

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

Estudo de interações proteicas com o produto do gene de
reparação de DNA *PSO5/RAD16* na levedura
Saccharomyces cerevisiae

Jenifer Saffi

Tese apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Bioquímica da UFRGS
como requisito para a obtenção do
grau de Doutor em Ciências.

Orientador: Prof. João A. P. Henriques

Porto Alegre

1999

A minha mamãe querida, pelos
muitos carinhos e cafunés, e
por todo seu apoio durante
meus estudos.

Ao Henrique, por toda nossa caminhada juntos, e ao nosso filho Gabriel, pela sua alegria e por ter tornado tudo tão especial.

Este trabalho foi realizado principalmente nas instalações do Laboratório de Radiobiologia Molecular do Centro de Biotecnologia do Instituto de Biociências da UFRGS. Parte dele também foi desenvolvido no “Institut für Biochemie der Universität München”, na Alemanha, através de uma colaboração com o Dr. E-L Winnacker e Dra. Heidi Feldmann, como também no “Department of Biology - Massachusetts Institut of Technology (MIT)”, em Boston, USA, através de uma colaboração com o laboratório do Prof. L. Guarente. Os órgãos financiadores deste projeto foram: CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, FAPERGS (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul), DAAD (Deutsch Akademisch Ausländer Dienst), e Laboratório GENOTOX, do Centro de Biotecnologia da UFRGS.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. João Antônio P. Henriques, pela excelente orientação, confiança e sobretudo, por ter me dado a chance de trabalhar em outros laboratórios pelo mundo afora, de onde vim não só com a bagagem científica, mas com uma imensa experiência de vida.

Ao Programa de Pós de Graduação em Bioquímica, pela acolhida.

Ao Prof. Ernst-Ludwig Winnacker, pela gentil acolhida em seu laboratório e à Dra. Heidi Feldmann, pela valiosa ajuda e co-orientação em boa parte deste trabalho.

Ao Prof. Leonard Guarente e ao Dr. David Sinclair, por tudo que me ensinaram.

Ao Prof. Martin Brendel, que mais do que um professor, foi sempre um grande amigo e à sua esposa Doris Brendel, que me adotou como filha em todas as minhas estadias pela Alemanha. Vocês são muito especiais!

A todos os amigos que fiz na Alemanha, especialmente a Lucia e sua mãe, Frau Driller (minha segunda mãe alemã), por todo o carinho e pelos muitos passeios que fizemos juntas: viagens, concertos, exposições de Renoir, etc...

A todos os colegas do laboratório, cujos nomes não serão citados, por que são muitos, e não há ordem de importância. Foram anos de uma convivência alegre e harmônica. Pelas palavras amigas, pelo carinho e pelas excelentes ajudas técnicas e científicas.

As minhas bolsistas de iniciação científica, Sandra e Valquíria, que ajudaram em diversas fases do trabalho.

A todos aqueles, que direta ou indiretamente torceram, acreditaram e contribuíram para que eu chegasse até aqui. E são tantos...

A minha família, especialmente a minha tia do coração, Celina, sobretudo por ter me ensinado a curtir e ver o mundo com outros olhos. Pelas muitas viagens que fizemos durante a minha infância...

Aos meus pais, pelo carinho, confiança, paciência e principalmente pelo enorme apoio, em todas as decisões que tomei em minha vida. Sei que muitas vezes deixei-os de coração na mão, a cada período longo que eu passava fora. Apenas sinto muito por meu pai não estar mais entre a gente, para presenciar e desfrutar comigo este momento. Que saudades...!

Ao destino, que em mais uma de suas peças, fez de um orientador um marido e além disso me trouxe o Gabriel, um anjo, que em menos de dois anos revolucionou totalmente minha vida...

“Eu prefiro ser essa metamorfose ambulante, do que ter aquela velha opinião formada sobre tudo...”

ÍNDICE

I. INTRODUÇÃO	01
1. Reparação de lesões no DNA	02
1.1 Tipos de lesões que acionam o sistema de reparação de DNA	03
1.1.1 Leses induzidas por radiação UV	03
1.1.2 Agentes alquilantes	06
1.1.3 Danos oxidativos	07
1.1.4 Psoralenos/Furocumarinas	08
1.2 Vias de reparação de DNA	10
1.2.1 Reparação por excisão de nucleotídeos (NER)	12
1.2.1.1 Etapas iniciais e eventos de pós-incisão do NER	17
1.2.1.2 Reparação acoplada à transcrição	20
1.2.1.3 NER em lesões de fitas não-transcritas e regiões silenciosas no DNA: Rad7 e Rad16	22
1.3 Reparação pós-replicativa e mutagênica de DNA	23
1.3.1 Atividades requeridas especificamente para a mutagênese induzida por danos no DNA	25
1.4 Reparação de DNA por recombinação homóloga	27
1.5 Reparação de DNA por recombinação não-homóloga ou ilegítima	31
2. Mutantes <i>ps0</i>	33
2.1 Características fenotípicas, bioquímicas e genéticas do primeiro grupo de genes <i>PSO</i> : <i>PSO1</i> à <i>PSO4</i>	35
2.2 Características fenotípicas, bioquímicas e genéticas dos genes <i>PSO5</i> , <i>PSO6</i> e <i>PSO7</i>	38

3.	Sistema Di-híbrido	40
3.1	Características do Método “ <i>Interaction Trap</i> ”	43
3.2	Aplicabilidade do sistema di-híbrido	45
II.	OBJETIVOS	47
1.	Objetivo Geral	48
2	Objetivos Específicos	48
III.	CAPÍTULO I	49
	“Interaction of the yeast Pso5/Rad16 and Sgs1 proteins: implications for DNA repair and aging”	50
IV.	CAPÍTULO II	79
	“Importance of the Sgs1 helicase activity in DNA repair of <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ”	80
V.	ANEXO I	96
	“Papel da Topoisomerase III em reparação de DNA”	96
VI.	DISCUSSÃO	105
1.	A proteína Pso5/Rad16 interage com Sgs1	106
2	Envolvimento de Sgs1 em reparação de DNA	108
3.	A topoisomerase III e seu papel em reparação de DNA	110
4.	Pso5/Rad16 exerce um papel no envelhecimento	112
5.	O envelhecimento e suas teorias	113
6.	Proposta de um modelo	115
VII.	CONCLUSÕES	118
1.	Conclusão Geral	119
2.	Conclusões específicas	119
VIII.	PERSPECTIVAS	120

IX. RESUMO E ABSTRACT	123
1. Resumo	124
2. Abstract	126
X. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	128

LISTA DE ABREVIATURAS

3-CPs	3-carbetoxipsoraleno
3-MeA	3-metiladenina
4-NQO	óxido de 4-nitroquinolina
8-MOP	8-metoxipsoraleno
AP	sítios apurínicos/apirimidínicos
ATP	adenosina trifosfato
C-C	dímero de pirimidina citosina-citosina
CPD	dímero de pirimidina ciclobutano
EMS	etil metanosulfonato
ERO	espécie reativa de oxigênio
H ₂ O ₂	peróxido de hidrogênio
HN2	mustarda nitrogenada bifuncional
HU	hidroxiuréia
ICL	ponte intercadeia
MMS	metil metanosulfonato
MNNG	N-metil-N ¹ -nitro--N-nitrosoguanidina
NEF	fator de excisão de nucleotídeos
NER	reparação por excisão de nucleotídeos
O ₂ ^{•-}	radical superóxido
OH [•]	radical hidroxil
PIBIDS	Tricotiodistrofia
SB	Síndrome de Bloom
SC	Síndrome de Cockayne
SW	Síndrome de Werner
T-T	dímero de pirimidina timina-timina
UV	radiação ultravioleta
UVA	radiação ultravioleta de comprimento de onda longo(UV _{365nm})
UVC	radiação ultravioleta de comprimento de onda curto (UV _{254nm})
XP	<i>Xeroderma pigmentosum</i>

INTRODUÇÃO

1. Reparação de lesões no DNA

Preservar a integridade genômica é uma característica fundamental de todos os organismos, uma vez que agentes exógenos e endógenos (químicos e/ou físicos) interagem e danificam o DNA. Lesões no DNA interferem significativamente em processos celulares e se não forem reparadas, ou forem reparadas de uma maneira incorreta, podem ser mutagênicas e ocasionar o envelhecimento celular, defeitos genéticos e carcinogênese.

Diversas mutações em genes de reparação de DNA estão envolvidas com síndromes humanas e processos carcinogênicos (ver revisão em Friedberg et al. 1995). Para estudar as funções de genes de reparação, uma série de organismos modelo têm sido utilizados. Muitos dos mecanismos básicos de alguns sistemas de reparação foram desvendados a partir do estudo da bactéria *E. coli*, o organismo modelo mais simples. Porém, a estrutura e a organização do genoma de organismos procariotos diferem muito daquelas de eucariotos. Na célula eucariota, o DNA está contido em um núcleo, que o isola do citosol e permite selecionar a entrada de proteínas específicas e bloquear a entrada de outras. Além disto, o DNA encontra-se enovelado em volta de proteínas (histonas), estando condensado e subdividido em vários cromossomos. Já na célula procariota, o único cromossomo não está contido em um núcleo e sua duplicação, transcrição e reparação são efetuadas diretamente no citoplasma. Devido às diferenças que certamente envolvem a manutenção do genoma nestas duas condições fundamentalmente distintas, modelos eucariotos têm sido adotados, onde a extrapolação para o funcionamento do sistema de reparação em humanos se torna mais confiável.

Uma área de bastante interesse, atualmente, é a obtenção de camundongos contendo deleções ou mutações específicas em genes de reparação, afim de se estudar as funções fisiológicas e também suas síndromes humanas correspondentes. Outra área em crescente avanço

é a da determinação de estruturas tridimensionais das enzimas e dos complexos de reparação que se formam no DNA lesado, para se elucidar a arquitetura e organização dessas proteínas como um todo (Wood et al. 1996). Porém, o estudo com organismos complexos como o camundongo impõe muitas limitações, pois uma série de mutações em genes de reparação podem ser fatais neste organismo. Por isto, um dos modelos eucariotos mais utilizados para o estudo dos mecanismos de reparação do DNA, pela facilidade de obter-se mutantes e por sua habilidade de se replicar tanto em estado haplóide como diplóide, é a levedura unicelular *Saccharomyces cerevisiae*.

1.1 Tipos de lesões que acionam o sistema de reparação de DNA

1.1.1 Lesões induzidas por radiação UV

➤ Dímeros de Pirimidina

Quando o DNA fica exposto à radiação de comprimento de onda curto (UV_{254nm} ou UVC), as bases pirimídicas que se encontram mais próximas tornam-se covalentemente ligadas, formando uma estrutura anelar de ciclobutano (Figura 1). Essa estrutura é resultante da saturação das suas ligações duplas 5, 6 e é chamada de dímero de pirimidina ou dipirimidina ciclobutano, também conhecida por CPD (ver revisão em Friedberg et al. 1991, 1995; Burdon 1999). A formação dos CPDs acontece de forma muito mais abundante entre as timinas do que entre as citosinas, ou seja, a formação de dímeros do tipo T-T é significativamente maior do que as do tipo C-C (Mitchell et al. 1992). Dependendo da forma isômera em que esses dímeros se encontram, podem ocorrer grandes distorções na hélice de DNA, o que acarreta na obrigatória parada da replicação. Isso acontece devido a um impedimento de adição de base para a formação de pontes de hidrogênio estáveis (Chan et al. 1985).

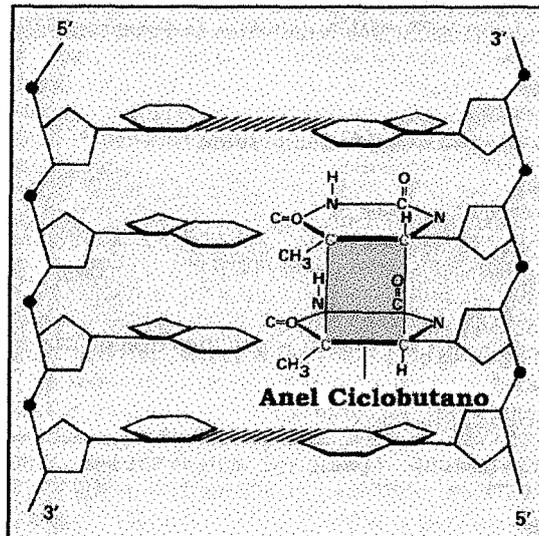


Figura 1. Representação esquemática de um anel ciclobutano entre duas timinas na mesma cadeia de DNA (Friedberg et al. 1991).

➤ Fotoprodutos 6-4

Essa forma de lesão também é típica de DNA irradiado por UV, porém é muito mais abundante entre as citosinas do que entre as timinas. Neste caso, a dupla ligação da pirimidina 5' abre-se e reage com o grupo exocíclico da pirimidina 3' (Lippke et al. 1981, Friedberg et al. 1995, Burdon 1999) (Figura 2). Entretanto, quando as citosinas encontram-se metiladas na posição C-5, não há a formação do 6-4 fotoproduto (Friedberg et al. 1991, 1995). Essas lesões são bastante vulneráveis ao ataque alcalino e o fotoproduto ocasiona também uma grande distorção na dupla hélice do DNA (Taylor et al. 1988).

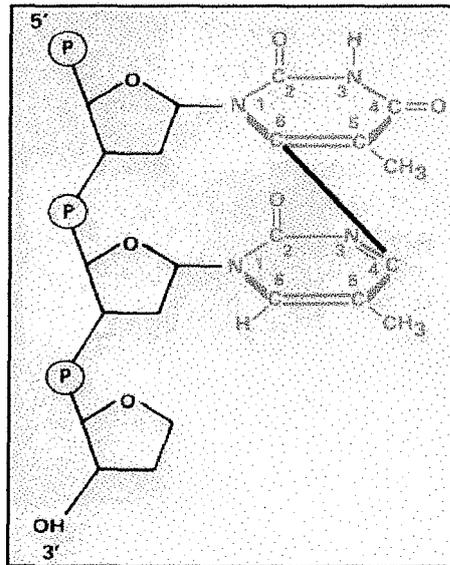


Figura 2. Representação esquemática de um 6-4 fotoproduto, produzido pela ligação entre o C⁶ de uma timina com o C⁴ da timina adjacente (Friedberg et al. 1991).

➤ Outras lesões

Apesar de serem mais abundantes após a radiação ionizante, as lesões do tipo timina glicóis também são encontradas após exposição à radiação UVC, como resultado da saturação da dupla ligação 5,6 de algumas pirimidinas. Além dessas, pontes intercadeia e quebras na cadeia de DNA já foram observadas após radiação UVC, porém em proporções bastante pequenas (Friedberg et al. 1995).

➤ O UV-mimético: óxido de 4-nitroquinolina (4-NQO)

O 4-NQO é considerado um UV-mimético, por produzir lesões de bases que, da mesma forma que os CPDs e 6-4 fotoprodutos, também são reparadas pelo sistema NER. Além dessas lesões, ele forma também 8-hidroxiguanina, gerando uma grande quantidade de quebras no DNA (Khoda et al. 1986, Friedberg et al. 1995). A sua ativação metabólica e a formação de adutos no DNA ainda não estão

completamente elucidados. Inicialmente, ele é convertido a óxido de 4-hidroxi-aminoquinolina e depois a óxido de 4-aminoquinolina, o qual tem o papel de acceptor final de hidrogênio (Sugimura et al. 1996).

1.1.2 Agentes alquilantes

Os agentes alquilantes são compostos eletrofilicos que apresentam afinidade por centros nucleofilicos de macromoléculas orgânicas, sendo muitos deles considerados potenciais carcinógenos (Lawley 1989). Esses agentes podem ser mono ou bifuncionais. No primeiro caso, eles possuem um único grupo reativo e portanto interagem com únicos centros nucleofilicos no DNA. Os centros mais reativos na base adenina são os nitrogênios N-1, N-3, N-6 e N-7. No caso das guaninas, são os N2, N-3 e N-7, assim como o oxigênio O-6. Em ambos os casos, porém, os nitrogênios N-3 e N-7 são os mais reativos. No caso das bases pirimídicas, os centros mais reativos das citosinas são N-3, N-4 e O-2, enquanto que das timinas são N-3, O-2 e O-4. Entretanto, a reatividade de todos esses centros é extremamente influenciada pela natureza das bases adjacentes na molécula do DNA. Exemplos de agentes alquilantes monofuncionais são: metil metano sulfonato (MMS), etil metano sulfonato (EMS), dimetilnitrosoamina, N-metil-N-nitrosouréia, N-etil-N-nitrosouréia, etc. (Friedberg et al. 1995, Burdon 1999). Para exemplificar, o MMS faz a metilação do DNA na 7-desoxiguanina e 3-desoxiadenina (3MeA). Esta última bloqueia a síntese de DNA, levando à letalidade da célula (Beranek 1990, Xiao et al. 1996).

Os agentes alquilantes bifuncionais apresentam dois grupamentos reativos e cada molécula é potencialmente capaz de reagir com dois sítios no DNA. Se os dois sítios encontram-se em fitas opostas de DNA, eles dão origem às pontes intercadeias (Figura 3), enquanto que se estiverem na mesma fita, formarão as pontes intracadeia. As pontes intercadeia representam uma classe importante de lesões ao DNA, pois elas previnem a separação da dupla fita e portanto podem

bloquear totalmente a replicação, transcrição e, conseqüentemente, a divisão celular. (Friedberg et al. 1995, Burdon 1999). As mustardas nitrogenadas e sulfúricas, a mitomicina e a cis-platina são exemplos bastante estudados como indutores de pontes intercadeias (Brendel e Ruhland 1984).

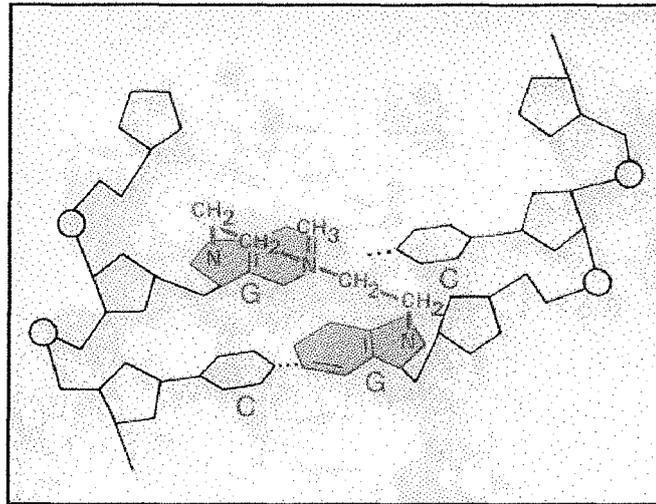


Figura 3. Representação esquemática de uma ponte intercadeia formada por mustarda nitrogenada, através dos N⁷ entre guaninas de fitas opostas de DNA (Friedberg et al. 1991).

1.1.3 Danos oxidativos

Os radicais livres produzem uma série de lesões ao DNA, danificando bases, riboses, causando quebras simples de cadeia, criando sítios apurínicos e apirimidínicos (sítios AP) e ligações cruzadas entre DNA e proteínas (Dizdaroglu 1993). O ataque de radicais pode levar a reações cruzadas entre DNA e proteínas, através da combinação de um radical proteico com um radical do DNA, ou pela adição de um radical do DNA a um aminoácido aromático de uma proteína (Nackerdien et al. 1991).

O radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) não são capazes de atacar o DNA diretamente. O superóxido é o radical mais abundante na célula, o qual pode ser gerado através do transporte de elétrons ou por autooxidação do oxigênio molecular (Santoro e Thiele 1997). Por sua natureza química, o $O_2^{\bullet-}$ comporta-se como redutor e o H_2O_2 como um antioxidante. Este último, por ser uma molécula neutra, atravessa membranas com relativa facilidade. Como não é um radical, e portanto não reage imediatamente, o H_2O_2 é um intermediário reativo de oxigênio que pode migrar pela célula e atingir alvos distantes do local de sua formação.

As espécies reativas de oxigênio (ERO) que lesionam o DNA diretamente são o radical hidroxila (OH^{\bullet}) e o oxigênio singlet (Cadenas 1989, Epe 1991, Fridovich 1998, Cadet et al. 1999). O OH^{\bullet} reage com as quatro bases do DNA, produzindo bases modificadas, além de causar quebras de cadeias do DNA e sítios AP (Cadet et al. 1999). Já o oxigênio singlet pode causar ciclo-adição aos carbonos de ligação dupla do anel imidazol, gerar sítios AP álcali-lábeis, e quebras de cadeia simples em posições adjacentes a guaninas (OhUigin et al. 1987, Dizdaroglu 1993, Cadet et al. 1999). O alvo preferencial do ataque de EROs parece ser a guanina e o produto final mais freqüente é a 8-hidroxi-guanina (Cadet et al. 1999).

1.1.4 Psoralenos/Furocumarinas

Psoralenos ou furocumarinas são compostos aromáticos tricíclicos, de origem natural ou sintética, os quais intercalam-se na molécula de DNA de maneira reversível, através de ligações químicas de natureza fraca, tais como força de Van der Waals e pontes de hidrogênio. Em presença de radiação UV de comprimento de onda longo (365nm ou UVA), podem formar adutos covalentes nas bases pirimídicas, principalmente nas timinas, levando à formação de dois tipos de fotoprodutos: as monoadições e biadições (Figura 4). As monoadições resultam do estabelecimento de ligações covalentes entre

a dupla ligação das posições 5,6 das pirimidinas e uma ou outra das duplas ligações das posições 3,4 do núcleo cumarínico ou 4', 5' do grupamento furano. Ao contrário das monoadições do tipo 3,4, as do tipo 4'-5' podem absorver um fóton adicional de UVA, provocando assim uma segunda fotoadição com outra base pirimídica localizada na cadeia oposta de DNA, levando à formação de pontes inter ou intra-cadeias. Os psoralenos que apresentam uma estrutura totalmente plana nos seus três anéis aromáticos, como o 8-metoxipsoraleno (8-MOP), são capazes de reagir com as pirimidinas em uma ou ambas extremidades da molécula de psoraleno para formar adutos mono e bifuncionais, respectivamente. Essas mudanças introduzem distorções na hélice do DNA de maneira bastante significativa. (ver revisão em Averbeck et al. 1992, Friedberg et al. 1995, Henriques et al. 1997).

As furocumarinas que possuem estrutura angular, como a angelicina, ou apresentam algum impedimento estérico em um de seus sítios fororreativos ou, como o 3-CPs (3-carbetoxipsorlaneo), formam apenas fotoadições monofuncionais (Averbeck et al. 1992, Henriques et al. 1997). Essas monoadições de psoralenos às bases pirimídicas são formadas três vezes mais freqüentemente que as pontes inter ou intra-cadeias e contribuem também para as lesões oxidativas da célula (Sinden and Cole 1987, Averbeck et al. 1992). Entretanto, as pontes inter ou intra-cadeias parecem ser as responsáveis pelas inativações biológicas induzidas pelo tratamento de bactérias, bacteriófagos e células eucarióticas com psoralenos fotoativados (Sinden and Cole 1987, Averbeck 1989, Averbeck et al. 1992, Henriques et al. 1997). Estudos fotoquímicos demonstraram que a maioria dos derivados de furocumarinas apresentam uma certa capacidade de gerar oxigênio singlet, embora nenhum com a mesma extensão que o derivado monofuncional 3-CPs (Averbeck et al. 1992, Joshi and Pathak, 1995). Demonstrou-se também, que o 3-CPs induz a foto-oxidação dos resíduos de guaninas presentes no DNA via oxigênio singlet. (Knobler et al. 1988, Averbeck et al. 1992, Friedberg et al. 1995).

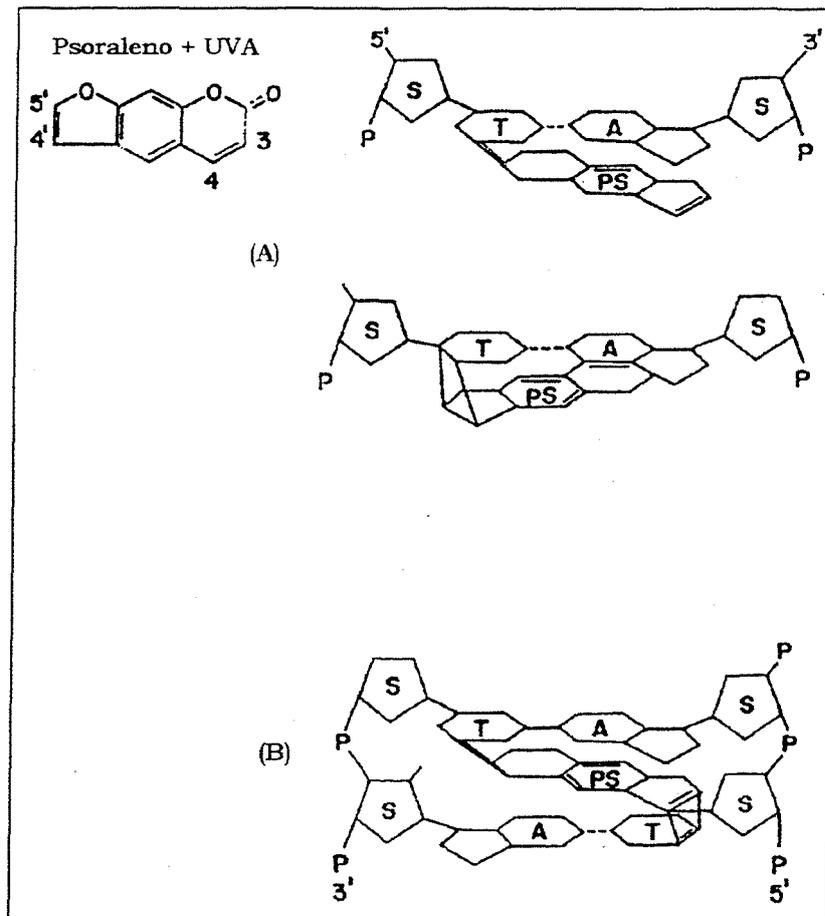


Figura 4. Representação esquemática de mono e biadições formadas por psoralenos + UVA na fita de DNA. (A) No primeiro exemplo demonstra-se a monoadição formada através da fotoreativação da timina com a dupla ligação 3-4 do psoraleno e no segundo com a ligação 4'-5'. (B) Intercalação do psoraleno entre duas moléculas de timina em fitas opostas de DNA, formando uma ponte intercadeia ou biadição (Friedberg et al. 1991).

1.2 Vias de reparação de DNA

A levedura *S. cerevisiae* é, provavelmente, o organismo eucarioto mais bem caracterizado geneticamente quanto a sua resposta a agentes que lesam o DNA. Mais de 50 loci que conferem resistência à radiação ionizante ou radiação UVC já foram identificados. Esses loci estão

classificados em três grupos de epistasia, os quais correspondem, até o momento, as três principais respostas celulares referentes aos danos no DNA: reparação por excisão/ressíntese, reparação por recombinação e reparação pós-replicativa e/ou mutagênica (Friedberg et al. 1995, Nickloff e Hoekstra 1998).

As interações epistáticas são definidas de acordo com a resposta que linhagens mutantes apresentam em relação a um determinado agente. Quando um duplo mutante é construído de simples mutantes pertencentes ao mesmo grupo de epistasia, ele não deve ser mais sensível ao agente genotóxico do que o mais sensível dos simples mutantes. Isso indica que esses dois genes estão envolvidos em etapas seqüenciais de uma rota bioquímica ou, então, que fazem parte de um complexo multimérico ou multiproteico. Entretanto, quando os simples mutantes pertencem a grupos epistáticos distintos, a dupla mutação mostra uma sensibilidade aumentada, chamada sinérgica, indicando que as duas vias de reparação competem para o mesmo tipo de lesão (Lawrence, 1989; Friedberg et al. 1991; Friedberg et al. 1995, Nickloff e Hoekstra 1998).

Os grupos de epistasia que foram definidos em relação à sensibilidade à radiação e a outros agentes mutagênicos estão mostrados na Tabela 1. Mutantes pertencentes ao grupo de epistasia RAD3 são defectivos no sistema de excisão/ressíntese de danos específicos de DNA, como na excisão de dímeros de pirimidina. Os genes pertencentes a essa via participam da reparação por excisão de nucleotídeos, também conhecida por NER ("nucleotide excision repair"). Os genes pertencentes à via RAD52 fazem a reparação de quebras duplas no DNA, principalmente através de recombinação homóloga, e os da via RAD6 pertencem à via mutagênica ou pós-replicativa, também conhecida como via de reparação sujeita a erros (para revisão, ver Friedberg et al. 1995 e Nickloff e Hoekstra 1998).

Tabela 1 Grupos de epistasia dos genes de *S. cerevisiae* envolvidos nos processos de reparação de DNA^a

RAD3	RAD52	RAD6
<i>RAD1</i>	<i>RAD50</i>	<i>RAD5(REV2) (SNM2)</i>
<i>RAD2</i>	<i>RAD51</i>	<i>RAD6</i>
<i>RAD3</i>	<i>RAD52</i>	<i>RAD8</i>
<i>RAD4</i>	<i>RAD53</i>	<i>RAD9</i>
<i>RAD7</i>	<i>RAD54</i>	<i>RAD15</i>
<i>RAD10</i>	<i>RAD55</i>	<i>RAD18</i>
<i>RAD14</i>	<i>RAD56</i>	<i>RADH</i>
<i>SSL1</i>	<i>RAD57</i>	<i>REV1</i>
<i>SSL2(RAD25)</i>	<i>RAD58</i>	<i>REV3 (PSO1)</i>
<i>TBF1</i>	<i>RAD59</i>	<i>CDC9</i>
<i>RAD16 (PSO5)</i>	<i>RAD24</i>	<i>REV5</i>
<i>RAD23</i>	<i>XRS12</i>	<i>REV6</i>
<i>CDC8</i>	<i>PSO4(PRP19)</i>	<i>REV7</i>
<i>CDC9</i>		<i>CDC7</i>
<i>MMS19</i>		<i>CDC8</i>
<i>PSO2(SNM1)</i>		<i>MMS3</i>
<i>PSO3</i>		<i>PSO4(PRP19)</i>
<i>RAD26</i>		<i>UMR1-7</i>
<i>CDC44</i>		
<i>RFA1</i>		
<i>POL30</i>		
<i>UVS12</i>		

^a Segundo Friedberg et al (1995), adaptado segundo Henriques et al. (1997) e Nickoloff e Hoekstra (1998). Os genes assinalados entre parênteses são alélicos aos primeiros.

1.2.1 Reparação por excisão de nucleotídeos (NER)

O NER compreende um dos sistemas mais versáteis de reparação do DNA, composto por múltiplas etapas onde diversas proteínas ligam-se ao DNA lesado, fazem duas incisões simples na fita (3'e 5' ao dano) e removem a lesão. Posteriormente, a DNA polimerase, DNA ligase e outras proteínas, preenchem a lacuna deixada para regenerar uma fita dupla de DNA intacta.

Esse modelo simples é bastante conservado evolutivamente, servindo tanto para bactérias como para organismos eucarióticos, desde as leveduras *S. cerevisiae* e *Schizosaccharomyces pombe*, até *Drosophila*, *Xenopus* e células de mamíferos. O NER é um dos grandes responsáveis pela reparação de lesões causadas pela radiação ultravioleta curta (UVC) (Sweder 1994).

Em humanos, as deficiências neste processo originam as doenças hereditárias “*Xeroderma pigmentosum*” (XP), Síndrome de Cockayne (SC) e a Tricotiodistrofia ou PIBIDS (Hoeijmakers 1993, Machado e Menck 1997, Wood 1997, Yu et al. 1999). Pacientes que sofrem de uma dessas doenças autossômicas recessivas são sensíveis à luz solar. Os portadores de XP mostram uma pigmentação anormal da pele, com predisposição ao câncer de pele e, muitas vezes, apresentam uma acelerada neurodegeneração. Os pacientes com SC também sofrem neurodegeneração e de um crescimento retardado, porém não possuem uma elevada incidência de câncer. Já a PIBIDS é um acrônimo de uma síndrome complexa que reúne fotosensibilidade, ictiose (descamação da pele), cabelos grisalhos, retardo mental, diminuição da fertilidade e baixa estatura. Estes pacientes são muito parecidos com os de SC em muitos aspectos, não apresentando da mesma forma, associação com câncer.

Com exceção dos genes humanos *ERCC6* e *XPCC*, todos os outros envolvidos com o NER possuem os seus homólogos em levedura (Hoeijmakers 1993; Aboussekhra e Wood 1994), com níveis de identidade variando entre 25 e 50% (Tabela 2). Algumas dessas proteínas estão também implicadas em processos que envolvem transcrição e replicação de DNA.

Além dos 6-4 fotoprodutos de pirimidina (citosina-timina) formados por radiação UVC, o NER também pode eliminar outras lesões, incluindo adutos de psoraleno fotoativados, lesões de agentes alquilantes, vários adutos de purina-cisplatina e adutos formados por carcinógenos policíclicos como o acetilamino-fluoreno (Wood 1996).

Tabela 2. Propriedades dos genes humanos envolvidos no NER e suas homologias com os genes de *S. cerevisiae* ^a.

Gene	Homólogo correspondente em <i>S.cerevisiae</i>	Propriedades da proteína
<i>XPA</i>	<i>RAD14</i>	Faz o reconhecimento da lesão provocada por UV, ligando-se a DNA de fita simples e dupla
<i>XPB/ERCC3</i>	<i>RAD25/SSL2</i>	DNA helicase 3'-5', envolvida na formação do complexo de pré-incisão, exerce função também em transcrição
<i>XPC</i>	<i>RAD4</i>	Estabiliza o complexo de pré-incisão, protegendo-o da degradação; liga-se preferencialmente a DNA simples fita e que sofreu lesão.
<i>XPD/ERCC2</i>	<i>RAD3</i>	DNA helicase 5'-3'
<i>CSB/ERCC6</i>	<i>RAD26</i>	DNA helicase, liga-se à cromatina exerce função não essencial à célula
<i>ERCC1</i>	<i>RAD10</i>	Subunidade de DNA endonuclease que atua na extremidade 5' da lesão, região C-terminal tem homologia com segmentos de UvrA e UvrC
<i>XPG/ERC C5</i>	<i>RAD2</i>	DNA endonuclease que atua na extremidade 3' do dano, forma complexo com ERCC4, ERCC11 e XPFC
<i>XPF/ERC C4</i>	<i>RAD1</i>	Subunidade de DNA endonuclease que atua na extremidade 5' da lesão
<i>HHR23A HHR23B PCNA Pol δ Pol ε RPA</i>	<i>RAD23 Pol δ Pol ε RPA</i>	Liga-se a XPCC e estimula sua atividade Síntese do reparo Síntese do reparo Proteína que se liga a DNA simples fita, interage com XPA

^a Segundo Wood (1997), com modificações e adaptações conforme Yu et al. (1999).

Ainda não são conhecidas as características estruturais precisas que definem a eficiência do reconhecimento da lesão pelo NER. Mas sabe-se, por exemplo, que nas lesões causadas por UVC, os dímeros de pirimidina do tipo anéis ciclobutano (CPDs) são removidos 5 a 10 vezes mais lentamente do genoma do que os 6-4 fotoprodutos.

Em *S. cerevisiae* há pelo menos nove genes indispensáveis para o NER, que são *RAD1*, *RAD2*, *RAD3*, *RAD4*, *RAD10*, *RAD14*, *SSL1*, *SSL2/RAD25* e *TFB1* (Bardwell et al. 1994b; Ramotar e Masson 1996). Mutação em qualquer um desses genes faz com que a levedura seja sensível a uma série de agentes mutagênicos, principalmente à radiação UVC, resultado de sua incapacidade em reparar essas lesões (Reynolds 1978, Resnick et al. 1981, Ramotar e Masson 1996). Além desses, há outros genes não essenciais como *RAD7*, *RAD16*, *RAD23*, *RAD24* e *MMS19*, cujas proteínas desempenham funções acessórias no NER (Bang et al. 1992, Sweder 1994, Ramotar e Masson 1996).

