

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E
MOLECULAR**

**INTERAÇÕES GENÉTICAS ENTRE O GENE *KIN3* E OS GENES DO
COMPLEXO MRX DE *Saccharomyces cerevisiae***

Jaqueline Cesar Rocha

**Dissertação apresentada ao Programa
de Pós-Graduação em Biologia
Celular e Molecular da Universidade
Federal do Rio Grande do Sul, como
requisito parcial para obtenção do
grau de Mestre em Ciências.**

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Jenifer Saffi

Porto Alegre

2009

Este trabalho foi desenvolvido nas instalações do Laboratório de Reparação de DNA em eucariotos, no Departamento de Biofísica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Este trabalho foi financiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) e Laboratório de Genotoxicidade (GENOTOX-ROYAL).

Ao meu amor Elton, por me incentivar a não desistir dos meus sonhos, e por me dedicar tanto amor, carinho e atenção em todos os momentos.

AGRADECIMENTOS

A Prof^a. Dr^a. Jenifer Saffi, por sua orientação e confiança. Pela grande oportunidade de crescimento e pela amizade e carinho durante todo esse tempo.

Ao Prof. Dr. João Antônio Pegas Henriques, pela oportunidade de fazer parte de seu grupo e por ser tão bem recebida.

Ao Elton, meu amor, por estar sempre ao meu lado, me apoiando, encorajando, mostrando o caminho certo, me amando e me fazendo tão feliz. Sem isso, tudo seria bem mais difícil...

A grande colega, e agora também uma grande amiga, Dinara, pela enorme ajuda em todos os momentos, e pelo enorme conhecimento compartilhado. Pelos bons momentos, alegres, divertidos, e principalmente, pela paciência, apoio e muita compreensão nos momentos difíceis. Você é uma pessoa maravilhosa...

As bolsistas, Ana Catarina, e as Brunas, Immich e Castilhos. E é claro, ao Ângelo, que apesar de não ser bolsista, sempre esteve disposto a ajudar. Obrigada pela grande ajuda sempre que foi necessário, pela amizade e pelos ótimos momentos divididos. Vocês foram muito importantes para a realização deste trabalho.

As colegas e amigas Albanin e Valéria, pelo incentivo, apoio e palavras de carinho em várias ocasiões. Pela ajuda e pelos ótimos momentos juntas, incluindo aqueles de mau-humor, nervosismo e estresse no final das nossas Dissertações e/ou Tese... Foi difícil, mas... Conseguimos!

Aos demais colegas dos Laboratórios 210 e 219, Diana, Ana Bárbara, Nusha, Iuri, Renata, Fabrício, Jacque, Cassiana,... pelas muitas palavras de apoio e pelos momentos agradáveis e divertidos.

Aos membros da Comissão de Acompanhamento, Prof. Dr. Guido Lenz e Dr^a. Jacqueline Moraes Cardone, pela colaboração, orientação e sugestões para o trabalho.

A Márcia Vaz, pelo carinho e disposição em ajudar, sempre.

A todos os professores e funcionários dos Departamentos de Biotecnologia e de Biofísica, que contribuíram de algum modo para minha formação. Em especial a Sílvia Centeno e ao Luciano Saucedo pela ajuda e esclarecimentos em várias ocasiões.

A minha família, pelo amor, carinho e apoio, mesmo a distância... e compreensão, apesar das saudades...

A Farmacêutica Marizete Balen, pelo incentivo, e pela compreensão, nos momentos em que foi necessário me ausentar do trabalho no Hospital São Lucas.

As ex-colegas do São Lucas, e agora amigas, Graziela, Laura, Eloni e Vanessa, pela grande amizade que cultivamos enquanto trabalhamos juntas. Pelos inúmeros favores, trocas de horários, e pelas muitas palavras de incentivo e carinho.

E por último, mas com certeza o mais importante: a Deus, por estar sempre junto comigo. Por me proporcionar tantas coisas boas, e junto com a felicidade de concluir mais uma etapa em minha vida, me presentear com a realização de outro sonho: um filho. Muito obrigada, meu Deus!

Obrigada!

ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS.....	8
LISTA DE FIGURAS E TABELAS.....	9
RESUMO.....	11
ABSTRACT.....	12
I- INTRODUÇÃO.....	13
1. A levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> como modelo de estudo.....	13
2. Lesões no DNA.....	15
2.1 Bases modificadas.....	16
2.2 Adutos mono e bi-funcionais.....	18
2.3 Quebras simples e duplas de DNA.....	21
3. Mecanismos de reparação de DNA.....	23
3.1 Reparação direta.....	26
3.2 Reparação de bases mal emparelhadas.....	27
3.3 Reparação por excisão de bases.....	27
3.4 Reparação por excisão de nucleotídeos.....	29
3.5 Reparação de quebras duplas.....	30
3.5.1 Recombinação homóloga.....	32
3.5.2 Recombinação não-homóloga.....	34
3.5.3 Reparação recombinacional de pontes intercadeias.....	36
3.6 Síntese translesão.....	37
4. Sinalização celular em resposta a danos no DNA.....	38
4.1 Cinases relacionadas à NIMA.....	40

4.1.2 Nek's em mamíferos.....	41
4.1.2 A cinase Kin3 em <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	43
5. O complexo MRX de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	44
II. OBJETIVOS.....	48
1. Objetivo geral.....	48
2. Objetivos específicos.....	48
III. CAPÍTULO I.....	49
IV. DISCUSSÃO GERAL.....	79
V. CONCLUSÕES.....	86
1. Conclusão geral.....	86
2. Conclusões específicas.....	86
VI. PERSPECTIVAS.....	88
VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	89
VIII. ANEXO.....	103

LISTA DE ABREVIATURAS

6-4 PP's	6-4 fotoprodutos
8-MOP	8-metoxipsoraleno
8-OxoG	8-oxoguanina
ATP	Adenosina trifosfato
BER	Base excision repair (Reparação por excisão de bases)
cis-DDP	cis-diaminodicloroplatino (Cisplatina)
CPD's	Ciclo butane pyrimidine dimers (Dímeros de pirimidina)
DDR	DNA damage response (Resposta a danos no DNA)
DNA	Desoxiribounucleic acid (Ácido desoxirribonucléico)
DSB's	Double-strand breaks (Quebras duplas de cadeias)
EMS	Etil metanosulfonato
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HN2	Mustarda nitrogenada bifuncional
HR	Homologous recombination (Recombinação homóloga)
HU	Hidroxiuréia
ICL's	Interstrand cross-links (Pontes intercadeias)
MMR	Mismatch repair (Reparação de bases mal emparelhadas)
MMS	Metil metanosulfonato
Nek's	NIMA related kinases (Cinases relacionadas a NIMA)
NER	Nucleotide excision repair (Reparação por excisão de nucleotídeos)
NHEJ	Non-homologous end joining (Recombinação não homóloga)
NIMA	Never in mitosis - gene A
ROS	Reactive oxygen species (Espécies reativas de oxigênio)
RPA	Replication protein A (Proteína de replicação A)
SSB's	Single-strand breaks (Quebras simples de cadeia)
TLS	Translesion synthesis (Síntese translesão)
UV	Radiação ultravioleta
UVA	Radiação ultravioleta de comprimento de onda longo (365nm)
UVC	Radiação ultravioleta de comprimento de onda curto (254nm)

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

I. INTRODUÇÃO

Figura 1. Ciclo celular da levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	14
Figura 2. Tipos de lesões induzidas por diferentes agentes indutores de danos no DNA.....	16
Figura 3. Exemplos de bases modificadas comumente encontradas no DNA.....	17
Figura 4. Principais lesões no DNA induzidas pela luz ultravioleta e a frequência com que ocorrem entre as bases.....	18
Figura 5. Formação de adutos entre cisplatina e DNA.....	20
Figura 6. Formação de ICL's a partir de mustardas nitrogenadas.....	21
Figura 7. 8-metoxipsoraleno e formação de adutos e ICL.....	22
Figura 8. Representação gráfica dos três tipos de interações gênicas possíveis em linhagens duplo mutantes em genes que participam em processos de reparação de DNA.....	25
Figura 9. Agentes que lesionam o DNA, lesões no DNA e principais mecanismos de reparação.....	26
Figura 10. Mecanismo de reparação por excisão de bases: sub-vias short-patch BER e long-patch BER.....	28
Figura 11. Representação esquemática da via de reparação por excisão de nucleotídeos.....	31
Figura 12. Esquema geral da recombinação homóloga.....	34
Figura 13. Modelo para recombinação não homóloga em <i>S. cerevisiae</i>	36
Figura 14. Família Nrk's (NIMA related kinases).....	42

III. CAPÍTULO I

Figure 1 (A-C) survival assay after treatment with 8-MOP and; (D-F) induced forward mutation in the <i>CAN1</i> locus per 10^7 survivors cells, in isogenic strains BY4741-WT, <i>kin3Δ</i> , <i>mre11Δ</i> and <i>mre11Δkin3Δ</i> , <i>rad50Δ</i> and <i>rad50kin3Δ</i> , <i>xrs2Δ</i> and <i>xrs2Δkin3Δ</i>	71
---	----

Figure 2 (A-C) survival assay after treatment with cisplatin and; (D-F) induced forward mutation in the <i>CANI</i> locus per 10^7 survivors cells, in isogenic strains BY4741-WT, <i>kin3Δ</i> , <i>mre11Δ</i> and <i>mre11Δkin3Δ</i> , <i>rad50Δ</i> and <i>rad50kin3Δ</i> , <i>xrs2Δ</i> and <i>xrs2Δkin3Δ</i>	72
Figure 3 (A-C) survival assay after treatment with nitrogen mustard and; (D-F) induced forward mutation in the <i>CANI</i> locus per 10^7 survivors cells, in isogenic strains BY4741-WT, <i>kin3Δ</i> , <i>mre11Δ</i> and <i>mre11Δkin3Δ</i> , <i>rad50Δ</i> and <i>rad50kin3Δ</i> , <i>xrs2Δ</i> and <i>xrs2Δkin3Δ</i>	73
Figure 4 (A-C) survival assay after treatment with UVC and; (D-F) induced forward mutation in the <i>CANI</i> locus per 10^7 survivors cells, in isogenic strains BY4741-WT, <i>kin3Δ</i> , <i>mre11Δ</i> and <i>mre11Δkin3Δ</i> , <i>rad50Δ</i> and <i>rad50kin3Δ</i> , <i>xrs2Δ</i> and <i>xrs2Δkin3Δ</i>	74
Figure 5. Regulation of <i>KIN3</i> expression in isogenic strains BY4741, <i>mre11Δ</i> , <i>rad50Δ</i> , <i>xrs2Δ</i>	75
Figure 6. Sensitivity to hydroxyurea (HU).....	76
Figure 7. Sensitivity to hydroxyurea (HU) plus caffeine.....	77
Figure 8. Sensitivity to mutagenic agents plus caffeine.....	78
Table 1. Yeast strains used in this study.....	70

RESUMO

Na levedura *Saccharomyces cerevisiae*, o gene *KIN3* codifica uma serina-treonina cinase cuja função ainda é desconhecida. A proteína Kin3 é homóloga estrutural da proteína NIMA, de *Aspergillus nidulans*, a qual é necessária para a transição da fase G2/M do ciclo celular, e ainda possui papel na resposta a danos no DNA. Cinases relacionadas à NIMA (Nek's) foram identificadas em diferentes espécies, e mamíferos contêm 11 Nek's. Algumas destas cinases apresentam propriedades semelhantes a NIMA, estando envolvidas na progressão do ciclo celular e na resposta a danos no DNA. A proteína Kin3 possui propriedades semelhantes a Nek1 e Nek2. Nek1 interage com proteínas envolvidas na sinalização e reparação de danos no DNA. Linhagens mutantes *kin3Δ* são defectivas na parada da fase G2/M do ciclo celular em resposta a danos no DNA e apresentam uma pronunciada sensibilidade a diversos agentes mutagênicos.

O objetivo deste trabalho foi avaliar a interação do gene *KIN3* com os genes do complexo MRX (*MRE11/RAD50/XRS2*), envolvido na sinalização e reparação de danos no DNA, bem como na manutenção da integridade dos cromossomos. O perfil de sensibilidade dos simples e duplos mutantes sugerem uma interação epistática entre o gene *KIN3* e os genes do complexo MRX, na resposta a danos causados por 8-metoxipsoraleno fotoativado, cisplatina e mustarda nitrogenada. A expressão do gene *KIN3* durante estresse mutagênico não apresentou diferenças significativas entre a linhagem selvagem e as linhagens mutantes *mre11Δ*, *rad50Δ* e *xrs2Δ*. Os resultados obtidos ainda indicam que a proteína Kin3 possa estar agindo junto com o complexo MRX na via Mec1/Tel1 de sinalização de danos no DNA.

ABSTRACT

In the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, the *KIN3* gene codifies a serine-threonine kinase whose function is still unknown. The Kin3 protein is a structural homolog of NIMA protein of *Aspergillus nidulans*, which is necessary to G2/M transition, and has a role in DNA damage response. NIMA-related kinases (Nrk's) were identified in different species, and mammals contain eleven Nrk's. Some of these kinases display similar properties with NIMA, being involved in cell cycle progression and DNA damage response. The Kin3p have similar properties with Nek1 and Nek2. Nek1 interacts with proteins involved in signaling and repair of DNA damage. Mutant strains in *KIN3* are defective in the G2/M-phase checkpoint in response to DNA damage and display a pronounced sensitivity to several mutagens.

The aim of this work was to evaluate the interaction between *KIN3* gene and the genes of MRX complex (*MRE11/RAD50/XRS2*), involved in signaling and repair of DNA damage, as well in the maintenance of chromosome integrity. The sensitivity profile of single and double mutants suggests an epistatic interaction between the *KIN3* gene and the genes of MRX complex, in damage response induced by photo-activated methoxypsoralen, cisplatin and nitrogen mustard. The *KIN3* gene expression during mutagenic stress does not show significant differences between the wild type and mutant strains *mre11* Δ , *rad50* Δ and *xrs2* Δ . The obtained results indicate that the Kin3 protein can act together with the MRX complex in the Mec1/Tel1 pathway of DNA damage signaling.

I - INTRODUÇÃO

1. A LEVEDURA *Saccharomyces cerevisiae* COMO MODELO DE ESTUDO

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* vem sendo utilizada há anos como um excelente modelo para compreensão de diferentes processos celulares (Hieter, 1998; Resnick e Cox, 2000). Com o seqüenciamento completo de seu genoma, tornou-se uma referência para estudos de seqüenciamento de genes humanos e de outros eucariotos superiores (Goffeau *et al*, 1996).

S. cerevisiae é um organismo unicelular, que apresenta um ciclo eucariótico típico, completo e bem definido. Pertence ao grupo das leveduras anaeróbicas facultativas, tem a glicose como sua fonte preferencial de carbono e possui um perfil de crescimento bem característico. Durante o seu crescimento, a levedura apresenta uma fase “lag”, na qual ocorre uma adaptação fisiológica ao novo meio de cultura, o metabolismo das células está ativo, sintetizando enzimas e coenzimas, e criando as condições necessárias para a próxima fase, onde começará a divisão celular. Nesta próxima fase, a exponencial, o número de células aumenta exponencialmente com o tempo, utilizando a energia proveniente da fermentação. A partir da diminuição da disponibilidade de glicose no meio, ocorre a desrepressão catabólica (transição diáuxica), com a parada transitória da divisão celular, e o preparo das células para o metabolismo respiratório. A divisão celular é reiniciada em ritmo mais lento e a levedura passa a utilizar o etanol produzido durante a fermentação como fonte de carbono (fase pós-diáuxica). A fase estacionária inicia quando todas as fontes de carbono forem exauridas, e nessa fase, a levedura pode sobreviver por muito tempo na ausência de nutrientes (Pringle *et al*, 1997; De Wind *et al*, 1997; Fuge e Werner-Washbourne, 1997; Gancedo, 1998).

A capacidade de *S. cerevisiae* replicar tanto em estado haplóide quanto diplóide, permite o isolamento e manifestação de mutações recessivas em linhagens haplóides,

bem como conduzir testes de complementação fenotípica em linhagens diplóides (Figura 1).

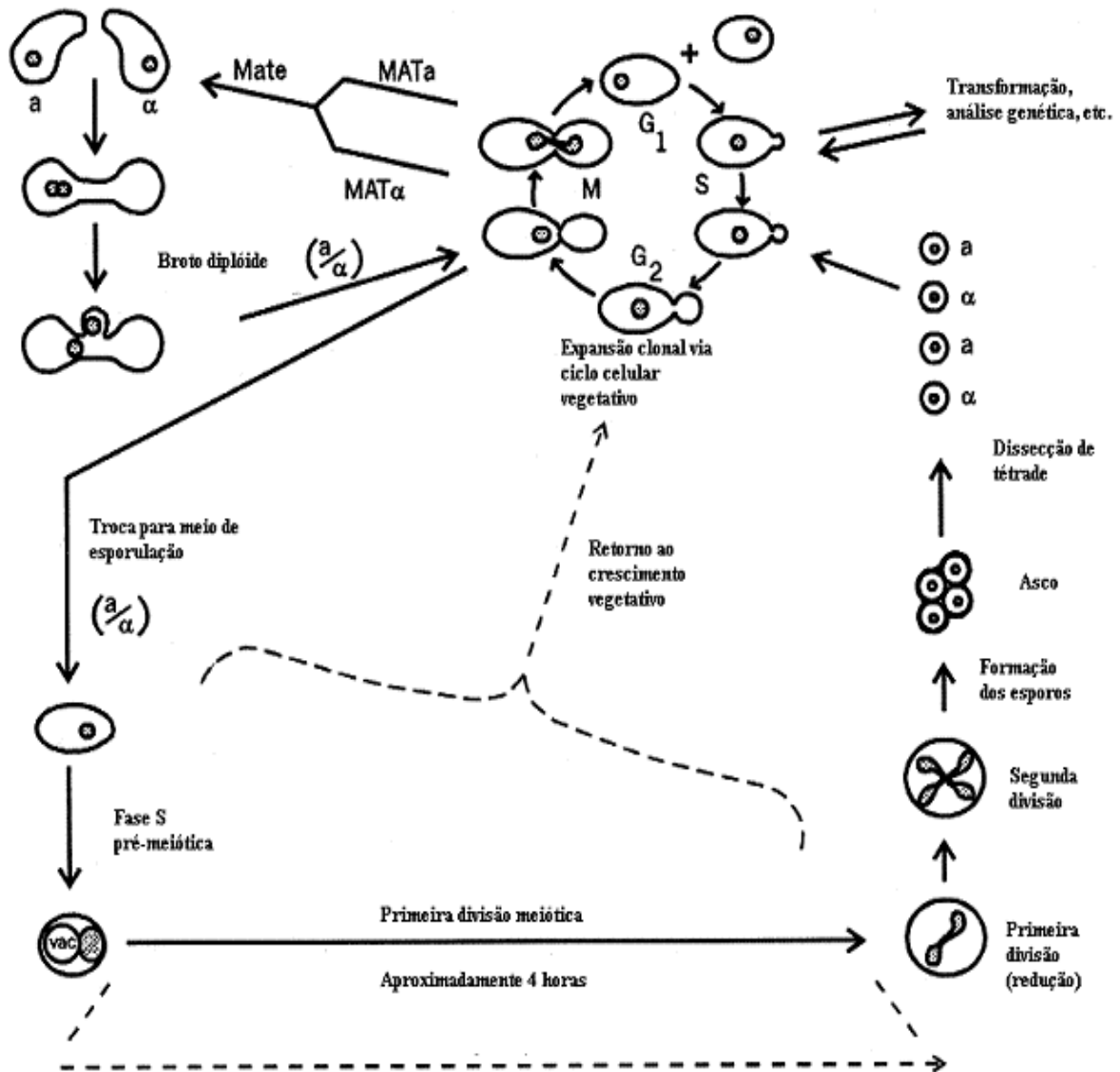


Figura 1. Ciclo celular da levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Células haplóides de sinais de acasalamento diferente ($MATa$ e $MAT\alpha$) podem formar células diplóides, capazes de esporular (meiose) e retornar ao crescimento vegetativo haplóide, permitindo análise genética da segregação (Adaptado de Dresser *et al*, 2000).

A facilidade de obtenção de mutantes faz com que este organismo seja um dos modelos eucarióticos melhor caracterizados geneticamente quanto à resposta celular aos

danos provocados no DNA. A disponibilidade de métodos de alta eficiência de transformação de leveduras possibilita a clonagem de genes por complementação genotípica. Além disso, o eficiente sistema de recombinação homóloga presente nas leveduras possibilita que sequências alteradas em genes clonados possam ser introduzidas novamente no cromossomo, na região homóloga correspondente. Com isso, consegue-se a rápida identificação de consequências fenotípicas de mutações em qualquer gene clonado. Além disso, a transformação de leveduras também pode ser conduzida com oligonucleotídeos sintéticos, permitindo a produção conveniente de numerosas formas alteradas de proteínas. O uso destas técnicas vem sendo amplamente explorado, permitindo análises desde regulação gênica a relação estrutura-atividade de proteínas, incluindo mutagênese e reparação de DNA (Ausubel *et al*, 1995; Pringle *et al*, 1997; Brown e Tuite, 1998; Burke *et al*, 2000).

2. LESÕES NO DNA

A instabilidade química característica da dupla hélice de DNA e a sua alta reatividade com uma série de agentes químicos e físicos, que emergiram surpreendentemente após a elucidação da sua estrutura por Watson e Crick, fazem com que os organismos estejam constantemente expostos a uma série de lesões em seu DNA. Além desta série de lesões ocasionadas por agentes exógenos (como luz ultravioleta, radiações ionizantes e agentes químicos), diversas fontes e processos endógenos (como radicais reativos, replicação e recombinação meiótica) contribuem para a diversidade de lesões que atingem o DNA das células a todo o momento (Figura 2; Friedberg *et al*, 2005, Friedberg, 2008).

Em nível celular, as lesões no DNA podem impedir processos como transcrição e replicação, resultando em parada do ciclo celular, morte celular ou mutações. Em nível de organismos, lesões no DNA têm sido implicadas em diversas doenças hereditárias, carcinogênese, desordens genéticas e envelhecimento (revisado por Altieri *et al*, 2008).

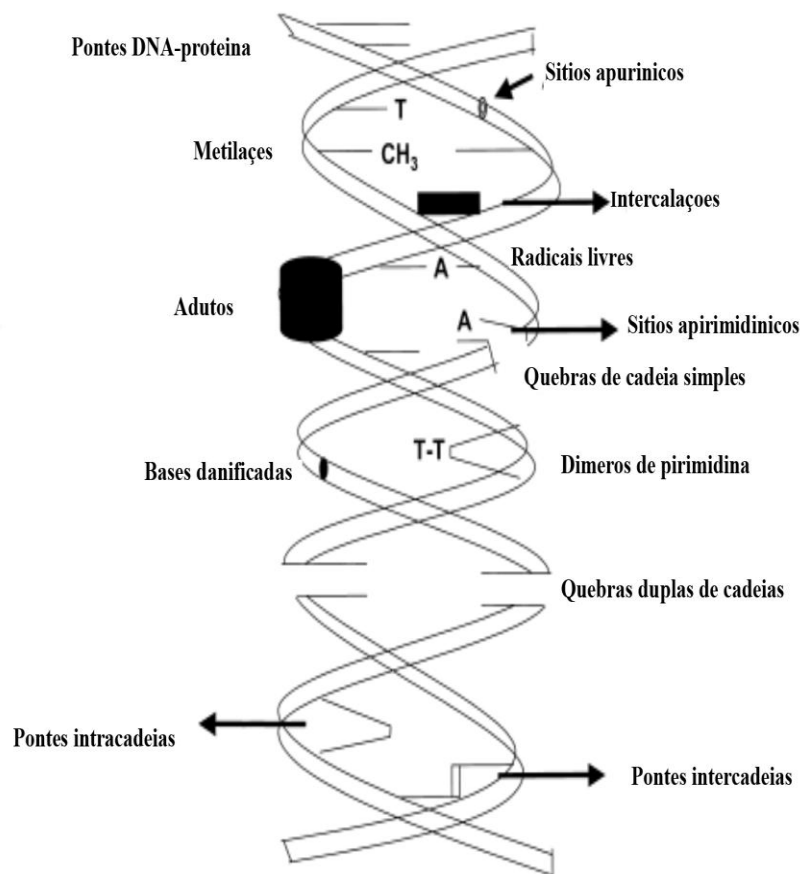


Figura 2. Tipos de lesões induzidas por diferentes agentes indutores de danos no DNA (Adaptado de Balajee e Bohr, 2000).

2.1 Bases modificadas

As bases modificadas no DNA representam uma ameaça às células, pelo fato de ocorrerem não só como resultado do ataque de agentes exógenos como também pelo ataque de espécies reativas de oxigênio geradas por reações espontâneas, levando à desaminação, hidrólise ou oxidação das bases no DNA (Figura 3; Slupphaug *et al*, 2003; Yonekura *et al*, 2009).

Radicalis hidroxil podem se ligar a guaninas e adeninas, nas posições 4,5 ou 8 do anel purínico, levando a uma diversidade de produtos. Uma das modificações de bases mais abundante é a 8-oxo-7,8-diidroguanina, também chamada 8-oxoguanina (8-oxoG) (Slupphaug *et al*, 2003). A 8-oxoG é uma base fracamente mutagênica, e leva

principalmente a substituições do tipo $G \rightarrow T$, e alternativamente, pode emparelhar erroneamente com uma adenina, produzindo uma substituição $A \rightarrow T$ (Cheng *et al*, 1992). Outra base modificada frequentemente encontrada, causada pela oxidação de pirimidinas induzida por radicais hidroxil é a timina-glicol (Tg). A principal alteração causada pela Tg é a modificação da estrutura do DNA, levando a um bloqueio no processo de replicação (McNulty *et al*, 1998).

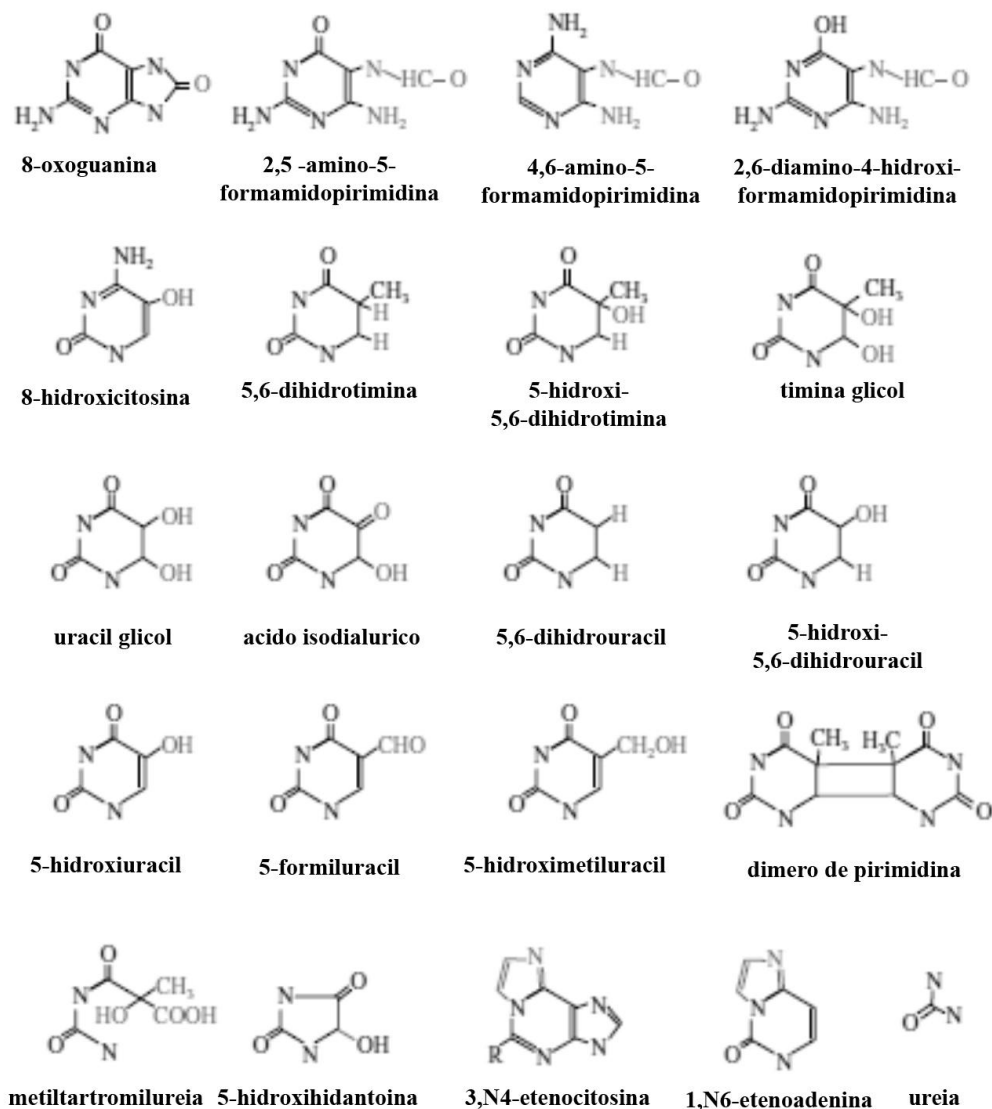


Figura 3. Exemplos de bases modificadas comumente encontradas no DNA, geradas pela ação de diferentes agentes (Adaptado de Slupphaug *et al*, 2003).

