas mediada por E3 também aparentemente não é essencial para a função de pRad6 em reparação e mutagênese. Deleção de N-terminal altamente conservado de pRad6 suprime a interação com pUbr1, e assim a degradação de proteínas dependente da via da regra N-terminal *in vivo*. O mutante é defectivo em esporulação mas somente moderadamente sensível à radiação UVC e

normal com respeito à indução de mutagenese (Nickoloff e Hoekstra 1998).

O importante indício do papel de pRad6 mediando a ubiquitinação em reparação e mutagenese pode ser sua associação com pRad18.

O complexo Rad6-Rad18 pode associar-se com componentes da maquinaria de replicação; seguida a parada do complexo de replicação no sítio da lesão do DNA, a ubiquitinação de proteínas do complexo de replicação dependente de Rad6-Rad18, pode ser indispensável para modular a união de proteínas da síntese translesão à maquinaria de replicação (Prakash *et al.* 2000).

A sensibilidade a mutágenos e a baixa mutabilidade induzida conferida pelo mutante alelo *ps08-1* sugere uma modificação na estrutura terciária da proteína Rad6-[P64L], que poderia não permitir a formação do heterodímero com pRad18 de ligação a DNA, um pré-requisito para a reparação de DNA pós-replicativo sujeito a erro (Prakash 1981; 1989). Modificações na seqüência de aminoácidos críticos nos resíduos 10-22 N-terminal ou resíduos 141-149 carboxiterminal, respectivamente, são conhecidos por proibir interações com pRad18 (Bailly *et al.* 1997) mas estas trocas não ocorreram em pRad6 codificado por *ps08-1*.

Quando comparamos as trocas moleculares nas mutações induzidas por mutágenos em alelos *rad6* caracterizados até agora, é interessante salientar a alta incidência de substituições do aminoácido P→L na proteína. Estas trocas foram encontradas em diferentes localizações dentro da pRad6 (Freiberg *et al.* 2000), e sempre originam-se de uma transição C→T. Embora a substituição de uma prolina por uma leucina sempre leve a uma modificação conformacional nas pRad6 mutantes, sabe-se que somente mutações em dois sítios, Rad6-[P64L] e Rad6-[P98L] (Freiberg *et al.* 2000) interferem negativamente na reparação pós-replicativa, como observado pelo fenótipo de sensibilidade a mutágenos e a baixa mutabilidade induzida. Contudo, com a exceção de Rad6-[P98L] (que apresenta uma mutação próxima ao resíduo crítico de Cisteína 88

necessário para todas as funções de pRad6) todas as outras proteínas contendo mutações *missense* (Rad6-[P4L/A5V], Rad6-[P43L], Rad6-[P64L]), que têm um C88 correto e um carboxiterminal ácido intacto, permitem a esporulação até algum ponto (Freiberg *et al.* 2000).

Enzimas de conjugação de ubiquitina são altamente conservadas em eucariotos. Prolinas na posição 64aa e outros sítios de aa são conservados em todos os genes homólogos à pRad6, não somente dentro das muitas enzimas de conjugação de ubiquitina de *S. cerevisiae*, mas também em ratos e no homem (tabela 9). A troca de um destes resíduos de prolina na posição 64 aparentemente leva à perda de somente algumas das funções de pRad6, como observado nos fenótipos de crescimento lento e em defeitos na reparação do mutante *ps08-1* de leveduras, enquanto resta alguma atividade intacta de conjugação ubiquitina que, junto com cauda polipeptídica carboxi terminal de 23aa semelhante a selvagem, é necessária para a esporulação em diplóides de leveduras.

Tabela 9: Representação da região altamente conservada de enzimas conjugada-ubiquitina de diferentes organismos, incluindo a proteína Pso8-1 alterada.

			↓		*
Sc	ps08-1	(60-101)	DEEYLNKPPHVKFLSEMFHPNVYANGEICLDILQNRWTP	TYD	
Sc	RAD6	(60-101)	DEEYPNKPPHVKFLSEMFHPNVYANGEICLDILQNRWTP	TYD	
Sc	UBC4	(58-99)	PTDYPFKPPKISFTTKIYHPNINANGNICLDILKDQWSP	PALT	
Hs	UBE2B	(60-101)	SEEYPNKPPPTVRFLSKMFHPNVYADGSICLDILQNRWSP	TYD	
Hs	UBE2A	(60-101)	TEEYPNKPPPTVRFVSKMFHPNVYADGSICLDILQNRWSP	TYD	
Hs	UBE2D1	(57-98)	PTDYPFKPPKIAFTTKIYHPNINSNGSICLDILRSQWSP	PALT	
Hs	UBE2D2	(57-98)	PTDYPFKPPKVAFTTRIYHPNINSNGSICLDILRSQWSP	PALT	
Ce	ubc-1	(60-101)	TEEYPNKPPPTVRFVSKMFHPNVYADGSICLDILQNRWSP	TYD	
Ce	ubc-2	(57-98)	PTDYPFKPPKVAFTTRIYHPNINSNGSICLDILRSQWSP	PALT	
Mm	ube2a	(60-101)	TEEYPNKPPPTVRFVSKMFHPNVYADGSICLDILQNRWSP	TYD	
Mm	ube2b	(60-101)	SEEYPNKPPPTVRFLSKMFHPNVYADGSICLDILQNRWSP	TYD	
Sp	ubc2	(1-150)	DEQYPNKPPPLVKFVSTMFHPNVYANGELCLDILQNRWSP	TYD	
Sp	ubc4	(57-98)	PTDYPFKPPKVNFTTRIYHPNINSNGSICLDILRDQWSP	PALT	

Sc, *S. cerevisiae*; Hs, *H. sapiens*; Ce, *C. elegans*; Mm, *M. musculus*; Sp, *S. pombe*.

↓ indica o ponto de troca de prolina na pPso8 mutada, * resíduo de cisteína-88, essencial para a atividade de conjugação de ubiquitina de pRad6; em preto, resíduos de prolina conservados.

Os genes *PSO8/RAD6*, *PSO1/REV3*, *PSO2/SNM1*, *PSO3* e *PSO4/PRP19* atuam em uma via sujeita a erros específica para a reparação de ICL?

A tabela 10 resume o modo de interação observado entre os mutantes *pso* e os mutantes *rad* que representam os três grupos de epistasia de reparação de DNA de leveduras, via de reparação por excisão de nucleotídeos (grupo RAD3), reparação pós-replicativa (grupo RAD6) e reparação por recombinação (grupo RAD52).