A Tabela 3 relaciona os genes do NER envolvidos na reparação de lesões causadas por UVC em *S. cerevisiae*, bem como as suas proteínas interagentes (Nickoloff e Hoekstra 1998).

Tabela 3. Genes da via RAD3 envolvidos em reparação de danos causados por UVC em *S. cerevisiae*^a

Gene	Atividades e outras características da proteína	Proteínas interagentes
<i>RAD1</i>	Endonuclease; complexada com Rad10p cliva junções de DNA fita simples e dupla das extremidades 3'	Rad10p, Rad14p
<i>RAD2</i>	Endonuclease; seu homólogo em humanos cliva junções de DNA fita simples e dupla das extremidades 5', é induzível por UV	Ssl2p, Tfb1p
<i>RAD3</i>	Componente do fator TFIIH, essencial, helicase DNA-DNA, DNA-RNA 5'-3', atividade ATPase dependente de DNA fita simples	Ssl1p, Ssl2p
<i>RAD4</i> <i>RAD7</i>	Especificamente requerido no reparo de regiões silenciosas do DNA, induzível por UV	Rad23p, TFIIH Sir3p, Rad16p
<i>RAD10</i>	Endonuclease, em complexo com Rad1p cliva DNA não reparado simples fita das extremidades 3'	Rad1p
<i>RAD14</i>	Liga-se especificamente à DNA contendo lesões de UV	Rad23p, Rad1p
<i>RAD16</i>	Contém domínios de helicase, especificamente requerido no reparo de regiões silenciosas do DNA, induzível por UV e choque térmico	Rad7p
<i>RAD23</i>	Domínio de ubiquitina, induzível por UV	Rad4p, Rad14p, Tfb1p
<i>RAD26</i>	Especificamente requerido no reparo preferencial de fitas transcritas	
<i>SSL1</i>	Componente do fator TFIIH, essencial	Rad3p, Tfb1p
<i>SSL2/</i> <i>RAD25</i>	Componente do fator TFIIH, essencial, helicase DNA-DNA 3'-5', atividade ATPase	Rad3p, Rad2p
<i>TFB1</i>	Componente do fator TFIIH, essencial	Rad2p, Rad23p, Ssl1p
<i>TFB2</i>	Componente do fator TFIIH, não está comprovada sua função no NER	
<i>TFB3</i>	Componente do fator TFIIH, não está comprovada sua função no NER	
<i>RFA1</i>	Subunidade do fator de replicação A	
<i>CDC44</i>	Subunidade do fator de replicação C	
<i>POL30</i>	PCNA	
<i>CDC9</i>	DNA ligase	

^a Segundo Nickoloff e Hickson (1998).

1.2.1.1 Etapas iniciais e eventos de pós-incisão do NER

A Figura 5 apresenta um modelo recente de como se imagina que possa funcionar o NER em *S. cerevisiae*, resumindo as etapas seqüenciais das enzimas envolvidas nesta forma de reparação (Nickoloff e Hoekstra 1998).

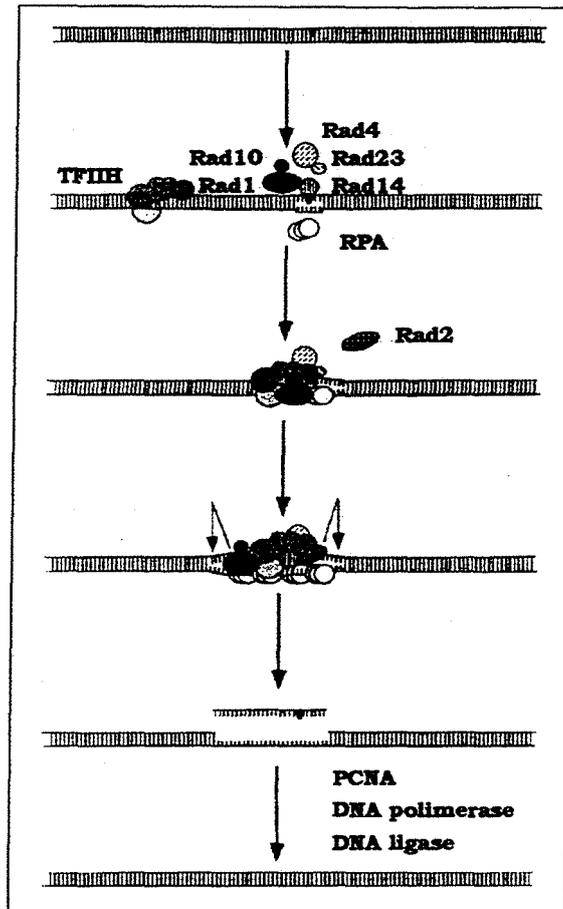


Figura 5. Modelo proposto para as etapas seqüenciais do NER em *S. cerevisiae* (Nickoloff e Hoekstra 1998).

A reparação do dano no DNA pelo NER é iniciada pelo reconhecimento da lesão que seria feita pelo produto do gene *RAD14* (Guzder et al. 1993). A seguir, a proteína RPA liga-se ao DNA e recruta as proteínas Rad4 e Rad23. Posteriormente, essas proteínas atraem o fator de iniciação da transcrição RNA polimerase II (Fator b ou TFIIE),

que percorre a fita de DNA mesmo na ausência de dano e que é recrutado pela proteína Rad3 quando a lesão aparece. As helicases Rad3 e Ssl2, associadas com o TFIIH, fazem o desenrolamento da hélice de DNA no sítio da lesão, seguida por uma incisão dupla no DNA. Na terminação 5', a incisão é feita pelo complexo proteico Rad1/Rad10 (Davis et al. 1995), possivelmente interagindo com a proteína Rad14, conforme o encontrado em sistema de mamíferos (Li et al 1994). Na terminação 3', acontece a incisão pela endonuclease de DNA simples fita Rad2, a qual é recrutada pelas interações de TFIIH. (Habracken et al. 1993, Nickoloff e Hoekstra 1998). Essa reação é dependente da hidrólise de ATP. A lesão é então removida para formar um pequeno fragmento, contendo 27-30 nucleotídeos, possivelmente pelas helicases Rad3 e Rad25 e pela DNA polimerase δ e ϵ , durante a síntese da reparação (Nickoloff e Hoekstra 1998).

Entre as proteínas do NER, Rad3, Rad25, Tfb1, Tfb2 e Tfb3 são fortemente associadas com TFIIH, indicando uma estreita ligação entre reparação de DNA e transcrição (Feaver et al. 1993). Ainda não se sabe exatamente se Tfb2 e Tfb3 são essenciais ao NER (Nickoloff e Hoekstra 1998).

As proteínas Rad3 e Rad25 possuem atividade de helicase 5'-3' e 3'-5', respectivamente, o que explica o requerimento dessas duas proteínas para desenrolar a fita de DNA, facilitando o acoplamento da reparação com a transcrição. Mutações no gene *RAD3* causam uma série de fenótipos, como as elevadas sensibilidades a UVC, ao agente alquilante MMS, a 4-NQO e a psoralenos + UVA (Cox e Parry 1968, Haynes e Kunz 1981, Henriques e Moustacchi 1981, Friedberg 1995). A deleção total ou parcial do gene *RAD3* é letal para a levedura, indicando que a proteína Rad3 desempenha função essencial para a viabilidade celular.

As proteínas Rad1 e Rad10 formam um complexo estável, através de seus domínios hidrofóbicos presentes na região carboxi-terminal (C-terminal) de ambas as proteínas (Bardwell et al. 1992). Estas proteínas

atuam juntas, como uma endonuclease específica que corta DNA simples fita, produzindo radical hidroxila-3' e grupo fosfato-5' numa reação que é dependente de Mg^{2+} (Tompkinson et al. 1993). Rad1/Rad10 formam complexo com Rad14, a qual direciona a endonuclease para o sítio da lesão (Guzder et al. 1996). Rad1 e Rad10 também atuam na reparação recombinacional, porém de uma forma distinta da via RAD52 (Schiestl e Prakash 1988, Schiestl e Prakash 1990, Ivanov e Haber 1995). A proteína Rad14 apresenta uma especificidade para lesões no DNA do tipo 6-4 fotoprodutos, causados por radiação UVC (Guzder et al. 1993). Não há evidências de que ela se ligue aos CPDs, sugerindo a existência de outras proteínas envolvidas no reconhecimento dos variados tipos de lesões no DNA. A proteína Rad2 é também uma endonuclease de DNA fita simples (Habracken et al. 1993). A proteína Rad4 forma um complexo estequiométrico com a proteína Rad23 e sugere-se que esse complexo atue no agrupamento dos fatores de reparação no sítio da lesão (Guzder et al. 1995a; Guzder et al. 1995b).

O requerimento de um grande número de proteínas para a reação de incisão indica que essa reação, provavelmente, envolve uma série de eventos coordenados dependentes do agrupamento temporal e espacial desses fatores proteicos no sítio da lesão. Guzder et al. (1996) verificaram, através de ensaios de co-purificação, imunoprecipitação e gel filtração, as etapas seqüenciais da formação desses complexos proteicos e definiram que as proteínas Rad1-Rad10 e Rad14 formam um complexo inicial, conforme já citado acima, o qual denominaram fator de excisão de nucleotídeos-1 (NEF-1). A proteína humana homóloga de Rad1 é a XPF, que associa-se com o homólogo de Rad10, a ERCC1. Da mesma forma que Rad1-Rad10, o complexo XPF-ERCC1 é uma DNA endonuclease. Experimentos com o sistema di-híbrido mostraram que a proteína humana XPA, homóloga de Rad14, interage com ERCC1 (Li et al. 1994). Guzder et al. (1996) mostraram que Rad14 associa-se mais fortemente a Rad1 do que a Rad10, sugerindo então

que em humanos a proteína XPA existe num complexo com ERCC1 e XPF *in vivo* e que XPF exerce um papel majoritário neste complexo. Rad4 e Rad23 também formam um complexo bastante estável, que foi considerado como sendo o NEF-2, o qual pode atuar primariamente como um “marcador” molecular que conecta NEF-1 ao TFIIH no sítio da lesão. Já as proteínas Rad2 e TFIIH fariam parte do NEF-3 e Rad7-Rad16, do NEF-4 (Guzder et al. 1996; Guzder et al. 1997). Recentemente, Guzder et al. (1999) mostraram que NEF2 e NEF4 ligam-se, de uma maneira sinérgica, a DNA irradiado por UVC e sugerem que a proteína Rad7 tenha a função de promover a ligação entre esses dois complexos.

Ainda não está bem conhecida a etapa seguinte à etapa de incisão. As atividades de helicase do TFIIH ou de outras proteínas podem ser necessárias para que haja a liberação do fragmento de DNA simples-fita. Sabe-se que as polimerases δ e ϵ são essenciais para a reparação. Além disso, o antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA) junta-se à polimerase δ e ϵ para formar uma holoenzima essencial para o processamento. Estudos em células de mamíferos também demonstraram que o PCNA é um componente indispensável ao NER (Nichols e Sancar 1992, Nickoloff e Hoekstra 1998).

1.2.1.2 Reparação acoplada à transcrição

O reconhecimento das lesões no DNA da cromatina ocorre de maneira variada para determinadas regiões específicas. Com isso, o NER fica subdividido em duas vias: a primeira é chamada de reparação global do genoma (“global genome repair”) que é essencial para a remoção dos danos de seqüências de DNA não-transcritas e a segunda é chamada de reparação acoplada à transcrição, que é uma reparação mais rápida e eficiente das fitas transcritas de genes ativos. Essa reparação acoplada à transcrição foi encontrada em células de mamíferos (Mellon et al. 1987), *E. coli* (Mellon e Hanawalt 1989) e em *S. cerevisiae* (Leadon e Lawrence 1992; Smerdon e Thoma 1990; Sweder e

Hanawalt 1992) e é responsável pela reparação preferencial das fitas transcritas de DNA de genes ativos.

Foi demonstrado que genes envolvidos em NER, como *RAD3*, *RAD25 (SSL1)* e *SSL2*, são componentes do fator de transcrição TFIIH em levedura (Feaver et al. 1993, Bardwell et al. 1994b). Os seus correspondentes genes homólogos em humanos codificam proteínas que também foram identificadas como sendo componentes do fator TFIIH de transcrição de células humanas. Hanawalt (1994) apresentou um modelo no qual estes processos estão acoplados. Neste modelo, a presença de uma lesão promove uma parada na transcrição seguida do recrutamento do complexo TFIIH e de outras proteínas envolvidas na reparação (reparossoma), cujos genes são induzidos. Após a reparação, o fator TFIIH atua como um fator de iniciação e a transcrição é reassumida. Na verdade, há estudos mostrando a existência *in vivo* de um complexo multiproteico formado pelas proteínas TFIIH, Ssl2, Rad14, Rad2, Rad1 e Rad10 na ausência de danos ao DNA, sugerindo que o reparossoma exista de forma constitutiva dentro da célula (Svejstrup et al. 1995).

Qual seria então a explicação de se ter componentes do complexo de iniciação da transcrição também envolvidos com o NER? Uma consideração, segundo Bardwell et al. (1994b), seria de que isso funcionaria como um mecanismo potencial da célula para parar a sua transcrição quando sofresse um dano no DNA, afim de evitar a formação de um transcrito errado. Se a proteína Rad3, sozinha ou em associação com o fator b, fosse requisitada para o NER, a transcrição ficaria mais lenta ou talvez nem acontecesse. Se o fator TFIIH, adicionalmente, participasse na replicação do DNA, esse processo poderia ter sua velocidade controlada, proporcionando um segundo nível de proteção contra uma infidelidade genômica. Nickoloff e Hoekstra (1998) sugerem, entretanto, a não utilização do termo “transcrição acoplada à reparação” para levedura, pois este mecanismo, tanto para levedura, quanto para mamíferos, ainda permanece muito

especulativo, uma vez que não há evidências bioquímicas da ligação entre o TFIIH e o reparossoma.

1.2.1.3 NER em lesões de fitas não-transcritas e regiões silenciosas no DNA: Rad7 e Rad16

O sinal de acasalamento na levedura *S. cerevisiae* é determinado pelo gene expresso no locus *MAT* (*MATa* ou *MAT α*), mas a mesma informação também pode ser encontrada no loco silencioso, não-transcrito (*HMR* ou *HML*), que é inativo através da ação dos produtos dos genes *SIR*. O envolvimento destes genes no controle da reparação de regiões não transcritas, foi identificado a partir de observações como a de que a remoção dos CPDs nos genes inativos, consideravelmente mais lenta do que nos genes ativos, é acelerada ao nível de genes ativos no mutante *sir3* (Terleth et al. 1990).

Os produtos dos genes *RAD7* e *RAD16* são requeridos na reparação preferencial de CPDs das regiões silenciosas do DNA, como nos loci *HMLa* e *HML α* , e para a reparação de fitas não transcritas de genes ativos (Verhage et al. 1994). A sensibilidade dos mutantes *rad16* e *rad7* à radiação UVC é menos pronunciada do que a dos mutantes essenciais ao NER. Sugere-se que *RAD7* e *RAD16* são responsáveis pela remoção de apenas uma fração (20-30%) dos CPDs totais (Verhage et al. 1994).

Recentemente, Reed et al. (1998) mostraram que mutantes *rad7* e *rad16* não são defectivos na etapa de incisão de DNA, porém são bastante defectivos em eventos pós-incisão, como na excisão de nucleotídeos e, como já descrito anteriormente (Wang et al 1997), na síntese da reparação. Dessa forma, concluiu-se que os produtos dos genes *RAD7* e *RAD16* participam em eventos de pós-incisão. Foi demonstrado que as proteínas Rad7 e Rad16 interagem *in vitro* e *in vivo* (Bang et al. 1992, Wang et al. 1997) e que a proteína Rad7 também interage física e geneticamente com a proteína Sir3, a qual está

envolvida na conformação estrutural de certas regiões do DNA reprimidas na transcrição (Paetkau et al. 1994). Por isto, foi proposto que estas proteínas atuariam mais a nível de remodelação da estrutura de cromatina para facilitar o NER das regiões silenciosas do genoma e da fita não transcrita de genes transcritivamente ativos (Verhage et al. 1994). Efetivamente, Rad16 é membro da família de proteínas Swi2/Snf2, mostrando homologia com o gene de reparação *RAD54* e com vários moduladores da transcrição, assim como o próprio gene *SNF2*, envolvido na remodelação da estrutura de cromatina (Bang et al. 1992). Já Guzder et al. (1997) postulam que o fator NEF-4, composto pelas proteínas Rad7 e Rad16, funciona como um sensor de danos no DNA, dependente de ATP, que conduziria as proteínas do NER à reparação das fitas não-transcritas de DNA.

1.3 Reparação pós-replicativa e mutagênica de DNA

O grupo de epistasia *RAD6*, que caracteriza-se por ser o responsável pela reparação de DNA por mutagênese, representa a mais complexa e menos compreendida das três vias de reparação de DNA em *S. cerevisiae* (Tabela 4). A mutagênese aumentada de células de levedura que sofreram o tratamento com agentes genotóxicos envolve a participação de uma série de funções celulares. O grupo inclui mutantes que são sensíveis à radiação UVC e ionizante, e apresentam uma resposta mutagênica diferenciada quando expostos a esses agentes (Friedberg et al. 1995, Nickoloff e Hoekstra 1998).

O fenótipo pleiotrópico dos mutantes *rad6* sugere uma proteína com características multifuncionais. Esses mutantes são extremamente sensíveis à radiação UVC, raios γ , agentes alquilantes e psoralenos fotoativados. Além disso, eles apresentam uma frequência de mutação extremamente reduzida ou mesmo um bloqueio total na taxa de mutação espontânea ou induzida após o tratamento com esses agentes (Prakash 1976, Prakash e Prakash 1980, Prakash 1994).

Tabela 4. Genes da via RAD6 envolvidos em reparação de danos causados por UVC em *S. cerevisiae*^a

Gene	Atividades e outras características da proteína	Proteínas interagentes
<i>RAD6</i>	Enzima E2 conjugada à ubiquitina	Rad18p
<i>RAD18</i>	Liga-se a DNA simples fita, induzível por UVC	Rad6p
<i>REV1</i>		
<i>REV2/RAD5</i>	Apresenta domínios de helicase e “zinc finger”	
<i>REV3</i>	Rev3p/Rev7p= DNA polimerase ζ	Rev7p
<i>REV7</i>		Rev3p
<i>SRS2</i>	Helicase 3'-5', ATPase, regulada pelo ciclo celular	
<i>CSC7</i>	Quinase serina-treonina requerida no processo de iniciação da replicação	Dbf4p

^a Segundo Nickoloff e Hoeckstra (1998).

A caracterização de diferentes mutações alélicas de *rad6* e de supressores da mutação *rad6* indica que o seu produto gênico exerce múltiplas funções. Mutantes *rad6* também mostram ser deficientes na reparação pós-replicação, o que provavelmente justifica a sua sensibilidade a UVC (Prakash 1981). Há linhagens diplóides deficientes em esporulação (Monteloni et al. 1981). Foram isolados também supressores que separam a função de *RAD6* na mutagenese da sua função na reparação de danos induzidos por radiação UVC (Lawrence e Christensen 1979, Tuite e Cox 1981, Nickoloff e Hoekstra 1998).

A proteína Rad6 é uma das 5 enzimas do tipo E2 do sistema ligase-ubiquitina, que catalisa a transferência de ubiquitinas ativadas às histonas H2A e H2B (Jentsch et al. 1987). A função desta proteína na

mutagênese não está relacionada com a sua capacidade de ubiquitinar histonas, mas sim a sua interação com a proteína Rad18.

Rad18 é uma proteína que se liga à fita simples de DNA (Baily et al. 1994) e, como Rad6, é induzida após exposição à radiação UVC (Jones et al. 1990). Os mutantes *rad18* também são sensíveis à radiação UVC, raios γ e a uma variedade de agentes químicos, porém, ao contrário de *rad6*, não são deficientes em esporulação, recombinação meiótica ou mutagênese induzida por UVC (ver revisão em Friedberg 1995 e Nickoloff e Hoekstra 1998). Experimentos de imunoprecipitação demonstraram a formação de um complexo estável e específico entre Rad18 e Rad6 (Bailly et al. 1994).

O gene *SRS2* foi caracterizado inicialmente como sendo um supressor de *rad6* e *rad18* para sensibilidade à radiação UVC (Aboussekhra et al. 1989, Schiestl et al. 1990), e codifica para uma helicase 3'-5' com função de ATPase (Aboussekhra et al. 1989, Rong e Klein 1993). Sugere-se que esta proteína canaliza as lacunas no DNA fita simples no lado oposto à lesão, as quais são formadas durante a replicação para as diversas vias de reparação. Essa canalização começaria com o processo mutagênico, através de *RAD6/RAD18*, e competiria com a reparação recombinacional que é dependente da via *RAD52*. (Schiestl et al. 1990; Aboussekhra et al. 1992, Friedberg et al. 1995, Nickoloff e Hoekstra 1998).

1.3.1 Atividades requeridas especificamente para a mutagênese induzida por danos no DNA

Alguns mutantes que apresentam frequência de mutação reversa reduzida, como *rev3*, *rev6* e *rev7*, possuem uma deficiência geral na mutagênese induzida por danos ao DNA, enquanto que os outros mutantes *rev* possuem uma frequência de mutação reduzida apenas para certos sistemas mutacionais (Friedberg et al. 1995, Nickoloff e Hoekstra 1998). O mutante *rev3* é bloqueado em mutagênese induzida e

espontânea, entretanto, é pouco sensível à UVC e não é deficiente na reparação pós-replicativa (Prakash 1981).

A proteína Rev3 apresenta uma atividade instável de DNA polimerase (Nelson et al. 1996). Entretanto, essa atividade parece ser aumentada quando há a formação de um complexo com o produto do gene *REV7* (Nelson et al. 1996). O complexo Rev3/Rev7 foi chamado de DNA polimerase ζ , o qual está envolvido na síntese de DNA translesão. Este complexo deve ser considerado como uma polimerase não essencial, envolvida exclusivamente com o "bypass" mutagênico das lesões no DNA, através da inserção de nucleotídeos aleatórios.

O gene *REV1* também está envolvido na síntese translesão e apresenta 25% de identidade com a proteína UmuC de *E.coli* (Larimer et al. 1989). O gene *REV2* (alelo ao *RAD5*) é um componente do processo de replicação do DNA e pertence à família de helicases SNF2, que inclui *ERCC6*, *RAD16*, *RAD54*, *SNF2*, *MOT1* e o gene de *Drosophila* *BRM*. (Eisen et al. 1995). Sugere-se que o mesmo esteja envolvido num mecanismo de reparação pós-replicativo não-mutagênico, relacionado a *RAD18* (Friedberg et al. 1995, Nickoloff e Hoekstra 1998).

Sumarizando, a função de DNA polimerase do complexo Rev3/Rev7 parece ser o elemento chave da síntese de DNA translesão, possivelmente fazendo parte de um complexo de replicação que inclui outros membros da família dos genes *REV*. (Morrison et al. 1989, Nelson et al. 1996). Ainda não existe um mecanismo satisfatório que explique todas as características da mutagênese induzida por UVC na levedura, mas parece que a mesma não depende exclusivamente da ativação de genes induzíveis, como no caso de *E.coli* (Friedberg et al. 1995, Nickoloff e Hoekstra 1998).

Recentemente, Paulovich et al. (1998) mostraram que os genes *RAD9*, *RAD17*, *RAD24* e *MEC3* são requeridos na mutagênese induzida por UVC e que *RAD9* e *RAD17* (mas não *REV3*, *RAD24* e *MEC3*) são necessários na indução de troca de cromátides irmãs dependente de replicação. A função destes genes na regulação do ciclo celular em

reposta aos danos no DNA já está bem estabelecida (Weinert e Hartwell 1988, 1990, 1993; Weinert et al. 1994). Os resultados de Paulovich et al. (1998) demonstram que genes envolvidos em parada de ciclo celular ou *checkpoint* não controlam exclusivamente a progressão do ciclo celular como resposta ao dano, mas também possuem um papel de “tolerar” a lesão no DNA durante a replicação.

1.4 Reparação de DNA por recombinação homóloga

Em linhagens haplóides de levedura, a recombinação homóloga é um dos mecanismos usados na reparação de quebras de cadeias duplas de DNA (DSBs), as quais são geradas, na sua maioria, por radiação ionizante e alguns agentes alquilantes, como o MMS. Na primeira etapa da meiose, as quebras de cadeias duplas são introduzidas em loci específicos no cromossoma e servem como sítios de iniciação da recombinação (ver revisão em Friedberg et al. 1995, Nickoloff e Hoekstra 1998). Se não forem reparadas corretamente, podem causar deleções mutagênicas, translocações, ou até mesmo a perda cromossomal e morte celular. A instabilidade genômica derivada da incapacidade de reparar os DSBs pode levar também a processos carcinogênicos, através da ativação de oncogenes, à inativação de supressores tumorais ou à perda de heterozigosidade (Kanaar et al. 1998).

Em *S. cerevisiae*, há doze genes envolvidos na reparação recombinacional de quebras de cadeia dupla, os quais constituem a via RAD52 de epistasia e inclui os genes *RAD50* à *RAD57*, *RAD59*, *MRE2*, *MRE11* e *XRS2* (Game 1993, Heywer e Kolodner 1993, Friedberg et al. 1995, Nickoloff e Hoekstra 1998, Kanaar et al. 1998). A maioria destes genes está implicada não só em recombinação mitótica, mas também meiótica, a qual é iniciada pela formação e subsequente pela reparação de quebras de cadeias duplas. Linhagens defectivas em qualquer um destes genes são extremamente sensíveis à radiação ionizante. Há também outros genes cujos produtos não atuam

diretamente na reparação de quebras duplas, mas têm uma função no processo recombinacional, como por exemplo o *CDC1*, envolvido com o ciclo de divisão celular (Ramotar e Masson 1996). Para alguns destes genes da via RAD52, como *RAD50*, *RAD51*, *RAD52*, *RAD54* e *MRE11*, já foram identificados homólogos em camundongos e humanos (Shinohara et al. 1993, Muris et al 1994, Kanaar et al. 1996, Dolganov 1996, Kannar et al. 1998). Na levedura, a proteína Rpa, a qual se liga a fita simples de DNA e é codificada pelos genes RFA, também participa da reparação de quebras de cadeias duplas e ativa reações de troca de cadeia (Wood 1996).

A Figura 6 representa um modelo resumido da reparação de quebras duplas de DNA por recombinação homóloga em *S. cerevisiae*, segundo Tacker (1999).

Ensaio bioquímicos e utilizando o sistema di-híbrido mostraram que as proteínas Rad50, Xsr2 e Mre11 interagem umas com as outras. Sugere-se que as mesmas atuem juntas na etapa inicial da criação das quebras de cadeias duplas do DNA necessárias para que haja recombinação meiótica (Johzuka e Ogawa 1995, Ogawa et al. 1995, Kannar et al. 1998). Postula-se que o complexo Mre11/Rad50 ligue-se aos sítios expostos da cromatina afim de reprimir a produção de lesões recombinogênicas espontâneas e há estudos mostrando que Mre11, Rad50 e Xrs2 constituem a atividade de exonuclease 5'-3' no processamento das quebras duplas de DNA durante a mitose (Johzuka e Ogawa 1995, Ramotar e Masson 1996).

A proteína Rad51 interage com Rad52 (Milne e Weaver 1993), assim como seus homólogos em humanos (Shen et al. 1996). Estudos utilizando o sistema di-híbrido mostraram que a proteína Rad51 também pode interagir com Rad54 (Clever et al. 1997) e Rad55, sendo que este último está associado com Rad57 (Hays et al. 1995). Sendo assim, há pelo menos cinco proteínas, Rad51, Rad52, Rad54, Rad55 e Rad57, formando um complexo multiproteico na reparação

recombinacional em *S. cerevisiae*, denominado "recombinossoma" (Hays et al. 1995, Ramotar e Masson 1996).

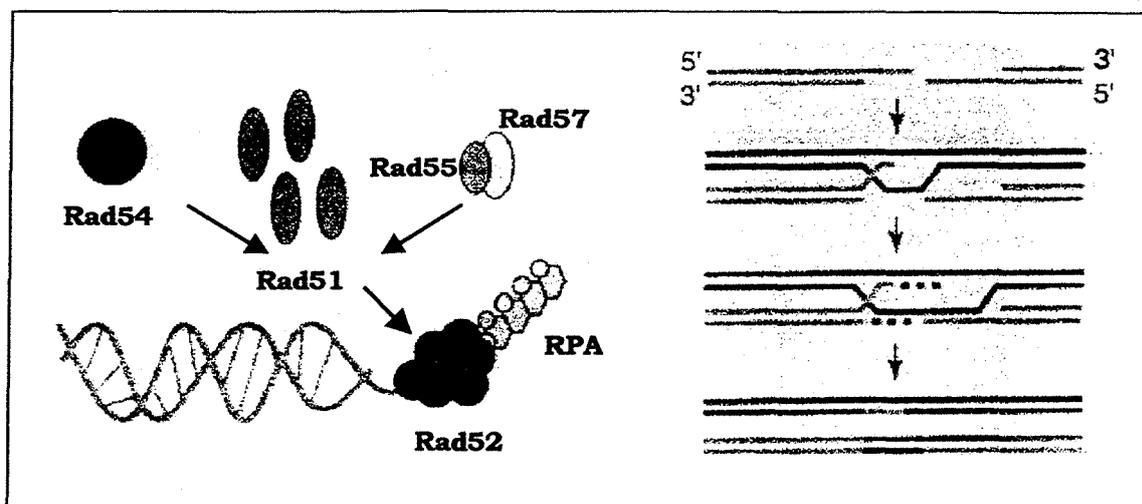


Figura 6. Reparação de DSB através de recombinação homóloga, em *S. cerevisiae*. O desenho da direita mostra a quebra da dupla fita de DNA, com as extremidades 3' expostas (cinza claro) e a associação desta com uma fita intacta (cinza escuro). A recombinação acontece, seguida da ressíntese do DNA (linha pontilhada). O desenho à esquerda mostra as proteínas envolvidas na etapa da recombinação homóloga, bem como as associações físicas entre as mesmas (segundo Tacker 1999).

O gene *RAD54*, assim como o *RAD16* que pertence ao NER, é membro da família de genes SWI/SNF2, que inclui ativadores de transcrição e helicases que alteram a estrutura da cromatina (Troelstra e Jaspers 1994). A proteína Rad51 liga-se ao DNA numa reação dependente de ATP e possui grande homologia com a proteína RecA de *E. coli*, atuando de forma similar a esta na formação de nucleofilamentos helicoidais sobre o DNA (Shinohara et al. 1992).

No grupo de epistasia *RAD52*, os mutantes *rad52* são os que apresentam os defeitos mais severos na reparação de DSBs e recombinação. Estes mutantes são bastante sensíveis à radiação

ionizante (Resnick e Martin 1976) e praticamente bloqueados em recombinação meiótica e esporulação (Game et al. 1980). Apesar do gene *RAD52* não possuir homologia significativa com os genes envolvidos em recombinação em *E. coli*, ele é bastante conservado em levedura, humanos e camundongos (Muris et al. 1994, Park 1995, Nickoloff e Hoeckstra 1998, Kannar et al. 1998), sugerindo que a proteína Rad52 deve ser única para todos os organismos eucarióticos.

A proteína Rad52 purificada é capaz de se ligar à DNA de fita simples e dupla, podendo também anelar oligonucleotídeos de DNA de fita simples complementares (Mortensen et al. 1996, Ogawa et al. 1993). Recentemente, Shinohara e Ogawa (1999) mostraram que Rad52 facilita a formação dos filamentos de Rad51 na fase pré-sináptica da recombinação e New et al. (1999), observaram que Rad52 estimula a troca de cadeia, direcionando a proteína Rad51 ao complexo de replicação da proteína A (RPA) com DNA simples fita. Esses autores mostraram que a proteína Rad52 afeta o primeiro estágio da reação, que é a formação do filamento pré-sináptico, por superar os efeitos inibitórios do seu competidor, a proteína RPA. Além disso, que esse estímulo é dependente da ação conjunta de Rad51 com RPA, sugerindo então o requerimento de interações proteicas específicas entre Rad52, Rad51 e RPA.

O gene *RAD59* apresenta uma grande homologia com *RAD52*, e os mutantes *rad59* também são bastante sensíveis à radiação ionizante (Bai e Symington 1996). *RAD59* atua em recombinação mitótica independente de *RAD51*. A superexpressão de *RAD52* suprime os defeitos de recombinação e reparação em mutantes *rad59*, sugerindo a possibilidade de funções comuns entre essas duas proteínas. Postula-se que Rad59 participe não só da reparação de DSBs através de recombinação homóloga, mas também em não homóloga (Nickoloff e Hoeckstra 1998).

1.5 Reparação de DNA por recombinação não-homóloga ou ilegítima

A levedura *S. cerevisiae* é bastante eficiente em processos de recombinação homóloga. Entretanto, ela possui também um percentual baixo de recombinação não-homóloga, principalmente quando a via RAD52 não está atuando. Em humanos, o processo de reparação de DSBs por recombinação não-homóloga inicia-se pela ligação das extremidades livres, através de uma proteína quinase dependente de DNA (DNA-PK) (Price et al. 1997). Esta proteína também está envolvida na regulação da transcrição, em apoptose e em infecções virais de células humanas (Lees-Miller 1996), sendo regulada pela proteína Ku (Smider e Chu 1997, Yaneva et al. 1997, para revisão ver Featherstone e Jackson 1999).

A proteína Ku é um heterodímero composto por duas subunidades, uma de 70 e outra de 86 kDa (Reeves e Stoeber 1989) e atua como uma subunidade regulatória da ligação ao DNA, enquanto que a DNA-PK seria a subunidade catalítica (Gottlieb e Jackson 1993).

A reparação de DSBs por recombinação não homóloga em levedura parece acontecer na fase G1 do ciclo celular, quando não há cromossomas homólogos que propiciem a recombinação homóloga (Siede et al. 1996). Em *S. cerevisiae*, ainda não foi descrita nenhuma proteína quinase dependente de DNA. Entretanto, existe a proteína homóloga de Ku, a qual possui também uma grande afinidade por DNA e chama-se Hdf1 (Feldmann e Winnacker 1993). A proteína Hdf também é um heterodímero que se liga às extremidades da fita dupla de DNA. Na verdade, os genes que codificam para as duas subunidades (de 70 e 80 kDa) já foram clonados e chamam-se *HDF1* e *HDF2*, respectivamente ou *y-Ku70* e *y-Ku80* (Feldmann e Winnacker 1993, Feldmann et al. 1996), os quais estão envolvidos em reparação de DNA e também em recombinação ilegítima (Tsukamoto et al. 1996, Feldmann et al. 1996).

A Figura 7 apresenta um modelo de reparação de DSBs por recombinação ilegítima, segundo Kanaar et al. (1998). A formação do

DSBs faz com que o heterodímero Ku ligue-se às extremidades do DNA e recrute a DNA-PKcs. Além disso, a estrutura de cromatina pode ser influenciada. Em *S. cerevisiae*, as proteínas Sir2, Sir3 e Sir4 estão envolvidas e, em mamíferos, pode ocorrer um processo semelhante a esse, de remodelação da estrutura de cromatina. Foi demonstrado, através de experimentos com o sistema di-híbrido, que a proteína yKu70 interage com a Sir4 (Tsukamoto et al. 1997). Uma interpretação para esse resultado é que a proteína Ku teria o papel de recrutar as proteínas Sir até os DSBs, levando à formação de uma estrutura semelhante a de uma heterocromatina condensada em volta da lesão. Após a junção das duas extremidades, os protômeros de DNA-PKcs fosforilam-se uns aos outros, causando uma mudança estrutural neste complexo, resultando possivelmente na remoção de DNA-PKcs. Nos últimos estágios, o complexo *RAD50*, *MRE11* e *NBS1* é atraído, processando as extremidades.