Outras alterações de bases que são formadas de uma maneira independente de oxigênio são os fotoprodutos diméricos. Os dois principais fotoprodutos no DNA

formados pela ação da radiação ultravioleta são os dímeros de pirimidina (*ciclo butane pyrimidine dimers* – CPD's) e os 6-4 fotoprodutos (*pyrimidine-(6,4)-pyrimidone photoproducts* – 6-4 PP's) (Figura 4; revisado por Altieri *et al*, 2008). Estes fotoprodutos estão entre as lesões no DNA mais comuns induzidas pelo meio ambiente, e, portanto são um dos principais perigos à saúde humana, sendo os CPD's mais citotóxicos e mutagênicos que os 6-4 PP's em células de mamíferos (Pfeifer *et al*, 2005).

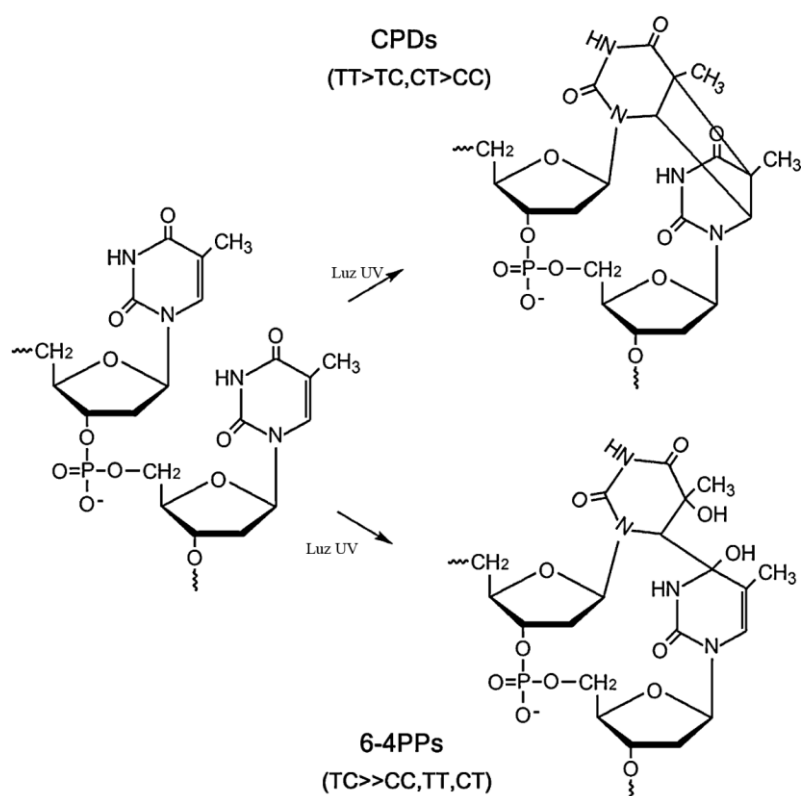


Figura 4. Principais lesões no DNA induzidas pela luz ultravioleta e a frequência com que ocorrem entre as bases. Dímeros de pirimidina (CPD's) e 6-4-piririmidina-pirimidona fotoprodutos (6-4 PP's) (Adaptado de Altieri *et al*, 2008).

2.2 Adutos mono e bi-funcionais

Os adutos no DNA são formados quando ocorre uma ligação covalente de determinadas substâncias com as bases nitrogenadas do DNA (Shärer, 2005). Os agentes formadores de adutos podem ser classificados de acordo com a sua capacidade

de ligação às moléculas de DNA, podendo ser monofuncionais, quando se ligam a apenas uma base nitrogenada (adutos monofuncionais), ou então bi- ou polifuncionais, quando tem a capacidade de ligação a duas bases nitrogenadas (adutos bifuncionais). No caso dos agentes bi-funcionais, a ligação pode ocorrer com duas bases situadas na mesma fita de DNA, levando a formação das pontes intracadeia, ou então, ligar-se a bases situadas em fitas opostas, formando as pontes intercadeias (interstrand cross links – ICL's) (Shärer, 2005).

Uma classe de substâncias capazes de gerar adutos são os agentes alquilantes, entre os quais pode-se destacar o metil metano sulfonato (MMS), o etil metano sulfonato (EMS) e a N-metil-N-nitrosouréia, os quais se ligam às bases do DNA através de grupos metila ou etila (Sanderson e Shield, 1996).

Os agentes bifuncionais possuem a capacidade de formar tanto monoadutos quanto pontes intra ou intercadeias de DNA, e são amplamente utilizados na terapêutica, principalmente no tratamento de tumores. Exemplos destes agentes são a cisplatina, as mustardas nitrogenadas bifuncionais, a ciclofosfamida e a mitomicina C (Sanderson e Shield, 1996; Dronkert e Kanaar, 2001).

A cisplatina (*cis*-diaminodicloroplatino – *cis*-DDP) vem sendo utilizada há anos no tratamento de diferentes tipos de tumores (revisado por Wang e Lippard, 2005). Os adutos mais freqüentes formados são as pontes intracadeia entre resíduos de guaninas em sequências 5'-GG-3' ou 5'-GNG-3' e entre adenina e guanina em sequências 5'-AG-3', representando aproximadamente 90% dos adutos formados. A cisplatina também possui a capacidade de formar pontes intercadeias, porém em menor extensão (5 a 8% do total de adutos) (Figura 5; para revisão ver Dronkert e Kanaar, 2001; Wang e Lippard, 2005; Noll *et al*, 2006).

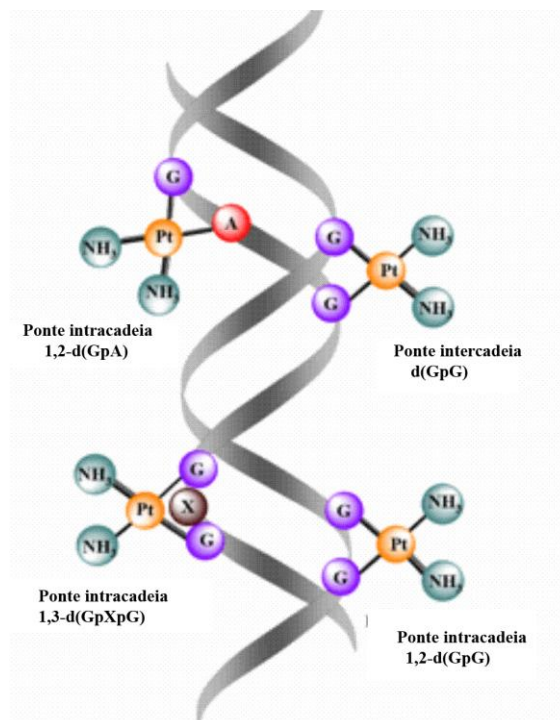


Figura 5. Formação de adutos entre cisplatina e DNA (Adaptado de Boulikas *et al*, 2007).

As mustardas nitrogenadas bifuncionais são agentes alquilantes que contêm um grupamento funcional N,N-bis-(2-cloroetil) amino reativo. Exemplos clínicos importantes dessa classe de drogas são a mecloretamina (HN2), o clorambucil e a ciclofosfamida (Noll *et al*, 2006). A HN2 é uma droga amplamente utilizada em estudos, como um agente indutor de danos no DNA (Povirk e Schuker, 1994), possui a capacidade de formar monoadutos, principalmente na posição N7 de guaninas, enquanto a formação de ICL's ocorre principalmente com resíduos de guaninas em sequências 5'-GNC-3' do DNA (Figura 6) . Os monoadutos são as principais lesões formadas, constituindo cerca de 90% das lesões, sendo que as pontes intra e intercadeias correspondem apenas a uma pequena fração do total de lesões (Dronkert e Kanaar, 2001; revisado por Noll *et al*, 2006).

Os psoralenos, ou furocumarinas, são compostos aromáticos tricíclicos, planares, de origem natural ou sintética. A estrutura planar e natureza hidrofóbica destes compostos fazem com que tenham a capacidade de se intercalar entre os pares de bases do DNA. Na presença de luz ultravioleta de 365nm (UVA), adicionam-se às bases pirimidínicas, através de ligações covalentes, formando diferentes tipos de adutos. A

extensão e natureza dos adutos formados, e a sua distribuição entre monoadutos ou pontes intercadeias, dependem do derivado psoraleno utilizado, da seqüência de ácidos nucleicos no DNA e da dose e comprimento de onda da radiação utilizada (Figura 7). Os psoralenos monofuncionais, como a angelicina, formam somente monoadutos, enquanto psoralenos bifuncionais, como o 8-metoxipsoraleno (8-MOP), formam tanto monoadutos como pontes intercadeias. (revisado por Bethea *et al*, 1999; Noll *et al*, 2006).

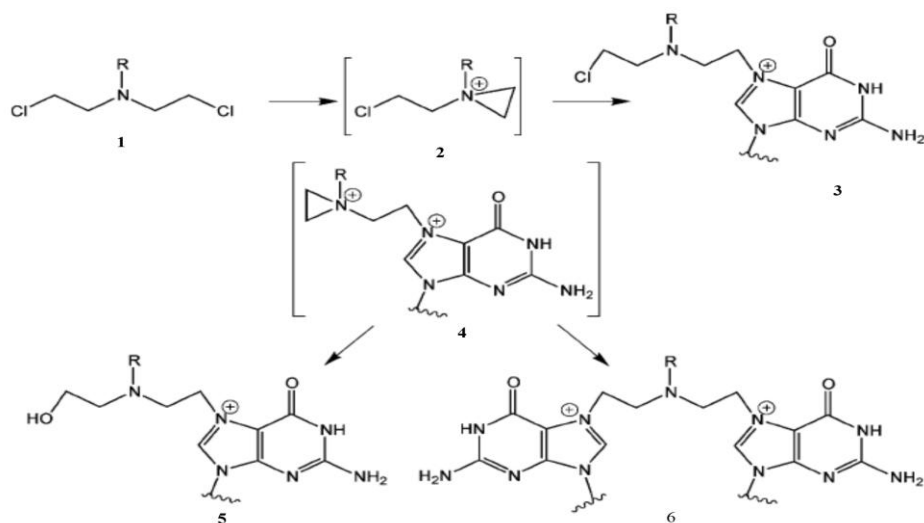


Figura 6. Formação de ICL's a partir de mostardas nitrogenadas. A mostarda nitrogenada (no caso de mecloretamina (1) R= CH₃) reage com os resíduos de guanina via intermediário aziridínio (2) para formar um derivado guanina N7-alkilado (3). Este monoaduto pode então formar outro intermediário aziridínio (4), que pode reagir com água para formar um 2-hidroxietil monoaduto (5) ou com um segundo resíduo de guanina para formar a ICL (6) (Adaptado de Noll *et al*, 2006).

2.3 Quebras simples e duplas de DNA

As lesões do tipo quebras de cadeia de DNA podem ser divididas em dois grupos: as quebras simples (*single strand breaks* – SSB's) e quebras duplas (*double strand breaks* - DSB's), e podem ocorrer como resultado de diferentes processos, como o ataque de um agente químico ou físico à ponte fosfodiéster, pelo bloqueio do

processo de replicação do DNA ou ainda pela ação de enzimas, como as envolvidas em mecanismos de reparação ou as que atuam no metabolismo geral do DNA (Dudáš e Chovanec, 2004; Caldecott, 2008).

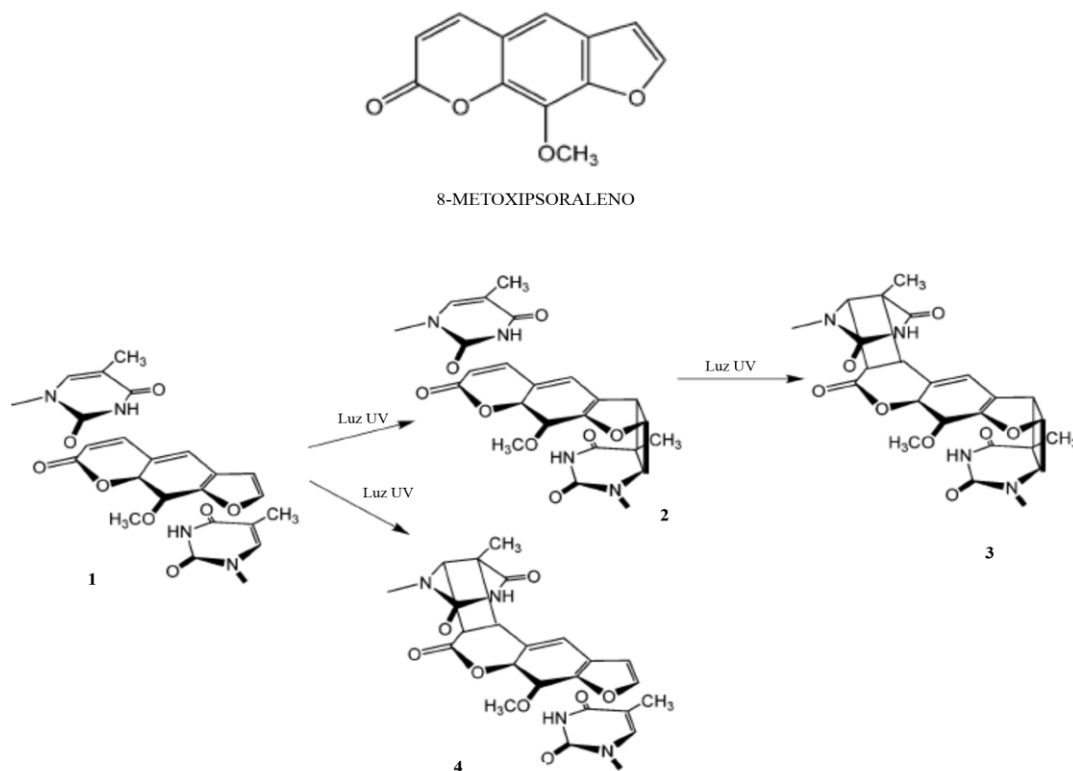


Figura 7. 8-metoxipsoraleno e formação de adutos e ICL. Após a intercalação do 8-MOP entre duas timinas (1), a absorção de luz ultravioleta pela droga ocasiona uma reação de ciclo-adição entre o anel furano ou pirona da timina adjacente, levando a formação de um monoadduto contendo uma ponte ciclobutano. O monoadduto-furano (2) pode absorver um segundo fóton de luz, levando a uma segunda ciclo-adição entre a ligação dupla da pirona e a timina da cadeia oposta, resultando na formação de uma ICL (3). No caso do monoadduto-pirona (4), a absorção de um segundo fóton de luz não é possível, e o mesmo permanece como monoadduto (Adaptado de Noll *et al*, 2006).

Uma das fontes mais comuns de SSB's é o ataque oxidativo por espécies reativas de oxigênio (*reactive oxygen species* - ROS) endógenas, e no caso de ROS derivadas do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) as SSB's ocorrem com uma frequência três vezes maior que a formação de DSB's. As SSB's também podem ocorrer diretamente,

pela desintegração de açúcares oxidados, ou indiretamente, durante o reparo por excisão de bases. Ainda, a atividade errônea ou abortiva de enzimas como a DNA topoisomerase também pode levar a formação de SSB's. As SSB's são menos tóxicas para a célula que as DSB's, principalmente pelo fato de serem reparadas rapidamente, caso contrário, podem levar a formação de DSB's (revisado por Caldecott, 2008).

As lesões do tipo DSB's representam uma séria ameaça à viabilidade celular e à estabilidade genômica, e são consideradas as lesões mais tóxicas para a célula (Dudáš e Chovanec, 2004; Shrivastav *et al*, 2008). Estas lesões são geradas naturalmente quando (i) a forquilha de replicação se apresenta bloqueada pela presença de lesões, (ii) durante rearranjos programados do genoma (incluindo a recombinação V(D)J e a meiose), (iii) pelo estresse físico gerado quando cromossomos dicêntricos ou concatenados são atraídos a pólos opostos durante a mitose, (iv) quando as células são expostas a agentes que danificam o DNA, como radiação ionizante (que induz a formação de DSB's diretamente e indiretamente via formação de ERO), agentes químicos e luz UV que criam lesões que bloqueiam a forquilha (adutos, dímeros de pirimidina e ICL's), ou drogas quimioterápicas que inibem a topoisomerase I ou II (revisado por Shrivastav *et al*, 2008).

3. Mecanismos de reparação de DNA

Como visto no item anterior, o DNA é constantemente atacado por metabólitos reativos endógenos, drogas terapêuticas e uma série de mutágenos ambientais, os quais impactam a sua integridade. As modificações causadas por estes agentes resultam em uma diversidade de lesões, as quais, se não forem corretamente reparadas ou removidas, podem levar a mutações e/ou morte celular.

De um modo comum, o termo reparação de DNA tem sido usado para envolver a totalidade de múltiplas e diversas vias pelas quais as células respondem a insultos genéticos (Friedberg *et al*, 2005). Contudo, falando de uma maneira exata, reparação de DNA é um termo bioquímico que define processos biológicos durante os quais

alterações na química do DNA são removidas e a integridade do genoma é restaurada (Friedberg, 2008).

Mutações em genes envolvidos em reparação de DNA são responsáveis pelo desenvolvimento de tumores e várias doenças hereditárias, caracterizadas por complexas alterações metabólicas (Christmann *et al*, 2003). Da mesma forma, genes de reparo e suas proteínas correspondentes são ainda responsáveis pelo desenvolvimento de resistência a drogas citostáticas em células tumorais (revisado por Altieri *et al*, 2008).

A reparação do DNA é um processo bioquimicamente complexo, que emprega inúmeras proteínas com funções distintas, tanto espacialmente quanto temporalmente. Conforme a natureza do dano ou a sua extensão, determinados complexos protéicos serão preferencialmente utilizados. Estes complexos protéicos definem as chamadas “vias de reparação do DNA”, e são responsáveis pela manutenção do genoma em quaisquer condições fisiológicas. Interessantemente, uma sobreposição funcional entre as diferentes vias de reparação é regra na célula em vez de exceção, de forma que vários genes ou complexos atuem ao mesmo tempo na reparação de diferentes danos (Lindahl e Wood, 1999; Slupphaug *et al*, 2003).

As interações gênicas entre os genes envolvidos na reparação de DNA são definidas de acordo com a resposta que uma linhagem mutante apresenta em resposta a um determinado agente genotóxico. Quando um duplo mutante é construído de simples mutantes pertencentes ao mesmo grupo de epistasia, ele não deve ser mais sensível ao agente que o simples mutante mais sensível dos simples mutantes. Isto indica que estes dois genes estão envolvidos em etapas seqüenciais de uma rota bioquímica ou, então, que fazem parte de um complexo multimérico ou multiprotéico. Entretanto, quando os simples mutantes pertencem a grupos epistáticos distintos e competem pelo mesmo tipo de lesão, a dupla mutação resulta em uma sensibilidade aumentada, chamada sinérgica. Um terceiro tipo de interação pode ser identificado quando o duplo mutante apresenta uma sensibilidade que corresponde à soma das sensibilidades dos simples mutantes. Esta interação é dita aditiva e ocorre quando cada mutação bloqueia uma via diferente de reparação, mas não competem pelo mesmo substrato (Figura 8, Henriques e Moustachi, 1981; Henriques e Brendel, 1990; Friedberg *et al*, 2005; Revers, 2003).

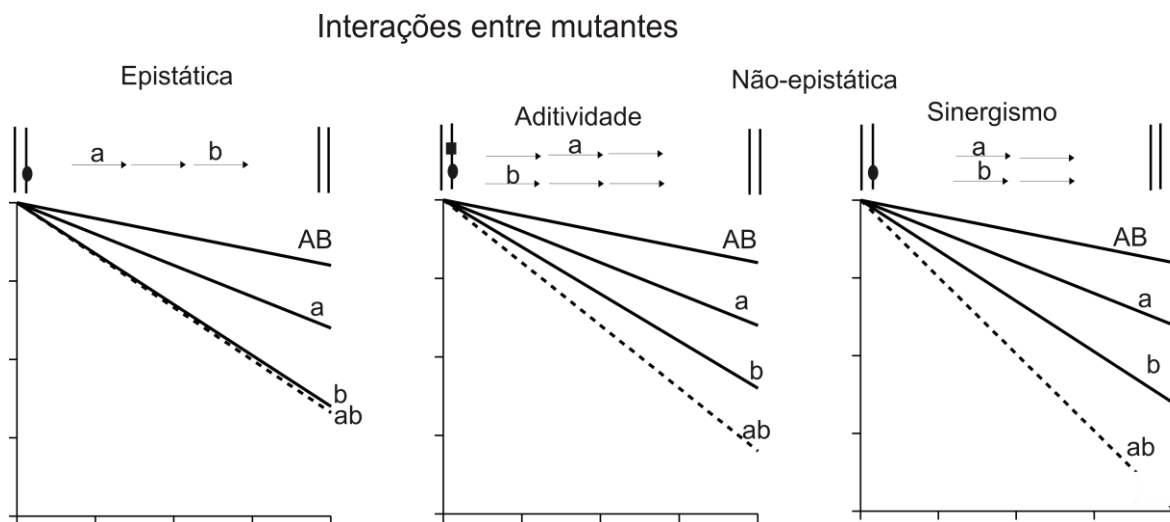


Figura 8. Representação gráfica dos três tipos de interações gênicas possíveis em linhagens duplo mutantes em genes que participam em processos de reparação de DNA.

O estudo de alelismo entre simples mutantes sensíveis à radiação, bem como das interações de epistasia e sinergismo entre duplos e triplos mutantes estabeleceram três grupos de epistasia na reparação de lesões, os quais correspondem às três principais respostas celulares referentes a danos no DNA: reparação por excisão de nucleotídeos (via *RAD3*), reparação por recombinação ou reparação de quebras de cadeia (via *RAD52*) e reparação pós-replicativa e/ou mutagênica (via *RAD6*) (para revisão ver Friedberg *et al*, 2005).

Estas vias de reparação incluem: (i) reparação direta; (ii) reparação de emparelhamento incorreto de bases (mismatch repair – MMR); (iii) reparação por excisão de bases (base excision repair – BER); (iv) reparação por excisão de nucleotídeos (nucleotide excision repair – NER); (v) reparação por recombinação homóloga (homologous recombination – HR); (vi) reparação por recombinação não-homóloga (non-homologous end joining – NHEJ) e (vii) síntese translesão (Figura 9; Friedberg *et al*, 2005).

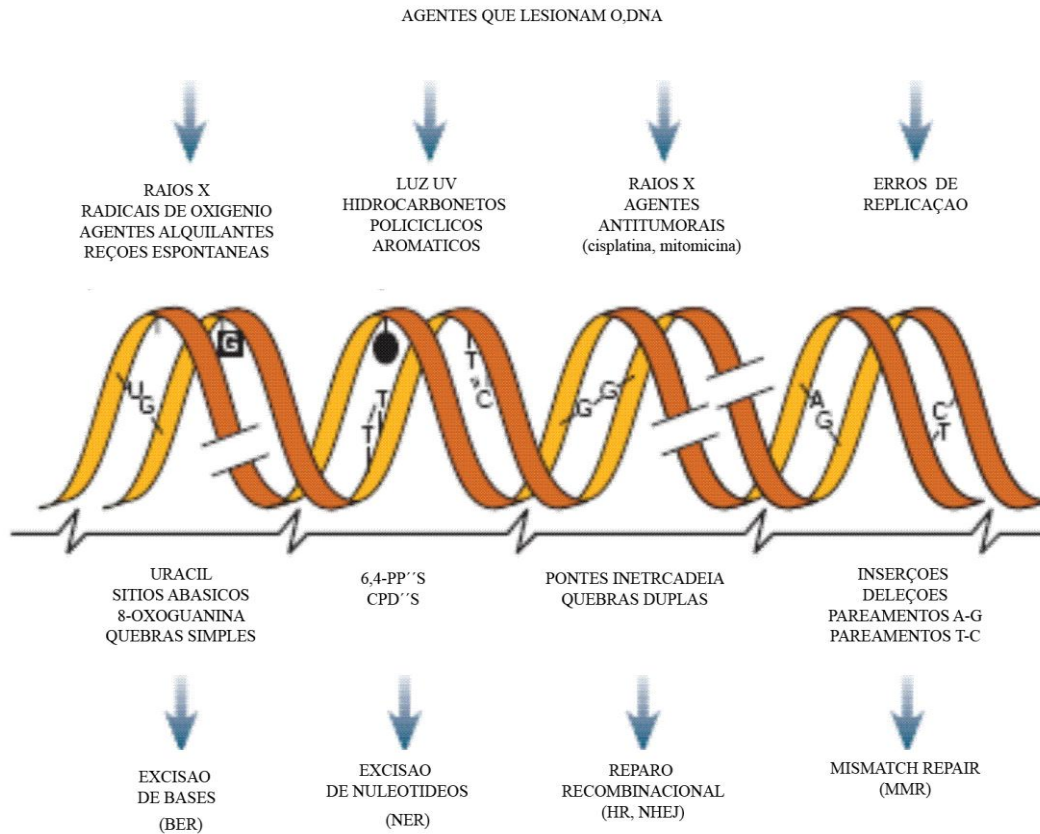


Figura 9. Agentes que lesionam o DNA, lesões no DNA e principais mecanismos de reparação. Cada agente pode induzir diferentes tipos de lesões, assim como diferentes agentes podem induzir lesões similares, que são reparadas através de uma via ou pela sobreposição de um ou mais vias. Além dos mecanismos exemplificados na figura, ainda podem ser utilizados outros mecanismos, como a reparação direta e a reparação pós-replicativa (síntese translesão) (Adaptado de Hoejmakers, 2001).

3.1 Reparação direta

A reparação direta, ou reversão direta do dano no DNA é tida como o mais simples mecanismo de reparação, envolvendo enzimas simples que conseguem reparar lesões sem que seja necessária a incisão da cadeia açúcar-fosfato do DNA ou a excisão de bases. A simplicidade relativa deste mecanismo prediz um processo essencialmente livre de erro, entretanto, abrange um limitado número de substratos. Os principais tipos de reparação direta de danos são (i) reversão direta de bases alquiladas, que remove

lesões geradas por agentes alquilantes, os quais transferem grupos metil ou etil a guaninas, e (ii) reparação de fotoprodutos (revisado por Eker *et al*, 2009).

A reparação de fotoprodutos, ou fotoreativação enzimática, é um processo no qual os dímeros de pirimidina (CPD's) e os 6-4 fotoprodutos (6-4 PP's), gerados pela exposição à luz UV, são removidos do genoma. Neste tipo de reparação, a remoção do dano resulta em uma monomerização do dímero, catalisada pelas enzimas pertencentes à família das fotoliasas/criptocomas. As fotoliasas são encontradas em bactérias, *S. cerevisiae*, *Drosophila melanogaster*, marsupiais e em inúmeras plantas, mas não em mamíferos superiores, incluindo *Homo sapiens* (para revisão, ver Thompson e Sancar, 2002; Christmann *et al*, 2003; Friedberg *et al*, 2005, Eker *et al*, 2009).