Para esta análise, envolvendo os genes *RAD3*, *RAD6* e *RAD52*, pode-se concluir que *PSO2* e *PSO3* pertencem ao grupo de epistasia RAD3, enquanto *PSO1* e *PSO4* pertencem a via RAD6 e RAD52 respectivamente. Dentre os dez genes *PSO* estudados detalhadamente, sete (*PSO1*, *PSO2*, *PSO3*, *PSO4*, *PSO8*, *PSO9* e *PSO10*) são defectivos na indução de mutação reversa e para frente após tratamento com agentes indutores de ICL e monoadutos fotoinduzidos pelo 3-CPs (para revisão: Cassier *et al.* 1980; Cassier e Moustacchi 1981; Henriques *et al.* 1989; Henriques e Brendel 1990; Henriques *et al.* 1997; Brendel e Henriques 2001). Surpreendentemente os mutantes *pso2-1*, *pso3-1* e *pso4-1* interagem epistaticamente um com o outro e com *pso1/rev3* após tratamento com 8-MOP+UVA, entretanto estes três mutantes interagem sinergisticamente com *rad6/pso8*. Sugere-se, a partir desses dados que os genes *PSO1* à *PSO4* controlam uma via de reparação sujeita a erros, específica para lesões de ICL fotoinduzidas por 8-MOP durante a fase estacionária de crescimento, onde a DNA polimerase translesão (Pol ζ) estaria processando os intermediários de reparação gerados pelas proteínas Pso2, Pso3 e Pso4, independente de Rad6 (Henriques *et al.* 1997; Brendel e Henriques 2001). Convém salientar que o fenótipo pleitrópico do mutante *pso4/prp19* quanto ao bloqueio na reparação de DNA, na indução de mutação, recombinação, esporulação e na atividade e splicing no RNA (Henriques *et al.* 1987) pode ser explicado por duas razões: a) a atividade da proteína Pso4/Prp19 tem mais que uma função, e uma delas pode diretamente

afetar a reparação de DNA e recombinação; ou b) o splice não efetivo do pré-mRNAs de um a vários dos 225 conhecidos pré-mRNAs de leveduras contendo introns na temperatura permitida poderia levar a uma fisiologia celular parcialmente defectiva.

Entretanto, os mutantes *rad6/ps08* (figura 7, resultados; Henriques e Moustacchi 1981) e *rad18* (Meniel *et al.* 1995), os quais são envolvidos em etapas iniciais da resposta celular pós-lesão no DNA, são sensíveis a 8-MOP fotoativado. Este fato, associado à relação de epistasia entre o mutante *rad6/ps08* e *rev3* (tabela 10) após tratamento com esse agente, sugere que exista outra via de reparação de ICL, onde pRad6 e pRad18 provavelmente produzam intermediários de reparação que serão processados também por pRev3 via síntese translesão.

Mutantes *rev3* são muito sensíveis a ICL, mas apresentam uma fase-S normal, indicando que a DNA polimerase ζ não é requerida para a cinética normal de replicação (Xiao *et al.* 2000). Ainda apresentam uma parada na fase terminal de G2 do ciclo celular após danos-ICL, confirmando a participação de pRev3 na reparação pós-replicativa de DNA-ICL (Grossmann *et al.* 2001).

Tabela 10: Interação entre mutantes *rad* e *ps0* para a sobrevivência a radiação UVC e a fotoadição de 8-MOP e 3-CPs.

	<i>rad3</i>			<i>rad6</i>			<i>ps01/rev3</i>			<i>rad52</i>		
	8-MOP	3-CPs	UVC	8-MOP	3-CPs	UVC	8-MOP	3-CPs	UVC	8-MOP	3-CPs	UVC
<i>Pso1</i>	S	S	S	S	E	E	E	-	-	E	S	S
<i>Pso2</i>	E	E	E	E	NE	S	E	E	S	NE	NE	Nd
<i>Pso3</i>	E	E	Nd	nd	S	S	E	E	A	NE	E	nd
<i>Pso4</i>	E ^a	NE ^a	E ^a	NE	Nd	E	E	nd	E	E	nd	nd

E, A, S, NE referem-se a epistasia, aditividade, sinergismo e não-epistasia (sensibilidade levemente maior do que a aditividade)

nd, não determinado

Adaptado de Henriques *et al.* 1997

^a Cardone 2000

Estes dados levam à hipótese de que outras DNA polimerases poderiam atuar na reparação de ICL. Entretanto, RAD30, uma polimerase translesão (Pol η), que também pertence à via RAD6, não apresenta um papel importante na reparação de ICL. Em contraste a mutantes *rev3*, os mutantes *rad30* não são significativamente mais sensíveis a 8-MOP fotoativado do que a linhagem selvagem, e a reparação de ICL ocorre sem um *checkpoint* prolongado em G2 (Grossmann *et al.* 2001). Estas observações sugerem que a atividade de síntese translesão tem um papel específico e não substitui ou tem atividade que se sobrepõe na reparação de ICL, reforçando a idéia de que *rev3* possui um papel importante na síntese translesão de danos-ICL (Grossmann *et al.* 2001). É importante salientar que, embora mutantes *psol* a *ps04* mostrem uma interação epistática para mutágenos indutores de ICL, não se tem nenhuma evidência até agora de que as proteínas de reparação Pso1/Rev3 à Pso4/Prp19 podem interagir sozinhas ou em um complexo (entre elas mesmas ou com outras proteínas de reparação) para um possível procedimento seqüencial e remoção destas lesões no DNA de leveduras (Brendel e Henriques 2001).

Recentemente Grossmann *et al.* (2001) mostraram que os mutantes *psol/rev3*, *ps02-1* e *rad51* tratados em fase logarítmica com 8-MOP+UVA não apresentam uma interação epistática. O triplo mutante *rad51 psol(rev3) ps02* apresenta maior sensibilidade que os duplos mutantes, e tolera somente um ICL por genoma a uma dose de 37% de sobrevivência, sugerindo uma completa deficiência para reparação de ICL. Isto indica que não existe uma via adicional e que os genes *RAD51*, *PSO1/REV3* e *PSO2* representam três diferentes vias na reparação de ICL. O fato que mutantes *ps02-1* (via NER), *ps04-1* e *rad51-1* (via recombino gênica) são bloqueados na ligação de DBS induzidas por 8-MOP+UVA, embora sejam hábeis para incisar ICL (Jachymczyk *et al.* 1981; Magaña-Schwencke *et al.* 1982; Morais *et al.* 1996; Henriques *et al.* 1997; Brendel e Henriques 2001), indica que a ligação de quebras pode provavelmente ser processada por mais do que uma e portanto diferentes vias recombinacionais. Inobstante, Meira *et al.*

(1994) mostraram que a mutação em *PSO3*, a qual pertence à via RAD3 (Benfato *et al.* 1992), reduz especificamente a recombinação intracromossomal entre seqüências repetidas, um fenômeno já conhecido para os mutantes *rad1* e *rad10* da via NER (Klein 1988; Saffran *et al.* 1994).

Se a reparação de DBS faz parte da resposta a ICL, é possível que parte dos passos envolvidos na recombinação possam ser utilizados por todas as vias de reparação de ICL. O grande número de mecanismos alternativos existentes para recombinação homóloga ou não-homóloga torna possível que cada via utilize um mecanismo diferente de recombinação (Meniel *et al.* 1995; Grossmann *et al.* 2001).