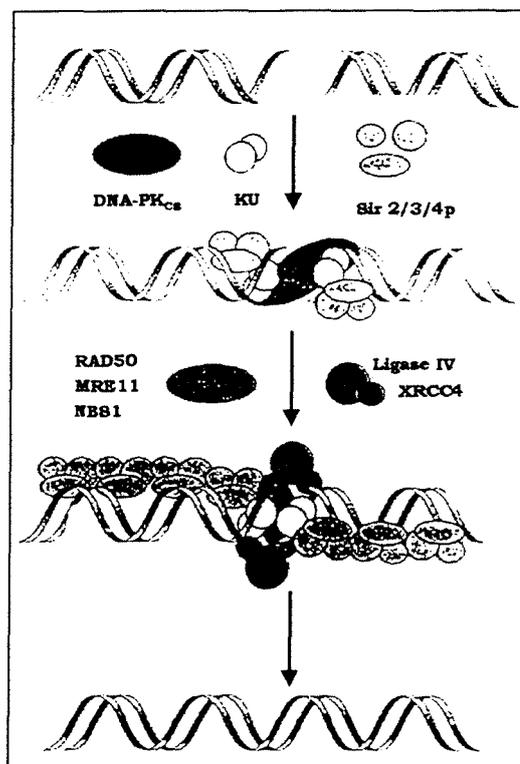


Figura 7. Modelo da reparação de DSB através de recombinação ilegítima (segundo Kanaar et al. 1998).

Enfim, as funções e interações entre os produtos gênicos envolvidos em processos recombinacionais têm importância em áreas além do simples interesse acadêmico na dinâmica do DNA. Alguns exemplos são a terapia gênica e a instabilidade genômica em casos de câncer. A recombinação é uma característica essencial para a integração plasmideal e implementação de genes de interesse, e estudos com recombinação induzida por DSBs têm sido direcionados para se otimizar as estratégias de terapia gênica baseadas neste processo. A instabilidade genômica aumenta significativamente as frequências de mutação, que podem levar à progressão de um processo tumoral. Portanto, estudos com mecanismos de recombinação, bem como a sua regulação, continuarão sendo muito importantes para a compreensão dos processos celulares básicos tanto para casos normais, quanto para as doenças. Além disso, servirão como parâmetro importante na análise dos riscos provenientes de exposição às radiações (Nickoloff e Hoeckstra 1998, Kannar et al. 1998).

2. Mutantes *ps*

Na busca da identificação de novos genes envolvidos na reparação de DNA, principalmente na reparação de pontes inter ou intra-cadeia, Henriques e Moustacchi (1980) isolaram uma nova classe de mutantes sensíveis à fotoadição de psoralenos mono (3-CPs) e bi-funcionais (8-MOP), os quais foram denominados mutantes *ps*.

Um grande progresso já foi feito na análise molecular destes genes e na caracterização fenotípica dos seus alelos mutantes. A tabela 5 apresenta as propriedades das proteínas codificadas pelos sete genes *PSO* caracterizados até o presente momento, bem como os principais fenótipos dos seus alelos mutantes.

O primeiro grupo de genes *PSO*, que vai do *PSO1* ao *PSO4*, pode ser considerado o que está envolvido predominantemente em reparação de pontes inter cadeia de DNA, também chamadas “interstrand cross-

links” (ICL). Já o segundo grupo de genes, do *PSO5* ao *PSO7*, caracteriza-se preferencialmente por reparar lesões induzidas por psoralenos monofuncionais e agentes que produzem estresse oxidativo na célula (Henriques e Brendel 1990, Henriques et al. 1997).

Tabela 5 Propriedades das proteínas codificadas pelos genes *PSO* e os fenótipos dos seus alelos mutantes^a

Gene	Peso molecular da proteína (kDa)/ Função	Fenótipo do mutante
<i>PSO1/REV3</i>	173; polimerase translesão putativa	Sensível à radiação e a agentes mutagênicos químicos, baixa mutabilidade
<i>PSO2/SNM1</i>	72; desconhecida	Sensível a todos os tratamentos que induzem pontes intercadeias no DNA
<i>PSO3</i>	Desconhecida	Recombinação e mutabilidade induzida diminuída; células não atingem à fase estacionária de crescimento
<i>PSO4/PRP19</i> (essencial)	56.7; proteína associada à splisossoma	Sensível a agentes mutagênicos, não apresenta recombinação mitótica, apresenta baixa mutabilidade e defectivo em esporulação
<i>PSO5/RAD16</i>	91.3; DNA helicase	Sensível à UV e a danos oxidativos
<i>PSO6/ERG3</i>	43; ergosterol desaturase	Sensível a danos oxidativos
<i>PSO7/COX11</i>	28; associa-se ao complexo citocromo-oxidase	Petit (mutação nuclear) células sensíveis a 4-NQO em fase de crescimento

^a Segundo Henriques et al. (1997).

2.1 Características fenotípicas, bioquímicas e genéticas do primeiro grupo de genes *PSO*: *PSO1* à *PSO4*

O gene *PSO1* é alelo ao gene *REV3* (Cassier-Chauvat and Moustacchi 1988) e os seus alelos mutantes são sensíveis a uma série de agentes genotóxicos, como radiação UVC, raios X, agentes alquilantes mono e bi-funcionais e psoralenos fotoativados (Moustacchi 1988, Henriques and Brendel 1990, Henriques et al. 1997). Mutantes *psol1/rev3* conferem um fenótipo antimutador, assim como as frequências de mutação de defasagem de quadro de leitura ("frameshift") e de mutação para frente ("forward") induzidas por UVC, também são extremamente reduzidas (Henriques et al. 1997).

A proteína codificada pelo gene *PSO1/REV3* parece ser uma DNA polimerase translesão, pertencente a classe delta das DNA polimerases de levedura. Porém, ela não é essencial para a reparação pós-replicativa para danos induzidos por UV, nem para a reparação por excisão de bases. Argumenta-se que a proteína Rev3 esteja envolvida apenas com a síntese de DNA translesão, processando diferentes formas de lesões espontâneas ou induzidas de DNA na levedura, especialmente quando a reparação livre de erros não está operando (Morrison et al. 1989, Henriques et al. 1997).

O gene *PSO2* é alelo ao *SNM1* (Cassier-Chauvat e Moustacchi 1988) e células mutantes para qualquer um desses alelos são especificamente sensíveis a todos os agentes mutagênicos bi ou polifuncionais que produzem quantidades substanciais de pontes intercadeias no DNA, como por exemplo, mustardas nitrogenadas e sulfúricas e seus derivados e psoralenos fotoativados. Entretanto, são resistentes a agentes alquilantes monofuncionais, como o MNNG (nitrosoguanidina), ou UV-mimético 4-NQO (1-óxido de 4-nitroquinolina) (Ruhland et al. 1981, Brendel e Ruhland 1984, Henriques e Brendel 1990, Henriques et al. 1997). Dependendo do tipo de mutagênico usado, a mutagênese e a recombinação mitótica

induzidas podem ser totalmente ou parcialmente bloqueadas (Henriques e Brendel 1990)

A função da proteína codificada pelo gene *PSO2/SNM1* ainda é desconhecida, mas sabe-se que a mesma possui um motivo de “zinc finger”, localizando-se no cromossoma XIII e não é essencial para a viabilidade celular (Henriques et al. 1997). A análise bioquímica de reparação de DNA no mutante *ps02-1/snm1* mostrou que o mesmo é capaz de incisar as pontes inter-cadeias induzidas por psoralenos fotoativados e mustardas nitrogenadas, mas não restitui DNA de alto peso molecular, sugerindo então um bloqueio na etapa pós-excisão (Henriques et al. 1997).

O alelo mutante *ps03-1* confere sensibilidade ao tratamento com psoralenos fotoativados mono (3-CPs) e bifuncionais (8-MOP), é levemente sensível à radiação UVC, a mustardas nitrogenadas mono e bifuncionais (HN1 e HN2, respectivamente), mas é resistente à radiação gama. Esse mutante também é parcialmente defectivo na mutação reversa induzida e na mutação para frente (Moustacchi et al. 1983, Henriques e Brendel 1990, Henriques et al. 1997). Recentemente, mostrou-se que *ps03-1* é sensível à paraquat, que gera ânions superóxido, à H_2O_2 , à cloreto de cádmio e à formaldeído, sugerindo então que *ps03-1* é defectivo na reparação de lesões produzidas por estresse oxidativo (Henriques et al. 1997, Brendel et al. 1998). Brendel et al. (1998) mostraram que alguns dos fenótipos de sensibilidade aos agentes mencionados acima estava ligado aos baixos níveis de glutathiona presentes no mutante *ps03-1*, uma vez que descobriu-se que a própria linhagem selvagem *N123*, da qual todos os mutantes *ps0* foram derivados, com exceção do *ps04-1*, possuíam uma mutação no gene *GSH1*, o qual codifica para a enzima g-glutamilcisteína sintetase (Ohtake e Yabuuchi 1991). Quando o mutante *ps03-1 gsh1-leaky* foi transformado com o gene *GSH1*, houve complementação dos fenótipos de resistência para MNNG, de sensibilidade à cádmio e formaldeído e de instabilidade mitocondrial. Entretanto, as sensibilidades para UVC,

psoralenos fotoativados, H₂O₂ e paraquat permaneceram, assim como a baixa frequência de mutabilidade e conversão gênica, induzidas por UVC (Brendel et al. 1998).

A construção de duplas mutações de *pso3-1* com os mutantes *rad*, revelou uma interação epistática do mesmo com *rad3-15* e *pso2-1* para sensibilidade à 3-CPs e 8-MOP + UVA, indicando assim um papel do *PSO3* na via de excisão-ressíntese, ou seja, na via RAD3.

Keszenman et al. (1994) mostraram que o choque térmico (38°C) induz um aumento da sobrevivência e diminuição da mutagênese induzida especificamente para 8-MOP + UVA no mutante *pso3-1*, protegendo também contra o efeito letal da hipertermia (50°C). Dessa forma, a proteção conferida pelo choque térmico é específica para o agente mutagênico ou para um determinado tipo de lesão de DNA no mutante *pso3-1*, servindo então para canalizar intermediários de reparação para a via livre de erros (Keszenman et al. 1994).

O gene *PSO3* ainda não foi clonado, portanto a função desta proteína ainda está bastante especulativa. Acredita-se que, pelo fato da mutação ter sido isolada pelo fenótipo de deficiência em reparação, associado ao seu papel no estresse oxidativo e recombinação mitótica, principalmente conversão gênica (Meira et al. 1994), ela tenha um papel entre reparação de DNA e metabolismo cromossômico.

O mutante *pso4-1* era chamado originalmente de *xr9*, pois havia sido isolado através da sua moderada sensibilidade a raios X (Benaten e Beam 1977). Por apresentar uma elevada sensibilidade a 8-MOP + UVA ele foi redefinido, posteriormente, como sendo *pso4-1* (Henriques et al. 1989). O fenótipo de mutabilidade pleiotrópica deste mutante torna-o semelhante ao mutante *recA* de *E. coli*. Linhagens diplóides homozigóticas de *pso4-1* apresentam uma taxa de esporulação extremamente baixa (<1%). A análise de epistasia para sensibilidade a 8-MOP + UVA mostrou que o gene *PSO4* encontra-se na via de reparação recombinacional RAD52 (Tabela 1, Morais et al. 1996, Henriques et al. 1997).

A clonagem de *PSO4* constatou seu alelismo com *PRP19*, que codifica uma proteína associada a esplissossoma e é essencial para a viabilidade de linhagens haplóides de levedura (Cheng et al. 1993, Grey et al. 1996). Acredita-se que a proteína Pso4/Prp19 esteja associada com, pelo menos, dois complexos proteicos distintos na célula: um envolvendo processamento de mRNA e outro na reparação recombinacional (Henriques et al. 1997).

Recentemente, descobriu-se que a proteína Prp19 interage *in vitro* com Snt309, uma outra proteína associada ao mesmo complexo de Prp19 e que pode estar envolvida na modulação das interações de Prp19 com os outros componentes do complexo de Prp19 ou do splissossoma (Chen et al. 1998). Ao contrário de Prp19, a proteína Snt309 não é indispensável para a viabilidade celular.

A caracterização fenotípica e análises epistáticas entre os mutantes *pso1* à *pso4* e os mutantes *rad*, envolvidos nas vias RAD3, RAD6 e RAD52, mostraram que *PSO2* e *PSO3* pertencem ao grupo de epistasia RAD3, enquanto que *PSO1* e *PSO4* pertencem à via RAD6 e RAD52, respectivamente. O fato de todos os mutantes *pso* apresentarem deficiência na mutabilidade e recombinação induzidas após o dano com o psoraleno 8-MOP + UVA, sugere que os genes *PSO* controlam uma via de reparação recombinacional sujeito a erro, específica para lesões de pontes inter-cadeias produzidas por 8-MOP fotoinduzido, onde a DNA polimerase translesão Pso1/Rev3 estaria processando os intermediários de reparação produzidos pelas proteínas Pso2, Pso3 e Pso4.

2.2 Características fenotípicas, bioquímicas e genéticas dos genes *PSO5*, *PSO6* e *PSO7*

A clonagem do mutante *pso5-1*, comprovou que o gene é alelo ao *RAD16* (Paesi-Toresan et al. 1995), o qual está envolvido na reparação preferencial de excisão de nucleotídeos de lesões de DNA induzidas por

UV em fitas não transcritas (Bang et al. 1992, Schild et al 1992), conforme já mencionado anteriormente na seção 1.2.1.3 .O mutante *pso5-1* confere sensibilidade moderada à radiação UVC e é sensível ao psoraleno monofuncional 3-CPs + UVA, e a agentes que aumentam o estresse oxidativo da célula, como H₂O₂ e paraquat (Paesi-Toresan et al. 1995). Além disso, esse mutante também é sensível a substâncias UV-miméticas, como 4-NQO, e a agentes alquilantes, como HN1 e HN2, apesar de sua frequência de mutação induzida ser igual à linhagem selvagem, após o tratamento com esses agentes (Querol et al. 1994).

O mutante *pso6-1* é bastante sensível à paraquat e H₂O₂, agentes que aumentam o estresse oxidativo da célula, e somente em fase estacionária de crescimento é sensível à 3-Cps + UVA, assim como o *pso5-1* (Querol et al. 1994). A clonagem deste gene revelou alelismo com o gene *ERG3* (Schmidt et al. 1999), o qual supostamente não está envolvido em reparação de DNA. A proteína Erg3 é a enzima esterol D-5 desaturase, envolvida na biossíntese do ergosterol (Smith e Parks 1993). Desta forma, a sensibilidade deste mutante à 3-CPs fotoativado deve-se ao fato das proteções anti-oxidantes estarem defectivas na célula, uma vez que o 3-CPs causa sua letalidade também via um mecanismo dependente de oxigênio singlet (Sage et al. 1989, Averbek et al. 1992, Schmidt et al. 1999). O alelismo encontrado entre os genes *PSO6* e *ERG3* sugere uma possível função do ergosterol na proteção dos componentes celulares aos danos oxidativos causados por espécies ativas de oxigênio como, por exemplo, os radicais peróxido, superóxido e hidroxila (Schmidt et al. 1999).

Assim como todos os outros mutantes deste grupo dos *pso*, (o *pso5-1* e *pso6-1*), o mutante haplóide *pso7-1* também confere sensibilidade à 3-CPs + UVA, e esse efeito desaparece quando na presença de azida sódica, um agente que impede a formação do oxigênio singlet (Querol et al. 1994). Isso indicaria o envolvimento do gene *PSO7* na reparação de danos oxidativos ao DNA. O mutante *pso7-1* também é sensível à paraquat, H₂O₂ e, em fase de crescimento, à HN1 e 4-NQO,

mas é tão sensível quanto à linhagem selvagem aos agentes HN2 e UVC. (Querol et al. 1994, Pungartnik et al. 1999).

A clonagem do gene *PSO7*, através da complementação do seu fenótipo de sensibilidade à 4-NQO, mostrou que este gene é alelo ao *COX11* (Pungartnik et al. 1999), o qual codifica uma proteína de membrana interna mitocondrial, sendo responsável pela última etapa da associação do complexo citocromo-oxidase (Tzagoloff et al. 1990). Portanto, este gene estaria envolvido com metabolismo respiratório celular e não diretamente em reparação de DNA. Dessa forma, a sensibilidade dos mutantes *pso7/cox11* a agentes genotóxicos deve estar ligada a incapacidade desses mutantes em neutralizar eficientemente as espécies reativas de oxigênio que são formadas durante a metabolização destes agentes, gerando lesões no DNA (Pungartnik et al. 1999).

Enfim, a caracterização fenotípica e molecular dos mutantes *pso* tem dado uma grande contribuição no estudo de reparação de lesões estáveis do DNA, especificamente das pontes inter e intra cadeia formadas pelas adições de psoralenos fotoativados aos resíduos de timina. Ensaios bioquímicos com as proteínas codificadas por esses genes serão de grande valia para o entendimento da função das mesmas e na compreensão das várias etapas da reparação de lesões fotoinduzidas por psoralenos também em humanos.

3. Sistema Di-híbrido

O estudo de interações proteicas tem se tornado cada vez mais importante, uma vez que eles formam a base de uma grande variedade de processos biológicos, incluindo replicação, transcrição, secreção, transdução de sinal e metabolismo. A identificação de proteínas que interagem entre si compreende um aspecto essencial para a elucidação da regulação e função de uma determinada proteína. Os métodos bioquímicos tradicionais utilizados para o estudo de interação proteína-

proteína apresentam como desvantagem maior o fato da interação ser vista apenas como uma banda que apresenta uma determinada mobilidade num gel de poliacrilamida. O processo que compreende a purificação dessas bandas até a clonagem dos seus respectivos genes é bastante trabalhoso e requer muito tempo, uma vez que envolve métodos que vão desde a purificação de uma quantidade suficiente de proteína para fins de seqüenciamento e produção de anticorpos, até a triagem com uma biblioteca para o gene correspondente (Bartel e Fields 1997, Drees 1999).

O sistema di-híbrido foi desenvolvido inicialmente por Fields e Song (1989), modificado por Chien et al. (1991) e compreende um ensaio genético na levedura *Saccharomyces cerevisiae* que permite estudar proteínas que interagem fisicamente *in vivo*. Esse método pode ser utilizado no estudo de domínios ou resíduos importantes para a interação entre duas proteínas (Li e Fields 1993) e, apesar de ser um ensaio genético na levedura, ele possibilita também que se estude a interação entre proteínas de diversos outros organismos.

Esse sistema baseia-se na propriedade de que muitos ativadores de transcrição de eucariotos possuem pelo menos dois domínios funcionais distintos, um que direciona a ligação a seqüências específicas de DNA e outro que ativa a transcrição. (Keegan et al. 1986; Hope e Struhl 1986). Essa estrutura modular é melhor ilustrada por experimentos em levedura que mostram que domínios de ligação ao DNA ou domínios de ativação podem ser trocados de um fator de transcrição para o outro e reter a sua função. Por exemplo, quando o domínio de ligação ao DNA do fator de transcrição de levedura Gal4 é trocado pelo domínio de ligação ao DNA do repressor bacteriano *LexA*, a proteína híbrida resultante ativa a transcrição de genes repórteres contendo sítios de ligação adjacentes à *LexA* (Brent e Ptashne, 1985). Da mesma forma, quando o domínio de ligação ao DNA do Gal4, que por si só não é capaz de ativar a transcrição, é fusionado a domínios de ativação de outras proteínas, as proteínas híbridas resultantes ativam a

transcrição de genes repórteres com sítios de ligação adjacentes à Gal4 (Ma e Ptashne, 1987; Sadowski et al. 1988; Chasman et al. 1989). Para que a ativação da transcrição ocorra é necessário que haja uma ligação covalente entre os domínios de ligação ao DNA e de ativação (Ma e Ptashne 1987).

Fields e Song (1987) fusionaram a proteína de levedura Snf1 ao fator de ligação ao DNA Gal4 e a proteína Snf4 ao fator de ativação da transcrição. Se Snf1 e Snf4 interagissem, elas fariam com que os domínios de ligação ao DNA e de ativação também se ligassem, fazendo com que as proteínas híbridas ativassem a transcrição do gene repórter lacZ. Dessa forma, a interação entre Snf1 e Snf4 era medida através da produção de beta-galactosidase. O sucesso desse experimento fez com Fields e Song (1987) propusessem a clonagem de cDNAs codificando proteínas que interagissem com uma determinada proteína em estudo. O modelo proposto por estes autores determina que uma proteína conhecida é fusionada ao domínio de ligação ao DNA de Gal4 e uma biblioteca de cDNA é fusionada ao domínio de ativação. A transcrição de um gene repórter é ativado na levedura se houver a interação entre a proteína em estudo e a(s) proteína (s) codificada (s) pelo cDNA fusionado ao fator de ativação da transcrição.

Baseado nessa sugestão, diversos laboratórios do mundo inteiro vêm desenvolvendo variações do sistemas di-híbrido (Chien et al. 1991, Dalton e Treisman 1992, Durfee et al. 1993, Gyuris et al. 1993, Vojtek et al. 1993, Vidal et al. 1996, Vidal 1997, 1999 , revisado por Bartel e Fields 1997 e por Drees 1999), sendo que todos eles apresentam três componentes básicos essenciais: vetores de levedura para a expressão de uma proteína conhecida fusionada a um domínio de ligação ao DNA, vetores de levedura que direcionam a expressão de proteínas codificadas por um cDNA fusionado ao domínio de ativação da transcrição e genes repórteres de levedura que contêm sítios de ligação para o domínio de ligação ao DNA. O método do di-híbrido utilizado neste trabalho foi o chamado "interaction trap".

3.1 Características do Método “Interaction Trap”

O método “interaction trap” é uma modificação do sistema híbrido, desenvolvido por Gyuris et al. (1993) e Zervos et al. (1993), que consiste basicamente de três componentes:

1º- utiliza um vetor de expressão da proteína de interesse fusionada a *LexA*. Essa fusão é chamada de “bait”.

2º- utiliza uma linhagem de levedura contendo dois genes repórteres: um deles é o gene *LEU2* de levedura, o qual codifica para o aminoácido leucina, e que contém suas seqüências regulatórias substituídas por operadores *LexA*. A transcrição de *LexA*-operador-*LEU2* (*LexAop-LEU2*) pode ser medida pela habilidade da linhagem em crescer na ausência de leucina, que requer o produto do gene *LEU2*. Esse gene *LexAop-LEU2* é integrado no cromossoma da levedura. O outro gene repórter é o *LacZ*, que proporciona um segundo ensaio para a ativação do “bait” e das proteínas ligadas ao fator de ativação da transcrição que interajam com o esse “bait”, assim como possibilita uma análise quantitativa sobre a interação.

3º- utiliza um plasmídeo contendo o banco de cDNA, que direciona a expressão condicional de proteínas codificadas por esse cDNA e que contém três domínios fusionados no seu N-terminal: um sinal de localização nuclear (SV40), um domínio de ativação da transcrição, o B42 derivado de *E. coli*, o qual é considerado um moderado ativador de transcrição em levedura, e possui também um “epitopo tag” de hemaglutinina (HA), que permite a verificação da expressão da proteína de fusão por imunoblotting com o anticorpo HA. A proteína codificada por esse cDNA é expressa sobre o controle do promotor da levedura *GAL1*, o qual é induzido por galactose e reprimido por glicose.

A representação esquemática do método “interaction trap” está ilustrada na Figura 8. A proteína “bait” é expressa constitutivamente. Ela liga-se a operadores de *LexA* antes dos genes repórteres *LEU2* e *lacZ*, mas não é capaz de por si só ativar a transcrição dos mesmos. A

proteína codificada pelo cDNA fusionado ao fator de ativação da transcrição é expressa constitutivamente sobre o controle do promotor *GAL1*. Em meio contendo glicose, o promotor *GAL1* é reprimido e portanto não há a expressão da proteína codificada pelo cDNA, nem tampouco o crescimento da linhagem de levedura na ausência de leucina. Quando as leveduras são crescidas em meio contendo galactose, as proteínas codificadas por esse cDNA são expressas, e aquelas que interagem com a proteína “bait”, ou seja, a proteína em estudo, vão ativar a transcrição dos genes repórteres *LEU2* e *lacZ*. Dessa forma, as células serão capazes de formar colônias em meio contendo galactose, na ausência do aminoácido leucina e formarão colônias azuis em placas de galactose contendo X-Gal.

Apesar de toda a sua praticidade, o método requer alguns cuidados essenciais para garantir um resultado com sucesso. Antes de se fazer a triagem do gene codificado pela proteína de interesse com o banco de cDNA ou uma biblioteca genômica, alguns controles devem ser feitos com o “bait”. É necessário que se verifique que essa proteína fusionada ao *LexA* é expressa e encontra-se no núcleo, e para isso existe o ensaio de repressão da transcrição (Bartel e Fields 1997). Um segundo ensaio importante, é verificar se a proteína “bait” não é capaz de por si só ativar a transcrição dos genes repórteres. Esse caso é comumente encontrado quando se trabalha, por exemplo, com fatores de transcrição, o que inviabiliza a triagem da proteína total com o banco. Neste caso, deve-se construir proteínas “truncadas”, ou seja, com alguns aminoácidos de seus domínios N ou C-terminal deletados (para revisão ver Bartel e Fields 1997).

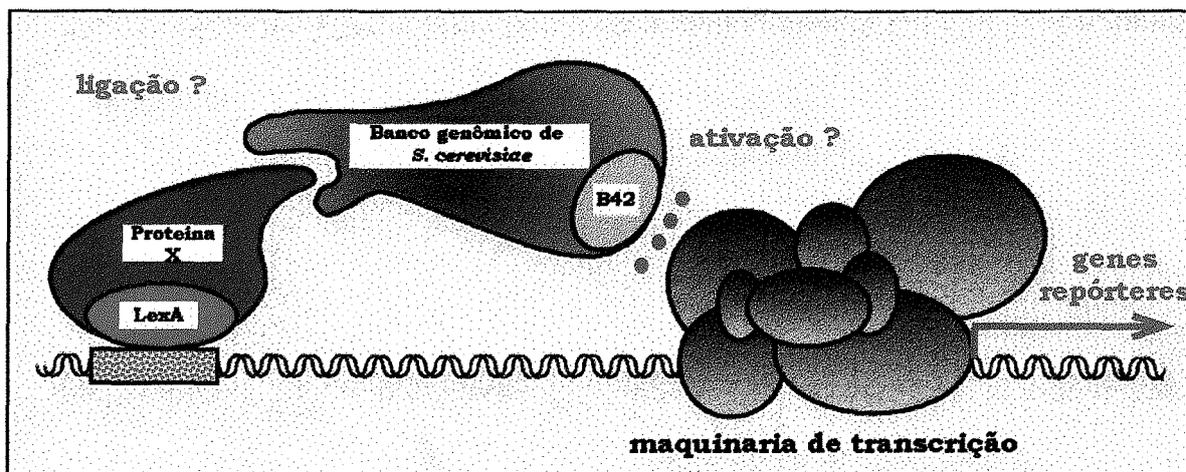


Figura 8. Representação esquemática do método "Interaction Trap".

3.4 Aplicabilidade do sistema di-híbrido

O sucesso do sistema di-híbrido deve-se ao fato de que muitas funções celulares acontecem através de interações proteicas. Um exemplo clássico é o processo complexo de iniciação da transcrição, que requer um conjunto ordenado de numerosos fatores de transcrição que interagem com a RNA polimerase e outras proteínas formando um "maquinário" proteico, responsável pelo início da transcrição (Guarente 1996, Tjian e Maniatis 1994). O total entendimento destes processos requer o conhecimento não só das proteínas que interagem, mas das relações (conexões) entre as mesmas.

Muitas novas proteínas estão sendo identificadas através de projetos de seqüenciamento em larga escala dos genomas de diversos organismos. Entretanto, apenas a seqüência destas proteínas não oferece muita informação sobre a sua função.

O sistema di-híbrido tem sido amplamente utilizado no estudo destas funções e relações proteicas. Atualmente, há uma série de projetos de interações proteicas em larga-escala, os quais são realizados

através do ensaio de acasalamento, também conhecido como "mating assay". Neste método, a proteína fusionada ao domínio de ligação ao DNA ("bait") e a proteína fusionada ao domínio de ativação ("prey") são expressas em duas linhagens haplóides de levedura de "mating type" opostos (a e α) que são cruzadas para se estudar a interação entre essas duas proteínas. O cruzamento ocorre quando as duas linhagens entram em contato, resultando numa fusão para formar uma linhagem diplóide. Desta forma, a interação pode ser determinada pela medida da ativação de um gene repórter do sistema di-híbrido na linhagem diplóide. Esse método está sendo utilizado tanto no estudo de interações entre complexos pequenos de proteínas (Finley e Brent 1994, 1995; Reymond e Brent 1995), quanto no estudo de mapeamento de conexões proteicas codificadas por um pequeno genoma (Bartel et al. 1996). Esses autores identificaram interações entre proteínas codificadas pelo genoma do bacteriófago T7, através do cruzamento entre duas bibliotecas, uma delas fusionada ao domínio de ligação ao DNA e a outra ao domínio de ativação, as quais foram expressas separadamente em linhagens de levedura de sinais de acasalamento opostos. A outra grande aplicação desta metodologia é na análise de doenças genéticas e de outras interações genéticas complexas, como no caso de genes que modificam a função de outros genes, mas que podem estar envolvidos no mesmo processo (Finley e Brent 1997).

Enfim, a técnica do di-híbrido, nas suas diversas formas de apresentação e aplicabilidade têm contribuído muito para o entendimento desse complexo campo de interações proteína-proteína. Certamente ele será de grande valia nos estudos de mapeamento do genoma humano, abrindo um enorme leque na análise de doenças genéticas e no estudo de drogas que interferem ou bloqueiam interações proteicas importantes.

OBJETIVOS

1. Objetivo Geral

Estudar a proteína de reparação de DNA Pso5/Rad16 da levedura *Saccharomyces cerevisiae*, buscando interações proteicas que possam auxiliar na melhor compreensão do mecanismo de ação desta helicase no NER de regiões silenciosas e não transcritas do genoma.

2. Objetivos específicos

- Utilizar a técnica do sistema di-híbrido para fazer o “screening” de *PSO5/RAD16* com um banco genômico de *S. cerevisiae*, com a finalidade de buscar candidatos a interatores com o produto deste gene.
- Confirmar a interação encontrada através de ensaios bioquímicos, como a técnica de imunoprecipitação e ensaios de beta-galactosidase.
- Construir linhagens simples e duplo mutantes, respectivos aos genes em estudo, afim de verificar uma interação genética, através de testes de sensibilidade a agentes genotóxicos.
- Verificar o papel da proteína interatora com Pso5/Rad16 em reparação de DNA.
- Tentar elaborar um modelo que demonstre o papel comum das proteínas interadoras.

CAPÍTULO I

**Interaction of the yeast Pso5/Rad16 and Sgs1 proteins:
implications for DNA repair and aging**

(Submetido à Molecular and General Genetics)

**Interaction of the yeast Pso5/Rad16 and Sgs1 proteins:
implications for DNA repair and aging**

Jenifer Saffi¹, Heidi Feldmann², Ernst-Ludwig Winnacker² and João A. P.
Henriques^{1#}

¹Centro de Biotecnologia/Depto. de Biofísica, UFRGS. Av. Bento
Gonçalves, 9500 - Campus do Vale , 91501-970 Porto Alegre, RS, Brazil

²Institut für Biochemie der Universität München, Feodor-Lynen-str. 25,
81377, München, Germany

Corresponding Author:

João A. P. Henriques

¹Centro de Biotecnologia and Depto. de Biofísica, UFRGS. Av. Bento
Gonçalves, 9500 - Campus do Vale , 91501-970 Porto Alegre, RS, Brazil

Telefone:(051) 316 6084

FAX: (051) 319 1079

e-mail: pegas@dna.cbiot.ufrgs.br

Abstract

The interaction trap method was used to isolate putative binding partners of Rad16/Pso5, a protein responsible for repair of silent DNA. One of the interactors found was Sgs1, a protein influencing the life span of *S. cerevisiae*. Using the same fusion proteins from the two-hybrid screening, we show evidence that both proteins also interact *in vitro*. We tested isogenic strains, containing mutant alleles of the two genes in single and double mutant combination, for phenotypic similarity. Life span in *sgs1Δ* single and *sgs1Δ rad16Δ* double mutants is about 40% of that of WT, and the *rad16/ pso5Δ* single mutant also had its life span reduced to 75%. Sensitivity to different mutagens whose lesions are poorly repaired in *rad16/pso5Δ* mutants was tested in *sgs1Δ* mutants. *sgs1Δ* conferred sensitivity to MMS and HN2 alkylating agents, H₂O₂ and was moderately sensitive to UV_{254nm} (UVC), 4-NQO but not to photoactivated psoralens 3-CPs and 8-MOP. An epistatic interaction between *rad16* and *sgs1* mutations after UVC, 4-NQO and H₂O₂ was observed. These results demonstrate that Sgs1 is not only involved in genome stability, somatic recombination and aging, but is also implicated, together with Pso5/Rad16, in the repair of specific DNA damage.

Keywords

Saccharomyces cerevisiae

RAD16

SGS1

DNA repair

aging

Introduction

Molecular cloning of the putative repair gene *PSO5* of *Saccharomyces cerevisiae* revealed its allelism to *RAD16* (Paesi-Toresan et al. 1995). At stationary phase of growth cells harbouring mutant allele *pso5-1* are moderately sensitive to UVC and to the UV mimeticum 4-nitroquinoline-1-oxide (4NQO). They are also cross-sensitive to photoactivated 3-carbethoxypsoralen (3-CPS+UVA), a treatment producing either 4'-5' furan-side pyrimidine monoadducts in DNA or singlet oxygen. The mutation *pso5-1* also confers sensitivity to other oxidative stress-enhancing chemicals, such as hydrogen peroxide and paraquat (Paesi-Toresan et al. 1995, Querol et al. 1994, Henriques et al. 1997).

PSO5/RAD16 encodes a 91.3 kD protein (790 amino acids) containing two putative zinc finger domains and several other helicase-typical regions that are also found in several other proteins like Snf2, Rad54 and Mot1 (yeast; Bang et al. 1992, Schild et al. 1992), Brm (*Drosophila*), and human Hsnf2, the latter being a homologue of Snf2 (Chiba et al. 1994). Yeast gene *RAD54* is involved in recombinational repair, while all of the other proteins have been implicated in transcriptional regulation. The N-terminal part of Rad16 contains a high number of charged amino acids, a feature also found in yeast repair proteins Rad4, Rad6, and Rad7 and it also contains a signal sequence for nuclear localization (Bang et al. 1992, Schild et al. 1992). Rad16 has been shown to function in a specific subpathway (global genome repair) of nucleotide excision repair (NER), which preferentially repairs pyrimidine dimers of the cyclobutane type (CPDs) in either the *HMLa* or the *HMLα* loci (Schild et al. 1992), in the silent regions of DNA, and in non-transcribed strands of active genes (Bang et al. 1992, Schild et al. 1992, Verhage et al. 1994). Rad16 interacts physically with Rad7, which is a protein also essential for global genome repair (Guzder et al. 1997). Yeast mutants *rad16* and *rad7* lack global genome repair, whereas their transcription-coupled repair is not affected (Verhage et al. 1994). Recently, Reed et al

(1998), have shown that Rad16, together with Rad7 may participate in postincision events during NER. This means, in contrast to a previous suggestion (Guzder et al. 1997), that such mutants can not efficiently execute the subsequent steps of oligonucleotide excision and repair synthesis. According to their results, associated with the fact that Rad16 is a member of SWI2/SNF2 superfamily of DNA-dependent ATPase (Bang et al. 1992), the Rad7-Rad16 complex may facilitate the remodeling of a protein-DNA structure generated by damage specific incision (possibly including the NER machinery) that is uniquely associated with NER of transcriptionally repressed regions and the nontranscribed strand of transcriptionally active genes. This remodeling presumably facilitates oligonucleotide excision and repair synthesis. Additionally, it has been shown that *rad7* and *rad16* mutants are proficient for NER-dependent incision in regions such as *HMLa* (Reed et al. 1998). While it appears safe to postulate a function of *RAD16/PSO5* in NER, there remains the question whether Pso5/Rad16 also interacts with proteins, not necessarily involved in DNA repair. Its partner Rad7 (NEF4 component) has been reported to physically interact with Sir3p, which is involved in the structural conformation of certain transcriptionally repressed regions of DNA (Paetkau et al. 1994).