3.2 Reparação de bases mal emparelhadas

Apesar da grande fidelidade do pareamento de bases do DNA, conforme Watson e Crick, ligações alternativas entre hidrogênios podem ocasionalmente ocorrer. O sistema de *mismatch repair* (MMR) é responsável pela remoção de bases mal emparelhadas causadas por reações espontâneas ou induzidas de desaminação, oxidação, metilação, ou ainda erros de replicação. O processo básico de MMR envolve o reconhecimento da base mal emparelhada, sua incisão e a síntese de reparo (revisado por Christmann *et al*, 2003).

3.3 Reparação por excisão de bases

A via de reparação por excisão de bases (*base excision repair* – BER) é um dos processos mais ativos de reparação de DNA, que permite o reconhecimento específico e excisão de apenas uma base danificada no DNA. Em leveduras e mamíferos, BER é a principal via de remoção de danos gerados pelo metabolismo normal das células (Boiteux e Guillet, 2004), sendo também responsável pela remoção de bases danificadas geradas pela exposição a agentes exógenos, como agentes alquilantes, radiação ionizante e luz UV (Christmann *et al*, 2003)

A via BER parece ser a mais simples e completamente definida de todas as vias de reparação, consistindo de apenas 5 passos básicos, catalisados por diferentes

enzimas. Em um primeiro passo, a base danificada é removida por uma classe de enzimas, as DNA glicosilases, gerando um sítio apurínico/apirimidínico (sítios AP). Estes sítios AP são processados por uma AP-endonuclease, levando a interrupções de cadeia simples, que são então preenchidas por uma DNA polimerase, em uma via curta (short patch BER), preenchendo um trecho de apenas um nucleotídeo, ou uma via longa (long patch BER), que substitui de 2 a 13 nucleotídeos, seguido então de um passo de ligação (Figura 10; Memisoglu e Samson, 2000; Boiteaux e Guiller, 2004; revisado por Altieri *et al*, 2008).

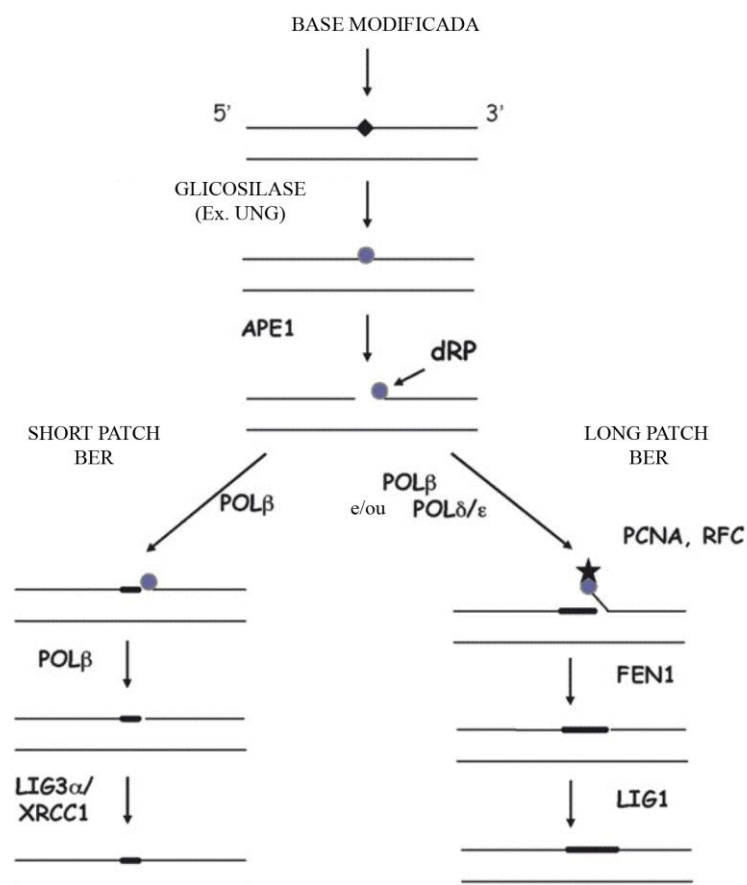


Figura 10. Mecanismo de reparação por excisão de bases: sub-vias short-patch BER e long-patch BER. A base danificada é incisada pela ação de uma glicosilase, gerando um sítio apurínico/apirimidínico, que é processado por uma endonuclease. Ocorre então o preenchimento por uma polimerase, seguido do passo de ligação (Adaptado de Wilson III e Bohr, 2007)

3.4 Reparação por excisão de nucleotídeos

A via de reparação por excisão de nucleotídeos (*nucleotide excision repair* – NER) possui a habilidade de eliminar uma grande variedade de lesões que alteram significativamente a estrutura do DNA. Dentre estas lesões, as mais relevantes são os fotoprodutos formados entre pirimidinas adjacentes, induzidas pela luz UV (CPD's e 6-4 PP's). O NER ainda pode remover adutos químicos volumosos como aqueles induzidos por hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, como o benzopireno presente na fumaça do cigarro, e também adutos e pontes intra e intercadeias induzidas por diversos outros agentes, como a cisplatina, as mostardas nitrogenadas e os psoralenos (para revisão, ver Prakash e Prakash, 2000; Christmann et al, 2003; Noll *et al*, 2006; Nospikel, 2009).

O mecanismo de NER envolve a ação de 20 a 30 proteínas em passos sucessivos: (i) reconhecimento do dano no DNA e montagem de um complexo multiprotéico no local da lesão; (ii) dupla incisão da cadeia de DNA, pela ação de endonucleases, em ambos os lados 5' e 3', e remoção do oligonucleotídeo contendo a lesão, (iii) preenchimento do espaço vazio, e (iv) ligação das cadeias (revisado por Altieri *et al*, 2008; Nospikel, 2009).

Existem duas sub-vias da via NER: a reparação global do genoma (*global genome repair* - GGR) e a reparação acoplada à transcrição (*transcription-coupled repair* – TCR). A via GGR atua na reparação do genoma como um todo, enquanto a via TCR atua na reparação de genes ativamente transcritos, sendo que estas duas vias diferem apenas no passo inicial de reconhecimento da lesão no DNA.

A via GGR é iniciada pelo reconhecimento de um sítio de dano no DNA por proteínas específicas, que tem a capacidade de discernir entre regiões danificadas ou não, identificando adutos volumosos que causam distorções na dupla-hélice. Em mamíferos, esse reconhecimento é feito por um complexo que consiste de três subunidades: XPC, HR23B e centrin-2. Tem sido observado que lesões do tipo 6-4-PP's, que induzem um maior distorção da hélice, são reconhecidas e reparadas muito mais rapidamente que os CPD's. Outro fator que coopera no reconhecimento das lesões é o complexo DDB, que tem a capacidade de reconhecer lesões que causam distorções menores na hélice, como os CPD's. Já no TCR, a presença da lesão resulta no bloqueio da RNA polimerase. Isto leva a montagem de um complexo no sítio da lesão,

envolvendo as proteínas CSA, CSB e/ou TFIIS. Após o reconhecimento inicial das lesões, ocorre o recrutamento das demais proteínas da maquinaria NER, que promovem a excisão da lesão, preenchimento da fenda pela polimerase, seguida de um passo final de ligação (Figura 11; para revisão, ver Christmann *et al*, 2003; Altieri *et al*, 2008, Schuck *et al*, 2008, Nospikel, 2009).

Defeitos em genes da via NER estão ligados a doenças genéticas raras, como Xeroderma Pigmentosum (XP), Tricotiodistrofia (TTD) e Síndrome de Cockayne (CS). Mutações em no mínimo 11 dos genes envolvidos na via NER estão associadas às manifestações clínicas destas doenças, os quais demonstram algumas similaridades, bem como algumas diferenças marcantes. Em geral, os pacientes apresentam anormalidades neurológicas complexas, como desenvolvimento retardado e degeneração neurológica progressiva, envelhecimento precoce, alta foto sensibilidade e predisposição ao câncer (para revisão, ver Prakash e Prakash, 2000; Christmann *et al*, 2003; Altieri *et al*, 2008; Schuck *et al*, 2008; Nospikel, 2009).

3.5 Reparação de quebras duplas

As quebras duplas de cadeia (DSB's) correspondem ao tipo de lesão mais tóxico para o DNA. A falha em reparar as DSB's, ou a reparação incorreta, pode resultar em grandes alterações cromossômicas, incluindo deleções, translocações, e fusões cromossômicas que aumentam a instabilidade genômica e são características próprias de células tumorais.

Para combater estes efeitos deletérios, as principais vias envolvidas na reparação de DSB's são a recombinação homóloga (*homologous recombination* – HR) e a recombinação não homóloga (*non-homologous end-joining* – NHEJ). A diferença fundamental entre estas vias é o requerimento de uma sequência homóloga. A via HR recupera a informação genética de uma sequência homóloga não danificada (cromátide irmã ou cromossomo homólogo), enquanto a via NHEJ recupera DSB's via ligação direta das extremidades quebradas, sem qualquer requerimento de homologia. (para revisão, ver Hopfner *et al*, 2002; Dudáš e Chovanec, 2004; Shrivastav *et al*, 2008).

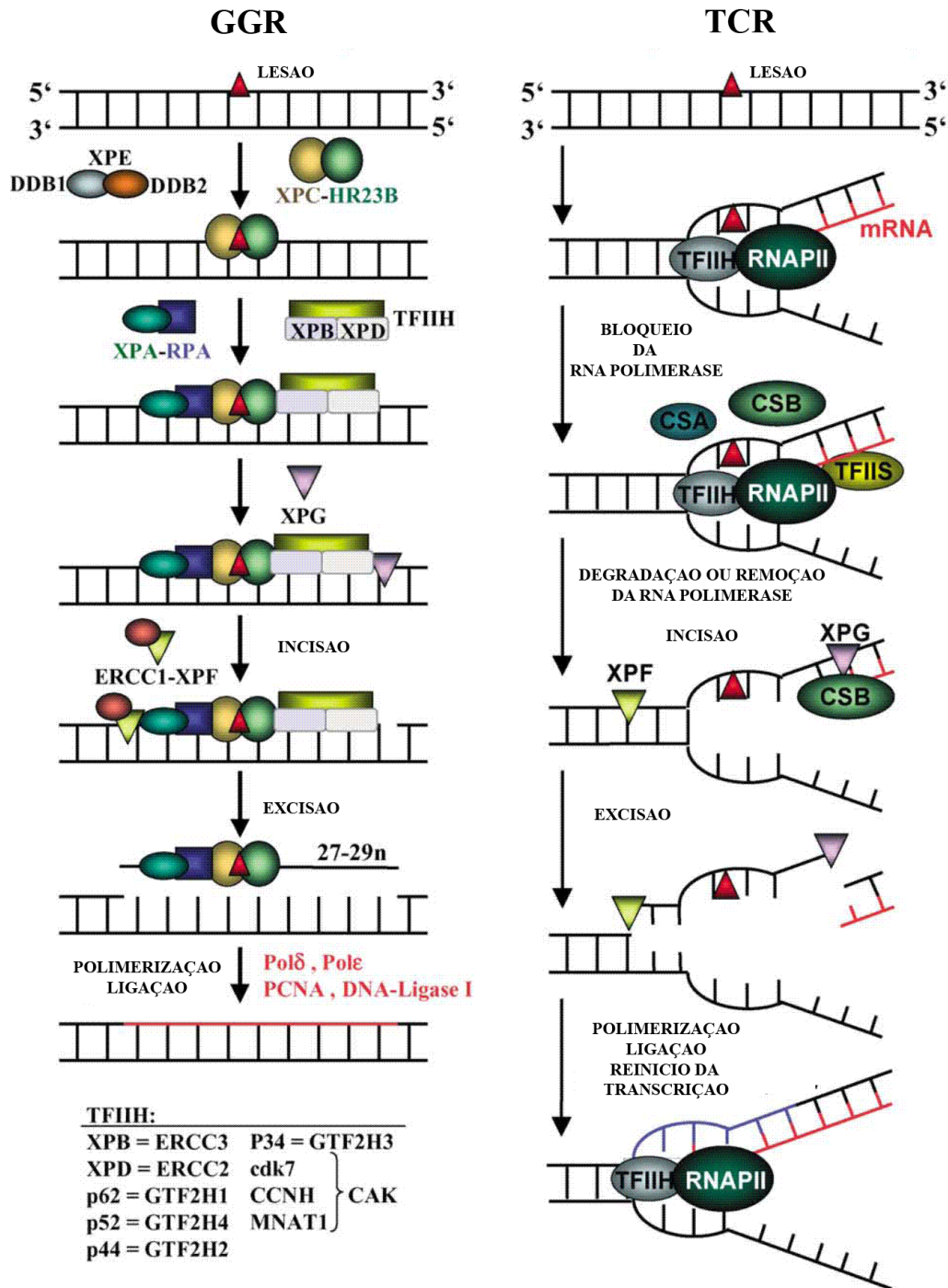


Figura 11. Representação esquemática da via NER. As duas vias apresentam o mesmo mecanismo de reparação com diferença apenas no passo inicial de reconhecimento da lesão. No GGR, o complexo XPC/HR23B em cooperação com XPE e DDB1 reconhecem a lesão. O passo seguinte é a demarcação da lesão, através da formação de um complexo que inclui XPA, RPA e o fator de transcrição TFIIH, mantendo as cadeias separadas. No passo final, a cadeia danificada é excisada, pelas endonucleases XPG e XPF/ERCC1. A fenda resultante é preenchida pela DNA polimerase e as fitas são seladas pela DNA ligase. No TCR, a RNA polimerase II bloqueada no sítio do dano, é assistida pelas proteínas CSA (ERCC8) e CSB (ERCC6). A remoção da RNA

polimerase permite o acesso dos demais componentes da maquinaria NER, e é seguida pelos passos de excisão, polimerização e ligação, permitindo o reinício da transcrição (adaptado de Christmann *et al*, 2003).

Outras possibilidades na reparação de DSB's são a síntese dependente de anelamento de cadeia (*synthesis-dependent strand-annealing* – SDSA) e a reparação de quebras induzidas pela replicação (*break induced replication* – BIR), que podem ser consideradas sub-vias da HR (para revisão ver Li e Heyer, 2008). Já o anelamento de cadeia simples (*single strand annealing* – SSA) é a possível via de reparação de DSB's que ocorrem em genomas que contem muitas seqüências repetidas (para revisão, ver Shrivastav *et al*, 2008).

Os mecanismos de reparação são conservados através da evolução e operam em uma variedade de organismos, incluindo procariotos e eucariotos. A contribuição relativa para a reparação de DSB's, entretanto, difere significativamente dependendo do organismo. Enquanto HR desempenha um papel principal em procariotos e eucariotos inferiores, opera raramente em células somáticas de eucariotos superiores, na qual a reparação de DSB é principalmente via NHEJ. A via NHEJ, apesar de identificada em eucariotos inferiores, como as leveduras *S. cerevisiae* e *Schizosaccharomyces pombe*, e também em bactérias, serviria nestes organismos principalmente como um sistema de reserva para reparação de DSB's (revisado por Dudáš e Chovanec, 2004). As possíveis explicações para estas diferenças podem ser devido ao fato de que eucariotos superiores possuem genomas grandes e complexos, que fazem com que a busca pela homologia na HR possa ser ineficiente. Ainda, eucariotos superiores contêm um alto nível de seqüências repetidas, constituindo uma fonte potencial de instabilidade genética, caso a reparação de DSB's ocorra por recombinação ectópica (revisado por Pardo *et al*, 2009).

3.5.1 Recombinação homóloga

O processo de recombinação homóloga desempenha papel essencial na manutenção da estabilidade genômica de organismos eucariotos e procariotos. A função primária da HR em células mitóticas é reparar DSB's ou quebras simples de cadeia. Ainda, é requerida para manutenção dos telômeros, e conseqüentemente, para a

proliferação na ausência de telomerase. Durante a meiose, a HR é essencial para estabelecer a conexão entre os cromossomos homólogos, permitindo sua correta separação na primeira divisão meiótica. Além disso, a alta frequência de recombinação meiótica contribui para a diversidade, pela criação de novos arranjos entre genes, ou partes de genes (revisado por Krogh e Symington, 2004).

A HR promove a reparação de DSB's em um processo livre de erro, já que utiliza a informação de uma fita homóloga como molde. Os genes centrais na HR são os genes do grupo de epistasia *RAD52* (*RAD50*, *RAD51*, *RAD52*, *RAD54*, *RDH54/TIDI*, *RAD55*, *RAD57*, *RAD59*, *MRE11* E *XRS2*), a maioria dos quais foram identificados pelo requerimento na reparação de dano no DNA induzido por radiação ionizante em *S. cerevisiae*, sendo este grupo de genes altamente conservado entre os eucariotos (revisado por Krogh e Symington, 2004).

A acessibilidade a uma fita molde influencia a eficiência da HR, por isso, células auto-regulam a HR durante as fases S e G2 do ciclo celular, quando as cromátides-irmãs estão disponíveis, sendo estas o molde preferido para a HR tanto em leveduras quanto mamíferos (Kadik e Hartwell, 1992; revisado por Shiravastav *et al*, 2008).

A recombinação homóloga é iniciada pela ressecção das extremidades das quebras duplas pelo complexo MRX(N) (*Mre11/Rad50/Xrs2* em *Saccharomyces cerevisiae*, *Mre11/Rad50/Nbs1* em mamíferos). Imediatamente após a ressecção, ocorre a ligação de diversas unidades da proteína RPA (*replication protein A*), eliminando estruturas secundárias da cauda de DNA de fita simples. Em um processo mediado por *Rad52*, *Rad55* e *Rad57*, a proteína *Rad51* substitui a proteína RPA e forma um filamento de nucleoproteína, que invade a sequência complementar da cromátide-irmã, num processo facilitado por *Rad54*, formando um heteroduplex de DNA. *Rad51* é o principal fator na maioria dos eventos de reparação dirigidos por homologia e direciona a cauda de DNA de fita simples com extremidade 3' pela procura, invasão e pareamento com a sequência homóloga não danificada, portanto facilitando a recombinação entre as cadeias. Este processo de invasão das cadeias e formação de um heteroduplex de DNA leva a formação de uma estrutura *D-loop*. Após a formação desta estrutura, a extremidade 3' anelada é estendida pela síntese de reparação. Do outro lado da estrutura *D-loop*, forma-se uma estrutura em "X", as junções de Holliday, que podem se mover ao longo da cadeia de DNA, sendo clivadas por resolvases, gerando produtos com ou

sem *crossing over* (Figura 12, para revisão ver Christmann *et al*, 2003; Krogh e Symington, 2004; Dudáš e Chovanec, 2004; Altieri *et al*, 2008; Li e Heyer, 2008).

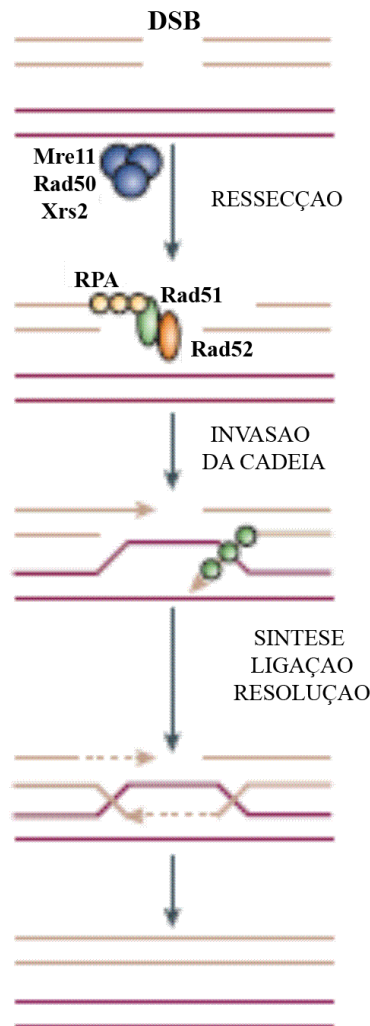


Figura 12. Esquema geral da recombinação homóloga. Após a ressecção das extremidades pelo complexo MRX, ocorre a formação do nucleofilamento de proteína Rad51 e busca pela sequência homóloga na cadeia molde. O processo é seguido pela síntese da nova cadeia, ligação das extremidades e resolução das junções de Holliday (modificado de Attikum e Gasser, 2005).

3.5.2 Recombinação não-homóloga

A via de recombinação não-homóloga (NHEJ) é a via de reparação de DSB's através da re-ligação das duas extremidades quebradas. Como visto anteriormente, esta é a principal via para reparação de DSB's em eucariotos superiores. A NHEJ possui a

capacidade de ligar quaisquer tipos de extremidades de DSB's, sem o requerimento de seqüências homólogas, como a via oposta, a HR. Entretanto, é considerada uma via de reparação sujeita a erro, pelo fato de poder ocasionar pequenas inserções ou deleções (Pastwa e Blasiak, 2003).

O substrato para a via NHEJ são extremidades de cadeia dupla com processamento limitado, enquanto para HR, os substratos são caudas de cadeia simples com extremidades 3' livres, geradas por uma extensiva ressecção 5'. Essa ressecção 5' é irreversível, e pelo menos em leveduras, é um mecanismo que canaliza a reparação das DSB's para HR (Frank-Vaillant e Marcand, 2002). Na fase G1 do ciclo celular, esta ressecção é ineficiente, e conseqüentemente, os eventos de HR são raros, favorecendo a reparação via NHEJ (Aylon et al, 2004). Já a via HR é preferencialmente utilizada durante as fases S e G2 do ciclo celular, devido à disponibilidade das cromátides-irmãs, e a possibilidade de ressecção das extremidades nestas fases, indicando que ocorre uma auto-regulação do processo de ressecção pela presença das cromátides-irmãs. No entanto, a via NHEJ ainda permanece ativa durante estas fases, indicando que pode competir para a reparação de DSB's mesmo com a presença de moldes homólogos próximos a lesão (Takata *et al*, 1998; revisado por Shiravastav *et al*, 2008; Pardo *et al*, 2009).

Para efetuar a reparação, a via NHEJ utiliza diversas proteínas que carregam funções estruturais de estabilização, bem como de degradação, polimerização e ligação. A maquinaria NHEJ utiliza o mesmo grupo básico de proteínas tanto em mamíferos quanto em leveduras: as proteínas de ligação as extremidades Ku70 e Ku80, e a DNA ligase IV e sua proteína associada XRCC4 (Lif1 em *S. cerevisiae*). Mamíferos ainda necessitam das DNA-PKs, para as quais não existem homólogos em leveduras. Neste caso, o complexo MRX teria uma função análoga (Pastwa e Blasiak, 2003; Daley *et al*, 2005; Hefferin e Tomkinson, 2005; Pardo *et al*, 2009).

Em *S. cerevisiae*, o processo de NHEJ é iniciado pela ligação das heterodímero Ku70/80 a ambas as extremidades quebradas do DNA, possivelmente protegendo as extremidades da degradação e sinalizando o dano para as demais proteínas da NHEJ (Dudasova *et al*, 2004). Praticamente ao mesmo tempo em que ocorre a ligação do complexo Ku, ocorre a ligação do complexo MRX (Lisby *et al*, 2004), auxiliando-o na estabilização das extremidades, e no recrutamento e ligação do complexo Dnl4/Lif1. Se

o processamento das extremidades é necessário, ainda ocorre o recrutamento de proteínas como Rad27 e Pol4, sendo o processo finalizado pela ligação das extremidades (Figura 13; para revisão ver Pastwa e Blasiak, 2003; Krogh e Symington, 2004; Hefferin e Tomkinson, 2005; Pardo *et al*, 2009).

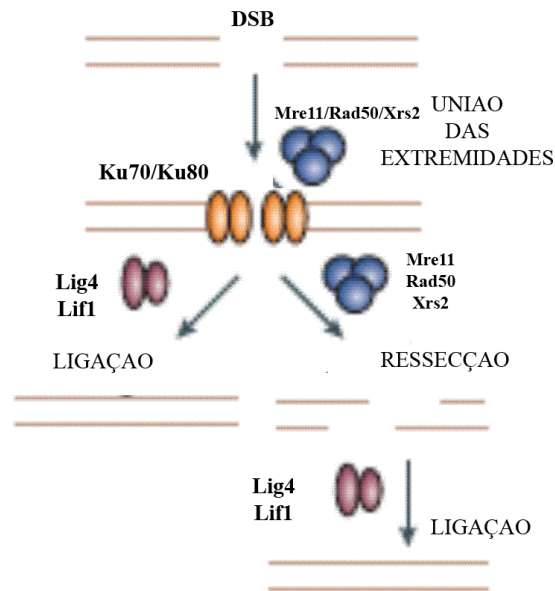


Figura 13. Modelo para recombinação não homóloga em *S. cerevisiae*. Após a indução da DSB, o passo inicial é a ligação do complexo Ku. O complexo Mre11/Rad50/Xrs2 associa ao DNA ligado a Ku formando complexo de ligação entre as duas extremidades. As extremidades podem ser ligadas diretamente pela ação da DNA ligase 4 e seu fator Lif1, ou ainda, quando necessário, pode haver uma ressecção das extremidades pelo complexo MRX, seguido do passo de ligação (modificado de Attikum e Gasser, 2005).

3.5.3 Reparação recombinacional de pontes intercadeias

Além do seu papel na reparação de DSB's, a via recombinacional também está envolvida na reparação de ICL's. Durante a reparação deste tipo de lesão, ocorre a formação de quebras nas cadeias de DNA, e conseqüentemente o requerimento desta via, que pode agir ou não em colaboração com a via NER e a via de síntese translesão em eucariotos (para revisão ver Dronkert e Kanaar, 2001; Lehoczky *et al*, 2007).

Em *S. cerevisiae* a principal via é a recombinação homóloga, usando as cromátides-irmãs ou os cromossomos homólogos (revisado por Dronkert e Kanaar,

2001; Lehoczky *et al*, 2007). Diversos estudos indicam que células diplóides são mais resistentes a agentes indutores de ICL's que células haplóides (Henriques e Moustachi, 1980; Fedorova e Marfin, 1982; Fedorova e Kozhina, 1987), e que em células haplóides, DSB's induzidas por 8-MOP, cisplatina ou HN2 somente podem ser reparadas quando a HR é funcional (Magana-Schwencke *et al*, 1982; McHugh *et al*, 2000; Frankenberg-Schwager *et al*, 2005). Entretanto, nem todos os tipos de ICL's requerem a HR para serem reparadas, uma vez que linhagens deficientes em Rad52 apresentam uma viabilidade semelhante à linhagem selvagem em resposta a carmustina (Beljanski *et al*, 2004). Respostas diferentes também são observadas dependendo da fase do ciclo celular. Enquanto linhagens deficientes nos genes de HR (*rad51* e *rad52*) são sensíveis a agentes geradores de ICL's em células passando pela fase S (fase exponencial), não se observa sensibilidade quando estas linhagens são tratadas em fase estacionária, indicando a operação de uma via alternativa independente da HR, e provavelmente envolvendo a via de síntese translesão (Henriques e Moustachi, 1980; McHugh *et al*, 2000; Sarkar *et al*, 2006). Entretanto, o envolvimento da via NHEJ na reparação de ICL's não é bem estabelecida (Dronkert e Kanaar, 2001; Sarkar *et al*, 2006; Lehoczky *et al*, 2007).

Parecem existir diferenças importantes na reparação de ICL's entre leveduras e mamíferos, porém as vias de reparação deste tipo de dano ainda não são completamente entendidas. Além disso, mamíferos possuem um número maior de proteínas envolvidas, incluindo as proteínas da via de Fanconi, a qual aparenta ser fundamental para o recrutamento de Rad51 durante a reparação de ICL's mediada por HR (Dronkert e Kanaar, 2001; Nojima *et al*, 2005; Li e Heyer, 2008).