Embora o exato mecanismo de reparação de ICL ainda não esteja bem compreendido, conforme as informações bioquímicas sobre intermediários de reparação e sobrevivência de mutantes (Henriques *et al.* 1997; Brendel e Henriques 2001), dois cenários de eventos de reparação podem ser propostos: (a) em células em fase estacionária (G1 do ciclo celular), a remoção unilateral de um braço do ICL, pelo NER de genes transcritivamente ativos, pelo BER ou pela instabilidade química, seguida pelo preenchimento da lacuna pela síntese translesão/pós-replicativa (DNA polimerase ζ) e, em uma segunda etapa, a remoção da lesão monofuncional restante via NER (Miller *et al.* 1982); e (b) em células em fase exponenciais, a remoção do ICL, incisado em ambas as fitas de DNA, (após a síntese de DNA) em G2 com subsequente reparação das DBS resultantes, por reparação recombinacional homóloga ou não-homóloga, a última talvez associada com indução de mutações (Holbeck e Strathern 1997).

CONCLUSÕES

A caracterização fenotípica, genotípica e molecular do gene *PSO8* de *Saccharomyces cerevisiae* permite concluir que:

- ✓ a mutação *ps08-1* é recessiva, durante a meiose segrega como genes mendelianos e complementa as mutações *ps0* até então descritas;
- ✓ o mutante *ps08-1* é sensível a fotoadição das furocumarinas mono (3-CPs) e bi (8-MOP) funcionais, apresenta sensibilidade cruzada à exposição a radiação UVC, aos tratamentos com os agentes alquilantes MNNG e DEO e ao agente UV-mimético 4-NQO;
- ✓ a mutação *ps08-1* causa um aumento na taxa de mutações espontâneas, o que lhe confere um fenótipo mutador;
- ✓ a mutação *ps08-1* apresenta uma importante redução na indução de mutações reversa e para frente, em relação à linhagem selvagem;
- ✓ a clonagem do gene *PSO8* através da complementação fenotípica da sensibilidade do mutante *ps08-1* à radiação UVC, revelou que este é alelo ao gene *RAD6*, que pertence à via de reparação pós-replicativa;
- ✓ o seqüenciamento do mutante alelo *ps08-1* revelou que este contém uma mutação *missense*, ainda não descrita, uma transição C→T no

nucleotídeo 191, que leva à substituição de uma prolina por uma leucina na posição 64aa (*rad6*-[P64L]);

- ✓ a mutação *pso8/rad6*-[P64L] resulta em um fenótipo de sensibilidade a mutágenos, baixa indução de mutabilidade e crescimento lento;
- ✓ a mutação *pso8/rad6*-[P64L] permite a esporulação, indicando que a Rad6p-[P64L] apresenta alguma atividade biológica inerente a Rad6p selvagem.

PERSPECTIVAS

O seqüenciamento do mutante alelo *ps08-1* revelou que este contém uma mutação *missense* C→T ainda não descrita, que resulta em uma proteína Rad6 alterada na posição 64aa -Rad6-[P64L]-, deixando o resto da proteína inalterada.

A esporulação de diplóides heteroalélicas *ps08-1* ocorre com eficiência próxima àquela observada para a linhagem selvagem. Inobstante, o mutante *ps08-1* apresenta sensibilidade a vários mutágenos, entretanto para a radiação UVC ele é menos sensível que mutantes *rad6Δ*. Estes resultados sugerem que a proteína mutada Rad6-[P64L] apresenta alguma atividade de reparação. Isto significa que existe ainda uma interação residual com pRad18, resultando em um complexo funcional.

Seria interessante comprovar que pRad6-[P64L] codificada pelo gene *PSO8* mutado apresenta alguma atividade residual inerente na pRad6 selvagem. Para tal, propõe-se a construção de linhagens *rad6Δ* haplóides e diplóides homozigóticas para *rad6Δ*, transformadas com plasmídios de cópias simples e múltiplas, contendo o gene *PSO8* mutado. Assim, a análise da resposta da mutação *ps08-1* no *background* da linhagem *rad6*, frente a diferentes mutagênicos, tanto para a sobrevivência quanto para a indução de mutação (reversa e para frente), possibilitaria verificar a existência ou não desta atividade residual.

Além disso, poder-se-ia analisar, também, se a super expressão da pRad-[P64L] tem algum efeito sobre o fenótipo de crescimento lento e sobre a sobrevivência em baixas temperaturas.

Da mesma forma, seria interessante checar se a mutação *missense* apresentada por Rad6-[P64L] tem alguma influência sobre a função de ubiquitinar às histonas H2A e H2B.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABOUSSEKHRA, A.; CHANET, R.; ZGAGA, Z.; CASSIER-CHAUVAT, C.; HEUDE, M.; FABRE, F. *RADH*, a gene of *Saccharomyces cerevisiae* encoding a putative DNA helicase involved in DNA repair. Characteristics of *radH* mutants and sequence of the gene. **Nucleic Acids Res.**, v. 17, p. 7211-7220, 1989.
- AHNE, F.; JHA, B.; ECKARDT-SCHUPP, F. The *RAD5* gene product is involved in the avoidance of non-homologous end-joining of DNA double strand breaks in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Nucleic Acids Res.**, v. 25, p. 743-749, 1997.
- ALANI, E.; PADMORE, R.; KLECKNER, N. Analysis of wild-type and *rad50* mutants of yeast suggests an intimate relationship between meiotic chromosome synapsis and recombination. **Cell**, v. 61, p. 419-436, 1990.
- ALTSCHUL, S.F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E.W.; LIPMAN, D.J. Basic local alignment search tool. **J. Mol. Biol.**, v. 215, p. 403-410, 1990.
- 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.