In order to find possible binding partner of Pso5 we performed a two hybrid screen (Fields and Song 1989, Zervos et al. 1993) using the full-length *LexA-PSO5* DNA binding domain fusion gene as bait and a genomic *S. cerevisiae* library. Amongst different potential interactors we isolated a part of the coding region of the *SGS1* gene, which is a slow growth suppressor of *top3* mutants (Gangloff et al. 1994), as strongest interactor with the *PSO5* bait. In a phenotypic characterization of *sgs1* and *pso5/rad16* single and double mutant strains after treatments with UVC, 4-NQO, H₂O₂, MMS, HN2, and photoactivated psoralens 3-CPs and 8-MOP we were able to show that a *sgs1* mutant allele enhanced the cell's sensitivity to some mutagens suggesting that Sgs1 is involved in DNA repair processes in *S. cerevisiae*. Moreover, we have observed that

PSO5/RAD16 gene has some implication in yeast aging.

Materials and Methods

Saccharomyces cerevisiae Strains

The relevant genotypes of strains used in this work are listed in Table 1. *RAD16* disrupted and *SGS1* disrupted strains, *rad16Δ* and *sgs1Δ* were generated in *W303-1A* (Thomas and Rothstein 1989) by one step gene disruption (Rothstein 1983) of the wild-type *RAD16* and wild-type *SGS1* gene, respectively. The double mutant strain *rad16Δ sgs1Δ* was generated by disruption of the *SGS1* wild-type gene in a *rad16Δ* single mutant strain.

Table 1: *S. cerevisiae* strains used in this study

Strain	Relevant genotype	Source
<i>W303-1A</i>	<i>Mata ade2-1 can1-100 his3-11 leu2-3,112 ura3-1 trp1</i>	Thomas and Rothstein 1989
<i>rad16Δ</i>	<i>Mata rad16::URA3 ade2-1 can1-100 his3-11 leu2-3,112 ura3-1 trp1</i>	This study
<i>sgs1Δ</i>	<i>Mata sgs1::LEU2 ade2-1 can1-100 his3-11 leu2-3 ura3-1 trp1</i>	This study
<i>rad16Δsgs1Δ</i>	<i>Mata rad16::URA3 sgs1::LEU2 ade2-1 can1-100 his3-11 trp1 ura3-1 leu2-3, 112</i>	This study
<i>pso5-1</i>	<i>Mata his1-1</i>	Querol et al. 1994
<i>EGY194^a</i>	<i>Mata trp1 ura3 his3 LEU2::pLexAop1-LEU2</i>	Gyuris et al. 1993

^a Selection strain for the two hybrid screen

Media and growth conditions

Yeast strains were grown at 30°C in YPD liquid medium/plates containing 2% glucose, 1% yeast extract, 2% bacto-peptone or selective medium/plates supplemented with the appropriate nutrients (SD medium is 2% glucose/galactose, 0.67% yeast nitrogen base without amino acids, plus nutrients) (Sherman et al. 1986).

Disruption of *RAD16* and *SGS1* gene

Rad16 disrupted strains were constructed using plasmid pUB23, kindly provided by Dr. D. Bang (Bang et al. 1992). This plasmid contains *RAD16* gene disrupted with *URA3*. The plasmid was digested with *PvuI*. The DNA was used to transform the haploid strain *W303-1A* to *Ura*⁺ for one step gene disruption (Rothstein 1983).

Plasmid pDB20 (Yu et al. 1991), was used for *SGS1* disruption. The plasmid contains 4.3 kb of the *SGS1* gene cloned into the *NotI* side. This *NotI* fragment of *SGS1* was subcloned into plasmid pGEM4Z. The plasmid was cleaved with *NruI* 162 bp downstream of ATG, inside the coding region of *SGS1* gene. 3994 bp were removed by *SacII* digestion and replaced by the *LEU2* gene. The resulting plasmid was restricted with *SacI/BamHI* and the DNA was used to transform haploid strain *W303-1A* and *rad16Δ*. Disruption of *RAD16* and *SGS1*, respectively, was verified by Southern blot analysis (not shown), by testing for UVC and/or MMS sensitivity, and by life-span analysis.

***E. coli* strain and plasmids**

E. coli K-12 KC8 *pyrF::Tn5*, *hsdR*, *leuB600*, *trpC9830*, *lacD74*, *strA*, *galK*, *hisB436* was used for the rescue of yeast plasmids as described previously (Gyuris et al. 1993).

The plasmid pJG4-5 (Zervos et al. 1993), containing a genomic yeast library carries the B42 activation domain, the influenza virus HA1 epitope tag and the SV40 nuclear localization signal. This vector, together with *lexA*-fusion DNA binding vector pEG202 and the *lacZ* reporter plasmid

pSH18-34 were provided by Dr. Roger Brent.

Two-hybrid Screen

Construction of baits: plasmid pCP482 (Paesi-Toresan et al. 1995) containing a 5.4 kb insert of *PSO5/RAD16* gene was digested with *AflIII*, originating the fragment *PSO5/RAD16(AflIII)*, containing 2.62 kb of the gene. This fragment was subcloned into the *SmaI* cloning site of plasmid pGEM4Z (Promega, Biotec). To generate the 5' part of the gene a PCR starting at the ATG start codon (containing an *EcoRI* cloning site) and ending at the *RsrII* site of *PSO5/RAD16* was performed and the product of 244 bp was cloned into pGEM4Z containing *PSO5/RAD16(AflIII)* digested with *EcoRI* and *RsrII*. The resulting plasmid *PSO5/RAD16(ATG-AflIII)*-fulllength was digested with *EcoRI* and *BamHI*. The resulting fragment containing the complete open reading frame of the *PSO5/RAD16* gene was cloned into plasmid pEG202/*EcoRI/BamHI*, originating the pEG-*PSO5(ATG)* bait, that was also called *LexA-Pso5* (aa 1-790). A second bait was also constructed, lacking the first 82 aminoacids from the N-terminal part of *Pso5/Rad16* protein. The construct started at the *RsrII* site of *PSO5/RAD16* gene and was cloned into pEG202 digested with *EcoRI/BamHI*. The resulting plasmid was called pEG-*PSO5(RsrII)* or *LexA-Pso5* (aa 82-790). The correct orientation and in-frame fusions of *PSO5/RAD16* gene with the *LexA* DNA binding domain were verified by sequencing using a *LexA* DNA binding domain specific primer (5'-CAG AGC TTC ACC ATT GAA GGG -3'). Before starting the screening, 2 other assays were made with the baits. First, the repression assay (Brent and Ptashne 1984) to confirm that the *LexA* fusions proteins are synthesized in yeast and bind to the *LexA* operators. The expression of *LexA-Pso5*(aa 1-790) and *LexA-Pso5*(aa 82-790) proteins were also detected by Western blot using the polyclonal *LexA* antibody (Santa Cruz) (data not shown). Second, the baits were transformed into the mutant strain *pso5-1* (Table 1) and 5 transformants were checked for UVC sensitivity in order to check for the complementation of this phenotype.

The two hybrid screen: the two-hybrid screen was performed essentially as described by previously (Zervos et al. 1993, Gyuris et al. 1993). The plasmid pJG4-5, containing a yeast activation domain library, S288C, constructed by Paul Watt (Ausubel et al. 1996) was transformed into the reporter strain EGY194, carrying pEG-PSO5 (ATG) and pSH18-34, as described (Gietz and Schiestl 1995). Plasmids were isolated from yeast that survived selection for leucine prototrophy on galactose and showed *lacZ* expression on X-Gal-glucose plates.

β -galactosidase quantitative assay

The quantification of the β -galactosidase activity was assayed by a modification of Guarente's method (1983) (Guarente 1993). Three individual transformants were assayed after growth overnight in liquid SC lacking the appropriate nutrients, utilizing 2% raffinose as a carbon source. The cells were diluted and were grown to mid-log phase in 2% galactose for 4 hours. After centrifugation, they were resuspended in 500 μ l of Z buffer (100mM NaPO₄ at pH7.0, 10mM KCl, 1mM Mg(SO₄)₂, 38 mM β -mercaptoethanol). The OD₆₀₀ was determined for the washed cells, 25 μ l of 0.1% SDS was added to cell suspension and mixed vigorously for 15 sec, followed by addition of 50 μ l of chloroform with repeated vortexing. After incubation for 15 min at 30°C, 0.2 ml of ONPG (4 mg/ml) stock) was added, and the reaction was incubated at 30°C until a yellow color began to appear, or for 15 min after which 0.4 ml of 1.0 M Na₂CO₃ was added to terminate the reaction. The cells were centrifuged for 5 min at 2.500 rpm and the OD₄₂₀ and OD₅₅₀ were determined. Basal β -galactosidase activity was measured by grown on glucose liquid cultures. The activity of β -galactosidase in Miller units was calculated by use of the formula Units= 1000 x [(OD₄₂₀) - (1.75 x OD₅₅₀)] / (volume) (time) (OD₆₀₀).

Immunoprecipitation

This was performed essentially as described (Wittenberg and Reed 1988, Gyuris et al. 1993). Strain EGY194 was transformed with the bait

plasmids encoding *LexA*-tagged Pso5/Rad16 and B42^{AD}-Sgs1(aa 421-972), encoding HA-tagged Sgs1 (aa 421-792). The cells were grown overnight in liquid SC lacking the appropriate nutrients, utilizing 2% raffinose. When the OD₆₀₀ was approximately 1,0 2% galactose was added to the cultures that were grown for further 4 hours. Cells extracts were prepared as described (Wittenberg and Reed 1988) and immunoprecipitations were carried out using anti-*LexA* goat polyclonal antibody (Santa Cruz). Western blots were probed with the 12CA5 anti-HA monoclonal antibody, using standard techniques (Ausubel et al. 1996).

Mutagen Treatments

Psoralen+UVA: Two psoralens were used: monofunctional 3-carbethoxypsoralen (3-CPs) was kindly provided by E. Bisagni (Institute Curie, Orsay, France) and bifunctional 8-methoxypsoralen (8-MOP) from Sigma (St. Louis, USA). Yeast cells were grown in YPD medium to stationary phase ($1-2 \times 10^8$ cells/ml). Cells were harvested, washed and resuspended in sterile saline to 3×10^6 cells/ml and treated according to standard procedures (Querol et al. 1994).

MMS and 4-NQO: Different cell concentrations in stationary phase of growth were spread in triplicates on YPD plates that had been supplemented with either MMS (Sigma), varying from 0.005 to 0.02% or with 4-NQO (Sigma) at concentration from 0.1 to 0.4 μ M.

UVC: Cells were grown in YPD to exponential phase of growth ($1-2 \times 10^7$ cells/ml). They were harvested, washed and resuspended in sterile saline or water. Different cell concentrations were spread immediately in triplicate on YPD plates and after drying irradiated with UVC (Stratlinker, Stratagene) with doses ranging from 5 to 80 J/m².

Hydrogen peroxide (H₂O₂): a suspension of cells in exponential phase were treated with varying amounts of H₂O₂ (1-6 mM) at 30°C for 1h.

Bifunctional Nitrogen Mustard (HN2): sensitivity to HN2 (2-2'-dichloro N-methyldiethylamine hydrochloride)(Aldrich) was determined via the center well test, as described by Ruhland et al. (1981). YPD plates containing a round well in the center were used. A loop of a cell suspension in stationary growth was taken and plated from the border of the well to the border of the plate in one continuous strike. In the well, 0.2ml of HN2 aqueous solution at concentrations from 50-100 mM were placed. Impaired growth was measured as *mm* of growth inhibition.

After all treatments the plates were incubated for 3-5 days at 30°C. Survival data represent the average of at least three experiments.

Life Span Analysis

Life span was analyzed by methods described previously (Kennedy et al. 1994). Cells were taken from cultures in exponential phase of growth and plated on YPD. After an incubation at 30°C for 3 h the daughter cells were isolated as buds that had emerged from mother cells by moving them to non-inhabited regions of the plate using a Zeiss Micromanipulator. The life spans of these cells were determined by noting and removing all subsequent daughters they generated. Plates were incubated at 30°C during working hours and shifted to 4°C overnight.

Results

Isolation of a *SGS1* domain interaction with *PSO5/RAD16*

The yeast two hybrid system can be a successful approach to identify and analyze protein-protein interaction in vivo. We used the *LexA*-based system (Zervos et al. 1993, Gyuris et al. 1993) to screen a genomic library for proteins interacting with Pso5p. Plasmid pEG-*PSO5*(ATG), encoding an in-frame *LexA* DNA binding domain-Pso5 fusion protein was used to screen a genomic yeast library (Ausubel et al. 1996). 530,000 primarily obtained transformants were pooled and an aliquot of this pool was plated on selective medium containing galactose for induced expression of the activation domain fusion library. 370 clones able to express the *LEU2* reporter gene were picked and re-tested for induced expression of *LEU2*. Additionally we tested these clones for their ability to express *lacZ* as second reporter gene. We could thus isolate 14 clones growing on medium lacking leucine only in the presence of galactose and also showing β -galactosidase-induced blue color on Gal/X-gal media.

Library plasmids of these clones were isolated. After re-transformation into EGY194 containing the pEG-*PSO5*(ATG) and pSH18-34 reporter plasmids induced expression of the reporter genes was re-established, verifying once more the interaction of *LexA*-Pso5 fusion protein with the respective library encoded proteins. Inserts of positive library plasmids were sequenced. Out of 14 plasmids we identified 3 containing a genomic DNA fragment coding for the same part of the *SGS1* gene. The *SGS1* domain identified in this interaction trap screen coded for a 371 amino acid polypeptide (aa 421 to aa 792 of the total *SGS1* ORF encoding).

To ensure that this domain of Sgs1 specifically interacts with Pso5 we tested different false baits for activation of the reporter genes together with the isolated *SGS1* prey plasmid. There was no interaction of the *SGS1* prey-encoded fusion protein with 3 different "false baits" (from our baits collection), such as *LexA*-Pso4 (yeast Prp19 protein), shown in Table 2,

LexA-Primase and *LexA*-Pur (the last two are mammalian proteins). Moreover, we retransform *Sgs1*-prey with the truncated bait *LexA*-Pso5(aa 82-790) and we found practically the same interaction then that observed for the full-length *LexA*-Pso5(aa 1-790), which not excludes the possibility that this N-terminal part of Pso5/Rad16 protein is not essential for the interaction with *Sgs1*. Table 2 shows the induced specific expression of *lacZ* reporter gene in the presence of *LexA*-Pso5 baits and *Sgs1* prey proteins. Therefore, we conclude that interaction of Pso5 with the isolated *Sgs1* domain is specific.

SGS1 was originally isolated as a "slow growth suppressor" of topoisomerase 3 (*top3*) mutant strains (Watt et al. 1995). *Sgs1* has been shown to interact physically with Top2 and Top3 in the two hybrid system (Gangloff et al. 1994, Watt et al. 1995). The Top3 interacting domain of *Sgs1* is located within the N-terminal part of the protein (aa 1 to aa 500). The *Sgs1* domain (aa 421 to aa 792) interacting with Pso5 in our screen is overlapping with that identified to interact with Top2 (aa 432 to aa 724). It may be that this part of *Sgs1p* protein contains two protein-protein interaction domains.

Table 2. Interaction between Pso5/Rad16 and Sgs1

DNA-binding domain plasmid	Activation domain plasmid	Galactose	
		Leu	β -galactosidase activity ^a
<i>LexA-Gal4</i>	B42 _{AD}	+++	415
<i>LexA-Pso5</i> (aa 1-790)	B42 _{AD} - Sgs1 (aa 421-792)	+++	320
<i>LexA-Pso5</i> (aa 82-790)	B42 _{AD} - Sgs1 (aa 421-792)	+++	202
<i>LexA-Pso4</i>	B42 _{AD} - Sgs1 (aa 421-792)	-	<1
<i>LexA-Bicoid</i>	B42 _{AD}	-	<1

Plasmids that directed the synthesis of the DNA-binding domain and activation domain fusion proteins were introduced into EGY194. In addition to the LexAop-LEU2 reporter, the strain also harbored pSH18-40, a very sensitive LexAop-LacZ reporter. Basal β -galactosidase activity was measured by grown on glucose liquid cultures (not shown). pEG-*GAL4* bait contains the Gal4 transcription activator and was used as positive control; pEG-*PSO5* (ATG) and pEG-*PSO5*(RsrII) correspond to full-length and N-terminal truncated Pso5 baits, respectively; pEG-*PSO4* is a splicing Prp19 protein and was used as "false bait"; pEG-Bicoid bait contains residues 2-160 of the *Drosophila bicoid* gene product and was used as negative control.

^a Expressed in Miller Units. The values are averages from three transformants each assayed in duplicate in the presence of 2% galactose.

The Pso5/Rad16 protein interacts with Sgs1 *in vitro*

The Sgs1 domain (aa 421-792) tagged with a hemagglutinin (HA) epitope was expressed in EGY194 together with either *LexA*-Pso5(aa 1-790) or *LexA*-Pso5(aa 82-790) baits. Figure 1 shows that HA-tagged Sgs1 coimmunoprecipitated with both Pso5 full-length and Pso5 N-terminal truncated protein in the presence of 2% galactose. The interaction was not observed when cells were grown only in 2% glucose (data not shown). The empty plasmid pEG202, as well as the "false bait" *LexA*-Pso4, failed to immunoprecipitate with HA-tagged Sgs1.

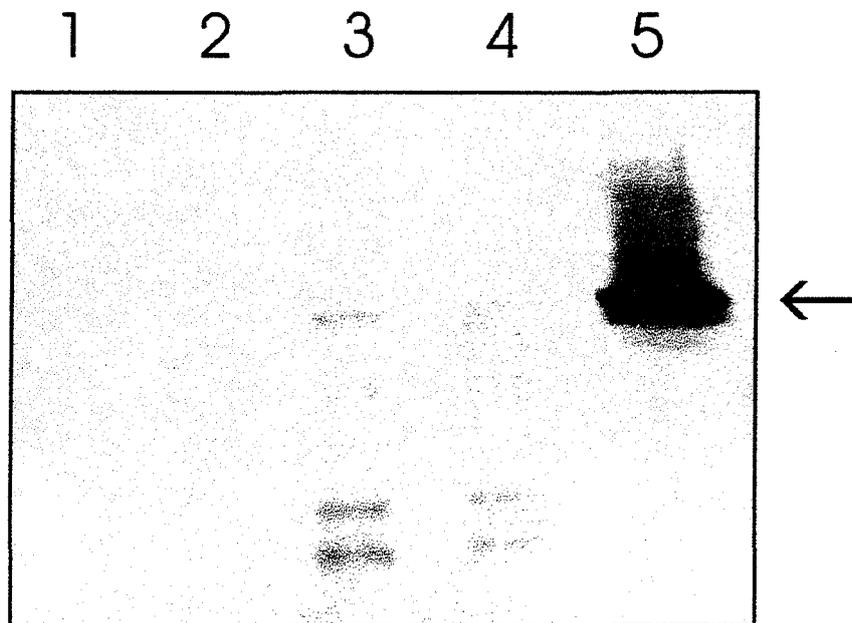


Fig.1 Coimmunoprecipitation of Pso5/Rad16p and Sgs1.

An autoradiograph of a Western blot with anti-HA monoclonal antibody (12CA5) of proteins immunoprecipitated using anti-*LexA* goat polyclonal antibody. The arrow indicates the Sgs1-HA tagged fusion protein at approximately 70 kDa. Extracts were prepared from 2% galactose cultures of EGY194 harbouring the following plasmids:

Lane 1-pEG202(*LexA*)+ pJG4-5 (B42_{AD})

Lane 2-*LexA*-Pso4 ("false bait")+ B42_{AD}-Sgs1

Lane 3-*LexA*-Pso5(aa 1-790) + B42_{AD}-Sgs1

Lane 4- *LexA*-Pso5(aa 82-790) + B42_{AD}-Sgs1

Lane 5- crude extract from EGY 194 harbouring B42_{AD}-Sgs1

Deletion of the *SGS1* gene affects *PSO5/RAD16* - dependent DNA repair

SGS1 gene has been identified originally as a slow growth suppressor of a top3 mutant strain that also suppresses the genomic instability of this strain (Gangloff et al. 1994). *PSO5/RAD16* gene is involved in nucleotide excision repair and is essential for global genome repair (Verhage et al. 1994). If interaction between Pso5/Rad16 and Sgs1 has any biological significance we might expect that mutations of the *SGS1* gene would affect the DNA repair phenotype of a *pso5/rad16* mutant. To test this assumption we constructed a set of isogenic yeast strains, containing *rad16Δ*, *sgs1Δ*, or both the *rad16Δsgs1Δ* deletions and determined their sensitivity towards several mutagenic treatments.

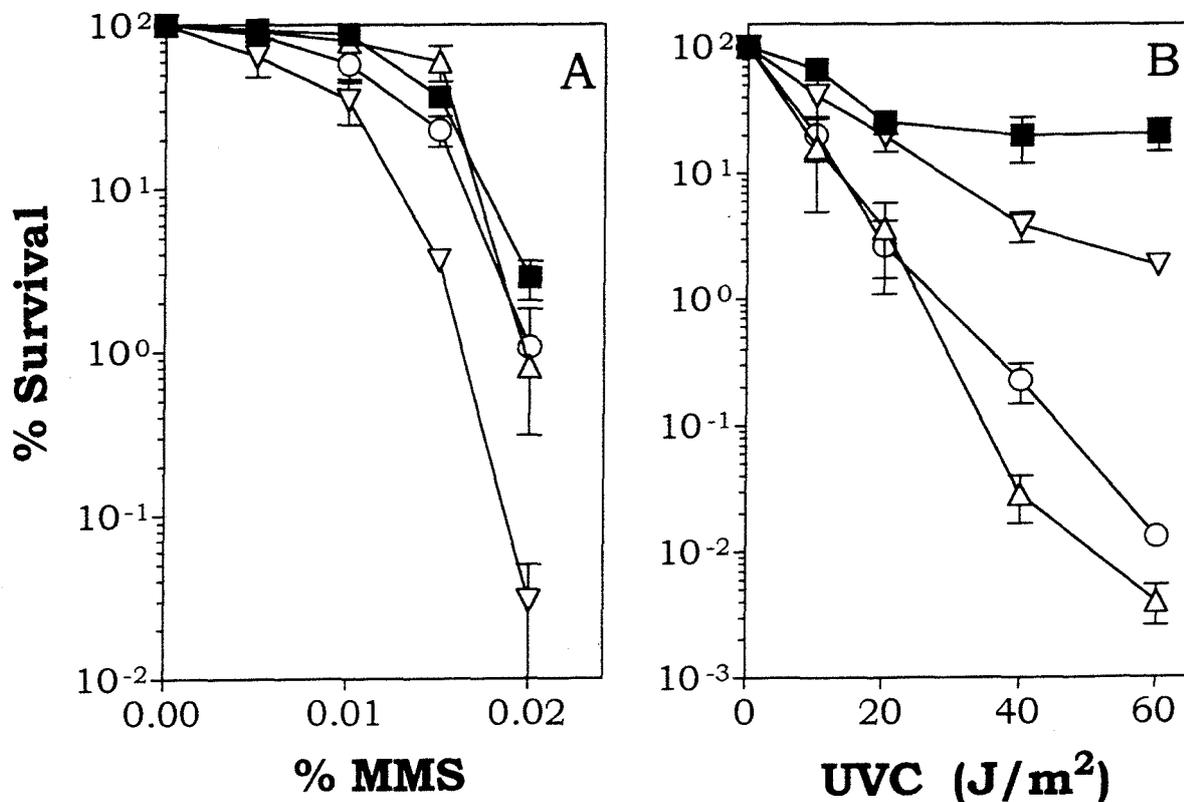
In Fig. 2A the data for survival after MMS treatment show that the *rad16Δ* strain is relatively resistant to MMS, compared with the wild-type strain whereas the *sgs1Δ* mutant has a lower survival by more than two orders of magnitude at 0.02% MMS. Interestingly, the double mutant *rad16Δ sgs1Δ* was significantly less sensitive to this treatment compared with the *sgs1Δ* single mutant, suggesting that *rad16Δ* mutation rescues part of the MMS sensitivity of the *sgs1Δ*.

Figure 2 panels B and E shows the results of UVC and 4-NQO, sensitivity-tests for the same set of mutants. For both treatments the double mutant *rad16Δsgs1Δ* displays a slightly decreased sensitivity compared with the more sensitive *rad16Δ* single mutant but is significantly more sensitive than *sgs1Δ* single mutant or the wild-type strain. This nearly epistatic interaction might indicate that both gene products function in a common pathway of repair of e.g. CPDs and 4-NQO UV-mimetic lesions. It is interesting to notice that *sgs1Δ* alone also conferred sensitivity to UVC and 4-NQO although not as significant as observed for the *rad16Δ* allele .

The *rad16Δ* mutant, allelic to *pso5-1*, confers, as previously observed (Querol et al. 1994), sensitivity to the photoactivated mono (3-CPs) and bifunctional (8-MOP) psoralens (Fig. 2C and 2F). The

photoactivated 8-MOP induces in DNA both monoadducts and intrastrand crosslinks, whereas the 3-CPs + UVA generates 1997 either 4'-5' furan-side pyrimidine monoadducts or singlet oxygen (Averbeck et al. 1992, Henriques et al. 1997). The *sgs1Δ* single mutant strain shows wild-type like resistance for both agents. The *rad16Δsgs1Δ* double mutant shows sensitivity to 3-CPs and 8-MOP+UVA comparable to that of the *rad16Δ* single mutant. These results suggest that Sgs1 is not involved in repair of monoadducts and interstrand DNA crosslinks photoinduced by psoralens and singlet oxygen generated by photoactivated 3-CPs.

Fig.2D clearly shows that *sgs1Δ* single mutant, as already seen for *pso5-1* mutant (Querol et al. 1994), is also sensitive to the oxidative agent H_2O_2 . The magnitude of this cytotoxic effect is even more pronounced in *sgs1Δ*. The double mutant *rad16Δsgs1Δ* presents practically the same sensitivity as *rad16Δ* mutant, suggesting also an interaction of epistatic type for H_2O_2 induced lesions.



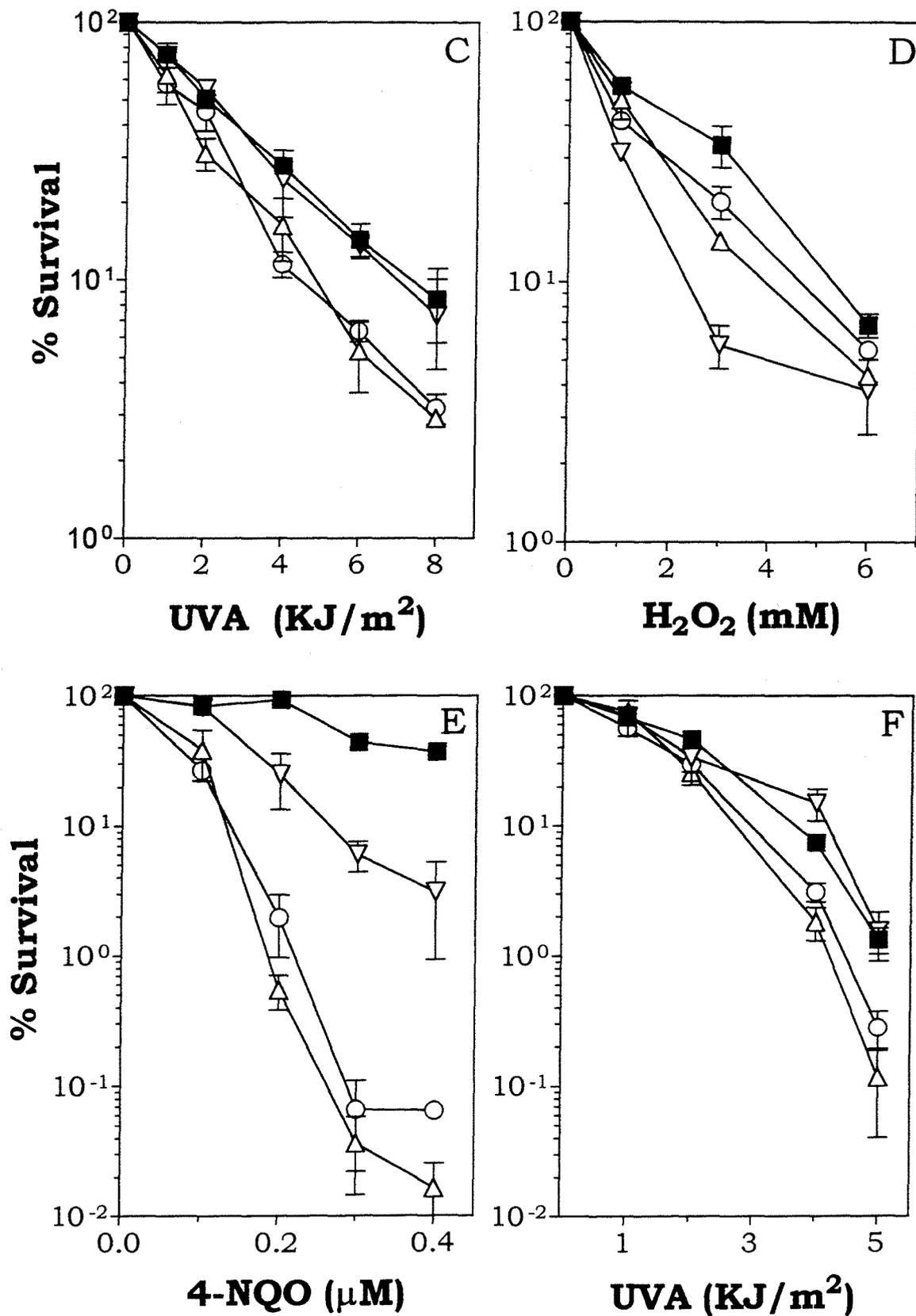


Fig.2 SGS1 is involved in yeast DNA repair.

Haploid wild type (■) and isogenic strains carrying a *rad16Δ* (Δ), *sgs1Δ* (∇) and *rad16Δsgs1Δ* (○) were assayed for their MMS (A), UVC (B), 3-CPs+UVA (C), H₂O₂ (D), 4-NQO (E) and 8-MOP + UVA (F) sensitivities (see Materials and Methods).

Fig.3 shows, as previously observed to *pso5-1* mutant (Querol et al. 1994), that *sgs1Δ* mutant is also sensitive to the HN2 bifunctional alkylating agent, which induces intrastrand cross-link in guanine DNA bases (cf. Henriques et al. 1997). The double mutant *rad16Δsgs1Δ* was more sensitive than the most sensitive single mutant *rad16Δ*. This suggests that *sgs1Δ* and *rad16Δ* mutants show a non-epistatic interaction for HN2 induced lesions.

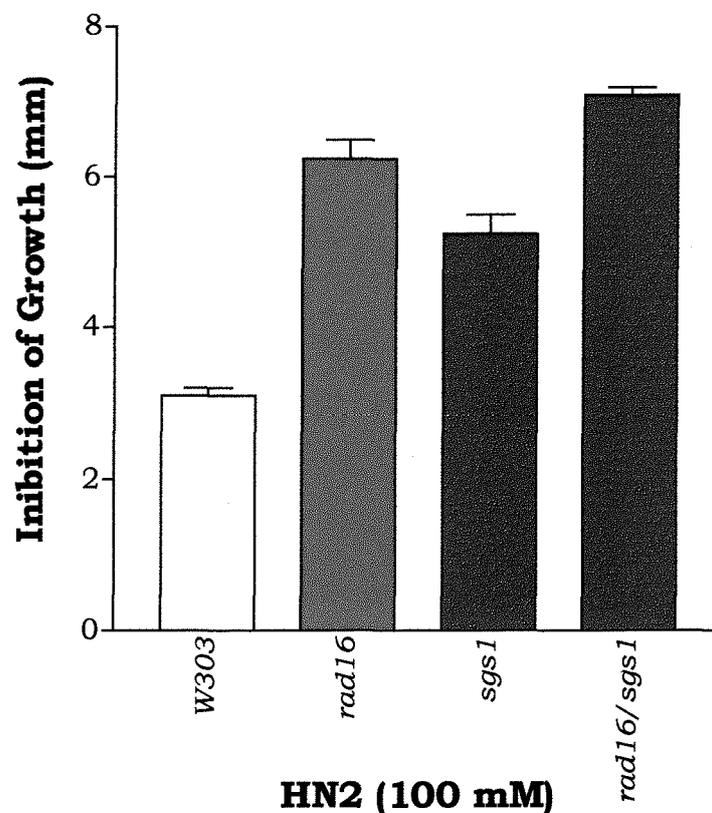


Fig. 3 *Sgs1Δ* is required for HN2 repair lesions.

Sensitivity to HN2 was determined via the center well test, using the same isogenic strains described in Fig.2. A loop of a cell suspension in stationary growth was taken and plated from the border of the well to the border of the plate in one continuous strike. In the well, 0.2 ml of 100 mM HN2 was placed. Impaired growth was measured as mm of growth inhibition.

Life span is not altered in *rad16Δsgs1Δ* double mutants

SGS1 has been shown to be involved in life span determination of yeast (Sinclair et al. 1997). Mutation of the *SGS1* gene result in a drastically reduced life span of about 40% of the wild-type (Fig. 4). Therefore, we tested the effect of a *rad16* mutation on life span in a wild-type and *sgs1* background. Figure 4 shows life span analysis for the different strains. Average life span of the *rad16Δ* single mutant is reduced by 6 generations compared to the wild type strain. This life span reduction is significant but not as drastic as observed for the *sgs1Δ* strain. Therefore, the *RAD16/PSO5* gene seems to be involved in life span determination. The *rad16Δ sgs1Δ* double mutant strain displayed a life span comparable to the *sgs1Δ* single mutant strain. This epistatic interaction of *rad16* and *sgs1* mutations suggest that *RAD16/PSO5* and *SGS1* share functions in the same pathway of life span control.

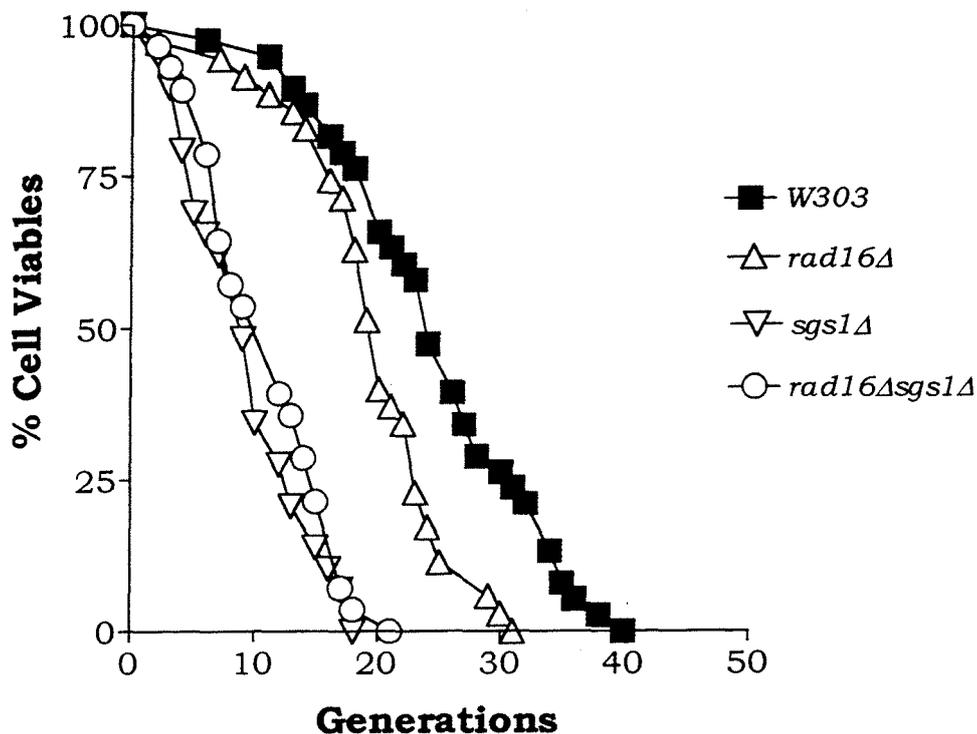


Fig. 4 *PSO5/RAD16* is implicated in yeast aging.