3.6 Síntese translesão

A parada da replicação do DNA devido à presença de uma base danificada ou outra lesão na cadeia molde de DNA desafia a habilidade das células a completar seu ciclo celular. Em contraste à parada da transcrição, que ativa vias específicas de reparação acopladas à transcrição, nenhum mecanismo de reparação é especificamente ativado em resposta à parada na replicação do DNA. Por estes motivos, as células desenvolveram estratégias, os chamados mecanismos de tolerância ao dano ou reparação pós-replicativa (revisado por Friedberg, 2005).

A síntese translesão (*translesion synthesis* – TLS) é um processo no qual o dano não é efetivamente reparado, mas ocorre um desvio (*bypass*) das lesões, permitindo a conclusão da replicação. Em eucariotos, as polimerases pertencentes à família Y, e a DNA polimerase ζ (pertencente à família B) são capazes de promover a replicação através de lesões no DNA. Em contraste às polimerases replicativas, que sintetizam DNA com um alto grau de precisão e são bloqueadas por lesões que distorcem significativamente a geometria do DNA, as polimerases da TLS são capazes de sintetizar através destas lesões, por possuírem sítios ativos mais abertos, que permitem acomodar estas lesões, porém apresentam uma taxa muito maior de erro que as polimerases replicativas (Lehmann, 2005; Prakash *et al*, 2005).

Os mecanismos de tolerância ao dano podem ser tanto livres de erro como sujeitos a erro, dependendo da polimerase envolvida. Em *S. cerevisiae* estes mecanismos dependem dos genes codificados pelo grupo de epistasia *RAD6* para reparação de dano por UV (Friedberg *et al*, 2005). *RAD6* codifica para uma enzima de conjugação da ubiquitina que forma um complexo com o produto do gene *RAD18*, uma proteína de ligação ao DNA (Bailly *et al*, 1994). Seus modos de tolerância ao dano, livre ou sujeito a erro, foram determinados por suas interações epistáticas com outros membros do grupo, os quais incluem *RAD5*, *RAD30*, *MMS2*, *UBC13*, *REV1*, *REV3*, *REV7* e *CDC7* (revisado por Kunz *et al*, 2000, Andersen *et al*, 2008).

4. Sinalização celular em resposta a danos no DNA

Como vimos, o DNA está sob constante ameaça de danos gerados por agentes exógenos ou endógenos. As lesões resultantes do ataque destes agentes devem ser reparadas para prevenir a perda ou transmissão incorreta da informação genética. Por estes motivos, o reconhecimento e sinalização do dano é um pré-requisito para a indução das respostas celulares subsequentes, como aumento na reparação de DNA, parada do ciclo celular, apoptose ou senescência, as quais têm sido coletivamente chamadas de resposta ao dano no DNA (*DNA damage response* - DDR). A falha no controle destas vias contribui para a instabilidade genômica, podendo causar

anormalidades no desenvolvimento, e em organismos superiores, pode levar ao processo de tumorigênese.

Uma das características bem estabelecidas da resposta ao dano no DNA é diminuir ou parar a progressão do ciclo celular, como resultado dos chamados pontos de checagem do ciclo celular (*checkpoints*), os quais atrasam transições em pontos chave do ciclo, até que a reparação tenha ocorrido (Lowndes e Murguia, 2000; Abraham, 2001; Rouse e Jackson, 2002). Outros aspectos da resposta ao dano incluem mudanças na estrutura da cromatina no local de dano no DNA e a indução transcricional e modificações pós-traducionais de várias proteínas envolvidas na reparação do DNA (Lowndes e Murguia, 2000; Morrison *et al*, 2000; Abraham, 2001). Com a combinação destas estratégias, aumentam as habilidades do organismo sobreviver ao dano no DNA.

A resposta ao dano no DNA durante qualquer fase do ciclo celular tem o mesmo padrão: após a detecção do dano por proteínas sensoras, proteínas transdutoras transmitem o sinal para proteínas efetoras, que desencadeiam a cascata de reações. Entre as proteínas sensoras de danos em mamíferos estão os complexos Rad9-Hus1-Rad1, Rad17-RFC e MRN (em *S. cerevisiae*, Rad17-Ddc1-Mec3, Rad24-RFC e MRX, respectivamente) (Abraham, 2001; Bradbury e Jackson, 2003; Lukas *et al*, 2004). As modificações causadas por estas proteínas levam à ativação de várias cinases, que constituem as transdutoras na cascata sinalizadora, entre as quais estão ATM e ATR (Abraham, 2001). ATM e ATR pertencem à família das proteínas relacionadas à fosfatidil inositol 3-cinase (PI3K), e correspondem as proteínas Tel1 e Mec1 em *S. cerevisiae*, respectivamente. Elas diferem quanto ao tipo de estresse genotóxico que promove sua ativação. Em humanos, ATM responde primariamente a agentes que causam quebras duplas de DNA, e apesar de ATR responder a quebras duplas, esta não é sua principal função, sendo ativada principalmente em resposta a quebras simples de cadeia, bloqueios na forquilha de replicação e adutos volumosos, como os gerados por luz UV (Abraham, 2001; Shiloh, 2003). Já em *S. cerevisiae*, Mec1 é a principal cinase envolvida na resposta a quebras duplas, enquanto Tel1 tem um papel redundante com Mec1 e somente uma menor participação na maioria dos *checkpoints* de resposta a danos no DNA (Grenon *et al*, 2006). Tel1 agiria independentemente de Mec1 na sinalização de quebras duplas somente na presença de um maior número de lesões (Mantiero *et al*, 2007). A ativação de ATM (Tel1) e ATR (Mec1) leva à fosforilação de uma série de proteínas. Entre elas as proteínas Mre11 e Nbs1 (Xrs2) do complexo MRN

(MRX), envolvidas na reparação de DNA, e as cinases Chk1 e Chk2 (Chk1 e Rad53, em *S. cerevisiae*), envolvidas em parada de ciclo celular em resposta a danos no DNA (Abraham, 2001; Shiloh, 2003).

Como dito anteriormente, a ativação dos *checkpoints* leva ao atraso em transições específicas do ciclo celular, permitindo que a reparação do dano seja feita. Na fase G1 do ciclo os danos necessitam ser reparados antes da etapa de replicação, quando as lesões primárias poderiam bloquear a replicação ou serem convertidas em lesões mais tóxicas. Durante a fase S, as lesões frequentemente levam à incorporação incorreta de nucleotídeos ou ao bloqueio e colapso da forquilha de replicação, e, quando não reparadas, contribuem para o aumento da instabilidade dos cromossomos. Entretanto, a fase G2 é a última alternativa para a célula reparar lesões ainda existentes, evitando que a célula entre em mitose, quando ocorre a divisão do DNA duplicado entre as duas células-filhas, pois a entrada na mitose com o DNA danificado ou parcialmente replicado pode ter conseqüências desastrosas para a célula (revisado por Lukas *et al*, 2004; Branzei e Foiani, 2008).

Por estes motivos, a parada do ciclo celular da fase G2-M é um ponto crucial para a célula. A cinase dependente de ciclina (Cdc2) está presente em todos os eucariotos e é o regulador chave da entrada na mitose (Nigg, 1995). Quando ligada às Ciclinas A e B, é ativada, fosforilando uma série de substratos e promovendo duplicação dos centrossomos, montagem do fuso mitótico, condensação dos cromossomos, entre outras funções, e a sua inibição leva à parada em G2 (Nigg, 1995; Fry e Nigg, 1995; Malumbres e Barbacid, 2005). No fungo filamentoso *Aspergillus nidulans*, além de Cdc2, a proteína cinase NIMA também foi identificada como fundamental para a progressão na mitose (Osmani *et al*, 1987; Fry e Nigg, 1995).

4.1 Cinases relacionadas à NIMA

A proteína NIMA (*never in mitosis A*) é uma serina treonina cinase codificada pelo gene *nimA* em *A. nidulans* necessária para a transição G2-M (Osmani *et al*, 1987). Mutações sensíveis a temperatura do gene *nimA* são bloqueados na fase G2, entrando rapidamente na mitose quando retornam à temperatura permissiva (Osmani *et al*, 1991). A superexpressão do gene *nimA* em *A. nidulans* bem como a expressão heteróloga em *S.*

pombe, em oócitos de *Xenopus* e células humanas pode promover certos aspectos da mitose, incluindo formação de fusos mitóticos aberrantes, condensação da cromatina e quebra do envelope nuclear (O'Connell *et al*, 1994; Lu e Hunter, 1995). Ainda, mutações da proteína NIMA são capazes de induzir parada em G2 em células humanas (Lu e Hunter, 1995) e em *A. nidulans*, NIMA também está envolvida em parada de ciclo celular na resposta a danos no DNA (Ye *et al*, 1996).

Como a maioria dos reguladores do ciclo celular é conservada entre os organismos eucariotos, pode-se sugerir a conservação da proteína NIMA e a sua via em outros organismos, apesar das diferenças existentes entre os eventos mitóticos em *Aspergillus* e outros eucariotos (O'Connell *et al*, 2003). Diversas cinases relacionadas à NIMA (Nrk's ou Nek's – NIMA related kinases) já foram identificadas em diferentes espécies, entre as quais Fin1 (em *S. pombe*), Nim1 (em *Neurospora crassa*), Kin3 (em *S. cerevisiae*) e em mamíferos já são descritas um total de 11 Nek's (para revisão ver O'Connell *et al*, 2003; O'Regan *et al*, 2007). Estas proteínas são definidas como cinases relacionadas à NIMA baseadas em sua similaridade com o domínio catalítico de NIMA. Diversas destas proteínas têm a mesma organização dos seus domínios C-terminal, provavelmente sendo homólogos mais fiéis da NIMA. Outras possuem motivos adicionais ou perdem sequências não catalíticas, neste caso, o domínio C-catalítico de um ancestral NIMA pode ter sido adquirido para funções adicionais, e possivelmente não relacionado ao controle da mitose (Fig. 14, O'Connell *et al*, 2003).

4.1.2 Nek's em mamíferos

Em mamíferos, como dito anteriormente, foram descritas 11 proteínas relacionadas à NIMA, as proteínas Nek. Nek1, a primeira Nek identificada, em camundongos, é principalmente expressa em células germinativas (Letwin *et al*, 1992) e mutações nesta proteína em animais estão envolvidas na etiologia da doença policística dos rins, causando efeitos deletérios como esterilidade (em machos), dismorfismo facial, retardo no crescimento e anormalidades neurológicas (Upadhyia *et al*, 2000). A proteína Nek1 humana interage com diversas outras proteínas que atuam em diferentes processos como o desenvolvimento da doença policística dos rins, reparação de quebras duplas de DNA, na transição da fase G2/M e no desenvolvimento das células neuronais. Entre estas proteínas, estão Mre11, 53BP1 e ATRX, conhecidas pelo envolvimento na

resposta a danos ao DNA (Surpilli *et al*, 2003). Estudos posteriores demonstram o envolvimento da proteína Nek1 na resposta à radiação ionizante (Polci *et al*, 2004). A proteína Nek1 ainda responde a diversos outros agentes indutores de danos no DNA e interage com outras proteínas envolvidas na resposta a danos, sendo que a deficiência desta proteína induz defeitos nas paradas de ciclo celular G1/S e G2/M como resposta a danos no DNA, falhando em ativar mediadores *downstream*, como Chk1 e Chk2 (Chen *et al*, 2008).

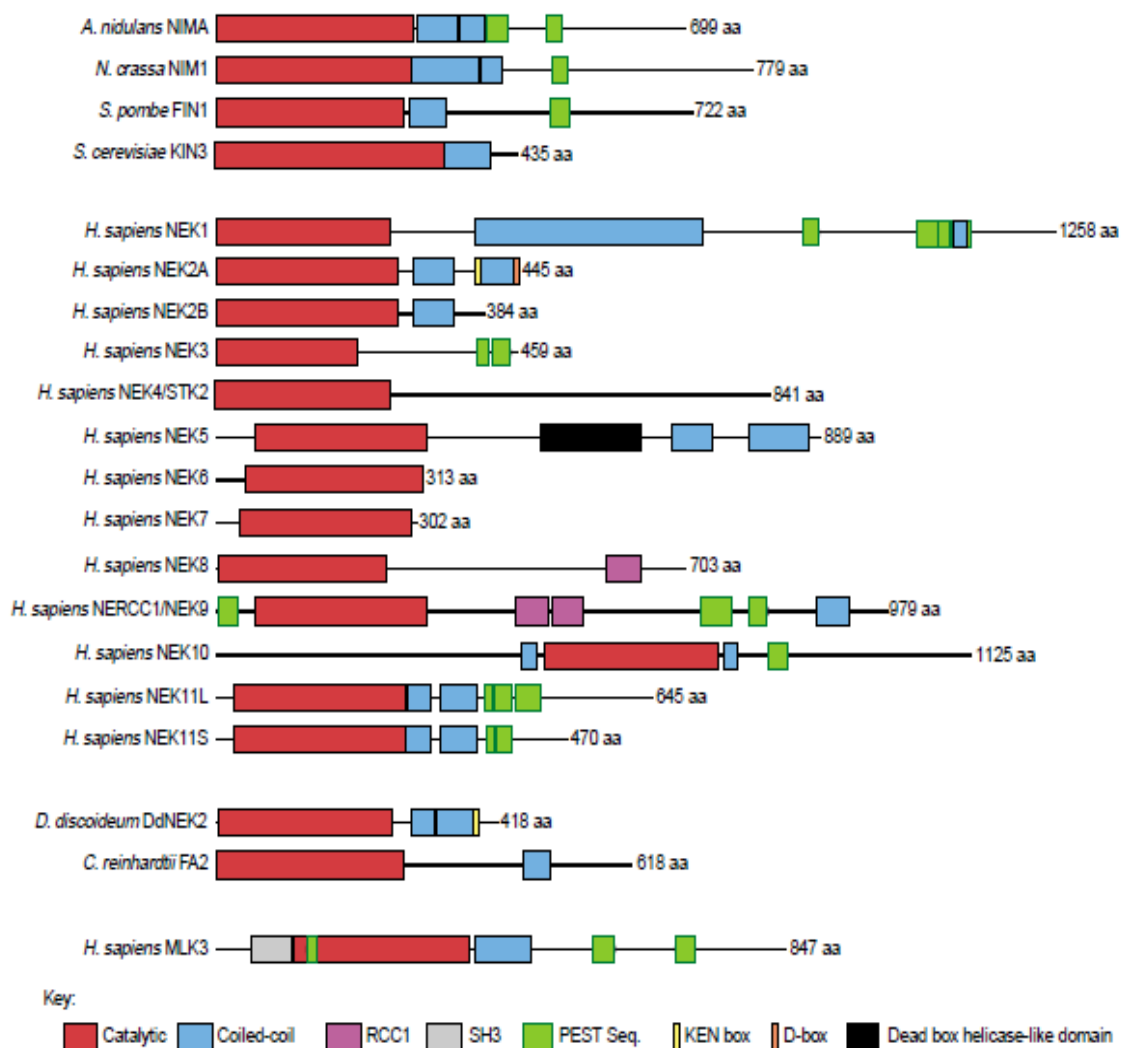


Figura 14. Família Nrk's (NIMA related kinases). Alinhamento das características estruturais chaves da família Nrk's, incluindo: sequências PEST, domínios super hélice (coiled coil) e outros domínios. A cinase NIMA é mostrada no topo, demonstrando o clássico alinhamento do domínio catalítico, sequências PEST e domínio super hélice essenciais para a atividade e regulação de NIMA em *Aspergillus nidulans* (Adaptado de O'Connell *et al*, 2003).

A proteína Nek2 é a mais próxima estruturalmente de NIMA, com uma grande similaridade no domínio catalítico e que apresenta propriedades bioquímicas em comum, o que faz com que ela seja uma das proteínas mais bem caracterizadas (Fry, 2002). Nek2 apresenta uma expressão dependente do ciclo celular e um perfil de atividades que fortemente indicam seu papel na mitose (Fry *et al*, 1995). Entretanto, Nek2 não recupera o fenótipo da mutação *nimA*, não podendo portanto, ser considerado um homólogo direto (O'Connell *et al*, 2003). Nek2 está envolvida na regulação da separação dos centrossomos durante a entrada na mitose, na progressão da fase G2/M e na condensação da cromatina (revisado por Fry, 2002; Hayward e Fry, 2006). Ainda, Nek2 também está envolvida na fosforilação de Hec1, proteína que desempenha funções essenciais na segregação dos cromossomos (Chen *et al*, 2002).

As demais Nek's são menos caracterizadas, sendo que de algumas ainda não são conhecidas suas funções. Nek6, Nek7 e Nek9 atuam em uma mesma cascata mitótica, e assim como Nek2, estão envolvidas na progressão da mitose, tendo papéis importantes na organização do fuso mitótico e na segregação dos cromossomos. Nek8 pode estar envolvida na formação de cílios, pois da mesma forma que Nek1, se apresenta mutada na doença policística dos rins. Nek11 está envolvida em parada de ciclo celular em resposta a danos ao DNA (para revisão ver O'Regan *et al*, 2003; Quarmby e Mahjoub, 2005).

4.1.2 A cinase Kin3 em *Saccharomyces cerevisiae*

O gene *KIN3* de *S. cerevisiae* foi isolado em 1990, através da clonagem de fragmentos genômicos com uma mistura de oligonucleotídeos correspondendo à parte de uma região altamente conservada no domínio catalítico de proteínas serina-treonina cinases (Jones e Rosamond, 1990). Estudos posteriores demonstraram que o gene *KIN3* está localizado no cromossomo *I*, e seu produto é uma proteína de 435 aminoácidos com um peso molecular de 51,2 kDa (Schweitzer e Philippsen, 1992; Barton *et al*, 1992). O gene *KIN3* não é essencial, pois a sua disrupção não impede o crescimento da linhagem em uma variedade de fontes de carbono, incluindo glicose, galactose, etanol, glicerol, maltose, rafinose ou sacarose, tanto sob condições aeróbicas quanto anaeróbicas, nem a conjugação ou esporulação (Schweitzer e Philippsen, 1992). Ainda, a superexpressão do

gene *KIN3* não resulta em nenhum fenótipo detectável de crescimento (Barton *et al*, 1992).

A proteína Kin3 é estruturalmente relacionada à NIMA de *A. nidulans*, possuindo 44% de identidade e 60% similaridade (protein-protein BLAST). Apesar das funções desta proteína ainda não serem conhecidas, estudos demonstram que Kin3 apresenta propriedades similares a algumas cinases relacionadas à NIMA. Assim como Nek2, Kin3 possui a capacidade de fosforilar a proteína Hec1, a qual é essencial para a correta segregação dos cromossomos (Chen *et al*, 2002). Linhagens mutantes no gene *KIN3* apresentam uma pronunciada sensibilidade a diversos agentes mutagênicos, como metilmetanosulfonato, doxorubicina, cisplatina e mustarda nitrogenada (Moura *et al*, dados não publicados), semelhante a Nek1, que responde a danos gerados por radiação ionizante (Polci *et al*, 2004) e sofre re-localização em foci nucleares em resposta a danos causados por diversos agentes (Chen *et al*, 2008). Células deficientes na proteína Kin3 ainda são defectivas na parada da fase G2/M em resposta ao dano no DNA (Moura *et al*, dados não publicados).

5. O complexo MRX de *Saccharomyces cerevisiae*

Como visto nos itens anteriores, o complexo MRX está envolvido em diferentes processos celulares, possuindo um papel central na maioria dos aspectos da resposta celular a quebras duplas de DNA (incluindo reparação por recombinação homóloga e não-homóloga), recombinação meiótica, manutenção dos telômeros e ativação de *checkpoint* em resposta a danos no DNA (para revisão ver D'Amours e Jackson, 2002; Assenmacher e Hopfner, 2004; Williams *et al*, 2007).

Este complexo é composto pelas proteínas Mre11, Rad50 e Xrs2 em *S. cerevisiae* (Mre1, Rad50 e Nbs1 em mamíferos), e foi originalmente isolado a partir de *screening* genéticos em mutantes de *S. cerevisiae* que eram hipersensíveis a danos no DNA (RAD50 e XRS2) ou defectivos em recombinação meiótica (MRE11). Estudos posteriores demonstraram que linhagens deficientes em uma das três proteínas apresentam fenótipos idênticos, e análises genéticas com duplos e triplos mutantes

confirmaram sua relação epistática (para revisão ver D'Amours e Jackson, 2002; Assenmacher e Hopfner, 2004; Williams *et al*, 2007).

Mre11 é a proteína central do complexo. Esta proteína de aproximadamente 80 kDa interage independentemente com ambos Rad50 e Xrs2 (Nbs1), além de interagir consigo mesma, para formar dímeros. Mre11 possui atividades 3'-5' exonuclease sobre fitas duplas, endonuclease sobre fitas simples e duplas, de anelamento de cadeias DNA e uma fraca atividade de dissociação de pequenos duplex de DNA (Paull e Gellert 1998; Trujillo *et al*, 1998; Usui *et al*, 1998; Furuse *et al*, 1998), sendo estas atividades reguladas de diferentes maneiras por Rad50, Xrs2 (Nbs1) e ATP (Paull e Gellert, 1998, 1999 ; Moncalian *et al*, 2004).

Rad50 é uma proteína de aproximadamente 150 kDa que possui estrutura similar a da família de proteínas de manutenção estrutural dos cromossomos (*structural maintenance of chromosome* – SMC) (Alani *et al*, 1989; Strunnikov e Jessberger, 1999). Rad50 contém dois motivos de ligação de nucleotídeos, Walker A e Walker B, em suas extremidades amino e carboxi-terminal, respectivamente, sendo estes motivos separados por duas regiões de repetições de sequências que formam uma extensa estrutura *coiled-coil* (Alani *et al*, 1989; Dolganov *et al*, 1996). Em um processo dependente de ATP, Rad50 se liga ao DNA, formando dímeros, que combinam com duas moléculas de Mre11 para formar um complexo tetramérico estável, sendo que essa capacidade de Rad50 se ligar e manter as extremidades de DNA próximas auxilia no processo de reparação de quebras duplas de DNA (de Jager *et al*, 2001; Chen *et al*, 2001; Anderson *et al*, 2001). Rad50 ainda possui a capacidade de estimular a atividade exonuclease de Mre11, enquanto regula negativamente a atividade endonuclease, prevenindo a degradação excessiva do DNA (Anderson *et al*, 2001; D'Amours e Jackson, 2002; Ghosal e Muniyappa, 2007).

Xrs2 (Nbs1) é a proteína do complexo que possui a sequência menos conservada. A similaridade entre os diferentes organismos está na presença de um domínio N-terminal *forkhead-associated* (FHA-domain), o qual é dependente de fosforilação e permite interações entre proteínas (revisado por D'Amours e Jackson, 2002). A proteína Xrs2 (Nbs1) modula a atividade nuclease de Mre11/Rad50 (Paul e Gellert, 1999). Além disso, pode se ligar a estruturas secundárias de DNA, ajudando a

direcionar Mre11/Rad50 as DSB's, e também mediar interações proteína-proteína entre o complexo e outras proteínas de sinalização e reparação (Trujillo *et al*, 2003).

Em resposta a formação de DSB's, o complexo MRX(N) é rapidamente recrutado aos sítios de dano, interagindo com Tel1 (ATM). Essa interação induz a auto-ativação de Tel1 que é capaz de fosforilar uma série de substratos (Lee e Paul, 2004). Mre11 e Xrs2 são ambas fosforiladas por Tel1 sendo esta fosforilação necessária para uma eficiente parada de ciclo celular na fase S (Lim *et al*, 2000; D'Amours e Jackson, 2001). Outros estudos também demonstram o envolvimento do complexo na ativação de *checkpoints* em outras fases do ciclo celular (Grenon *et al*, 2001; D'Amours e Jackson, 2002; Assenmacher e Hopfner, 2004). Mec1, ortólogo de ATR, também é capaz de induzir paradas de ciclo celular em resposta a danos, estabelecendo o complexo MRX(N) como um co-fator para ambas as cinases Tel1 (ATM) e Mec1 (ATR) (D'Amours e Jackson, 2002; Assenmacher e Hopfner, 2004).

O complexo MRX(N), mais especificamente a proteína Mre11, é o primeiro fator envolvido na detecção dos sítios de DSB's (Lisby *et al*, 2004). Na reparação por recombinação homóloga, Mre11 inicia o processo com a ressecção 5'-3' das extremidades das DSB's, para gerar extremidades 3' livres (D'Amours e Jackson 2002; Assenmacher e Hopfner, 2004). Ocorre então a formação do complexo com Rad50, sendo que Rad50 possui a capacidade de se ligar a extremidades de DNA, mantendo-as próximas, e uma das conseqüências desta atividade seria facilitar a busca de seqüências homólogas na fita molde (de Jager *et al*, 2001; D'Amours e Jackson 2002). A proteína Xrs2 (Nbs1), além de modular a atividade nucleolítica de Mre11/Rad50, direciona o complexo as DSB's e também media interações com outras proteínas (Trujillo *et al*, 2003).

O complexo MRX também é essencial para o processo de NHEJ em leveduras. A proteína Rad50, através de seus domínios de ligação ao DNA de alta afinidade, ajuda a manter as extremidades das DSB's próximas, facilitando seu pareamento e ligação (Hopfner *et al*, 2002). Apesar da atividade nucleolítica de Mre11 poder participar do processamento das extremidades das DSB's e facilitar o seu pareamento, esta atividade não é essencial (Moreau *et al*, 1999). Já a proteína Xrs2, além do seu papel na sinalização do dano e recrutamento de outras, interage com Lif1, estimulando a reação de ligação pelo complexo Lig4 (Chen *et al*, 2001). Embora o complexo possua função

nuclease, sua função essencial durante a NHEJ parece ser estrutural, mantendo as extremidades das quebras unidas e recrutando o complexo ligase (revisado por Pardo *et al*, 2009).

Apesar de o complexo MRN existir em vertebrados, sendo análogo ao complexo MRX de leveduras, não há evidências definitivas de que ele esteja envolvido em NHEJ (Pastwa e Blasiak, 2003; Daley *et al*, 2005; Pardo *et al*, 2009). Uma possível função para o complexo MRN em mamíferos seria manter as extremidades próximas, sendo menos crítica quando as extremidades podem ser ligadas diretamente, sem necessidade de um processamento prévio (de Jager *et al*, 2001). Em mamíferos, a presença das DNA-PKs teria essa analogia de função, podendo explicar desta forma o não requerimento do complexo na via NHEJ (Pardo *et al*, 2009).

As vias de sinalização e reparação de danos no DNA são altamente conservadas entre as espécies, muitas destas desde procariotos até humanos, indicando a sua importância evolutiva. Alguns componentes destas vias encontram-se mutados em síndromes humanas raras, sendo associadas a diversas anormalidades do desenvolvimento ou a predisposição ao câncer (para revisão ver Altieri *et al*, 2008). Estudos demonstram que o complexo MRN pode interagir com cinases envolvidas na sinalização e reparação de danos no DNA, como descrito anteriormente, em mamíferos a proteína Nek1 parece interagir com a proteína Mre11 (Surpilli *et al*, 2003; Chen *et al*, 2008). Por estes motivos é relevante a investigação das funções destes componentes em organismos modelo como a levedura *S. cerevisiae*, o que pode permitir uma melhor compreensão dos mecanismos que controlam a sinalização e a reparação de danos no DNA em eucariotos superiores.

II – OBJETIVOS

1. Objetivo geral

O objetivo principal deste trabalho é avaliar as interações genéticas do gene *KIN3* com os genes do complexo MRX em *Saccharomyces cerevisiae* durante estresse genotóxico, buscando novas informações que possam auxiliar na compreensão dos mecanismos implicados na sinalização da reparação de DNA e parada de ciclo celular.