- AVERBECK, D.; MOUSTACCHI, E. 8-Methoxypsoralen plus 365nm light effects and repair in yeast. **Biochem. Biophys. Acta**, v. 395, p. 393-404, 1975.
- BAILLY, V.; LAMB, J.; SUNG, P.; PRAKASH, S.; PRAKASH, L. Specific complex formation between yeast *RAD6* and *RAD18* proteins: a potential mechanism for targeting *RAD6* ubiquitin-conjugating activity to DNA damage sites. **Genes Dev.**, v. 8, p. 811-820, 1994.
- 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.
- BANG, D.D.; VERHAGE, R.; GOOSEN, N.; BROUWER, J.; VAN DE PUTE, P. Molecular cloning of *RAD16*, a gene involved in differential repair in *Saccharomyces cerevisiae*. **Nucleic Acids Res.**, v. 2, p. 3925-3931, 1992.
- BANKMANN, M.; BRENDEL, M. Molecular dosimetry of 8-MOP + UVA-induced DNA photoadducts in *Saccharomyces cerevisiae*: correlation of lesion number with genotoxic potential. **J. Photochem. Photobiol.**, v. 4, p. 57-74, 1989.
- BARDWELL, A.J.; BARDWELL, L.; WANG, Z.; SIEDE, W.; REAGAN, M.S.; TOMKINSON, A.E.; FRIEDBERG, A.S.; PITTINGER, C.; FEAVAR, W.J.; SVEISTRUP, J.; KORNBERG, R.D.; FRIEDBERG, E.C. Recent insights on DNA repair: the mechanism of damaged nucleotide excision in eukaryotes and its relationship to other cellular processes. **Annals New York Acad. Sci.** v. 726, p. 281-291, 1994.
- BARDWELL, L.; COOPER, A.J.; FRIEDBERG, E.C. Stable and specific association between the yeast recombination and DNA repair proteins Rad1 and Rad10 *in vitro*. **Mol. Cell Biol.** v. 12, p. 3041-3049, 1992.
- BENATEN, A.; BEAM, C.A. The genetic control of X-ray resistance of budding yeast cells. **Radiat. Res.** v. 69, p. 91-116, 1977.
- BENFATO, M.S.; BRENDEL, M.; HENRIQUES, J.A.P. The DNA repair gene *PSO3* of *Saccharomyces cerevisiae* belongs to the *RAD3* epistasis group. **Curr. Genet.**, v. 21, p. 85-90, 1992.
- 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* Ka80 homologue roles in DNA double strand break rejoining and in telomeric maintenance. **Nucleic. Acids Res.**, v. 24, p. 44639-4648, 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.; 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. Gent.**, 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.
- 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.
- BROOMFIELD, S.; CHOW, B.L.; XIAO, W. MMS2, encoding a ubiquitin-conjugating-enzyme-like protein, is a member of the yeast error-free postreplication repair pathway. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 95, p. 5678-5683, 1998.
- 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. Gent.**, 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.
- CARDONE, J.M. A influência da mutação *pso4-1* no processamento de pre-mRNA e reparação do DNA, na levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Porto Alegre, UFRGS. 63p, 2000. **Dissertação de bacharelado em Ciências Biológicas.**
- 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. Allelism between *pso1-1* and *rev3-1* mutants and between *pso2-1* and *sum1* mutants in *Saccharomyces cerevisiae*. **Curr. Gent.**, v. 13, p. 37-40, 1988.

- 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.
- CHAN, G.L.; DOETSCH, P.W.; HASELTINE, W.A. Cyclobutane pyrimidine dimers and (6-4) photoproducts block polymerization by DNA polimerase I. **Biochemistry**, v. 24, p. 5723-5728, 1985.
- CHANET, R.; WILLIAMSON, D.H.; MOUSTACCHI, E. Cyclic variations in killing and "petite" mutagenesis induced by ultraviolet light in *Saccharomyces cerevisiae*. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 324, p. 290-299, 1973.
- CHEN, H.R.; JAN, S.-P.; TSAO, T.Y.; SHEU, Y.-J.; BANROQUES, J.; CHENG, S.-C. Snt309p, a component of the Prp19p-associated complex that interacts with Prp19p and associates with the spliceosome simultaneously with or immediately after dissociation of U4 in the same manner as Prp19p. **Mol. Cell Biol.**, v. 18, p. 2196-2204, 1998.
- 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.
- CLEVER, B.; INTERHAL, H.; SCHMUCKLI-MAURER, J.; KING, J.; SIGRIST, M.; HEYER, W.D. Recombinational repair in yeast functional interactions between Rad51 and Rad54 proteins. **EMBO Journal**, v.16, p. 2535-2544, 1997.
- 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.
- DAVIES, A.A.; FRIEDBERG, E.C.; TOMKINSON, A.E.; WOOD, R.D.; WEST, S.C. Role of the Rad1 and Rad10 proteins in nucleotide excision-repair and recombination. **J. Biol. Chem.**, v. 270, p. 24638-24641, 1995.
- DOHMEN, R.J.; MADURA, K.; BARTEL, B.; VARSHAVSKY, A. The N-end-rule in 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 intestrand cross-links. **Mutat. Res.**, v. 486, p. 217-247, 2001.
- EISEN J.A.; HANAWALT, P.C. A phylogenomic study of DNA repair genes, proteins, and processes. **Mutat. Res.**, v. 435, p 171-213, 1999.
- ENDO, H.; ONO, T.; SUGIMURA, T. Chemistry and biological actions of 4-nitroquinoline 1-oxide. **Rec. Res. Canc. Res.**, v. 34, p. 1-101, 1971.

- FABRE, F.; MAGANA-SCHWENCKE, N.; CHANET, R. Isolation of the *RAD18* gene of *Saccharomyces cerevisiae* and construction of *rad18* deletion mutants. **Mol. Gen. Genet.**, v. 215, p. 425-430, 1989.
- FEAVER, W.J.; SVEJSTRUP, I.Q.; BARDWELL, L.; BARDWELL, A.J.; BURATOWSKI, S.; GULYAS, K.D.; DONAHUE, T.F.; FRIEDBERG, E.C.; KORNBERG, R.D. Dual roles of a multiprotein complex from *S. cerevisiae* in transcription and DNA repair. **Cell**, v. 75, p.1379-1387, 1993.
- FELDMANN, H.; WINNACKER, E.L. A putative homologue of the human autoantigen Ku from *Saccharomyces cerevisiae*. **J. Biol. Chem.**, v. 268, p. 12995-12900, 1993.
- FREIBERG, G.; MESECAR, A.D.; HUANG, H.; HONG, J.Y.; LIEBMAN, S.W. Characterization of novel *rad6/ubc2* ubiquitin-conjugating enzyme mutants in yeast. **Curr. Genet.**, v. 37, p. 221-233, 2000.
- FRIEDBERG, E.C. **DNA repair**. Ron Newcomer & Associates, San Francisco, USA. 1991.
- FRIEDBERG, E.C.; FEAVER, W.J.; HUANG, W.; REAGAN, M.S.; REED, S.H.; YOU, Z.; WEI, S.; RODRIGUEZ, K.; TALAMANTEZ, J.; TOMKINSON, A.E. The current status of nucleotide excision repair in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Advance in DNA damage and repair**. New York, p. 111-123, 1999.
- FRIEDBERG, E.C.; WALKER, G.C.; SIEDE, W. **DNA repair and mutagenesis**. Washington: ASM Press, USA, 1995.
- GAME J.C. The *Saccharomyces* repair genes at the end of the century. **Mutat. Res.**, v. 451, p. 277-293, 2000.
- 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.; 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 yeasts. **Mutat. Res.**, v. 24, p. 281-292, 1974.