Life span analysis was performed by standard methods (see Materials and Methods). All mortality curves were generated from at least two independent experiments (Kennedy et al. 1994).

Discussion

The *PSO5/RAD16* gene of *S. cerevisiae* involved in nucleotide excision repair, especially in global genome repair is essential for the repair of the nontranscribed strand of active genes and of silent DNA regions in the genome (Bang et al. 1992, Schild et al. 1992, Verhage et al. 1994). Our interaction trap screen using the full-length *PSO5* gene as a bait and a genomic yeast library to find genes encoding proteins interacting with Pso5 yielded 14 positive clones. Amongst these we identified three plasmids containing the same DNA fragment coding for an internal part of the Sgs1 protein. The Sgs1 domain fused to the activation domain plasmid induced specific expression of the lacZ reporter gene in the presence of *lexA-Pso5*(aa 1-790) and *lexA-Pso5*(aa 82-790). This interaction was also confirmed by coimmunoprecipitation of HA-tagged Sgs1 with both Pso5 full length and Pso5 N-terminal truncated protein. *SGS1* was originally identified as an extragenic suppressor that suppresses both slow growth and the increased genomic instability of topoisomerase 3, *top3*, mutant strains. Sgs1 interacts physically with Top2 and Top3 in a Two Hybrid screen (Gangloff et al. 1994, Watt et al. 1995, Guarente 1996). The domain interacting with Top3 localizes in the N-terminal 500 aa of the Sgs1, but it has been shown that the C-terminal part of Sgs1 is essential for function in a *top3* mutant. The domain identified for Top2 interaction localizes between aa 432 and aa 724 of the Sgs1. In our screen, we identified a part of Sgs1 from aa 421 to aa 792 to interact with Pso5. This overlaps with the Top2 interacting region. Since we do not know what part of the isolated Sgs1 domain is really interacting with Pso5 or Top2, respectively, we can not exclude the existence of two different domains, each interacting with either one of the proteins. There are seven highly conserved helicase domains in the amino acid sequence of Sgs1 and this region displays homology with *E. coli* RecQ, and the human BLM and WRN proteins. BLM and WRN are defective in the cancer disorder Bloom's syndrome and the premature aging disorder Werner's

syndrome, respectively (Watt et al. 1995, Watt et al. 1996). Sgs1 displays a 3' - 5' helicase activity in vitro (Benett et al. 1998). This helicase activity is not essential for Sgs1 function in a top3 background (Lu et al. 1996). Rad16 contains seven helicase domains as well and shows high homology with Rad54 and Rad5, two putative helicase proteins involved in DNA repair and also with the transcription factors Snf2 and Mot1 (Bang et al. 1992, Schild et al. 1992).

The observed sensitivities of *sgs1* mutant to several mutagenic agents, i.e. UVC, MMS, 4-NQO, H₂O₂ and HN2, implies that *SGS1* gene product is involved in DNA repair (Fig.2). It thus shown similar function as the Rad12+ gene product of the fission yeast *rad12*, the null mutant of which is also sensitive to UV and γ radiation (Davey et al. 1998). Rad12+ is the homolog *BLM* and *SGS1*, and is identical to the recently reported *rhq1+* gene. In contrast to *pso5/rad16*, *sgs1* mutation does not show any sensitivity to photoactivated mono (3-CPs) and bi (8-MOP) functional psoralens. This implies that Pso5/Rad16 is involved in the repair of some DNA lesions different from those being a substrate for Sgs1.

Although *sgs1* mutant is highly sensitive to MMS treatment, *rad16 Δ* strain is relatively resistant to MMS and the double mutant *rad16 Δ sgs1 Δ* was significantly less sensitive to this treatment compared with the *sgs1 Δ* single mutant, suggesting that *rad16 Δ* mutation rescues part of the MMS sensitivity of the *sgs1 Δ* (Fig.2A). This result indicates that, in some way, Sgs1 and Pso5/Rad16 are necessary to process the MMS DNA lesion. If Sgs1 protein is missing the repair process may be initiated but cannot be completed without the activity of the interacting partner. This might result in a more severe damage for the cell than the original unrepaired lesion. Thus, considering that 3-methyladenine (3-MeA) MMS induced lesions block DNA replication having single-strand DNA ends (Xiao et al. 1996), it would be expected that Sgs1 might be able to recruit Pso5/Rad16 helicase and/or other proteins to process the damaged DNA, via post-replication (*RAD6* and *RAD18*) or recombination (*RAD50* and *RAD52*) pathways (Xiao et al. 1996). Alternatively, in the absence of Pso5/Rad16, Sgs1 could

recruit topoisomerases (Top2/Top3) or other proteins to act on. Otherwise, when both Sgs1 and Pso5/Rad16 protein are absent the MMS DNA lesions would be substrate for another DNA repair mechanism. Consistent with this idea, it has recently been shown that besides NER, the MMS DNA damage can be repaired by an association of the alkylation-specific base excision repair (Mag1 and Apr1) and the Rad1 and Rad10 recombination complex (Xiao et al. 1996).

For the bifunctional alkylating agent HN2, we have observed that *sgs1Δ* and *rad16Δ* mutants showed a nonepistatic interaction, indicating that the product of these genes act in different substrates. HN2 reacts primarily with guanines producing N7-guanine alkylation and inter/intra strand DNA crosslinks (c.f. Friedberg et al. 1995). As *rad16Δ* is HN2 sensitive (Fig. 3) and is not able to repair 8-MOP + UVA induced ICL in the silent locus *HMLα* (Meniel et al. 1995), we could speculate that Sgs1 protein is likely to be required to repair N7-guanine alkylation and/or intrastrand DNA crosslink induced by HN2. This hypothesis could be reinforced by the observation that *sgs1Δ* is defective in repair of CPDs (Fig. 2B), which are typical intrastrand DNA crosslinks.

The epistatic interaction observed between *sgs1* and *ps05/rad16* mutations after UVC, 4-NQO and H₂O₂ treatments, as well as for life span, demonstrates that both proteins are involved in the same repair pathway and that Pso5/Rad16 DNA repair protein is also implicated somehow in yeast aging. Disruptive mutation of *RAD16* reduces the average life span of the mutants significantly (Fig. 4). Interestingly, Rad7, (the Rad16 partner in NER), Rad1 and Rad26 do not show any reduction in life span (Park et al. 1999). Rad1 and Rad26 that also belong to NER, are involved in removing non-homologous single strand ends of a DSB and transcription-coupled repair, respectively. In addition, this is an evidence that not exclusively RAD52 DNA repair pathway (*RAD50*, *RAD51*, *RAD52* and *RAD57* gene products) (Park et al. 1999), which is involved in DSBs and homologous recombinational repair (c.f. Friedberg et al. 1995) plays a role in shortening of life span in yeast.

It has been proposed by Sinclair and Guarante (1997) that accumulation of extrachromosomal rDNA circles (ERCs) cause aging in yeast mother cells. The authors have also demonstrated that the accumulation of ERCs is more rapid in *sgs1* strains and this could be the cause for shorter life span of this mutant. Recently, it was shown that ERCs can be generated by homologous recombination in the rDNA (Park et al. 1999). Beside this, the same authors have shown that *rad52* mutant cells do not accumulate ERCs with age, but have a very short life span, that might be due the accumulation unrepaired DSBs in these mutants. Moreover, Sun et al. (1999) have proposed that the accumulation of rDNA circles in *sgs1* mutants may be due the lack of an appropriate unwinding activity, which lead to recombination. They have shown that Sgs1p helicase efficiently unwinds guanine-guanine (G-G) paired substrates, which are found in G-rich regions, like the telomeres and in the non-template strand of the rDNA. Indeed, the formation of G-G paired structure contributes to the genomic instability and hyperrecombination phenotypes characteristic of the *sgs1* mutants (Sun et al. 1999).

The physical and genetic interaction reinforced by epistasis analysis between *SGS1* and *RAD16* has suggested that Sgs1 helicase creates the structures that Rad16 helicase can act on.

Verhage et al. (1996) have shown that repair of induced CPDs in non-transcribed strands of rDNA is partly dependent on Rad7 and Rad16 proteins. More recently, Reed et al. (1998) have shown biochemical evidence that Rad7-Rad16 complex may facilitate the remodeling of a protein-DNA structure generated by damage specific incision (possibly including the NER machinery) that is uniquely associated with NER of transcriptionally repressed regions and the nontranscribed strand of transcriptionally active genes. This remodeling presumably facilitates oligonucleotide excision and repair synthesis. Additionally, it has been shown that *rad7* and *rad16* mutants are proficient for NER-dependent incision in regions such as *HMLa* (Verhage et al. 1994).

All these observations, taken together with the fact that both *rad16*

and *sgs1* mutants are epistatic after treatment with UVC, to 4-NQO, as well to H₂O₂, as well as for life span, lead us to propose that Sgs1 and Rad16, with its partner Rad7, may work together, after the incision step, in the rDNA containing either spontaneous or induced damage, remodeling the cromatine structure to facilitate the repair enzymes access, probably via RAD52 homologous recombinational repair, in order to avoid formation of DSB. It is interesting to notice that, like *rad16Δ* and *sgs1Δ*, *rad52Δ* and *sgs1Δ* also show an epistatic interaction for life span (Park et al. 1999). In addition, the interaction between Rad7 and Sir3 (Paetkau et al. 1994), which is involved in illegitimate recombination and DSB repair (Tsukamoto et al. 1997), could be another DNA repair alternative to the cell to avoid DSB in order to compensate the absence of homologous recombination.

In this paper we show that Rad16 and Sgs1 proteins genetically and physically interact. We suggest here that, besides the involvement of Sgs1 in genome stability, somatic recombination and aging (Gangloff et al. 1994, Watt et al. 1995, Sinclair et al. 1997), this protein is also implicated, together with Pso5/Rad16 in the repair of specific DNA damage. Moreover, Rad16 has a reduction in life span, indicating that NER has a small, but significant, contribution in aging.

Acknowledgments

We thank Dr. L. Guarente and D. Sinclair for help in life span experiment and to provide us the antibodies. We thank Drs. D. Bang, R. Brent and D. Sinclair for kindly provide the plasmids and strains and Dr. M. Brendel for critical reading the manuscript. We also thank Dr. Wolfgang Wendler for the great help during the two-hybrid screen. This work was supported by CNPq, FAPERGS and GENOTOX (Laboratório de Genotoxicidade/ UFRGS) and the travel grants by CNPq/DAAD and FAPERGS/DAAD.

References

- Ausubel F, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA and Struhl K. (1996) Current Protocols in Molecular Biology. 3rd. Ed., Supplement 33, John Wiley & Sons, Inc., USA.
- Averbeck D, Dardalhon M, Magaña-Schwencke N, Meira LB, Meniel V (1992) New aspects of the repair and genotoxicity of psoralen photoinduced lesions in DNA. *J Photochem Photobiol, B Biol* 14: 47-63.
- Bang DD, Verhage R, Goosen N, Brouwer J and Van de Putte P (1992) Cloning of *RAD16*, a gene involved in differential repair in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res* 20: 3925-3931.
- Benett RJ, Sharp JA. and Wang JC (1998) Purification and characterization of the Sgs1 DNA helicase activity of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 273: 9644-9650.
- Brent R. and Ptashne M. (1984) A bacterial repressor protein or a yeast transcriptional terminator can block upstream activation of a yeast gene. *Nature* 312:612-615.
- Chiba H, Muramatsu M, Nomoto A and Kato H (1994) Two human homologues of *Saccharomyces cerevisiae* *SWI/SNF2* and *Drosophila brahama* are transcriptional coactivators cooperating with the estrogen receptor and the retinoic acid receptor. *Nucleic Acids Res* 10: 1815-1820.
- Davey S, Han CS, Ramer SA, Klassen JC, Jacobson A, Eisenberger A, Hopkins KM, Lieberman HB, Freyer GA (1998) Fission yeast *rad12+* regulates cell cycle checkpoint control and is homologous to the Bloom's syndrome disease gene. *Mol Cell Biol* 18: 2721-2728.

Fields S and Song OK (1989) A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature* 340: 245-246.

Friedberg EC, Walker GC and Siede W (1995) DNA repair and mutagenesis, ASM Press, Washington, DC.

Gangloff S, McDonald J, Bendixen C, Arthur L, and Rothstein R. (1994) The yeast type I topoisomerase Top3 interacts with Sgs1, a DNA helicase homolog: a potential eukaryotic reverse gyrase. *Mol Cell Biol* 14: 8391-8398.

Gietz RD. and Schiestl RH. (1995) Transforming yeast with DNA. *Methods in Molecular and Cellular Biology* 5:255-269.

Guarente L (1983) Yeast promoters and LacZ fusions designed to study expression of cloned genes in yeast. *Methods Enzymol* 101: 181-191.

Guarente L (1996) Do changes in chromosomes cause aging? *Cell* 86: 9-12.

Guzder SN, Sung P, Prakash L and Prakash S (1997) Yeast Rad7-Rad16 complex, specific for the nucleotide excision repair of nontranscribed DNA strand, is a ATP-dependent DNA damage sensor. *J Biol Chem* 272: 21665-21668.

Gyuris J, Golemis E, Chertkov H and Brent R. (1993) Cdi1, a human G1 and S phase protein phosphatase that associates with Cdk2. *Cell* 75: 791-803.

Henriques JAP, Brozmanova J and Brendel M (1997) Role of *PSO* genes in the repair of photoinduced interstrand cross-links and photooxidative damage in the DNA of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Photochem Photobiol, B Biol* 39: 185-196.

Kennedy BK, Austriaco NR Jr and Guarente L (1994) Daughter cells of *Saccharomyces cerevisiae* from old mothers display a reduced life span. *J Cell Biol* 127: 1985-1993.

Lu J, Mullen JR, Brill SJ, Kleff S, Romeo M and Sternglanz R (1996) Human homologues of yeast helicase. *Nature* 383:678-679

Meniel V, Magaña-Schwencke N and Averbeck D (1995) Preferential repair in yeast after induction of interstrand cross-links by 8-methoxypsoralen plus UVA. *Mutat Res* 329: 121-130.

Paesi-Toresan SO, Pich CT, Grey M, Keszesmann-Pereira D, Brendel M. and Henriques JAP (1995) Gene *PSO5* of *Saccharomyces cerevisiae*, involved in repair of oxidative damage, is allelic to *RAD16*. *Curr Genet* 27, 493-495.

Paetkau DW, Riese JA, MacMorran WS, Woods RA and Gietz D (1994) Interaction of the yeast *RAD7* and *SIR3* proteins: implications for DNA repair and chromatin structure. *Genes Dev* 8: 2035-2045.

Park, PU, Defossez, PA and Guarente, L (1999). Effects of mutations in DNA repair genes on formation of ribosomal DNA circles and life span in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 19: 3848-3856.

Querol CB, Paesi-Toresan SO, Meira LB, Brendel M. and Henriques JAP (1994) Isolation and characterization of three mutants with increased sensitivity to photoactivated 3-carbethoxypsoralen in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Genet* 25, 407-411.

Reed, SH, You, Z and Friedberg, EC (1998). The yeast *RAD7* and *RAD16* genes are required for postincision events during nucleotide excision repair. *J Biol Chem* 273: 29481-29488.

Rothstein RJ (1983) One-step gene disruption in yeast. *Methods Enzymol* 101: 202-211.

Ruhland A, Kircher M, Wilborn F and Brendel M (1981) A yeast specifically sensitive to bifunctional alkylation. *Mutat Res* 91: 457-485.

Schild D, Glassner BJ, Mortimer RK, Carlson, Mand Laurent, BC (1992) Identification of *RAD16*, a yeast excision repair gene homologous to the recombinational repair gene *RAD54* and to SNF2 gene involved in transcriptional activation. *Yeast* 8: 385-395.

Sherman F., Fink GR and Hicks JB (1986). *Methods in yeast genetics* . Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.

Sinclair DA and Guarente L (1997) Extrachromosomal rDNA circles-a cause of aging in yeast. *Cell* 91: 1033-1042.

Sinclair DA, Mills K, and Guarente L (1997) Accelerated aging and nucleolar fragmentation in yeast *sgs1* mutants. *Science* 277: 1313-1319.

Sun H, Bennet, RJ and Maizels, N (1999). The *Saccharomyces cerevisiae* Sgs1 helicase efficiently unwinds G-G paired DNAs. *Nucleic Acids Res* 27: 1978-1984.

Thomas BJ and Rothstein R (1989) Elevated recombination rates in transcriptionally active DNA. *Cell* 56: 619-630.

Tsukamoto Y, Kato J and Ikeda H. (1997) Silencing factors participate in DNA repair and recombinationn inn *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature* 388: 900-903.

Verhage R, Zeeman AM, de Groot N, Gleig F, Bang DD, Van de Putte P and Brouwer J (1994). The *RAD17* and *RAD16* genes, which are essential for pyrimidine dimer removal from the silent mating type loci, are also required for repair of nontranscribed strand of an active gene in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 14: 6135-6142.

Verhage RA, Van de Putte P and Brouwer J (1996) Repair of rDNA in *Saccharomyces cerevisiae*: *RAD4*-independent strand-specific nucleotide excision repair of RNA polymerase I transcribed genes. *Nucleic Acids Res* 24:1020-1025.

Watt P, Louis E, Borts R and Hickson I. (1995) Sgs1: a eukaryotic homolog of *E. coli* RecQ that interacts with topoisomerase II *in vivo* and is required for faithful chromosome segregation. *Cell* 81: 253-260.

Watt PM, Hickson ID, Borts RH and Louis EJ, (1996) *SGS1*, a homologue of the Bloom's and Werner's Syndrome genes, is required for maintenance of genome stability in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 144: 935-945.

Wittenberg C and Reed SI (1988) Control of the yeast cell cycle is associated with assembly/disassembly of the Cdc28 protein kinase complex. *Cell* 54: 1061-1072.

Xiao W, Chow BL and Rathgeber L. (1996). The repair of DNA methylation damage in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Genet* 30: 461-468.

Yu W, Macreadie IG, Winge DR (1991) Protection against cadmium toxicity in yeast by alcohol dehydrogenase. *J Inorg Biochem* 44:155-61

Zervos AS, Gyuris J and Brent R. (1993) Mxi1, a protein that specifically interacts with Max to bind Myc-Max recognition sites. *Cell* 72: 223-232.

CAPÍTULO II

Importance of the Sgs1 helicase activity in DNA repair of *Saccharomyces cerevisiae*

(Aceito à publicação em Current Genetics)

**Importance of the Sgs1 helicase activity in DNA repair of
*Saccharomyces cerevisiae***

Jenifer Saffi, Valquíria Reis Pereira and João Antonio Pêgas Henriques[#]

Department of Biophysics/ Biotechnology Center, UFRGS. Av. Bento
Gonçalves, 9500, 91507-970 Porto Alegre, Brazil

Corresponding author:

João Antonio P. Henriques

Centro de Biotecnologia/Departamento de Biofísica da UFRGS

Cx. Postal, 15005

Campus do Vale, 91501-970, Porto Alegre, Brazil

Tel: (+55) 51 316 6069

FAX: (+55) 51 319 1079

e-mail: pegas@dna.cbiot.ufrgs.br

Abstract

The *Saccharomyces cerevisiae* Sgs1 protein is a DNA helicase of the *E.coli* RecQ family, together with *S. pombe* Rqh1 and the human Bloom and Werner proteins. Mutation of the *SGS1* causes premature aging in yeast cells, including accumulation of extrachromosomal rDNA circles. We have recently shown that Sgs1p interacts with the DNA repair Rad16p and it is epistatic to Rad16p for UVC, 4-NQO and H₂O₂ lesions. Therefore we tested *sgs1* strains containing mutations in the helicase and C-terminal domains and we demonstrate here that the helicase activity of Sgs1 is important for most elements of *sgs1* mutation phenotype, including sensitivity to UVC, 4-NQO, H₂O₂, MMS and hydroxyurea.

Key words *Saccharomyces cerevisiae* *SGS1* Helicase

DNA repair

Introduction

The *Saccharomyces cerevisiae* *SGS1* gene product is a member of a DNA helicase family that includes the *E.coli* RecQ (Nakayama et al. 1985), *Schizosaccharomyces pombe* *rqh1+* (Stewart et al. 1997) and the human Bloom's and Werner's syndrome proteins. These are involved in two rare diseases that exhibit chromosome instability and predisposition to cancer (Ellis et al. 1995; Yu et al. 1996).

The *SGS1* gene was originally identified as an extragenic suppressor of the slow growth phenotype of cells deficient in DNA topoisomerase III (Gangloff et al. 1994) and was found to interact physically with topoisomerases II and III (Watt et al. 1995; Gangloff et al. 1994). Deletion of *SGS1* results in increased recombination at the ribosomal DNA (rDNA) locus (Gangloff et al. 1994; Watt et al. 1995) and accumulation of extrachromosomal rDNA circles containing one or more rDNA repeats (Sinclair and Guarente, 1997). Also, mutation of *SGS1* reduces the average life span of yeast strains by about 40% and accelerates the onset of yeast aging phenotypes including cell enlargement, the relocalization of the Sir complex to the nucleolus, and sterility (Sinclair et al. 1997).

Sgs1p displays 3'-5' helicase and DNA-dependent ATPase activities *in vitro* (Lu et al. 1996, Bennett et al. 1998). It has been recently reported that Sgs1p helicase is efficient in the unwinding of guanine-guanine (G-G) paired DNA substrates (Sun et al. 1999). These authors have proposed that the diminished ability to unwind G-G paired regions may also explain the deleterious effect of mutation of Sgs1 on rDNA stability, the accelerated aging of yeast, and may be responsible as well for aging in the related *WRN* helicase deficient humans.

By the two-hybrid approach we have recently found that the yeast DNA repair protein Rad16 interacts with Sgs1p (Saffi et al. 1999). Genetic analysis of single and double mutations of both *RAD16* and *SGS1* genes has shown that *SGS1* has an important role in the repair of specific DNA damage and that it is epistatic to Rad16 in the repair of lesions produced

by UVC radiation, 4-NQO and H₂O₂. Also, *sgs1* mutants were highly sensitive to the DNA mono and bifunctional alkylating agents MMS and HN2.

We wondered whether Sgs1p is involved in DNA repair via its helicase activity. Therefore, we tested *sgs1* strains containing mutations in the helicase and C-terminal domains for sensitivity to a set of genotoxic agents like MMS, HN2, 4-NQO, UVC and H₂O₂. Also, we asked if the helicase domain of Sgs1p is responsible for the observed hypersensitivity of Sgs1 to hydroxyurea. Here we report that the loss of helicase activity of Sgs1p is responsible for most elements of the *sgs1* mutant phenotype.

Materials and Methods

Saccharomyces cerevisiae strains

The isogenic strains *sgs1-hd*, *sgs1-ct* and *sgs1Δ* were a gift from Dr. D. Sinclair. They were constructed as follows: plasmid pJL31 and its derivatives containing all the respective Sgs1 helicase (*sgs1-hd*) and C-terminal (*sgs1-ct*) mutations, as described by Lu et al. (1996) were digested with *ApaI* and *SacI*, ligated into pRS304 and integrated in *W303-1A* (Thomas and Rothstein, 1989) by cutting with *Bsu36I*. Construction of *sgs1-hd* was achieved by oligonucleotide-directed PCR mutagenesis, introducing a mutation in the invariant lysine residue of helicases. In turn, *sgs1-ct* was constructed by insertion of the nonsense-containing oligonucleotide CTAGCTAGCTAG at the unique *XcaI* site (amino-acid 1,245) in *SGS1*, truncating the protein so that it had 1,245 aminoacids, compared to the normal 1,447. The strains *W303-1A* (*Mata ade2-1 can1-100 his3-11 leu2-3,112 ura3-1 trp1-1*; table 1) and their derivatives *rad16Δ*, *sgs1Δ* and *rad16Δsgs1Δ* used in table 1 are described by Saffi et al (1999).

Media and growth conditions

Yeast strains were grown at 30°C in YPD liquid medium/plates containing 2% glucose, 1% yeast extract, 2% bacto-peptone or selective medium/plates supplemented with the appropriate nutrients (SD medium is 2% glucose/galactose, 0.67% yeast nitrogen base without amino acids, plus nutrients) (Sherman et al. 1986).

Mutagens treatment

MMS and 4-NQO: Different cell concentrations in stationary phase of growth were spread in triplicates on YPD plates previously supplemented with either MMS (Sigma), varying from 0.005 to 0.02% or 4-NQO (Sigma) at concentrations from 0.1 to 0.4 µM.

UVC: Cells were grown in YPD to exponential phase (1-2 x10⁷ cells/ml). They were harvested, washed and resuspended in sterile saline or water. Different cell concentrations were spread immediately in triplicate on YPD plates and, after drying, irradiated with UVC (Stratlinker, Stratagene) with doses ranging from 10 to 120 J/m².

Hydrogen peroxide (H₂O₂): cells suspension, in exponential phase, were treated with varying amounts of H₂O₂ (1-6 mM) at 30°C for 1h.

Nitrogen Mustard (HN2): sensitivity to HN2 (2-2'-dichloro N-methyldiethylamine hydrochloride; Aldrich) was determined via the center well test, as described by Ruhland et al. (1981), using YPD plates. A loop of a cell suspension in stationary growth was taken and plated from the border of the well to the border of the plate in one continuous strike. The well was filled with 0.2ml of HN2 in ice-cold aqueous solution at concentrations from 50-100 mM. Impaired growth was measured as *mm* of growth inhibition.

After all treatments the plates were incubated for 3-5 days at 30°C. Survival data represent the average of at least three experiments.

Survival: Cells were grown in liquid YPD at 30°C for 3 days to obtain cultures in stationary phase. Cultures in exponential phase were obtained by growing 5×10^6 cells in 10 ml of YEPD for 4 hours at 30°C.

Sensitivity to Hydroxyurea (HU): Stationary cultures were diluted serially by 10-fold and were spotted onto rich media plates with or without HU (100mM). The plates were incubated at 30°C for 2-3 days.

Results and Discussion

We have recently shown (Saffi et al. 1999) that Sgs1p, involved in premature yeast aging, (Sinclair et al. 1997), has an important role in yeast DNA repair in combination with Rad16p, a helicase protein involved in preferential nucleotide excision repair (NER) of silent DNA and of the non-transcribed strand of active genes (Bang et al. 1992, Schield et al. 1992, Verhage et al. 1994). Table 1 summarizes the new phenotypes of *sgs1* and *rad16* mutants for several genotoxic agents. Therefore we tested the involvement of the helicase and C-terminal domains of Sgs1p in the repair of DNA damaged by these agents.

Table 1. Phenotypic characterization of isogenic strains towards different mutagens ^a

Agent	W303-1A	<i>sgs1</i>	<i>rad16</i>	<i>rad16/sgs1</i>
UVC	R	S	SS	SS
4-NQO	R	S	S	S
MMS	R	SS	R	R
H ₂ O ₂	R	S	S	S
HN2	R	S	S	SS

R, wild-type response (resistant).

S, sensitive and SS, very sensitive

^a Data from Saffi et al. (1999).

Figure 1 clearly shows that *sgs1* strains mutated in the helicase domain are very sensitive to MMS, UVC, 4-NQO and H₂O₂, whereas C-terminal *sgs1* mutants lacking the last 202 aminoacids showed a resistance similar to that of the wild-type. It is interesting to note that *sgs1-hd* mutants were even more sensitive to MMS, UVC and H₂O₂ than was *sgs1Δ*. This implies that for such DNA lesions, lack of the helicase activity is even more harmful to the mutant cells than the loss of the entire protein. It is also important to remark that *sgs1-ct* mutants maintain the helicase activity (Lu et al. 1996), which probably explains the observed wild-type like resistance. However, these authors have shown that the C-terminal but not the helicase domain of Sgs1 protein is essential for function in the *top3* mutant background.

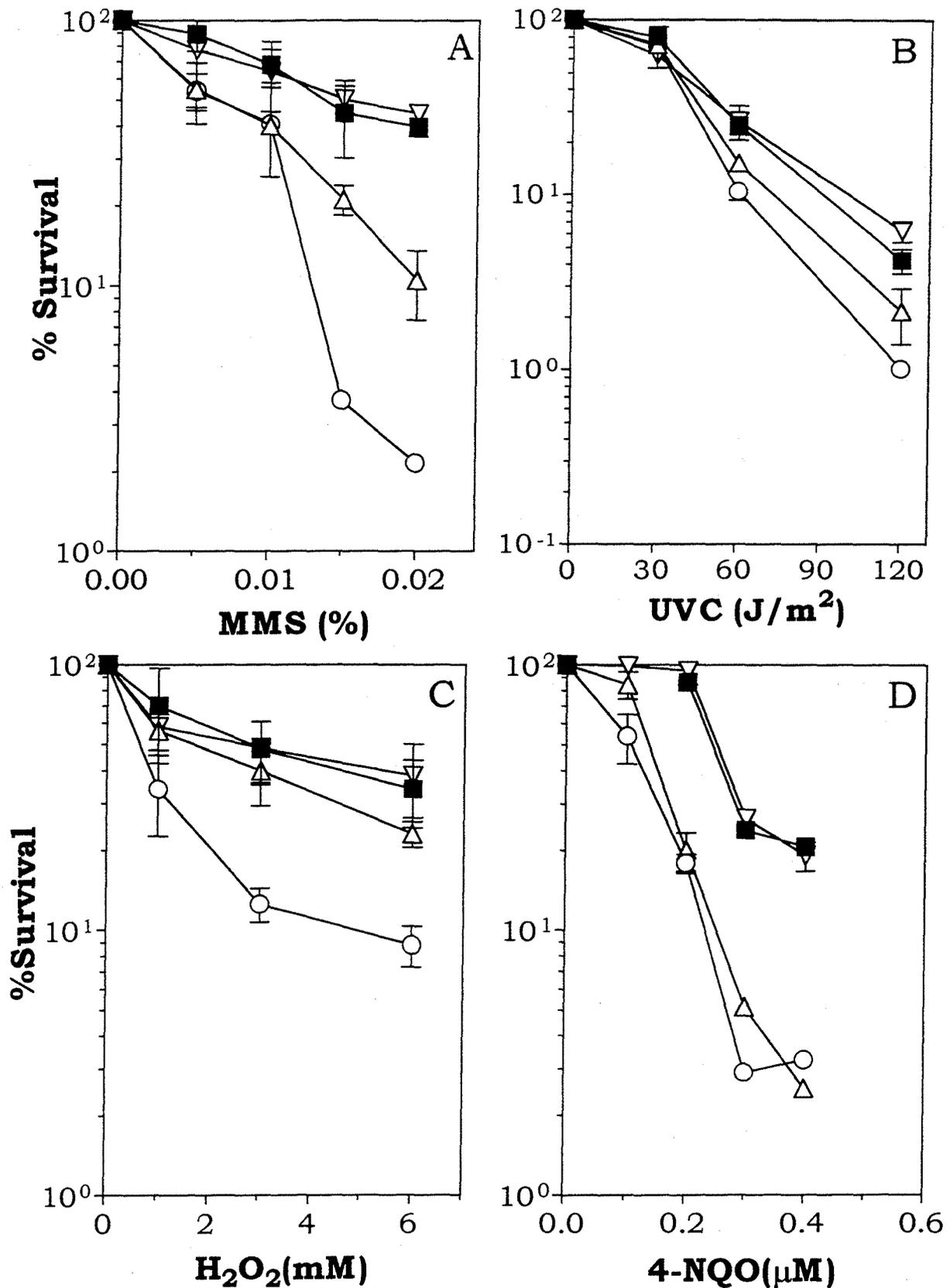


Fig. 1. Haploid wild type *W303-1A* (■) and isogenic strains carrying a *sgs1Δ* (Δ), *sgs1-ct* (∇) and *sgs1-hd* (O) were assayed for their MMS (A), UVC (B), H₂O₂ (C), 4-NQO (D) sensitivities (see Materials and Methods).

We show here the involvement of *SGS1* helicase in the repair of the bulky base DNA lesion repair, specifically in the repair of pyrimidine dimers, DNA alkylations and oxidative damage. In fact, UVC not only produces pyrimidine dimers in DNA but also oxidative DNA damage, generating, via singlet oxygen formation, oxidized guanine moieties such as 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (Wei et al. 1997) and 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine (Zhang et al. 1997).

Figure 2 demonstrates the growth inhibition of the *sgs1* mutant strains in the presence of the bifunctional alkylating agent HN2. Here, in contrast to the MMS results, not only *sgs1Δ* and *sgs1-hd*, but also the *sgs1-ct* mutation conferred high sensitivity to this agent. This response indicates that the helicase activity of Sgs1p is not selectively required for repair of HN2-induced N-7 guanine alkylation, intra-strand adducts or inter-strand DNA crosslinks. We can predict that after treatment with MMS alkylating agent, in which the 3-methyladenine lesions block DNA replication having single strand DNA ends (Xiao et al. 1996), Sgs1 might be able to recruit topoisomerase (Top2/Top3) to process the DNA damage via recombination (*RAD50*, *RAD52*) DNA repair pathway (Xiao et al 1996). Indeed, *top3Δ* mutants are very sensitive to MMS, whereas double mutant *sgs1Δtop3Δ* shows a MMS sensitivity similar to that observed for *sgs1Δ* mutant (our unpublished data).

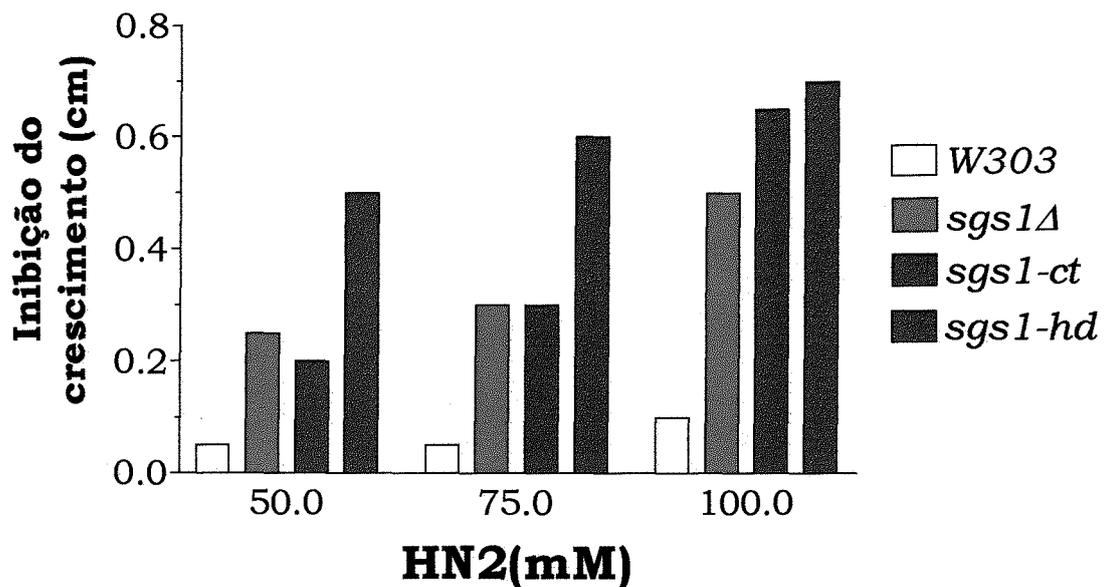


Fig. 2. Sensitivity to HN2 was determined via the center well test, using the same isogenic strains described in Fig.1. A loop of a cell suspension in stationary growth was taken and plated from the border of the well to the border of the plate in one continuous strike. In the well, 0.2 ml of 100 mM HN2 was placed. Impaired growth was measured as mm of growth inhibition.