2. Objetivos específicos

- ✓ Construção dos duplos mutantes no gene *KIN3* e nos genes do complexo MRX, através de disrupção gênica.
- ✓ Avaliar as interações genéticas através da determinação do perfil de sensibilidade dos simples e duplos mutantes após tratamento com diferentes agentes genotóxicos.
- ✓ Verificar o bloqueio na mutagênese nestes mutantes após tratamento genotóxico, através do ensaio de detecção de mutação tipo *forward*.
- ✓ Avaliar a expressão do gene *KIN3* nas linhagens mutantes no complexo MRX em resposta a lesões ao DNA por meio do uso de um plasmídeo contendo o promotor do gene fusionado ao gene repórter codificador da beta-galactosidase.
- ✓ Verificar o envolvimento de Kin3 na sinalização de parada de ciclo celular, utilizando hidroxiuréia, inibidor da fase S, e cafeína, inibidor das cinases Tel1 e Mec1.

III – CAPÍTULO I

NIMA-related kinase Kin3p interact with MRX complex in *Saccharomyces cerevisiae*

(A ser submetido a Current Genetics)

NIMA-related kinase Kin3p interact with MRX complex in *Saccharomyces cerevisiae*

Jaqueline Cesar Rocha¹, Dinara Jaqueline Moura¹, Bruna Frielink Immich¹, Jacqueline de Moraes Cardone¹, João Antonio Pêgas Henriques^{1,2}, Jenifer Saffi^{1,2,*}

¹ Departamento de Biofísica /Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

² Laboratório de Genética Toxicológica, Programa de Pós-Graduação em Genética e Toxicologia Aplicada - Universidade Luterana do Brasil, Canoas, RS, Brazil

* Corresponding author. Laboratório de Genética Toxicológica, Avenida Farroupilha 8001, Prédio 01 sala 122; Bairro São José, CEP 92425-900, Canoas- RS, Brasil. Tel.: +55 51 34774000 ext. 2774; fax: +55 51 34779214.

E-mail address: jenifer.saffi@ulbra.br (J.Saffi)

Abstract

The *KIN3* gene of *Saccharomyces cerevisiae* codifies a serine-threonine kinase which exact role has not yet been determined. Kin3 protein is a structural homolog of nimA, of *Aspergillus nidulans*, which is a mitotic regulator with a pivotal role in controlling de G₂-M transition and that responds to DNA damage. Several NIMA-related kinases (Nrk's) were identified in different species, and mammals contains eleven Nrk's. They are involved in different process, including mitotic progression and DNA damage response. Studies showed that Kin3p share similar properties with Nek1 and Nek2. Nek1 interacts with proteins involved in the DNA damage response and repair. Our previous results showed that *KIN3* gene mutant strains are sensible to several mutagens and defective in G₂/M phase checkpoint in response to DNA damage. In this work, we evaluated the interaction of *KIN3* gene with the genes of the MRX complex (*MRE11-RAD50-XRS2*), which is involved in DNA damage sensing, signaling and repair mechanism, as well as maintenance of chromosomal integrity in the cell. Our results suggest an epistatic interaction of *kin3Δ* allele with *mre11Δ*, *rad50Δ* and *xrs2Δ* alleles in response to adducts inducers such as photo-activated 8-methoxypsoralen, cisplatin and nitrogen mustard. The *KIN3* gene expression was up regulated in wild type strain after mutagenic stress, whereas no significant differences in MRX mutant strains in the same conditions was observed. Indeed, MRX complex and Kin3p can be involved in Mec1 DNA damage signaling pathway.

Keywords: *KIN3*, DNA damage, MRX complex, NIMA-related kinases, *Saccharomyces cerevisiae*

Introduction

The genome integrity of organisms is maintained generation after generation, through a number of mechanisms, like replication, cell cycle checkpoints, and DNA damage repair (Czornak et al. 2008). The DNA damage is a consequence of endogenous sources and processes (e.g. reactive radicals, stalled replication forks, and meiotic recombination) as well exogenous sources (e.g. ionizing radiation, UV light and chemical agents) (Friedberg et al. 2006). DNA lesions threaten genomic integrity and activating signal transduction pathways and DNA damage checkpoints, which are highly conserved from yeast to humans. Once DNA lesions are detected, full activation of these pathways leads to the transcriptional activation of a DNA damage response, temporary cell cycle arrest and activation of DNA repair (Lowndes and Murguia 2000; Nyberg et al. 2002; Grenon et al. 2006).

One of the complexes involved in DNA damage response is MRX, composed of Mre11p, Rad50p, and Xrs2p subunits. This complex has a critical role in the DNA damage sensing, signaling and repair mechanism, as well as in maintenance of chromosomal integrity in the cell (D'Amours and Jackson 2002; Assenmacher and Hopfner 2004; Krogh et al. 2005). Mre11p displays 3'-5' single-strand (ssDNA) and double-strand DNA (dsDNA) exonuclease activity, ssDNA endonuclease activity, a limited DNA unwinding activity, and it can bind to both ssDNA and dsDNA (Furuse et al. 1998; Usui et al. 1998; Moreau et al. 1999). Rad50p exhibits ATP-dependent binding to dsDNA involving protein dimer formation (Raymond and Kleckner 1993). Xrs2p show DNA binding activity and enhances the Mre11p nuclease activity (Trujillo et al. 2003). The MRX complex interacts with many proteins, including those involved in

activation of Tel1p and Mec1p kinases pathways. In a yeast two-hybrid screen Mre11p has been identified as a potential direct target of Nek1 from humans (Surpili et al. 2003).

The serine/threonine protein kinase Nek1p is a NIMA-related kinase found in mammalian cells, sharing approximately 40-45 % similarity with NIMA (never in mitosis A) (Letwin et al. 1992), which is a mitotic regulator in *Aspergillus nidulans* with a pivotal role in controlling G₂-M transition (Osmani et al. 1988, Osmani et al. 1991a; Osmani et al. 1991b). Nek1p was the first NIMA ortholog identified and is involved in the DNA damage response to multiple agents (Chen et al. 2002; Polci et al. 2004; Chen et al. 2008). It's deficiency induces defects in G₁/S and M-phase checkpoints in DNA damage response, failing to activate downstream mediators such as Chk1 and Chk2 (Chen et al. 2008). Nek1 interacts with some proteins involved in DNA damage response, some upstream of Chk1 and Chk2, and at least one involved in the effectors arm of DNA damage repair (Chen et al. 2008). Mammals contain another ten NIMA-related kinases, involved in mitotic progression, microtubule organization, mitotic spindle formation, and DNA damage response. NIMA-related kinases (Nrk's) were identified in different species (O'Connell et al. 2003, O' Regan et al. 2007).

The *KIN3* gene of *Saccharomyces cerevisiae* was isolated from a library of cloned genomic fragments by probing with an oligodeoxyribonucleotide mixture corresponding to part of a highly-conserved region in the catalytic domain of protein serine-threonine kinases (Jones and Rosamond 1990). Subsequent works showed that the *KIN3* is located on chromosome I, and its product is a protein of 435 amino acids and molecular weight of 51,203 Da (Schweitzer and Philippsen 1992; Barton et al. 1992). The Kin3p is not essential for growth, conjugation or sporulation, and it is a structural homolog of the NIMA of *A. nidulans* (Jones and Rosamond 1990; Schweitzer

and Philippsen 1992; Barton et al. 1992). The function of Kin3p is unknown, but studies showed that Kin3p share similar properties with Nek2, having a role in phosphorylation of Hec1, which is necessary for faithful chromosome segregation and cell survival (Chen et al. 2002). Indeed, *KIN3* gene mutant strains are sensitive to several mutagenic agents, and Kin3p deficient cells are defective in G2/M-phase checkpoints in response to DNA damage (Moura et al, unpublished results).

Since MRX is a highly conserved protein complex, with a critical role in the DNA damage sensing, signaling and repair mechanism and Kin3p seems to be involved in DNA damage response, in this work we evaluated the genetic interaction of the *KIN3* gene with the genes of the MRX complex in *S. cerevisiae*.

Material and Methods

1.1 Chemicals

The amino acids (L-histidine, L-threonine, L-methionine, L-tryptophan, L-leucine, and L-lysine), nitrogen bases (adenine and uracil), L-canavanine, cisplatin and nitrogen mustard (HN2) were purchased from Sigma (Saint Louis, MO, USA). 8-methoxypsoralen (8-MOP) was a gift from Prof. Dietrich Averbeck (Institut Curie, Orsay, France). Yeast extract, bacto-peptone, yeast nitrogen base and bacto-agar were obtained from Difco Laboratories (Detroit, MI, USA). All others reagents were of analytical grade.

1.2 Strains, Plasmids and Media

The yeast strains used in this study are listed in Table 1. The double mutants were constructed using a *kin3Δ::URA3* disruption cassette that had been amplified from YCPLac33 by PCR using specific primers [*kin3::URA3S* (5'-ATGCATAGACGACAGTTTTTCCAAGAATACCGTAGTCCTTATAATACAGTTTTTTAGT-3') and *kin3::URA3A* (5'-TTATCGATATCTTGTTTGCCAGTGGTATGCAGGTTTGGCAATACTCTTCCTTTTCAATA -3')] and a high fidelity thermostable DNA polymerase (Platinum® Taq, Invitrogen). All double mutants were transformed by method of lithium acetate method (Gietz and Woods, 2002) using this linear disruption constructs. Transformants were selected by growth on SynCo-Ura media and disruption of the *KIN3* gene was verified by genomic PCR. The *Escherichia coli* strain XL1-Blue (*recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1lac [F' proAB lacIqZ.M15 Tn10 (Tetr)]*- Stratagene, USA) was used for plasmid manipulation and propagation. The *KIN3* reporter plasmid, that contains a *KIN3* upstream non-coding region fused in frame with the β-galactosidase gene from *E. coli*, was provided by D. Moura (Federal University of Rio Grande do Sul). Yeast media and bacterial genetic protocols were as described by Burke et al. (2000) and Sambrook et al. (2000), respectively. Complete medium YPD containing 0.5 % yeast extract, 2 % bacto-peptona, and 2 % glucose were used routine growth of yeast cells. The minimal medium contained 0.67 % yeast nitrogen base without amino acids and 2 % glucose was supplemented with the appropriate amino acids. For plates, the medium was supplemented with 2 % bacto-agar.

1.3 Mutagen treatment and survival assays

Stationary phase cultures were obtained by the inoculation of an isolated colony in liquid YPD. After 48 hours, cells were washed twice in phosphate buffered saline (PBS pH 7.4) and re-suspended in the same buffer to a titer of 2×10^8 cells/mL. To evaluate

the sensitivity for different mutagens, cells were treated with either cisplatin at concentrations to 50 a 900 $\mu\text{g}/\text{mL}$, or nitrogen mustard (HN2) at concentrations ranging to 50 a 800 μM for 1 h in a rotatory shaker at 30 °C in the dark. After treatment, cells were appropriately diluted and plated in triplicate on solid medium. For photo activated 8-methoxypsoralen (8-MOP) sensitivity, cells were incubated with a concentration of 5 μM for 30 min at 4 °C in the dark, and after appropriate dilution, plated on solid medium and exposed to increasing doses of UVA (dose range from 0 to 2.0 kJ/m^2 - Stratalinker, Stratagene, USA). Sensitivity to $\text{UV}_{254\text{nm}}$ (UVC) was determined by irradiating cells already diluted and plated on solid medium with doses ranging from 0 to 150 J/m^2 . After treatments, plates were incubated at 30 °C for 2-3 days before counting the colonies. Data represent the average of at least three independent experiments, each carried out in triplicate.

1.4 Mutagenesis evaluation

Forward mutation was measured with the canavanine resistance assay (*CAN1* → *can1^R*) after induction with cisplatin, HN2, 8-MOP or UVC. Cells were plated onto SC plates lacking arginine and supplemented with canavanine (60 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Plates were incubated in the dark, for 3-5 days before counting the colonies. Mutant frequencies were scored per surviving cells. The experiments were carried in triplicate, and data represent the average of at least three independent experiments.

1.5 β -galactosidase assay

The plasmid pMEL β 2, which contains a gene fusion of the upstream non-coding *KIN3* region (-1,100 bp) with *lacZ* reporter gene (Moura et al. unpublished dates), was used to access the pattern of *KIN3* expression under genotoxic stress. The yeast transformation was performed by the method of lithium acetate (Gietz and Woods, 2002). Cells were

grown overnight in SC-ura medium, resuspended in the same medium and treated with either cisplatin (50 µg/mL) or HN2 (25µM), in a rotatory shaker at 30 °C in the dark. The treatment with 8-MOP + UVA (0.5 KJ/m²) and UVC (20 J/m²) was conducted as previously described and after treated cultures were incubated at 30 °C with shaking in the dark. Samples were taken at 1 and 2 h after treatment. At different time points, cells were harvested, washed and resuspended in Z-buffer (Na₂HPO₄, 60 mM; NaH₂PO₄ 40 mM; KCl, 10 mM; MgSO₄, 1 mM; β-mercaptoethanol, 50mM). The β-galactosidase activity was determined using o-nitrophenol-β-D-galactosidase as substrate in according to Burke et al. (2000) and activity was expressed as units per optical density at 600 nm (OD600) unit of cells.

1.6 Sensitivity to drugs and caffeine

For drop tests, exponential cultures were obtained by inoculation of a single colony in liquid YPD. After 24 h, cells were washed twice in phosphate buffered saline (PBS pH 7.4) and re-suspended in the same buffer to a titer of 1 x 10⁸ cells/mL. For hydroxyurea sensitivity, 5µL of 10-fold dilutions was spotted onto YPD plates containing HU (25 and 50mM) or HU (50mM) plus caffeine (7,5mM). For nitrogen mustard and cisplatin, cells were treated with concentrations of 25 µM and 250 µg/mL, respectively for 1 h. For UVC, an aliquot of 1 mL of cell suspension was irradiated with a UVC dose of 20 J/m². For photo activated 8-methoxypsoralen, after treatment with 5 µM for 30 min at 4° C in the dark, an aliquot of 1 mL was irradiated with a UVA dose of 0.8 kJ//m². After treatments with HN2, cisplatin, UVC or photo activated 8-methoxypsoralen; 5µL of 10-fold dilutions was spotted onto an YPD plate containing caffeine at a concentration of 7.5 mM. The plates were incubated at 30 °C for 2-3 days.

Results and discussion

In our previous, unpublished dates, we shown that Kin3p has an important role in yeast DNA damage response. Our data demonstrate that *kin3Δ* yeast strain showed an increase sensitivity to different DNA adduct inducers and that this kinase is important for proper checkpoint activation in G₂/M phase in response to DNA damage (Moura et al. unpublished dates). Taking into account the possible involvement of Kin3p in DNA adducts response, the aim of this work was to evaluate the genetic interaction of *KIN3* with genes of MRX complex (*MRE11*, *RAD50* and *XRS2*) after mutagenic stress. This complex is involved in several aspects of the cellular DNA damage response including DSB repair by NHEJ and HR, that is implicated in the repair of these bulky lesions, and checkpoint activation (D'Amours and Jackson, 2002, Willians et al. 2007).

Figure 1 shows that after treatment with photo activated 8-methoxypsoralen (8-MOP) *mre11Δkin3Δ* and *xrs2Δkin3Δ* double mutants display a phenotype similar to the *kin3Δ* single mutant, but are more sensitive than the *mre11Δ* and *xrs2Δ* single mutants, indicating that the *KIN3* gene deletion induces an increase in sensitivity of *mre11Δ* and *xrs2Δ* simple mutants (Fig. 1A and C). The double mutant *rad50Δkin3Δ* shows practically the same sensitivity as the *rad50Δ* and *kin3Δ* mutants (Fig. 1B). The forward mutation rate was also quite similar between single and double mutants (Fig. 1D-F), but all mutant strains showed a decrease in mutation rate when compared to WT strain. These epistatic interactions suggest that both gene products may function in a common pathway of repair of 8-MOP-induced DNA lesions. The bifunctional furocoumarin 8-MOP in eukaryotic cells intercalates into DNA and undergoes photocycloaddition with pyrimidines to form monoadducts and interstrand cross-links (ICLs) and some oxidative

damage. The involvement of MRX complex in 8-MOP-DNA damage response was previously reported in a model proposed by Pichierri and Rosselli (2004). NBS1 (Xrs2 in yeast), under the control of ATR kinase, is activated in response to ICL leading to ICL-dependent S-phase checkpoint (Pichierri and Rosselli, 2004).

After cisplatin treatment, the double mutants *mre11Δkin3Δ* and *xrs2Δkin3Δ* were as sensitive as single mutants (Fig. 2A and 2C). Indeed, the *kin3Δ* allele confers sensitivity to cisplatin, although not as strong as observed for the *rad50Δ* and *rad50Δkin3Δ* mutants (Fig. 2B). In addition, the mutagenesis results showed that the deletion of *KIN3* gene induces a block in revertants rate in MRX mutants after cisplatin treatment. Cisplatin can react with DNA forming monoadducts and bi-adducts, as DNA interstrand cross-links and mainly DNA intrastrand cross-links (Lippert, 1992; Fichtinger-Schepman et al., 1995). Nitrogen mustard (HN2) is also a bi-functional agent which forms a variety of DNA adducts including monoadducts and cross-links (McHugh et al. 1999). HN2, as well as cisplatin, binds preferably to the N7 position of guanines, but on the opposite DNA strands forming DNA interstrand crosslink's (McHugh et al. 1999). As observed in Fig. 3, no differences were observed in MRX mutants after *KIN3* gene deletion, and all double mutants showed the same sensitivity profile than the single mutants *mre11Δ*, *rad50Δ* or *xrs2Δ*. Similar results were observed in forward mutation evaluation (Fig. 3D-F). The observed sensitivities of *mre11* mutant allele to cisplatin and HN2 (Fig. 2 and 3) confirm and extend the findings of McHugh et al. (2000), showing that MRX alleles in *S. cerevisiae* are also sensitive to ICLs inducers. Moreover, these results are in accordance with our previous results, which indicate the Kin3 involvement in response to mutagenic stress induced by cisplatin and HN2 (Moura et al., unpublished results). Additionally we showed that this protein acts in the epistatic way with MRX complex in these responses.

Irradiation with ultraviolet (UV) light induces mainly two types of DNA photoproducts, cyclobutane pyrimidine dimers (CPD) and pyrimidine (6-4) pyrimidone photoproducts (6-4PP), that cause severe structural distortions in the DNA (reviewed by Pfeifer et al. 2005). The treatment with different bi-functional agents (8-MOP, cisplatin and HN2) revealed that all double mutants showed a similar phenotype to at least one of the respective single mutant, whereas the deletion of *KIN3* gene increases a sensitivity of *mre11Δ* and *xrs2Δ* alleles after exposure to UVC (Fig. 4A and 4C). On the other hand, the sensitivity of *rad50Δ* allele decreases slightly, by introduction of *kin3* mutation when exposed to higher radiation doses (Fig. 4B). The pronounced sensitivity observed in *xrs2Δ* strain, as well as, in *rad50Δ*, are in disagreement with previous reports in mammalian cells, which indicated that the induced S-phase checkpoint response after UVC damage is independent of Nbs1 (Xrs2 in yeast) and Mre11 (Heffernan et al. 2002). In forward mutation evaluation, all strains share similar results, but deletion of *KIN3* gene results in a slightly reduction in mutation rates, in comparison to WT and MRX single mutants (Fig. 4D-F), respectively. These differences in the sensitivity of the single and double mutants suggest that in the UVC induced DNA damage response, Kin3p can act in an independent way of the MRX complex.

Our results suggest an epistatic interaction of *kin3Δ* allele with *mre11Δ*, *rad50Δ* and *xrs2Δ* alleles in response to adduct inducers. Psoralen (photo activated), cisplatin and HN2 are interstrand cross-linking agents. The ICLs, despite of their minor amount, are the most critical cytotoxic adducts produced by these drugs (reviewed by Noll et al. 2006). The repair of DNA interstrand cross-links is less thoroughly characterized than many of the other DNA repair pathways. Genetic and biochemical data indicate that elimination of ICLs requires successive involvement of several distinct repair pathways in a coordinated manner including structure specific endonucleases (excision repair

group), proteins required for the recombination-mediated double-strand break (DSB) repair, (recombinational repair group), and error-prone translesion DNA polymerases (mutagenic group) (Dronkert and Kannar, 2001; Grossmann et al. 2001). The MRX complex functions as a double-strand break (DSB) sensor (Lee and Paull, 2004). As mentioned in previous reports, *mre11Δ* yeast strain is sensitive to ICLs forming agents and Nbs1 is activated in response to ICL, leading to the hypothesis that the formation of the Mre11/Rad50/Xrs2(Nbs1) complex at the site of damage is an important contributor to ICL repair (McHugh et al. 2000; Pichierri and Rosselli 2004; Noll et al. 2006). Our results reinforce the role of MRX complex in this response (Fig. 1-4) and add a new player in this process, the protein Kin3. In human cells MRE11, together with other DNA damage response proteins such as 53BP1 and ATRX (Rad54p in yeast), has been suggested as a potential binding partner of Nek1, a mammalian ortholog of NIMA (Surpili et al. 2003). In this sense, at least in yeast, NIMA-related kinase Kin3p seems to act in the same way that the protein Mre11. In addition, no significant alteration in *KIN3* gene expression was observed in the times studied, during treatment with 8-MOP, cisplatin, HN2 and UVC (Fig. 5).

In general, cells with damaged DNA trigger a common signal transduction pathway called DNA damage checkpoint, which delay cell-cycle transitions until repair has occurred (Rouse and Jackson 2002). Our previous results showed that *kin3Δ* fail to arrest the cells at the G₂/M-phase checkpoint in response to DNA damage (Moura et al. unpublished dates). In addition, MRX complex is involved in S-phase and G₂-phase checkpoints after DSB damage (Lisby et al. 2004). The MRX can function together with both Tel1 (ATM in mammalian cells) and Mec1 (ATR in mammalian cells), PI3K-like kinases, to trigger checkpoint activation in response to DSBs, and leading to activation of the checkpoint kinases Rad53 (Chk2) and Chk1 (Schwartz et al. 2002; Blankley and

Lydall 2004). Mammalian Nek1 deficient cells are defective in G₁/S and M-phase checkpoints in response to DNA damage and fail to activate downstream crucial mediators Chk1 and Chk2. Since γ -H2AX is activated and localized to DNA damage sites soon after DNA damage in Nek1 deficient cells, it is suggested that Nek1 is not required for direct ATM or ATR activation and can be involved in activation of intermediaries in these pathways (Polci et al. 2004; Chen et al. 2008). Chen et al. (2008) suggested the most proximal or upstream sensor in the DNA damage response is thought to be the Mre11-Rad50-Nbs1 (MRN) complex.

The capacity of cells to arrest the cell-cycle progression in response to DNA synthesis inhibition and the dependence of this response on Tel1/Mec1 action were analyzed, by evaluation of the effect of hydroxyurea (HU) and/or caffeine treatment in WT and mutant cells (Fig. 6 and 7). In hydroxyurea-treated cells, the stalled replication forks in S-phase induced cell cycle arrest due to reversible inhibition of ribonucleotide reductase, which prevents the reduction of ribonucleotides to deoxyribonucleotides (dNTPs), depleting the dNTP pools (Lopes et al. 2001). This stalling of replication forks promotes activation of a Mec1-dependent checkpoint response that slows DNA replication, stabilizes replication forks, and prevents entry into a catastrophic mitosis. However, caffeine has been demonstrated to override DNA damage checkpoints by inhibiting the Tel1/Mec1 (Nyberg et al. 2002; Cortez 2003). Fig. 6 shows that the treatment with HU does not induce a cytotoxic effect in *kin3 Δ* mutant. Moreover, MRX single and double mutants are sensitive to HU in a dose dependent manner (Fig. 6), failing to resume cell cycle progression when the S phase is interrupted. Lisby et al. (2004) suggested that in the event of replication collapse, DNA ends are exposed, triggering the recruitment of Mre11 for processing and recombinational restart of the replication fork. Next, to check the presence of a Tel1/Mec1-dependent response in

strains, cells were pre-treated with HU and then exposed to caffeine. As shown in Fig. 7, *kin3Δ* cells showed a more pronounced sensitivity when compared to WT cells. The caffeine abolished the HU-induced checkpoint and probably cells re-enter into mitosis, leading to cell death. This response may indicate that Kin3p can play a role in a Tel1/Mec1-dependent pathway during stalled replication fork. Increases in the sensitivity were also observed in MRX single and double mutants (Fig. 7).

In order to test whether Tel1/Mec1 pathway is involved in the response to mutagenic stress, simple and double mutants were pre-treated with 8-MOP, cisplatin, HN2 or UVC and exposed to caffeine. In contrast, to HU plus caffeine results, *kin3Δ* strain is more resistant than to WT strain (Fig. 8) in the co-treatment with ICL inducers. Although in lesser extent, the deletion of *KIN3* gene in *mre11Δ* mutant allele also induced an increase in survival when cells were treated with cisplatin and HN2 plus caffeine. These results suggest that the absence of Tel1/Mec1 and Kin3 functional proteins prevents cell treated with mutagens plus caffeine from a lethal (repair) process or channels the DNA lesions to a successful mode of repair. In yeast, Mec1 is the major checkpoint kinase while Tel1 is largely redundant with Mec1 and only plays a minor role in most DNA damage checkpoint responses (Grenon et al. 2006). Our results suggest that MRX complex and Kin3p can be involved in Tel1/Mec1 pathway to signaling adduct injury, however the exact contribution of Kin3p in checkpoint activation in these conditions remains to be solved.

In this paper we have shown evidences that Kin3p and MRX complex proteins (Mre11/Rad50/Xrs2) interact genetically in a epistatic way after mutagenic stress, and this response seems to be dependent of Tel1/Mec1 pathway. However more evidences are still needed to confirm these interactions and hypotheses. In this sense, experiments are being conduct in our laboratory in order to determine physical and biochemical

interactions of Kin3 with proteins of MRX complex, as well as between Kin3 and Tel1 and Mec1 proteins.

Acknowledgements

Research was supported by grants from the Brazilian Agencies 'Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico' (CNPq) and 'Fundação de Amparo a Pesquisa do Rio Grande do Sul' (FAPERGS).