- GASPARRO, F.P.; LIAO, B.; FOLEY, P.J.; WANG, X.M.; MADISON McNIFF, J. Psoralen photochemotherapy, clinical efficacy, and photomutagenicity: the role of molecular epidemiology in minimizing risks. **Envir. and Mol. Mutag.**, v. 31, p. 105-112, 1998.
- GIETZ, D.; STJEAN, A.; WOODS, R.A.; SCHIESTL, R. H. Improved method for high efficiency transformation of intact yeast cells. **Nucleic. Acids Res.**, v. 20, p. 1425, 1992.
- GOTO, Y.; MATSUDA, T.; ITO, K.; HUH, N.H.; THOMALE, J.; RAJEWSKY, M.F.; HAYATSU, H.; NEGISHI, T. Mutagenicities of N-nitrosodimethylamine and N-nitrosodiethylamine in *Drosophila* and their relationship to the levels of O-alkyl adducts in DNA. **Mutat. Res.**, v. 425, p. 125-134, 1999.
- GREENBERG, R.B.; ALBERTI, M.; HEARST, J.E.; CHUA, M.A.; SAFFRAN, W.A. Recombinational and mutagenic repair of psoralen interstrand crosslinks in *Saccharomyces cerevisiae*. **J. Biol. Chem.**, v. 276, p. 31551-31560, 2001.
- GREY, M.; BRENDEL, M. A ten-minute protocol for transforming *Saccharomyces cerevisiae* by electroporation. **Curr. Gent.**, v. 22, p. 335-336, 1992a.
- GREY, M.; BRENDEL, M. Rapid and simple isolation of DNA from agarose gels. **Curr. Gent.**, v. 22, p. 83-84, 1992b.
- GREY, M.; DÜSTERHÖFT, A.; HENRIQUES, J.A.P.; BRENDEL, 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.
- GROSSMANN, K.F.; WARD, A.M.; MARKOVIC, M.E.; FOLIAS, A.E.; MOSES, R.E. *S. cerevisiae* has three pathways for DNA interstrand crosslink repair. **Mutat. Res.**, v. 487, p.73-88, 2001.
- GUZDER, S.; 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.; 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.; 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, 1995a.
- GUZDER, S.N.; HABRACKEN, Y.; SUNG, P.; PRAKASH, L.; PRAKASH, S. Reconstitution of yeast nucleotide excision repair with purified Rad proteins, replication protein A, and transcription factor TFIIH. **J. Biol. Chem.**, v. 270, p. 12973-12976, 1995b.
- 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.
- GUZDER, S.N.; SUNG, P.; PRAKASH, L.; PRAKASH, S. Yeast DNA repair gene *RAD14* encodes a zinc metalloprotein with affinity for ultraviolet-damaged DNA. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 90, p. 5433-5437, 1993.
- GUZDER, S.N.; SUNG, P.; PRAKASH, S.; PRAKASH, L. Nucleotide excision repair in yeast is mediated by sequential assembly of repair factors and not by a pre-assembled repairsome. **J. Biol. Chem.**, v. 271, p. 8903-8910, 1996.
- HAAS, A.; REBACK, P.M.; PRATT, G.; RECHSTEINE, 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.; BRENDEL, 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. Recombination: a frank view of exchanges and vice versa. **Curr. Cell. Biol.**, v. 12, p. 286-292, 2000.
- HABER, J.E. Mating-type gene switching in *Saccharomyces cerevisiae*. **Trends Genet.**, v. 8, p. 446-452, 1992.
- HABRAKEN, Y.; SUNG, P.; PRAKASH, L.; PRAKASH, S. Yeast DNA-repair gene *RAD2* encodes a single-stranded endonuclease. **Nature**, v. 366, p. 365-368, 1993.
- HAMPSEY, M. A review of phenotypes in *Saccharomyces cerevisiae*. **Yeast**, v. 13, p. 1099-1133, 1997.
- HASTINGS, P.J.; QUAH, S.K.; VON BORSTEL, R.C. Spontaneous mutation by mutagenic repair of spontaneous lesions in DNA. **Nature**, v. 264, p. 719-722, 1976.

- HAYS, S.L.; FIRMENICH, A.A.; BERG, P. Complex formation in yeast double-strand break repair: participation of Rad51, Rad52, Rad55 and Rad57 proteins. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 92, p. 6925-6929, 1995.
- HENRIQUES, J.A.P.; BRENDEL, 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.; BRENDEL, 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.
- HENRIQUES, J.A.P.; CHANET, R.; AVERBECK, D.; MOUSTACCHI, E. Lethality and "Petite" mutation induced by the photoaddition of 8-methoxypsoralen in yeast. **Mol. Gen. Genet.**, v. 158, p. 63-72, 1977.
- HENRIQUES, J.A.P.; MOUSTACCHI, E. Interaction between mutations for sensitivity to psoralen photoaddition (*psa*) and to radiations (*rad*) in yeast. **J. Bacteriol.**, v. 148 p. 248-256, 1981.
- HENRIQUES, J.A.P.; MOUSTACCHI, E. Isolation and characterisation of *psa* mutants sensitive to photoaddition of psoralen derivatives in *Saccharomyces cerevisiae*. **Genetics**, v. 95, p. 273-288, 1980.
- 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.
- HEYER, W.D. The search for the right partner: homologous pairing and DNA strand exchange proteins in eukaryotes. **Experientia**, v. 50, p. 223-233, 1994.
- HOEIJMAKERS, J.H.J. Nucleotide excision repair II: from yeast to mammals. **TIG**, v. 9, p. 211-217, 1993.
- HOFFMANN, R.M.; PICKART, C.M. Noncanonical MMS2 encoded ubiquitin-conjugating enzyme functions in assembly of novel polyubiquitin chains for DNA repair. **Cell**, v. 96, p. 645-653, 1999.
- HOLBECK, S.L.; STRATHERN, J.N. A role for *REV3* in mutagenesis during double-strand break repair in *Saccharomyces cerevisiae*. **Genetics**, v. 147, p. 1017-1024, 1997.
- HORIO, T. Indications and action mechanisms of photo-therapy. **J. Dermatol. Sci.**, v. 23 (Suppl. 1), p. S17-S21, 2000.