Figure 3 shows that the helicase domain of Sgs1 is responsible for the HU hypersensitivity of the *sgs1* mutants. This result implies, as already suggested by Yamagata et al. (1999), that the Sgs1 helicase activity has a role for resumption of cell cycle progression when S phase has been interrupted.

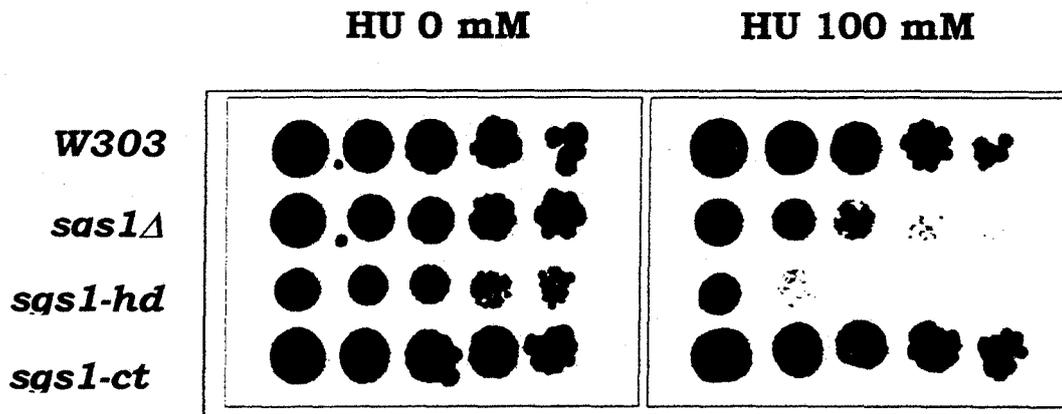


Fig. 3. Sensitivity to hydroxyurea (HU). Stationary cultures were diluted serially by 10 fold and were spotted onto rich media plates with or without HU (100mM).

Recently, Kusano et al. (1999) have shown that the *Drosophila melanogaster* Bmblm gene, which is also homologue to *BLM*, is partially able to rescue the sensitivity of *sgs1Δ* to MMS. Therefore, these phenotypes of *sgs1Δ* and *sgs1-hd* mutants, associated with the *sgs1* hyper-recombination activity (Watt et al. 1996), and the fact that *BLM* helicase domain can restore the sensitivity of *sgs1* to HU (Yamagata et al. 1998), reinforce the hypothesis that Sgs1p is functionally more homologous to *BLM* than to the *WRN*-encoded helicase. Substrate specificity is a critical determinant of the helicase function. It has been shown that recombinant Bloom (rBLM) and Sgs1 helicases can unwind DNAs in which guanine-guanine (G-G) pairing stabilizes interstrand interactions (Sun et al. 1998, 1999).

It has been proposed that RecQ helicases are required for correcting structural abnormalities arising during replication, such as at sites where replication forks encounter DNA lesions (Chakraverty and Hickson, 1999). These authors have suggested that RecQ helicases, in conjunction with topoisomerase III, may be important for the integration of cellular responses to DNA-damaging agents or inhibitors of DNA synthesis, such

as linking cell cycle checkpoint responses to recombinational repair.

All the observations reported so far on the Sgs1p helicase activity, together with our findings on its role in DNA repair, lead us to propose that this part of the protein has specific roles on its interaction with the DNA, which might be similar to those exerted by the human helicases Bloom and Werner. Further, it seems now worth examining whether the *WRN* and *BLM* helicases can rescue yeast *sgs1* mutants from the deleterious effects of some DNA-damaging agents.

Acknowledgements We thank Dr. D. Sinclair for kindly providing the *sgs1* mutant strains. We thank Dr. M. Brendel for the helpful discussions and Dr. E. J. Garcia for critical reading of the manuscript. This work was supported by CNPq and GENOTOX- Laboratório de Genotoxicidade -UFRGS.

References

- Bang DD, Verhage R, Goosen N, Brouwer J and Van de Putte P (1992) Cloning of *RAD16*, a gene involved in differential repair in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res* 20:3925-3931.
- Benett RJ, Sharp JA. and Wang JC (1998) Purification and characterization of the Sgs1 DNA helicase activity of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 273:9644-9650.
- Chakraverty RK, Hickson ID (1999) Defending genome integrity during DNA replication: a proposed role for RecQ family helicases. *Bioessays* 21:286-294.
- Ellis NA, Groden J, Ye TZ, Straughen J, Lennon, DJ, Ciocci S, Proytcheva M, German J (1995) The Bloom's syndrome gene product is homologous to RecQ helicases. *Cell* 83:655-666.
- Gangloff S, McDonald J, Bendixen C, Arthur L, and Rothstein R. (1994) The yeast type I topoisomerase Top3 interacts with Sgs1, a DNA helicase homolog: a potential eukaryotic reverse gyrase. *Mol Cell Biol* 14:8391-8398.
- Kusano K, Berres ME, Engels WR (1999) Evolution of the RecQ family of helicases: a drosophila homolog, Dmblm, is similar to the human bloom syndrome gene. *Genetics* 151:1027-1039.
- Lu J, Mullen JR, Brill SJ, Kleff S, Romeo M and Sternglanz R (1996) Human homologues of yeast helicase. *Nature* 383:678-679

Nakayama K, Irino N, Nakayama H (1985) The *recQ* gene of *Escherichia coli* K12: molecular cloning and isolation of insertion mutants. *Mol Gen Genet* 200:266-271.

Ruhland A, Kircher M, Wilborn F, Brendel M (1981) A yeast mutant specifically sensitive to bifunctional alkylation. *Mutat Res* 91:457-462.

Saffi J, Feldmann, H, Winnacker E-L and Henriques JAP (1999) Interaction of the yeast Pso5/Rad16 and Sgs1 proteins: implications for DNA repair and aging. *Mol Gen Genetics* (Submitted).

Schild D, Glassner BJ, Mortimer RK, Carlson, Mand Laurent, BC (1992) Identification of *RAD16*, a yeast excision repair gene homologous to the recombinational repair gene *RAD54* and to *SNF2* gene involved in transcriptional activation. *Yeast* 8:385-395.

Sherman F, Fink GR and Hicks JB (1986) *Methods in yeast genetics*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.

Sinclair DA and Guarente L (1997) Extrachromosomal rDNA circles- a cause of aging in yeast. *Cell* 91:1033-1042.

Sinclair DA, Mills K, and Guarente L (1997) Accelerated aging and nucleolar fragmentation in yeast *sgs1* mutants. *Science* 277:1313-1319.

Stewart E, Chapman CR, Al-Khodairy F, Carr AM, Enoch T (1997) *rqh1+*, a fission yeast gene related to the Bloom's and Werner's syndrome genes, is required for reversible S phase arrest. *EMBO J* 16:2682-2692.

Sun H, Karow JK, Hickson ID, Maizels N (1998) The Bloom's Syndrome helicase unwinds G4 DNA. *J Biol Chem* 273:27587-27592.

Sun H, Bennet, RJ and Maizels, N (1999) The *Saccharomyces cerevisiae* Sgs1 helicase efficiently unwinds G-G paired DNAs. *Nucleic Acids Res* 27:1978-1984.

Thomas BJ and Rothstein R (1989) Elevated recombination rates in transcriptionally active DNA. *Cell* 56:619-630.

Verhage R, Zeeman AM, de Groot N, Gleig F, Bang DD, Van de Putte P and Brouwer J (1994) The *RAD7* and *RAD16* genes, which are essential for pyrimidine dimer removal from the silent mating type loci, are also required for repair of nontranscribed strand of an active gene in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 14:6135-6142.

Watt P, Louis E, Borts R and Hickson I (1995) Sgs1: a eukaryotic homolog of *E. coli* RecQ that interacts with topoisomerase II *in vivo* and is required for faithful chromosome segregation. *Cell* 81:253-260.

Watt PM, Hickson ID, Borts RH and Louis EJ (1996) *SGS1*, a homologue of the Bloom's and Werner's Syndrome genes, is required for maintenance of genome stability in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 144:935-945.

Wei H, Cai Q, Rahn R, Zhang X (1997) Singlet oxygen involvement in ultraviolet (254nm) radiation-induced formation of 8-hydroxy-deoxyguanosine in DNA. *Free Rad Biol Med* 23:148-154.

Xiao W, Chow BL and Rathgeber L (1996) The repair of DNA methylation damage of *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Genet* 30:461-468.

Yamagata K, Kato J-I, Shimamoto A, Goto M, Furuichi Y and Ikeda H (1998) Bloom's and Werner's syndrome genes suppress hyperrecombination in yeast *sgs1* mutant: implication for genomic instability in human diseases. *Proc Natl Acad Sci* 95:8733-8738.

Yu CE, Oshima J, Fu YH, Wijsman EM, Hisama E, Alisch R, Mathews S, Nakura J, Miki T, Ouais S, Martin GM, Mulligan J and Schellenberg GD (1996) Positional cloning of the Werner's syndrome gene. *Science* 272:258-262.

Zhang X, Rosenstein BS, Wang Y, Lebwohl M, Mitchell DM, Wei H (1997) Induction of 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine by ultraviolet radiation in calf thymus DNA and HeLa cells. *Photochem Photobiol* 65:119-124.

ANEXO I

Papel da Topoisomerase III em reparação de DNA

Introdução

As topoisomerasas são enzimas essenciais ao metabolismo do DNA, como na replicação, transcrição, segregação cromossômica e estabilidade genômica (revisado por Duguet 1997). Variações nos níveis de expressão de topoisomerase pode resultar em diferentes fenótipos pleiotrópicos, tanto em bactérias, quanto em leveduras (Kim and Wang 1989, Wallis et al. 1989, Drlica 1990, Gangloff et al. 1999).

Em *S. cerevisiae*, já foram identificadas três topoisomerasas nucleares e uma mitocondrial. Entre as nucleares, as DNA topoisomerasas I e II (codificadas pelos genes *TOP1* e *TOP2*, respectivamente) são capazes de relaxar moléculas de DNA superenroladas tanto negativa, quanto positivamente. Já a topoisomerase III, codificada pelo gene *TOP3*, consegue relaxar um pouco DNA enrolado negativamente. (ver revisão em Gangloff et al. 1994b, Gangloff et al. 1996, Wang 1996). Com relação a topoisomerase mitocondrial, identificada recentemente, muito pouco se sabe sobre sua função (Ezekiel et al. 1994).

O gene *TOP3* é homólogo as genes *topA* e *topB* de *E. coli*, mas não a *TOP1* ou *TOP2* de *S. cerevisiae*. (Kim e Wang 1992). Em humanos e camundongos já foram encontrados homólogos a *TOP3*, e foi demonstrado que ela é essencial para a embriogênese de camundongos (Seki et al. 1998).

Os mutantes *top3* foram isolados originalmente por estimularem eventos recombinacionais entre seqüências repetidas (Gangloff et al. 1994a, 1994b). Além desse fenótipo, os mutates *top3* apresentam aberrações no seu ciclo celular, que leva a um crescimento mais lento, devido a defeitos na decatenação de DNA fita simples, no final da replicação (Gangloff et al. 1994b).

Conforme já foi mencionado nos capítulos I e II, a mutação *sgs1* suprime o fenótipo de crescimento lento dos mutantes *top3* (Gangloff et al. 1994a). Como as proteínas Sgs1 e Top3 interagem *in vivo* e *in vitro*,

imagina-se que Top3 seja requerida para atuar sobre os mesmos substratos que Sgs1 (Gangloff et al. 1994a).

Baseado nesta hipótese, e também pelo fato de Sgs1 interagir com Pso5/Rad16 e exercer um papel em reparação de DNA (Capítulos I e II), decidiu-se investigar as respostas fenotípicas dos mutantes *top3Δ* para diversos agentes genotóxicos, assim como as do duplo mutante *sgs1/top3Δ* e do triplo mutante *sgs1/rad16/top3Δ*.

2. Material e Métodos

2.1 Linhagens de *S. cerevisiae*

As linhagens utilizadas foram construídas e gentilmente cedidas pelo Dr. D. Sinclair e são todas isogênicas. A obtenção das mesmas foi através da análise randômica de esporos oriundos do cruzamento da linhagem W303 (MAT α *sgs1Δ top3Δ rDNA::ADE2*) com a linhagem W303 (MAT α *pso5/rad16Δ*), descrita no Capítulo I.

2.2 Meio de cultura e condições de crescimento

As linhagens foram mantidas em placas de meio completo (YPD) contendo 0.5% de extrato de levedura, 2% de peptona e 2% de glicose e 2% de agar (Sherman *et al.*, 1986). Após 3-5 dias de crescimento a 30°C, elas alcançavam a fase estacionária de crescimento ($2-4 \times 10^8$ céls/ml).

2.3 Teste em gotas para análise do fenótipo

Uma alçada de células em fase estacionária foi suspensa em 200 μ l de água destilada e diluída 4 a 5 vezes na ordem de 1: 10. Gotas de 10 μ l de cada diluição foram plaqueadas em YPD com ou sem mutagênicos.

Os agentes mutagênicos utilizados foram metil-metanosulfonato (MMS), na concentração de 0,010% e 0,015%, o óxido de 4-nitroquinolina (4-NQO) 0.4 μ M e peróxido de hidrogênio (H₂O₂) 5mM e 8mM, os quais eram adicionados no momento de fazer as placas de YPD, quando este encontra-se na temperatura adequada (em torno de 50°C). A dose de

radiação ultravioleta de comprimento de onda curto (UVC) foi 60 J/m², usando-se o aparelho Stratalinker (Stratagene).

3. Resultados e Discussão

A Figura 1 mostra os resultados de sensibilidade para H₂O₂ e MMS dos simples mutantes *sgs1Δ*, *top3Δ* e do duplo mutante *sgs1Δtop3Δ*. Observa-se, claramente, que o mutante *top3Δ* é extremamente sensível ao MMS e tão sensível quanto a *sgs1Δ* a H₂O₂. É interessante observar que a dupla mutação *sgs1Δtop3Δ* restaura totalmente essa sensibilidade dos simples mutantes. Isso leva-nos a sugerir que, na ausência de Sgs1 e Top3, a célula canaliza o reparo desta lesão para outra via que independente da função destas proteínas. Para as lesões do tipo alquilações de DNA, provocadas por MMS, verifica-se que a dupla mutação *sgs1/top3Δ* não é tão sensível quanto a *top3Δ* é para MMS. Isso indica que, da mesma forma que para o crescimento lento, a mutação *sgs1Δ* suprime, pelo menos parcialmente, o fenótipo de sensibilidade de *top3Δ* a esse agente. Como a helicase Sgs1 interage física e geneticamente com Top3 (Gangloff et al. 1994a), esse resultado confirma a hipótese destes autores de que a proteína Top3 atuaria sobre um mesmo substrato que Sgs1. Além disso, a função da Top3 parece ser importantíssima para a viabilidade celular na presença da lesão.

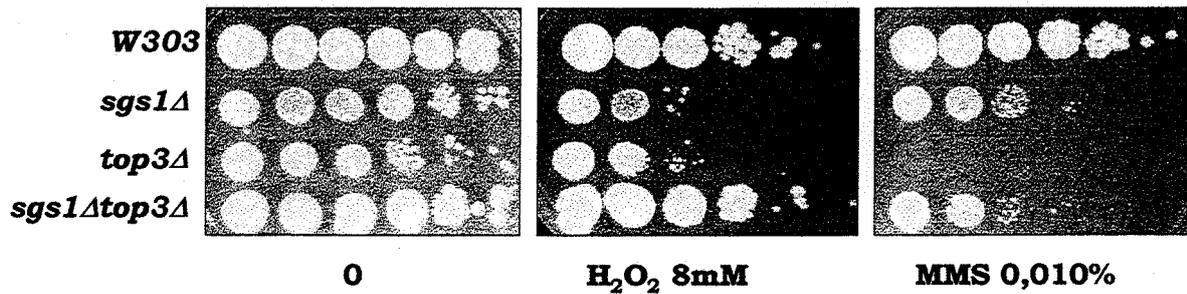


Figura 1. Teste em gotas para a sensibilidade a H_2O_2 e MMS.

A Figura 2 confirma os dados apresentados na Figura 1 e adiciona outras informações. Verifica-se que para MMS, a resposta obtida com a tripla mutação *sgs1/top3/rad16Δ* foi a mesma que para o duplo mutante *sgs1Δtop3Δ*, enquanto que a dupla mutação *sgs1/rad16Δ* teve um perfil igual a selvagem, confirmando os resultados apresentados no Capítulo I. Desta forma, salienta-se o papel da proteína Top3 na reparação das lesões do tipo alquilação de DNA

Ao contrário da resposta ao MMS, o mutante *top3Δ* foi pouco sensível a UVC, apresentando um fenótipo semelhante ao *sgs1Δ* (Capítulo I-Figura 2B). Por outro lado, a mutação *sgs1Δ* restaura a sensibilidade apresentada por *top3Δ*. Entretanto, tanto o duplo (*sgs1/rad16Δ*), quanto o triplo mutante *sgs1/top3/sgs1Δ* foram extremamente sensíveis a UVC. Esse resultado evidencia que a reparação destas lesões são dependentes, quase que exclusivamente da helicase Rad16.

Curiosamente, todos os mutantes foram igualmente sensíveis ao UV-mimético 4-NQO. Sabe-se que este agente forma também uma grande quantidade de quebras no DNA e lesões oxidativas (Friedberg et al. 1995, Sugimura et al. 1996). Ressalta-se que *rad16Δ* e *sgs1Δ* mostraram-se epistáticos para a reparação destas lesões (Figura 2- Capítulo I). Portanto, pode-se sugerir um papel comum das três proteínas para atuar sobre esse substrato.

envolvimento em reparação de DNA. Esse resultado vai ao encontro da proposta de Chakraverty e Hickson (1999), que colocam a Top3 e a helicase Sgs1 na função de preparar a lesão. A hipótese é bastante válida, principalmente para lesões provocadas por agentes que alquilam DNA, como o MMS, onde a Top3, juntamente com a helicase Sgs1, processariam o DNA contendo as lesões, para permitir o acesso das demais enzimas de reparação.

4. Referências Bibliográficas

CHAKRAVERTY RK and HICKSON ID (1999) Defending genome integrity during DNA replication: a proposed role for RecQ family helicases. *BioEssays* 21: 286-294.

DRLICA K (1990) Bacterial topoisomerases and the control of DNA supercoiling. *Trends Genet* 6: 433-437.

DUGUET M (1997) When helicase and topoisomerase meet! *J Cell Sci* 110: 1345-1350.

EZEKIEL UR, TOWLER EM, WALLIS JW and ZASSENHAUS (1994) Evidence for a nucleotide-dependent topoisomerase activity from yeast mitochondria. *Curr Genet* 27: 31-37.

FRIEDBERG E, WALKER GC and SIEDE W (1995) *DNA repair and mutagenesis*. ASM Press, Washington, USA.

GANGLOFF S, McDONALD J, BENDIXEN C, ARTHUR L and ROTHSTEIN R (1994a) The yeast type I topoisomerase Top3 interacts with Sgs1, a DNA helicase homologue: a potential eukaryotic reverse gyrase. *Mol Cell Biol* 14: 8391-8398.

GANGLOFF S, LIEBER MR and ROTHSTEIN R (1994b) Transcription, topoisomerases and recombination. *Experimentia* 50: 261-269.

GANGLOFF S, ZOU H and ROTHSTEIN R (1996) Gene conversion plays the major role in controlling the stability of large tandem repeats in yeast. *EMBO J* 15: 1715-1725.

GANGLOFF S, MASSY B, ARTHUR L, ROTHSTEIN R and FABRE F (1999) The essential role of yeast topoisomerase III in meiosis depends on recombination. *EMBO J* 18: 1701-1711.

KIM RA and WANG JC (1989) A subthreshold level of DNA topoisomerases leads to the excision of yeast rDNA as extrachromosomal rings. *Cell* 57: 975-985.

KIM RA and WANG JC (1992) Identification of the yeast *TOP3* gene product as a single strand-specific DNA topoisomerase. *J Biol Chem* 267: 17178-17185.

SEKI T, SEKI M, KATADA T and ENOMOTO T (198) Isolation of a cDNA encoding mouse DNA topoisomerase III which is highly expressed at the mRNA level in the testis. *Biochem Biophys Acta* 1396: 127-131.

SUGIMURA T, OKABE K, NAGAO M (1966) The metabolism of 4-nitroquinoline-1-oxide, a carcinogen. 3. An enzyme catalysing the conversion of 4-nitroquinoline-1-oxide to 4-hydroxyaminoquinoline-1-oxide in rat liver and hepatomas. *Cancer Res* 26: 1717-21

THOMAS BJ and ROTHSTEIN R (1989) Elevated recombination rates in transcriptionally active DNA. *Cell* 56: 619-630.

WALLIS JW, CHREBET G, BRODSKY G, ROLFE M and ROTHSTEIN R
(1989) A hyper-recombination mutation in *S. cerevisiae* identifies a
novel eukaryotic topoisomerase. *Cell* 58: 409-419.

WANG JC (1996) DNA topoisomerases. *Ann Rev Biochem* 65: 635-692.

DISCUSSÃO

A integridade genômica das células é constantemente desafiada por agentes endógenos e exógenos que danificam o DNA. Não é surpreendente, portanto, que o grande número de lesões que ocorrem neste DNA leve a indução de várias enzimas ou vias de reparação, específicas para os diversos tipos de danos.

Apesar do genoma da levedura *S. cerevisiae* já estar totalmente seqüenciado desde 1996, a função da maioria das seqüências codificantes deste genoma ainda está desconhecida. Os estudos de interações proteicas, utilizando o sistema di-híbrido como ferramenta, têm contribuído muito para a elucidação de muitas funções de proteínas, as quais, muitas vezes, são apenas identificadas.

Por ser um *screening* relativamente rápido e realizado na própria levedura, decidiu-se utilizar o “*interaction trap*”, uma variação do tradicional sistema di-híbrido (Zervos e Gyuris 1993), afim de identificar interatores para produto do gene *PSO5/RAD16*. Este trabalho é então mais uma contribuição ao estudo de interações entre as proteínas que atuam em reparação e, além disso, mostra um papel importante de uma proteína de envelhecimento envolvida com a reparação de danos específicos ao DNA.

1. A proteína Pso5/Rad16 interage com Sgs1

No capítulo I, mostrou-se que o produto do gene *PSO5*, alelo ao gene *RAD16* que atua no NER de regiões silenciosas e não-transcritas do genoma (Bang et al. 1992, Schield et al. 1992, Verhage et al. 1994), interage com um domínio do produto gênico de *SGS1*, pelo uso da técnica de *interaction trap*.

O gene *SGS1* foi caracterizado como sendo supressor do crescimento lento e de instabilidade genômica de mutantes de topoisomerase III (Gangloff et al. 1994b). Ele codifica uma DNA helicase 3'-5', com atividade de ATPase (Lu et al. 1996, Bennett et al. 1998) e interage também com as topoisomerases II e III (Watt et al. 1995, Gangloff et al. 1994b). Mutações no gene *SGS1* resulta em instabilidade genômica, incluindo aumento na

recombinação de seqüências repetidas no rDNA (Gangloff et al. 1994b, Watt et al. 1996). Os mutantes *sgs1* possuem um tempo de geração reduzido em 60%, com relação a linhagem selvagem, o que caracteriza um fenótipo de envelhecimento prematuro. Além disso, esses mutantes são estéreis e apresentam fragmentação do nucléolo (Sinclair et al. 1997, Sinclair et al. 1998a, 1998b).

O gene que codifica para a Síndrome de Werner (SW) em humanos, o *WRN*, apresenta uma grande homologia com *SGS1*, possuindo também atividade de DNA helicase dependente de ATP e de exonuclease 3'-5' (Yu et al. 1996, Gray et al. 1997, Shen et al. 1998). A proteína *Wrn*, apesar de não ter sua função ainda conhecida *in vivo*, é responsável pelos fenótipos de envelhecimento precoce, predisposição ao câncer, cabelos grisalhos, arteriosclerose e perda da plasticidade da pele, em indivíduos portadores da SW (revisado em Sinclair et al. 1998b). Assim como *Sgs1p*, a proteína *Wrn* está localizada no nucléolo em células de humanos (Gray et al. 1998, Marciniak et al. 1998).

O gene *SGS1* também apresenta bastante homologia com o *BLM*, cujo produto gênico é responsável pela Síndrome de Bloom (SB) em humanos (Ellis et al. 1995). Os indivíduos portadores de SB caracterizam-se por uma estatura baixa, imunodeficiência e uma elevada predisposição ao câncer (German and Ellis 1997). Ao contrário dos pacientes com SW, os com SB não possuem o fenótipo de envelhecimento precoce, mas apresentam uma elevada instabilidade genômica, como o aumento de aberrações cromossômicas e freqüência elevada de troca de cromátides irmãs (German 1993, Neff et al. 1999).

A interação encontrada entre a proteína *Pso5/Rad16* e o domínio de *Sgs1* (aa 421-792) foi confirmada por experimentos de indução de beta-galactosidase, medida pela expressão do gene repórter *lacZ*, e de co-imunoprecipitação (Capítulo I). Não foram utilizados anticorpos específicos para essas proteínas, mas sim contra LexA e hemaglutinina (HA), cujas seqüências correspondentes encontravam-se no *bait* e no *prey*, respectivamente. Dessa forma, foi possível verificar que apenas a

construção contendo o gene *PSO5/RAD16* inteiro ou truncado era capaz de imunoprecipitar com o domínio de *SGS1*.

É importante ressaltar que o domínio de Sgs1p encontrado interagir com a Pso5p (aminoácido 421 ao 792), foi praticamente o mesmo daquele que interage com Top2, (aminoácido 432 ao 724) (Watt et al. 1995). Como não foram feitas deleções na proteína Sgs1 para se mapear qual o domínio que interage especificamente com Pso5, não se pode excluir a possibilidade de existir dois domínios diferentes de interação em Sgs1. É possível que cada um desses domínios interaja com cada uma das proteínas.

2. Envolvimento de Sgs1 em reparação de DNA

A interação entre Pso5/Rad16 e Sgs1 foi verificada geneticamente, através da construção de linhagens haplóides simples e duplo mutantes para esses genes, conforme descrito no Capítulo I. Verificou-se que a mutação *sgs1* é sensível a uma série de agentes genotóxicos, como UVC, ao UV-mimético 4-NQO, H₂O₂ e é principalmente sensível aos agentes alquilantes MMS e HN2. O fato de *sgs1Δ* não apresentar sensibilidade a psoralenos mono (3-Cps) ou bifuncionais (8-MOP) fotoativados, demonstra que essa proteína pode estar envolvida na reparação de lesões diferentes das que servem de substrato para Pso5. O duplo mutante *rad16Δsgs1Δ* foi tão sensível quanto o simples mutante *rad16Δ* para UVC, 4-NQO e H₂O₂ mostrando uma interação epistática entre esses dois produtos gênicos para a reparação de dímeros de pirimidina e danos oxidativos.

É importante ressaltar que a radiação UVC e o agente UV-mimético 4-NQO não produzem apenas dímeros de pirimidina no DNA, mas também uma série de lesões oxidativas, como formação de oxigênio singlet e oxidação das guaninas (Wei et al. 1997, Zhang et al. 1997). Portanto, é bastante provável que essa seja a causa principal da sensibilidade dos mutantes *sgs1* a esses agentes.

No capítulo II, demonstra-se que é o domínio helicase da proteína Sgs1 o responsável pelo fenótipo de sensibilidade dos mutantes *sgs1* a

maioria dos agentes testados. Mostrou-se que apenas as linhagens de *sgs1*, contendo mutações no seu domínio helicase, foram sensíveis aos agentes MMS, UVC, 4-NQO e H₂O₂, enquanto que aquelas que continham mutações no domínio C-terminal apresentaram sensibilidade igual à selvagem, para todos esses agentes. É importante lembrar que, tanto a linhagem com a mutação no aminoácido lisina da helicase (*sgs1-hd*), quanto a que possui deleção nos últimos 202 aminoácidos da região C-terminal de Sgs1 (*sgs1-ct*) mantêm seus domínios de interação com as Topoisomerasas II, III e também com o Pso5. Até o presente momento, não foi encontrada nenhuma proteína que interaja com a porção C-terminal de Sgs1. Entretanto, sabe-se que essa região é importante para manter a função de Sgs1 quando a topoisomerase III estiver faltando, ou seja, num "background" *top3* (Lu et al. 1996). Esses autores demonstraram que o alelo *sgs1-ct* é incapaz de complementar a deleção *sgs1* na linhagem mutante *sgs1top3*. Além disso, eles mostraram que essa incapacidade de complementar não é devido à instabilidade da proteína, uma vez que o mesmo alelo complementa a linhagem *sgs1top1*.

Também no capítulo II foi demonstrado que a hipersensibilidade do mutante *sgs1* à hidroxiuréia (HU) é também dependente do seu domínio helicase. De acordo com esse resultado, foi mostrado, recentemente (Yamagata et al. 1998), que o domínio helicase de *BLM* pode restaurar a sensibilidade de *sgs1* à HU. Esse fato, juntamente com a observação que o gene de *Drosophila melanogaster*, *Dmblm*, homólogo de *SGS1* e *BLM*, é capaz de restaurar parcialmente a sensibilidade dos mutantes *sgs1* à MMS (Kusano et al. 1999), reforça a idéia de que *SGS1* seja mais homólogo funcionalmente à *BLM* do que à *WRN*. A esse respeito, algumas linhagens celulares com SB apresentam uma sensibilidade aumentada a agentes alquilantes, como mitomicina C, N-nitroso-N-etiluréia e etilmetano-sulfonato (EMS). Alterações em algumas enzimas envolvidas com replicação e reparação de DNA também já foram identificadas em alguns tipos celulares de SB (Ellis et al. 1995, Neff et al. 1999). Recentemente, foi demonstrado que células *WRN* apresentam

sensibilidade à 4-NQO (Ogburn et al. 1997). O homólogo de *SGS1* em *Schizosaccharomyces pombe* é o Rad12+, cuja mutação não só apresenta sensibilidade à UVC e radiação γ , mas também à HU (Stewart et al. 1997, Davey et al. 1998).

Recentemente, Yamagata et al. (1998) mostraram que a helicase Sgs1 atua como um supressor de recombinação ilegítima, através de recombinação homóloga e que as helicases humanas *WRN* e *BLM* podem suprimir a recombinação homóloga e ilegítima aumentadas nos mutantes *sgs1*. Além disso, esses autores demonstraram que a helicase *BLM*, mas não a *WRN*, é capaz de suprimir o crescimento celular de *top3sgs1* e restaurar a sensibilidade aumentada do mutante *sgs1* à hidroxiurêira.

A família de helicases do tipo RecQ é requerida para corrigir anormalidades estruturais formadas durante o processo de replicação, por exemplo, nos sítios de forquilhas de replicação que possuem lesões no DNA. Chakraverty e Hickson (1999) propõem que essas helicases sejam importantes para a integração das respostas celulares aos agentes que lesam DNA ou inibidores da síntese de DNA, ligando respostas de parada de ciclo celular à reparação por recombinação. A incapacidade de resolver estruturas anormais de DNA, originárias dos últimos estágios da replicação poderia levar a quebras e, portanto, a eventos aberrantes de recombinação, como observa-se em mutantes deficientes nas helicases RecQ e também nas topoisomerasas.

3. A topoisomerase III e seu papel em reparação de DNA

O fato de Sgs1 estar relacionado à reparação de DNA, levou-nos a questionar o papel da Top3, sua proteína interatora, (Gangloff et al. 1994b) também nesta função. O Anexo reporta, claramente, que mutantes *top3 Δ* são extremamente sensíveis a MMS (Figuras 1 e 2 do Anexo) e que *sgs1 Δ* é capaz de restaurar parcialmente esta sensibilidade. Esse resultado está de acordo com a hipótese de Gangloff et al. (1994b, 1999), de que ambas as proteínas estariam atuando sobre um mesmo substrato,

no caso, a lesão do DNA. Exceto para a sensibilidade a UVC, os mutantes *top3Δ* foram também bastante sensíveis aos danos oxidativos produzidos por H₂O₂ e às lesões produzidas pelo 4-NQO. Já os duplos e triplos mutantes apresentaram respostas distintas para esses agentes, sugerindo que a formação do complexo Sgs1/Rad16/Top3, ou Sgs1/Top3 e até mesmo Rad16/Top3 esteja relacionada com a especificidade da lesão.

A função da topoisomerase 3 em processos que envolvem metabolismo de DNA já é bastante conhecida. Mutantes *top3Δ* apresentam uma variedade de fenótipos, como alterações no seu ciclo celular, eventos de hiper-recombinação, expressão anormal de genes, pobre capacidade de cruzamento, instabilidade cromossômica e ausência de esporulação (Gangloff et al. 1994a, 1996, revisado por Duguet 1997 e por Gangloff et al. 1999). Essa proteína não é essencial ao crescimento vegetativo (ciclo mitótico), porém sua função é requerida para completar a primeira fase do ciclo meiótico. Segundo Gangloff et al. (1999), uma possível explicação seria que a Top3 resolveria intermediários de recombinação, envolvendo cromossomas homólogos. Esses autores também demonstraram, que embora a ausência de Sgs1 suprima totalmente os fenótipos mitóticos dos mutantes *top3Δ*, na meiose essa seria a primeira evidência onde o complexo Sgs1/Top3 estaria dissociado. Essa conclusão partiu da observação que a porcentagem de tétrades nos duplos mutantes *top3sgs1Δ* é extremamente baixa (~1-2%), comparada com a dos simples mutantes *sgs1Δ* (~30%). Portanto, na meiose, a Top3 atuaria sobre substratos diferentes dos da helicase Sgs1. Esta visão está de acordo com a idéia de que Top3 e Sgs1 atuariam juntos na terminação da replicação (tanto na mitose quanto na meiose) e Top3 atuaria sozinha na resolução de algumas junções duplas de Holliday, que nada mais são que intermediários de recombinação meiótica (Gangloff et al. 1999).

Nossos resultados caminham nesta mesma direção, sugerindo também que, para determinados tipos de lesões, a presença da proteína Rad16 é essencial para a função exercida por Sgs1 e Top3.

4. Pso5/Rad16 exerce um papel no envelhecimento

Uma vez que a divisão celular em levedura acontece de maneira assimétrica, torna-se possível separar microscopicamente, através da técnica de micromanipulação, as células mãe e filha após cada divisão. Esses experimentos permitem identificar o número de vezes que cada célula mãe dá origem às filhas e esse processo é denominado de “tempo de geração” (Kennedy et al. 1994).

No capítulo I é mostrado que a linhagem *rad16Δ* apresenta uma redução significativa no seu tempo de geração e a dupla mutação *rad16Δsgs1Δ* comporta-se como a haplóide mutante *sgs1Δ*. Esses resultados demonstram mais uma interação epistática entre os genes *PSO5/RAD16* e *SGS1*.

Recentemente, Park et al. (1999) mostraram que *RAD7*, o gene que atua juntamente com *RAD16* na reparação de regiões silenciosas e não transcritas do genoma e que interage física e geneticamente com *RAD16* (Guzder et al. 1997), não está implicado em envelhecimento. Esses autores verificaram que linhagens mutantes *rad7* não apresentaram alteração no seu tempo de geração. O envolvimento de outras mutações *RAD* no tempo de geração também foi estudado por eles. Observou-se que *rad1*, o qual está implicado no anelamento de DNA fita simples do NER (Ivanov et al. 1995, 1996), assim como *rad26*, que é defectivo na reparação acoplada à transcrição (Van Gool et al. 1994), não apresentaram seu tempo de geração alterado. Por outro lado, verificou-se que o tempo de geração dos mutantes *rad52* (média de 7.1 gerações) é ainda mais curto que dos mutantes *sgs1* (média de 9.8 gerações), enquanto que a dupla mutação *sgs1rad52* apresenta um tempo de geração menor que o simples mutante *rad52* (média de 5.5 gerações). Esse resultado indica então um efeito sinérgico entre as duas mutações (Park et al. 1999).