References

- Assenmacher N, Hopfner KP (2004) MRE11/RAD50/NBS1: complex activities. *Chromosoma* 113:157-166
- Barton AB, Davies CJ, Hutchison CA, Kaback DA (1992) Cloning of chromosome I DNA from *Saccharomyces cerevisiae*: analysis of the *FUN52* gene, whose product has homology to protein kinases. *Gene* 117:137-140
- Beljanski V, Marzilli LG, Doetsch PW (2004) DNA damage-processing pathways involved in the eukaryotic cellular response to anticancer DNA cross-linking drugs. *Mol Pharmacol* 65:1496-1506
- Blankley RT, Lydall D (2004) A domain of Rad9 specifically required for activation of Chk1 in budding yeast. *J Cell Sci* 117:601-608
- Burke D, Dawson T, Stearns T (2000) *Methods in Yeast Genetics*, a CSH Laboratory course manual, CSH Laboratory Press, Plainview, New York

- Chen Y, Riley DJ, Zheng L, Chen PL, Lee WH (2002) Phosphorylation of the mitotic regulator protein Hec1 by Nek2 kinase is essential for faithful chromosome segregation. *J Biol Chem* 277:49408-49416
- Chen Y, Chen PL, Chen CF, Jiang X, Riley DJ (2008) Never-in-mitosis related kinase 1 functions in DNA damage response and checkpoint control. *Cell Cycle* 7:3194-3201
- Cortez D (2003) Caffeine inhibits checkpoint responses without inhibiting the ataxia-telangiectasia-mutated (ATM) and ATM-and Rad3-related (ATR) protein kinases. *J Biol Chem* 278:37139-37145
- Czornak K, Chughtai S, Chrzanowska KH (2008) Mystery of DNA repair: the role of MRN complex and ATM kinase in DNA damage repair. *J Appl Genet* 49:383-396
- D'Amours D, Jackson SP (2002) The Mre11 complex: at the crossroads of DNA repair and checkpoint signaling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3:317-327
- Dronkert ML, Kanaar R (2001) Repair of interstrand cross-links. *Mutat Res* 486:217-247
- Fichtinger-Schepman AM, van Dijk-Knijnenburg HC, van der Velde-Visser SD, Berends F, Baan RA (1995) Cisplatin-and carboplatin-DNA adducts: is PT-AG the cytotoxic lesion? *Carcinogenesis* 16:2447-2453
- Friedberg EC, Walker GC, Siede W, Wood RD, Schultz RA, Ellenberger T (2006) *DNA repair and Mutagenesis*. 2nd ed. ASM Press, Washington DC

- Furuse M, Nagase Y, Tsubouchi H, Murakami-Murofushi K, Shibata T, Ohta K (1998) Distinct roles of two separable in vitro activities of yeast Mre11 in mitotic and meiotic recombination. *Embo J* 17:6412-6425
- Gietz RD, Woods RA (2002) Transformation of yeast by lithium acetate/single-stranded carrier DNA/polyethylene glycol method. *Methods Enzymol* 350:87-96
- Grenon M, Magill CP, Lowndes NF, Jackson SP (2006) Double-strand breaks triggers MRX-and Mec1-dependent, but Tel1-independent, checkpoint activation. *FEMS Yeast Res* 6:836-847
- Heffernan TP, Simpson DA, Frank AR, Heinloth AN, Paules RS, Cordeiro-Stone M, Kaufmann WK (2002) An ATR- and Chk1-dependent S checkpoint inhibits replicon initiation following UVC-induced DNA damage. *Mol Cell Biol* 22:8552-61
- Jones DG, Rosamond J (1990) Isolation of a novel protein kinase-encoding gene from yeast by oligodeoxyribonucleotide probing. *Gene* 90:87-92
- Krogh BO, Llorente B, Lam A, Symington LS (2005) Mutations in Mre11 phosphoesterase motif I that impair *Saccharomyces cerevisiae* Mre11-Rad50-Xrs2 complex stability in addition to nuclease activity. *Genetics* 171:1561-1570
- Lee JH, Paull TT (2004) Direct activation of the ATM protein kinase by the Mre11/Rad50/Nbs1 complex. *Science* 304:93-6
- Letwin K, Mizzen L, Motro B, Ben-David Y, Bernstein A, Pawson T (1992) A mammalian dual specificity kinase, Nek1, is related to the NIMA cell cycle regulator and highly expressed in meiotic germ cells. *EMBO J* 11:3521-3531

- Lippert B (1992) From cisplatin to artificial nucleases--the role of metal ion-nucleic acid interactions in biology. *Biometals* 5:195-208
- Lisby M, Barlow JH, Burgess RC, Rothstein R (2004) Choreography of the DNA damage response: spatiotemporal relationships among checkpoint and repair proteins. *Cell* 117:699-713
- Lopes M, Cotta-Ramusino C, Pellicioli A, Liber G, Plevani P, Muzi-Falconi M, Newlon CS, Foiani M (2001) The DNA replication checkpoint response stabilizes stalled replication forks. *Nature* 412:557-561
- Lowndes NF, Murguia JR (2000) Sensing and responding to DNA damage. *Curr Opin Genet Dev* 10:17-25
- McHugh PJ, Gill RD, Waters R, Hartley JA (1999) Excision repair of nitrogen mustard-DNA adducts in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res* 27:3259-3266
- McHugh PJ, Sones WR, Hartley JA (2000) Repair of intermediate structures produced at DNA interstrand cross-links in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 20:3425-3433
- Moreau S, Ferguson JR, Symington LS (1999) The nuclease activity of Mre11 is required for meiosis but not for mating type switching, end joining, or telomere maintenance. *Mol Cell Biol* 19:556-566
- Noll DM, Mason TM, Miller PS (2006) Formation and repair of interstrand cross-links in DNA. *Chem Rev* 106:277-301
- Nyberg KA, Michelson RJ, Putnam CW, Weinert TA (2002) Toward maintaining the genome: DNA damage and replication checkpoints. *Annu Rev Genet* 36:617-656

- O'Connell MJ, Krien MJ, Hunter T (2003) Never say never. The NIMA-related protein kinases in mitotic control. *Trends Cell Biol* 13:221-228
- O'regan L, Blot J, Fry AM (2007) Mitotic regulation by NIMA-related kinases. *Cell Div* 2:25
- Osmani SA, Pu RT, Morris NR (1988) Mitotic induction and maintenance by over expression of a G2-specific gene that encodes a potential protein kinase. *Cell* 52:237-244
- Osmani AH, McGuirre SL, Osmani SA (1991) Parallel activation of the NIMA and p34cdc2 cell cycle regulated protein kinases is required to initiate mitosis in *A. nidulans*. *Cell* 67:283-291
- Osmani AH, O'Donnell K, Pu RT, Osmani SA (1991) Activation of the nimA protein kinase plays a unique role during mitosis that cannot be bypassed by absence of the bimE checkpoint. *EMBO J* 10:2669-2679
- Pfeifer GP, You YH, Besaratinia A (2005) Mutations induced by ultraviolet light. *Mutat Res* 571:19-31
- Pichierri P, Rosselli F (2004) The DNA crosslink-induced S-phase checkpoint depends on ATR-CHK1 and ATR-NBS1-FANCD2 pathways. *EMBO J* 23:1178-1187
- Polci R, Peng A, Chen PL, Riley DJ, Chen Y (2004) NIMA-related protein kinase 1 is involved in the ionizing radiation-induced DNA damage response. *Cancer Res* 64:8800-8803
- Raymond WE, Kleckner N (1993) RAD50 protein of *S. cerevisiae* exhibits ATP-dependent DNA-binding. *Nucleic Acids Res* 21:3851-3856

- Rouse J, Jackson SP (2002) Interfaces between the detection, signaling, and repair of DNA damage. *Science* 297:547-551
- Sambrook J, Fritsch ER, Maniatis T (2000) *Molecular cloning: a laboratory manual*. 3rd ed. Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, New York
- Surpili MJ, Delben TM, Kobarg J (2003) Identification of proteins that interact with the central coiled-coil region of the human protein kinase NEK1. *Biochemistry* 42:15369-15376
- Schwartz MF, Duong JK, Sun Z, Morrow JS, Pradhan D, Stern DF (2002) Rad9 phosphorylation sites couple Rad53 to the *Saccharomyces cerevisiae* DNA damage checkpoint. *Mol Cell* 9:1055-65
- Scweitzer B, Philippsen P (1992) *NPK1*, a nonessential protein kinase gene in *Saccharomyces cerevisiae* with similarity to *Aspergillus nidulans nimA*. *Mol Gen Genet* 234:164-167
- Trujillo KM, Roh DH, Chen L, Van Komen S, Tomkinson A, Sung P (2003) Yeast xrs2 binds DNA and helps target rad50 and mre11 to DNA ends. *J Biol Chem* 278:48957-48964
- Usui T, Ohta T, Oshiumi H, Tomizawa J, Ogawa H, Ogawa T (1998) Complex formation and functional versatility of Mre11 of budding yeast in recombination. *Cell* 95:705-716

Table 1 Yeast strains used in this study

Strain	Genotype	Source
BY4741	<i>Mata; his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0</i>	Euroscarf
<i>kin3Δ</i>	BY4741; <i>kin3::kanMX4</i>	Euroscarf
<i>mre11Δ</i>	BY4741; <i>mre11::kanMX4</i>	Euroscarf
<i>rad50Δ</i>	BY4741; <i>rad50::kanMX4</i>	Euroscarf
<i>xrs2Δ</i>	BY4741; <i>xrs2::kanMX4</i>	Euroscarf
<i>mre11Δkin3 Δ</i>	<i>mre11Δ; kin3::URA3</i>	This work
<i>rad50Δkin3Δ</i>	<i>rad50Δ; kin3::URA3</i>	This work
<i>xrs2Δkin3 Δ</i>	<i>xrs2Δ; kin3::URA3</i>	This work

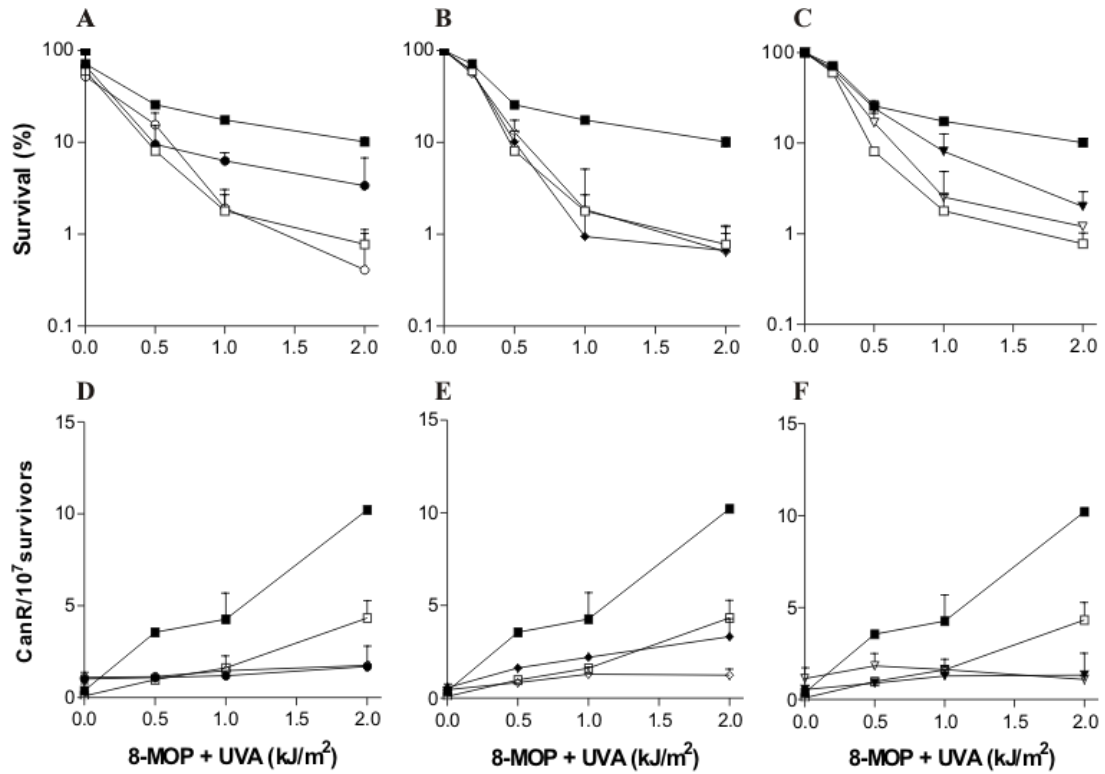


Figure 1 (A-C) survival assay after treatment with 8-MOP and; (D-F) induced forward mutation in the *CAN1* locus per 10^7 survivors cells, in isogenic strains BY4741-WT (filled square), *kin3Δ* (open square), *mre11Δ* (filled circle) and *mre11Δkin3Δ* (open circle), *rad50Δ* (filled diamond) and *rad50kin3Δ* (open diamond), *xrs2Δ* (filled triangle) and *xrs2Δkin3Δ* (open triangle). Results are expressed as means \pm standard deviation of four independent experiments

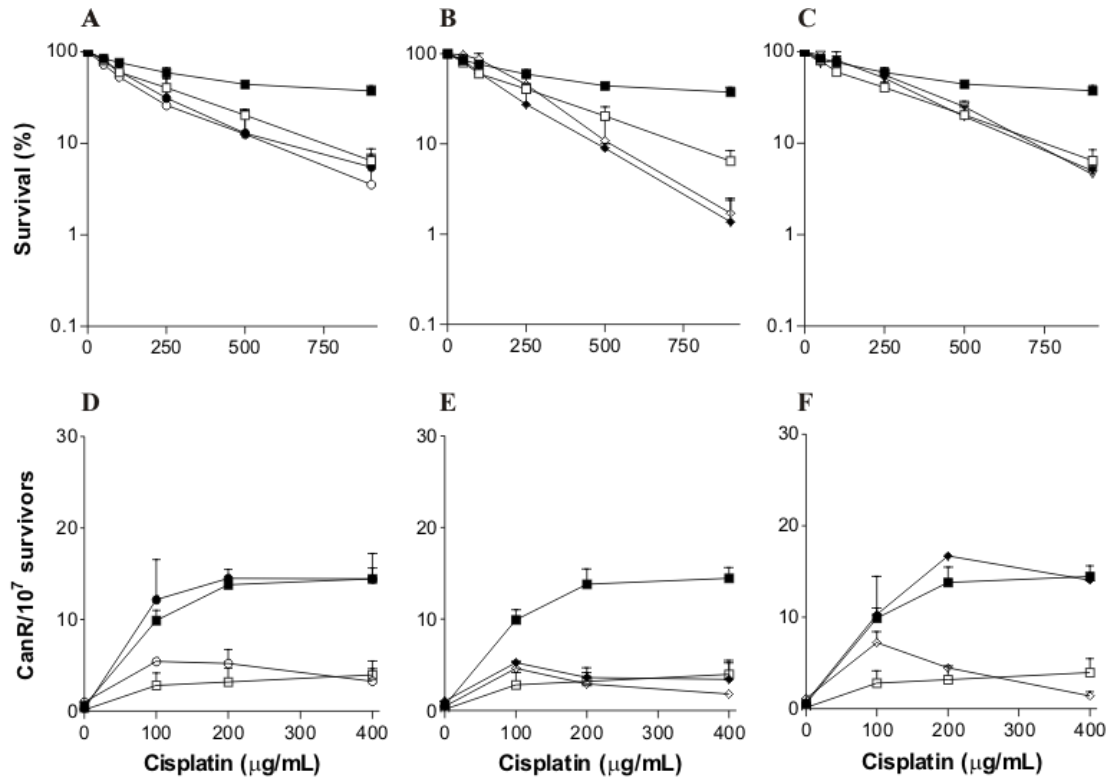


Figure 2 (A-C) survival assay after treatment with cisplatin and; (D-F) induced forward mutation in the *CAN1* locus per 10^7 survivors cells, in isogenic strains BY4741-WT (filled square), *kin3* Δ (open square), *mre11* Δ (filled circle) and *mre11* Δ *kin3* Δ (open circle), *rad50* Δ (filled diamond) and *rad50kin3* Δ (open diamond), *xrs2* Δ (filled triangle) and *xrs2* Δ *kin3* Δ (open triangle). Results are expressed as means \pm standard deviation of four independent experiments

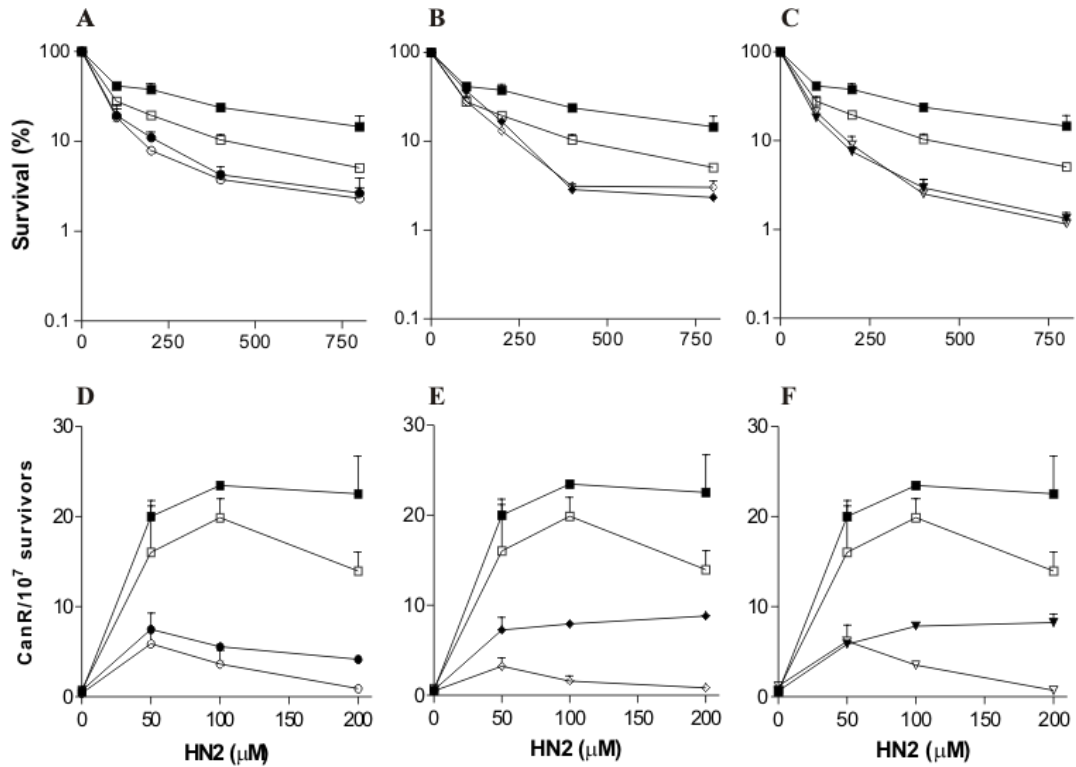


Figure 3 (A-C) survival assay after treatment with nitrogen mustard and; (D-F) induced forward mutation in the *CAN1* locus per 10^7 survivors cells, in isogenic strains BY4741-WT (filled square), *kin3Δ* (open square), *mre11Δ* (filled circle) and *mre11Δkin3Δ* (open circle), *rad50Δ* (filled diamond) and *rad50kin3Δ* (open diamond), *xrs2Δ* (filled triangle) and *xrs2Δkin3Δ* (open triangle). Results are expressed as means \pm standard deviation of four independent experiments

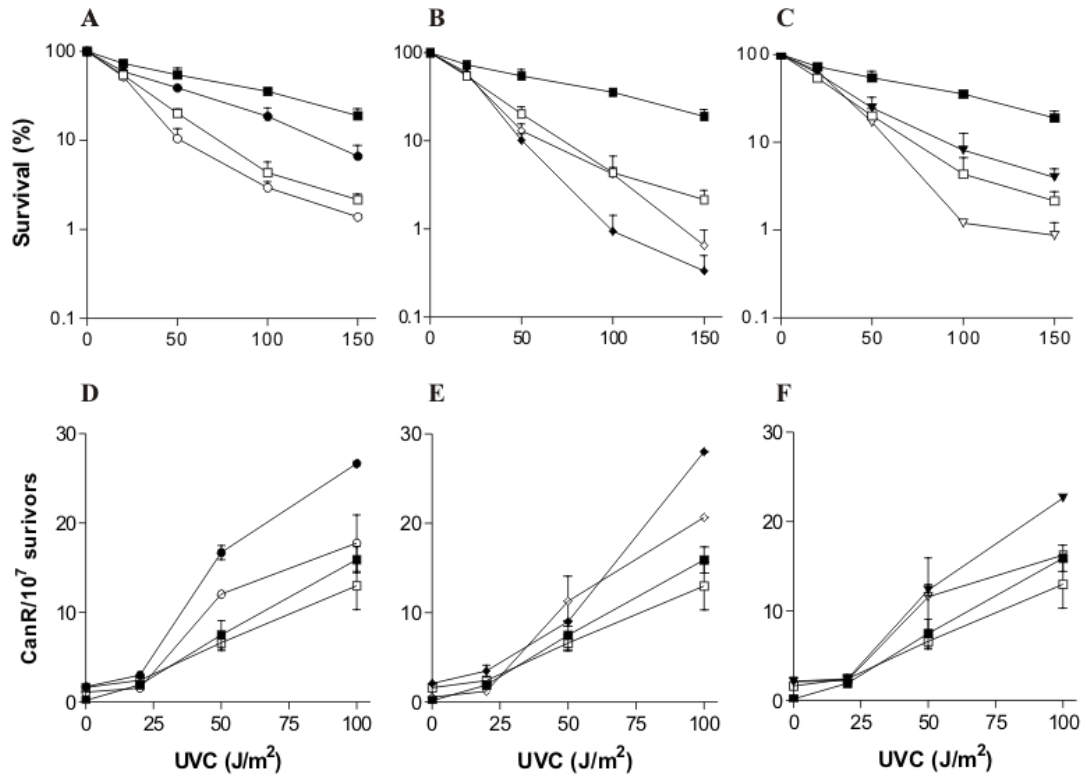


Figure 4 (A-C) survival assay after treatment with UVC and; (D-F) induced forward mutation in the *CAN1* locus per 10^7 survivors cells, in isogenic strains BY4741-WT (filled square), *kin3* Δ (open square), *mre11* Δ (filled circle) and *mre11* Δ *kin3* Δ (open circle), *rad50* Δ (filled diamond) and *rad50**kin3* Δ (open diamond), *xrs2* Δ (filled triangle) and *xrs2* Δ *kin3* Δ (open triangle). Results are expressed as means \pm standard deviation of four independent experiments

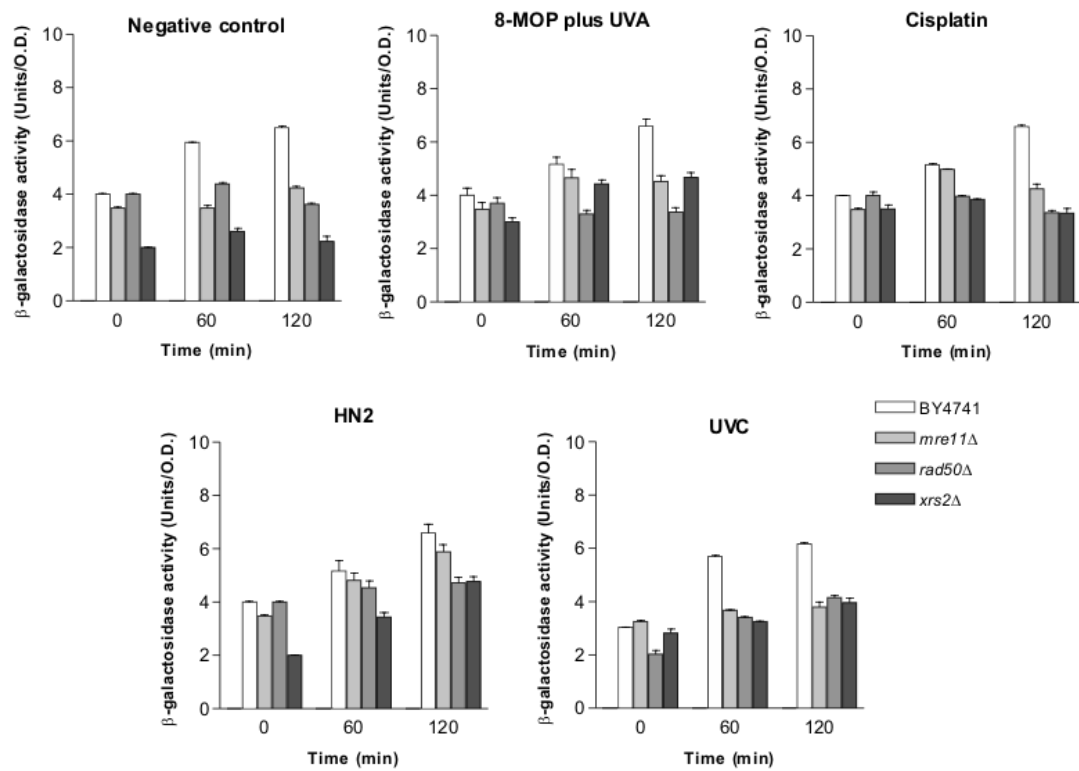


Figure 5 Regulation of *KIN3* expression in isogenic strains BY4741, *mre11* Δ , *rad50* Δ , *xrs2* Δ . *KIN3* expression was assayed using a reporter plasmid pMEL β 2. Cells in exponential phase were reinoculated in SC-ura fresh medium supplemented or not with cisplatin (50 μ g/mL) and HN2 (25 μ M). For 8-MOP plus UVA (0.5kJ/m²) and UVC (20 J/m²) treatments, cells were irradiated and after resuspended in SC-ura fresh medium. Aliquots were withdrawn at one and two hours for cell number determination and *KIN3* expression measure

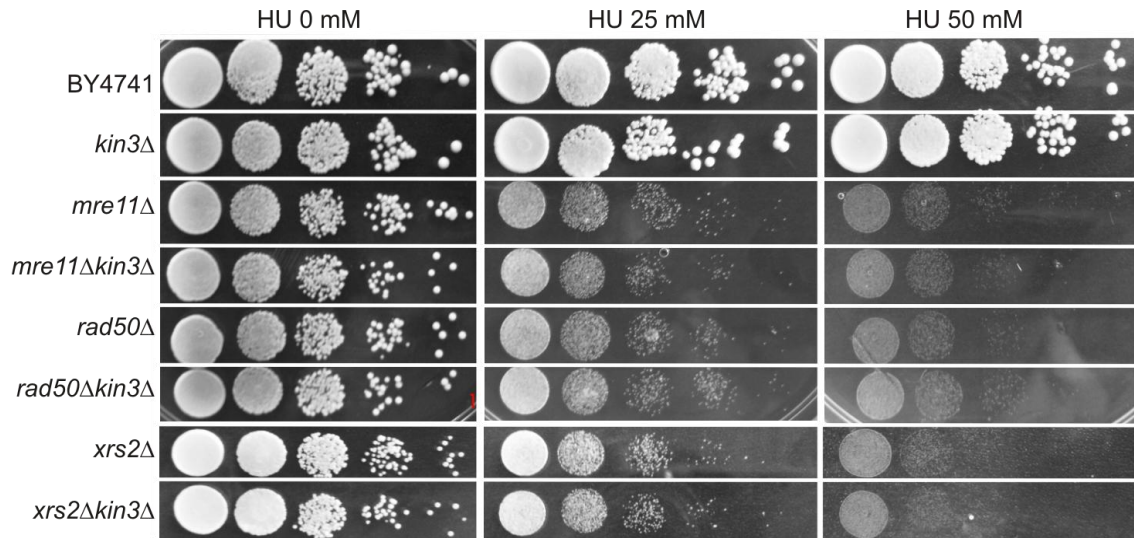


Figure 6 Sensitivity to hydroxyurea (HU). Exponentially cultures were diluted serially by 10-fold and were spotted onto rich media plates with (25 and 50 mM) or without (0 mM) HU

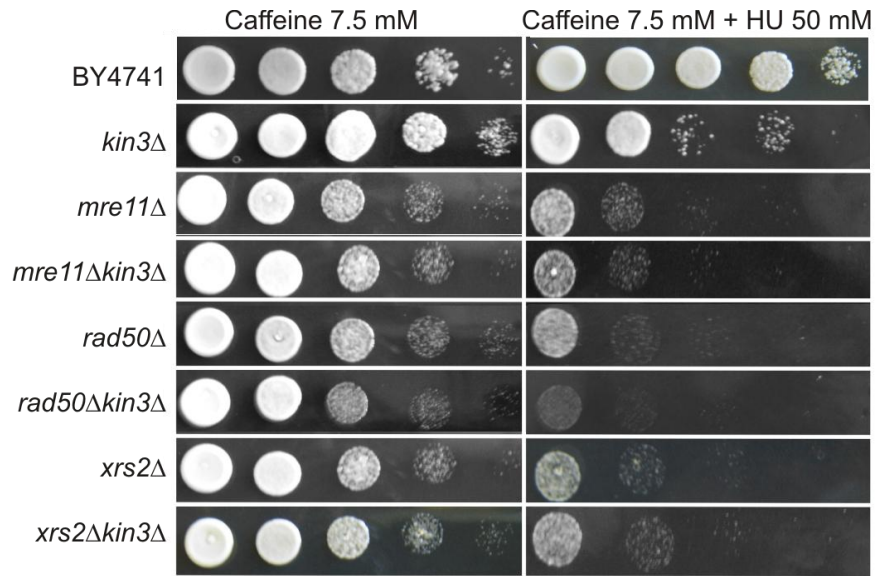


Figure 7 Sensitivity to hydroxyurea (HU) plus caffeine. Exponentially cultures were pre-treated with HU (50 mM) or without in YPD, diluted serially by 10-fold and were spotted onto rich media plates with caffeine (7.5 mM)

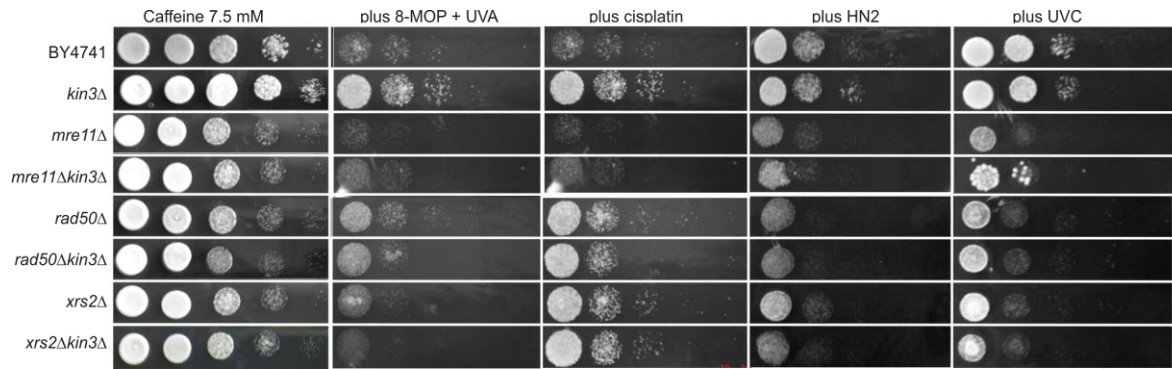


Figure 8 Sensitivity to mutagenic agents plus caffeine. Exponentially cultures were pre-treated with 8-MOP (5 μ M), cisplatin (250mg/mL), nitrogen mustard (25 μ M) or UVC (20J/m²), diluted serially by 10-fold and were spotted onto rich media plates with caffeine (7.5 mM)

IV – DISCUSSÃO GERAL

A manutenção da integridade genômica é de crucial importância para todos os organismos. Danos ao DNA são causados constantemente, por diversos agentes endógenos ou exógenos, e podem ter consequências severas caso persistam no genoma. Modificações no DNA podem levar a mutações, as quais alteram a sequência codificadora do DNA, podendo levar ao desenvolvimento de câncer em mamíferos. Outras lesões no DNA interferem com processos celulares normais, como replicação e transcrição, e são deletérias a célula. Por estes motivos, os organismos desenvolveram inúmeros mecanismos para enfrentar os efeitos destas lesões. Diversos mecanismos de reparação do DNA estão disponíveis, agindo isoladamente ou em conjunto, dependendo do tipo de lesão encontrada, sendo que em células em divisão, a presença de danos leva a parada do ciclo celular, para permitir que o dano seja reparado antes da replicação ou divisão celular (Schärer, 2003).