- 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. 13993-1417, 1999.
- HUANG, H.; KABANA, A.; GOTTSCHLING, D.E.; PRAKASH, L.; LIEBMAN, S.W. The ubiquitin-conjugating enzyme Rad5 (Ubc2) is required for silencing in *Saccharomyces cerevisiae*. **Mol. Cell. Biol.**, v. 17, p. 6693-6699, 1997.
- HÜBSCHER, U.; NASHEUER, H.-P.; SYVÄOJA, J.E. Eukaryotic DNA polymerases, a growing family. **TIBS**, v. 25, p. 143-147, 2000.
- IVANOV, E.L.; SUGAWARA, N.; WHITE, C.I.; FABRE, F.; HABER, J.E. Mutations in *XRS2* and *RAD50* delay but do not prevent mating-type switching in *Saccharomyces cerevisiae*. **Mol. Cell. Biol.**, v. 14, p. 3414-4325, 1994.
- JACHYMCZYK, W.J.; VON BORSTEL, R.C.; MOWAT, M.R.A.; HASTINGS, P.J. Repair of interstrand cross-links in DNA of *Saccharomyces cerevisiae* requires two systems of DNA repair: the *RAD3* system and the *RAD51* system. **Mol. Gen. Genet.**, v. 182, p. 196-205, 1981.
- JENTSCH, S. The ubiquitin-conjugation system. **Annu. Ver. Genet.**, v. 26, p.179-207, 1992.
- 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.; HENDERSON, S.T.; PETES, T.D.; PRAKASH, S.; BURKMANN, M.; PRAKASH, L. *Saccharomyces cerevisiae* *RAD5*-encoded DNA repair protein contains DNA helicase and zinc-binding sequence motifs and affects the stability of simple repetitive sequences in the genome. **Mol. and Cell. Biol.**, v. 12, p. 3807-3818, 1992.
- JOHNSON, R.E.; KONDRATICK, C.M.; PRAKASH, S.; PRAKASH, L. *BRAD30* 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 Pol eta. **Science**, v. 283, p. 1001-1004, 1999b.
- JOHNSON, R.E.; PRAKASH, S.; PRAKASH, L. Yeast DNA repair protein *RAD5* that promotes instability of simple repetitive sequences is a DNA-dependent ATPase. **J. Biol. Chem.**, v. 269, p. 28259-28262, 1994.

- JOHZUKA, K.; OGAWA, H. Interaction of Mre11 e Rad50: two proteins required for DNA repair e meiosis-specific double-strand break formation in *Saccharomyces cerevisiae*. **Genetics**, v. 139, p. 1521-1532, 1995.
- JONES, J.S.; WEBER, S.; PRAKASH, L. The *S. cerevisiae* *RAD18* gene encodes a protein that contains potential zinc finger domains for nucleic acids binding and a putative nucleotide binding sequence. **Nucleic Acids Res.**, v. 16, p. 9119-7131, 1988.
- JOSHI, P.C.; PATHAK, M.A. Photophysical and photobiological properties of 3-Carbethoxyypsoralen. **Indian J. Biochem. Biophys.**, v. 32, p. 63-73, 1995.
- KANAAR, R.; HOELJMAKERS, J.H.J. From competition to collaboration. **Nature**, v. 391, p. 335-327, 1998.
- KAPLUN, L.; IVANTSIV, Y.; KORNITZER, D.; RAVEH, D. Functions of the DNA damage response pathway target Ho endonuclease of yeast for degradation via the ubiquitin-26S proteasome system. **PNAS**, v. 97, p. 10077-10082, 2000.
- KLEIN, H.L. Different types of recombination events are controlled by the *RAD1* and *RAD52* genes of *Saccharomyces cerevisiae*. **Genetics**, v. 120, p. 367-377, 1988.
- KOKEN, M.H.; REYNOLDS, P.; JASPERS-DEKKER, I.; PRAKASH, L.; PRAKASH, S.; BOOTEMA, D.; HOELJMAKERS, J.H. Structural and functional conservation of two human homologs of the yeast DNA repair gene *RAD6*. **Proc. Nat. 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.
- KUPIECK, 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.; HOELJMAKERS, J.H.J. Molecular mechanism of nucleotide excision repair. **Genes & Development**, v. 13, p. 768-785, 1999.
- LARIMER, F.W.; PERRY, J.R.; HARDIGREE, A.A. The *REV1* gene of *Saccharomyces cerevisiae*: Isolation, sequence and functional analysis. **J. Bacteriol.**, v. 171, p. 230-237, 1989.

- LAWRENCE, C. 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. Mutagenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. **Adv. Genet.**, v. 21, p. 173-254, 1982.
- LAWRENCE, C.W.; CHRISTENSEN, R.B. Metabolic suppressors of trimethoprin and ultraviolet light sensitivities of *Saccharomyces cerevisiae rad6* mutants. **J. Bacteriol.**, v. 139, p. 866-876, 1979.
- 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 ζ 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.
- LEMONT, J.F. Induction of forward mutations in mutationally defective yeast. **Mol. Gen. Genet.**, v. 119, p.27-42, 1972.
- LEMONT, J.F. Mutants of yeast defective in mutation induced by ultraviolet light. **Genetics**, v. 68, p. 21-33, 1971.
- LEWIS, L.K.; KIRCHNER, J.M.; RESNICK, M.A. Requirement for end-joining and checkpoint functins, but not RAD52-mediated recombination, after EcoRI endonuclease cleavage of *Saccharomyces cerevisiae* DNA. **Mol. Cell. Biol.**, v. 18, p. 1891-1902, 1998.
- 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 pyrimidines nucleoside-cytidine sequences. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 78, p. 3388-3392, 1981.
- 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. U.S.A.**, v. 79, p. 1722-1726, 1982.

- MARIS, A.F.; ASSUMPCÃO, A.L.K.; BONATTO, D.; BRENDEL, M.; HENRIQUES, J.A.P. Diacyc shift-induced intrinsic stress resistance against hydro-peroxides in *Saccharomyces cerevisiae* is independent of mitochondrial function. **Curr. Gent.**, v. 39, p. 137-149, 2001.
- MARIS, A.F.; KERN, A.L.; PICADA, J.; BOCCARDI, F.; BRENDEL, M.; HENRIQUES, J.A.P. Glutathione, but not transcription factor Yap1, required for carbon source-dependent (increased) resistance to oxidative stress in *Saccharomyces cerevisiae*. **Curr. Gent.**, v. 37, p. 175-182, 2000.
- MASUTANI, C.; KUSUMOTO, R.; YAMADA, A.; DOHMAE, N.; YOKOI, M.; YUASA, M.; ARAKI, M.; IWAI, S.; TAKIO, K.; HAMAOKA, F. The XPV (xeroderma pigmentosum variant) gene encodes human DNA polymerase eta. **Nature**, v. 399, p. 700-704, 1999.
- 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.
- 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.
- MILLER R D, PRAKASH L, PRAKASH S, Genetical control of excision of *Saccharomyces cerevisiae* interstrand DNA cross-links induced by psoralen plus near-UV light. **Mol. Cell. Biol.**, v. 2, p. 939-948, 1982.
- MILNE, G.T.; WEAVER, D.T. Dominant negative alleles of *RAD52* reveal a DNA repair/recombination complex including Rad51 and Rad52. **Genes Dev.**, v. 7, p. 1755-1765, 1993.
- 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. Gent.**, v. 29, p. 211-218, 1996.