5. O envelhecimento e suas teorias

Atualmente, há duas correntes de teorias sobre o envelhecimento. Uma delas é a teoria dos danos múltiplos (*multi-hit theory*), a qual defende a idéia que são os vários tipos de lesões que o DNA acumula, causadas tanto por agentes endógenos quanto exógenos, a causa do envelhecimento. A outra sugere que o envelhecimento está ligado a influências genéticas que estão intimamente relacionadas com o metabolismo e ciclo celular (Sinclair et al. 1998b, Jawinski 1999). Apesar dessas duas teorias não serem mutualmente exclusivas, pois é possível por exemplo, que danos oxidativos conduzam ao início de um programa genético, elas são sempre discutidas separadamente.

A hipótese dos danos múltiplos postula que o envelhecimento seja devido, em parte, ao acúmulo de danos oxidativos moleculares irreversíveis (Pacifci e Davies 1991, Harman 1994, Martin et al. 1996, revisado por Sinclair et al. 1998b, Johnson et al. 1999). O oxigênio molecular pode gerar um número de moléculas reduzidas parcialmente e espécies reativas de oxigênio (ERO), as quais levam a danos extensivos, como modificação no DNA, peroxidação lipídica e aumento da degradação e inativação proteica (revisado em Sohal e Weindruch 1996).

A hipótese de que o envelhecimento é determinado geneticamente postula que os organismos são programados a envelhecer após a reprodução, através de um processo que é a extensão do desenvolvimento. Uma forma desta teoria prediz que há um relógio genético governando o aparecimento dos fenótipos associados ao envelhecimento. Esta teoria também apóia a idéia de que os genes envolvidos com a manutenção das funções celulares eventualmente tornam-se desregulados, o que resulta no envelhecimento do organismo (revisado por Sinclair et al. 1998b).

Apesar do tamanho celular não ter ligação direta com o tempo de geração de um organismo, por outras razões as células tornam-se metabolicamente e fisiologicamente menos robustas, até serem incapazes de suportar o processo de divisão celular. Essa incapacidade pode resultar

do acúmulo de danos no DNA e nas proteínas ou da redução de síntese proteica, além de outras causas (Sinclair et al. 1998b).

Quando as células envelhecem, elas tornam-se estéreis e esse é um dos fenótipos mais bem conhecidos do envelhecimento em *S. cerevisiae*. Essa esterilidade é causada pela perda do silenciamento do locus de acasalamento *HMRa* e *HMR α* , o que resulta na expressão simultânea de ambas informações a e α para o acasalamento (Smeal et al. 1996). Essa perda do silenciamento é causada pela realocização da proteína Sir3, a qual é responsável pela regulação dessa informação silenciosa, e talvez de Sir4, para o nucléolo nas células envelhecidas (Kennedy et al. 1997, Sinclair et al. 1998).

Outra biomarca para o envelhecimento em levedura é a fragmentação do nucléolo, o qual é uma estrutura nuclear que contém genes de RNA ribossomal (rDNA), além de outros componentes necessários para o complexo ribossomal (Melese e Xue 1995). O rDNA de levedura, localizado no cromossoma XII, contém 100-200 cópias repetidas de uma unidade de 9.1 Kb e aparece perto da periferia do núcleo, numa forma mais ovalada (Petes 1979, Schimmang et al. 1989, Rutchenko e Sherman 1994). Entretanto, as células envelhecidas de levedura apresentam um nucléolo maior e fragmentado em estruturas múltiplas e circulares (Sinclair et al. 1997).

Postula-se que a fragmentação do nucléolo e a redistribuição de Sir3p podem estar relacionadas, uma vez que a realocização das proteínas Sir ao nucléolo pode atrasar ou diminuir o dano que, eventualmente, leva à fragmentação (Sinclair et al. 1998a, 1998b). Essa hipótese é suportada por várias observações: a) o rDNA é considerado um alvo nato para o silenciamento; b) a deleção dos genes *SIR2*, *SIR3* ou *SIR4* reduz dramaticamente o tempo de geração (Kennedy et al. 1995); c) foi mostrado, recentemente, que as proteínas Sir estão implicadas com a reparação de quebras duplas no DNA (Tsukamoto et al. 1997).

Sinclair e Guarente (1997) mostraram que à medida que a célula de *S. cerevisiae* envelhece, começa a haver o acúmulo de círculos de rDNA

extracomossomais, os ERCs, enquanto que células jovens são livres de ERCs. Além disso, eles mostraram que linhagens mutantes *sgs1* acumulam ERCs numa velocidade muito mais rápida que linhagens selvagens, sugerindo ser essa a causa do envelhecimento em levedura (ver Figura 9). Baseado neste modelo, Park et al. (1999) mostraram que os ERCs podem ser gerados através de recombinação homóloga no rDNA, ou seja, por um mecanismo via RAD52. Entretanto, mutantes *rad52*, apesar de possuírem um tempo de geração até mais curto que *sgs1*, não acumulam ERCs, sugerindo então que é o acúmulo das quebras duplas não reparadas por esses mutantes, a cauda da sua morte prematura.

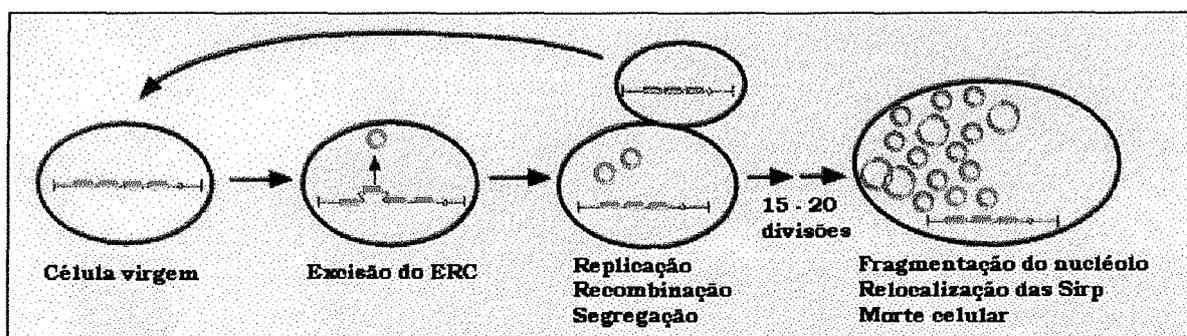


Figura 9. Representação do modelo de formação dos círculos extracomossomais de rDNA (segundo Guarente et al. 1998).

O fato de *pso5/rad16* ser, até o momento, o único mutante de reparação de excisão/ressíntese (via RAD3) que apresentou um tempo de geração reduzido requer uma observação mais cuidadosa. É possível que essa redução seja devido exclusivamente ao acúmulo de danos não reparados, resultando na perda de sua viabilidade celular. Mas essa também é uma confirmação de que a morte prematura pode ter outras causas que não estejam relacionadas com a formação de ERCs.

6. Proposta de um modelo

A interação entre as proteínas Pso5/Rad16 e Sgs1, associada ao fato de Sgs1 interagir com TopIII e TopII, leva-nos a complementar o modelo proposto por Chakraverty e Hickson (1999), apresentado na Figura 10. Quando as células são expostas a qualquer tipo de lesão, acontece uma parada na forquilha de replicação e a célula precisa, então, integrar vários processos enzimáticos, que atuem não somente em parada do ciclo celular, mas também na replicação do DNA, recombinação e outras vias de reparação. Uma vez que as helicases e topoisomerases possuem a capacidade de gerar e processar substratos de DNA até intermediários de DNA simples fita, o complexo dessas proteínas Sgs1/Top3 ou Sgs1/Rad16 ou até mesmo de Sgs1/Top3/Rad16 pode exercer um papel central nesta rede de várias vias. A interação destas proteínas pode levar a dois processos que não são mutualmente exclusivos: eles atuariam na preparação das lesões de DNA das regiões silenciosas e não transcritas, canalizando a reparação para a via recombinacional RAD52, e na ausência desta, para a recombinação ilegítima, mediada pelas proteínas yKu e Sir3. Assim, gerariam estruturas que atuariam a parada do ciclo celular, prevenindo dessa forma a formação de novas estruturas erradas (ou distorcidas). Esse modelo poderia explicar a reparação das lesões produzidas pelo agente alquilante MMS, por exemplo, em que lesões do tipo 3-metiladenina bloqueiam a replicação do DNA, que possui extremidades de fita simples (Xiao et al. 1996).

De uma forma mais resumida, as helicases e topoisomerases poderiam servir para coordenar respostas celulares que garantam a integridade do DNA durante a sua síntese (Chakraverty e Hickson 1999).

No modelo proposto por Park et al (1999) para o envelhecimento, a helicase Pso5/Rad16, juntamente com as suas proteínas interatoras, teria o papel de desenrolar a dupla hélice de DNA nas regiões silenciosas e não transcritas do genoma. Alternativamente, esses complexos proteicos remodelariam a estrutura da cromatina, para dar acesso às demais

enzimas para completar a reparação de lesões geradas durante a replicação de DNA.

Não se pode esquecer da interação entre Sir3 e Rad7, mostrada por Paetkau et al. (1994), a qual serviria como outra alternativa para a célula evitar os DSB e compensar a ausência de recombinação homóloga. Rad7, ao interagir com o Sir3, pode possibilitar a canalização do substrato intermediário de reparação gerado por Rad16, para ser terminado via recombinação ilegítima.

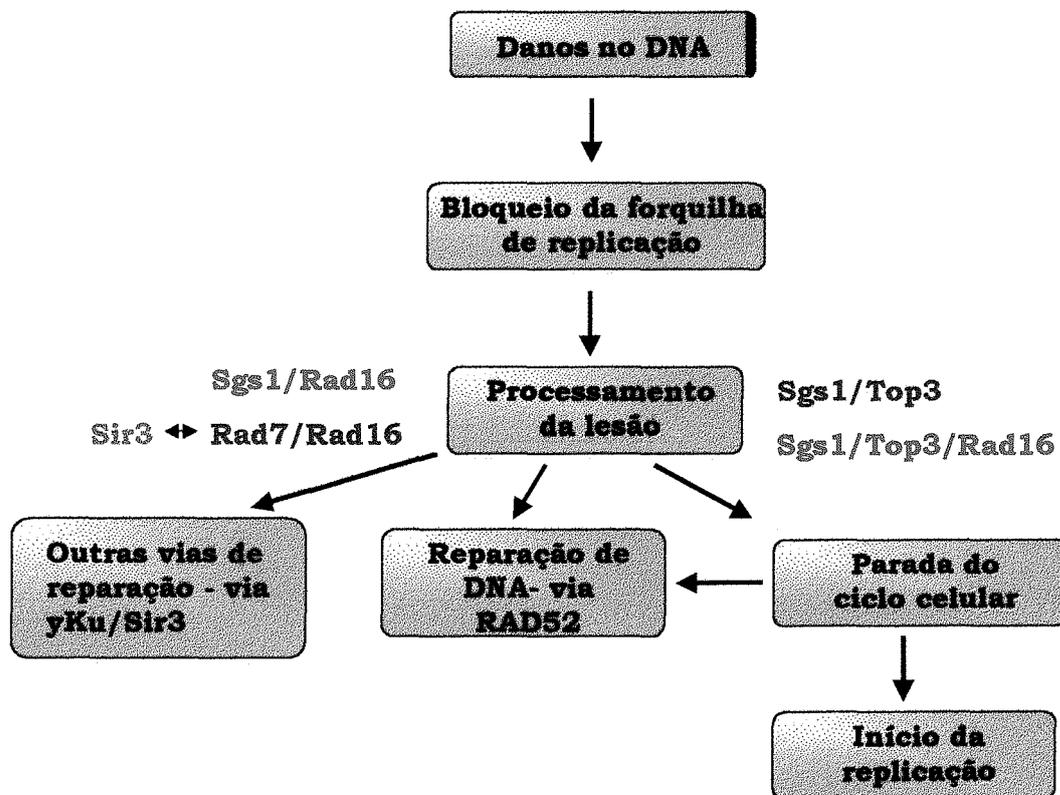


Figura 10. Modelo proposto para a função e interação entre as proteínas Pso5/Rad16, Sgs1 e Top3 (adaptado de Chakraverty e Hickson 1999). Em vermelho, estão as interações propostas, as quais seriam formadas em função do substrato gerado. Em azul, os complexos que já foram mostrados em outros trabalhos. O processamento das estruturas aberrantes conduziria a reparação para suas diferentes vias. Na ausência de determinadas proteínas, este processo ficaria comprometido, levando ao acúmulo de lesões, como de DSB, ocasionando assim, a morte prematura.

CONCLUSÕES

1. Conclusão Geral

Os resultados apresentados neste trabalho demonstram a existência de interação física e genética entre duas helicases pertencentes a famílias diferentes, a proteína Pso5/Rad16 e a Sgs1. Além disso, mostram que a função helicase de Sgs1, assim como a Topoisomerase III, exercem importante papel em reparação do DNA.

2. Conclusões específicas

- O método escolhido para o estudo das interações proteicas de Pso5/Rad16, o “interaction trap”, foi adequado e através dele mostrou-se a interação entre uma proteína de reparação de DNA com outra de envelhecimento, a Sgs1.
- A proteína Sgs1 está relacionada com reparação de DNA, assim como a Topoisomerase III, especialmente em lesões causadas por alquilações no DNA.
- A função helicase de Sgs1 é importante para o papel que ela exerce em reparação de DNA, assim como para o fenótipo de sensibilidade a hidroxiuréia, sugerindo uma função desta proteína em parada do ciclo celular.
- O gene *PSO5/RAD16* pode exercer algum papel em envelhecimento precoce na levedura, uma vez que o mutante *rad16* apresentou um “tempo de geração” significativamente menor que a linhagem selvagem.
- Provavelmente, os complexos Sgs1/Rad16, como também de Sgs1/Rad16/Top3, e Sgs1/Top3 são responsáveis por processar lesões no DNA, com especificidade ao substrato.

PERSPECTIVAS

Seria de extrema relevância completar o trabalho apresentado no Anexo I, fazendo curvas de sobrevivência para os agentes testados, como MMS, UVC, 4-NQO e H₂O₂ com aqueles mutantes utilizados, afim de se confirmar os efeitos de epistasia e/ou sinergismo entre os mesmos.

A tentativa de obtenção do duplo mutante *rad16top3Δ* é bastante importante, para a comprovação da interação genética entre as proteínas. Uma maneira simples seria através de cruzamentos genéticos com os simples mutantes *rad16Δ* e *top3Δ*, obtenção da linhagem diplóide, seguida pela esporulação e dissecação das tétrades.

Além disso, poderia-se analisar, especificamente, o envolvimento do gene *SGS1* em alguma das três vias de reparação em *S. cerevisiae*. Para tal, propõe-se a construção de duplos mutantes de *sgs1rad52Δ*, *sgs1rad6Δ* e *sgs1rad3Δ* para se analisar as respostas fenotípicas destes com as dos respectivos simples mutantes para diferentes agentes genotóxicos.

De igual importância seria verificar a instabilidade genômica de mutantes *rad16Δ* e *rad16sgs1Δ*, bem como dos mutantes *rad16top3Δ*, *top3Δ*, e *rad16sgs1top3Δ*, medindo-se as freqüências de recombinação no rDNA desses mutantes.

A complementação da sensibilidade dos mutantes *sgs1Δ*, *sgs1-ct* e *sgs1-hd* à MMS, UVC, 4-NQO, HN₂ e H₂O₂ pelos genes humanos *BLM* e *WRN* em plasmídeos de cópias simples e múltiplas seria uma investigação bastante pertinente, em função dos resultados já obtidos por Yamagata et al. (1998). Esses autores demonstraram a complementação da sensibilidade de mutantes *sgs1* para hidroxiuréia com o domínio helicase de *BLM*.

Os estudos bioquímicos com a proteína codificada pelo gene *PSO5/RAD16* são inevitáveis. Embora ela seja uma helicase "putativa", ainda não há estudos que demonstrem essa função *in vitro*. Portanto, não se sabe ainda a direção em que ela percorre a fita de DNA. Através de experimentos de fluorescência, seria possível visualizar também a

localização de Pso5/Rad16p dentro da célula. Será que ela também encontra-se no nucléolo, como acontece com a proteína Sgs1?

Como foi mostrado no capítulo I que *rad16* envelhece mais prematuramente que uma linhagem selvagem, é válido verificar a formação e acúmulo dos círculos de rDNA em células envelhecidas desses mutantes. Dessa forma, poderia-se descobrir se eles envelhecem através de um mecanismo igual ao dos mutantes *sgs1*, ou se apenas morrem prematuramente em função do acúmulo de danos no DNA, como acontece com os mutantes *rad52*.

RESUMO E ABSTRACT

1. RESUMO

O gene *PSO5*, alelo ao *RAD16* de *Saccharomyces cerevisiae* pertence a via de reparação de DNA excisão/ressíntese, também chamada de via *RAD3*. Este gene está implicado na reparação de lesões do tipo dímeros de pirimidina, induzidas por radiação UV, em regiões não transcritas e silenciosas do genoma, assim como em reparação de lesões oxidativas e adutos de psoraleno fotoativados. A proteína codificada por este gene pertence à família *SNF2* de helicases. Neste trabalho, utilizou-se o sistema di-híbrido com o objetivo de buscar candidatos a possíveis interatores para a proteína Rad16.

O sistema di-híbrido consiste de um ensaio genético desenvolvido na própria levedura, que proporciona não apenas o estudo entre interações proteicas, como também favorece o estudo dos domínios ou resíduos que podem ser críticos para que a interação aconteça. Após o *screening* com um banco genômico de *S. cerevisiae*, obteve-se três seqüências codificantes diferentes, sendo uma delas relativa ao gene *SGS1*, com o qual prosseguiu-se o trabalho.

A proteína Sgs1 também é uma helicase, porém pertencente a família *RecQ* de *E. coli*. Ela interage com as topoisomerasas II e III e está envolvida com o envelhecimento precoce em levedura. Em humanos, apresenta homologia com as proteínas *Wrn* e *Blm*, responsáveis pelas "Síndrome de Werner" e "Síndrome de Bloom", relacionadas, respectivamente, com os fenótipos de envelhecimento precoce e predisposição ao câncer.

No Capítulo I, demonstra-se que a interação entre as proteínas Sgs1 e Rad16 é física e genética. Através de estudos com mutantes simples e duplos, mostra-se que o gene *SGS1* exerce um papel importante em reparação de DNA. Isso é devido ao fato que os mutantes *sgs1* foram sensíveis a agentes alquilantes, como *MMS* e *HN2*, bem como a radiação *UVC*, ao UV-mimético 4-*NQO* e a *H₂O₂*. Observou-se uma interação epistática entre *RAD16* e *SGS1* para alguns destes agentes testados. Além disso, verificou-se que o tempo de geração de uma linhagem mutante *rad16* é menor do que uma linhagem selvagem correspondente, sugerindo que o produto deste gene possa estar relacionado também com o envelhecimento precoce.

Com a finalidade de estudar qual o domínio da proteína Sgs1 pudesse estar relacionado com reparação de DNA, utilizaram-se linhagens

sgs1, contendo mutações nos seus domínios helicase e C-terminal. No Capítulo II, demonstra-se que a função helicase é responsável pela maioria dos fenótipos de sensibilidade aos agentes genotóxicos testados, bem como pela sensibilidade de *sgs1* a hidroxauréia.

O fato de Sgs1 interagir também com Top3 levou-nos a estudar o papel desta topoisomerase também em reparação de DNA. No Anexo, apresenta-se os resultados de sensibilidade de simples, duplos e triplos mutantes para os genes *SGS1*, *TOP3* e *RAD16*. As diferentes respostas obtidas para cada agente mutagênico testado, leva-nos a concluir que estas proteínas estejam envolvidas em reparação de lesões específicas, destacando-se a importância de Top3 na reparação de alquilações do DNA.

2. ABSTRACT

The *Saccharomyces cerevisiae* *PSO5* gene, allelic to *RAD16*, belongs to the excision-resynthesis DNA repair pathway that is also called RAD3. This gene is involved in the repair of UV-induced pyrimidine dimers of the non-transcribed and silent regions of the genome, as well as in oxidative damage repair and photoactivated psoralen adducts. The encoding protein belongs to the SNF2 family of helicases. In this work, the two-hybrid system was used in order to search putative interactors for the Rad16 protein.

The two-hybrid system is a yeast-based genetic assay for detecting not only protein interactions, but also to delineate domains or residues critical for the interaction. After a screening with a *S. cerevisiae* genomic library, three encoding sequences were identified, one of these was *SGS1*, used for further study.

The Sgs1 protein is also a helicase, but belongs to the *E.coli* RecQ family. It interacts with both topoisomerases II and III and is involved in yeast premature aging. In humans, it shows homology with Wrn and Blm proteins, which are responsible for the Werner Syndrome and the Bloom Syndrome, related to premature aging and to predisposition to cancer phenotypes, respectively.

In Chapter I, it is shown that the proteins Sgs1 and Rad16 interact physically and genetically. The study of single and double mutants has demonstrated that *SGS1* gene has an important role in DNA repair. This is due to the fact that *sgs1* mutants were sensitive to alkylating agents, like MMS and HN2, as well as to UVC radiation, to UV-mimetic 4-NQO and to H₂O₂. An epistatic interaction between *RAD16* and *SGS1* was observed after treatment with some of these agents. Additionally, it was verified that the life span of a *rad16* mutant strain is lower than its corresponding wild type, suggesting that the gene product could also be implicated with premature aging.

In order to study which domain of Sgs1 could be related to DNA repair, different *sgs1* strains were used, containing mutations in the helicase and C-terminal domains. In Chapter II, it is shown that the helicase function is responsible for most mutagen sensitivity phenotypes, and also to the *sgs1* sensitivity to hydroxyurea.

The fact that Sgs1 interacts with Top3, led us to study the role of topoisomerase III in DNA repair. In the Appendix, the results of sensitivity

tests of single, double and triple mutants for *SGS1*, *TOP3* and *RAD16* genes is shown. The different responses obtained for each mutagen tested, lead us to conclude that these proteins are involved in the repair of specific DNA lesions, emphasizing the important role of Top3 in the repair of DNA alkylations.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABOUSSEKHRA A, CHANET R, ZGAGA Z, CASSIER-CHAUVAT C, HEUDE M and FABRE F (1989) RADH, a gene of *Saccharomyces cerevisiae* encoding a putative DNA helicase involved in DNA repair. Characteristics of *radH* mutants and sequence of the gene. *Nucleic Acids Res* 17: 7211-7220.
- ABOUSSEKHRA A, WOOD RD (1994) Repair of UV-damaged DNA by mammalian and *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Opin Genet Dev* 4: 212-220.
- AVERBECK D (1989) Recent advances in psoralen phototoxicity mechanism. *Photochem Photobiol* 50: 859-882.
- AVERBECK D, DARDALHON M, MAGAÑA-SCHWENCKE, MEIRA LB, MENIEL V (1992) New aspects of the repair and genotoxicity of psoralen photoinduced lesions in DNA. *J Photochem Photobiol, B: Biol* 14: 47-63.
- BAI Y and SYMINGTON LS (1996) A RAD52 homolog is required for RAD51-independent mitotic recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev* 10: 2025-2037.
- BAILLY V, LAMB J, SUNG P, PRAKASH S and PRAKASH L (1994) 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: 811-820.
- BANG DD, VERHAGE R, GOOSEN N, BROUWER J, VAN DE PUTE P (1992) Molecular cloning of RAD16, a gene involved in differential repair in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res* 20: 3925-3931.
- BARDWELL AJ, BARDWELL L, IYER M, SVEJSTRUP JQ, FEAVER WJ, KORNBERG RD and FRIEDBERG EC (1994a) The yeast nucleotide

excision repair proteins Rad2 and Rad4 interact with RNA polymerase II basal transcription factor b. *Mol Cell Biol* 14: 3569-3576.

BARDWELL AJ, BARDWELL L, WANG Z, SIEDE W, REAGAN MS, TOMKINSON AE, FRIEDBERG AS, PITTENGER C, FEAVER WJ, SVEISTRUP J, KORNBERG RD, FRIEDBERG EC (1994b). Recent insights on DNA repair: the mechanism of damaged nucleotide excision in eukaryotes and its relationship to other cellular processes. *Annals New York Acad Sci* 726: 281-291.

BARDWELL L, COOPER AJ, FRIEDBERG EC (1992) Stable and specific association between the yeast recombination and DNA repair proteins Rad1 and Rad10 *in vitro*. *Mol Cell Biol* 12: 3041-3049.

BARTEL PL and FIELDS S (1997). The yeast two-hybrid system. Oxford University Press, New York.

BARTEL PL, ROECKLEIN JA, SENGUPTA D and FIELDS S (1996). A protein linkage map of *Escherichia coli* bacteriophage T7. *Nature Genetics* 12: 72-77.

BENATEN A and BEAM CA (1977) The genetic control of X-ray resistance of budding yeast cells. *Radiat Res* 69: 91-116.

BENETT RJ, SHARP JA e WANG JC (1998) Purification and characterisation of the Sgs1 DNA helicase activity of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 273: 9644-9650.

BERANEK DT (1990) Distribution of methyl and ethyladducts following alkylation with monofunctional alkylating agents. *Mutat Res* 231: 11-30.

- BRENDEL M and RUHLAND A (1984) Relationships between functionally and genetic toxicology of selected DNA-damaging agents. *Mutat Res* 133: 51-85.
- BRENDEL M, GREY M, MARIS AF, HIETKAMP J, FESÜS Z, PICH CT, DAFRÉ A, SCHMIDT M, ECKARDT-SCHUPP F and HENRIQUES JAP (1998) Low glutathione pools in the original *pso3* mutant of *Saccharomyces cerevisiae* are responsible for its pleiotropic sensitivity phenotype. *Curr Gent* 33: 4-9.
- BRENT R and PTASHNE M (1985). A eukaryotic activator bearing the DNA specificity of a prokaryotic repressor. *Cell* 43: 729-736.
- BURDON RH (Ed)(1999) Genes and the environment. TJ International Ltd, Padstow, UK.
- CADENAS E (1989) Biochemistry of oxygen toxicity. *Ann Rev Biochem* 58: 79-110.
- CADET J, DELATOUR T, DOUKI T, GASPARUTTO D, POUGET JP, RAVANAT JL and SAUVAIGO S (1999) Hydroxyl radicals and DNA base damage. *Mutat Res* 424: 9-21.
- CASSIER C and MOUSTACCHI E (1981) Mutagenesis induced by mono- and bi-functional alkylating agents in yeast mutants sensitive to photoaddition of furocumarins (*pso*) *Mutat Res* 84: 37-47.
- CASSIER C, CHANET R, HENRIQUES JAP and MOUSTACCHI E (1980) The effects of the three *PSO* genes on induced mutagenesis: a novel class of mutationally defective yeast. *Genetics* 100: 841-857.

- CASSIER-CHAUVAT C and MOUSTACCHI E (1988) Allelism between *pso1-1* and *rev3-1* mutants and between *pso2-1* and *sum1* mutants in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Genet* 13: 37-40.
- CHAKRAVERTY RK and HICKSON ID (1999) Defending genome integrity during DNA replication: a proposed role for RecQ family helicases. *BioEssays* 21: 286-294.
- CHAN GL, DOETSCH PW and HASELTINE WA (1985) Cyclobutane pyrimidine dimers and (6-4) photoproducts block polymerization by DNA polimerase I. *Biochemistry* 24: 5723-5728.
- CHASMAN DI, LEATHERWOOD J, CAREY M, PTASHNE M, KORNBERG RD (1989) Activation of yeast polymerase II transcription by herpesvirus VP16 and GAL4 derivatives in vitro. *Mol Cell Biol* 9: 4746-4749
- CHEN HR, JAN, S-P, TSAO TY, SHEU Y-J, BANROQUES J and CHENG S-C (1998). Snt309p, a component of the Prp19p-associated complex that interacts with Prp19p and associates with the spliceosome simultaneously with or immediately after dissociation of U4 in the same manner as Prp19p. *Mol Cell Biol* 18: 2196-2204.
- CHENG SC, TARN W-Y, TSAO TY and ABELSON J (1993) Prp19: a novel spliceosomal component. *Mol Cell Biol* 13: 1876-1882.
- CHIEN CT, BARTEL PL, STERNGLANZ R and FIELDS S (1991). The two-hybrid system: a method to identify and clone genes for proteins that interact with a protein of interest. *Proc Nat Acad Sci USA* 88: 9578-9582.
- CLEVER B, INTERTHAL H, SCHMUCKLI-MAURER J, KING J, SIGRIST M and HEYER W-D (1997) Recombinational repair in yeast: functional

interactions between Rad51 and Rad54 proteins. *EMBO J.* 16: 2535-2544.

COX BS and PARRY JM (1968) The isolation, genetics and survivor characteristics of ultraviolet light sensitive mutants in yeast. *Mutat Res* 6: 37-55.

DALTON S and TREISMAN R (1992) Characterisation of SAP-1, a protein recruited by serum response factor to the c-fos serum response element. *Cell* 68: 597-612.

DAVEY S, HAN CS, RAMER SA, KLASSEN JC, JACOBSON A, EISENBERGER A, HOPKINS KM, LIEBERMAN HB, FREYER GA (1998) Fission yeast rad12+ regulates cell cycle checkpoint control and is homologous to the Bloom's syndrome disease gene. *Mol Cell Biol* 18: 2721-2728.

DAVIES AA, FRIEDBERG EC, TOMKINSON AE, WOOD RD WEST SC (1995) role of the Rad1 and Rad10 proteins in nucleotide excision-repair and recombination. *J Biol Chem* 270: 24638-24641.

DIZDAROGLU M (1993) Chemistry and measurement of damage to DNA and nucleoproteins. In: Halliwell, B and Aruoma OI (Eds) *DNA and Free Radicals*. Sussex: Ellis Horwood Limited.

DIZDAROGLU M and KARAKAYA AE (1999) Advances in DNA damage repair. Oxygen radical effects, cellular protection, and biological consequences Vol 302. *NATO Sci Affairs Div*, NewYork, USA.

DOLGANOV GM *et al.* (1996) Human Rad50 is physically associated with human Mre11: identification of a conserved multiprotein complex implicated in recombinational DNA repair. *Mol Cell Biol* 16: 4832-4841.

- DREES BL (1999) Progress and variations in the two-hybrid and three-hybrid technologies. *Curr Opin Chem Biol* 3: 64-70.
- DUGUET M (1997) When helicase and topoisomerase meet! *J Cell Sci* 110: 1345-1350.
- DURFEE T, BECHERER K, CHEN PL, YEH SH, YANG Y, KILBURN AE, LEE WH, Elledge SJ (1993). The retinoblastoma protein associates with the protein phosphatase type I catalytic subunit. *Genes Dev* 7: 555-569.
- EISEN JA, SWEDER KS, HANAWALT PC (1995) Evolution of the SNF2 family of proteins: subfamilies with distinct sequences and functions. *Nucleic Acids Res* 23: 2715-2723.
- ELLIS NA, GRODEN J, YE TZ, STRAUGHEN J, LENNON DJ, CIOCCI S, PROYTCHIEVA M and GERMAN J (1995) The Bloom syndrome gene product is homologous to RecQ helicases. *Cell* 83: 655-666.
- EPE B (1991) Genotoxicity of singlet oxygen. *Chem Biol Interact* 80: 239-260.
- FEATHERSTONE C and JACKSON SP (1999) Ku, a DNA repair protein with multiple cellular functions? *Mutat Res* 434: 3-15.
- FEAVER WJ, SVEJSTRUP JQ, BARDWELL L, BARDWELL AJ, BURATOWSKI S, GULYAS KD, DONAHUE TF, FRIEDBERG EC, KOMBERG RD (1993) Dual roles of a multiprotein complex from *S. cerevisiae* in transcription and DNA repair. *Cell* 75: 1379-1387.
- FELDMANN HM and WINNACKER E-L (1993) A putative homologue of the human autoantigen Ku from *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 268: 12895-12900.

- FELDMANN HM, DRILLER L, MEIER L, MAGES G, KELLERMANN J and WINNACKER E-L (1996) HDF2, the second subunit of the Ku Homologue from *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 271: 27765-27769.
- FIELDS S and SONG O (1989) A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature* 340: 245-246.
- FIELDS S and STERNGLANZ R (1994) The two-hybrid system: an assay for protein-protein interactions. *Trends Genet.* 10: 286-289.
- FINLEY RL Jr and BRENT R (1994) Interaction mating reveals binary and ternary connections between *Drosophila* cell cycle regulators. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 12980-12984.
- FINLEY RL Jr and BRENT R (1995) Interaction trap cloning with yeast. In *DNA Cloning 2, Expression Systems: A Practical Approach*, BD Hames and DM Glover (Eds) Oxford, Oxford University Press pp. 169-203.
- FINLEY RL Jr and BRENT R (1997) Two-hybrid analysis of genetic regulatory networks. In *The yeast two-hybrid system* PL Bartel and S Fields (Eds). New York, Oxford, Oxford University Press pp. 197-214.
- FRIDOVICH I (1998) Oxygen toxicity: a radical explanation. *J Exp Biol* 201: 1203-1209.
- FRIEDBERG EC (1991) *DNA repair*. Ron Newcomer & Associates, San Francisco, USA.
- FRIEDBERG EC, WALKER GC and SIEDE W (1995) *DNA repair and mutagenesis*. ASM Press, Washington, USA.

- GAME JC (1993) DNA double-strand breaks and the *RAD50-RAD57* genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Semin. Cancer Biol.* 4: 73-83.
- GAME JC, ZAMB TJ, BRAUN RJ, RESNICK MA and ROTH RM (1980) The role of radiation (*rad*) genes in meiotic recombination in yeast. *Genetics* 94:51-68.
- GANGLOFF S, LIEBER MR and ROTHSTEIN R (1994a) Transcription, topoisomerases and recombination. *Experimentia* 50: 261-269.
- GANGLOFF S, MASSY B, ARTHUR L, ROTHSTEIN R and FABRE F (1999) The essential role of yeast topoisomerase III in meiosis depends on recombination. *EMBO J* 18: 1701-1711.
- GANGLOFF S, McDONALD J, BENDIXEN C, ARTHUR L and ROTHSTEIN R (1994b) The yeast type I topoisomerase Top3 interacts with Sgs1, a DNA helicase homologue: a potential eukaryotic reverse gyrase. *Mol Cell Biol* 14: 8391-8398.
- GANGLOFF S, ZOU H and ROTHSTEIN R (1996) Gene conversion plays the major role in controlling the stability of large tandem repeats in yeast. *EMBO J* 15: 1715-1725.
- GERMAN J (1993) Bloom syndrome: a mendelian prototype of somatic mutational disease. *Medicine* 72: 393-406.
- GERMAN J and ELLIS NA (1997) Bloom Syndrome. In: *Metabolic and molecular basis of inherited diseases*, ed. Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS and Valle D. New York: McGraw-Hill, 301-315.