De um modo geral, as respostas celulares a danos no DNA são altamente conservadas entre os diferentes organismos, desde o controle do ciclo celular até as vias de reparação. Estudos com leveduras, fungos filamentosos e células de mamíferos, entre outros organismos, têm sido amplamente utilizados para a compreensão destes mecanismos, os quais muitas vezes permitem aumentar o conhecimento sobre determinadas patologias ou até mesmo a etiologia do câncer.

No fungo filamentoso *A. nidulans* a proteína NIMA é um dos reguladores do ciclo celular, estando envolvida na progressão da fase G2 para a mitose (Osmani *et al*, 1987). Além disso, esta proteína também atua na parada do ciclo celular em resposta a danos no DNA (Ye *et al*, 1996). Diversas cinases relacionadas à NIMA já foram identificadas em diversos organismos, e entre as 11 Neks identificadas em humanos, algumas estão envolvidas em controle do ciclo celular e resposta a danos no DNA. A proteína Nek1, além de estar envolvida na resposta a agentes indutores de danos no DNA e no controle da progressão das fases G1/S e M do ciclo celular em resposta a danos no DNA (Polci *et al*, 2004; Chen *et al*, 2008), interage com diferentes proteínas envolvidas em diversos processos celulares, incluindo reparação de quebras duplas no DNA e parada de ciclo celular na fase G2/M (Surpili *et al*, 2003). Outro exemplo é a proteína Nek2, que por sua

vez, atua na progressão da fase G2/M, entre outros processos (revisado por Hayward e Fry, 2006).

Em *S. cerevisiae* a proteína Kin3 também foi identificada como um homólogo estrutural da proteína NIMA de *A. nidulans* (Jones e Rosamond, 1990; Barton *et al*, 1992; Schweitzer e Philippsen, 1992), entretanto suas funções ainda não são conhecidas. Estudos do nosso grupo demonstram que linhagens mutantes no gene *KIN3* apresentam uma pronunciada sensibilidade a agentes genotóxicos, e que a ausência desta proteína causa uma deficiência na ativação do checkpoint da fase G2/M em resposta a danos no DNA (Moura *et al*, dados não publicados).

Levando em consideração o possível envolvimento da proteína Kin3 na resposta a agentes indutores de danos no DNA, bem como resultados obtidos com o estudo de cinases relacionadas à NIMA em mamíferos, o objetivo deste trabalho foi investigar as interações genéticas entre o gene *KIN3* e os genes do complexo MRX (*MRE11*, *RAD50* e *XRS2*) em *S. cerevisiae* após estresse genotóxico, visto que este complexo está envolvido em diversos processos, incluindo reparação de quebras duplas de DNA (DSB's), por NHEJ ou HR, bem como ativação de *checkpoint* em resposta a danos (D'Amours e Jackson, 2002).

Os resultados obtidos nas curvas de sobrevivência utilizando 8-MOP foto ativado, cisplatina e mostarda nitrogenada indicam uma possível interação epistática entre o gene *KIN3* e os genes *MRE11*, *RAD50* e *XRS2*, já que os duplos mutantes apresentaram sensibilidade semelhante à sensibilidade dos simples mutantes mais sensíveis, sugerindo que estes genes atuem numa mesma via na reparação de lesões induzidas estes agentes.

Os agentes bi-funcionais 8-MOP, cisplatina e HN2 possuem a capacidade de formar uma variedade de lesões no DNA, incluindo monoadutos e pontes intra ou intercadeias (revisado por Bethea *et al*, 1999; Wang e Lippard, 2005; McHugh *et al*, 1999). Apesar das ICL's serem formadas em uma pequena proporção comparada ao total de lesões, representam o tipo mais tóxico de lesão causado por estas drogas (revisado por Noll *et al*, 2006). O mecanismo de reparação de ICL's não é completamente conhecido, entretanto, estudos indicam o envolvimento das vias de excisão de nucleotídeos (NER), da reparação de quebras duplas (recombinacional) e da síntese translesão (para revisão ver Dronkert e Kannar, 2001, Lehoczyk *et al*, 2007).

O envolvimento do complexo MRN em resposta a ICL's geradas por 8-MOP fotoativado foi demonstrado por Pichierri e Rosselli (2004), onde, sob controle da cinase ATR, a proteína Nbs1 (Xrs2 em levedura) é ativada levando a parada na fase S mediado por ICL. Durante a reparação das ICL's, a incisão das lesões pelas proteínas da via NER pode levar a formação de quebras duplas de cadeia, as quais servem como substrato para o complexo MRX, que atua como sensor de DSB's, ativando a cascata sinalizadora de paradas de ciclo celular e reparação de DNA (Lee e Paul, 2004). A elevada sensibilidade do mutante *mre11Δ* a HN2 reforça os dados de McHugh e colaboradores (2000), indicando o requerimento do complexo MRX na reparação de ICL's. Os resultados obtidos neste trabalho demonstram que, assim como *mre11Δ*, os outros alelos mutantes do complexo são sensíveis não só a HN2, mas também a cisplatina e 8-MOP fotoativado, confirmando a importância deste complexo na reparação de ICL's. A sensibilidade observada na linhagem mutante *kin3Δ* em resposta a cisplatina e HN2, como também observado por Moura e colaboradores (dados não publicados), juntamente com a sensibilidade a 8-MOP, indicam a participação da proteína Kin3 na resposta a danos causados por estes agentes. Em células humanas a proteína Mre11 interage com Nek1, o ortólogo em mamíferos da proteína NIMA de *A. nidulans* (Surpilli *et al*, 2003). O perfil de sensibilidade observado nos duplos mutantes é um indicativo de que em leveduras a cinase Kin3 interage de um modo epistático com o complexo MRX na resposta a danos causados por agentes indutores de ICL's.

Diferente da resposta observada no tratamento com os agentes bi-funcionais 8-MOP, cisplatina e HN2, onde os duplos mutantes demonstraram sensibilidade semelhante a pelo menos um dos simples mutantes, o tratamento com UVC resultou em diferentes perfis de sensibilidade. A irradiação das células com UVC induz a formação de dímeros de pirimidina (CPDs) e 6-4 fotoprodutos (6,4-PPs), lesões que induzem severas distorções na molécula de DNA (revisado por Pfeifer *et al*, 2005). Enquanto nas linhagens *mre11Δ* e *xrs2Δ* a deleção do gene *KIN3* induziu um aumento na sensibilidade em relação aos simples mutantes, a linhagem *rad50Δ* apresentou uma sensibilidade mais pronunciada comparada as linhagens *kin3Δ* e *rad50Δkin3Δ*, principalmente quando exposta a doses mais elevadas de UVC. Em mamíferos, as proteínas Mre11 e Nbs1 parecem não ser necessárias para a ativação de checkpoint de fase S sob baixas doses de UVC (1 J/m²) (Heffernan *et al*, 2002). Entretanto, outros estudos demonstram que quando células são

expostas a doses mais altas de UVC ocorre ativação de checkpoint de fase S de um modo dependente de Mre11 e Nbs1 (Olson *et al*, 2007). Da mesma forma, a deficiência de Rad50 impossibilita a ativação dos checkpoints de fase S e G2/M (Zhong *et al*, 2005). A sensibilidade das linhagens mutantes nos genes do complexo MRX confirma o envolvimento do complexo na resposta a danos causados por UVC. A sensibilidade do mutante *kin3Δ* indica que a proteína Kin3 também possa estar envolvida na resposta a estas lesões, entretanto, o perfil de sensibilidade dos duplos mutantes não é indicativo de interação epistática. Desta forma, Kin3 pode estar agindo de uma forma independente do complexo MRX na resposta a UVC.

Na avaliação da taxa de mutação para frente (*forward mutation*), observou-se que a deleção do gene *KIN3* ocasiona uma diminuição na frequência de mutação na linhagem selvagem quando expostas a 8-MOP, cisplatina ou HN2, indicando que a proteína Kin3 possa ter algum papel na via mutagênica de reparação de DNA. Em relação a lesões causadas por cisplatina e HN2, defeitos na via recombinogênica (*rad52*) induzem um aumento na taxa de mutação '*forward*', que apesar de pequeno em relação às células não tratadas, é indicativo de que na ausência de recombinação, a reparação de parte destas lesões é canalizada para a via mutagênica (Beljanski *et al*, 2004). A diminuição das taxas de mutação observada nos duplos mutantes na maioria dos tratamentos indica que possivelmente Kin3 esteja agindo em conjunto com o complexo MRX nesta resposta. Como anteriormente observado em relação às curvas de sobrevivência, as taxas de mutação em resposta a lesões induzidas por UVC também apresentam resultados diferentes em relação aos outros agentes. A via de síntese translesão, bem como a via de excisão de nucleotídeos (NER), representam as principais vias de reparação de fotoprodutos no DNA (Friedberg *et al*, 2005). Apesar das proteínas do complexo MRX estarem envolvidas numa via de reparação pós-replicativa de danos causados por UV, esta via seria livre de erro, visto que Rad50 e Xrs2 não contribuem para via de síntese translesão que utiliza as polimerases ζ e η , que são frequentemente mutagênicas (Gangavarapu *et al*, 2007). Quando se observa a resposta das linhagens aos danos causados por UVC, todas as linhagens apresentam uma taxa de mutação crescente com o aumento da dose de radiação, confirmando o não requerimento do complexo nesta via. Novamente, a deleção do gene *KIN3* ocasionou uma diminuição na frequência de mutação tanto na linhagem selvagem

quanto nas mutantes do complexo MRX. Apesar de a diminuição ser pequena, pode ser um indicativo de que Kin3 esteja agindo nesta via mutagênica.

A expressão do gene *KIN3* durante o estresse genotóxico também foi avaliada. Apesar de serem observados pequenos aumentos na expressão para algumas das linhagens em relação as células não tratadas, os mesmos não foram significativos.

Resultados prévios do nosso grupo demonstraram que linhagens deficientes na proteína Kin3 falham em ativar a parada de ciclo celular na fase G2/M em resposta a danos no DNA (Moura *et al*, dados não publicados). Como citado anteriormente, o complexo MRX está envolvido em diversos processos celulares, entre os quais, além da reparação por recombinação homóloga e não homóloga, também a sinalização e ativação de *checkpoint* de ciclo celular em resposta a danos no DNA (D'Amours e Jackson, 2002). Na presença de DSB's o complexo MRX induz a ativação de *checkpoints* em resposta a danos (Lisby *et al*, 2004; Grenon *et al*, 2006), agindo em conjunto com Mec1(ATR) e Tel1 (ATM) na ativação das cinases Chk1 e Rad53 (Chk2) (Lowndes e Murguia, 2000; Abraham, 2001). Células de mamíferos deficientes em Nek1 são incapazes de ativar os *checkpoints* de fase G1/S e M, devido à falha em ativar mediadores como Chk1 e Chk2. Entretanto, a proteína γ -H2AX é ativada e localizada em sítios de dano mesmo em células deficientes em Nek1, sugerindo que Nek1 não seja requerida para a ativação direta de ATM ou ATR, e sim na ativação de intermediários nestas vias (Polci *et al*, 2004, Chen *et al*, 2008). Um dos possíveis sensores nesta resposta poderia ser o complexo MRN (MRX) (Chen *et al*, 2008).

O envolvimento da proteína Kin3 na resposta à inibição da síntese de DNA e a dependência da ação de Tel1/Mec1 nesta resposta foi avaliada observando-se o efeito da hidroxiuréia (HU) e/ou cafeína sobre as linhagens. A HU leva a uma inibição da síntese de DNA, através da inibição reversível da ribonucleotídeo redutase, que faz com que haja uma diminuição nos níveis de desoxiribonucleotídeos (Lopes *et al*, 2001). Esta depleção faz com que as células apresentem diversas forquilhas de replicação inacabadas, que promovem a ativação de *checkpoint* através da ação de Mec1, permitindo a parada do ciclo e estabilização destas forquilhas, de modo que as células não entrem em mitose (Nyberg *et al*, 2002). Enquanto na linhagem deficiente na proteína Kin3 o tratamento com HU não apresentou efeito citotóxico, as linhagens simples e duplos mutantes do complexo MRX

apresentaram sensibilidade de uma maneira dose-dependente, não sendo capazes de recomeçar a progressão do ciclo celular após a fase S ter sido interrompida. Durante o colapso da forquilha de replicação, extremidades do DNA são expostas, recrutando a proteína Mre11 para processamento da forquilha de replicação e reinício recombinacional da forquilha (Lisby *et al*, 2004). Entretanto, quando as células foram tratadas com HU e expostas a cafeína, a linhagem mutante *kin3Δ* apresentou uma sensibilidade superior a da linhagem selvagem. Células expostas à cafeína ultrapassam *checkpoints* de dano no DNA devido à cafeína inibir ATR/ATM (Tel1/Mec1) (Blasina *et al*, 1999; Sarkaria *et al*, 1999; Cortez, 2003). Na linhagem *kin3Δ* a cafeína inibiu o *checkpoint* de fase S induzido por HU, com isso, as células reentraram na mitose levando a morte celular, sendo um indicativo de que Kin3 possa estar agindo em uma via dependente de Tel1/Mec1 na resposta ao colapso da forquilha de replicação. Uma sensibilidade mais pronunciada foi observada nos simples e duplos mutantes do complexo MRX, de acordo com o envolvimento do complexo MRX na via Tel1/Mec1 de ativação do *checkpoint* em resposta ao bloqueio da replicação (D'Amours e Jackson, 2001; Lee e Paul, 2004).

O envolvimento de Kin3 e da via Tel1/Mec1 na resposta ao estresse mutagênico também foi avaliado, sendo os simples e duplos mutantes pré-tratados com 8-MOP, cisplatina, HN2 ou UVC e expostos a cafeína. Diferente dos resultados obtidos com HU e cafeína, durante o tratamento com agentes indutores de ICL's (8-MOP, cisplatina e HN2) a linhagem mutante *kin3Δ* foi mais resistente que a linhagem selvagem, sugerindo que na deficiência de Kin3 e Tel1/Mec1, a reparação destas lesões seja canalizada para um mecanismo alternativo. Já no tratamento com UVC, apesar das linhagens selvagem e mutante *kin3Δ* serem sensíveis, não houve diferença de sensibilidade entre as mesmas, indicando que nas lesões induzidas por UVC, Kin3 talvez esteja agindo na mesma via que Tel1/Mec1. Em mamíferos, o complexo MRN age tanto *upstream* quanto *downstream* de ATR para mediar *checkpoint* de fase S em resposta a danos por UV ou HU, entretanto, o complexo é dispensável quando doses relativamente altas de UV ou HU são utilizadas (Olson *et al*, 2007). Novamente os simples e duplos mutantes do complexo MRX apresentaram uma sensibilidade pronunciada a todos os tratamentos. Apesar do resultado observado na linhagem *mre11Δ*, em que a deleção do gene *KIN3* ocasionou um aumento muito discreto na sobrevivência durante os tratamentos com cisplatina ou HN2 mais

caféina, os resultados observados, de um modo geral, sugerem que o complexo MRX e a proteína Kin3 estejam envolvidas na via Tel1/Mec1 de sinalização destes danos.

Neste trabalho conseguimos demonstrar que, frente ao estresse mutagênico, ocorre a interação epistática entre a proteína Kin3 e o complexo MRX, podendo esta resposta ser dependente da via Tel1/Mec1. Apesar de mais trabalhos serem necessários para confirmação destas interações e hipóteses, nossos resultados ampliam o conhecimento sobre esta proteína ainda pouco conhecida em *S. cerevisiae*. Ainda, fornecem dados para serem comparados e acrescentados aos já obtidos com proteínas semelhantes em mamíferos, permitindo uma melhor compreensão dos diversos mecanismos de regulação do ciclo celular e resposta a danos no DNA.

V - CONCLUSÕES

1. Conclusão geral

✓ Os resultados obtidos neste trabalho indicam que o gene *KIN3* interage de modo epistático com os genes do complexo MRX (*MRE11/RAD50/XRS2*) na resposta a danos no DNA. Além disso, esta resposta ao estresse mutagênico parece ser dependente da via Tel1/Mec1 de sinalização de danos no DNA.

2. Conclusões específicas

✓ A cinase Kin3 interage de um modo epistático com o complexo MRX na resposta a danos causados por agentes indutores de ICL's, como a 8-MOP, cisplatina ou HN2.

✓ Na resposta a danos induzidos por UVC, a cinase Kin3 parece agir de forma independente do complexo MRX.

✓ A deleção do gene *KIN3* ocasiona uma diminuição nas taxas de mutação *forward*, quando as linhagens são expostas a 8-MOP, cisplatina, HN2 ou UVC.

✓ A linhagem mutante *kin3Δ* não é defectiva na indução de *checkpoint* de fase S do ciclo celular.

✓ A cinase Kin3 parece agir em uma via dependente de Tel1/Mec1 na resposta ao colapso da forquilha de replicação.

✓ Na ausência de Kin3 e Tel1/Mec1, a reparação de lesões induzidas por 8-MOP, cisplatina ou HN2 parece ser canalizada para um mecanismo alternativo.

✓ Kin3 parece agir na mesma via que Tel1/Mec1 na reparação de lesões induzidas por UVC.

✓ A cinase Kin3 e o complexo MRX parecem agir em uma via dependente de Tel1/Mec1 na sinalização de danos.

VI - PERSPECTIVAS

- ✓ Confirmar as interações entre o gene *KIN3* e os genes do complexo MRX, através de ensaios de duplo-híbrido e ensaios de co-imunoprecipitação.

- ✓ Avaliar a expressão da proteína Kin3 nas diferentes linhagens mutantes do complexo MRX por imunoblotting nestas mesmas condições

- ✓ Confirmar o padrão de expressão do gene *KIN3* nas linhagens mutantes do complexo MRX em resposta ao estresse mutagênico, utilizando PCR semi-quantitativo.

- ✓ Determinar o perfil de ciclo celular das linhagens simples e duplos mutantes, através de citometria de fluxo nestas condições de estresse genotóxico.

VII - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ABRAHAM, R. T. Cell cycle checkpoints signaling through the ATM and ATR kinases. *Genes Dev.*, 15(17):2177-2196, 2001.
2. ALANI, E.; SUBBIAH, S. & KLECKNER, N. The yeast RAD50 gene encodes a predicted 153-kD proteins containing a purine nucleotide-binding domain and two large heptad-repeat regions. *Genetics*, 122(1):47-57, 1989.
3. ALTIERI, F.; GRILLO, C.; MACERONI, M. & CHICHIARELLI, S. DNA damage and repair: from molecular mechanisms to health implications. *Antioxid Redox Signal.*, 10(5):891-937, 2008.
4. ANDERSEN, P.L.; XU, F. & XIAO, W. Eukariotic DNA damage tolerance and translesion synthesis through covalent modifications of PCNA. *Cell Res.*, 18(1):162-173, 2008.
5. ANDERSON, D.E.; TRUJILLO K.M.; SUNG, P. & ERICKSON, H.P. Structure of the Rad50 x Mre11 DNA repair complex from *Saccharomyces cerevisiae* by electron microscopy. *J Biol Chem.*, 276(40):37027-37033, 2001.
6. ASSENMACHER N. & HOPFNER, K.P. MRE11/RAD50/NBS1: complex activities. *Chromossoma*, 113(4):157-166, 2004.
7. AUSUBEL, F.; BRENT, R.; KINGSTON, R.E.; MOORE, D.D.; SEIDMAN, J.G.; SMITH, J.A. & STRUHL, K. *Current Protocols in Molecular Biology*. 3a ed. (Suppl. 33), Wiley, Indianapolis, 1996.
8. AYLON, Y.; LIEFSHITZ, B. & KUPIEC, M. The CDK regulates repair of double-strand breaks by homologous recombination during the cell cycle. *EMBO J.*, 23(24):4868-4875, 2004.
9. 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.*, 8(7):811-820, 1994.
10. BALAJEE, A.S. & BOHR, V.A. Genomic heterogeneity of nucleotide excision repair. *Gene*, 250(1-2):15-30, 2000.
11. BARTON A.B.; DAVIES, C.J; HUTCHISON, C.A. 3rd & KABACK D.B. Cloning of chromosome I DNA from *Saccharomyces cerevisiae*: analyses of the FUN52 gene, whose product has homology to protein kinases. *Gene*, 117(1):137-140, 1992.
12. BELJANSKI, V.; MARZILLI, L.G. & DOETSCH, P.W. DNA damage-processing pathways involved in the eukaryotic cellular response to anticancer DNA cross-linking drugs. *Mol Pharmacol.*, 65(6):1496-1506, 2004.
13. BETHEA, D.; FULLMER, B.; SYED, G.; TIANO, J.; RISCHKO, C.; GILLESPIE, L.; BROWN, D. & GASPARRO, F.P. Psoralen photobiology and photochemotherapy: 50 years of science and medicine. *J Dermatol Sci.*, 19(2):78-88, 1999.
14. BLASINA, A.; PRICE, B.D.; TURENNE, G.A. & MCGOWAN, C.H. Caffeine inhibits the checkpoint kinase ATM. *Curr Biol.*; 9(19):1135-1138, 1999.
15. BOITEUX, S. & GUILLET, M. Abasic sites in DNA: repair and biological consequences in *Saccharomyces cerevisiae*. *DNA Repair*, 3(1):1-12, 2004.
16. BOULIKAS, T.; PANTOS, A.; BELLIS, E & CHRISTOFIS, P. Designing platinum compounds in cancer: structure and mechanisms. *Cancer Therapy*, 5:537-583, 2007.
17. BRADBURY, J.M. & JACKSON, S.P. The complex matter of DNA double-strand break detection. *Biochem Soc Trans.*, 31(Pt 1):40-44, 2003.
18. BRANZEI, D. & FOIANI, M. Regulation of DNA repair throughout the cell cycle. *Nat Rev Mol Cell Biol.*, 9(4):297-308, 2008.
19. BROWN, A.J.P & TUIITE, M.F. Yeast Gene Analysis. *Methods in Microbiology*, Vol. 26. Acad. Press, NY, 1998.
20. BURKE, D.; DAWSON, T. & STEARNS, T. Methods in Yeast Genetics, a CSH Laboratory course manual. CSH Laboratory Press, Plainview, NY, 2000.

21. CALDECOTT, K.W. Single-strand break repair and genetic disease. *Nat Rev Genet.*, 9(8):619-631, 2008.
22. CHEN, L.; TRUJILLO, K.; RAMOS, W.; SUNG, P. & TOMKINSON, A.E. Promotion of Dnl4-catalyzed DNA end-joining by the Rad50/Mre11/Xrs2 and Hdf1/Hdf2 complexes. *Mol Cell.*, 8(5):1105-1115, 2001.
23. CHEN, Y.; RILEY, D.J; ZHENG, L.; CHEN, P.L. & LEE, W.H. Phosphorylation of the mitotic regulator protein Hec1 by Nek2 kinase is essential for faithful chromosome segregation. *J Biol Chem.*, 277(51):49408-49416, 2002.
24. CHEN, Y.; CHEN, P.L.; CHEN, C.F.; JIANG, X. & RILEY, D.J. Never-in-mitosis related kinase 1 functions in DNA damage response and checkpoint control. *Cell Cycle*, 7(20):3194-3201, 2008.
25. CHENG, K.C.; CAHILL, D.S.; HASAI, H.; NISHIMURA, S. & LOEB, L.A. 8-Hydroxyguanine, an abundant form of oxidative DNA damage, causes G---T and A---C substitutions. *J Biol Chem.*, 267(1):166-172, 1992.
26. CHRISTMANN, M.; TOMICIC, M.T.; WYNAND, P.R. & KAINA, B. Mechanisms of human DNA repair: an update. *Toxicology*, 193:3-34, 2003.
27. CORTEZ, D. Caffeine inhibits checkpoint responses without inhibiting the ataxia-telangiectasia-mutated (ATM) and ATM-and Rad3-related (ATR) protein kinases. *J Biol Chem.*, 278(39):37139-37145, 2003.
28. D'AMOURS, D. & JACKSON, S.P. The yeast Xrs2 complex functions in S phase checkpoint regulation. *Genes Dev.*, 15(17):2238-2249, 2001.
29. D'AMOURS, D. & JACKSON, S.P. The Mre11 complex: at the crossroads of DNA repair and checkpoint signaling. *Nat Rev Mol Cell Biol.*, 3(5):317-327, 2002.
30. DALEY, J.M.; PALMBOS, P.L.; WU, D. & WILSON, T.E. Nonhomologous end joining in yeast. *Annu Rev Genet.*, 39:431-451, 2005.