- 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 polimerase. **J. Bacteriol.**, v. 171, p. 5659-5667, 1989.
- 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.
- MORTENSEN, U.H.; BENDIXEN, C.; SUNJEVARIC, J.; ROTHSTEIN, R. DNA strand annealing is promoted by the yeast Rad52 protein. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 93, p. 10729-10734, 1996.
- MORTIMER, R.K.; E HAWTORNE, D.C. Yeast Genetics. In: ROSE, A.H.; HARRISON, J. S. (eds). **The Yeast**. New York: Academic Press, v. 1, p. 54-116, 1969.
- MOUSTACCHI, E. DNA repair in yeast: genetic control and biological consequences. **Adv. Radiat. Res.** J. Lett (eds) Academic Press, New York, v. 13, p. 1-30, 1987.
- MOUSTACCHI, E. Photomutagenicity induced by psoralens: mechanism of repair and photomutagenicity. **Arch. Toxicol.**, v. 12, p. 26-34, 1988.
- 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.
- NASMYTH, K.A. The regulation of yeast mating-type chromatin structure by SIR an action at a distance affecting both transcription and transposition. **Cell**, v. 30, p. 567-578, 1982.
- NELSON, J.R.; LAWRENCE, C.W.; HINKLE, D.C. Thymine-thymine dimer bypass by yeast DNA polimerase ζ . **Science**, v. 272, p. 1646-1649, 1996.
- NEW, J.H.; SUGIYAMA, T.; ZAITSEVA, E.; KOWALCZYKOWSKI, S.C. Rad52 protein stimulates DNA strand exchange by Rad51 and replication protein A. **Nature**, v. 391, p. 407-410, 1998.
- NICKOLOFF, J.A.; HOEKSTRA, M.F. **DNA damage and repair**. Totowa, New Jersey: Human Press, 1998.

- OGAWA, T.; SHINOHARA, A.; NABETANI, A.; IKEYA, T.; YU, X.; EGELMAN, E.H.; OGAWA, H. **Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology**, v. 58, p. 567-576, 1993.
- 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. Gent.**, 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.; 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.
- 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.
- 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.
- PIERCE, M.K.; GIROUX, C.N. ; KUNZ, B.A. Development of a yeast system to assay mutational specificity. **Mutat. Res.**, v. 182, p. 65-74, 1987.
- 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. 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. The structure and function of *RAD6* and *RAD18* repair genes of *Saccharomyces cerevisiae*. **Genome**, v. 31, p. 597-600, 1989.

- PRAKASH, L.; PRAKASH, S. Isolation and characterization of MMS-sensitive mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. **Genetics**, v. 86, p. 33-55, 1977.
- PRAKASH, L.; PRAKASH, S. Genetic analysis of error-prone repair systems in *Saccharomyces cerevisiae*. In: GENEROSO, W.M.; SHELBY, M.D.; SERRES, F.J. **DNA repair and mutagenesis in eukaryotes**. New York: Plenum Publishing Corp., p. 141-158, 1980.
- PRAKASH, S.; JOHNSON, R.E.; WASHINGTON, M.T.; HARACSKA, L.; KONDRATICK, C.M. ; PRAKASH L. Role of Yeast and human DNA polymerase η 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.
- PRAKASH, S.; SUNG, P.; PRAKASH, L. DNA repair genes and proteins of *Saccharomyces cerevisiae*. **Annu. Rer. Genet.**, v. 27, p. 33-70, 1993.
- 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 *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.**, 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.
- RAHN, R.O.; PATRICK, M.H. Photochemistry of DNA: secondary structure, photosensitization, base substitution, and exogenous molecules, in: S.Y. Wang (Ed.), Photochemistry and Photobiology of Nucleic Acids. **Biology**, v. II, Academic Press, New York, p. 97-145, 1976.
- RAMOTAR, D.; MASSON, J.-Y. *Saccharomyces cerevisiae* DNA repair processes: an update. **Mol. Cell Biochem.**, v. 158, p. 65-75, 1996.
- RAYMOND, W.E.; KLECKNER, N. Rad50 protein of *S. cerevisiae* exhibits ATP-dependent DNA binding. **Nucleic Acids Res.**, v. 21, p. 3851-3856, 1993.

- 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.
- REYNOLDS, P.; WEBER, S.; PRAKASH, L. *RAD6* gene of *Saccharomyces cerevisiae* encodes a protein containing a tract of 13 consecutive aspartates. **Proc. Nat. Acad. Sci. USA**, v. 82, p. 168-172, 1985.
- RICHTER, D.; NIEGEMANN, E.; BRENDDEL, 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.
- ROBZYK, K.; RECHT, J.; OSLEY, M.A. Rad6-dependent ubiquitination of histone H2B in yeast. **Science**, v. 287, p. 501-504, 2000.
- ROSE, M.D.; NOVICK, P.; THOMAS, J.H.; BOTSTEIN, D.; FINK, G.R. A *Saccharomyces cerevisiae* genomic plasmid bank based on a centromere-containing shuttle vector. **Gene**, v. 60, p. 237-243, 1987.
- ROUSH, A.A.; SUAREZ, M.; FRIEDBERG, E.C.; RADMAN, M.; SIEDE, W. Deletion of the *Saccharomyces cerevisiae* gene *RAD30* encoding na *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.; 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.
- SAFFI, J.; PEREIRA, V.R.; HENRIQUES, J.A.P. Importance of the Sgs1 helicase activity in DNA repair of *Saccharomyces cerevisiae*. **Curr. Gent.**, v. 37, p. 75-78, 2000.
- SAFFRAN, W.A.; GREENBERG, R.B.; THALER-SCHEER, M.S.; JONES, M.M. Single strand and double strand DNA damage-induced reciprocal recombination in yeast. Dependence on nucleotide excision repair and *RAD1* recombination. **Nucleic Acids Res.**, vol. 22, p. 2823-2829, 1994.
- SAGE, E.; DOAM, T.L.; BOYER, V.; HELLAND, D.E.; KITTLER, L.; HELENE, C.; MOUSTACCHI, E. Oxidative DNA damage photoinduced 3-carbethoxy-psoralen and other furocoumarins: mechanisms of photooxidation and recognition by repair enzymes. **J. Mol. Biol.**, v. 209, p. 297-314, 1989.

- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.R.; MANIATIS, T. **Molecular Cloning: a laboratory manual**. 2nd ed. Cold Spring Harbour: Cold Spring Harbour Laboratory Press, 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.
- SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A.R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 74, p. 5463-5467, 1977.
- SCHAEFFER, L.; MONCOLLIN, V.; ROY, R.; STAUB, A.; MEZZINA, M.; SARASIN, A.; WEEDA, G.; HOEIJMAKERS, J.H.J.; EGLY, J.M. The ERCC2/DNA repair protein is associated with the class II BTF2/TFIIH transcription factor. **EMBO J.**, v. 13, p. 2388-2392, 1994.
- SCHIESTL, R.H.; PRAKASH, S.; PRAKASH, L. The *SRS2* supressor of *rad6* mutations of *Saccharomyces cerevisiae* acts by channeling DNA lesions into the *RAD52* DNA repair pathway. **Genetics.**, v. 124, p. 817-831, 1990.
- 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.
- SCHMIDT, M.; GREY, M.; BRENDDEL, M. A microbiological assay for the quantitative determination of glutathione. **Biotechniques**, v. 21, p. 881-886, 1996.
- SELBY, C.P.; SANCAR, A. Molecular mechanism of transcription repair coupling. **Science**, v. 260, p. 53-58, 1993.
- SHCHERBAKOVA, P.V.; NOSKOV, V.N.; PSHENICHNOV, M.R.; PAVLOV, Y.I. Base analog 6-N-hydroxylaminopurine mutagenesis in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* is controlled by replicative DNA polymerases. **Mutat. Res.**, v. 369, p. 33-44, 1996.
- SHERMAN, F.; FINK, G.R.; HICKS, J.B. Cold Spring harbor Laboratory Press. **Biological responses to DNA Damage**. v. LXV. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1986.