- GOTTLIEB TM and JACKSON SP (1993) The DNA-dependent protein kinase: requirement for DNA ends and association with Ku antigen. *Cell* 72: 131- 142.
- GRAY MD, SHEN JC, KAMATH-LOEB AS, BLANK A, SOPHER BL et al. (1997). The Werner Syndrome protein is a DNA helicase. *Nat Genet* 17: 100-103.
- GRAY MD, WANG L, YOUSSEOUFIAN H, MARTIN GM and OSHIMA J (1998). Werner helicase is localized to transcriptionally active nucleoli of cycling cells. *Exp Cell Res* 242: 487-494.
- GREY M, DÜSTERHÖFT A, HENRIQUES JAP and BRENDDEL M (1996) Allelism of *PSO4* and *PRP19* links pre-mRNA processing with recombination and error-prone rDNA repair in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res* 24: 4009-4014.
- GUARENTE L (1996) Transcriptional coactivators in yeast and beyond. *Trends Biochem. Sci.* 20: 517-521.
- GUARENTE L, RUVKUN G and AMASINO R (1998) Aging, life span and senescence. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 11034-11036.
- GUZDER S, SUNG P, PRAKASH S and PRAKASH S (1997) Yeast Rad7-Rad16 complex, specific for the nucleotide excision repair of nontranscribed DNA strand, is a ATP-dependent DNA damage sensor. *J Biol Chem* 272: 21665-21668.
- GUZDER S, SUNG P, PRAKASH S and PRAKASH S (1998) The DNA-dependent ATPase activity of yeast nucleotide excision repair factor 4 and its role in DNA damage recognition. *J Biol Chem* 273: 6292-6296.

GUZDER SN, BAILLY V, SUNG P, P, PRAKASH L and PRAKASH S (1995a) Yeast DNA repair protein *RAD23* promotes complex formation between transcription factor *TFIIH* and DNA damage recognition factor *RAD14* *J Biol Chem* 270: 8385-8388.

GUZDER SN, HABRACKEN Y, SUNG P, PRAKASH L and PRAKASH S (1995b) Reconstitution of yeast nucleotide excision repair with purified Rad proteins, replication protein A, and transcription factor *TFIIH*. *J Biol Chem* 270: 12973-12976.

GUZDER SN, SUNG P, PRAKASH L and PRAKASH S (1999) Synergistic interaction between yeast nucleotide excision repair factors NEF2 and NEF4 in the binding of ultraviolet-damaged DNA. *J Biol Chem* 274: 24257-24262.

GUZDER SN, SUNG P, PRAKASH L, PRAKASH S (1993) Yeast Dna repair gene *RAD14* encodes a zinc metalprotein with affinity for ultraviolet-damaged DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 5433-5437.

GUZDER SN, SUNG P, PRAKASH S and PRAKASH S (1996) Nucleotide excision repair in yeast is mediated by sequential assembly of repair factors and not by a pre-assembled repairosome. *J Biol Chem* 271: 8903-8910.

GYURIS J, GOLEMIS E, CHERTKOV H, Brent R (1993) Cdi1, a human G1 and S phase protein phosphatase that associates with Cdk2. *Cell* 75: 791-803.

HABRAKEN Y, SUNG P, PRAKASH L, PRAKASH S (1993) Yeast DNA-repair gene *RAD2* encodes a single-stranded endonuclease. *Nature* 366: 365-368.

- HANAWALT PC, DONAHUE BA, SWEDER KS (1994) Repair and transcription. Collision or collusion? *Curr Biol* 4:518-21.
- HARLEY CB, FUTCHER AB and GREIDER CW (1990) Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature* 345: 458-460.
- HARMAN D (1994) Free-radical theory of aging: increasing the functional life span. *Ann NY Acad Sci* 717: 1-15.
- HARPER JW, ADAMI G, WEI N, KEYOMARSI K and ELLEDGE SJ (1993). The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. *Cell* 75: 805-816.
- HAYNES RH and KUNZ BA (1981) DNA repair and mutagenesis in yeast. In: STRATHERN JN, JONES EW, BROACH JR (eds) the molecular biology of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: life cycle and inheritance vol 1. *Cold Spring Harbor*. New york, pp 371-414.
- HAYS SL, FIRMINICH AA and BERG P (1995) Complex formation in yeast double-strand break repair: participation of Rad51, Rad52, Rad55 and Rad57 proteins. *Proc. Natl Acad Sci USA* 92: 6925-6929.
- HENRIQUES JAP and BRENDEL M (1990) The role of *PSO* and *SNM* genes in dark repair of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Genet* 18: 387-393.
- HENRIQUES JAP and MOUSTACCHI (1980) Isolation and characterisation of *pso* mutants sensitive to photoaddition of psoralen derivatives in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 95: 273-288.

- HENRIQUES JAP and MOUSTACCHI (1981) Interaction between mutations for sensitivity to psoralen photoaddition (*ps0*) and to radiation (*rad*) in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* 148: 248-256.
- HENRIQUES JAP, BROZMANOVA J and BRENDDEL M (1997) Role of *PSO* genes in the repair of photoinduced interstrand cross-links and photooxidative damage in the DNA of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Photochem Photobiol, B: Biology* 39: 185-196.
- HENRIQUES JAP, VICENTE EJ, da SILVA KVCL, SCHENBERG ACG and HENRIQUES JAP (1989) *PSO4*: a novel gene involved in error-prone repair in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mutat Res* 218: 111-124.
- HEYER WD and KOLODNER RD (1993) Enzymology of homologous recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 46: 221-271.
- HOELJMAKERS JHJ (1993) Nucleotide excision repair II: from yeast to mammals. *Trends Genet* 9: 211-217.
- HOPE IA and STRUHL K (1986) Functional dissection of a eukaryotic transcriptional activator protein, *GCN4* of yeast *Cell* 46: 885-894.
- IVANOV EL and HABER JE (1995) *RAD1* and *RAD10*, but not other excision repair genes, are required for double-strand break-induced recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 15: 2245-2251.
- IVANOV EL, SUGAWARA N, FISHMAN-LOBELL J and HABER JE (1996) Genetic requirements for the single-strand annealing pathway of double-strand break repair in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 142:693-704.

- JAWINSKI SM (1999) Molecular mechanisms of yeast longevity. *Trends Microbiol* 7: 247-252.
- JENTSCH S, McGRATH JP and VARSHAVSKY (1987) The yeast DNA repair gene *RAD6* encodes a ubiquitin-conjugating enzyme. *Nature* 329: 131-134.
- JOHSON FB, SINCLAIR DA and GUARENTE (1999) Molecular biology of aging. *Cell* 96: 291-302.
- JOHZUKA K and OGAWA H (1995) Interaction of Mre11 e Rad50: two proteins required for DNA repair e meiosis-specific double-strand break formation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 139: 1521-1532.
- JONES JS, PRAKASH L and PRAKASH S (1990) Regulated expression of the *Saccharomyces cerevisiae* DNA repair gene *RAD7* in response to DNA damage and during sporulation. *Nucleic Acids Res* 18: 3281-3285.
- JOSHI P and PATHAK MA (1983) Production of singlet oxygen and superoxid radicals by psoralens and their biological significance. *Biochem Biophys Res Commun* 112: 638-646.
- KANAAR R *et al.* (1996). Human and mouse homologs of the *Saccharomyces cerevisiae* *RAD54* DNA repair gene: evidence for functional conservation. *Curr Biol*. 6: 828-838.
- KANAAR R, HOEIJMAKERS JHJ and Van GENT DC (1998) Molecular mechanisms of DNA double-strand break repair. *Trends Cell Biol* 8: 483-489.
- KEEGAN L, GILL G and PTASHNE M (1986). Separation of the DNA binding from the transcription-activating function of a eukaryotic regulatory protein. *Science* 231: 699-704.

- KENNEDY BK, AUSTRIACO NR, ZHANG J and GUARENTE L (1995) Mutation of the silencing gene *SIR4* can delay aging in *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell* 80: 485-496.
- KENNEDY BK, GOTTA M, SINCLAIR DA, MILLS K, McNABB DS et al. (1997) Redistribution of silencing proteins from telomeres to the nucleolus is associated with extension of life span in *S. cerevisiae*. *Cell* 89: 381-391.
- KESZENMAN DJ, SANTOS JF, BOEIRA JM, SAFFI J and HENRIQUES JAP (1994) Heat shock changes the response of the *pso3* mutant of *Saccharomyces cerevisiae* to 8-methoxypsoralen photoaddition. *Curr Genet* 26: 100-104.
- KNOBLER RM, HÖNIGSMANN H and EDELSON RL (1988) Psoralen phototherapies, p. 117-148. In F.P. Gasparro (ed.) *Psoralen DNA Photobiology*. CRC Press, Inc., Boca Raton, Fla.
- KOHDA K, TAKA K, KASAI H, NISHIMURA S and KAWAZOE Y (1986) Formation of 8-hydroxyguanine residues in cellular DNA exposed to the carcinogen 4-nitroquinoline-1-oxide. *Biochem Biophys Res Commun* 139: 626-632.
- KUSANO K, BERRES ME and ENGELS WR (1999) Evolution of the RecQ family of helicases: a *Drosophila* homolog, *Dmblm*, is similar to the human bloom syndrome gene. *Genetics* 151: 1027-1039.
- LARIMER FW, PERRY JR and HARDIGREE AA (1989) The *REV1* gene of *Saccharomyces cerevisiae*: isolation, sequence and functional analysis. *J Bacteriol* 171: 230-237.

- LAWLEY PD (1989) Mutagens as carcinogens: development of current concepts. *Mutat Res* 213: 3-25.
- LAWRENCE CW and CHRISTENSEN (1979) Metabolic suppressors of trimethrofin and ultraviolet light sensitivities of *Saccharomyces cerevisiae rad6* mutants. *J Bacteriol* 139: 866-876.
- LEADON AS and LAWRENCE DA (1992) Strand-selective repair of DNA damage in the yeast *GAL7* gene requires RNA polymerase II. *J Biol Chem* 167: 23175-23182.
- LEES-MILLER SP (1996) The DNA dependent protein kinase, DNA-PK: 10 years and no ends in sight. *Biochem Cell Biol* 74: 503-512.
- LI B and FIELDS S (1993). Identification of mutations in p53 that affect its binding to SV40 large T antigen by using the yeast two-hybrid system *FASEB J.* 7: 957-963.
- LI L, ELLEDGE SJ, PETERSON CA, BALES ES and LEGERSKI RJ (1994) Specific association between the human DNA repair proteins XPA and ERCC1. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 5012-5016.
- LIPPKE JA, GORDON LK, BRASH DE and HASELTINE WA (1981) Distribution of UV light-induced damage in a defined sequence of human DNA: detection of alkaline-sensitive lesions at pyrimidines nucleoside-cytidine sequences. *Proc Natl Acad Sci USA* 78: 3388-3392.
- LU J, MULLEN JR, BRILL SJ, KLEFF S, ROMEO M e STERNGLANZ R (1996) Human homologues of yeast helicase. *Nature* 383: 678-679.
- MACHADO CR and MENCK CFM (1997) Human DNA repair diseases: from genome instability to cancer. *Bras J Genet* 20: 755-762.

- MARCINIAK RA, LOMBARD DB, JOHNSON FB and GUARENTE L (1998) Nucleolar localization of the Werner syndrome protein in human cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 6887-6892.
- MARTIN GM, AUSTAD SN and JOHNSON TE (1996) Genetic analysis of ageing: role of oxidative damage and environmental stresses. *Nat Genet* 13: 25-34.
- MATSUOKA S, EDWARDS M, BAI C, PARKER S, ZHANG P, BALDINI A, HARPER JW and ELLEDGE SJ (1995), p57^{KIP2}, a structurally distinct member of the p21^{CIP1} Cdk-inhibitor family, is a candidate tumor suppressor gene. *Genes Dev.* 9: 650-662.
- MEIRA LB, MAGAÑA-SCHWENCKE N, AVERBECK D and HENRIQUES JAP (1994) Involvement of the *PSO3* gene of *Saccharomyces cerevisiae* in intrachromosomal mitotic recombination and gene amplification. *Mol Gen Genet* 245: 750-759.
- MELESE T and XUE Z (1995) The nucleolus: an organelle formed by the act of building a ribosome. *Curr Opin Cell Biol* 7: 319-324.
- MELLON I and HANAWALT PC (1989) Induction of the *Escherichia coli* lactose operon selectively increases repair of its transcribed DNA strand. *Nature* 342: 95-98.
- MELLON IM, SPIVAK GS and HANAWALT PC (1987) Selective removal of transcription blocking DNA damage from the transcribed strand of the mammalian *DHFR* gene. *Cell* 51: 241-249.
- MILNE GT and WEAVER DT (1993) Dominant negative alleles of *RAD52* reveal a DNA repair/recombination complex including Rad51 and Rad52. *Genes Dev.* 7: 1755-1765.

- MITCHELL DL, JEN J and CLEVER JE (1992) Sequence specificity of cyclobutane pyrimidine dimers in DNA treated with solar (ultraviolet B) radiation. *Nucleic Acids Res* 20: 225-229.
- MONTELONE BA, PRAKASH S and PRAKASH L (1981). Recombination and mutagenesis in rad6 mutants of *Saccharomyces cerevisiae*: evidence for multiple functions of the RAD6 gene. *Mol Gen Genet* 184: 410-415.
- MORAIS MA Jr, VICENTE EJ, BROZMANOVA J, SCHENBERG ACG and HENRIQUES JAP (1996). Further characterisation of the yeast *pso4-1* mutant: interactions with *rad51* and *rad52* mutant after photoinduced psoralen lesions. *Curr Genet* 29: 211-218.
- MORRISON A, CHRISTENSEN RB, ALLEY J, BECK AK, BERNSTINE EG, LEMONTT JF and LAWRENCE CW (1989). REV3, a yeast gene whose function is required for induced mutagenesis, is predicted to encode a nonessential DNA polimerase. *J Bacteriol* 171: 5659-5667.
- MORTENSEN UH, BENDIXEN C, SUNJEVARIC J and ROTHSTEIN R (1996) DNA strand annealing is promoted by the yeast Rad52 protein *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 10729-10734.
- MOUSTACCHI E (1988) Photomutagenicity induced by psoralens: mechanism of repair and photomutagenicity. *Arch Toxicol* 12: 26-34.
- MOUSTACCHI E, CASSIER C, CHANET R, MAGAÑA-SCHWENCKE N, SAEKI N and HENRIQUES JAP (1983) Biological role of photoinduced crosslinks and monoadducts in yeast DNA: genetic control and steps involved in their repair. In: *Cellular Responses to DNA damage*. E.C. Friedberg and AB Bridges (eds). Alan Liss Inc., New York p. 87-106.

- MURIS DFR, BEZZUBOVA O, BUERSTEDDE JM, VREEKEN K, BALAJEE AS, OSGOOD CJ, TROELSTRA C, HOELJMAKERS JH, OSTERMANN K, SCHMIDT H et al. (1994) Cloning of human and mouse genes homologous to *RAD52*, a yeast gene involved in DNA repair and recombination. *Mutat. Res. DNA repair* 315: 295-305.
- NACKERDIEN Z, RAO G, CACCIUTTOLO MA, GAJEWSKI E and DIZDAROGLU M (1991) Chemical nature of DNA-protein cross-links produced in mammalian chromatin by hydrogen peroxide in the presence of iron or copper ions. *Biochemistry* 30: 4873-4879.
- NEFF NF, ELLIS NA, YE TZ, NOONAN J, HUANG K, SANZ M and PROYTCHEVA M (1999) The DNA helicase activity of *BLM* is necessary for the correction of the genomic instability of Bloom syndrome cells. *Mol Biol Cell* 10: 665-676.
- NELSON JR, LAWRENCE CW and HINKLE DC (1996) Thymine-thymine dimer bypass by yeast DNA polimerase ζ . *Science* 272: 1646-1649.
- NEW JH, SUGIYAMA T, ZAITSEVA E and KOWALCZYKOWSKI SC (1999) Rad52 protein stimulates DNA strand exchange by Rad51 and replication protein A. *Nature* 391:407-410.
- NICHOLS AF and SANCAR A (1992) Purification of PCNA as a nucleotide excision repair protein. *Nucleic Acids Res* 20: 2441-2556.
- NICKOLOFF JA and HOEKSTRA MF (1998) *DNA Damage and Repair*. Human press, Totowa, New Jersey, USA.
- OBGURN CE, OSHIMA J, POOT M, CHEN R, HUNT KE et al. (1997) An apoptosis-inducing genotoxin differentiates heterozygotic carriers for

Werner helicase mutations from wild-type and homozygous mutants. *Hum Genet* 101: 121-125.

OGAWA HK, JOHZUKA K, NAKAGAWA T, LEEM S-H and HAGIHARA AH (1995) functions of the yeast meiotic recombination genes *MRE11* and *MRE2*. *Adv Biophys* 31: 67-76.

OGAWA T, SHINOHARA A, NABETANI A, IKEYA T, YU X, EGELMAN EH and OGAWA H (1993) *Cold Spring Harbour Symp Quant Biol* 58: 567-576.

OHTAKE Y and YABUUCHI S (1991) Molecular cloning of the glutamylcysteine synthetase gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 7: 953-961.

OHUIGIN C, McCONNELL DJ, KELLY JM and VAN der PUTTEN WJ (1987) Methylene blue photosensitised strand cleavage of DNA: effects of dye binding and oxygen. *Nucleic Acids Res* 15: 7411-7427.

PACIFICI RE and DAVIES KJ (1991) Protein, lipid and DNA repair synthesis in oxidative stress: the free-radical theory of aging revisited. *Gerontology* 37: 166-180.

PAESI-TORESAN SO, PICH CT, GREY M, KESZENMAN D, BRENDDEL M and HENRIQUES JAP (1995) Gene *PSO5* of *Saccharomyces cerevisiae*, involved in repair of oxidative damage, is allelic to *RAD16*. *Curr Genet* 27: 493-495.

PAETKAU DW, RIESE JA, MacMORRAN WS, WOODS RA and GIETZ D (1994). Interaction of the yeast *RAD7* and *SIR3* proteins: implications for DNA repair and chromatin structure. *Genes Dev.* 8: 2035-2045.

- PARK MS (1995) Expression of human *RAD52* confers resistance to ionizing radiation in mammalian cells *J Biol Chem* 270: 15467-15470.
- PARK PU, DEFOSSEZ PA and GUARENTE L (1999) Effects of mutations in DNA repair genes on formation of ribosomal DNA circles and life span in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cel Biol* 19: 3848-3856.
- PAULOVICH AG, ARMOUR CD and HARTWELL LH (1998) The *Saccharomyces cerevisiae* *RAD9*, *RAD17*, *RAD24* and *MEC3* genes are required for tolerating irreparable, ultraviolet-induced DNA damage. *Genetics* 150: 75-93.
- PETES TD (1979) Yeast ribosomal DNA genes are located on chromosome XII. *Proc Natl Acad Sci USA* 76: 410-414.
- PRAKASH L (1976a) Lack of chemically induced mutation in repair deficient mutants of yeast. *Genetics* 78: 1101-1118.
- PRAKASH L (1976b) Effect of genes controlling radiation sensitivity on chemically induced mutations in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 83: 285-3101.
- PRAKASH L (1981) Characterisation of postreplication repair in *Saccharomyces cerevisiae* and effects of *rad6*, *rad18*, *rev3* and *rad52* mutations. *Mol Gen Genet* 184: 471-478.
- PRAKASH L and PRAKASH S (1980) Genetic analysis of error-prone repair systems in *Saccharomyces cerevisiae* p. 141-158. Em Generoso WM, Shelby MD and Serres FJ (ed.) DNA repair and mutagenesis in eukaryotes. *Plenum Publishing Corp.*, New York.

- PRICE EA, BOURNE SL, RADBOURNE R, LAWON PA, LAMERDIN J, THOMPSON LH and ARRAND JE (1997) Rare microsatellite polymorphisms in the DNA repair genes *XRCC1*, *XRCC3* and *XRCC5* associated with cancer in patients of varying radiosensitivity. *Somat Cell Mol Genet* 23: 237-247.
- PUNGARTNIK C, KERN MF, BRENDEL M and HENRIQUES JAP (1999) Mutant allele *pso7-1*, that sensitizes *Saccharomyces cerevisiae* to photoactivated psoralen, is allelic with *COX11*, encoding a protein indispensable for a functional cytochrome c oxidase. *Curr Genet* 36: 130-136.
- QUEROL CB, PAESI-TORESAN SO, MEIRA LB, BRENDEL M and HENRIQUES JAP (1994) Isolation and characterisation of three mutants with increased sensitivity to photoactivated 3-carbethoxypsoralen in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Genet* 25: 407-411.
- RAMOTAR D and MASSON J-Y (1996) *Saccharomyces cerevisiae* DNA repair processes: an update. *Mol Cell Biochem* 158: 65-75.
- REED SH, YOU Z and FRIEDBERG EC (1998) The yeast *RAD7* and *RAD16* genes are required for postincision events during nucleotide excision repair. *J Biol Chem* 273: 29481-29488.
- REEVES WH, STHOEGER ZM (1989) Molecular cloning of cDNA encoding the p70 (Ku) lupus autoantigen. *J Biol Chem* 264: 5047-52
- RESNICK MA and MARTIN P (1976) The repair of double-strand breaks in the nuclear DNA of *Saccharomyces cerevisiae* and its genetic control. *Mol Gen Genet* 143: 119-129.

- RESNICK MA, BOYCE J, COX B (1981) Postreplication repair in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* 146: 285-290.
- REYMOND A and BRENT R (1995) p16 proteins from melanoma-prone families are deficient in binding to Cdk4. *Oncogene* 11: 1173-1178.
- REYNOLDS RJ (1978) Removal of pyrimidine dimers from *Saccharomyces cerevisiae* nuclear DNA under non growth conditions as detected by a sensitive, enzymatic assay. *Mutation Res* 50: 43-56.
- RONG L and KLEIN H (1993) Purification and characterization of the Srs2 DNA helicase of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 268: 1252-1259.
- RUHLAND A, KIRCHER M, WILBORN F and BRENDDEL M (1981) A yeast mutant specifically sensitive to bifunctional alkylation. *Mutat Res* 91: 457-462.
- RUTCHENKO EP and SHERMAN F (1994) Physical constitution of ribosomal genes in common strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 10: 1157-1171.
- SADOWSKI I, MA J, TRIEZENBERG S and PTASHNE M (1988) GAL4-VP16 is an unusually potent transcriptional activator. *Nature* 335: 563-564.
- SAGE E, DOAM TL, BOYER V, HELLAND DE, KITTLER L, HELENE C and MOUSTACCHI E (1989) Oxidative DNA damage photoinduced 3-carbethoxypsoralen and other furocoumarins: mechanisms of photooxidation and recognition by repair enzymes. *J Mol Biol* 209: 297-314.

SANTORO N e THIELE DJ (1997) Oxidative stress responses in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: In: Hohmann S and Mager WH (Eds) *Yeast Stress Responses*, pp. 171-212. Heidelberg: Springer-Verlag GmbH & Co. KG

SCHIESTL RH and PRAKASH S (1988) *RAD1*, an excision repair gene of *Saccharomyces cerevisiae*, is also involved in recombination. *Mol Cell Biol* 8: 3619-3626.

SCHIESTL RH and PRAKASH S (1990) *RAD10*, an excision repair gene of *Saccharomyces cerevisiae*, is also involved in the *RAD1* pathway of mitotic recombination. *Mol Cell Biol* 10: 2485-2491.

SCHILD D, GLASSNER BJ, MORTIMER RK, CARLSON, M LAURENT BC (1992) Identification of *RAD16*, a yeast repair gene homologous to the recombinational repair gene *RAD54* and to the *SNF2* gene involved in transcription activation. *Yeast* 8: 385-395.

SCHIMMANG T, TOLLERVEY D, KERN H, FRANK R and HURT EC (1989) A yeast nucleolar protein related to mammalian fibrillarin is associated with small nucleolar RNA and is essential for viability. *EMBO J* 8: 4015-4024.

SCHMIDT CL, GREY M, SCHMIDT M, BRENDEL M and HENRIQUES JAP (1999) Allelism of *Saccharomyces cerevisiae* genes *PSO6*, involved in survival after 3-CPs + UVA induced damage, and *ERG3*, encoding the enzyme sterol C-5 desaturase. *Yeast* (in press).

Sen GUPTA DJ, ZHANG B, KRAMER B, POCHART P, FIELDS S and WICKENS M (1996) A three-hybrid system to detect RNA-protein interactions in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 8496-8501.

- SERRANO M, HANNON GJ and BEACH D (1993). A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4. *Nature* 366: 704-707.
- SHEN JC, GRAY MD, OSHIMA J and LOEB LA (1998) Characterization of Werner syndrome protein DNA helicase activity directionally substrate dependence and stimulation by replication protein A. *Nucleic Acids Res* 26: 2879-2885.
- SHEN ZY, CLOUD KG, CHEN DJ and PARK MS (1996) Specific interactions between the human Rad51 and Rad52 proteins. *J Biol Chem* 271: 148-152.
- SHINOHARA A and OGAWA T (1999) Stimulation by Rad52 of yeast Rad51- mediated recombination. *Nature* 391: 404-407.
- SHINOHARA A et al. (1993) Cloning of human, mouse and fission yeast recombination genes homologous to *RAD51* and *recA*. *Nature Genet.* 4: 239-243.
- SHINOHARA A, OGAWA H and OGAWA T (1992) Rad51 protein involved in repair and recombination in *S. cerevisiae* is a RecA-like protein. *Cell* 69: 457-470. (Erratum *Cell* 71: 180 (1992)).
- SHINOHARA A, OGAWA H, MATSUDA Y, USHIO N, IKEO K and OGAWA T (1993) Cloning of human, mouse and fission yeast recombination genes homologous to *RAD51* and *recA*. *Nat Genet* 4: 239-243.
- SIEDE W, FRIEDL AA, DIANOVA I, ECKARDT SCHUPP F and FRIEDBERG EC (1996). The *Saccharomyces cerevisiae* Ku autoantigen homologue affects radiosensitivity only in the absence of homologous recombination. *Genetics* 142: 91-102.

- SINCLAIR DA, GUARENTE L (1997) Extrachromosomal rDNA circles – a cause aging in yeast. *Cell* 91: 1033-1042.
- SINCLAIR DA, MILLS K and GUARENTE L (1997) Accelerated aging and nucleolar fragmentation in yeast *sgs1* mutants. *Science* 277: 1313-1316.
- SINCLAIR DA, MILLS K and GUARENTE L (1998a) Molecular mechanisms of yeast aging. *Trends Biochem Sci* 23:131-4.
- SINCLAIR DA, MILLS K and GUARENTE L (1998b) Aging in *Saccharomyces cerevisiae*. *Ann. Rev. Microbiol.* 52: 533-560.
- SINDEN RR and COLE RS (1978) Repair of cross-linked DNA and survival of *Escherichia coli* treated with psoralen plus lights: effects of mutation influencing genetic recombinations and DNA metabolism. *J Bacteriol* 136: 538-547.
- SMEAL T, CLAUS J, KENNEDY B, COLE F and GUARENTE L (1996) Loss of transcriptional silencing causes sterility in old mother cells of *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell* 84: 633-642.
- SMERDON MA and THOMA F (1990) Site-specific DNA repair at the nucleosome level in a yeast minichromosome. *Cell* 61: 675-684.
- SMIDER V and CHU G (1997) The end joining reaction in V(D)J recombination. *Semin Immunol* 9: 713-732.
- SMITH SJ and PARKS LW (1993) The *ERG3* gene in *Saccharomyces cerevisiae* is required for the utilisation of respiratory substrates and in heme-deficient cells. *Yeast* 9: 1177-1187.

- SOHAL RS and WEINDRUCH R (1996) Oxidative stress, caloric restriction and aging. *Science* 273: 59-63.
- STEWART E, CHAPMAN CR, AL-KHODIARY F, CARR AM and ENOCH T (1997) *rqh1+*, a fission yeast gene related to the Bloom and Werner syndrome genes, is required for reversible S-phase arrest. *EMBO J* 16: 2682-2692.
- SUGIMURA T, OKABE K, NAGAO M (1966) The metabolism of 4-nitroquinoline-1-oxide, a carcinogen. 3. An enzyme catalysing the conversion of 4-nitroquinoline-1-oxide to 4-hydroxyaminoquinoline-1-oxide in rat liver and hepatomas. *Cancer Res* 26: 1717-1721.
- SUNG P, REYNOLDS P, PRAKASH L and PRAKASH S (1993) Purification and characterisation of the *Saccharomyces cerevisiae* RAD1/RAD10 endonuclease. *J Biol Chem* 268: 26391-26399.
- SVEJSTRUP JQ, WANG Z, , FEAVER WJ, WU X, DONAHUE F, FRIEDBERG EC and KORNBERG RD (1995) Different forms of yeast RNA polimerase transcription factor IIH (TFIIH) for transcription and DNA repair: holoTFIIH and a nucleotide excision repairosome. *Cell* 80: 21-28.
- SWEDER KS (1994) Nucleotide excision repair in yeast. *Curr Genet* 27: 1-16.
- SWEDER KS and HANAWALT PC (1992) Preferential repair of cyclobutane pyrimidine dimers in the transcribed strand of a gene in yeast chromosomes and plasmids is dependent on transcription. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 10696-10700.

- TAYLOR JS, GARRET DS and COHRS MO (1988) Solution-state structure of the Dewar pyriminone photoproduct of thymidyl-(3'-5')-thymidine. *Biochemistry* 27: 7206-7215.
- TERLETH C, SCHENK P, POOT R, BROUWER J and Van DE PUTTE (1990) Differential repair of UV damage in rad mutants of *Saccharomyces cerevisiae*: a possible function of G2 arrest upon UV irradiation. *Mol Cell Biol* 10: 4678-4684.
- THACKER J (1999) A surfeit of RAD51-like genes? *Trends Genet* 15: 166-168.
- TJIAN R and MANIATIS T (1994) Transcriptional activation: A complex puzzle wiith few easy pieces. *Cell* 77: 5-8.
- TOMKINSON AE, BARDWELL AJ, BARDWELL L, TAPPE NJ and FRIEDBERG EC (1993) Yeast DNA repair proteins Rad1 and Rad10 constitute a single-stranded DNA endonuclease. *Nature* 362: 860-862.
- TOYOSHIMA H and HUNTER T (1994). p27, a novel inhibitor of G1 cyclin-Cdk protein kinase activity, is related to p21. *Cell* 78: 67-74.
- TROELSTRA C, JASPERS NG (1994) Recombination and repair. Ku starts at the end. *Curr Biol* 4: 1149-1151.
- TSUKAMOTO Y, KATO J and IKEDA H (1996) Hdf1, a yeast Ku-protein homologue, is involved in illegitimate recombination, but not in homologous recombination. *Nucleic Acids Res* 24: 2067-2072.
- TSUKAMOTO Y, KATO J and IKEDA H (1997) Silencing factors participate in DNA repair and recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature* 388: 900-903.

- TUITE MF and COX BS (1981). *RAD6+* gene of *Saccharomyces cerevisiae* codes for two mutationally separable deoxyribonucleic acid repair functions. *Mol Cell Biol* 1: 153-157.
- TZAGOLOFF A, CAPITANIO N, NOBREGA MP and GATTI D (1990) Cytochrome oxidase assembly in yeast requires the product of *COX11*, a homologue of the *P. denitrificans* protein encoded by *ORF3*. *EMBO J* 9: 2759-2764.
- Van GOOL AJ, VERHAGE R, SWAGEMAKERS SM, van DE PUTTE P, BROUWER J, TROELSTRA C, BOOTSMA D and HOELJMAKERS JH (1994) *RAD26*, the functional *S. cerevisiae* homologue to the Cockayne Syndrome B gene *ERCC6*. *EMBO J* 13: 5361-5369.
- VERHAGE R, ZEEMAN AM, de GROOT N, GLEIG F, BANG DD, VAN DE PUTTE P and BROUWER J (1994) The *RAD7* and *RAD16* genes, which are essential for pyrimidine dimer removal from silent mating type loci, are also required for repair of nontranscribed strand of an active gene in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 14: 6135-6142.
- VERHAGE RA, VAN DE PUTE P, BROUWER J (1996) Repair of rDNA in *Saccharomyces cerevisiae*: *RAD4*-independent strand-specific nucleotide excision repair of RNA polimerase I transcribed genes. *Nucleic Acids Res* 24: 1020-1025.
- VIDAL M (1997) The reverse two-hybrid system. In *The yeast two-hybrid system* PL Bartel and S Fields (Eds). New York, Oxford, Oxford University Press pp. 109-147.
- VIDAL M and ENDOH H (1999) Prospects for drug screening using the reverse two-hybrid system. *Trends Biotech* 17:374-381.

- VIDAL M, BRACHMANN R, FATTAEY A, HARLOW E and BOEKE JD (1996) Genetic selection for the dissociation of protein-protein and DNA-protein interactions. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 10315-10320.
- VOJTEK AB, HOLLENBERG SM, COOPER JA (1993) Mammalian Ras interacts directly with the serine/threonine kinase Raf. *Cell* 74: 205-214.
- WANG Z, WEI S REED S, WU X, SVEJSTRUP J, FEAVER W, KORNBERG R and FRIEDBERG E (1997) The *RAD7*, *RAD16* and *RAD23* genes of *Saccharomyces cerevisiae*: Requirement for transcription-independent nucleotide excision repair in vitro and interactions between the genes products. *Mol Cell Biol* 17: 635-643.
- WATT P, LOUIS E, BORTS R and HICKSON I (1995) Sgs1: a eukaryotic homologue of *E. coli* RecQ that interacts with topoisomerase II in vivo is required for faithful chromosome segregation. *Cell* 81: 253-260.
- WATT PM, HICKSON ID, CBORTS RH and LOUIS EJ (1996) SGS1, a homologue of the Bloom's and Werner's Syndrome genes, is required for maintenance of genome stability in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 144: 935-945.
- WEI H, CAI Q, RAHN R, ZHANG X (1997) Singlet oxygen involvement in ultraviolet (254nm) radiation-induced formation of 8-hydroxydeoxyguanosine in DNA. *Free Rad Biol Med* 23:148-154.
- WEINERT TA and HARTWELL LH (1988) The *RAD9* gene controls the cell cycle response to DNA damage in *Saccharomyces cerevisiae*. *Science* 241: 317-322.

- WEINERT TA and HARTWELL LH (1990). Characterisation of *RAD9* of *Saccharomyces cerevisiae* and evidence that its function acts posttranslationally in cell cycle arrest after DNA damage. *Mol Cell Biol* 10: 6554-6564.
- WEINERT TA and HARTWELL LH (1993) Cell cycle arrest of *cdc* mutants and specificity of the *RAD9* checkpoint. *Genetics* 134: 63-80.
- WEINERT TA, KISER GL and HARTWELL LH (1994) Mitotic checkpoint genes in budding yeast and the dependence of mitosis on DNA replication and repair. *Genes Dev* 8: 652-665.
- WOOD RD (1996) DNA repair in eukaryotes. *Ann Ver Biochem* 65: 135-167.
- WOOD RD (1997) Nucleotide excision repair in mammalian cells. *J Biol Chem* 272: 23465-23468.
- XIAO W, CHOW BL and RATHGEBER L (1996) The repair of DNA methylation damage of *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Genet* 30:461-468.
- YAMAGATA K, KATO JI, SHIMAMOTO A, GOTO M, FURUICHI Y and IKEDA H (1998) Bloom's and Werner's syndrome genes suppress hyperrecombination in yeast *sgs1* mutant: implication for genomic instability in human diseases. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 8733-8738.
- YANEVA M, KOWALEWSKI T and LIEBER MR (1997) Interaction of DNA-dependent protein kinase with DNA and with Ku: Biochemical and atomic-force microscopy studies. *EMBO J* 16: 5098-5112.

YU CE, OSHIMA J, FU YH, WIJSMAN EM, HISAMA F et al. (1996) Positional cloning of the Werner's syndrome gene. *Science* 272: 258-262.

YU Z, CHEN J, FORD N, BRACKLEY ME and GLICKMAN BW (1999) Human DNA repair systems: an overview. *Envir Mol Mutag* 33: 3-20.

ZERVOS AS, GYURIS J, BRENT R (1993). Mxi1, a protein that specifically interacts with Max to bind Myc-Max recognition sites. *Cell* 72: 223-232.

ZHANG J and LAUTAR S (1996) A yeast three-hybrid method to clone ternary protein complex components. *Anal Biochem* 242: 68-72.

ZHANG X, ROSENSTEIN BS, WANG Y, LEBWOHL M, MITCHELL DM, WEI H (1997) Induction of 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine by ultraviolet radiation in calf thymus DNA and HeLa cells. *Photochem Photobiol* 65:119-124.