31. DE JAGER, M.; VAN NOORT, J.; VAN GENT, D.C.; DEKKER, C.; KANAAR, R. & WYMAN, C. Human Rad50/Mre11 is a flexible complex that can tether DNA ends. *Mol Cell.*, 8(5):1129-1135, 2001.
32. DE WIND, J.H; THEVELEIN, J.M. & WINDERRICK, J. Adaptation to nutrient depletion in yeast. In: Hohmann, S., Mager, W.H. *Yeast Stress Responses*. Springer, p.7-52, NY, 1997.
33. DOLGANOV, G.M.; MASER, R.S.; NOVIKOV, A.; TOSTO, L.; CHONG, S.; BRESSAN, D.A. & PETRINI, J.H. Human Rad50 is physically associated with human Mre11: identification of a conserved multiprotein complex implicated in recombinational DNA repair. *Mol Cell Biol.*, 16(9):4832-4841, 1996.
34. DRONKERT, M.L. & KANAAR, R. Repair of interstrand cross-links. *Mutat Res.*, 486(4):217-247, 2001.
35. DUDÁS, A. & CHOVANEC, M. DNA double-strand break repair by homologous recombination. *Mutat Res.*, 566(2):131-167, 2004.
36. DUDÁSOVÁ, Z.; DUDÁS, A. & CHOVANEC, M. Non-homologous end-joining factors of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol Rev.*, 28(5):581-601, 2004.
37. EKER, A.P.; QUAYLE, C.; CHAVES, I. & VAN DER HORST, G.T. DNA repair in mammalian cells: Direct DNA damage reversal: elegant solutions for nasty problems. *Cell Mol Life Sci.*, 66(6):968-980, 2009.
38. FEDOROVA, I.V & KOZHINA, T.N. Repair of plasmid DNA treated with 8-methoxypsoralen and long-wave UV light ($\lambda=365\text{nm}$) in wild type and mutant rad2 cells of *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetika*, 23(9):1564-1573, 1987.
39. FEDOROVA, I.V. & MARFIN, S.V. Genetic control of crossing-over in yeast. III. Induction by 8-methoxypsoralen and long-wave UV irradiation ($\lambda=365\text{nm}$). *Genetika*, 18(2):207-214, 1982.
40. FRANKENBERG-SCHWAGER, M.; KIRCHERMEIER, D.; GREIF, G.; BAER, K.; BECKER, M. & FRANKENBERG, D. Cisplatin-mediated DNA double-strand breaks in

replication but not in quiescent cells of *Saccharomyces cerevisiae*. *Toxicology*, 213(2-3):175-184, 2005.

41. FRANK-VAILLANT, M. & MARCAND, S. Transient stability of DNA ends allows nonhomologous end joining to precede homologous recombination. *Mol Cell.*, 10(5):1189-1199, 2002.

42. FRIEDBERG, E.C.; WALKER, G.C.; SIEDE, W.; WOOD, R.D.; SCHULTZ, R.A. & ELLENBERGER, T. *DNA Repair and Mutagenesis*. 2nd ed. ASM Press, Washington DC, 2006.

43. FRIEDBERG, E.C. Suffering in silence: the tolerance of DNA damage. *Nat Rev Mol Cell Biol.*, 6(12):943-953, 2005.

44. FRIEDBERG, E.C. A brief history of DNA repair field. *Cell Res.*, 18(1):3-7, 2008.

45. FRY, A.M. & NIGG, E.A. Cell cycle. The NIMA kinase joins forces with Cdc2. *Curr Biol.*, 5(10):1122-1125, 1995.

46. FRY, A.M.; SCHULTZ, S.J.; BARTEK, J. & NIGG, E.A. Substrate specificity and cell cycle regulation of the Nek2 protein kinase, a potential human homolog of the mitotic regulator NIMA of *Aspergillus nidulans*. *J Biol Chem.*, 270(21):12899-12905, 1995.

47. FRY, A.M. The Nek2 protein kinase: a novel regulator of centrosome structure. *Oncogene*, 21(40):6184-6194, 2002.

48. FURUSE, M.; NAGASE, Y.; TSUBOUCHI, H.; MURAKAMI-MUROFUSHI, K.; SHIBATA, T. & OHTA, K. Distinct roles of two separable in vitro activities of yeast Mre11 in mitotic and meiotic recombination. *EMBO J*, 17(21):6412-6425, 1998.

49. GANCEDO, J.M. Yeast carbon catabolite repression. *Microbiol Mol Biol Rev.*, 62(2):334-361, 1998.

50. GANGAVARAPU, V.; PRAKASH, S. & PRAKASH, L. Requirement of RAD52 group genes for postreplication repair of UV-damaged DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol.*, 27(21):7758-7764, 2007.

51. GHOSAL, G. & MUNIYAPPA, K. The characterization of *Saccharomyces cerevisiae* Mre11/Rad50/Xrs2 complex reveals that Rad50 negatively regulates Mre11 endonucleolytic but not the exonucleolytic activity. *J Mol Biol.*, 372(4):864-882, 2007.
52. GOFFEAU, A.; BARRELL, B.G.; BUSSEY, H.; DAVIS, R.W.; DUJON, B.; FELDMANN, H.; GALIBERT, F.; HOHEISEL, J.D.; JACQ, C.; JOHNSTON, M.; LOUIS, E.J.; MEWES, H.W.; MURAKAMI, Y.; PHILPPSEN, P.; TETTELIN, H. & OLIVER, S.G. Life with 6000 genes. *Science*, 274(5287):563-567, 1996.
53. GRENON, M.; GILBERT, C. & LOWNDES, N.F. Checkpoint activation in response to double-strand breaks requires the Mre11/Rad50/Xrs2 complex. *Nat Cell Biol.*, 3(9):844-847, 2001.
54. GRENON, M.; MAGILL, C.P.; LOWNDES, N.F. & JACKSON, S.P. Double-strand breaks trigger MRX- and Mec1-dependent, but Tel1-independent, checkpoint activation. *FEMS Yeast Res.*, 6(5):836-847, 2006.
55. HAYWARD, D.G. & FRY, A.M. Nek2 kinase in chromosome instability and cancer. *Cancer Lett.*, 237(2):155-166, 2006.
56. HEFFERIN, M.L. & TOMKINSON, A.E. Mechanism of DNA double-strand break repair by non-homologous end joining. *DNA Repair (Amst.)*, 4(6):639-648, 2005.
57. HENRIQUES, J.A. & BRENDEL, M. The role of PSO and SNM genes in DNA repair of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Genet.*, 18(5):387-393, 1990.
58. HENRIQUES, J.A. & MOUSTACCHI, E. Interactions between mutations for sensitivity to psoraleno photoaddition (pso) and to radiation (rad) in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol.*, 148(1):248-256, 1981.
59. HIETER, P. The yeast genome and clinical genetics. *Clin Genet.*, 54(2):113-116, 1998.
60. HOPFNER, K.P.; PUTNAM, C.D. & TAINER, J.A. DNA double-strand break repair from head to tail. *Curr Opin Struct Biol.*, 12(1):115-122, 2002.
61. JACKSON, S. P. Sensing and repairing DNA double-strand breaks. *Carcinogenesis*, 23(5):687-696, 2002.

62. JONES, D.G. & ROSAMOND, J. Isolation of a novel protein kinase-encoding gene from yeast by oligodeoxyribonucleotide probing. *Gene*, 90(1):87-92, 1990.
63. KADIK, L.C. & HARTWELL, L.H. Sister chromatids are preferred over homologs as substrates for recombinational repair in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 132(2):387-402, 1992.
64. KROGH, B.O. & SYMINGTON, L.S. Recombination proteins in yeast. *Annu Rev Genet.*, 38:233-271, 2004.
65. KUNZ, B.A.; STRAFFON, A.F. & VONARX, E.J. DNA damage-induced mutation: tolerance via translesion synthesis. *Mutat Res.*, 451(1-2):169-185, 2000.
66. LEE, J.H. & PAULL, T.T. Direct activation of the ATM protein kinase by the Mre11/Rad50/Nbs1 complex. *Science*, 304(5667):93-96, 2004.
67. LEHMANN, A.R. Replication of damaged DNA by translesion synthesis in human cells. *FEBS Lett.*, 579(4):873-876, 2005.
68. LEHOCZKÝ, P.; McHUGH, P.J. & CHOVANEC, M. DNA interstrand cross-link repair in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol Rev.*, 31(2):109-133, 2007.
69. LETWIN, K.; MIZZEN, L.; MOTRO, B.; BEN-DAVID, Y.; BERNSTEIN, A. & PAWSON, T. A mammalian dual specificity protein kinase, Nek1, is related to the NIMA cell cycle regulator and highly expressed in meiotic germ cells. *EMBO J.*, 11(10):3521-3531, 1992.
70. LI, X. & HEYER, W.D. Homologous recombination in DNA repair and DNA damage tolerance. *Cell Res.*, 18(1):99-113, 2008.
71. LIM, D.S.; KIM, S.T.; XU, B.; MASER, R.S.; LIN, J.; PETRINI, J.H. & KASTAN, M.B. ATM phosphorylates p95/nbs1 in an S-phase checkpoint pathway. *Nature*, 404(6778):613-617, 2000.
72. LINDAHL, T. & WOOD, R.D. Quality control by DNA repair. *Science*, 285(5446):1897-1905, 1999.

73. LISBY, M.; BARLOW, J.H.; BURGESS, R.C. & ROTHSTEIN, R. Choreography of the DNA damage response: spatiotemporal relationships among checkpoint and repair proteins. *Cell*, 118(6):699-713, 2004.
74. LOPES, M.; COTTA-RAMUSINO, C.; PELLICIOLI, A.; LIBERI, G.; PLEVANI, P.; MUZI-FALCONI, M.; NEWLON, C.S. & FOIANI, M. The DNA replication checkpoint stabilizes stalled replication forks. *Nature*, 412(6846):557-561, 2001.
75. LOWNDES, N.F. & MURGUIA, J.R. Sensing and responding to DNA damage. *Curr Opin Genet Dev.*, 10(1):17-25, 2000.
76. LU, K.P. & HUNTER, T. Evidence for a NIMA-like pathway in vertebrate cells. *Cell*, 81(3):413-424, 1995.
77. LUKAS, J.; LUKAS, C. & BARTEK, J. Mammalian cell cycle checkpoints: signaling pathways and their organization in space and time. *DNA Repair (Ams.)*, 3(8-9):997-1007, 2004.
78. MAGAÑA-SCHWENCKE, N.; HENRIQUES, J.A.; CHANET, R. & MOUSTACCHI, E. The fate of 8-methoxypsoralen photoinduced crosslinks in nuclear and mitochondrial yeast DNA: comparison of wild-type and repair-deficient strains. *Proc Natl Acad Sci USA*, 79(6):1722-1726, 1982.
79. MALUMBRES, M. & BARBACID, M. Mammalian cyclin-dependent kinases. *Trends Biochem Sci.*, 30(11):630-641, 2005.
80. MANTIERO, D.; CLERICI, M.; LUCCHINI, G. & LONGHESE, M.P. Dual role for *Saccharomyces cerevisiae* Tel1 in the checkpoint response to double-strand breaks. *EMBO Rep.*, 8(4):380-387, 2007.
81. McHUGH, P.J.; GILL, R.D.; WATERS, R. & HARTLEY, J.A. Excision repair of nitrogen mustard DNA adducts in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acid Res.*, 27(16):3259-3266, 1999.
82. McHUGH, P.J.; SONES, W.R. & HARTLEY, J.A. Repair of intermediate structures of DNA interstrand cross-links in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol.*, 20(10):3425-3433, 2000.

83. McNULTY, J.M.; JERKOVIC, B.; BOLTON, P.H. & BASU, A.K. Replication inhibition and miscoding properties of DNA templates containing a site-specific cis-thymine glycol or urea residue. *Chem res Toxicol.*, 11(6):666-673, 1998.
84. MEMISOGLU, A. & SAMSON, L. Base excision repair in yeast and mammals. *Mutat Res.*, 451(1):39-51, 2000.
85. MONCALIAN, G.; LENGSELD, B; BHASKARA, V.; HOPFNER, K.P.; KARCHER, A.; ALDEN, E.; TAINER, J.A. & PAULL, T.T. The rad50 signature motif: essential to ATP binding and biological function. *J Mol Biol.*, 335(4):937-951, 2004.
86. MOREAU, S.; FERGUSON, J.R. & SYMINGTON, L.S. The nuclease activity of Mre11 is required for meiosis but not for mating type switching, end joining, or telomere maintenance. *Mol Cell Biol.*, 19(1):556-565, 1999.
87. MORRISON, C.; SONODA, E.; TAKAO, N.; SHINOHARA, A.; YAMAMOTO, K. & TAKEDA, S. The controlling role of ATM in homologous recombinational repair of DNA damage. *EMBO J.*, 19(3):463-471, 2000.
88. NIGG, E.A. Cyclin-dependent kinases: key regulators of the eukaryotic cell cycle. *Bioessays*, 17(6):471-480, 1995.
89. NOJIMA, K.; HOCHEGGER, H.; SABERI, A.; FUKUSHIMA, T.; KIKUCHI, K.; YOSHIMURA, M.; ORELLI, B.J.; BISHOP, D.K.; HIRANO, S.; OHZEKI, M.; ISHIAI, M.; YAMAMOTO, K.; TAKATA, M.; ARAKAWA, H.; BUERSTEDDE, J.M.; YAMAZOE, M.; KAWAMOTO, T.; ARAKI, K.; TAKAHASHI, J.A.; HASHIMOTO, N.; TAKEDA, S. & SONODA, E. Multiple repair pathways mediate tolerance to chemotherapeutic cross-linking agents in vertebrate cells. *Cancer Res.*, 65(24):11704-11711, 2005.
90. NOLL, D.M.; MASON, T.M. & MILLER, P.S. Formation and repair of interstrand cross-links in DNA. *Chem Rev.*, 106(2):277-301, 2006.
91. NOUSPIKEL, T. DNA repair in mammalian cells: Nucleotide excision repair: variations on versatility. *Cell Mol Life Sci.*, 66(6):994-1009, 2009.

92. NYBERG, K.A.; MICHELSON, R.J.; PUTNAM, C.W. & WEINERT, T.A. Toward maintaining the genome: DNA damage and replication checkpoints. *Annu Rev Genet.*, 36:617-656, 2002.
93. O'CONNELL, M.J.; NORBURY, C. & NURSE, P. Premature chromatin condensation upon accumulation of NIMA. *EMBO J.*, 13(20):4926-4937, 1994.
94. O'CONNELL, M.J.; KRIEN, M.J. & HUNTER, T. Never say never. The NIMA-related protein kinases in mitotic control. *Trends Cell Biol.*, 13(5):221-228, 2003.
95. O'REGAN, L.; BLOT, J. & FRY, A.M. Mitotic regulation by NIMA-related kinases. *Cell Div.*, 29:2-25, 2007.
96. OLSON, E.; NIEVERA, C.J.; LEE, A.Y.; CHEN, L. & WU, X. The Mre11-Rad50-Nbs1 complex acts both upstream and downstream of ataxia telangiectasia mutated and Rad3-related protein (ATR) to regulate the S-phase checkpoint following UV treatment. *J Biol Chem.*, 282(31):22939-22952, 2007.
97. OSMANI, S.A.; MAY, G.S. & MORRIS, N.R. Regulation of the mRNA levels of nimA, a gene required for the G2-M transition in *Aspergillus nidulans*. *J Cell Biol.*, 104(6):1495-1504, 1987.
98. OSMANI, A.H.; O'DONNELL, K.; PU, R.T. & OSMANI, S.A. Activation of the nimA protein kinase plays a unique role during mitosis that cannot be bypassed by absence of the bimE checkpoint. *EMBO J.*, 10(9):2669-2679, 1991.
99. PARDO, B.; GÓMEZ-GONZALEZ, B. & AQUILERA, A. DNA repair in mammalian cells: DNA double-strand breaks repair: how to fix a broken relationship. *Cell Mol Life Sci.*, 66(6):1039-1056, 2009.
100. PASTWA, E. & BLASIAK, J. Non-homologous end joining. *Acta Biochim Pol.*, 50(4):891-908, 2003.
101. PAULL, T.T. & GELLERT, M. The 3' to 5' exonuclease activity of Mre11 facilitates repair of DNA double-strand breaks. *Mol Cell.*, 1(7):969-979, 1998.

102. PAULL, T.T. & GELLERT, M. Nbs1 potentiates ATP-driven DNA unwinding and endonucleases cleavage by the Mre11/Rad50 complex. *Genes Dev.*, 13(10):1276-1288, 1999.
103. PFEIFER, G.P.; YOU, Y.H. & BESARATINIA, A. Mutations induced by ultraviolet light. *Mutat Res.*, 571(1-2):19-31, 2005.
104. PICHIERRI, P. & ROSSELLI, F. The DNA crosslink-induced S-phase checkpoint depends on ATR-CHK1 and ATR-NBS1-FANCD2 pathway. *EMBO J.*, 23(5):1178-1187, 2004.
105. POLCI, R.; PENG, A.; CHEN, P.L.; RILEY, D.J. & CHEN, Y. NIMA-related protein kinase 1 is involved in the ionizing radiation-induced DNA damage response. *Cancer Res.*, 64(24):8800-8803, 2004.
106. POVIRK, L.F. & SCHUKER, D.E. DNA damage and mutagenesis induced by nitrogen mustards. *Mutat Res.*, 318(3):205-226, 1994.
107. PRAKASH, S. & PRAKASH, L. Nucleotide excision repair in yeast. *Mutat Res.*, 451(1-2):13-24, 2000.
108. PRAKASH, S.; JOHNSON, R.E. & PRAKASH, L. Eukariotic translesion synthesis DNA polymerases: specificity of structure and function. *Ann Rev Biochem.*, 74(317-353), 2005.
109. PRINGLE, J.R.; BROACH, J.R. & JONES, E.W. The Molecular and Cellular Biology of the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*, Vol 3. Cell Cycle and Cell Biology. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold spring Harbor, NY, 1997.
110. QUARMBY, L.M. & MAHJOUR, M.R. Caught Nek-ing: cilia and centrioles. *J Cell Sci.*, 118(Pt2):5161-5169, 2005.
111. RESNICK, M.A. & COX, B.S. Yeast as an honorary mammal. *Mutat Res.*, 451(1-2):1-11, 2000.
112. REVERS, L.F. Caracterização molecular dos genes *PSO2* e *PSO4* de *Saccharomyces cerevisiae* envolvidos na reparação do DNA: análise funcional e identificação de

interações proteína-proteína. Tese de Doutorado, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2003.

113. ROUSE, J. & JACKSON, S.P. Interfaces between the detection, signaling, and repair of DNA damage. *Science*, 297(5581):547-551, 2002.

114. SANDERSON, B.J. & SHIELD, A.J. Mutagenic damage to mammalian cells by the therapeutic alkylating agents. *Mutat Res.*, 355(1-2):41-57, 1996.

115. SARKAR, S.; DAVIES, A.A.; ULRICH, H.D. & McHUGH, P.J. DNA interstrand crosslink repair during G1 involves nucleotide excision repair and DNA polymerase zeta. *EMBO J.*, 25(6):1285-1294, 2006.

116. SARKARIA, J.N.; BUSBY, E.C.; TIBBETTS, R.S.; ROOS, P.; TAYA, Y.; KARNITZ, L.M. & ABRAHAM, R.T. Inhibition of ATM and ATR kinase activities by the radiosensitizing agent, caffeine. *Cancer Res.*, 59(17):4375-4382, 1999.

117. SCHÄRER, O.D. Chemistry and biology of DNA repair. *Angew Chem Int Ed Engl.*, 42(26):2946-2974, 2003.

118. SCHARER, O.D. DNA interstrand crosslinks: natural and drug-induced DNA adducts that induce unique cellular responses. *Chembiochem.*, 6(1):27-32, 2005.

119. SCHUCK, S.C.; SHORT, E.A. & TURCHI, J.J. Eukaryotic nucleotide excision repair: from understanding mechanisms to influencing biology. *Cell Res.*, 18(1):64-72, 2008.

120. SCHWEITZER, B. & PHILIPPSEN, P. NPK1, a nonessential protein kinase gene in *Saccharomyces cerevisiae* with similarity to *Aspergillus nidulans* nimA. *Mol Gen Genet.*, 234(1):164-167, 1992.

121. SHILOH, Y. ATM and related protein kinases: safeguarding genome integrity. *Nat Rev Cancer*, 3(3):155-168, 2003.

122. SHIRAVASTAV, M.; DE HARO, L.P. & NICKOLOFF, J.A. Regulation of DNA double-strand break repair choice. *Cell Res.*, 18(1):134-147, 2008.

123. SLUPPHAUG, G.; KAVLI, B. & KROKAN, H.E. The interacting pathways for prevention and repair of oxidative DNA damage. *Mutat Res.*, 531(1-2):231-251, 2003.
124. STRUNNIKOV, A.V. & JESSBERGER, R. Structural maintenance of chromosomes (SMC) proteins: conserved properties for multiple biological functions. *Eur J Biochem.*, 263(1):6-13, 1999.
125. SURPILI, M.J.; DELBEN, T.M. & KOBARG, J. Identification of proteins that interact with the central coiled-coil of the human protein kinase NEK1. *Biochemistry*, 42(51):15369-15376, 2003.
126. TAKATA, M.; SASAKI, M.S.; SONODA, E.; MORRISON, C.; HASHIMOTO, M.; UTSUMI, H.; YAMAGUCHI-IWAI, Y.; SHINOHARA, A. & TAKEDA, S. Homologous recombination and non-homologous end joining pathways of DNA double-strand break repair have overlapping roles in the maintenance of chromosome integrity in vertebrate cells. *EMBO J.*, 17(18):5497-5508, 1998.
127. THOMPSON, C.L. & SANKAR, A. Photolyase/cryptochrome blue-light photoreceptors use photon energy to repair DNA and reset the circadian clock. *Oncogene*, 21(58):9043-9056, 2002.
128. TRUJILLO, K.M.; YUAN, S.S.; LEE, E.Y. & SUNG, P. Nuclease activities in a complex of human recombination and DNA repair factors Rad50, Mre11, and p95. *J Biol Chem.*, 273(34):21447-21450, 1998.
129. TRUJILLO, K.M.; ROH, D.H.; CHEN, L.; VAN KOMEN, S.; TOMKINSON, A. & SUNG, P. Yeast xrs2 binds DNA and helps target rad50 and mre11 to DNA ends. *J Biol Chem.*, 278(49):48957-48964, 2003.
130. UPADHYA, P.; BIRKENMEIER, E.H.; BIRKENMEIER, C.S. & BARKER, J.E. Mutations in a NIMA-related kinase gene, Nek1, cause pleiotropic effects including a progressive polycystic kidney disease in mice. *Proc Natl Acad Sci USA*, 97(1):217-221, 2000.

131. USUI, T.; OHTA, T.; OSHIUMI, H.; TOMIZAWA, J.; OGAWA, H. & OGAWA, T. Complex formation and functional versatility of Mre11 of budding yeast in recombination. *Cell*, 95(5):705-716, 1998.
132. WANG, D. & LIPPARD, S.J. Cellular processing of platinum anticancer drugs. *Nat Rev Drug Discov.*, 4(4):307-320, 2005.
133. WILLIAMS, R.S.; WILLIAMS, J.S. & TAINER, J.A. Mre11-Rad50-Nbs1: a keystone complex connecting DNA repair machinery, double-strand break signaling, and the chromatin template. *Biochem Cell Biol.*, 85(4):509-520, 2007.
134. WILSON, D.M.^{3rd} & BOHR, V.A. The mechanism of base excision repair, and its relationship to aging and disease. *DNA Repair (Amst)*, 6(4):544-559, 2007.
135. YE, X.S.; FINCHER, R.R.; TANG, A.; O'DONNELL, K. & OSMANI, S.A. Two S-phase checkpoints systems, one involving the function of both BIME and Tyr15 phosphorylation of p34cdc2, inhibit NIMA, and prevent premature mitosis. *EMBO J.*, 15(14):3599-3610, 1996.
136. YONEKURA, S.; NAKAMURA, N.; YONEI, S. & ZHANG-AKIYAMA, Q.M. Generation, biological consequences and repair mechanisms of cytosine deamination in DNA. *J Radiat Res.*, 50(1):19-26, 2009.
137. ZHONG, H.; BRYSON, A.; ECKERSDORFF, M. & FERGUSON, D.O. Rad50 depletion impacts upon ATR-dependent DNA damage responses. *Hum Mol Genet.*, 14(18):2685-2693, 2005.

VIII. ANEXO

CURRICULUM VITÆ

ROCHA, J.C.

1. DADOS PESSOAIS

Nome: Jaqueline Cesar Rocha

Local e data de nascimento: Palmeira das Missões, RS, Brasil, 12 de novembro de 1976

Endereço profissional: Av. Ipiranga 6690, Hospital São Lucas da PUCRS, Setor de Suprimentos

Telefone profissional: 51 3320.3448

E-mail: jcrocha01@hotmail.com

2. FORMAÇÃO:

Graduação em Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1996 – 2000.

3. ESTÁGIOS:

I. Bolsa de Iniciação Científica

Agente: CNPq

Projeto: Clonagem e caracterização molecular do gene *PSO3* de *Saccharomyces cerevisiae*.

Orientador: Prof. João Antonio Pegas Henriques

Co-orientadora: Dra Jenifer Saffi

Local: Centro de Biotecnologia da UFRGS

Período: outubro de 1999 a janeiro de 2001

Projeto paralelo: Avaliação da atividade do palmitato de retinol sobre células da levedura *Saccharomyces cerevisiae*.

Orientadora: Prof. Ana Ligia de Paula Ramos

Co-orientadora: Dra Jenifer Saffi

Local: Centro de Biotecnologia da UFRGS

Período: maio a dezembro de 2000

II. Estágio Curricular em Farmácia

Local: Hospital São Lucas da PUCRS

Período: agosto a novembro de 2000

III. Estágio Voluntário

Projeto: Avaliação das atividades do composto ebselen sobre a levedura *Saccharomyces cerevisiae*

Orientadora: Dra Jenifer Saffi

Local: Centro de Biotecnologia da UFRGS

Período: outubro de 2005 a fevereiro de 2007

4. PRÊMIOS E DISTINÇÕES

XII Salão de Iniciação Científica - Prêmio destaque da Sessão

ROCHA JC, AIUB C, SAFFI J, HENRIQUES JAP. Clonagem e caracterização molecular do gene *PSO3* de *Saccharomyces cerevisiae*. Universidade Federal do Rio Grande do Sul – Porto Alegre – RS – setembro de 2000.

5. EXPERIÊNCIA PROFISSIONAL ANTERIOR

Farmacêutica Responsável Técnica, Farmácia Panvel, 2001 - 2003

6. ARTIGOS COMPLETOS PUBLICADOS

MIORELLI S.T.; ROSA, R.M.; MOURA, D.J.; ROCHA, J.C.; LOBO, L.A.; HENRIQUES, J.A.P. & SAFFI, J. Antioxidant and anti mutagenic effects of ebselen in yeast and in cultured mammalian V79 cells. *Mutagenesis* 23(2):93-99, 2008.

7. RESUMOS E TRABALHOS APRESENTADOS EM CONGRESSOS

ROSA, R.M.; ROCHA, J.C.; HENRIQUES, J.A.P.; SAFFI, J. Análise de interações genéticas entre a mutação *psb3-1* e mutantes defectivos na reparação por excisão de bases na levedura *Saccharomyces cerevisiae*. In: XXIII Reunião de Genética de Microrganismos, Pirenópolis, GO. Livro de Resumos da XXIII Reunião de Genética de Microrganismos, 2002

ROHERS, R.; ROCHA, J.C.; RAMOS, A.L.P.; SAFFI, J. Glutathione measurement of *SOD* deficient *Saccharomyces cerevisiae* strains using a microbiological quantitative assay. In: XXIII Reunião de Genética de Microrganismos, Pirenópolis, GO. Livro de Resumos da XXIII Reunião de Genética de Microrganismos, 2002

MIORELLI, S.; LOBO, L.A.C.; ROCHA, J.C.; SAFFI, J. Efeitos biológicos do composto organoselenado ebselen em células eucarióticas. In: I Encontro sobre Selênio e Telúrio, Bento Gonçalves, RS. Livro de Resumos do I Encontro sobre Selênio e Telúrio, 2006

BALEN, M.A.; GOERCK, G.C.; ROCHA, J.C.; MARQUES, B.C.; SOUZA, J.S. Avaliação dos Estornos de Medicamentos em um Hospital de Ensino de Porto Alegre. II Congresso Brasileiro sobre Uso Racional de Medicamentos, Florianópolis, SC. Livro de Resumos do II Congresso Brasileiro sobre Uso Racional de Medicamentos, 2007

IMMICH, B.F.; ROCHA, J.C.; MOURA, D.J.; CASTILHOS, B.; SPEROTTO, A.R.M.; HENRIQUES, J.A.P.; LENZ, G.; SAFFI, J. Avaliação da interação do gene *KIN3* com genes de sinalização e reparo de DNA em *Saccharomyces cerevisiae*. In: I Encontro Gaúcho de Micologia, Porto Alegre, RS. Livros de Resumos do I Encontro Gaúcho de Micologia, 2008.