- SHINOHARA, A.; OGAWA, H.; OGAWA, T. Rad51 protein involved in repair and recombination in *S. cerevisiae* is a RecA-like protein. **Cell**, v. 69, p. 457-470, 1992.
- SHINOHARA, A.; OGAWA, T. Stimulation by Rad52 of yeast Rad51-mediated recombination. **Nature**, v. 391, p. 404-407, 1998.
- SIEDE, W. The RAD6 gene of yeast: a link between DNA repair, chromosome structure and protein degradation? **Radiat Environ Biophys**, v. 27, p. 277-286, 1988.
- 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. Gent.**, 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.
- SNOW, R. Absence of suppressible alleles at the *his1* locus of yeast. **Mol. Gen. Genet.** v. 164, p. 341-342, 1978.
- SUNG, P. Yeast Rad55 and Rad57 proteins form a heterodimer that functions with replication protein A to promote DNA strand exchange by Rad51 recombinase. **Genes and Develop.**, v. 11, p. 1111-1121, 1997.
- SUNG, P.; BERLETH, E.; PICKART, C.; PRAKASH, S.; PRAKASH, L. Yeast *RAD6* encoded ubiquitin conjugating enzyme mediates protein degradation dependent on the N-end-recognizing E3 enzyme. **EMBO J.**, vol. 10, p. 2187-2193, 1991.
- SUNG, P.; PRAKASH, S.; PRAKASH, L. Mutation of cysteine-88 in the *Saccharomyces cerevisiae* *RAD6* protein abolishes its ubiquitin-conjugating activity and its various biological functions. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 87, p. 2695-2699, 1990.
- SUNG, P.; REYNOLDS, P.; PRAKASH, L.; PRAKASH, S. Purification and characterization of the *Saccharomyces cerevisiae* *RAD1/RAD10* endonuclease. **J. Biol. Chem.**, v. 268, p. 26391-26399, 1993.
- SUNG, P.; WATKINS, J.F.; PRAKASH, L.; PRAKASH, S. Negative superhelicity promotes ATP-dependent binding of yeast *RAD3* protein to ultraviolet-damaged DNA. **J. Biol. Chem.**, v. 269, p. 8303-8308, 1994.

- 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.
- SVEJSTRUP, J.Q.; WANG, Z.; FEAVER, W.J.; WU, X.; DONAHUE, F.; FRIEDBERG, E.C.; KORNBERG, R.D. Different forms of yeast RNA polymerase transcription factor IIH (TFIIH) for transcription and DNA repair: holoTFIIH and a nucleotide excision repairosome. **Cell**, v. 80, p. 21-28, 1995.
- SWEDER, K.S. Nucleotide excision repair in yeast. **Curr. Gent.**, v. 27, p. 1-16, 1994.
- 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.
- SWIETLINSKA, Z.; ZABOROWSKA, D.; ZUK, J. Survival and liquid holding recovery in UV-sensitive strains of *Saccharomyces cerevisiae* after treatment with chemical mutagens and radiation. **Acta Microbiol. Pol.**, v. 25, p. 295-305, 1976.
- 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.
- TOMKINSON, A.E.; BARDWELL, A.J.; BARDWELL, L.; TAPPE, N.J.; FRIEDBERG, E.C. Yeast DNA repair proteins Rad1 and Rad10 constitute a single-stranded DNA endonuclease. **Nature**, v. 362, p. 860-862, 1993.
- TROELSTRA, C.; JASPERS, N.G. Recombination and repair. Ku starts at the end. **Curr. Biol.**, v. 4, p. 1149-1151 1994.
- Van DER LAAN, R.; ROEST, H.P.; HOOGERBRUGGE, J.W.; SMIT, E.M.E.; SLATER, R.; BAARENDS, W.M.; HOEIJMAKERS, J.H.J.; GROOTEGOED, A. Characterization of *mRAD18Sc*, a mouse homolog of the yeast postreplication repair gene *RAD18*. **Genomics**, v. 69, p. 86-94, 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. **Nucl. Acids Res.** V. 21, p. 5890-5895, 1993.
- VARSHAVSKY, A. The N-end-rule pathway of protein degradation. **Genes Cells.**, vol. 2, p. 13-28, 1997.
- 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 polimerase I transcribed genes. **Nucleic Acids Res.**, v. 24, p. 1020-1025, 1996.
- WANG, Z.; WEI, S.; REED, S.; WU, X.; SVEJSTRUP, J.; FEAVER, W.; KORNBERG, R.; FRIEDBERG, E. The *RAD7*, *RAD16* and *RAD23* genes of *Saccharomyces cerevisiae*: Requirement for transcription-independent nucleotide excision repair in vitro and interactions between the genes products. **Mol. Cell. Biol.**, v. 17, p. 635-643, 1997.
- 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.A.; KISER, G.L.; HARTWELL, L.H. Mitotic checkpoint genes in budding yeast and the dependence of mitosis on DNA replication and repair. **Genes Dev.**, v. 8, p. 652-665, 1994.
- WOLTER, R.; SIEDE, W.; BRENDEL, M. Regulation of *SNM1*, na inducible *Saccharomyces cerevisiae* gene required for repair of DNA cross-links. **Mol. Gen. Genet.**, v. 250, p. 162-168, 1996.
- WOOD, R.D. DNA repair in eukaryotes. **Ann. Ver. Biochem.**, v. 65, p. 135-167, 1996.
- WOOD, R.D. Nucleotide excision repair in mammalian cells. **J. Biol. Chem.**, v. 272, p. 23465-23468, 1997.
- WORTHYLAKE, D.K.; PRAKASH, S.; PRAKASH, L.; HILL, C.P. Crystal structure of the *Saccharomyces cerevisiae* ubiquitin-conjugating enzyme Rad6 at 2.6 Å resolution. **J. Biol. Chem.**, vol. 273, p. 6271-6276, 1998.

- XIAO, W.; CHOW, B.L. FONTANIE, T.; MA, L.; BACCHETTI, S.; HRYCIW, T.; BROOMFIELD, S. Genetic interactions between error-prone and error-free postreplication repair pathways in *Saccharomyces cerevisiae*. **Mutat. Res.**, v. 435, p. 1-11, 1999.
- 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.
- YU, Z.; CHEN, J.; FORD, N.; BRACKLEY, M.E.; GLICKMAN, B.W. Human DNA repair systems: an overview. **Envir. Mol. Mutag.**, v. 33, p. 3-20, 1999.